

Załącznik Z-1a**Autoreferat**

1. Imię i Nazwisko: **Magdalena Stobiecka**
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

Doktor Nauk Rolniczych*Dyscyplina: technologia żywności i żywienia***Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności****Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie, 2009**

Promotor: Prof. dr hab. Hanna Radecka

Tytuł rozprawy doktorskiej: "Opracowanie biocujników do oznaczania genetycznie zmodyfikowanej soi"

Magister Biologii**Wydział Biologii,****Uniwersytet Warmińsko - Mazurski****w Olsztynie, 2002**

Promotor: Dr hab. Agnieszka Piotrowicz-Cieślak

Tytuł rozprawy magisterskiej: "Zawartość cukrów rozpuszczalnych i aktywność β -D fruktofuranozydazy w kielkujących nasionach łubinu żółtego"

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

Adiunkt (2011 - obecnie)**Zakład Biofizyki, Wydział Technologii Drewna,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie, Warszawa****Staż podoktorski (2008 - 2011)****(Postdoctoral Research Scholar)****Wydział Chemii, Stanowy Uniwersytet Nowego****Jorku w Potsdamie, Potsdam, USA****Asystent (2004 - 2010)****Zakład Biosensorów, Instytut Rozrodu Zwierząt
i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk
w Olsztynie, Olsztyn**

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

A) Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Badanie biomarkerów stresu oksydacyjnego oraz indukowanej agregacji nanocząstek złota przy użyciu rezonansowej spektroskopii rozpraszania światła, spektroskopii absorpcyjnej, fluorescencji i nanowagi kwarcowej”

Powyższe osiągnięcie naukowe zostało udokumentowane w formie jednotematycznego cyklu publikacji. Oświadczenie współautora publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego i kopie publikacji habilitanta zawarte są w Załącznikach Z-3a i Z-3b.

B) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

(1) Magdalena Stobiecka and Maria Hepel, 2011, Effect of buried potential barrier in label-less electrochemical immunodetection of glutathione and glutathione-capped gold nanoparticles, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 3524-3530; IF 5.602, MNiSW 45*

* CZĘŚĆ A WYKAZU CZASOPISM NAUKOWYCH z 2012 r

(2) Magdalena Stobiecka and Maria Hepel, 2010, Rapid functionalization of metal nanoparticles by moderator-tunable ligand-exchange process for biosensor designs, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 149, 373-380; IF 3.370, MNiSW 32

(3) Maria Hepel and Magdalena Stobiecka, 2011, Comparative kinetic model of fluorescence enhancement in selective binding of monochlorobimane to glutathione, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 225, 72–80; IF 2.421, MNiSW 25*

* CZĘŚĆ A WYKAZU CZASOPISM NAUKOWYCH z 2012 r

(4) Magdalena Stobiecka and Maria Hepel, 2011, Double-shell gold nanoparticle-based DNA-carriers with poly-L-lysine binding surface, *Biomaterials*, 32, 3312-3321; IF 7.404, MNiSW 50*

* CZĘŚĆ A WYKAZU CZASOPISM NAUKOWYCH z 2012 r

(5) Maria Hepel and Magdalena Stobiecka, 2012, Detection of Oxidative Stress Biomarkers Using Functional Gold Nanoparticles, in: *Fine Particles in Medicine and Pharmacy*, E. Matijevic [Ed.], Springer, Chapter 9, pp. 241-291, ISBN 978-1-4614-0378-4; MNiSW-10 pkt.*

*Punkty według Załącznika nr 2, Karty Oceny Jednostki Naukowej, Część C, dla dyscyplin: nauki przyrodnicze i medyczne, Autorstwo rozdziału w monografii w języku angielskim wydanej przez wydawcę ogólnościatowego

(6) Magdalena Stobiecka and Maria Hepel, 2011, Nitrotyrosine as a Biomarker of Diabetes, in: *Advances in Medicine and Biology*, Vol. 13, L.V. Berhardt [Ed.], Nova Science Publishers, New York, Chapter 8, pp. 177-202, ISBN 978-1-61761-438-5, MNiSW-10 pkt.*

*Punkty według Załącznika nr 2, Karty Oceny Jednostki Naukowej, Część C, dla dyscyplin: nauki przyrodnicze i medyczne, Autorstwo rozdziału w monografii w języku angielskim wydanej przez wydawcę ogólnościatowego

C) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Głównym celem prowadzonych przeze mnie badań składających się na jednotematyczny cykl publikacji, było badanie oddziaływań biomarkerów stresu oksydacyjnego: glutationu (GSH), homocysteiny (Hcys), cysteiny (Cys) i nitrotyrozyny (NT) oraz polilizyny (PLL) z wielofunkcyjnymi nanocząstkami złota. Stres oksydacyjny jest czynnikiem wielu chorób naczyniowo-sercowych, nowotworowych i neurodegeneracyjnych takich jak: choroba Alzheimera, Parkinsona, autyzm. Wykonane przeze mnie badania są ważne ze względu na ich potencjalne zastosowania w diagnostyce chorób i terapii nowotworowej. Pomiary wykonywałam przy użyciu rezonansowej spektroskopii rozpraszania światła (Resonance Elastic Light Scattering, RELS), spektroskopii absorpcyjnej, fluorescencji, techniki nanowagi kwarcowej (Electrochemical Quartz Crystal Nanobalance, EQCN) i rezonansowego fluorescencyjnego przeniesienia energii (Resonance Fluorescence Energy Transfer, FRET). Indukowaną przez biomarkery agregację nanocząstek złota obserwowałam zarówno dla nanocząstek złota pokrytych niejonowym fluorosurfaktantem jak i dla ujemnie naładowanych nanocząstek

pokrytych cytrynianami. Agregacja nanocząstek oprócz pomiarów spektroskopowych została potwierdzona przez zdjęcia z wysokorozdzielczego transmisyjnego mikroskopu elektronowego (High Resolution Transmission Electron Microscopy, HR-TEM). Obszerne badania prowadzone w ramach osiągnięcia naukowego dotyczyły wymiany ligandów na powierzchni nanocząstek, międzycząsteczkowych oddziaływań i agregacji nanocząstek złota przy użyciu biomarkerów stresu oksydacyjnego i polilizyny.

