



**POLITECHNIKA
RZESZOWSKA**
im. IGNACEGO ŁUKASIEWICZA



**WYDZIAŁ
CHEMICZNY**
POLITECHNIKI RZESZOWSKIEJ

AUTOREFERAT

dr JOANNA NIZIOŁ

Katedra Polimerów i Biopolimerów

Wydział Chemiczny

Politechniki Rzeszowskiej im. Ignacego Łukasiewicza

ZAŁĄCZNIK NR 3

DO WNIOSKU O PRZEPROWADZENIE POSTĘPOWANIA HABILITACYJNEGO

Rzeszów 2021

IMIĘ I NAZWISKO

Joanna Nizioł

POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE

- 17.06.2008** **Uzyskanie tytułu magistra chemii**
- Studia magisterskie (jednolite, pięcioletnie 10.2003 – 06.2008), Uniwersytet Jagielloński, Wydział Chemii. Panel specjalizacyjny: chemia biologiczna. Temat pracy magisterskiej: Struktura podjednostkowa bakteryjnej anteny fotosyntetycznej LH1. Praca magisterska wykonana w Zakładzie Fizjologii i Biochemii Roślin na Wydziale Biochemii Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierownictwem prof. dr hab. Leszka Fiedora
- 25.02.2015** **Uzyskanie stopnia naukowego doktora nauk chemicznych w dyscyplinie technologia chemiczna**
- Temat rozprawy doktorskiej: "Borowe pochodne nukleozydów i nukleotydów". Praca realizowana w Pracowni Chemii Bioorganicznej pod kierownictwem prof. dr hab. inż. Tomasza Rumana. Rozprawa doktorska została wyróżniona przez Radę Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej im. Ignacego Łukasiewicza.

INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

- Od 08.12.2020** Profesor uczelni w grupie pracowników badawczo-dydaktycznych w Katedrze Polimerów i Biopolimerów Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej im. Ignacego Łukasiewicza w pełnym wymiarze czasu pracy.
- 10.2016 – 11.2020** Adiunkt w Zakładzie Polimerów i Biopolimerów Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej im. Ignacego Łukasiewicza w pełnym wymiarze czasu pracy.
- 10.2016 – 09.2016** Asystent w Zakładzie Polimerów i Biopolimerów Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej im. Ignacego Łukasiewicza w pełnym wymiarze czasu pracy.
- 10.2015 – 09.2016** Asystent w Pracowni Chemii Bioorganicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej im. Ignacego Łukasiewicza w pełnym wymiarze czasu pracy.
- 03.2015 – 09.2015** Starszy specjalista naukowo-techniczny w Pracowni Chemii Bioorganicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej im. Ignacego Łukasiewicza w pełnym wymiarze czasu pracy.

- 09.2012 – 02.2015** Starszy referent techniczny w Pracowni Chemii Bioorganicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej im. Ignacego Łukasiewicza w pełnym wymiarze czasu pracy.
- 01.2010 – 08.2012** Starszy referent techniczny w Centrum Biotechnologicznym Katedry Biochemii i Biotechnologii na Wydziale Chemicznym, Politechniki Rzeszowskiej im. Ignacego Łukasiewicza w pełnym wymiarze czasu pracy.
- 02.2009 – 10.2009** Staż absolwencki w Centrum Biotechnologicznym Katedry Biochemii i Biotechnologii Wydziału Chemicznego, Politechniki Rzeszowskiej na stanowisku asystenta w pełnym wymiarze czasu pracy.

4. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1 PKT. 2 USTAWY PRAWA O SZKOLNICTWIE WYŻSZYM I NAUCE Z DNIA 20 LIPCA 2018 r.

4.1. Osiągnięcie naukowe stanowiące znaczny wkład w rozwój dyscypliny inżynieria chemiczna

Moje osiągnięcie naukowe zgłoszone do postępowania habilitacyjnego obejmuje cykl 10 powiązanych tematycznie artykułów naukowych pod wspólnym tytułem:

„Zastosowanie spektrometrii mas z miękką jonizacją w analizie związków małowcząsteczkowych”

Wszystkie prace w roku ich opublikowania w czasopismach naukowych w ostatecznej formie były ujęte w wykazie sporządzonym zgodnie z przepisami wydanymi na podstawie art. 267 ust. 2 pkt 2 lit. B.

4.2. Wykaz powiązanych tematycznie artykułów naukowych wraz z określeniem wkładu w ich powstanie

We wszystkich pracach [H1-10] jestem pierwszym lub ostatnim współautorem. Ponadto w sześciu artykułach naukowych pełnię funkcję autora korespondencyjnego. Sumaryczny Impact Factor dla tych prac, podany zgodnie z rokiem ich publikacji wynosi **39,2**. Ilość punktów Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN) wynosi **730** w tym 580 (wg punktacji obowiązującej od 2019 r.) i 150 (wg punktacji obowiązującej w latach 2011-2018). Łączna suma cytowań (bez autocytowań) według bazy Web of Science (WoS) tych prac wynosi **86 (77)**. Oświadczenia wszystkich współautorów poszczególnych prac, z podaniem indywidualnego merytorycznego wkładu każdego z nich w ich powstanie zostały przedstawione w załączniku nr 5.

[H1] J. Nizioł, J. Sunner, I. Beech, K. Ossoliński, A. Ossolińska, T. Ossoliński, A. Płaza and T. Ruman Localization of metabolites of human kidney tissue with infrared laser-based selected reaction monitoring mass spectrometry imaging and silver-109 nanoparticle-

based surface assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging. *Analytical Chemistry*, 2020, 17, 4251-4258.

IF₂₀₂₀ = 6.986; MEiN₂₀₂₀ = 140

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań oraz merytorycznej analizie podjętego zagadnienia. Przygotowałam badany materiał. Brałam udział w opracowaniu koncepcji zestawu badawczego LARESI oraz wykonaniu aparatury LARESI. Brałam udział w rejestracji widm MS, MS/MS oraz MSI. Przetworzyłam, zinterpretowałam i opisałam wszystkie wyniki pomiarów analitycznych. Przygotowałam manuskrypt oraz przeprowadziłam proces publikacji (ustosunkowanie się do otrzymanych recenzji i uwag edytora, wprowadzanie sugerowanych zmian, korekta błędów itd.).

[H2] J. Nizioł, Ł. Uram, M. Szuster, J. Sekuła, T. Ruman, Biological activity of *N*(4)-boronated derivatives of 2'-deoxycytidine, potential agents for boron-neutron capture therapy, *Bioorg. Med. Chem.*, 2015, 23, 6297-6304

IF₂₀₁₅ = 2.923; MEiN₂₀₁₅ = 30

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań oraz merytorycznej analizie podjętego zagadnienia. Wykonałam proces syntezy, oczyszczenia i wydzielenia nowej borowej pochodnej nukleotydów. Wykonałam pomiary próbek za pomocą MS. Brałam udział w rejestracji widm NMR. Przetworzyłam, zinterpretowałam i opisałam wszystkie wyniki pomiarów analitycznych (NMR, MS) dotyczących otrzymanego związku. Brałam udział w przygotowaniu manuskryptu oraz przeprowadzeniu procesu publikacji (ustosunkowanie się do otrzymanych recenzji i uwag edytora, wprowadzanie sugerowanych zmian, korekcie błędów itd.).

[H3] J. Nizioł, K. Osoliński, T. Osoliński, A. Osolińska, V. Bonifay, J. Sekuła, Z. Dobrowolski, J. Sunner, I. Beech and T. Ruman, Surface-transfer mass spectrometry imaging of renal tissue on gold nano-particle enhanced target, *Analytical Chemistry*, 2016, 88, 7365-71

IF₂₀₁₆ = 6.320; MEiN₂₀₁₆ = 45

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań oraz merytorycznej analizie podjętego zagadnienia. Przygotowałam badany materiał. Brałam udział w rejestracji widm MS, MS/MS oraz MSI. Przetworzyłam, zinterpretowałam i opisałam wszystkie wyniki pomiarów analitycznych. Brałam udział w przygotowaniu manuskryptu oraz przeprowadzeniu procesu publikacji (ustosunkowanie się do otrzymanych recenzji i uwag edytora, wprowadzanie sugerowanych zmian, korekta błędów itd.).

[H4] J. Nizioł*, J. Sekuła, T. Ruman, Visualizing spatial distribution of small molecules in the rhubarb stalk (*Rheum rhabarbarum*) by surface-transfer mass spectrometry imaging. *Phytochemistry*, 2017, 139, 72-80

IF₂₀₁₅ = 2.923; MEiN₂₀₁₅ = 30

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań oraz merytorycznej analizie podjętego zagadnienia. Przygotowałam badany materiał. Brałam udział w rejestracji widm MSI. Przetworzyłam, zinterpretowałam i opisałam wszystkie wyniki pomiarów analitycznych. Przygotowałam manuskrypt oraz przeprowadziłam proces publikacji (ustosunkowanie się do otrzymanych recenzji i uwag edytora, wprowadzanie sugerowanych zmian, korekta błędów itd.).

[H5] J. Nizioł, M. Misiorek, T. Ruman, Mass spectrometry imaging of low molecular weight metabolites in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa Duch.*) cv. Primoris with ^{109}Ag nanoparticle enhanced target. *Phytochemistry*, 2019, 159, 11-19

IF₂₀₁₉= 3.044; MEiN₂₀₁₉ = 100

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań oraz merytorycznej analizie podjętego zagadnienia. Wykonałam rejestracje widm MSI i MS/MS. Przetworzyłam, zinterpretowałam i opisałam wszystkie wyniki pomiarów analitycznych. Brałam udział w przygotowaniu manuskryptu oraz przeprowadzeniu procesu publikacji.

[H6] J. Nizioł*, K. Ossoliński, B. P. Tripet, V. Copie, A. Arendowski, T. Ruman Nuclear magnetic resonance and surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-based serum metabolomics of kidney cancer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2020, 412, 5827-5841

IF₂₀₂₀= 4.142; MEiN₂₀₂₀ = 70

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań oraz merytorycznej analizie podjętego zagadnienia. Przygotowałam ekstrakty do analizy NMR i MS. Przetworzyłam, zinterpretowałam i opisałam wszystkie wyniki pomiarów analitycznych (NMR, MS). Wykonałam analizę statystyczną. Przygotowałam manuskrypt oraz przeprowadziłam proces publikacji (ustosunkowanie się do otrzymanych recenzji i uwag edytora, wprowadzanie sugerowanych zmian, korekta błędów itd.).

[H7] J. Nizioł*, K. Ossoliński, B. P. Tripet, V. Copie, A. Arendowski, T. Ruman. Nuclear magnetic resonance and surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-based metabolome profiling of urine samples from kidney cancer patients. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021, 193,113752

IF₂₀₂₀= 3.935; MEiN₂₀₂₀ = 100

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań oraz merytorycznej analizie podjętego zagadnienia. Przygotowałam ekstrakty do analizy NMR i MS. Przetworzyłam, zinterpretowałam i opisałam wszystkie wyniki pomiarów analitycznych (NMR, MS). Wykonałam analizę statystyczną. Przygotowałam manuskrypt oraz przeprowadziłam proces publikacji (ustosunkowanie się do otrzymanych recenzji i uwag edytora, wprowadzanie sugerowanych zmian, korekta błędów itd.).

[H8] J. Nizioł*, V. Copie, B. P. Tripet, L.B. Nogueira, K.O.P.C. Nogueira, K. Ossoliński, A. Arendowski, T. Ruman. Metabolomic and elemental profiling of human tissue in kidney cancer. *Metabolomics*, 2021, 17, 30

IF₂₀₂₀= 4.290; MEiN₂₀₂₀ = 100

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań oraz merytorycznej analizie podjętego zagadnienia. Przygotowałam ekstrakty do analizy NMR, MS i ICP-OES. Przetworzyłam, zinterpretowałam i opisałam wszystkie wyniki pomiarów analitycznych. Wykonałam analizę statystyczną. Przygotowałam manuskrypt oraz przeprowadziłam proces publikacji (ustosunkowanie się do otrzymanych recenzji i uwag edytora, wprowadzanie sugerowanych zmian, korekta błędów itd.).

[H9] A. Kołodziej, T. Ruman, J. Nizioł* Gold and silver nanoparticles-based laser desorption/ionization mass spectrometry method for detection and quantification of carboxylic acids. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2020, 55,e4604

IF₂₀₂₀= 1.982; MEiN₂₀₂₀ = 70

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań oraz merytorycznej analizie podjętego zagadnienia. Brałam udział w analizie danych MS. Brałam udział w przygotowaniu manuskryptu oraz przeprowadzeniu procesu publikacji

[H10] J. Nizioł*, V. Bonifay, K. Ossoliński, T. Ossoliński, A. Ossolińska, J. Sunner, I. Beech, A. Arendowski and T. Ruman, Metabolomic study of human tissue and urine in clear cell renal carcinoma by LC-HRMS and PLS-DA, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2018, 410, 3859-3869

IF₂₀₁₈= 3.286; MEiN₂₀₁₈ = 40

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań oraz merytorycznej analizie podjętego zagadnienia. Przygotowałam badany materiał. Brałam udział w rejestracji widm LC-MS. Przeprowadziłam interpretacje i opis wszystkich wyników pomiarów analitycznych. Przygotowałam manuskrypt oraz przeprowadziłam proces publikacji (ustosunkowanie się do otrzymanych recenzji i uwag edytora, wprowadzanie sugerowanych zmian, korekta błędów itd.).

4.3. Wpływ na dyscyplinę naukową

Zakres tematyczny podejmowany w ramach mojej działalności naukowej zawartej w wymienionych publikacjach **[H1-H10]** mieści się w zakresie dyscypliny Inżynieria Chemiczna. Prowadzone przeze mnie wielowątkowe badania łączą w sobie wiele zagadnień z obszaru spektrometrii mas i nanomateriałów. Mój główny watek badawczy bazował na opracowywaniu nowych metod wytwarzania nanocząstek metalicznych oraz nowych metod jonizacji w spektrometrii mas, które potencjalnie mogą znaleźć zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu począwszy od monitorowania procesów po identyfikację związków

chemicznych. Najważniejsze aspekty technologiczne zawarte w moich badaniach mające największy wpływ na dyscyplinę inżynieria chemiczna to:

- Opracowanie nowej, unikalnej w skali świata metody LARESI do badania materiałów naturalnych, syntetycznych czy też kontroli jakości materiałów
- Wytwarzania nanocząstek metalicznych
- Pokrywanie nanocząstkami różnych typów materiałów
- Zastosowanie nanocząstek do detekcji związków chemicznych
- Testy na złożonych mieszaninach biologicznych

Niesłabnące zainteresowanie zastosowaniem spektrometrii mas i syntezy nanocząstek w inżynierii chemicznej jest widoczne przykładowo w zestawieniu artykułów naukowych w bazie Scopus, która wskazuje ponad 61 000 prac opublikowanych w kategorii spektrometrii mas (MS) oraz inżynierii chemicznej.

Przemysł i sektor produkcyjny standardowo korzysta z wielu metod analitycznych zarówno w celu opracowywania nowych produktów, przetwarzania, jak i kontroli jakości. Jednym z najbardziej przydatnych narzędzi analitycznych o wielu zastosowaniach przemysłowych i produkcyjnych jest spektrometria mas. MS rutynowo wykorzystywana jest w kryminalistyce, monitorowaniu zanieczyszczeń oraz w przemyśle spożywczym. Zwłaszcza producenci żywności wymagają potężnych narzędzi analitycznych, aby zachować wysokie standardy bezpieczeństwa i jakości dostarczanej żywności, zgodne z obowiązującymi przepisami i normami. Obecnie dużym problemem analitycznym w tym sektorze jest kwestia pozostałości różnych pestycydów w żywności, które ze względu na szeroki wachlarz swoich właściwości fizykochemicznych i obecności w setkach różnych typów próbek stanowią wyzwanie w szybkiej i opłacalnej analizie (Perreault et al., 2019).

Kluczowe znaczenie dla konkurencyjności przemysłu chemicznego mają badania, rozwój, innowacje i postęp technologiczny, które stanowią podstawę wzrostu gospodarczego. Przykładem innowacji w chemii analitycznej i produkcji są przenośne przyrządy analityczne, które mogą być używane do identyfikacji i weryfikacji substancji chemicznych i materiałów w terenie przy użyciu różnych technik spektroskopowych. Ciekawym przykładem jest połączenie spektrometrii mas z elektrochirurgiczną dysekcją tkanki co pozwala z dużą precyzją określić rodzaj tkanki *in vivo*. Dzięki temu możliwe staje się rozróżnienie komórek nowotworowych od zdrowych i usunięcie guza bez naruszania zdrowych obszarów (Balog et al., 2013). Daje to chirurgom możliwość nie tylko identyfikacji granicy między komórkami nowotworowymi a normalnymi, ale pozwala również rozróżnić między sobą różne rodzaje nowotworów a także ocenić, czy komórki rakowe zostały całkowicie usunięte (Zhang et al., 2017).

Obrazowanie za pomocą spektrometrii mas (MSI) często wykorzystywane jest w materiałoznawstwie. Przykładowo stosunkowo niedawno wykonano MSI w analizie rozmieszczenia związków chemicznych na wybranych powierzchniach w nanoskali. (Liang et al., 2017).

4.3. Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników, wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

4.3.1. Wprowadzenie

Związki o niskiej masie cząsteczkowej (LMWC z ang. low molecular weight compounds) to termin stosowany w chemii analitycznej dla określenia dowolnych związków o masie cząsteczkowej poniżej 1000 Da. W rezultacie klasyfikacja ta obejmuje związki o bardzo różnych właściwościach chemicznych, takie jak lipidy, węglowodany, związki o działaniu farmakologicznym lub też przykładowo alkaloidy. Jakościowy i ilościowy pomiar LMWC w złożonych próbkach jest jednym z ważniejszych celów w wielu dziedzinach chemii analitycznej, w tym metabolomiki, lipidomiki, nauk farmaceutycznych, kryminalistyki, nauk o środowisku i żywności. Głównym wyzwaniem w analizie LMWC jest ich szeroki zakres właściwości chemicznych, co w przeciwieństwie do proteomiki, uniemożliwia opracowanie jednej metody MS, która byłaby stosowalna dla całej gamy omawianych związków. Inne wyzwania stojące przed analizą LMWC w układach biologicznych obejmują ich wybitnie szeroki zakres stężeń i szybki współczynnik konwersji w porównaniu z ekspresją białek. Złożoność próbki może być dodatkowym wyzwaniem, tak jak w przypadku większości eksperymentów bioanalitycznych (Hadacek and Bachmann, 2015).

4.3.1.1. Metody laserowej jonizacji/desorpcji w spektrometrii mas

Analiza niektórych LMWC była już możliwa za pomocą najstarszych metod jonizacji w spektrometrii mas, takich jak jonizacja elektronami czy polem, które były już dobrze rozwinięte, w momencie opracowania pierwszych metod laserowych w MS. Nowe metody jonizacji otworzyły nowe możliwości nie tylko w analizie LMWC. Jednak pierwsze próby zastosowania LDI MS w latach 70 XX wieku pokazały główne ograniczenia tej metody, zwłaszcza silną fragmentację jonów oraz fakt, że związki muszą być w stanie absorbować światło zastosowanego lasera, co znacznie ograniczało obszar wykorzystania tej metody. Prawdziwym przełomem w tej dziedzinie było odkrycie w 1985 r. przez Karasa i Hillenkampa desorpcji/jonizacji laserowej wspomaganej matrycą (MALDI), jednej z najczęściej stosowanych metod łagodnej jonizacji obok elektrorozpylania (ESI) (Karas et al., 1985). Jest to jedna z najbardziej selektywnych, czułych i wydajnych metod stosowanych przede wszystkim w analizie nielotnych i labilnych związków o dużej masie cząsteczkowej, takich jak białka, kwasy nukleinowe, polisacharydy i polimery syntetyczne. Główne zalety MALDI to (i) miękka i wydajna desorpcja/jonizacja różnych lotnych i nielotnych substancji przy stosunkowo niskim stopniu fragmentacji, (ii) duża tolerancja na obecność soli i detergentów, (iii) prostota widma, ponieważ większość jonów jest pojedynczo naładowana, (iv) bardzo wysoka czułość detekcji w szerokim zakresie mas rzędu attomoli, (v) wysoka dokładność wyznaczania masy, (vi) szybka analiza i (vii) względnie proste oprzyrządowanie oraz pomiar.

