

Warszawa, 4.09.2019 r.

mgr inż. Joanna Kruszewska
Katedra Chemii Analitycznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Warszawska

Streszczenie Rozprawy Doktorskiej

Zastosowanie spektrometrii mas do badania wewnątrzkomórkowych przemian metalonanomateriałów o potencjalnych właściwościach terapeutyczno-diagnostycznych

Zgodnie ze statystykami Światowej Organizacji Zdrowia choroba nowotworowa stanowi obecnie drugą główną przyczynę zgonów na świecie. Zwiększona w ostatnich latach śmiertelność z powodu raka powoduje straty w wysokości większej niż bilion USD rocznie, stwarzając również istotne problemy ekonomiczne. Wciąż poszukiwane są nowe podejścia terapeutyczne, łączące możliwość szybkiej diagnozy, efektywnego leczenia i ograniczenia skutków ubocznych terapii przeciwnowotworowej. Obiecującą koncepcję walki z rakiem stanowi wykorzystanie nanomateriałów teranostycznych, to znaczy mających zastosowanie zarówno w diagnozowaniu, jak i leczeniu choroby.

Celem rozprawy doktorskiej było opracowanie metodyk analitycznych opartych na spektrometrii mas umożliwiających badanie wewnątrzkomórkowych przemian wybranych metalonanomateriałów (kulistych nanocząstek złota oraz kropek kwantowych CdSeS/ZnS) o potencjalnym zastosowaniu w diagnostyce i terapii nowotworów. Badania skupiały się na optymalizowaniu postępowań pobierania oraz wydzielania materiałów z komórek. Poszerzenie wiedzy na temat przemian stosowanych nanomateriałów wewnątrz komórek mogłoby zwiększyć ich udział w badaniach klinicznych dotyczących leczenia choroby nowotworowej.

Zaprojektowano postępowanie analityczne służące do oznaczania stopnia pobierania metalonanomateriałów przez komórki w warunkach imitujących wnikanie materiałów do komórek *in vivo* za pomocą spektrometrii mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP-MS). Stwierdzono, że korona białkowa wytworzona na badanych nanocząstkach w środowisku surowicy krwi ludzkiej zmniejsza wchłanianie nanomateriału przez komórki. Zjawisko to powinno być więc uwzględniane w optymalizowaniu metodyk analitycznych ukierunkowanych na ilościowe oznaczanie pobierania nanocząstek. Za pomocą zoptymalizowanego postępowania określono wpływ rozmiaru nanocząstek złota, zastosowanej

dawki kropek kwantowych oraz czasu inkubacji nanomateriału z komórkami na stopień ich pobierania. Zaproponowano sposób oznaczania form złota w przedziałach komórkowych po pobraniu nanocząstek złota przez komórki z użyciem opracowanej metody frakcjonowania komórek poprzez wirowanie.

Frakcje cytozolu i organelli komórek nowotworowych (po testach pobierania nanocząstek) zawierające różne formy metali zbadano z wykorzystaniem technik rozdzielania: elektroforezy kapilarnej (CE) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w połączeniu z ICP-MS, a także za pomocą ICP-MS w trybie analizy pojedynczej cząstki (spICP-MS). Stosowalność techniki CE-ICP-MS w analizie metalonanomateriałów w matrycach biologicznych o skomplikowanym składzie potwierdzono uprzednio analizując próbki nanocząstek złota oraz kropek kwantowych (preinkubowanych w surowicy krwi ludzkiej) w symulowanym cytozolu komórki nowotworowej. Zoptymalizowane metody posłużyły do określenia wpływu czasu inkubacji nanomateriału z komórkami, zastosowanej dawki lub średnicy nanocząstek na ich przemiany w środowisku wewnątrzkomórkowym. Zaobserwowano, iż w odróżnieniu od nanocząstek złota, badane kropki kwantowe pod wpływem warunków panujących wewnątrz komórki nowotworowej ulegają rozpadowi z uwolnieniem jonowych form kadmu, co może być kluczowe pod kątem biologicznych efektów działania badanych materiałów.

Zoptymalizowano metody CE-ESI/MS-MS oraz μ HPLC-ESI-MS/MS do identyfikacji białek oddziałujących z nanocząstkami złota w komórkach nowotworowych. Zaproponowano w tym celu postępowanie proteomiczne „shotgun” oraz trawienie białek zaadsorbowanych na nanocząstce, którego zaletą jest skrócenie postępowania analitycznego oraz zmniejszenie prawdopodobieństwa utraty analitów o małych stężeniach. Śladowe zawartości białek w badanych próbkach komórek nowotworowych stwarzają konieczność modyfikacji metody i uzupełnienia jej o etap zatężania analitów.

Opracowane w niniejszej rozprawie metodologie analityczne mogą znaleźć zastosowanie do badania pobierania oraz wewnątrzkomórkowych przemian różnych nanomateriałów, niezależnie od rodzaju metalu, który w nich występuje. Zaproponowane postępowania są odpowiednie do analizy próbek zawierających różne ilości (szeroki zakres) metali, odpowiadające dawkom nanomateriałów podawanych w badaniach *in vivo*.

Słowa kluczowe: spektrometria mas, nanocząstki złota, kropki kwantowe, komórki nowotworowe