Badania prowadzone w ramach osiągnięcia naukowego obejmowały następujące tematy:

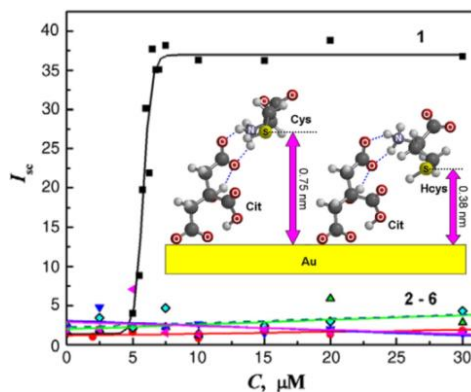
1. Wykrywanie markerów stresu oksydacyjnego: glutationu, homocysteiny i cysteiny podczas ich oddziaływań z nanocząstkami złota przy użyciu rezonansowej spektroskopii rozpraszania światła i spektroskopii absorpcyjnej

Wcześniejsze badania wykorzystujące nanocząstki do badania biomarkerów stresu oksydacyjnego: GSH (Lim et al., 2008), Cys (Rusin et al., 2004, Zhang et al., 2002) i Hcys (Gates et al., 2008, Rusin et al., 2004, Wang et al., 2004, Lim et al., 2007) opierały się głównie na pomiarach kolorymetrycznych. W swoich pomiarach stwierdziłam, że biomarkery te można również wykrywać badając ich oddziaływania z nanocząstkami złota (AuNP) metodą rozpraszania światła przez lokalny plazmon powierzchniowy w rezonansowej spektroskopii elastycznego rozpraszania światła (RELS). Metoda ta wykazuje wyższą czułość niż metody kolorymetryczne (Hepel and Stobiecka, 2012, Stobiecka and Hepel, 2010, Hepel and Stobiecka, 2011a).

Po dodaniu wzrastających stężeń biomarkerów: Hcys i GSH do roztworu nanocząstek złota pokrytych cytrynianami (AuNP@Cit), obserwowałam wzrost intensywności rozpraszania światła RELS. Na przykład, po dodaniu 15 μM homocysteiny do AuNP intensywność rozpraszania światła była 19 razy większa: $I_{sc,2}/I_{sc,1} = 19$, a po dodaniu glutationu 9 razy większa: $I_{sc,2}/I_{sc,1} = 9$, ($C_{\text{GSH}} > 2.5 \text{ mM}$) ($I_{sc,1}$ i $I_{sc,2}$ to odpowiednio intensywności rozpraszania światła przez nanocząstki przed i po dodaniu biomarkerów). Uzyskane przeze mnie wyniki były zgodne z wynikami otrzymanymi podczas pomiarów absorpcyjnych w świetle ultrafioletowym i widzialnym (UV-Vis). Po dodaniu biomarkerów do roztworu AuNP obserwowałam wzrost absorbancji i przesunięcie pasma lokalnego plazmonu powierzchniowego w stronę dłuższych fal

($\Delta\lambda_{\max} = 44$ nm dla Hcys i $\Delta\lambda_{\max} = 54$ nm dla GSH) (Stobiecka and Hepel, 2010, Hepel and Stobiecka, 2012). Po dodaniu GSH, Hcys i Cys, była widoczna także zmiana koloru roztworu nanocząstek złota z czerwonego na fioletowy. Wszystkie te wyniki świadczyły o tworzeniu się większych agregatów nanocząstek pod wpływem biomarkerów. Podczas agregacji wzbudzały się kolektywne oscylacje lokalnych powierzchniowych plazmonów cząstek wchodzących w skład agregatu, zastępując niezależne oscylacje plazmonowe pojedynczych nanocząstek. Kolektywne oscylacje większych agregatów powodują efekt batochromowy i zmianę koloru roztworu koloidalnego.

W kolejnych doświadczeniach opracowałam nowe metody służące do wykrywania biomarkerów stresu oksydacyjnego: Hcys i Cys oraz badałam ich oddziaływanie z nanocząstkami złota pokrytymi niejonowym fluorosurfaktantem Zonylem (AuNP@Zonyl) (Hepel and Stobiecka, 2012). Cząsteczki biomarkerów zastępowały fluorosurfaktant na powierzchni AuNP, a następnie wywoływały grupowanie sferycznych nanocząstek złota w większe agregaty. Podczas badań zauważyłam nieznaczne różnice w oddziaływaniu Hcys i Cys z naładowanymi ujemnie oraz obojętnymi nanocząstkami. Na podstawie uzyskanych wyników eksperymentalnych, symulacji dynamiki molekularnej i obliczeń kwantowych zaproponowałam mechanizm oddziaływań tych tioaminokwasów z nanocząstkami AuNP@Cit i AuNP@Zonyl. Stwierdziłam, że w początkowym etapie oddziaływań biomarkerów z AuNP tworzy się powierzchniowy kompleks między cząsteczkami Cit i Hcys oraz Cit i Cys. Siły działające między cząsteczkami cytrynianów i biomarkerów to przyciąganie elektrostatyczne oraz wiązania wodorowe. Konformacyjne różnice kompleksów widoczne są głównie w odległości grupy tiolowej $-SH$ biomarkerów od powierzchni złota. Dla Hcys dystans od powierzchni złota wynosi 0.38 nm a dla Cys 0.75 nm. Powoduje to zróżnicowaną zdolność biomarkerów do wymiany liganda z powierzchni AuNP i indukowanie procesu agregacji nanocząstek (Rys.1). Z uzyskanych przeze mnie rezultatów jasno wynika, że cząsteczki Hcys wykazały większą efektywność w wymianie liganda w porównaniu z cząsteczkami Cys. Wyniki badań dotyczących mechanizmu oddziaływań biomarkerów z cytrynianami mają kluczowe znaczenie w analitycznym rozróżnianiu cząsteczek o podobnej budowie (Hcys różni się od Cys tylko tym, że w swojej cząsteczce posiada dodatkową grupę $-CH_2$).



Rys. 1. Zależność intensywności rozpraszania światła (I_{sc}) dla nanocząstek złota pokrytych cytrynianami w zależności od stężenia (1) homocysteiny, (2) metioniny, (3) alaniny, (4) histydyny, (5) glutationu, (6) cysteiny; $C_{AuNP} = 3.8 \text{ nM}$, $\text{pH}=5$, $\lambda_{ex} = 560 \text{ nm}$. WSTAWKA: Powierzchniowe kompleksy Hcys i Cys z Cit tworzące się podczas wymiany liganda. (Na podstawie publikacji (Hepel and Stobiecka, 2012)).