Podstawą techniki MALDI jest zastosowanie matrycy chemicznej, w dużym nadmiarze w stosunku do analitu, w postaci małych cząsteczkowych związków organicznych. Matrycę dobiera się w zależności od właściwości analizowanych substancji. Dobrze dobrana matryca

w MALDI powinna spełniać szereg warunków m.in: (i) zdolność do absorpcji światła przy długości fali emitowanej przez laser, (ii) rozpuszczalność w tych samych rozpuszczalnikach co analit, (iii) zdolność do przenoszenia protonów podczas procesu jonizacji, (iv) trwałość w warunkach próżni, (v) zapobieganie tworzeniu agregatów cząsteczek analitu. Bardzo ważne jest w jaki sposób matryca i analit oddziałują na siebie. Podczas typowego przygotowywania próbki metodą „wysychającej kropli” mała objętość roztworu analitu (około 10^{-6} – 10^{-9} M) i prawie nasycony roztwór matrycy (ok. 0,01–0,1 M) miesza się z sobą, następnie rozpuszczalnik odparowuje i tak przygotowaną próbkę umieszcza się w próżni spektrometru mas. Po odparowaniu rozpuszczalnika matryca krystalizuje w określonej morfologii, tworząc warstwę kryształów o małej grubości i wielkości od kilku do kilkuset mikrometrów, w zależności od rodzaju matrycy, rozpuszczalnika, właściwości powierzchni podłoża i innych szczegółów przygotowywania preparatu. Typowy stosunek molowy analitu do matrycy wynosi od około 10^{-2} dla związków, takich jak słabo protonowalne leki bez grup funkcyjnych o charakterze zasadowym, do około 10^{-7} dla czwartorzędowych pochodnych soli amoniowych. Większość znanych popularnych matryc ko-krystalizuje ilościowo z cząsteczkami analitu (do maksymalnego stężenia) tworząc jednorodną warstwę o grubości kilkudziesięciu μm (Hillenkamp et al., 2013).

Do tej pory technika MALDI nie była stosowana zbyt często w analizie związków małowielkościowych ($MW < 1000$ Da), ze względu na liczne niedogodności związane z zastosowaniem tradycyjnych matryc organicznych m.in. (i) nakładaniem się sygnałów matrycy na sygnały badanej substancji, (ii) nasyceniem detektora w zakresie niskich wartości m/z (< 1500), (iii) tworzeniem się adduktów z matrycą, (iv) niską wydajnością jonizacji dla większości obojętnych związków organicznych, (v) niejednorodną ko-krystalizacją i (vi) problematyczną kalibracją w niskim zakresie m/z . Ponadto, stosowanie tradycyjnych matryc wymagających obecności kwasów może powodować rozpad niektórych substancji. Najważniejszym jednak problemem jest trudna, mało dokładna i zawodna kalibracja (np. w metodzie MALDI) zewnętrzna oraz także wewnętrzna oparta na zbyt małej ilości punktów kalibracyjnych w niskim rejonie m/z , najczęściej pochodzących od sygnałów adduktów matrycy, prowadząc do znacznych rozbieżności w analizie rzędu nawet kilkuset ppm, co jest niezwykle kłopotliwe i niedopuszczalne w przypadku identyfikacji związków. Jest to szczególnie ważne w przypadku mieszanin o nieznanym składzie. Istotnym problemem związanym z kalibracją jest również grubość warstwy matryca-analit na płytce. W przypadku matryc tradycyjnych ko-krystalizujących z analitem stosunkowo duża grubość warstwy skutkuje dużym rozrzutem przestrzennym paczki jonów podążających do detektora, obniżając rozdzielczość oraz dokładność wyznaczenia m/z .

Od czasu opracowania techniki MALDI zaproponowano szereg metod, które niwelowały konieczność użycia matryc organicznych. Pierwszą alternatywą było wykorzystanie przez Tanakę w 1988 r. nanocząstek kobaltu o średnicy 30 nm zawieszonych w glicerolu jako ciekłej matrycy, w której rozpuszczany był analit (Tanaka et al., 1988). Dalszy rozwój metod bezmatrycowych nastąpił w 1995 r, kiedy Jan Sunner opracował technikę laserowej desorpcji/ionizacji wspomaganą powierzchnią (SALDI z ang. surface-assisted laser

desorption/ionization), w której zastosowano stałe podłoże w postaci cząstek grafitu o wielkości 2-150 μm zawieszonych w glicerolu (Sunner et al., 1995). Obecnie w handlu dostępnych jest kilka rodzajów matryc nieorganicznych opartych o związki metalu lub tlenku metalu (Al, Mn, Mo, Sn, SnO_2 , TiO_2 , W, WO_3 , Zn i ZnO), zawieszone w glicerolu lub ciekłej parafinie. Wszystkie metody SALDI łączy kilka zalet, takich jak łatwe przygotowanie próbek, szybkie pomiary i redukcja tła chemicznego pochodzącego od jonów matrycy organicznej. Jednak z matrycami w postaci zawiesiny wiążą się liczne ograniczenia takie jak problemy z ich wykorzystaniem w instrumentach z zamontowanym uchwytem płytki w pozycji pionowej oraz przede wszystkim efekt „sweet spot”, czyli występowanie obszaru z zagregowanymi cząsteczkami analitu, powodujący ich zawyżoną abundancję, co skutkuje złą powtarzalnością uzyskiwanych widm MS oraz uniemożliwia analizę ilościową.

W celu zniwelowania ograniczeń związanych z ciekłymi matrycami zaczęto opracowywać różne rodzaje powierzchni wspomagających jonizację/desorpcję w technice SALDI MS (z ang. surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry). Znanych jest wiele przykładów różnych rodzajów powierzchni tego typu w tym materiały węglowodórne, takie jak grafit, nanorurki węglowe (CNT), proszki z węgla aktywnego, fulereny i grafen. SALDI-MS połączono również z innymi metodami, takimi jak chromatografia cienkowarstwowa (TLC-SALDI) i ekstrakcja do fazy stałej (SPE-SALDI) (Abdelhamid, 2019). Dodatkowo, znana jest spektrometria mas z desorpcją/jonizacją laserową wspomaganą polimerem (PALDI-MS), z małymi polimerami używanymi jako niepolarne matryce w analizie związków niskocząsteczkowych (Woldegiorgis et al., 2004). Podążając za tym trendem, opracowano również typ spektrometrii mas z laserową desorpcją/jonizacją wspomaganą zol-żelom (SGALDI) z użyciem warstwy zol-żelom jako podłoża dla próbki (Lin and Chen, 2002). Analiza LDI-MS związków o małych masach cząsteczkowych była również wspomaganą zastosowaniem różnych rodzajów nanocząstek (NP) pełniących funkcję matrycy w tym oparte o metale Ag, Au, Pt i wiele innych (Abdelhamid, 2018), jednak w każdym przypadku wymagały one specjalnego nakładania na powierzchnie. Ważnym momentem w analizie związków o małych masach cząsteczkowych było opracowanie przez Siuzdaka metody, desorpcji/jonizacji na porowatym krzemie (DIOS) w której analit nakładany jest bezpośrednio na porowatą powierzchnię krzemu (Wei et al., 1999). Była to pierwsza metoda analizy w LDI-MS, umożliwiająca efektywne pomiary przy braku dodatkowych związków organicznych pełniących funkcję matrycy.

Obecnie znanych jest wiele podobnych metod wykorzystujących odpowiednio przygotowaną powierzchnię, podkład pomiarowy kompatybilny ze spektrometrami laserowymi, na którą nanoszony jest analit, jednak wszystkie charakteryzuje mniejsza o kilka rzędów wielkości czułość niż w przypadku MALDI, a także silnie zwiększona fragmentacja jonów, która w zależności od metody ogranicza dostępny zakres mas do około 2000 Da. Tego typu metody prawdopodobnie są oparte na procesie desorpcji termicznej na granicy faz substrat/analit z typowym dla niej z wysokim wewnętrznym wzbudzeniem jonów i niską wydajnością jonizacji. Istotnym problemem jest również mała dokładność wyznaczonej masy, ze względu na konieczność kalibracji zewnętrznej, brak sygnałów od nanostruktur które można

byłoby zastosować do kalibracji wewnętrznej, problem z rozpuszczalnością analit-matryca oraz zbyt dużą grubością warstw w obrębie miejsca pomiaru. Ponadto większość tego typu metod jest czasochłonna, kosztowna i wymaga sporych zasobów materiałowych.

Ze względu na szerokie spektrum zastosowania i dużą wydajność jonizacji, do tej pory najbardziej obiecujące okazało się zastosowanie w LDI MS różnych rodzajów nanocząstek szczególnie srebra (AgNPs), pełniących funkcje matrycy, w mieszaninie z analitem. Jednak ze względu na sposób aplikacji, nakładanie zawiesiny w formie kropli, grubość powstałej warstwy mieszaniny analitu z NPs, w tego typu rozwiązaniach ciągle nie zapewnia dużej dokładności wyznaczanych wartości m/z . Ponadto te metody są niezwykle czasochłonne i wymagają sporych zasobów zarówno na etapie syntezy jak również izolacji nanocząstek m.in. stabilizatorów zapobiegających ich agregacji. Zastosowanie nanocząstek w przypadku LDI MS może być również problematyczne przez ryzyko zanieczyszczenia nanocząsteczkami wnętrza instrumentu MS podczas ablacji laserowej.

Większość z opisanych powyżej problemów została rozwiązana wraz z opracowaniem przez nasz zespół nowych technik w SALDI wykorzystujących powierzchnie modyfikowaną nanocząstkami srebra (AgNPs) (J. Nizioł et al., 2013), srebra monoizotopowego ($^{109}\text{AgNPs}$) (J. Nizioł et al., 2013) oraz złota (AuNPs) (Sekuła et al., 2015). Wymienione metody zostały szczegółowo opisane w kolejnych rozdziałach.

4.3.1.2. Obrazowanie w spektrometrii mas

Obrazowanie metodą spektrometrii mas (MSI, z ang. mass spectrometry imaging) oprócz detekcji i identyfikacji różnych związków dostarczanej przez konwencjonalne MS, dodatkowo umożliwia wizualizację lokalizacji powierzchniowej analitów w zróżnicowanych stałych próbkach (Richard M. Caprioli et al., 1997). Obecnie do MSI najczęściej stosuje się trzy główne źródła jonów. Pierwsza z metod jest stosowana w spektroskopii mas jonów wtórnych (SIMS), w której powierzchnia próbki jest bombardowana przez wiązkę klastrów lub jonów pierwotnych prowadzącą do wybicia jonów wtórnych z badanej powierzchni (Niehuis et al., 1987). Druga metoda jonizacji może zachodzić w warunkach ciśnienia atmosferycznego poprzez interakcję naładowanych mikrokropeł rozpuszczalnika z powierzchnią próbki, w technice zwanej desorpcją/ionizacją przez elektrorozpylanie (DESI) (Takáts et al., 2004). Trzecia technika polega na napromieniowaniu próbki laserem w technice MALDI MS (Richard M. Caprioli et al., 1997).

Obrazowanie MALDI-MS (MALDI-MSI) stało się referencyjną techniką analizy różnych biomolekuł o dużej masie cząsteczkowej, otwierającą nowe możliwości w dziedzinie biologii molekularnej, biologii roślin i biomedycynie. Jednak, MALDI-MSI również cierpi na szereg ograniczeń. Po pierwsze jakość matrycy osadzonej na próbce ma duży wpływ na wydajność analityczną eksperymentu MALDI-MSI. Niejednorodność w ko-kryształizacji matrycy i analitu jest odpowiedzialna za powstawanie efektu "sweet spot" prowadzącego do braku powtarzalności pomiędzy próbkami i strzałami lasera. Ponadto integralność molekularnego rozkładu przestrzennego może być zaburzona przez niewłaściwe nałożenie matrycy co może z kolei spowodować znaczną migrację lub delokalizację cząsteczek będących przedmiotem

zainteresowania, wpływając na rozdzielczość przestrzenną i/lub prowadzić do błędnej interpretacji wyników MSI. Ponadto powstawanie kryształów matrycy większych niż rozmiar plamki lasera może również wpływać na rozdzielczość przestrzenną. Przykładowo rozmiary kryształów matrycy DHB i CHCA uzyskane metodą natryskowego osadzania zwykle mieszczą się między 5 a 20 μm . Nakładanie matrycy na sucho metodą sublimacji, pomaga zwiększyć rozdzielczość przestrzenną poprzez zapewnienie wysoce jednorodnego nałożenia matrycy z minimalną boczną dyfuzją analitu i mniejszym rozmiarem kryształów. Jednak ze względu na brak rozpuszczalników, uzyskuje się słabą desorpcję analitu i mniejszą intensywność sygnałów (Chughtai and Heeren, 2008).

Konwencjonalny MALDI MSI stanowi wyzwanie, szczególnie jeśli chodzi o przestrzenne rozmieszczenie małych cząsteczek (<1000 Da). Małe cząsteczki mają duże znaczenie w przemyśle chemicznym, spożywczym, ponieważ odgrywają istotną rolę w procesach biochemicznych, takich jak rozwój chorób lub komunikacja międzykomórkowa. W konsekwencji analiza małych cząsteczek i metabolitów metodami MS cieszy się dużym zainteresowaniem na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci. Problemy związane z matrycą napotkane w MALDI-MSI zachęcały do poszukiwania nowych rozwiązań. Pomimo zaproponowanych alternatyw polegających m.in. na sposobie przygotowania próbki (np derywatywacja analitu/matrycy lub zoptymalizowane zastosowanie matrycy), znacznym ulepszeniu instrumentów MS czy też opracowywaniem nowych matryc organicznych obecnie żadna ze znanych metod LDI MS nie jest wolna od ograniczeń i nie znalazła szerokiego zastosowania w analizie związków małowcząsteczkowych.

Aby przezwyciężyć ograniczenia z jakimi spotyka się technika MALDI w zakresie obrazowania MS, zaproponowaliśmy kilka nowych metod obrazowania MS wykorzystujących stal pokrytą kationowymi nanocząstkami srebra, srebra-109 lub złota (AgNPs, ¹⁰⁹AgNPs i AuNPs) (A. Arendowski et al., 2018; Nizioł et al., 2016, 2017; Nizioł and Ruman, 2013; Sekuła et al., 2015).

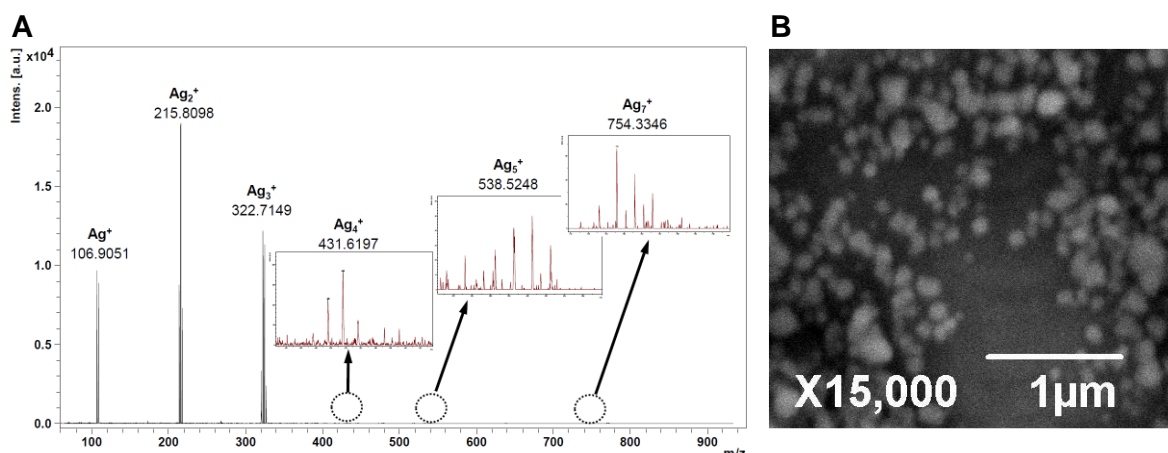
4.3.1.3. Nowe metody bezmatrycowe w analizie związków małowcząsteczkowych - badania własne powiązane z zaprezentowanymi w ramach osiągnięcia wynikami

Moje badania w obrębie poszukiwania nowych metod do analizy związków małowcząsteczkowych z wykorzystaniem spektrometrii mas z laserową desorpcją/ionizacją (LDI MS) rozpoczęły się (jako wątek poboczny przy realizacji badań w zakresie syntezy chemicznej nukleozydów i nukleotydydów) jeszcze przed uzyskaniem przeze mnie stopnia naukowego doktora. Przełomowym momentem było opracowanie nowatorskiej metody nakładania kationowych nanocząstek srebra (AgNPs) (J. Nizioł et al., 2013), srebra monoizotopowego (¹⁰⁹AgNPs) (Joanna Nizioł et al., 2013) oraz nanocząstek złota (AuNs) (Sekuła et al., 2015) na płytki-targety instrumentów LDI MS (np. MALDI MS). Opracowana przez nasz zespół metoda modyfikacji powierzchni stalowych płytek pozwoliła na przezwycięzenie większości przedstawionych w poprzednich rozdziałach problemów towarzyszących znanym w literaturze metodom LDI MS. Nowe bezmatrycowe metody okazały się bardzo szybkie, czułe, proste

w wykonaniu oraz pozwalały w ciągu kilku godzin na przekształcenie ‘nieaktywnej’ (wymagającą zastosowania odpowiednich matryc, zakwaszania badanych próbek itd.) płytki stalowej w płytkę z powierzchnią, na którą można bezpośrednio nakładać roztwory czy materiały analizowane o bardzo szerokim spektrum zastosowania bez konieczności wcześniejszej modyfikacji i specjalnego przygotowywania próbki.

4.3.1.3.1. Powierzchnia modyfikowana nanocząstkami srebra

Pierwsza z opracowanych metod wykorzystywała powierzchnię modyfikowaną kationowymi nanocząstkami srebra (AgNPs). Wykazują one szereg zalet, które umożliwiają ich szerokie zastosowanie w metodach MS. Szczególnie przydatna jest ich zdolność do jonizacji szerokiego spektrum związków chemicznych ze stosunkowo dużą wydajnością. AgNPs skutecznie jonizują polarne i niepolarne związki chemiczne w średnim i niskim zakresie mas cząsteczkowych włączając często kłopotliwe w analizie alkaloidy, węglowodany, glikozydy, kwasy nukleinowe, nukleozydy czy nukleotydy. W porównaniu do tradycyjnych technik jonizacji wspomaganych matrycą (MALDI) zastosowana metoda niweluje wszelkie niedogodności związane z wpływem większości komercyjnie dostępnych matryc na widmo próbki. Synteza nanocząstek srebra elektrostatycznie związanych ze stalową płytką została przeprowadzona w wyniku redukcji trifluorooctanu srebra(I) przez kwas 2,5-dihydroksybenzoesowym (DHB). Badanie wielkości AgNPs przeprowadzono za pomocą m.in. dynamicznego rozpraszania światła (DLS) (J. Nizioł et al., 2013).



Rysunek 1. Widmo LDI MS płytki AgNPET w trybie dodatnim z reflektorem (A). Obraz SEM AgNPs fragmentu płytki AgNPET w powiększeniu 15 000x (B) (J. Nizioł et al., 2013).

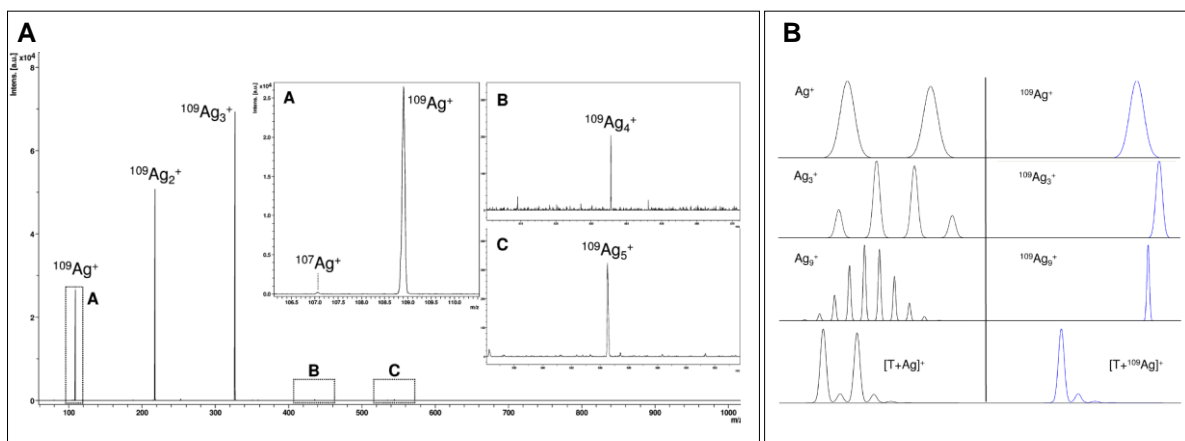
W celu zwiększenia pokrycia powierzchni płytki nanocząstkami przeprowadzono wcześniejsze trawienie stalowej płytki mieszaniną stężonych kwasów HNO₃/HCl (1:1, v/v), co miało przełożenie na widoczne zmniejszenie wymaganej mocy lasera o 30-50%. Ponadto powierzchnia płytki AgNPET okazała się trwała i odporna na czyszczenie mechaniczne (materiałem bawełnianym), nie wpływając przy tym na jej właściwości jonizacyjne. Powierzchnię czynną można usunąć przez trawienie w roztworze stężonego kwasu azotowego lub wodzie królewskiej. Widmo MS uzyskane metodą AgNPET LDI w trybie dodatnim z reflektorem jest bardzo klarowne w niskim zakresie mas (ang. LMW, low molecular weight)

od 0 do 1500 Da i zawiera (i) głównie trzy zestawy sygnałów przypisanych do (a) dwóch izotopów jonów srebra (^{107}Ag oraz ^{109}Ag) (wartość obliczona - 106,9051 Da dla pików $^{107}\text{Ag}^+$ o najwyższej intensywności), (b) Ag_2^+ (wartość obliczona - 215,8098 Da dla sygnału o najwyższej intensywności) oraz (c) Ag_3^+ (obliczona wartość - 322,7149 Da dla sygnału o największej intensywności) jak również pików o niskiej intensywności przypisane do innych mono kationów takich jak kationowe agregaty srebra od Ag_6^+ do Ag_{10}^+ . Kationowe agregaty srebrne są niezwykle ważne w kontekście kalibracji widma. Kalibracja wykonywana jest z wykorzystaniem emitowanych przez płytkę jonów i klastrow srebrnych od Ag^+ do Ag_{30}^+ (zależnie od zakresu pomiarowego) co skutkuje uzyskiwaniem mas analitu z bardzo wysoką dokładnością, niemożliwą do uzyskania za pomocą kalibracji zewnętrznej. Grubość warstwy mierzonej jest zwykle rzędu kilkunastu-kilkudziesięciu nanometrów, a więc 100-1000 razy mniejsza niż przy zastosowaniu matryc organicznych, co znakomicie zwiększa precyzję pomiaru do maksymalnej osiągalnej dla danego instrumentu. Dzięki precyzyjnej kalibracji oraz minimalnej grubości warstwy analitu na płytce uzyskano precyzję pomiaru świadczącą o tym, iż ta metoda jest ograniczona głównie przez możliwości techniczne instrumentu.

4.3.1.3.2. Powierzchnia modyfikowana nanocząstkami srebra monoizotopowego

Bez wątplenia przełomowym pomysłem okazała się późniejsza modyfikacja metody AgNPET LDI MS poprzez zastosowanie kationowych nanocząstek srebra monoizotopowego ($^{109}\text{AgNPET}$), co skutkowało znacznym uproszczeniem sygnałów badanej substancji. Znacznie zmniejszyło się ryzyko nałożenia sygnałów adduktów jonów srebrnych z sygnałami analizowanej substancji oraz uproszczeniu uległ rozkład izotopowy srebrnych adduktów analitu oraz klastrow srebrnych stosowanych do kalibracji. Zastosowanie modyfikacji srebrem monoizotopowym pozwoliło uzyskać dużo wyższą dokładność, rozdzielczość oraz czułość nawet rzędu attomoli. Nanostruktury wytworzone na powierzchni stalowej płytki zostały otrzymane w reakcji redukcji $\text{CF}_3\text{COO}^{109}\text{Ag}$ kwasem 2,5-dihydroksybenzoesowym. Analiza uzyskanego widma LDI MS zmodyfikowanej srebrem monoizotopowym stalowej płytki w trybie dodatnim z reflektorem, mierzonego w niskim zakresie mas 0-1500 Da (rysunek 2), wykazała obecność głównie trzech sygnałów, które przypisano do $^{109}\text{Ag}^+$ (wartość obliczona: 108,9048 Da) oraz $^{109}\text{Ag}_2^+$ (wartość obliczona: 217,8096 Da), oraz $^{109}\text{Ag}_3^+$ (wartość obliczona: 326,7144 Da), oraz kilka sygnałów o niskiej intensywności takich jak $^{109}\text{Ag}_4^+$ (435,6192 Da), $^{109}\text{Ag}_5^+$ (544,5240 Da), Ag_6^+ (653,4288 Da), Ag_7^+ (762,3336 Da), Ag_8^+ (871,2384 Da), Ag_9^+ (980,1432 Da), oraz Ag_{10}^+ (1089,048 Da). Niezwykła prostota obserwowanego widma MS jest spowodowana zastosowaniem srebra monoizotopowego o wysokiej czystości, zawierającym ^{107}Ag w ilości nieprzekraczającej 0.25% (Joanna Nizioł et al., 2013).

Wzbogacenie nanocząstek w ^{109}Ag zwiększyło dwukrotnie intensywność sygnałów adduktów analitu z jonem srebra-109. Bardzo prosty rozkład izotopowy pików srebra monoizotopowego pozwala przeprowadzić znacznie precyzyjniejszą kalibrację, co w konsekwencji przekłada się na większą dokładność uzyskanych pików analitu. Uzyskane wyniki pozwoliły osiągnąć wysoką dokładność poniżej 0.9 ppm nawet w stosunkowo niedużym instrumencie.



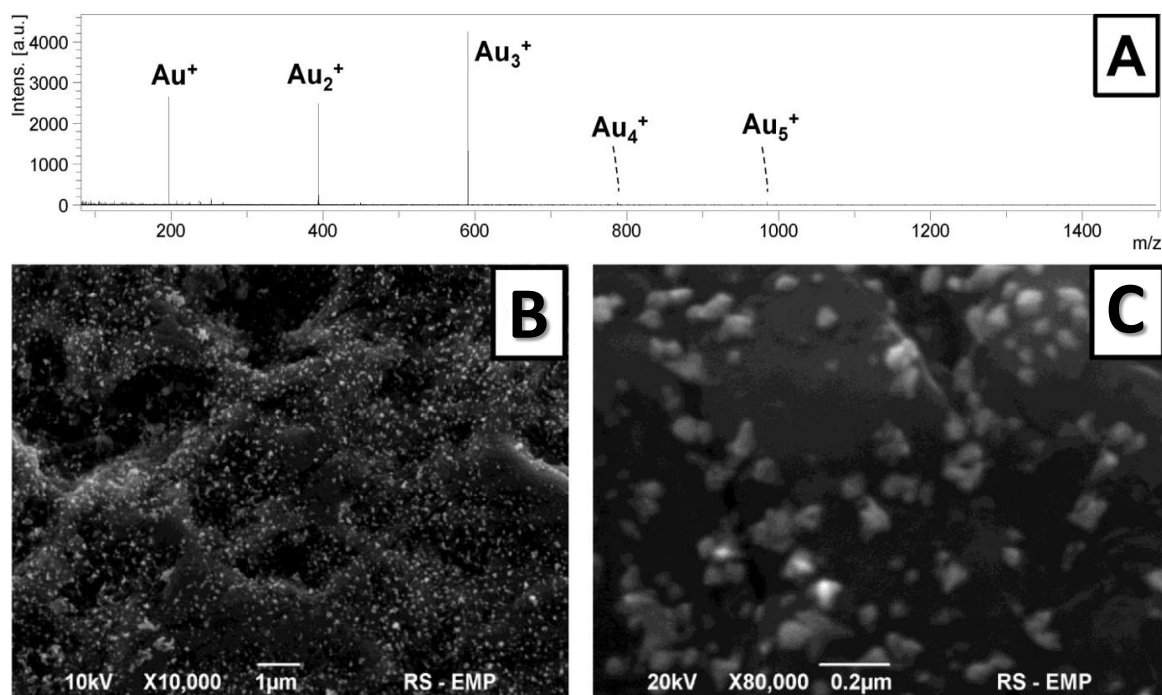
Rysunek 2. Widmo LDI MS zmodyfikowanej płytki $^{109}\text{AgNPET}$ w trybie dodatnim z reflektorem (A). Rozkład izotopowy wybranych jonów w metodzie AgNPET (lewa strona) i $^{109}\text{AgNPET}$ (prawa strona). Symbolem T oznaczono tymidynę (B) (Joanna Nizioł et al., 2013).

Porównanie obliczonego rozkładu izotopowego dla kilku jonów Ag oraz ^{109}Ag przedstawia rysunek 2B. Można łatwo zauważyć, że jonizacja analitu za pomocą nanocząstek srebra została znacznie ulepszona poprzez zastosowanie srebra monoizotopowego, gdyż rozkład izotopowy srebra naturalnego jest znacznie bardziej złożony niż w przypadku ^{109}Ag . Dzięki zastosowanej modyfikacji AgNPET, zwiększającej prostotę uzyskiwanych widm MS, analiza różnych mieszanin. **Ponadto, dzięki redukcji ilości sygnałów na widmie metoda ta umożliwia badania niezwykle skomplikowanych układów biologicznych co było wcześniej niezwykle trudne.**

4.3.1.3.2. Powierzchnia modyfikowana nanocząstkami złota

W 2015 roku nasz zespół badawczy zaprezentował kolejną bezmatrycową metodę LDI MS opartą o powierzchnie modyfikowaną nanocząstkami złota (AuNPET). Metoda AuNPET jest również bardzo skuteczna w analizie różnych LMWC w obiektach takich jak: aminokwasy, sacharydy, nukleozydy, glikozydy, zasady nukleinowe, lipidy itp. Rysunek 3 przedstawia widmo LDI MS płytki AuNPET w trybie reflektrowym dodatnim z wewnętrzną sześcienną kalibracją widma, pozwalające na bardzo wysoką dokładność wyznaczania masy analitu. Z opublikowanych danych wynika, że płytka AuNPET doskonale nadaje się do analizy bardzo skomplikowanych mieszanin biologicznych w szerokim zakresie m/z o czym świadczą liczne wyniki opublikowane przez nasz zespół (Adrian Arendowski et al., 2018; Arendowski and Ruman, 2017; Sekuła et al., 2015).

Metoda AuNPET jest bardzo podobna do metody, która została opublikowana wcześniej ($^{109}\text{AgNPET}$) z tym wyjątkiem, że $^{109}\text{AgNPET}$ jest bardziej skuteczna w jonizacji związków o niskiej polarności. Natomiast metoda oparta o nanocząstki złota jest bardziej uniwersalna i przystępna ze względu na niższą cenę wytworzenia jednej płytki. Ponadto wyniki analizy metodą AuNPET nie wymagają żadnego dodatkowego przetwarzania i są kompatybilne z większością dostępnych komercyjnie baz metabolitów, które niestety nie uwzględniają adduktów z jonami srebra monoizotopowego, które dominują na widmach MS wykonanych na płytce $^{109}\text{AgNPET}$.



Rysunek 3. Widmo LDI MS płytki AuNPET w trybie dodatnim z reflektorem (A). Obraz SEM AuNPs fragmentu płytki AuNPET w powiększeniu 10 000x (B) i 80 000x (C) (Sekuła et al., 2015).

Obie metody w dużym stopniu się uzupełniają, dlatego w różnym stopniu znalazły swoje zastosowanie w analizie różnego typu materiałów.

4.3.2. Cel i zakres prowadzonych badań

Celem naukowym monotematycznego cyklu prac stanowiącego podstawę niniejszego postępowania habilitacyjnego było opracowanie metod syntezy nanocząstek, zbadanie potencjału ich zastosowania do detekcji związków chemicznych, zastosowanie ich do modyfikacji płytek-targetów instrumentów MS, oraz wykorzystanie w analizie związków o niskiej masie cząsteczkowej. Uzyskane wyniki pozwoliły nawet badać niezwykle złożone mieszaniny w próbkach biologicznych z wykorzystaniem spektrometrii mas. Ponadto, opracowanie koncepcji nowego rozwiązania technicznego do obrazowania MS materiałów poprzez laserową ablację materiałów, transfer wytworzonych cząstek w fazie gazowej i ich wprowadzenie do źródła jonów instrumentu MS wraz z późniejszą analizą wyników. Moje badania skupiały się głównie na opracowaniu wszechstronnej metody do jakościowej i ilościowej analizy polarnych i niepolarnych związków małowcząsteczkowych w materiale z wykorzystaniem spektrometrii mas (MS) z desorpcją/ionizacją laserową (LDI). Badania obejmowały zastosowanie nowych metod spektrometrii mas z laserową desorpcją/ionizacją ($AgNPET$, $^{109}AgNPET$ i $AuNPET$) w analizie MS, MS/MS oraz MSI związków małowcząsteczkowych w różnych rodzajach próbek. Wyniki analizy na obiektach biologicznych pozwoliły na wskazanie nowych biomarkerów raka nerki pozwalających na wczesne rozpoznanie tej choroby a także diagnozy, wskazań dotyczących leczenia i oceny, monitorowania leczenia,

identyfikacji nawrotów, a także wyjaśnienia procesów molekularnych stojących za tego typu stanami chorobowymi.

Osiągnięcie założonego celu było możliwe poprzez realizację poniższych celów szczegółowych:

- Opracowanie nowej eksperymentalnej metody obrazowania za pomocą spektrometrii mas pod ciśnieniem atmosferycznym (LARESI) pod kątem analizy rozkładu szerokiej gamy związków małowcząsteczkowych na różnych powierzchniach [H1]
- Zastosowanie metody LARESI w obrazowaniu MS związków małowcząsteczkowych na wybranych powierzchniach testowych. [H1]
- Zastosowanie łagodnych metod jonizacji $^{109}\text{AgNPET}$ oraz AuNPET LDI MS w analizie MS, MSI oraz MS/MS związków małowcząsteczkowych na bardzo trudnych obiektach testowych takich jak ludzkie tkanki nowotworowe, tkanki roślinne, płyny fizjologiczne czy też fragmenty DNA wyekstrahowane z linii komórkowych [H1-H8]
- Porównanie metod $^{109}\text{AgNPET}$ i AuNPET w analizie ilościowej i jakościowej związków małowcząsteczkowych na przykładzie kwasów karboksylowych [H9]
- Zastosowanie metody UPLC-HRMS w analizie związków małowcząsteczkowych w ekstraktach tkanek oraz płynów fizjologicznych [H10]

4.3.3. Wyniki badań własnych zgłoszonych jako osiągnięcie

Najważniejszą część badań wchodzących w zakres niniejszego osiągnięcia naukowego, prezentowanego jako podstawa do nadania stopnia naukowego doktora habilitowanego, stanowi opracowywanie nowych wszechstronnych metod analizy związków małowcząsteczkowych [H1] oraz metod wytwarzania nanostruktur metalicznych i nakładania ich na powierzchnię stali nierdzewnej wraz z przykładami ich zastosowania [H2-H10].

Pierwsza zgłoszona w ramach osiągnięcia publikacja [H1] opisuje nową eksperymentalną metodę obrazowania za pomocą spektrometrii mas pod ciśnieniem atmosferycznym określaną jako „ablacja laserowa ze zdalną jonizacją przez elektrorozpylanie” (LARESI), w której zastosowano ablację laserem impulsowym, nanosekundowym typu OPO w zakresie SWIR (2,9 μm) oraz wtórną jonizację przez elektrorozpylanie (ESI). Skuteczność nowej metody MSI w analizie rozkładu powierzchniowego związków małowcząsteczkowych na badanej powierzchni zaprezentowano w trybie monitorowania wybranych reakcji fragmentacji (SRM) na przykładzie detekcji LMWC w ludzkiej tkance nerki.

Kolejne prace [H2-H8] opisują zastosowanie metody $^{109}\text{AgNPET}$ oraz AuNPET LDI MS w analizie MS, MSI oraz MS/MS związków małowcząsteczkowych w różnego typu obiektach testowych w tym tkankach roślinnych, ludzkich, płynów fizjologicznych oraz ekstraktów komórkowych.

W pracy [H9] dokonano porównania wydajności jonizacji związków testowych w obu metodach $^{109}\text{AgNPET}$ i AuNPET na przykładzie kwasów karboksylowych. Natomiast wykorzystanie metody UPLC-HRMS w analizie ekstraktów moczu i tkanek w pracy [H10], pozwoliło na porównanie metod $^{109}\text{AgNPET}$ oraz AuNPET LDI MS z metodami klasycznymi najczęściej stosowanymi w analizie jakościowej i ilościowej związków małowcząsteczkowych.

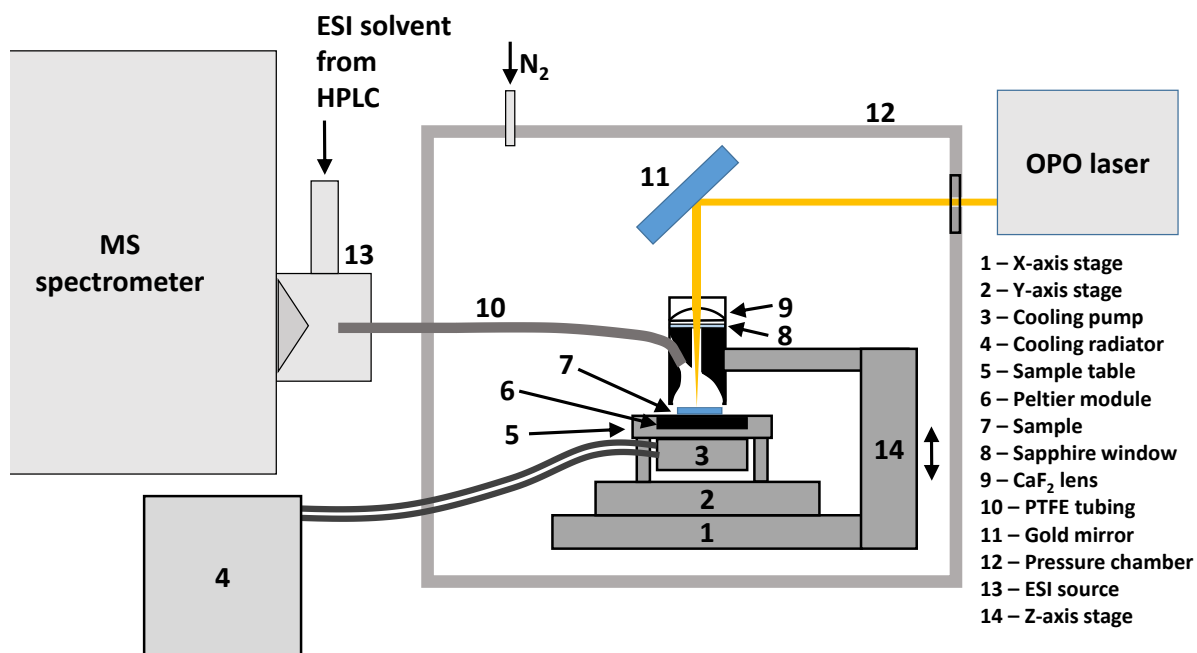
[H1] Nowa metoda ablacji laserowej ze zdalną jonizacją przez elektrorozpylanie pod ciśnieniem atmosferycznym

Jak już wspomniano w poprzednich rozdziałach, obecnie w obrazowaniu molekularnym głównie używane są dwie bardzo czułe techniki SIMS i MALDI MS. Oprócz licznych ograniczeń wymienionych we wstępie obie metody wymagają wysokiej próżni, co znacznie limituje ich zastosowanie zwłaszcza do analizy próbek biologicznych *in vivo* oraz w czasie rzeczywistym.