2. Badanie indukowanej agregacji nanocząstek złota oraz wyjaśnienie mechanizmu procesu wymiany ligandów na powierzchni nanocząstek

W ramach badań oddziaływań nanocząstek złota z biomarkerami stresu oksydacyjnego, przeprowadziłam szereg eksperymentów dotyczących mechanizmu wymiany liganda oraz wzajemnego oddziaływania i agregacji nanocząstek pod wpływem biomarkerów. W badaniach tych pokazałam, że siły występujące podczas agregacji nanocząstek obejmują: siły oddziaływania elektrostatycznego (Hepel and Stobiecka, 2012, Stobiecka and Hepel, 2010), oddziaływania dipolowego typu „+” „-” (Hepel and Stobiecka, 2012), van der Waalsa (Stobiecka and Hepel, 2011a) i wiązań wodorowych (Hepel and Stobiecka, 2012). Wykazałam również, że oddziaływania między nanocząstkami zależne są od pH roztworu, siły jonowej oraz rozmiaru i kształtu nanocząstek złota (Hepel and Stobiecka, 2012).

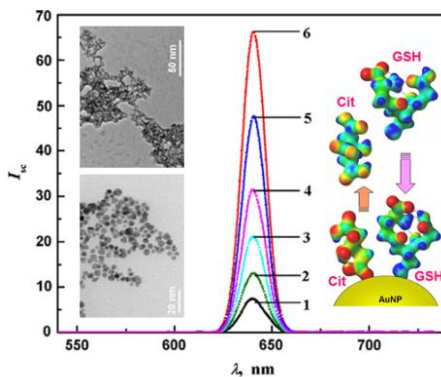
Pierwszym etapem, który prowadzi do agregacji nanocząstek jest proces wymiany liganda na powierzchni AuNP (Ackerson et al., 2005, Stobiecka and Hepel, 2010, Hepel and Stobiecka, 2012). Następnie zachodzą oddziaływania międzycząsteczkowe prowadzące do agregacji nanocząstek złota (Lim et al., 2007, Mocanu et al., 2009). Z powodu stosunkowo słabego powinowactwa cytrynianów do złota, termodynamiczna stabilność zaadsorbowanych cytrynianów na AuNP nie jest duża. Cytryniany mogą więc łatwo ulegać procesowi wymiany przez cząsteczki tioli. Mocniej związane z powierzchnią są cząsteczki cysteiny, a najsilniej homocysteiny. Proces wymiany liganda może być ponadto hamowany kinetycznie (Stobiecka and Hepel, 2010). W badaniach procesu wymiany wielu ligandów zawierających GSH, Hcys

i Cit, odkryłam bowiem, że jeden z ligandów (GSH) może kontrolować szybkość wymiany innych ligandów (Hcys i Cit) zwalniając proces a nawet zapobiegając agregacji nanocząstek złota podczas pomiaru trwającego 60 s (Stobiecka and Hepel, 2010). Zanim nastąpi całkowita wymiana liganda mogą również występować międzycząsteczkowe połączenia, które powodują częściową agregację AuNP. W przypadku glutationu stwierdziłam, że w pierwszym etapie tworzenia agregatów, biomarker łączy ze sobą cząsteczki cytrynianów znajdujące się na powierzchni sąsiednich nanocząstek złota tworząc małe agregaty typu: AuNP@Cit-GSH-Cit@AuNP. Dopiero po wymianie liganda i zastąpieniu Cit przez GSH, dominują oddziaływania elektrostatyczne i wiązania wodorowe między cząsteczkami GSH pokrywającymi sąsiednie nanocząstki złota (AuNP@GSH-GSH@ AuNP) (Hepel and Stobiecka, 2012).

W badaniu agregacji nanocząstek złota pod wpływem biomolekuł, wykorzystałam przesunięcie pasma lokalnego plazmonu powierzchniowego (SP) w absorpcji UV-Vis i spektroskopię RELS oraz potwierdziłam ją, za pomocą obrazów wysokorozdzielczego transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Częstotliwość oscylacji SP jest bardzo czuła na zmiany w otoczeniu nanocząstek i odległości między nimi. Po zbliżeniu się AuNP na odległość mniejszą niż ok. 5 promieni nanocząstki, plazmonowe pola elektryczne wokół nanocząstek zaczynają oscylować w sposób skoordynowany. Badania teoretyczne oscylacji plazmonowych (Lee and El-Sayed, 2006) i absorpcyjnych widm SP (Link and El-Sayed, 1999) umożliwiły zrozumienie mechanizmu, który powoduje przesunięcie maksimum absorpcji związane z procesem agregacji nanocząstek, obserwowane podczas moich badań eksperymentalnych (Hepel and Stobiecka, 2012). AuNP wykazują wzmocnienie intensywności rozpraszania światła podczas agregacji z powodu kolektywnych oscylacji plazmonów powierzchniowych (Hepel and Stobiecka, 2012). Zależność intensywności I_{sc} od rozmiaru agregatów a nie może być bezpośrednio wyznaczona z równania Rayleigha, według którego $I_{sc} \sim a^6$, ponieważ stężenie nanocząstek zmniejsza się podczas procesu agregacji (Hepel and Stobiecka, 2012). Rozmiary agregatów wyznaczyłam z pomiarów RELS $(I_{sc,2}/I_{sc,1}) = (a_2/a_1)^3$, gdzie 1 i 2 oznaczają stan przed i po agregacji nanocząstek (Hepel and Stobiecka, 2012). Po dodaniu Hcys, średnica agregatów jest 1.99 razy większa niż średnica pojedynczych nanocząstek. Po dodaniu GSH wielkość agregatów zwiększyła się natomiast 2.09 razy (Stobiecka and Hepel, 2010, Hepel and Stobiecka, 2012).