Spektrometria mas pod ciśnieniem atmosferycznym (AMS, z ang. ambient mass spectrometry) została po raz pierwszy zaprezentowana wraz z techniką DESI w 2007 r. przez grupę Cooks'a (Ifa et al., 2007), a następnie z powodzeniem zastosowaniu w obrazowaniu lipidów i innych związków małowcząsteczkowych w tkance raka nerki (Wiseman et al., 2008). W przypadku DESI główne ograniczenia obejmują stosunkowo niewielką rozdzielczość przestrzenną, ograniczoną zwykle do 100 μm , małą wydajność jonizacji dla niektórych cząsteczek i małą wydajność desorpcji dla cząsteczek silnie związanych z powierzchnią. Ponadto głębokość próbkowania w DESI jest bardzo mała, co znacznie się zmniejsza ilość materiału dostępnego do analizy w spektrometrze mas. Podobnie jak w przypadku MALDI, zwiększa to ryzyko wystąpienia w widmie MS sygnałów pochodzących głównie z płynów pozakomórkowych.

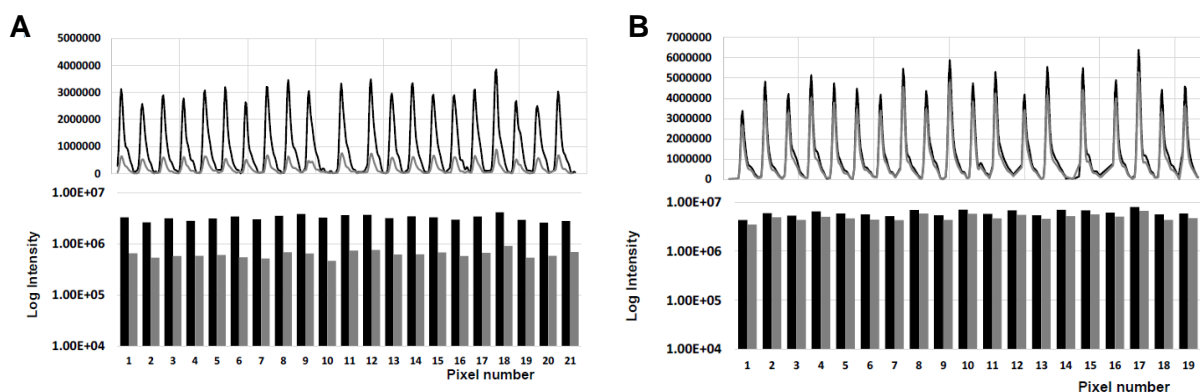
Wśród wszystkich metod MS stosowanych pod ciśnieniem atmosferycznym, najbardziej odpowiednie dla analizy metabolitów w tkankach biologicznych są te które do jonizacji i desorpcji wykorzystują laser z promieniowaniem w zakresie SWIR. Wiązka laserowa o długości fali około 2,94 μm jest silnie absorbowana przez drgania rozciągające O-H w wiązaniach wodorowych wody obecnej w niemal każdym materiale biologicznym. Główną przewagą lasera IR nad laserem UV jeśli chodzi o ablacje tkanki to większa głębokość próbkowania dochodząca do około 10 μm dla pojedynczego impulsu lasera (dla energii impulsu rzędu 1-5 mJ) i niemal dowolna głębokość w przypadku powtarzających się impulsów lasera. Warto zauważyć, że MSI do tej pory był używany prawie wyłącznie w trybie analizy niecelowanej i monitoringu wszystkich jonów (full scan monitoring – MS1). W tandemowej spektrometrii mas (MS/MS) selektywność w celowanej analizie jest dodatkowo wzmacniana przez tryb monitorowania wybranych reakcji fragmentacji (SRM, z ang. selected reaction monitoring) lub tryb monitorowania wielu reakcji fragmentacji (MRM, z ang. multiple reaction monitoring). Tryb pomiaru SRM/MRM dramatycznie zwiększa czułość detekcji i parametr LOD danego analitu. Z tych powodów MS/MS jest potężnym narzędziem zapewniającym wysoką czułość detekcji i prawie pewną identyfikację celowanych niskocząsteczkowych związków. Metodę LArESI charakteryzuje również szeroki zakres dynamiczny, dużą szybkość pomiaru i przydatność do analizy ilościowej

W niniejszej pracy [H1] po raz pierwszy zaprezentowano nową eksperymentalną konfigurację MSI określoną jako „ablacja laserowa ze zdalną jonizacją przez elektrorozpylanie” (LArESI) w analizie rozkładu związków małowcząsteczkowych na powierzchni wybranych obiektów testowych.



Rysunek 4. Konfiguracja eksperymentalna systemu LARES SRM MSI [H1]

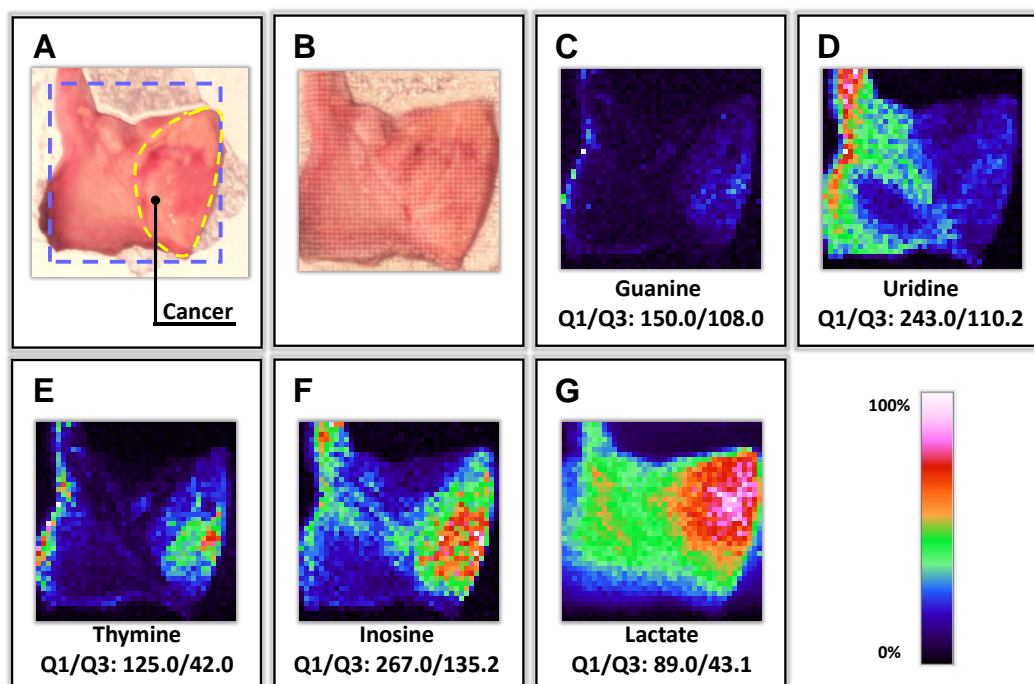
Eksperymentalny zestaw LARESI został następnie przetestowany również w celu dostarczenia danych na temat zmienności intensywności sygnału MS/MS od piksela do piksela (rysunek 4). W tym celu przeprowadzono pomiar w trybie MS/MS (z ang. Enhanced Product Ion, EPI) na przykładzie dwóch związków testowych lizyny i seryny. Idealny obiekt testowy powinien wykazywać jednorodne rozmieszczenie badanego związku na danej powierzchni, jednak ten warunek nie zapewni doskonałych rezultatów, jeśli składowe instrumentu generują zmienny sygnał.



Rysunek 5. Zmienność intensywności sygnału w kolejnych punktach pomiarowych (pikselach) w metodzie LARESI mierzona w trybie MS/MS dla protonowego adduktu lizyny $[Lys + H]^+$ (A, czarna linia) i protonowego adduktu fragmentu lizyny o wartości m/z 84 ($[C_5H_9N + H]^+$, A, szara linia), a także dla $[Ser-H]^-$ (B, czarna linia) i fragmentu seryny m/z 72 ($C_2H_2NO_2^-$, B, szara linia). Wykresy słupkowe przedstawiają dane maksymalnej intensywności w skali logarytmicznej dla danego punktu pomiarowego [H1].

Wizualizację zmian intensywności sygnału przy każdym pikselu dla dwóch związków testowych lizyny i seryny oraz ich fragmentów mierzonych w trybie MS/MS dodatnim i ujemnym MS/MS przedstawiono na rysunku 5. Zmienność obliczona jako odchylenie standardowe maksymalnych intensywności w każdym pikselu wynosiła 12% i 16% dla protonowanej lizyny i fragmentu lizyny oraz 14% i 15% dla deprotonowanej seryny i odpowiednio fragmentu seryny. Zaobserwowane zmienności są bardzo niskie w porównaniu z wynikami zaprezentowanymi dla MALDI MSI (Porta et al., 2015).

W celu zademonstrowania możliwości techniki LARESI w analizie materiału biologicznego, wykonano celowane obrazowanie MS/MS w trybie SRM zamrożonych ludzkich tkanek nerki pozyskanych w wyniku nefrektomii od dwóch pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem nerki [H1]. Badane tkanki zawierały część nowotworową oraz mały fragment sąsiedniej zdrowej tkanki, która została uznana za normalną na podstawie badania histopatologicznego. Celowaną analizę przeprowadzono dla wybranych metabolitów, które według doniesień literaturowych, ze względu na metabolizm charakterystyczny dla procesu nowotworzenia, powinny występować w znacznie większej ilości w tkance nowotworowej w porównaniu do tkanki normalnej (Phan et al., 2014). Wybranymi do analizy związkami były aminokwasy, nukleozydy, zasady nukleinowe, witaminy oraz niektóre związki małowcząsteczkowe wskazywane w literaturze jako potencjalne biomarkery raka nerki.



Rysunek 6. Wyniki obrazowania techniką LARESI MSI SRM fragmentu tkanki nerki. (A) Zdjęcie mikroskopowe badanej powierzchni tkanki przed (B) i po analizie. (C-G) Reprezentacje graficzne dla wybranych przejść MRM wykrytych w obrębie analizowanej powierzchni z rozdzielczością przestrzenną $200 \times 200 \mu\text{m}$ [H1].

Wyniki obrazowania na trzech różnych skrawkach tkanki w trymie SRM zaprezentowano tylko dla wybranych związków, które wykazywały największe zróżnicowanie

pod względem ilości w tkance nowotworowej i normalnej. Każdy badany skrawek tkanki zawierał zarówno fragment tkanki nowotworowej jak również fragment normalnej tkanki nerki pobrany od tego samego pacjenta. Najlepsze wyniki obrazowania metodą LARESI, w których zaobserwowano największe zróżnicowanie w ilości badanego związku w obrębie badanego materiału biologicznego uzyskano dla 10 aminokwasów, witaminy E, guaniny, urydyny, tyminy, inozyny oraz mleczanu. Obrazy jonowe ośmiu aminokwasów (alanina, seryna, treonina, lizyna, kwas glutaminowy, metionina, histydyna i fenyloalanina) oraz urydyny wskazywały na ich zwiększony poziom w tkance zdrowej w porównaniu do tkanki nowotworowej. Natomiast w przypadku argininy, tryptofanu, guaniny, tyminy, inozyny, mleczanu oraz witaminy E stwierdzono ich nieznacznie większe stężenie w tkance nowotworowej w porównaniu z tkanką normalną. Związkami, które w największym stopniu różnicowały badane tkanki były: seryna, kwas glutaminowy, histydyna i fentyloalanina. Wyniki obrazowania MS wybranych związków małowcząsteczkowych uzyskane metodą LARESI w trybie SRM są zbieżne z rezultatami opublikowanymi z wykorzystaniem innych metod analitycznych stosowanych również w analizie materiału nowotworowego. Wybrane obrazy wyodrębnionych plików chromatogramów jonowych dla związków badanych za pomocą LARESI przedstawiono na rysunku 6.

Opracowana nowa metoda obrazowania MS pod ciśnieniem atmosferycznym, LARESI w trybie SRM umożliwia wizualizację rozkładu powierzchniowego związków małowcząsteczkowych na różnych powierzchniach z dużą czułością, specyficznością i krótkim czasem analizy przy minimalnym wstępnym przygotowywaniu próbki. Zastosowanie metody LARESI w MSI było pierwszym w literaturze zobrazowaniem przestrzennego rozmieszczenia guaniny, urydyny, tyminy i inozyny w obrębie ludzkich tkanek nerki oraz pierwszym znanym w literaturze zastosowaniem metody LARESI w obrazowaniu za pomocą spektrometrii mas materiału biologicznego w postaci ludzkich tkanek pod kątem wskazania potencjalnych biomarkerów raka nerki. Konstrukcja systemu LARESI pozwala na dużą elastyczność w wyborze metody jonizacji i detekcji. Platforma LARESI ułatwia obrazowanie szerokiej gamy materiałów, takich jak próbki biologiczne, w tym żywe biofilmy i rośliny, o różnej wielkości i topografii powierzchni. Platforma LARESI oferuje mnóstwo zastosowań w różnych dziedzinach życia, w tym badaniach medycznych, środowiskowych, wody pitnej, żywności i farmacji. Co ważne, otwiera również możliwości nie tylko obrazowania metabolicznego nieożywionych obiektów, ale także czasowe, w tym również w czasie rzeczywistym i przestrzenne (tj. w trzech wymiarach) charakterystyki metaboliczne w bardzo złożonych, żywych systemach biologicznych. Ze względu na niezwykle uproszczony proces przygotowywania próbki do pomiaru obrazowanie MS metodą LARESI wydaje się być idealnym rozwiązaniem zwłaszcza dla szybkich analiz różnego typu tkanek nowotworowych. Ponadto technika LARESI MSI jest kompatybilna z różnymi laserami, o różnej długości fali oraz daje możliwość mrożenia/chłodzenia obiektu.

[H2-H4] Zastosowanie metody AuNPET LDI MS w analizie związków małowymiarowych

W celu zademonstrowania skuteczności metody AuNPET LDI MS w analizie związków małowymiarowych przeprowadzono szereg pomiarów MS, MSI oraz MS/MS z wykorzystaniem różnego typu wymagających w analizie obiektów testowych w tym tkanki roślinnej, ludzkiej, płynów fizjologicznych oraz ekstraktów komórkowych.

[H2] Analiza fragmentów DNA z wbudowanymi borowymi pochodnymi nukleotydów

Wiodącym tematem mojej pracy doktorskiej była synteza borowych pochodnych nukleotydów i nukleotydów, jako potencjalnych inhibitorów wzrostu komórek nowotworowych oraz wybranych reakcji enzymatycznych. W ramach przeprowadzonych badań dużym sukcesem było opracowanie metody syntezy nowej borowej pochodnej 2'-deoksycytidyny, wykazującej się niską toksycznością i zdolnością do fosforylacji *in vivo* do poziomu trifosforanu, co sugerowało możliwość zachodzenia procesu integracji tego związku borowego do struktury kwasów nukleinowych. Tak sformułowaną tezę zweryfikowano po obronie pracy doktorskiej przeprowadzając próby wbudowania tego związku do struktury DNA ludzkich komórek nowotworowych [H2]. Jednak detekcja tego typu modyfikacji w strukturze DNA dostępnymi metodami analitycznymi stanowiła olbrzymie wyzwanie. Jako metodę najbardziej kompatybilną z analizą małych ilości materiału biologicznego z dużą czułością i rozdzielczością wybrano laserową spektrometrię mas. Jednak związki boru, zwłaszcza pochodne nukleotydów i nukleotydów, okazały się być niezwykle trudnym obiektem analizy metodami MS, ze względu na ich (i) niezwykle labilność, (ii) wrażliwość na środowisko kwasowe, (iii) niską trwałość w roztworach wodnych w przypadku niektórych typów związków borowych, (iii) niebezpieczeństwo zajścia reakcji β -eliminacji pierścienia heterocyklicznego zasady azotowej. Ponadto, do ich jednoznacznej identyfikacji krytycznie ważna była dokładność dopasowania uzyskanych m/z poniżej 10 ppm. W celu określenia czy borowa pochodna 2'-deoksycytidyny mogła być wychwycona przez komórki nowotworowe i wbudowana do struktury DNA w pracy [H2] wykorzystano niezwykle uniwersalną i łagodną metodę jonizacji z zastosowaniem powierzchni modyfikowanej nanocząstkami złota (AuNPET LDI MS). Niniejsza praca potwierdza wcześniejsze obserwacje wskazujące na fakt, że zastosowana metoda odznacza się niezwykle wszechstronnością, pozwalając nie tylko na detekcję i analizę nukleotydów i nukleotydów, ale także dowolnych związków organicznych, również w złożonych mieszaninach czy też w układach biologicznych. W związku ze skomplikowanym tłem chemicznym obserwowanym w widmach z zastosowaniem tradycyjnych matryc organicznych identyfikacja związków niskocząsteczkowych byłaby bardzo utrudniona. Ponadto wymagane do tych metod środowisko kwasowe powodowałoby kolejne komplikacje. Pomiar MS wykonano po wcześniejszej inkubacji borowej pochodnej nukleotydu w hodowli komórkowej i izolacji DNA nanosząc bezpośrednio na płytkę AuNPET roztwór DNA. Metoda AuNPET LDI MS została wybrana jako nie tylko jako idealne rozwiązanie do desorpcji/jonizacji analitu, ale także ze względu na możliwość wykonania wewnętrznej kalibracji na emitowanych podczas uderzenia impulsu lasera jonach złota.

Dzięki zastosowanej metodzie AuNPET LDI MS w pracy [H2] wykazano, że borowa pochodna nukleozydów jest wbudowywana do kwasów nukleinowych jako funkcjonalna pochodna nukleotydu. Wnioski te zostały również potwierdzone analizą NMR, która dodatkowo wykazała na bardzo wysoki stopień podobieństwa naturalnej pary zasad dG–dC z układem nukleozydów dG–borowy nukleozyd. Dzięki braku sygnałów pochodzących od tradycyjnych matryc organicznych w niskim rejonie m/z oraz zastosowaniu wewnętrznej kalibracji z wykorzystaniem jonów złota możliwa była identyfikacja z bardzo wysoką dokładnością trzydziestu pięciu jonów pochodzących głównie od oligonukleotydów będących fragmentami zmodyfikowanej struktury DNA. Metoda AuNPET LDI MS odznacza się niezwykle wszechstronnością, pozwalając nie tylko na detekcję i analizę nukleozydów i nukleotydów, ale także dowolnych związków organicznych, również w złożonych mieszaninach czy też w układach biologicznych. Może okazać się szczególnie przydatna w identyfikacji związków organicznych trudnych w analizie z wykorzystaniem klasycznych technik MS, zwłaszcza związków niezwykle labilnych, wrażliwych na środowisko kwasowe oraz nietrwałych w roztworach wodnych.