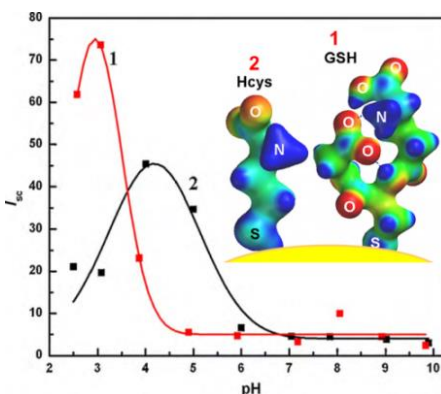
W swoich badaniach, obserwowałam zmiany rozpraszania RELS zachodzące w zależności od pH roztworu. Były one wywołane tworzącą się nową równowagą kwasowo-zasadową między cząsteczkami cytrynianów i biomarkerów. Ze względu na różne wartości pK_a badanych aminokwasów, mogłam rozróżnić biomarkery w roztworach o innym pH. W $pH = 3$, GSH występuje głównie w postaci jonu dipolowego. Grupy aminowe $-NH_2$ ($pK_a = 9.49$) są uprotonowane tworząc grupy $-NH_3^+$ a grupy karboksylowe $-COOH$ kwasu glutaminowego ($pK_a = 2.04$) są w większości zdysocjowane tworząc naładowane ujemnie grupy $-COO^-$. Powoduje to, że cząsteczki GSH znajdujące się na dwóch sąsiednich nanocząstkach zaczynają ze sobą oddziaływać za pomocą sił dipolowych. Grupy $-COO^-$ glutationu znajdującego się na pierwszej nanocząstce ($_1|-COO^-$) oddziaływują z grupami $-NH_3^+$ glutationu znajdującego się na drugiej nanocząstce ($_2|-NH_3^+$) i odwrotnie, grupy $-NH_3^+$ glutationu znajdującego się na pierwszej nanocząstce ($_1|-NH_3^+$) oddziaływują z grupami karboksylowymi glutationu znajdującego się na drugiej nanocząstce ($_2|-COO^-$) ($_1$ i $_2$ oznaczają sąsiednie nanocząstki złota). Sprawia to, że nanocząstki złota pokryte glutationem (AuNP@GSH) w $pH = 3$ łączą się w większe agregaty. Potwierdziłam to za pomocą badań eksperymentalnych stosując technikę RELS (Rys.2) (Hepel and Stobiecka, 2012).

Tworzenie agregatów zgodnie z prawem Rayleigha powoduje wzrost intensywności rozpraszania światła a także przesunięcie długości fali pasma plazmonu powierzchniowego w kierunku dłuższych fal (Stobiecka and Hepel, 2010, Hepel and Stobiecka, 2012). W $pH = 3$ nie obserwowałam takich wyników dla nanocząstek złota pokrytych homocysteiną (AuNP@Hcys). Szczegółowa analiza wykazuje bowiem, że w kwaśnym pH cząsteczki Hcys posiadają ładunek dodatni netto. Jest to spowodowane protonacją grup aminowych oraz grup karboksylowych. Prowadzi to, do wymiany liganda, czyli zastąpienia znajdujących się na powierzchni nanocząstek cytrynianów lub fluorosurfaktantu przez cząsteczki Hcys. Następuje wtedy stabilizacja złota koloidalnego w roztworze. Złote nanocząstki pokryte Hcys odpychają się od siebie i nie obserwujemy wzrostu intensywności rozpraszania światła.



Rys. 2. Widma elastycznego rozpraszania światła dla 10.1 nM AuNP_{5nm} i różnych stężeń GSH zarejestrowane po 1 min od momentu dodania GSH do roztworu; C_{GSH} [mM]: (1) 0, (2) 2.67, (3) 3.0, (4) 3.17, (5) 3.33, (6) 5; WSTAWKA: Proces wymiany liganda między Cit i GSH oraz zdjęcia z wysokorozdzielczego elektronowego mikroskopu transmisyjnego przedstawiające agregację nanocząstek złota pokrytych GSH. (Na podstawie publikacji (Hepel and Stobiecka, 2012)).

Dopiero w pH = 5-6 zauważyłam, że nanocząstki AuNP@Cit lub AuNP@Zonyl, po dodaniu Hcys grupują się w większe agregaty. Obserwowałam wtedy wzrost intensywności rozproszenia światła i batochromowe przesunięcie pasma absorpcji SP (Stobiecka and Hepel, 2010, Hepel and Stobiecka, 2012). Stwierdziłam również, że dodatek do cząsteczek złota innych aminokwasów, takich jak histydyna, alanina czy metionina, w ogóle nie powoduje agregacji nanocząstek w tym pH. Jest to spowodowane całkowitym brakiem wymiany liganda na powierzchni nanocząstek. Aminokwasy bez grupy -SH nie zastępują cząsteczek Cit oraz ZONYLu na powierzchni AuNP. Grupa -S-S- w metioninie też nie ma dostatecznie silnego powinowactwa do złota. W pH = 5-6, glutation, który wymienia Cit i ZONYL w nanocząstkach AuNP@Cit i AuNP@Zonyl, nie powoduje agregacji nanocząstek złota. W tym pH cząsteczki GSH występują bowiem w postaci anionów i posiadają wypadkowy ładunek ujemny. Po wymianie cytrynianów lub Zonylu, następuje wzajemne odpychanie nanocząstek AuNP@GSH od siebie. Dodatkowe utrudnienia w wymianie liganda powoduje fakt, że w pH = 5-6 cytryniany znajdujące się na powierzchni złota również naładowane są ujemnie. Występują zatem siły elektrostatycznego odpychania między cząsteczkami Cit i GSH. Z przeprowadzonych przeze mnie badań wynika, że ze względu na zależność agregacji AuNP przez biomarkery stresu oksydacyjnego od pH, jest możliwe rozróżnienie biomarkerów GSH i Hcys poprzez odpowiednie dobranie pH roztworu (Rys.3) (Stobiecka and Hepel, 2010, Hepel and Stobiecka, 2012).

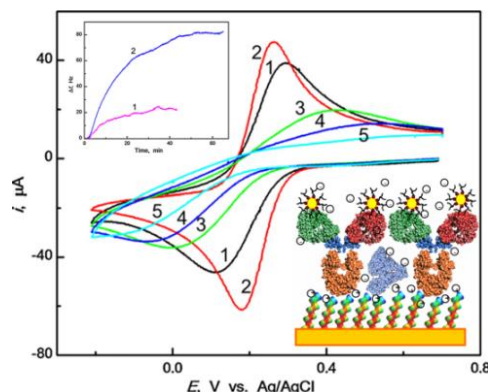


Rys. 3. Zależność intensywności rozpraszania światła I_{sc} względem pH dla: (1) 20 μ M roztworu GSH i (2) 20 μ M roztworu Hcys; $\tau = 60$ s; $C_{AuNP} = 3.8$ nM; średnica AuNP: 5 nm, $C_{Cit} = 0.46$ mM. (Na podstawie publikacji (Stobiecka and Hepel, 2010)).

3. Badanie efektu bariery potencjałowej w piezooimmunosensorze służącym do wykrywania glutationu i nanocząstek złota pokrytych glutationem

Czujniki bazujące na molekularnym rozpoznaniu i używające monowarstw zbudowanych z przeciwciał, DNA lub receptorów (Mirkin et al., 1996, Stobiecka et al., 2009, Stobiecka et al., 2010d, Stobiecka and Hepel, 2010, Stobiecka et al., 2012) stanowią ważny element rozwoju nowego kierunku diagnostyki medycznej. Coraz częściej wchodzi one bowiem w skład szybkich testów, tzw. oznaczeń przy łóżku chorego, które można wykonywać w gabinecie lekarza podstawowej opieki zdrowotnej. Jest to metoda szczególnie upowszechniająca się w krajach trzeciego świata, gdzie dostęp do instrumentalnych metod analitycznych i diagnostyki laboratoryjnej jest znacznie ograniczony. Czujniki molekularne powinny wykazywać wymaganą czułość, muszą być tanie i spełniać warunki higieny (np. sensory jednorazowego użytku) (Uehara et al., 2010, Zhang et al., 2002). Opracowanie odpowiednich czujników na różne biomarkery chorób wymaga szczegółowych badań oddziaływań supramolekularnych, wiązań kowalencyjnych i wodorowych w warstwach chemoczułych, selektywności, czułości sensora, itp. Dla uzyskania satysfakcjonującej czułości sensora i warstwy bioaktywnej bardzo istotne jest skompensowanie oddziaływań elektrostatycznych. Badania wpływu barier potencjałowych, na rozkład pola i potencjału elektrycznego w modelowych warstwach prowadziłam używając niezwykle czułego kwarcowego przetwornika piezoelektrycznego z napyłoną elektrodą złotą (Stobiecka and Hepel, 2011b). W ramach tej tematyki opracowałam dwa typy immunosensorów, które służyły do wykrywania glutationu. W pierwszym typie sensora, przeciwciało skierowane

przeciw GSH (anti-GSH) było przyłączane do powierzchni złotej piezoelektrody poprzez samoorganizującą się warstwę (SAM) naładowanych dodatnio cząsteczek aminoheksanotiolu. W drugim piezosensorze, przeciwciało było przyłączone do ujemnie naładowanej warstwy cząsteczek glutationu. W obu rodzajach sensorów wytwarzałam sztywną monowarstwę ładunków dodatnich lub ujemnych. Technika używaną podczas tych pomiarów była elektrochemiczna nanowaga kwarcowa. Poszczególne warstwy tworzone podczas konstrukcji sensora obserwowałam za pomocą pomiarów nanograwimetrycznych a także elektrochemicznych. Pomiary woltammetryczne prowadziłam w obecności dwóch markerów redoks: ujemnego jonu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ i dodatniego jonu $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$. Mocniejsze zmiany w odpowiedzi sensora uzyskałam dla immunosensora z dodatnią barierą potencjału (Rys.4). Okazuje się, że zapewnia ona lepszą stabilność filmu i bardziej korzystny rozkład ładunku. Większą czułość względem analitu obserwowałam w badaniach wykorzystujących ujemny marker elektrochemiczny. Uzyskane wyniki eksperymentalne zostały również potwierdzone przez teoretyczne obliczenia rozkładu pola elektrycznego i potencjału, wykonane stosując równanie różniczkowe Poissona i używając rozkładu Gaussa dla ładunków związanych w filmie. Stwierdziłam również, podobnie jak inni badacze (Gerdon et al., 2005), że badane piezoimmunosensory wykazały lepszą czułość w stosunku do nanocząstek złota pokrytych glutationem niż samych cząsteczek glutationu (Rys.4).



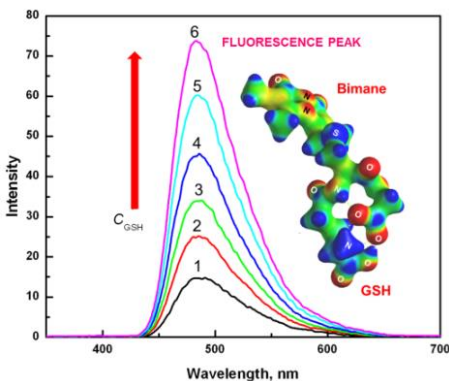
Rys. 4. Cykliczne woltamogramy uzyskane w 1 mM roztworze $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ po modyfikacji immunosensora z dodatnią barierą potencjału: (1) czysta złota piezoelektroda, (2) po dodaniu 6-amino-1-heksanotiolu, (3) po zakotwiczeniu monoklonalnego przeciwciała anti-GSH, (4) po zablokowaniu albuminą z surowicy bydlęcej, (5) nanocząstki złota pokryte glutationem; $\nu = 100 \text{ mV/s}$. WSTAWKA: Grawimetryczne zmiany filmu QC/Au/AHT/Ab,BSA po dodatku: (1) 1.25 mM GSH, (2) 0.95 nM AuNP@GSH; oraz schemat modyfikacji piezoelektrody. (Na podstawie publikacji (Stobiecka and Hepel, 2011b)).

W badaniach tych osiągnęłam bardzo niski limit detekcji: LOD = 0.3 nM. Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowałam wnioski odnośnie konstrukcji warstw chemoczułych. Warstwy te przede wszystkim muszą być zbalansowane elektrycznie w celu zminimalizowania niespecyficznego wymiany jonowej na granicy faz warstwa-elektrolit. Dla zakotwiczenia cząsteczek przeciwciał w warstwie chemoczułej, jest wskazane natomiast wytworzenie dodatniej bariery potencjałowej. Bariera ta powinna być usytuowana w głębi warstwy chemoczułej, przy granicy faz elektroda-warstwa, żeby obniżyć niespecyficzną wymianę jonową na granicy faz warstwa-elektrolit (Stobiecka and Hepel, 2011b).