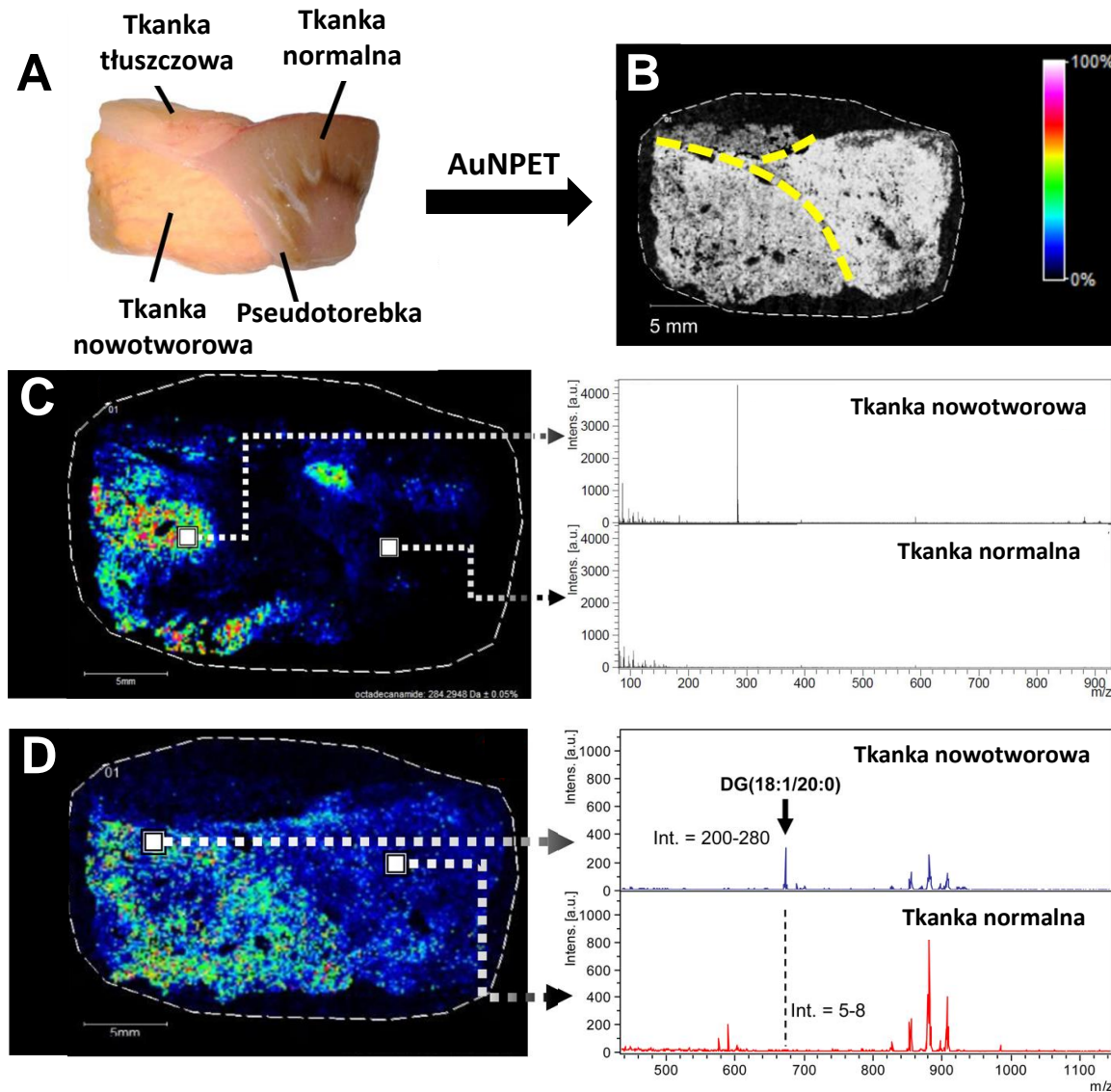
[H3] Zastosowanie metody AuNPET LDI analizie MS, MS/MS i MSI związków małowcząsteczkowych w ludzkich tkankach nowotworowych

Jednym z pierwszych ważnych zastosowań spektrometrii mas z desorpcją/ionizacją laserową wykorzystującą powierzchnię modyfikowaną nanocząstkami złota (AuNPET LDI MS) była analiza i obrazowanie ludzkiej tkanki nerki pobranej chirurgicznie od pacjenta ze zdiagnozowanym nowotworem tego narządu [H3].

Zastosowana w pracy H3 technika AuNPET LDI MSI nie tylko pozwoliła zniwelować wszelkie niedogodności związane z koniecznością zastosowania tradycyjnych matryc w MALDI ale również umożliwiła znaczne uproszczenie etapu przygotowywania materiału do analizy, ograniczającego się jedynie do homogenizacji 1 mg tkanki ze 100 μ l rozpuszczalnika o odpowiedniej polarności (tetrahydrofuranu lub wody). Sama analiza MS wymagała bardzo małej objętości finalnego ekstraktu tkanki w ilości nie przekraczającej 0,3 μ l nakładanej bezpośrednio na płytkę. W celu zniwelowania ryzyka możliwej deformacji tkanki w wysokiej próżni instrumentu badany materiał naniesiono bezpośrednio na płytkę pokrytą nanocząstkami złota metodą imprintu, poprzez szybkie dotknięcie (1 s) fragmentu tkanki do powierzchni płytki, w wyniku czego następował transfer substancji z powierzchni tkanki na powierzchnię płytki. Uzyskane odbitki stanowiły odwzorowanie rozkładu przestrzennego substancji na powierzchni badanej tkanki.

W niniejszej pracy [H3] przedstawiono 32 obrazy jonowe wygenerowane dla kilkudziesięciu wartości m/z , które w największym stopniu różnicowały tkankę nowotworową i normalną. Analiza rozmieszczenia przestrzennego wybranych wartości m/z w większości przypadków ujawniła zróżnicowanie intensywności poszczególnych pików w zależności od rodzaju tkanki. Szczególnie interesujące były wartości m/z , których położenie mogło być związane ze stanem chorobowym tkanki, czyli występujące w większej ilości w tkance nowotworowej lub normalnej. Uzyskane fragmenty m/z pozwoliły z dużą pewnością

zidentyfikować oktadekanamid i digliceryd DG(18:1/20:0) jako potencjalne biomarkery raka nerki. Należy zaznaczyć, że była to pierwsza prezentacja wyników MSI ludzkiej tkanki nerki z wykorzystaniem techniki SALDI z powierzchnią modyfikowaną nanocząstkami złota. Równolegle przeprowadzono również analizę MS oraz MS/MS ekstraktów krwi, moczu oraz tkanek pobranych od 11 pacjentów z nowotworem nerki.



Rysunek 3. Wyniki obrazowania techniką AuNPET LDI MS fragmentu tkanki nerki. (A) Zdjęcie mikroskopowe badanej powierzchni tkanki. (B) Reprezentacje graficzne dla wybranych wartości m/z wykrytych w obrębie analizowanej powierzchni z rozdzielczością przestrzenną $150 \times 150 \mu\text{m}$ [H3].

Zastosowana w pracy [H3] metoda AuNPET LDI MSI umożliwiła analizę rozkładu przestrzennego związków młocząsteczkowych na powierzchni ludzkich tkanek nerki, a także pozwoliła na wskazanie 32 związków w największym stopniu różnicujących obszar tkanki nowotworowej i normalnej jako potencjalnych biomarkerów raka nerki. Dzięki dużej

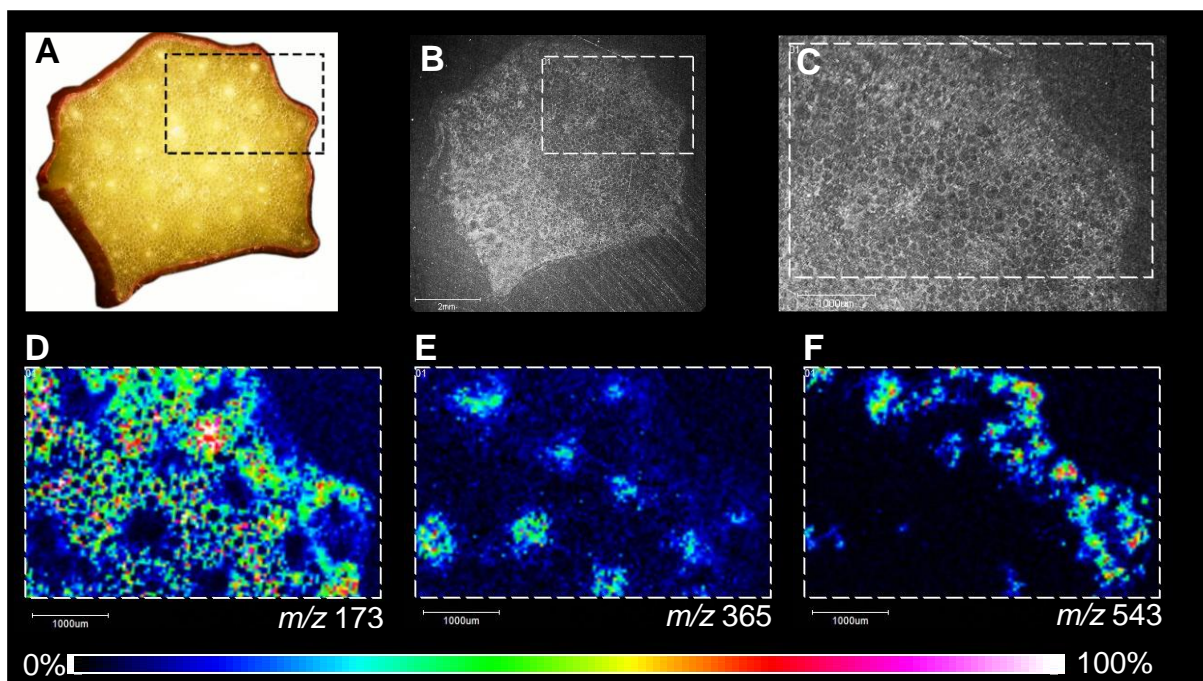
wydajności jonizacji, szybkiej preparatyki bez konieczności specjalnego przygotowywania próbki, dużej czułości przy małej objętości analitu jest to metoda doskonale nadająca się do analizy MS, MSI oraz MS/MS złożonych układów biologicznych takich jak tkanki ludzkie. Szczególnie istotnym potencjalnym zastosowaniem metody AuNPET LDI MSI jest analiza rozkładu aktywnych biologicznie związków małowcząsteczkowych na wszelkiego typu heterogenicznych tkankach zmienionych chorobowo, gdzie wychwycenie informacji przestrzennej zapewnia istotną przewagę nad standardowo stosowaną analizą zbiorczą, gdzie najbardziej znaczące różnice poziomów metabolitów mogą pozostać ukryte.

Zastosowanie metody AuNPET LDI MS w analizie tkanek roślinnych [H4]

Jednym z pierwszych zastosowań metody AuNPET LDI MS w analizie materiału roślinnego było obrazowanie MS przekroju poprzecznego łodygi rabarbaru (*Rheum rhabarbarum* L.) [H4]. Roślina ta jest wykorzystywana nie tylko jako źródło pożywienia, ale również jako surowiec do celów leczniczych. Rabarbar jest jedną z najstarszych i najbardziej znanych roślin stosowanych od tysięcy lat w tradycyjnej chińskiej medycynie do leczenia różnych chorób, w tym krwotoku z przewodu pokarmowego, zaprac, stanów zapalnych, wrzodów i żółtaczk. Obecnie wiele grup badawczych koncentruje się na analizie tej rośliny głównie pod kątem jej zastosowania w farmacji ze względu na jej liczne właściwości m.in. przeczyszczające, przeciwbólowe, przeciwbakteryjne, przeciwnowotworowe i przeciwskurczowe.

Techniki najczęściej wykorzystywane do rozdziału i analizy związków zawartych w materiale roślinnym ograniczały się jedynie do analizy jakościowej i ilościowej ekstraktów roślinnych. Wizualizacja dystrybucji biocząsteczek w narządach i organellach różnych próbek pochodzenia biologicznego do niedawna były wykonywane głównie z wykorzystaniem konwencjonalnych technik, takich jak mikroskopia fluorescencyjna z odpowiednią techniką znakowania lub barwienia. Jednak, aby w pełni poznać rozkład przestrzenny określonych związków w materiale roślinnym, obecnie najlepszym wyborem jest obrazowanie metodą spektrometrii masowej z desorpcją/ionizacją laserową (LDI-MSI). Niniejsza praca [H4] była pierwszym znanym w literaturze przykładem obrazowania MS fragmentu tkanki rabarbaru. W publikacji przedstawiono 48 najciekawszych obrazów jonowych będących odzwierciedleniem przestrzennego rozmieszczenia wybranych metabolitów w przekroju poprzecznym łodygi rabarbaru. Podobnie jak w przypadku obrazowania tkanki nowotworowej opisanego w poprzednim punkcie, również w tym przypadku obrazowanie MS z wykorzystaniem metody AuNPET LDI wykonano dla powierzchni materiału roślinnego odbitego na płytce zmodyfikowanej nanocząstkami złota (rysunek 7). Strukturę większości zaprezentowanych metabolitów potwierdzono analizą MS/MS w trybie LIFT®.

Metoda AuNPET LDI MSI umożliwiła szybką analizę, rozkładu przestrzennego szerokiej gamy związków młocząsteczkowych (metabolitów roślinnych) na powierzchni przekroju poprzecznego łodygi rabarbaru bez konieczności specjalnego przygotowywania próbki.



Rysunek 7. Wyniki obrazowania MS metodą AuNPET LDI powierzchni przekroju poprzecznego łodygi rabarbaru z rozdzielczością przestrzenną $40 \times 40 \mu\text{m}$ [H4].

W publikacji [H4] przedstawiono 48 obrazów jonowych wybranych metabolitów, których struktura w większości przypadków została potwierdzona analizą MS/MS. Praca [H4] stanowi pierwszy znany w literaturze przykład obrazowania MS fragmentu tkanki rabarbaru.

[H5-H8] Zastosowanie metody $^{109}\text{AgNPET}$ LDI MS w analizie związków małowcząsteczkowych

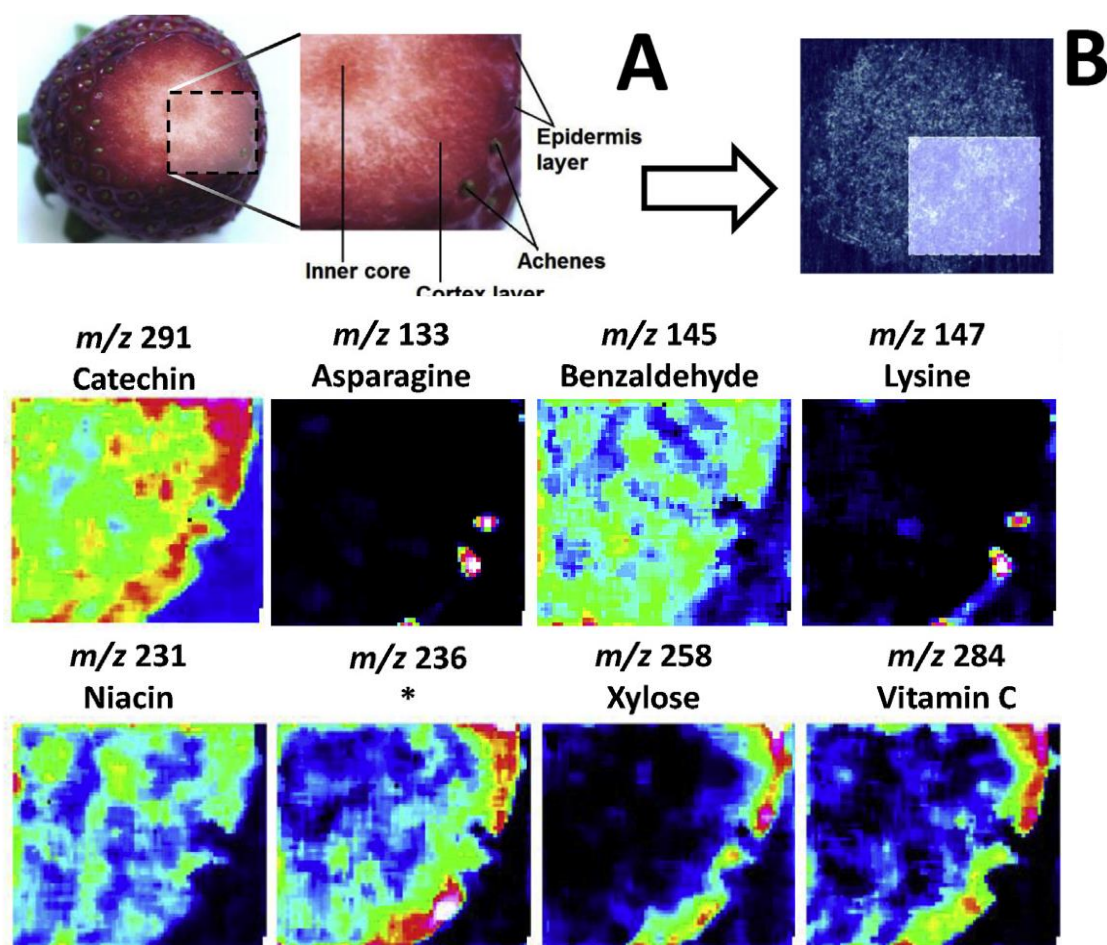
W celu zademonstrowania skuteczności metody $^{109}\text{AgNPET}$ LDI MS w analizie związków małowcząsteczkowych, podobnie jak w przypadku poprzedniej metody, przeprowadzono szereg pomiarów MS, MSI oraz MS/MS z wykorzystaniem różnego typu wymagających w analizie obiektów testowych w tym tkanki roślinnej, ludzkiej oraz płynów fizjologicznych.

[H5] Zastosowanie metody w analizie związków małowcząsteczkowych w tkankach roślinnych

Przykładem zastosowania metody $^{109}\text{AgNPET}$ LDI w obrazowaniu MS złożonych układów biologicznych była analiza przekroju poprzecznego owoca truskawki (*Fragaria x ananassa* Duch., *Rosaceae*) [H5]. Obecnie truskawka jest jednym z najczęściej uprawianych owoców jagodowych na świecie. Truskawka, dzięki swoim niepowtarzalnym walorom smakowym, zapachowym oraz odżywczym, stała się niezwykle popularnym składnikiem wielu produktów spożywczych. Skład chemiczny truskawki zależy od odmiany, warunków uprawy, dojrzewania, zbioru i przechowywania. Większość związków obecnych w truskawkach została zidentyfikowana metodą spektrometrii mas (MS) sprzężonej z technikami separacji, takimi jak chromatografia gazowa (GC) i cieczowa (LC). Jednak tego typu metody wymagają przeprowadzenia wcześniejszej ekstrakcji związków z tkanki roślinnej oraz nie dostarczają informacji na temat przestrzennej dystrybucji interesujących związków w badanych owocach.

W literaturze można było znaleźć jedynie nieliczne doniesienia przedstawiające obrazowanie MS tkanek truskawki z wykorzystaniem techniki MALDI i DESI.

Niniejsza publikacja [H5] przedstawia obrazowanie LDI-MS w analizie przestrzennej dystrybucji metabolitów o niskiej masie cząsteczkowej w owocu truskawki z wykorzystaniem powierzchni modyfikowanej nanocząstkami srebra monoizotopowego. Wyniki obrazowania przedstawiono w formie reprezentacji graficznej rozkładu przestrzennego dla wybranych 31 wartości m/z na badanej powierzchni tkanki roślinnej (rysunek 8). Zidentyfikowane metabolity należały do różnych klas związków chemicznych m.in fenole, witaminy, cukry, amionokwasy, kwasy karboksylowe, flawonoidy. Strukturę większości zaprezentowanych metabolitów potwierdzono analizą MS/MS w trybie LIFT®. Dla większości związków było to pierwsze w literaturze określenie rozmieszczenia przestrzennego w owocu truskawki.



Rysunek 8. Wyniki obrazowanie MS metodą $^{109}\text{AgNPET}$ LDI powierzchni przekroju poprzecznego owocu truskawki z rozdzielczością przestrzenną $100 \times 100 \mu\text{m}$ [H5]

Zastosowanie metody $^{109}\text{AgNPET}$ LDI MSI w analizie związków małowcząsteczkowych w materiale roślinnym [H5] pozwoliło zwizualizować rozkład przestrzenny 31 metabolitów obecnych w owocach truskawki odmiany *Primoris*. Strukturę większości z nich potwierdzono analizą MS/MS. Zastosowana metoda umożliwiła dokonanie korelacji funkcji biologicznej wykrytych związków z ich lokalizacją na badanej powierzchni. Znajomość lokalizacji

specyficznego związku biologicznie aktywnego w tkance może ułatwić i zoptymalizować jego pozyskiwanie z rośliny co potencjalnie może znaleźć swoje zastosowanie w medycynie, farmacji oraz w przemyśle chemicznym, gdzie wiedza ta może być wykorzystana w lepszym, wydajniejszym i bardziej opłacalnym projektowaniu różnych procesów przetwarzania roślin.