4. Badanie mechanizmu i kinetyki wiązania glutationu z monochlorobimananem za pomocą fluorescencji, izotermicznej kalorymetrii miareczkowej i spektroskopii Ramana

Znakowanie fluorescencyjne komórek oraz ich składników ma szerokie zastosowanie w biologii komórki i medycynie. Umożliwia bowiem badanie kluczowych aspektów procesów życiowych, takich jak cykl komórkowy, różne choroby, rozwój nowotworów itp. (Kamencic et al., 2000, Lakowicz, 2006). Wykorzystując doskonałą czułość metod fluorescencyjnych można bezpośrednio badać biomolekuły w żywych komórkach (Tseng et al., 2005). Włączając się w ten nurt badań, skupiłam się nad kinetycznymi aspektami selektywnego wiązania barwnika monochlorobimananu (MCB) z glutationem. GSH pełni ważną rolę w organizmie człowieka. Bierze udział w detoksykacji (James et al., 2006, Kohen and Nyska, 2002, Noble et al., 2005) i utrzymaniu prawidłowego potencjału redoks komórek (James et al., 2006). Prawidłowa gospodarka redoks ma ogromne znaczenie w regulacji wewnątrzkomórkowego metabolizmu, w procesach wzrostu i różnicowania się komórek oraz apoptozy. Pod wpływem stresu oksydacyjnego, stosunek utlenionej (GSSG) do zredukowanej (GSH) formy glutationu ulega zmianie i może wskazywać na stan chorobowy organizmu. W związku z tym, glutation stanowi doskonały biomarker chorób wywołanych przez stres oksydacyjny. Monochlorobimanan (MCB) jest związkami, który tworzy z tiolami fluorescencyjny addukt pozwalający na ich wykrycie w komórkach (Rys.5). Tworzenie kompleksu MCB z GSH (GSB) było wykorzystywane do jakościowego oznaczania GSH oraz mapowania jego rozmieszczenia w komórkach i tkankach. Służyło także do rozróżniania komórek nowotworowych od normalnych i wyjaśnienia mechanizmu odporności komórek nowotworowych na leki chemoterapeutyczne

(Millis et al., 1997). Ostatnio monochlorobiman został użyty także do analizy poziomu siarczków we krwi (Bengtsson et al., 2008). W moich pomiarach badałam oddziaływania barwnika monochlorobimanu z glutationem w celu wykorzystania tej metody do wykrywania GSH w próbkach osocza krwi dzieci chorych na autyzm (Hepel and Stobiecka, 2011a, James et al., 2006).



Rys. 5. Widma fluorescencyjne uzyskane dla 330 μM roztworu monochlorobimanu po dodaniu różnych stężeń glutationu mierzone po 50 min oddziaływania, C_{GSH} [μM]: (1) 0, (2) 67, (3) 133, (4) 200, (5) 270, (6) 333; WSTAWKA: Struktura adduktu GSB. (Na podstawie publikacji (Hepel and Stobiecka, 2011a)).

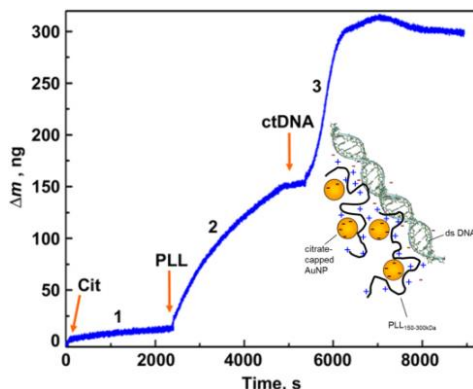
Z powodu nierównomiernego rozmieszczenia MCB w komórkach (preferencyjnie barwnik ten akumuluje się w jądrze komórkowym (Soderdahl et al., 2003)), w badaniach stosowałam wysokie stężenie MCB (wyższe, niż jest to zwykle stosowane w pomiarach fluorescencyjnych) w celu wysycenia jądra komórkowego. Dla uproszczenia modelu pomiarowego, w badaniach nie używałam również enzymu S-transferazy glutationowej (GST). GST jest wykorzystywana zwykle do przyspieszenia reakcji wiązania GSH z MCB i pomaga w przenoszeniu GSH przez błony komórkowe, np: z krwinek czerwonych do roztworu, pozwalając na analityczne wykrycie GSH bez niszczenia błon komórkowych. Oprócz pomiarów fluorescencyjnych wykonałam także pomiary nieoptyczną metodą izotermicznej kalorymetrii miareczkowej (ITC). Pomiary ITC wykluczają potencjalne zakłócenia analizy spowodowane zbyt wysokim stężeniem analitów, które może powodować wygaszanie sygnału fluorescencyjnego tworzonego kompleksu. W metodzie ITC proces wiązania GSH z MCB jest badany bowiem poprzez pomiar ciepła wydzielonego podczas reakcji. Wiązanie GSH z MCB jest procesem nieodwracalnym. Na podstawie uzyskanych przeze mnie wyników fluorescencyjnych i kalorymetrycznych opracowałam kinetyczny model wiązania MCB z GSH. Stałe szybkości reakcji otrzymane z pomiarów fluorescencyjnych i kalorymetrycznych wynosiły odpowiednio $k_1 = 0.274 \pm 0.012$

$s^{-1}M^{-1}$ i $k_2 = 0.315 \pm 0.004 s^{-1}M^{-1}$. Otrzymana podczas pomiarów zmiana entalpii $\Delta H = -48.46 \pm 0.61$ kJ/mol wskazuje na egzotermiczny charakter reakcji GSH z MCB. Porównywalne wartości stałych szybkości otrzymane dwoma niezależnymi metodami, wykluczyły ponadto możliwość zakłócenia fluorescencyjnego sygnału analitycznego dla stosowanych stężeń MCB (330 μM) i GSH (0-5 mM). Badanie zmian stanów wibracyjnych pierścieni monochlorobimanu po połączeniu z GSH zostało natomiast przeprowadzone za pomocą obliczeń kwantowo-mechanicznych. Relaksację pierścieni i tworzenie kompleksu GSH-MCB potwierdziłam dodatkowo badając widma spektroskopii Ramana (Hepel and Stobiecka, 2011a).

5. Zastosowanie nanocząstek złota pokrytych polilizyną w terapii genowej

Nanostruktury mogą być wykorzystywane w tworzeniu implantów, inżynierii tkankowej oraz jako nośniki genów do wycelowanego dostarczania związków w konkretne miejsce, np. okolice nowotworu (Lee et al., 2008, Nutiu and Li, 2005). Włączając się w ten nurt badań syntetyzowałam nanocząstki złota pokryte cytrynianami oraz polilizyną (AuNP@Cit/PLL). W swoich badaniach potwierdziłam, że AuNP@Cit/PLL stanowią doskonałe podłoże dla cząsteczek DNA (Stobiecka and Hepel, 2011a). Mocne elektrostatyczne oddziaływania AuNP@Cit z PLL, badałam za pomocą techniki RELS oraz absorpcji UV-Vis. W roztworze o $pH = 5.20 \pm 0.17$ grupy -COOH cytrynianów są zdysocjowane, nadając nanocząstkom złota ładunek ujemny. Polilizyna w tym pH jest sprotonowana i posiada ładunek dodatni netto. Po dodaniu wzrastających stężeń PLL do roztworu nanocząstek AuNP@Cit, obserwowałam efekt batochromowy i wzrost absorpcji lokalnego plazmonu powierzchniowego. Następowala również zmiana koloru roztworu AuNP@Cit. Świadczy to o silnym oddziaływaniu elektrostatycznym między cząstkami i tworzeniu się większych agregatów złota koloidalnego, w których cząsteczki polilizyny służą jako łączniki. Oddziaływanie AuNP@Cit z PLL powodowało ponadto mocny wzrost intensywności rozpraszania światła. Wyniki pomiarów RELS użyłam do wprowadzenia rozszerzonego równania adsorpcji langmuirowskiej (hyper-Langmuirian adsorption equation), z którego wynika, że na jedną nanocząstkę złota przypada 1.35 cząsteczki PLL. Potwierdza to, że cząsteczki PLL mogą służyć jako łączniki (mostki) w tworzeniu agregatów nanocząstek. Deprotonacja PLL w $pH > 11$, powodowała natomiast obniżenie intensywności rozpraszania światła i efekt hipsochromowy rezonansu

powierzchniowego. Następnie nanocząstki AuNP@Cit/PLL wykorzystywałam do badania oddziaływań z cząsteczkami kwasu deoksyrybonukleinowego pochodzącego z grasicy bydłej (ctDNA). Techniki EQCN i RELS, które zastosowałam w badaniach, potwierdziły elektrostatyczne przyciąganie między dodatnio naładowanymi cząsteczkami PLL i ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi w łańcuchu DNA (Rys.6). Z uzyskanych przeze mnie wyników można wnioskować, że nanocząstki AuNP@Cit/PLL mogą być wykorzystane jako nośniki genów.



Rys. 6. Zmiany masy Δm wywołane dodaniem roztworu cytrynianów (1), PLL (2), i ctDNA (3), do złotej piezoelektrody. Dodanie roztworów zaznaczone jest strzałkami; elektrolit: 0.02 M PBS, pH = 7.45. $C_{\text{Cit}} = 10$ mM, $C_{\text{PLL}} = 30$ ppm, $C_{\text{ctDNA}} = 45$ mM bp (wszystkie stężenia są stężeniami końcowymi). WSTAWKA: Schemat modyfikacji nanocząstek złota pokrytych Cit i PLL za pomocą ctDNA. (Na podstawie publikacji (Stobiecka and Hepel, 2011a)).

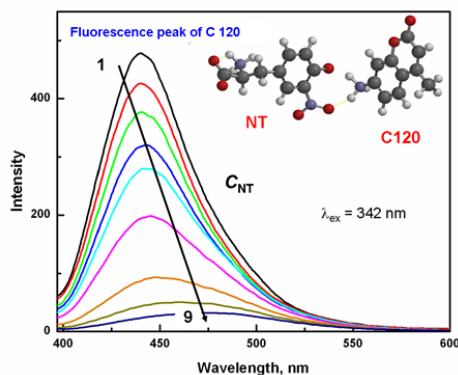
6. Badanie oddziaływania nitrotyrozyny z nanocząstkami złota pokrytymi cysteaminą i fluorescencyjnymi barwnikami

Nitrotyrozyna (NT) jest obiecującym biomarkerem zmian zachodzących w organizmie pod wpływem stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego (Kołodziejczyk, 2010, Szumska et al., 2012). Powstaje głównie w wyniku nitrowania reszt tyrozyny a jej podwyższony poziom skorelowany jest z nadprodukcją rodników. Podwyższony poziom NT w osoczu krwi występuje nie tylko u chorych z cukrzycą typu 1 i 2 (Ceriello et al., 2002, Hoeldke et al., 2002), ale także w takich chorobach jak: miażdżyca (Beckman et al., 1994), Alzheimer (Smith et al., 1997), lub reumatoidalne zapalenie stawów (Kaur and Halliwell, 1994).

Włączając się w ten nurt badań opracowałam nową metodologię do monitorowania poziomu NT wykorzystując spektroskopię rezonansowego rozpraszania światła oraz spektroskopię fluorescencyjną. Badałam oddziaływania nitrotyrozyny z nanocząstkami złota pokrytymi

cysteaminą oraz dwoma barwnikami fluorescencyjnymi: kumaryną C120 (Rys.7) i rodaminą B (RhB). Tworzenie się molekularnych struktur RhB-NT i C120-NT badałam także za pomocą symulacji dynamiki molekularnej i obliczeń kwantowo-mechanicznych. (Stobiecka and Hepel, 2011d).

Z otrzymanych podczas pomiarów spektroskopowych RELS wyników $(I_{sc,2}/I_{sc,1}) = (a_2/a_1)^3$, obliczyłam wielkość średnicy tworzących się agregatów po interakcji NT z AuNP ($a_{rel} = a_2/a_1 = 1.192$). Z uzyskanych danych jasno wynika, że w przeciwieństwie do glutationu i homocysteiny, nitrotyrozyna nie powoduje wymiany liganda na powierzchni AuNP, a wzrost średnicy agregatów następuje tylko dzięki przyłączeniu NT do cząsteczek cysteaminy pokrywających AuNP za pomocą oddziaływań elektrostatycznych i wiązań wodorowych. Dla potwierdzenia, że NT reaguje z AuNP, dodatkowo sprawdziłam adsorpcję NT na powierzchni złotej piezoelektrody i oddziaływanie NT z kumaryną C120 za pomocą techniki nanowagi kwarcowej. W badaniach fluorescencyjnych, nitrotyrozyna powodowała wygaszanie sygnału fluorescencyjnego zarówno kumaryny C120 jak i rodaminy B, gdzie bezpośredni transfer energii FRET w strukturze NT- RhB jest ograniczony ze względu na słabe pokrycie widma emisyjnego RhB z pasmem absorpcyjnym NT (Stobiecka and Hepel, 2011d). W tym przypadku prawdopodobnie mechanizm de-ekscytacji obejmuje wzbudzenie wibracyjne nieusztynionej części cząsteczki RhB czyli grupy karboksyfenylowej, związanej z cząsteczką NT wiązaniem wodorowym.