[H6-H8] Zastosowanie metody $^{109}\text{AgNPET}$ LDI w analizie MS związków małowcząsteczkowych w ludzkich tkankach

Tematem przewodnim badań przedstawionych w publikacjach [H6-H8] było zastosowanie metody $^{109}\text{AgNPET}$ LDI MS w niecelowanej analizie metabolicznej próbek od pacjentów z nowotworem nerki oraz identyfikacja związków małowcząsteczkowych pozwalających na wczesne rozpoznawanie i poprawę diagnostyki raka nerki. Badany materiał stanowiły próbki surowicy [H6], moczu [H7] oraz tkanek [H8] pobrane od 50 pacjentów chorujących na nowotwór nerki oraz 50 ochotników z każdej grupy kontrolnej. Łącznie zarejestrowano po 100 widm MS dla każdego rodzaju materiału biologicznego z czego połowę w każdym przypadku stanowiły próbki kontrolne. Zestawy danych MS poddano wielowymiarowej analizie statystycznej za pośrednictwem platformy MetaboAnalyst 3.0, w celu ujawnienia zmian metabolicznych w surowicy, moczu oraz tkankach pacjentów z rakiem nerki w odniesieniu do zdrowych.

Pierwsza praca z cyklu [H6] skupiała się na niecelowanej analizie ekstraktów surowicy. Analiza statystyczna danych uzyskanych z widm MS pozwoliła na wytypowanie 9 wartości m/z , które w największym stopniu różnicowały próbki pochodzące od osób chorych od próbek z grupy kontrolnej. Sześć wartości m/z występowało w dużo większej ilości w ekstraktach surowicy pacjentów z nowotworem nerki ($FC > 1,6$), natomiast dla pozostałych trzech wartości m/z ten trend był odwrotny ($FC < 0,5$).

Kolejna praca z cyklu [H7] obejmowała analizę 100 próbek ekstraktów moczu z wykorzystaniem metody $^{109}\text{AgNPET}$ LDI MS. 50 próbek pochodziło od pacjentów z rakiem nerki natomiast kolejne 50 od zdrowych ochotników. Zidentyfikowano 7 wartości m/z , które różniły się istotnie pod względem intensywności ($p < 0,05$) między próbkami moczu od pacjentów z rakiem nerki a zdrowymi ochotnikami. Przydatność tego modelu w diagnostyce raka nerki potwierdza m.in. krzywa ROC sporządzona dla 7 wyselekcjonowanych wartości m/z spełniających wszystkie warunki.

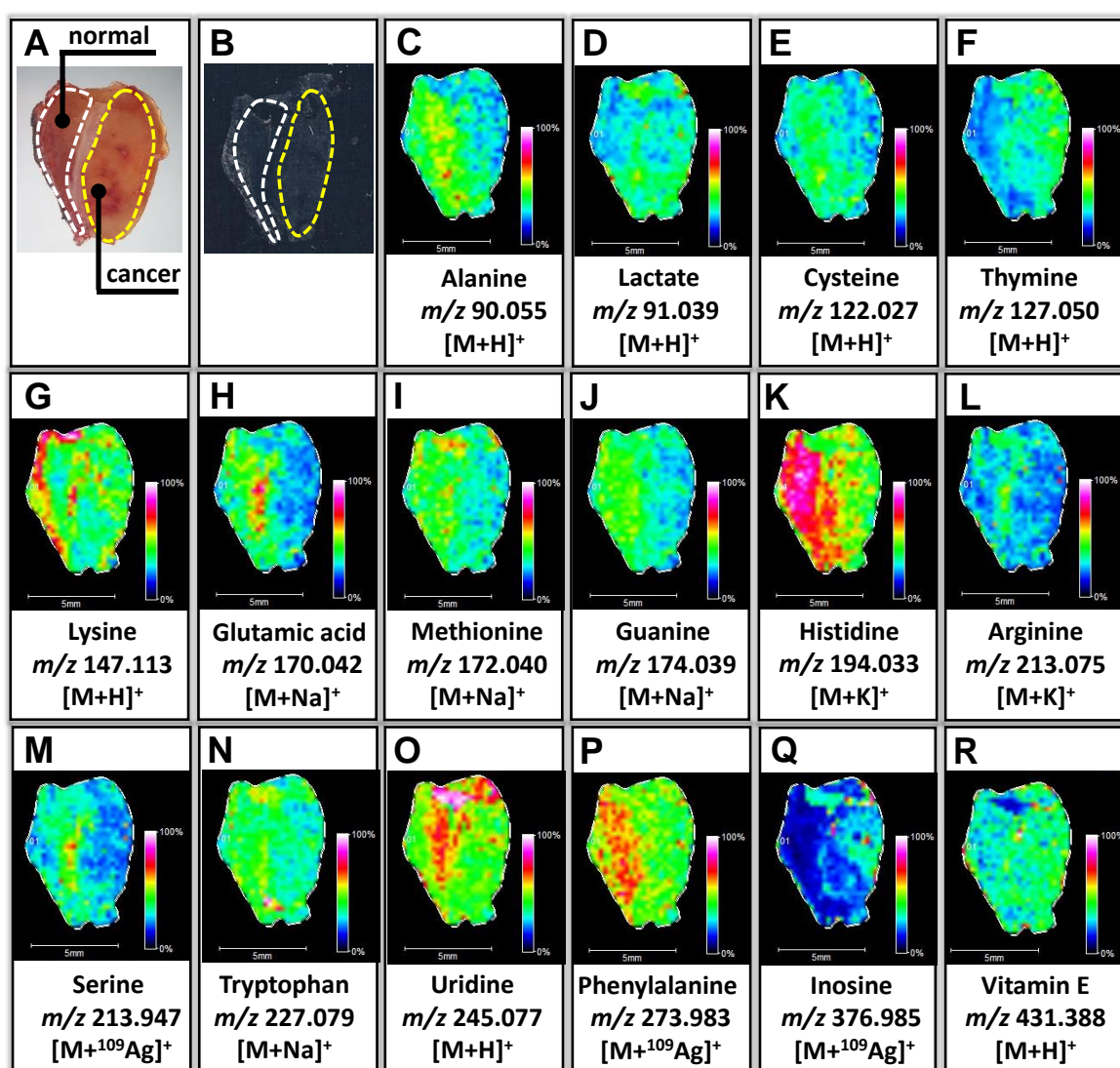
Ostatnia praca z tego cyklu [H8] poświęcona była analizie tkanek ludzkich pobranych od 50 pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem nerki (oba fragmenty tkanki podchodziły od tego samego pacjenta) z wykorzystaniem m.in. metody $^{109}\text{AgNPET}$ LDI MS. Analizie poddano osobno ekstrakty pochodzące z frakcji polarnej wodno-metanolowej oraz niepolarniej chloroformowej.

Niniejsze prace [H6-H8] wykazują, że metoda $^{109}\text{AgNPET}$ LDI MS w połączeniu z wielowymiarową analizą statystyczną jest użytecznym narzędziem w analizie metabolicznej ekstraktów surowicy moczu oraz tkanek stosowanym zwłaszcza pod kątem poszukiwania potencjalnych biomarkerów raka nerki. Dzięki zastosowaniu tej metody możliwe było wskazanie związków małowcząsteczkowych, które w największym stopniu różnicują grupę

nowotworową od grupę kontrolnej. Metoda $^{109}\text{AgNPET}$ LDI MS może być z powodzeniem wykorzystywana w niecelowanej analizie metabolicznej materiału biologicznego zwłaszcza ekstraktów surowicy, moczu oraz ludzkich tkanek. Metoda $^{109}\text{AgNPET}$ LDI MS wykazuje również potencjał jako mniej inwazyjne narzędzie w diagnostyce raka nerki lub monitorowania progresji tego nowotworu u pacjentów. W przyszłości ta metoda może być również potencjalnie wykorzystana do opracowania i produkcji szybkich testów diagnostycznych.

[H1] Zastosowanie metody $^{109}\text{AgNPET}$ LDI w analizie MSI związków małowcząsteczkowych w ludzkich tkankach

Niniejsza publikacja [H1] jest pierwszym znanym w literaturze przykładem wykorzystania powierzchni modyfikowanej srebrem-109 w obrazowaniu ludzkich tkanek.



Rysunek 9. Wyniki obrazowania techniką $^{109}\text{AuNPET}$ LDI MS fragmentu tkanki nerki. (A) Zdjęcie mikroskopowe badanej powierzchni tkanki oraz (B) jej odbitki na płytce. (C-R) Reprezentacje graficzne dla wybranych wartości m/z wykrytych w obrębie analizowanej powierzchni z rozdzielczością przestrzenną $250 \times 250 \mu\text{m}$ [H1].

W celu wizualizacji rozkładu przestrzennego związków małowcząsteczkowych w tkance nerki pobranej od pacjenta ze zdiagnozowanym nowotworem tego narządu przeprowadzono obrazowanie z wykorzystaniem metody $^{109}\text{AgNPET}$ LDI MS [H1]. Eksperyment MSI wykonywano przez rejestrację widm MS z rozdzielczością przestrzenną $250 \times 250 \mu\text{m}$. Część eksperymentalna związana z przygotowaniem materiału do analizy wymagała jedynie odbicia badanego fragmentu tkanki na płytce pokrytej nanocząstkami srebra-109. W pracy przedstawiono reprezentacje graficzne rozkładu przestrzennego wybranych 10 wartości m/z odpowiadających 10 aminokwasom w obrębie badanej tkanki (rysunek 9). Zastosowana metoda pozwoliła wskazać zróżnicowanie intensywności wybranych związków w obrębie tkanki nowotworowej i normalnej. Nieznacznie wyższy poziom alaniny, seryny, treoniny, lizyny, metioniny, histydyny, fenyloalaniny i kwasu glutaminowego zaobserwowano w obszarze tkanki normalnej. Natomiast jony przypisane do adduktu potasowego argininy były obecne w większej ilości w tkance nowotworowej.

[H9] Porównanie wydajności jonizacji związków testowych w metodzie $^{109}\text{AgNPET}$ i AuNPET

W tej pracy [H9] po raz pierwszy przedstawiono wyniki analizy jakościowej oraz ilościowej kwasów karboksylowych z wykorzystaniem powierzchni modyfikowanych nanocząstkami złota oraz srebra monoizotopowego (AuNPET $^{109}\text{AgNPs}$) z wykorzystaniem techniki LDI MS. Kwasy dikarboksylowe i tłuszczowe są zwykle wykrywane przy użyciu chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas (LC-MS). Znanych jest tylko kilka publikacji przedstawiających podejście LDI MS do wykrywania tych związków.

Do badania wybrano 10 kwasów karboksylowych, o różnych właściwościach chemicznych: kwas 3-metylohipurowy z grupy kwasów karboksylowych; kwas jabłkowy, pimelinowy i azelainowy należące do grupy nasyconych kwasów dikarboksylowych; kwas palmitynowy (C16:0) i arachidowy (C20:0) z grupy nasyconych kwasów tłuszczowych oraz kwas linolowy (C18:2), oleinowy (18:1), arachidonowy (20:4) i erukowy (22:1) z grupy nienasyconych kwasów tłuszczowych.

Mieszanina wszystkich wymienionych kwasów była mierzona bezpośrednio w stężeniach w zakresie od 1 mg/ml do 100 ng/ml, co odpowiada 10 000-krotnej zmianie stężenia. Wartość granicy wykrywalności (LOD) obliczono dla wartości sygnału do szumu (S/N) 3 dla próbek o najniższym stężeniu. Każda próbka została umieszczona na płytce docelowej w objętości 1 μl , co odpowiada 1 μg do 10 pg kwasów na plamka pomiarowa o wielkości od około 3 nmol do 300 fmol, obliczone, na przykład, na masę molową kwasu erukowego.

Analiza widm MS wykonanych dla związków naniesionych na płytkę modyfikowaną nanocząstkami srebra monoizotopowym ($^{109}\text{AgNPET}$) wykazała obecność sygnałów od wszystkich kwasów karboksylowych. Dominującym jonem w każdym przypadku był addukt ze srebrem monoizotopowym, pozostałe addukty z atomem wodoru, sodu i potasu wykryto w znacznie mniejszej ilości.

W przypadku związków naniesionych na płytkę modyfikowaną nanocząstkami złota (AuNPET) zidentyfikowano jedynie pięć z dziesięciu badanych związków. Sygnały tych kwasów stanowiły addukty z kationem sodu, potasu i wodoru, przy czym te ostatnie miały znacznie

mniejszą intensywność. Związki, których nie udało się zarejestrować na widmie łączyła obecność długiego łańcucha węglowodorowego o małej polarności. W oparciu o wartości intensywności oraz stężenia dla wszystkich zidentyfikowanych związków wyznaczono krzywe wzorcowe do analiz ilościowych. W większości przypadków współczynnik determinacji liniowej R^2 przekraczał wartość 0,99 co jest wynikiem bardzo dobrym, biorąc pod uwagę bardzo duży zakres zastosowanych stężeń analitów. Na obu płytках najwyższą intensywność dla wszystkich adduktów kwasów karboksylowych stwierdzono w widmach MS próbek o stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$, które odpowiada 100 ng związku przypadającego na punkt pomiarowy. Warto wspomnieć, że w tej pracy po raz pierwszy opublikowano wartości LOD dla kwasu jabłkowego, pimelinowego i azelainowego mierzonych ilościowo z wykorzystaniem metody LDI MS. Reasumując, kwasy karboksylowe były jonizowane skuteczniej na płytce $^{109}\text{AgNPET}$ w porównaniu z AuNPET co oceniono na podstawie wyższych intensywności sygnałów. Najbardziej widoczne było to w przypadku kwasów tłuszczowych mierzonych z wykorzystaniem AuNPET, gdzie nie wykryto sygnałów adduktów kwasu palmitynowego, linolowego, oleinowego, kwas arachidonowy i erukowego. Może to być spowodowane niską skutecznością jonizacji związków małopolarnych przez nanocząstki złota. W przypadku $^{109}\text{AgNPs}$, zaobserwowano głównie addukty z jonem srebra-109, natomiast w przypadku AuNPET, znaleziono addukty z jonem sodu, potasu i wodoru. Nasze wyniki sugerują, że nanocząsteczki złota nie nadają się do wykrywania śladów kwasów o niskiej polarności.

Kwasy karboksylowe, zwłaszcza w przypadku kwasów tłuszczowych były skuteczniej jonizowane na płytce $^{109}\text{AgNPET}$ niż na AuNPET. Obie metody mają niższą granicę wykrywalności niż stosowane powszechnie zestawy UPLC-MS. Metoda $^{109}\text{AgNPET}$ pozwoliła na uzyskanie dużo mniejszej wartości LOD dla kwasu palmitynowego niż w przypadku pomiaru z wykorzystaniem metody MALDI MS na papierze czy MALDI-FTICR MS.

[H10] Zastosowanie metody UPLC-HRMS w analizie związków małowcząsteczkowych w ekstraktach moczu i tkanek

W celu porównania opracowanych przez nasz zespół metod LDI MS wykorzystujących powierzchnie modyfikowane nanocząstkami srebra i złota z klasycznymi metodami najczęściej obecnie stosowanymi w analizie jakościowej i ilościowej związków małowcząsteczkowych – UHPLC HRMS - przeprowadzono niecelowaną analizę tkanek oraz próbek moczu od czterech pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem nerki [H10]. Próbę kontrolną stanowiło piętnaście próbek moczu pochodzących od zdrowych ochotników. Próbki analizowano z wykorzystaniem wysokorozdzielczej spektrometrii mas w połączeniu z ultrasprawną chromatografią ciekłą (UPLC-HRMS). Pomiary wykonano z wykorzystaniem chromatografu ciekłego (Agilent 1290) wyposażonego w kolumnę typu HILIC oraz sprzężonego ze spektrometrem mas (Agilent 6538) z łagodną jonizacją typu elektrorozpylanie (ESI) oraz analizatorem kwadropolowym połączonym z analizatorem czasu przelotu (QqTOF). Zastosowana metoda UPLC-HRMS pozwoliła na identyfikację związków małowcząsteczkowych o potencjalnym znaczeniu w diagnostyce nowotworu nerki w ekstraktach tkanek oraz moczu. Analiza stosunku intensywności danej wartości m/z w próbach kontrolnych kontrolnej oraz

nowotworowej pozwoliła wytypować 28 związków, które w największym stopniu różnicowały obie grupy. W przypadku ośmiu metabolitów zaobserwowano taką samą tendencję w różnicowaniu badanych grup zarówno w próbkach tkanek jak i w moczu. Zarówno w tkankach nowotworowych, jak i w moczu chorych na nowotwór w porównaniu z próbkami kontrolnymi stwierdzono znacznie wyższą intensywność 6 związków: hydroksybutyrylokarnityna, dekanoilokarnityna, propanoilokarnityna, karnityna, dodekanoilokarnityna i norepinefryna siarczan. Natomiast dla wartości m/z przypisanych do ryboflawiny i NAAG stwierdzono znacznie wyższą intensywność zarówno w tkance normalnej jak i w próbkach moczu osób zdrowych w porównaniu do próbek pochodzących od pacjentów z rakiem nerki. Wszystkie osiem wymienionych związków można uznać za potencjalne biomarkery raka jasnokomórkowego nerki. Wstępne badania przedstawione w niniejszej pracy będą kontynuowane w przyszłości na większą skalę w oparciu o większą liczbą pacjentów.

Zastosowana metoda UPLC-HRMS umożliwiła identyfikację 28 związków małowcząsteczkowych o potencjalnym znaczeniu w diagnostyce nowotworu nerki w ekstraktach tkanek oraz moczu. Jednak w porównaniu do metod AuNPET i $^{109}\text{AgNPET}$ LDI MS analiza metodą UPLC-HRMS okazała się bardzo czasochłonna, kosztowna i wymagała specjalnego przygotowania oraz co najważniejsze wyspecjalizowanego instrumentu o wysokiej rozdzielczości.

Podsumowanie [H1-H10]

Do najważniejszych osiągnięć, wynikających z przeprowadzonych badań zaprezentowanych w publikacjach [H1-H10] należy:

- Opracowanie nowej, czulej, specyficznej szybkiej i prostej metody obrazowania MS pod ciśnieniem atmosferycznym *in vivo* materiału biologicznego z wykorzystaniem LARESI MSI w trybie MRM, dedykowanej do analizy związków małowcząsteczkowych.
- Wykazanie, że metoda LARESI MSI MRM pozwala na analizę przestrzennego rozmieszczenia związków małowcząsteczkowych w bardzo złożonych matrycach.
- Wykazanie, że metoda AuNPET LDI MS może być wykorzystana w identyfikacji zmodyfikowanych fragmentów struktury kwasów nukleinowych w ekstrakcie DNA wyizolowanym z komórek rakowych.
- Wykazanie, że opracowane przez nasz zespół autorskie metody spektrometrii mas z laserową desoprpcją/ionizacją ($^{109}\text{AgNPET}$ i AuNPET) mogą być stosowane w analizie ilościowej i jakościowej związków małowcząsteczkowych w złożonych próbkach oraz analizie ich rozkładu przestrzennego w materiale biologicznym (tkankach ludzkich i roślinnych)
- Wykazanie, że metoda $^{109}\text{AgNPET}$ LDI MS w połączeniu z wielowymiarową analiza statystyczną może być z powodzeniem wykorzystana w poszukiwaniu potencjalnych biomarkerów nowotworowych.

Wyniki przedstawione w cyklu publikacji naukowych [H1-10] pozwalają wskazać nowe obszary badawcze, w których można wykorzystać opracowane przez nasz zespół metody do laserowej spektrometrii mas (AuNPET, AgNPET, ¹⁰⁹AgNPET LDI MS oraz LARESI MSI MRM).

- Metody obrazowania MS z wykorzystaniem AuNPET i ¹⁰⁹AgNPET pozwalają zniwelować wszelkie niedogodności związane z koniecznością zastosowania tradycyjnych matryc standardowo stosowanych w MSI. Dzięki temu możliwe jest zastosowanie łagodnej metody jonizacji jaką jest LDI w analizie związków o niskich masach cząsteczkowych na powierzchniach niemal dowolnego materiału trwałego w warunkach wysokiej próżni.
- Metody obrazowania MS z wykorzystaniem tych technik odznaczają się niezwykle uproszczoną metodyką przygotowania materiału do analizy co pozwala zniwelować ryzyko możliwej deformacji materiału badanego w wysokiej próżni instrumentu.
- Obie metody dostarczają informacji przestrzennych na temat lokalizacji określonego analitu w skrawkach różnych tkanek bez konieczności ekstrakcji, oczyszczania, rozdzielania czy też znakowania.
- Zastosowane metody nie wymagają wcześniejszych czasochłonnych wieloetapowych specjalnych przygotowań próbki do pomiaru co pozwala nie tylko zredukować całkowity czas analizy, ale przede wszystkim powoduje znaczne ograniczenie zużycia odczynników chemicznych a w szczególności rozpuszczalników organicznych co wpisuje się w założenia Zielonej Chemii.
- Metody AuNPET i ¹⁰⁹AgNPET LDI MS mogą mieć potencjalnie zastosowanie w standardowej diagnostyce różnych chorób. Ich znaczenie w medycynie może być znaczące, zwłaszcza że wykazują one znaczną przewagę w analizie dystrybucji związków małowcząsteczkowych takich jak lipidy czy leki w nienaruszonych tkankach nad konwencjonalnymi technikami ilościowymi takimi jak immunohistochemia czy radiografia, które są bardzo czasochłonne i dostarczają ograniczonych informacji odnośnie związków chemicznych.
- Zastosowanie tych metod w medycynie może umożliwić wykonywanie ultra-szybkiego obrazowania MS tkanek nowotworowych i zdrowych oraz (co wykonywane jest najczęściej) także tkanek z obszarem zdrowym i chorym poprzez znaczne uproszczenie metodyki obrazowania – zastosowania głównie imprintu tkanek na targety LDI MS aktywowane wcześniej nanostrukturami złota lub srebra-109. Dalekosiężnym celem badań jest stworzenie testów diagnostycznych opartych o wykrywanie markerów w krwi i/lub moczu. Prawdopodobnie możliwe także będzie opracowanie zestawu danych MS, metod MS, lub też kompletnych rozwiązań opartych o MS do wykrywania biomarkerów przez lokalny personel szpitalny, lub personel naukowy wykonujący badania zlecone. Celem powiązanych z badaniami jest opracowanie rozwiązań do wykrywania granic tkanek nowotworowych do zastosowania podczas zabiegu (sondy diagnostyczne).

- W przyszłości metody te mogą mieć potencjalne zastosowanie w lokalizacji i wizualizacji dystrybucji składników żywności m.in. w celu poprawy jakości i bezpieczeństwa żywności.
- Wszystkie metody mogą również okazać się bardzo cennym narzędziem w farmacji w badaniach dystrybucji, metabolizmu i akumulacji leków w organizmie.
- Opisane metody mogą być cennym narzędziem w badaniach z zakresu ekologii i ochrony środowiska zwłaszcza do szybkiej analizy jakościowej oraz wykrywania rozkładu powierzchniowego określonych analitów w biofilmach pokrywających różne powierzchnie. Skład chemiczny biofilmu wskazuje na konkretne, istotne dla środowiska stany, dlatego wiedza w tym zakresie może być wykorzystana w wielu różnych systemach w tym m.in. sieci uzdatniania wody i oczyszczania ścieków w celu zmniejszenia biofoulingu.
- Obrazowanie metodą spektrometrii mas z zastosowaniem tych metod daje możliwość śledzenia losów pestycydów w liściach i owocach roślin.
- Kolejnym potencjalnym zastosowaniem obrazowanie MS z wykorzystaniem obu metod jest analiza przenikania wybranych składników aktywnych kosmetyków przez skórę.
- Ponadto obie metody można zastosować w badaniach wpływu mikrozanieczyszczeń w tym produktów higieny osobistej, farmaceutyków, toksyn przemysłowych, pestycydów i innych nieskategoryzowanych materiałów toksycznych na organizmy żywe poprzez ich specyficzną lokalizację tkankową zwłaszcza w obwodowych tkankach liści roślin.

LITERATURA

- Abdelhamid, H.N., 2019. Nanoparticle-based surface assisted laser desorption ionization mass spectrometry: a review. *Microchim. Acta* 2019 18610 186, 1–35. <https://doi.org/10.1007/S00604-019-3770-5>
- Abdelhamid, H.N., 2018. Nanoparticle assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for small molecule analytes. *Microchim. Acta*. <https://doi.org/10.1007/s00604-018-2687-8>
- and, Y.-S.L., Chen*, Y.-C., 2002. Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry on Sol-Gel-Derived 2,5-Dihydroxybenzoic Acid Film. *Anal. Chem.* 74, 5793–5798. <https://doi.org/10.1021/AC020418A>
- Arendowski, Adrian, Nizioł, J., Ossoliński, K., Ossolińska, A., Ossoliński, T., Dobrowolski, Z., Ruman, T., 2018. Laser desorption/ionization MS imaging of cancer kidney tissue on silver nanoparticle-enhanced target. *Bioanalysis* 10, 83–94. <https://doi.org/10.4155/bio-2017-0195>
- Arendowski, A., Nizioł, J., Ruman, T., 2018. Silver-109-based laser desorption/ionization mass spectrometry method for detection and quantification of amino acids. *J. Mass Spectrom.* 53. <https://doi.org/10.1002/jms.4068>
- Arendowski, A., Ruman, T., 2017. Laser Desorption/Ionisation Mass Spectrometry Imaging of European Yew (*Taxus baccata*) on Gold Nanoparticle-enhanced Target. *Phytochem. Anal.* 28, 448–453. <https://doi.org/10.1002/PCA.2693>

- Balog, J., Sasi-Szabó, L., Kinross, J., Lewis, M.R., Muirhead, L.J., Veselkov, K., Mirnezami, R., Dezsó, B., Damjanovich, L., Darzi, A., Nicholson, J.K., Takáts, Z., 2013. Intraoperative tissue identification using rapid evaporative ionization mass spectrometry. *Sci. Transl. Med.* 5. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005623>
- Chughtai, K., Heeren, R.M.A., 2008. Mass Spectrometric Imaging for Biomedical Tissue Analysis. <https://doi.org/10.1021/cr100012c>
- Hadacek, F., Bachmann, G., 2015. Low-molecular-weight metabolite systems chemistry. *Front. Environ. Sci.* <https://doi.org/10.3389/fenvs.2015.00012>
- Hillenkamp, F., Jaskolla, T.W., Karas, M., 2013. The MALDI Process and Method, in: MALDI MS. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 1–40. <https://doi.org/10.1002/9783527335961.ch1>
- Ifa, D.R., Wiseman, J.M., Song, Q., Cooks, R.G., 2007. Development of capabilities for imaging mass spectrometry under ambient conditions with desorption electrospray ionization (DESI). *Int. J. Mass Spectrom.* 259, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2006.08.003>
- Karas, M., Bachmann, D., Hillenkamp, F., 1985. Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules.
- Liang, Z., Zhang, S., Li, X., Wang, T., Huang, Y., Hang, W., Yang, Z., Li, J., Tian, Z., 2017. Tip-enhanced ablation and ionization mass spectrometry for nanoscale chemical analysis. *Sci. Adv.* 3, eaaq1059. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaq1059>
- Niehuis, E., Heller, T., Feld, H., Benninghoven, A., 1987. Design and performance of a reflectron based time-of-flight secondary ion mass spectrometer with electrodynamic primary ion mass separation. *J. Vac. Sci. Technol. A Vacuum, Surfaces, Film.* 5, 1243–1246. <https://doi.org/10.1116/1.574781>
- Nizioł, J., Ossoliński, K., Ossoliński, T., Ossolińska, A., Bonifay, V., Sekuła, J., Dobrowolski, Z., Sunner, J., Beech, I., Ruman, T., 2016. Surface-Transfer Mass Spectrometry Imaging of Renal Tissue on Gold Nanoparticle Enhanced Target. *Anal. Chem.* 88. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01859>
- Nizioł, Joanna, Rode, W., Laskowska, B., Ruman, T., 2013. Novel monoisotopic ¹⁰⁹AgNPET for laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 85, 1926–1931. <https://doi.org/10.1021/ac303770y>
- Nizioł, J., Rode, W., Zieliński, Z., Ruman, T., 2013. Matrix-free laser desorption-ionization with silver nanoparticle-enhanced steel targets. *Int. J. Mass Spectrom.* 335. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2012.10.009>
- Nizioł, J., Ruman, T., 2013. Surface-transfer mass spectrometry imaging on a monoisotopic silver nanoparticle enhanced target. *Anal. Chem.* 85. <https://doi.org/10.1021/ac4031658>
- Nizioł, J., Sekuła, J., Ruman, T., 2017. Visualizing spatial distribution of small molecules in the rhubarb stalk (*Rheum rhabarbarum*) by surface-transfer mass spectrometry imaging. *Phytochemistry* 139. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.04.006>
- Perreault, P., Robert, E., Patience, G.S., 2019. Experimental Methods in Chemical Engineering: Mass Spectrometry—MS. *Can. J. Chem. Eng.* 97, 1036–1042. <https://doi.org/10.1002/cjce.23466>
- Phan, L.M., Yeung, S.C.J., Lee, M.H., 2014. Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies. *Cancer Biol. Med.* <https://doi.org/10.7497/j.issn.2095-3941.2014.01.001>
- Porta, T., Lesur, A., Varesio, E., Hopfgartner, G., 2015. Quantification in MALDI-MS imaging: what can we learn from MALDI-selected reaction monitoring and what can we expect for imaging? *Anal.*

Bioanal. Chem. 407, 2177–2187. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8315-5>

Richard M. Caprioli, Terry B. Farmer, A., Gile, J., 1997. Molecular Imaging of Biological Samples: Localization of Peptides and Proteins Using MALDI-TOF MS. <https://doi.org/10.1021/AC970888I>

Sekuła, J., Nizioł, J., Rode, W., Ruman, T., 2015. Gold nanoparticle-enhanced target (AuNPET) as universal solution for laser desorption/ionization mass spectrometry analysis and imaging of low molecular weight compounds. *Anal. Chim. Acta* 875, 61–72. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2015.01.046>

Sunner, J., Dratz, E., Chen, Y.-C., Biochem Biophys, R.D., 1995. Graphite Surface-Assisted Laser Desorption/ Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry of Peptides and Proteins from Liquid Solutions. *J. Chem. Phys. Lett* 67, 579–585.

Takáts, Z., Wiseman, J.M., Gologan, B., Cooks, R.G., 2004. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science* 306, 471–3. <https://doi.org/10.1126/science.1104404>

Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T., Matsuo, T., 1988. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2, 151–153. <https://doi.org/10.1002/rcm.1290020802>

Wei, J., Buriak, J.M., Siuzdak, G., 1999. Desorption–ionization mass spectrometry on porous silicon. *Nat.* 1999 3996733 399, 243–246. <https://doi.org/10.1038/20400>

Wiseman, J.M., Ifa, D.R., Zhu, Y., Kissinger, C.B., Manicke, N.E., Kissinger, P.T., Cooks, R.G., 2008. Desorption electrospray ionization mass spectrometry: Imaging drugs and metabolites in tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 18120–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801066105>

Woldegiorgis, A., Löwenhielm, P., Björk, A., Roeraade, J., 2004. Matrix-assisted and polymer-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of low molecular weight polystyrenes and polyethylene glycols. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 2904–2912. <https://doi.org/10.1002/RCM.1707>

Zhang, J., Rector, J., Lin, J.Q., Young, J.H., Sans, M., Katta, N., Giese, N., Yu, W., Nagi, C., Suliburk, J., Liu, J., Bensussan, A., Dehoog, R.J., Garza, K.Y., Ludolph, B., Sorace, A.G., Syed, A., Zahedivash, A., Milner, T.E., Eberlin, L.S., 2017. Nondestructive tissue analysis for ex vivo and in vivo cancer diagnosis using a handheld mass spectrometry system. *Sci. Transl. Med.* 9. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan3968>

5. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ.

5.1. STAŻE I WYJAZDY NAUKOWE

13.01 – 15.03.2016 The University of Oklahoma, Department of Microbiology and Plant Biology, staż naukowy w zespole prof. J. Sunnera i prof. Iwony Beech w zakresie obrazowania MS z wykorzystaniem metody LASCA oraz profilowania metabolomicznego materiału biologicznego.

22.06 – 03.07.2017 Universidade Federal de Ouro Preto, wyjazd naukowy w ramach współpracy z zespołem prof. Orlando Santosa oraz prof. Katiane Nogueira, w ramach Programu Erasmus+

01.08 – 18.08.2018 The University of Montana, Center for Biofilm Engineering and Department of Chemical and Biological Engineering, wyjazd naukowy w ramach współpracy z zespołem prof. J. Sunnera oraz Iwony Beech

5.2. BADANIA NAUKOWE REALIZOWANE WE WSPÓŁPRACY Z UCZELNIAMI ZAGRANICZNYMI

USA – Uniwersytet w Oklahomie

Współpraca naukowa z prof. Jana Sunnerem i Iwoną Beech, nawiązana podczas stażu podoktorskiego jest kontynuowana do dnia dzisiejszego w ramach badań dotyczących poszukiwania biomarkerów raka nerki oraz pęcherza moczowego z wykorzystaniem metod LDI MS oraz MSI. Wspólnie zrealizowaliśmy projekt grantowy OPUS 11 finansowany przez NCN pt. "Metody LDI MS oraz MSI w poszukiwaniu biomarkerów raka nerki" (projekt na sumę ok. 0,6 mln). W ramach konsultacji wyników badań realizowanych w ramach tego projektu w okresie od 01.08 do 18.08.2018 odbyłam kolejny staż naukowy w laboratorium prof. J. Sunnera oraz Iwony Beech tym razem w The University of Montana, Center for Biofilm Engineering and Department of Chemical and Biological Engineering. Obecnie pod moim kierownictwem wspólnie z prof. J. Sunnerem oraz Iwoną Beech realizowany jest projekt grantowy finansowany przez NCN w konkursie SONATA 14 pt. „Poszukiwanie oraz charakterystyka biomarkerów raka pęcherza” (2018/31/D/ST4/00109). Opisana aktywność zagraniczna zaowocowała łącznie trzema publikacjami naukowymi:

- J. Nizioł, K. Osoliński, T. Osoliński, A. Osolińska, **V. Bonifay**, J. Sekuła, Z. Dobrowolski, **J. Sunner**, **I. Beech** and T. Ruman, *Surface-transfer mass spectrometry imaging of renal tissue on gold nano-particle enhanced target*, *Analytical Chemistry*, 2016, 88, 7365-7371
- J. Nizioł*, **V. Bonifay**, K. Ossoliński, T. Ossoliński, A. Ossolińska, **J. Sunner**, **I. Beech**, A. Arendowski and T. Ruman, *Metabolomic study of human tissue and urine in clear cell renal carcinoma by LC-HRMS and PLS-DA*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2018, 410, 3859-3869
- J. Nizioł, **J. Sunner**, **I. Beech**, K. Ossoliński, A. Ossolińska, T. Ossoliński, A. Płaza and T. Ruman *Localization of metabolites of human kidney tissue with infrared laser-based selected reaction monitoring mass spectrometry imaging and silver-109 nanoparticle-based surface assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging*, *Analytical Chemistry*, 2020, 92, 4251–4258

Brazylia - Uniwersytet Federalny Ouro Preto

Nawiązana podczas wyjazdu w ramach Programu Erasmus+ współpraca z zespołem prof. Katiane Nogueira i prof. Leonardo Nogueira z Universidade Federal de Ouro Preto w Brazylii jest kontynuowana do dnia dzisiejszego w ramach badań dotyczących poszukiwania biomarkerów raka nerki oraz pęcherza moczowego z wykorzystaniem techniki atomowej spektrometrii emisyjnej ze wzbudzeniem w plazmie indukowanej (ICP-OES). Badania realizowane wspólnie z zespołem z Brazylii obejmują profilowanie wybranych pierwiastków w materiale biologicznym (ekstrakty surowicy) pobranym od pacjentów ze zdiagnozowanym

rakiem nerki oraz pęcherza moczowego oraz porównanie wyników z grupą kontrolną. Wspólnie zrealizowaliśmy projekt grantowy OPUS 11 finansowany przez NCN pt. "Metody LDI MS oraz MSI w poszukiwaniu biomarkerów raka nerki". Natomiast obecnie współpraca jest kontynuowana w ramach kierowanego przeze mnie projektu grantowego finansowanego przez NCN w konkursie SONATA 14 pt. „Poszukiwanie oraz charakterystyka biomarkerów raka pęcherza” (2018/31/D/ST4/00109). Opisana aktywność zagraniczna zaowocowała publikacją naukową:

- J. Nizioł*, V. Copie, B. P. Tripet, L.B. **Nogueira**, **K.O.P.C. Nogueira**, K. Ossoliński, A. Arendowski, T. Ruman. Metabolomic and elemental profiling of human tissue in kidney cancer. *Metabolomics*, 2021, 17, 30

USA – Uniwersytet Stanowy w Montanie

Współpraca z zespołem dr. Valérie Copié i dr Briana Tripeta z The University of Montana została zainicjowana w 2018 r w ramach realizacji projektu grantowego OPUS 11 finansowanego przez NCN pt. "Metody LDI MS oraz MSI w poszukiwaniu biomarkerów raka nerki". Obecnie współpraca jest kontynuowana w ramach kierowanego przeze mnie projektu grantowego finansowanego przez NCN w konkursie SONATA 14 pt. „Poszukiwanie oraz charakterystyka biomarkerów raka pęcherza” (2018/31/D/ST4/00109). Badania wspólnie realizowane obejmują profilowanie wybranych metabolitów w materiale biologicznym (ekstrakty surowicy, moczu i tkanek) pobranym od pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem nerki oraz pęcherza moczowego oraz porównanie wyników z grupą kontrolną z wykorzystaniem spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Opisana aktywność zagraniczna zaowocowała trzema publikacjami naukowymi:

- J. Nizioł*, K. Ossoliński, **B. P. Tripet**, **V. Copie**, A. Arendowski, T. Ruman Nuclear magnetic resonance and surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-based serum metabolomics of kidney cancer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2020, 412, 5827-5841
- J. Nizioł*, K. Ossoliński, **B. P. Tripet**, **V. Copie**, A. Arendowski, T. Ruman. Nuclear magnetic resonance and surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-based metabolome profiling of urine samples from kidney cancer patients. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021, 193, 113752
- J. Nizioł*, **V. Copie**, **B. P. Tripet**, L.B. Nogueira, K.O.P.C. Nogueira, K. Ossoliński, A. Arendowski, T. Ruman. Metabolomic and elemental profiling of human tissue in kidney cancer. *Metabolomics*, 2021, 17, 30

Polska - Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie

Moja aktywność naukowa obejmowała również prace nad projektowaniem oraz syntezą nowych borowych analogów i/lub pochodnych nukleozydów i nukleotydów, które mogą być traktowane jako potencjalne inhibitory wzrostu komórek i wybranych reakcji enzymatycznych oraz nowych nośników selektywnie dostarczających związku boru do komórek

nowotworowych glejaka. Dzięki unikalnym właściwościom związków boru istnieje uzasadnione podejrzenie, iż nowe borowe analogi nukleozydów i nukleotydów mogą mieć ogromne znaczenie w terapii przeciwnowotworowej, anty – HIV oraz borowo – neutronowej. Praca w obrębie tej tematyki realizowana była wspólnie z zespołem prof. Wojciecha Rode z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie, który kierował realizacją badań biologicznych uzyskanych przeze mnie związków. Opisana aktywność zaowocowała sześcioma wspólnymi publikacjami naukowymi:

- E. Dąbrowska-Maś, T. Frączyk, T. Ruman, K. Radziszewska, P. Wilk, J. Cieśla, Z. Zieliński, A. Jurkiewicz, B. Gołos, P. Wińska, E. Wałajtys-Rode, A. Leś, J. Nizioł, A. Jarmuła, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk and **W. Rode**, Tyrosine nitration affects thymidylate synthase properties, *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2012, 10, 323 – 331
- J. Nizioł, **W. Rode** and T. Ruman, Boron nucleic acid bases, nucleosides and nucleotides *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 2012, 9, 418-425
- J. Nizioł, Z. Zieliński, A. Leś, M. Dąbrowska, **W. Rode**, T. Ruman, Synthesis, reactivity and biological activity of *N*(4)-boronated derivatives of 2'-deoxycytidine, *Bioorg. Med. Chem.*, 2014, 22, 3906-3912
- J. Nizioł, **W. Rode**, T. Ruman The investigation of borane-unsaturated nucleoside reaction system, *Organic Communications*, 2014, 8, 9-16
- T. Frączyk, T. Ruman, P. Wilk, P. Palmowski, A. Rogowska-Wrzesińska, J. Cieśla, Z. Zieliński, J. Nizioł, A. Jarmuła, P. Maj, B. Gołos, P. Wińska, S. Ostafil, E. Wałajtys-Rode, D. Shugar, **W. Rode**, Properties of Phosphorylated Thymidylate Synthase, *BBA - Proteins and Proteomics*, 2015, 1854, 1922-1934
- Ł. Uram, J. Nizioł, P. Maj, J. Sobich, **W. Rode**, T. Ruman, *N*(4)-[*B*-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan)methyl]-2'-deoxycytidine as a potential boron delivery agent with respect to glioblastoma, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 95, 749-755

Polska – Politechnika Łódzka

Współpraca z zespołem prof. dr hab. Beata Gutarowskiej rozpoczęła się w 2017 roku w ramach badań poświęconych analizie metabolicznej różnych szczepów pleśni z wykorzystaniem opracowanych przez nas metod LDI MS. Rezultatem opisanej aktywności jest publikacja, w której po raz pierwszy zademonstrowano możliwość analizy ekstraktów komórkowych drobnoustrojów na powierzchni wzbogaconej nanocząsteczkami złota. Wykazano, że zastosowana metoda AuNPET LDI MS jest znacznie skuteczniejsza w wykrywaniu charakterystycznych metabolitów pleśni od tradycyjnie stosowanej techniki MALDI. Nawiązana współpraca jest obecnie kontynuowana m.in. w ramach badań poświęconych analizie biofilmów alg zasiedlających materiały budowlane z wykorzystaniem naszych autorskich metod LDI MS.

- A. Arendowski, J. Szulc, **J. Nizioł**, B. Gutarowska and T. Ruman, Metabolic profiling of moulds with laser desorption/ionization mass spectrometry on gold nanoparticle enhanced target, *Analytical Biochemistry*, 2018, 549, 45-52,

6. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ

6.1. DZIAŁALNOŚĆ DYDAKTYCZNA

Moja podstawowa działalność dydaktyczna od momentu zatrudnienia na Wydziale Chemicznym Politechniki Rzeszowskiej im. Ignacego Łukasiewicza obejmuje prowadzenie zajęć laboratoryjnych oraz wykładów dla studentów Wydziału Chemicznego na kierunku Biotechnologia na studiach I-go (CH-DI) i II-go stopnia (CH-DU) oraz dla studentów Wydział Budowy Maszyn i Lotnictwa na kierunku Mechanika i budowa maszyn na studiach II-go stopnia (MM-DU). Ponadto pełniłam funkcję recenzenta oraz opiekuna prac dyplomowych studentów I-go i II-go stopnia na kierunku Biotechnologia. W tym czasie przygotowałam i byłam opiekunem oraz głównym prowadzącym dziesięciu kursów dydaktycznych. W tym okresie przeprowadziłam łącznie 1415 godzin dydaktycznych w tym 1145 pracując na stanowisku naukowo-dydaktycznym (od 10.2015 do 06.2021) i 270 godzin przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora w okresie zatrudnienia na stanowisku technicznym i naukowo-technicznym (od 2009 do 2015).

6.1.1. Prowadzone zajęcia dydaktyczne

Przedmiot, kierunek, semestr	Forma zajęć	Cykl kształcenia	Liczba godzin
Chemia kosmetyków, CH-DI, 5 semestr	W	2020/21-Z	15
		2019/20-Z	15
		2018/19-Z	15
		2017/18-Z	15
	L	2020/21-Z	45
		2019/20-Z	45
		2018/19-Z	45
		2017/18-Z	45
Biochemia kryminalistyczna, CH-DI, 6 semestr	W	2020/21-L	15
		2019/20-L	15
	L	2020/21-L	45
		2019/20-L	45
		2017/18-L	45
		2017/18-Z	20
Biochemia, CH-DI, 3 semestr	L	2016/17-Z	60
		2015/16-Z	60
		2011/12-Z	60

Biokataliza, CH-DI, 5 semestr	L	2018/19-Z	45
		2016/17-Z	45
		2015/16-Z	60
Toksykologia, CH-DI, 6 semestr	L	2011/12-Z	30
		2010/11-Z	90
		2009/10-Z	30
Analiza Instrumentalna II, CH-DU, 1 semestr	L	2016/17-L	75
		2015/16-L	100
Izolacja i Identyfikacja Biomakromolekuł, CH-DU, 2 semestr	L	2016/17-Z	60
		2011/12-L	60
Metabolomika i lipidomika, CH-DU, 2 semestr	L	2018/19-Z	30
		2017/18-Z	45
Technologie diagnostyczne i analityczne wspomagające inżynierię medyczną, MM/DU, 2 semestr	L	2018/19-Z	24
Chemia i technologia biopaliw, CH-DI, 6 semestr	L	2017/18-L	45

6.1.2. Opieka nad studentami podczas realizacji prac dyplomowych

W latach 2015-2021 sprawowałam opiekę nad przygotowaniem 12 prac dyplomowych. Pod moją opieką 8 osób uzyskało tytuł zawodowy inżyniera natomiast 4 osoby uzyskały tytuł zawodowy magistra:

Kierunek, stopień	Autor	Temat pracy	Data obrony
Biotechnologia, I stopień	Agnieszka Nocoń	Metody LDI MS w analizie kosmetyków	01.02.2017
	Karolina Myśliwiec	Analogi oligonukleotydów do terapii antysensownej	03.02.2017
	Aneta Płaza	Obrazowanie tkanek za pomocą spektrometrii mas	05.02.2018
	Tomasz Rumanek	Analiza lipidów w płynach fizjologicznych i tkankach pacjenta z nowotworem nerki z wykorzystaniem LDI MS	01.02.2019
	Bartłomiej Misiąg	Zastosowanie LDI MS w analizie lipidów w płynach fizjologicznych i tkankach pacjenta z nowotworem pęcherza moczowego	06.02.2019
	Bernadeta Sołtys	Poszukiwanie biomarkerów raka nerki z wykorzystaniem spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego	11.02.2021

Biotechnologia, II stopień	Izabela Smutek	Metabolomiczna analiza tkanek w poszukiwaniu biomarkerów nowotworowych	11.02.2021
	Paulina Pietrucha	Metabolomiczna analiza płynów fizjologicznych w poszukiwaniu biomarkerów nowotworowych	11.02.2021
	Monika Kiszka	Poszukiwanie biomarkerów nowotworowych z wykorzystaniem techniki LDI MS	11.07.2017
	Agnieszka Nocoń	Analiza kosmetyków z wykorzystaniem metod LDI MS	18.06.2018
	Karolina Myśliwiec	Optymalizacja metody analizy moczu pacjentów z nowotworem nerki z wykorzystaniem spektrometrii mas z laserową desorpcją/jonizacją	27.06.2018
	Izabela Grzybowski	Optymalizacja metody analizy surowicy krwi pacjentów z nowotworem nerki z wykorzystaniem spektrometrii mas z laserową desorpcją/jonizacją	18.06.2018

6.1.3. Wykonane recenzje prac dyplomowych

W latach 2015-2021 wykonałam 11 recenzji prac dyplomowych w tym 5 inżynierskich i 6 magisterskich.

Kierunek, stopień	Autor	Temat pracy	Data obrony
Biotechnologia, I stopień	Aleksandra Winiarz	Badanie biologicznej aktywności nanocząstek zawierających biotynę	03.02.2017
	Marzena Maziarz	Analogi oligonukleotydów zawierające bor do terapii BNCT	06.02.2017
	Patrycja Dubiel	Klonowanie genu kodującego peroksydazę z genomu <i>Fragaria vesca</i> L.	07.02.2018
	Katarzyna Klimkiewicz	Wpływ dendrymerów PAMAM skoniugowanych z Fmoc-L-leucyną i celekoksybem na poziom cyklooksygenazy-2 w komórkach normalnych	01.02.2019
	Wioleta Wagowska	Metody badania genetycznej odporności na wirusowe zapalenie wątroby typu C	15.02.2021
Biotechnologia, II stopień	Anna Czerniecka	Obrazowanie MS tkanek zwierzęcych	15.10.2015

Adrian Arendowski	Nanostruktury złotowe w obrazowaniu tkanek roślinnych	23.06.2016
Anna Szamik	Chemiczne modyfikacje powierzchni stali do LDI MS	07.07.2016
Anna Tyka	Obrazowanie LDI MS w badaniu obiektów biologicznych	13.07.2017
Małgorzata Ziomek	Badania tkanki nerkowej za pomocą wspomaganej nanostrukturami laserowej spektrometrii mas	27.06.2018
Sylwia Rzepka	Badania tkanki pęcherza moczowego za pomocą wspomaganej nanostrukturami laserowej spektrometrii mas	27.06.2018

6.1.4. Opracowane treści programowe

Od 2010 roku opracowałam treści programowe dla 9 przedmiotów prowadzonych na kierunku Biotechnologia na studiach I-go i II-go stopnia oraz na kierunku Mechanika i budowa maszyn na studiach II-go stopnia.

- Opracowanie instrukcji, w formie prezentacji multimedialnej, do ćwiczeń laboratoryjnych z przedmiotu Izolacja i Identyfikacja Biomakromolekuł (3 CH-DU), Tytuł ćwiczenia: „Matryce do MALDI”
- Ulepszenie i aktualizacja instrukcji do ćwiczeń laboratoryjnych z przedmiotu Biochemia (2 CH-DI) Tytuł ćwiczenia: „Oznaczanie azotanów(III) i azotanów(V) w produktach mięsnych metodą spektrofotometryczną” oraz „Identyfikacja cukrów prostych i złożonych reakcjami kolorymetrycznymi. Hydroliza sacharozy”
- Opracowanie instrukcji do ćwiczeń laboratoryjnych z przedmiotu Toksykologia (3 CH-DI). Tytuły ćwiczeń:
 - „Ogólne informacje o toksykologii”
 - „Analiza jakościowa trucizn nieorganicznych w materiale biologicznym”
 - „Analiza jakościowa związków chemicznych o znaczeniu toksykologicznym (Cyjanowodór, formaldehyd, chloroform, fenol)”
 - „Oznaczanie alkaloidów w materiale biologicznym metodą TLC”
 - „Oznaczanie warfaryny w materiale biologicznym”
 - „Oznaczanie leków i dodatków do żywności w materiale biologicznym metodą TLC (Salinomycyna, Paracetamol)”
- Opracowanie instrukcji, w formie prezentacji multimedialnej, do ćwiczeń laboratoryjnych z przedmiotu Biokataliza (3 CH-DI), Tytuł ćwiczenia: „Hydroliza estrów kwasu salicylowego z użyciem *Saccharomyces cerevisiae* oraz analiza produktu metodami LDI MS”
- Opracowanie treści wykładu 15 h z przedmiotu Chemia kosmetyków (3 CH-DI)

6. Opracowanie treści wykładu 15 h z przedmiotu Biochemia kryminalistyczna (3 CH-DI)
7. Opracowanie instrukcji do ćwiczeń laboratoryjnych z przedmiotu Chemia kosmetyków (3 CH-DI). Tytuły ćwiczeń:
 - „Izolacja olejków eterycznych z surowców roślinnych”
 - „Otrzymywanie oraz badanie właściwości mydeł sodowych oraz detergentów anionowych”
 - „Tworzenie kompozycji zapachowych oraz wyrobów perfumeryjnych”
 - „Otrzymywanie oraz badanie właściwości kremów do skóry”
 - „Otrzymywanie oraz analiza kremów z filtrem przeciwsłonecznym”
8. Opracowanie instrukcji do ćwiczeń laboratoryjnych z przedmiotu Biochemia kryminalistyczna (3 CH-DI). Tytuły ćwiczeń:
 - „Ujawnianie śladów krwawych”
 - „Spektrofotometryczne oznaczanie śladów ołowiu w materiale biologicznym”
 - „Ujawnianie odcisków palców metodami fizycznymi i chemicznymi”
 - „Oznaczanie leków przeciwdepresyjnych w krwi metodą chromatografii cienkowarstwowej”
 - „Wykrywanie narkotyków w moczu metodą LC-MS”
9. Opracowanie instrukcji do ćwiczeń laboratoryjnych z przedmiotu Chemia i technologia biopaliw (3 CH-DI). Tytuły ćwiczeń:
 - „Ekstrakcja olejów roślinnych do produkcji biodiesla”
 - „Wytwarzanie biodiesla metodą katalizy zasadowej”
 - „Produkcja bioetanolu z produktów wysokocukrowych z zastosowaniem immobilizowanych drożdży”
 - „Produkcja bioetanolu z produktów wysokoskrobiowych z zastosowaniem immobilizowanych drożdży”
 - „Produkcja bioetanolu z produktów zawierających lignocelulozę z zastosowaniem immobilizowanych drożdży”
10. Opracowanie instrukcji do ćwiczeń laboratoryjnych z przedmiotu Metabolomika i lipidomika (3 CH-DI). Tytuły ćwiczeń:
 - „Ekstrakcja lipidów z próbek żywności metodą Folcha oraz ich oczyszczanie i rozdział metodą ekstrakcji do fazy stałej (SPE)”
 - „Identyfikacja składników ekstraktów lipidowych próbek żywności metodą spektrometrii mas. Analiza metaboliczna lipidów”
 - „Analiza metabolomiczna ekstraktów kawy uzyskanych za pomocą spektrometrii mas z laserową desorpcją/ionizacją (LDI MS) wraz z analizą statystyczną”
11. Opracowanie instrukcji do ćwiczeń laboratoryjnych z przedmiotu Technologie diagnostyczne i analityczne wspomagające inżynierię medyczną (1 MM/DU) wraz z prezentacją w formie multimedialnej. Tytuły ćwiczeń:
 - „Identyfikacja mikroorganizmów metodą MALDI MS”

- „Analiza jakościowa i ilościowa składników płynów fizjologicznych metodą HPLC-ESI-MS”

6.2. DZIAŁALNOŚĆ POPULARNONAUKOWA

Brałam udział w różnych akcjach promocyjnych kierunku studiów na Wydziale Chemicznym PRz wśród młodzieży

- 20.02.2018** Wykład popularnonaukowy z okazji XXV Jubileuszowego Seminarium „Wybrane problemy chemii” na Politechnice Rzeszowskiej, Tytuł wykładu: „(W)dzięki chemii, czyli związki chemiczne w kosmetyczkach”
- 27.6.2017** Wykład na zaproszenie pt. “Chemistry and biochemistry of boron analogues and derivatives of nucleoside and nucleotides”, invited lecture (Erasmus+), UFOP, Ouro Preto, Brazylia
- 31.03.2017** Udział w organizacji III Nocnego Spotkania z Nauką, temat mini-laboratorium: „Jakie związki chemiczne znajdują się na naszym palcu”
- 30.03.2017** Wykład popularnonaukowy z okazji Dnia Otwartego Dla Dziewczyn na Politechnice Rzeszowskiej, Tytuł wykładu: „Związki chemiczne w kosmetykach”
- 02.10.2015** Udział w organizacji II Nocnego Spotkania z Nauką, temat mini-laboratorium: „Jakie związki chemiczne znajdują się na naszym palcu”

6.3. DZIAŁALNOŚĆ ORGANIZACYJNA

W ramach swojej pracy zawodowej brałam czynny udział w działalności organizacyjnej prowadzonej na rzecz Uczelni w różnej formie.

- Od 05.2021** Członek Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej im. Ignacego Łukasiewicza
- Od 05.2021** Członek Kolegium Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej im. Ignacego Łukasiewicza
- Od 2020** Członek Rady Dyscypliny Inżynieria Chemiczna Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej im. Ignacego Łukasiewicza
- 06-10.2018** Organizacja certyfikowanego szkolenia dla studentów pt. „Tworzenie receptur, produkcja i wprowadzanie kosmetyków do sprzedaży” w ramach programu POWER, Kuźnia kluczowych kompetencji studentów Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej
- 06-10.2018** Organizacja wizyty studyjnej pt. „Zapoznanie się z nowoczesnymi technologiami produkcji kosmetyków” w ramach programu POWER, Kuźnia kluczowych kompetencji studentów Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej

- 15.05.2018** Aktualizacja prezentacji i przedstawienie specjalności Biochemia Stosowana podczas spotkania ze studentami kierunku Biotechnologia studiów I stopnia
- 05.2017** Przygotowanie prezentacji i przedstawienie specjalności Biochemia Stosowana podczas spotkania ze studentami kierunku Biotechnologia studiów I stopnia
- 05.2017** Opracowanie plakatu promującego specjalność Biochemia Stosowana
- 15.03.2017** Współudział w opracowaniu anglojęzycznej wersji strony internetowej Wydziału Chemicznego
- Od 2017** Opiekun specjalności Biochemia stosowana, kierunek: Biotechnologia, studia pierwszego stopnia
- Od 2016** Członek zespołu zadaniowego ds. oceny programów kształcenia i weryfikacji powołanego przez Radę Wydziału Chemicznego PRz (Uchwała Nr 22/2014, ze zmianą Uchwała Nr 29/2014)
- 12.09.2016** Opiekun studentów studiów stacjonarnych I stopnia kierunku biotechnologia rozpoczynających naukę od roku akademickiego 2016/2017
- 11.2017** Członek komisji dokonującej oceny i współautor raportu z oceny programu kształcenia i weryfikacji efektów kształcenia Politechniki Rzeszowskiej w roku ak. 2016/2017 na Wydziale Chemicznym na kierunku Biotechnologia, studia stacjonarne I i II stopnia
- 11.2018** Członek komisji dokonującej oceny i współautor raportu z oceny programu kształcenia i weryfikacji efektów kształcenia Politechniki Rzeszowskiej w roku ak. 2017/2018 na Wydziale Chemicznym na kierunku Biotechnologia, studia stacjonarne I i II stopnia

6. INNE INFORMACJE DOTYCZĄCE KARIERY ZAWODOWEJ

7.1. NAGRODY I STYPENDIA

- 30.11.2017 Nagroda Rektora Politechniki Rzeszowskiej im. Ignacego Łukasiewicza za osiągnięcia naukowe
- 09.12.2016 Nagroda Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za osiągnięcia naukowe będące podstawą nadania stopnia doktora
- 02.2014 – 02.2015 Stypendium doktorskie Politechniki Rzeszowskiej im. Ignacego Łukasiewicza
- 11.2011 – 09.2013 Stypendium dla doktorantów w ramach projektu "Podkarpacki fundusz stypendialny dla doktorantów"

7.2. PRZERWY W KARIERZE ZAWODOWEJ

01.05.2019 – 17.09.2019	Urlop macierzyński
18.09.2019 – 30.09.2019	Urlop rodzicielski
01.10.2019 – 25.11.2020	Urlop rodzicielski połączony z pracą w wymiarze połowy pełnego wymiaru pracy

Dr Joanna Nizioł
Wydział Chemiczny PP
Joanna Nizioł