Rys. 7. Widma emisyjne fluorescencji kumaryny C120 w obecności wygaszacza nitrotyrozyny. C_{NT} : (krzywe 1 do 9) 0-0.33 mM; $\lambda_{ex} = 342$ nm; C_{C120} : 17 nM; 20 mM Tris, pH 7.4 (Stobiecka and Hepel, 2011d)

Na podstawie pomiarów fluorescencyjnych i rozszerzonego równania Sterna-Volmera wyznaczyłam również stałe wygaszania wynoszące odpowiednio $K_{sv} = 2.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ i $K_{sv} = 7.9 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ dla molekularnych struktur RhB-NT i C120-NT.

Głównymi osiągnięciami prowadzonych przeze mnie badań są:

- Opracowanie nowej metody do wykrywania markerów stresu oksydacyjnego: glutationu, homocysteiny i cysteiny za pomocą rezonansowej spektroskopii rozpraszania światła i spektroskopii absorpcyjnej
- Odkrycie efektu bariery potencjału w piezoimmunosensorach służących do wykrywania glutationu i nanocząstek złota pokrytych glutationem
- Zbadanie mechanizmu i kinetyki wiązania glutationu ze znacznikiem monochlorobimananem za pomocą spektroskopii fluorescencyjnej i Ramana
- Badanie agregacji nanocząstek złota pod wpływem biomarkerów stresu oksydacyjnego
- Wyjaśnienie mechanizmu procesów wymiany liganda na powierzchni nanocząstek złota między cząsteczkami cytrynianów, fluorosurfaktanta, glutationu, cysteiny i homocysteiny
- Synteza nanocząstek złota pokrytych polilizyną dla potencjalnych zastosowań ich jako nośników DNA w terapii genowej
- Opracowanie nowej metodologii do monitorowania poziomu nitrotyrozyny za pomocą spektroskopii fluorescencyjnej

Wykorzystanie wyników

Wyniki badań przedstawionych w osiągnięciu naukowym wykorzystałam do opracowania biosensorów służących do wykrywania stresu oksydacyjnego i jego ilościowego oznaczenia (Stobiecka and Hepel, 2011d, Stobiecka and Hepel, 2010, Hepel and Stobiecka, 2012, Hepel and Stobiecka, 2011a, Stobiecka and Hepel, 2011b). Wyniki te mogą być podstawą do opracowania nowych metod diagnostycznych umożliwiających wykrywanie chorób oraz w terapii genowej. Opracowane czujniki mogą być zminiaturyzowane i włączone do matrycy czujników pozwalających na równoczesne oznaczanie wielu biomarkerów chorobowych. Zastosowanie takich matryc w punktach opieki, z dala od szpitali wyposażonych w instrumentalne metody analityczne, jest ważnym elementem rozwoju medycyny w krajach trzeciego świata. Uzyskane wyniki stanowią oryginalny wkład w rozwój diagnostyki medycznej związanej z opracowaniem nowej metody na wykrycie biomarkerów stresu oksydacyjnego i wykorzystaniem rezonansowej spektroskopii rozpraszania światła. Z przeprowadzonych przeze mnie badań jednoznacznie

wynika, że RELS jest bardzo czułą metodą, która może służyć do wykrywania biomarkerów stresu oksydacyjnego: GSH, Hcys oraz Cys i rozróżniania ich między sobą (Stobiecka and Hepel, 2010, Hepel and Stobiecka, 2012). Wyciszanie sygnału fluorescencyjnego w spektroskopii fluorescencyjnej również może stanowić doskonałą metodę służącą do wykrywania biomarkerów (np. nitrotyrozyny) (Stobiecka and Hepel, 2011d). Ponadto nanocząstki złota pokryte polilizyną mogą stanowić nietoksyczne nośniki genów i cząsteczek o charakterze potencjalnych leków (Stobiecka and Hepel, 2011a).

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych.

Tematyka badań będących przedmiotem mojego zainteresowania przed uzyskaniem stopnia doktora:

- Badanie cukrów rozpuszczalnych zawartych w nasionach łubinu żółtego
- Badanie konformacyjnych zmian białek przy użyciu techniki elektrochemicznej nanowagi kwarcowej
- Elektrochemia białek i kwasów nukleinowych z wykorzystaniem elektrod węglowych i rtęciowej elektrody wiszącej
- Opracowanie biosensorów opartych o DNA służących do wykrywania genetycznie zmodyfikowanej soi
- Charakterystyka warstw redoks tworzonych na powierzchni złotych elektrod stałych
- Wykorzystanie pomiarów potencjometrycznych w badaniu interakcji neutralnych form anilin z pochodnymi kaliksarenów

W latach 1997-2002 studiowałam na Uniwersytecie Warmińsko - Mazurskim (UWM) na Wydziale Biologii, który ukończyłam w 2002 r. Pracę magisterską zatytułowaną "Zawartość cukrów rozpuszczalnych i aktywność β -D fruktofuranozydazy w kiełkujących nasionach łubinu żółtego", wykonywałam w Katedrze Fizjologii i Biotechnologii Roślin UWM. Moim promotorem naukowym była dr hab. Agnieszka Piotrowicz-Cieślak. W latach 2002-2006, na Wydziale Biologii UWM, realizowałam program studiów doktoranckich, a pracę doktorską pisałam pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. H. Radeckiej w Instytucie Rozrodu Zwierząt

i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk (IRZiBŻ PAN) w Olsztynie, w Zakładzie Biosensorów. W 2003 roku wyjechałam na 3-miesięczny staż naukowy podnoszący moje kwalifikacje naukowe do Stanowego Uniwersytetu Nowego Jorku (SUNY) w Potsdamie, do Stanów Zjednoczonych. W laboratorium prof. M. Hepel pracowałam jako research assistant. Badałam proces adsorpcji białek na mono- i wielowarstwowych samoorganizujących się strukturach oraz zmiany konformacyjne białka albuminy, pod wpływem jonów azotanowych i w obecności jonów kadmu oraz miedzi. Podczas wyjazdu zapoznałam się z technikami elektroanalitycznymi takimi jak: technika elektrochemicznej nanowagi kwarcowej, cykliczna woltamperometria (Cyclic voltammetry, CV), elektrochemiczne metody pulsowe (Differential Pulse Voltammetry, DPV; Square Wave Voltammetry, SWV) i z techniką mikroskopii sił atomowych (Atomic Force Microscopy, AFM) i skaningowej mikroskopii elektronowej (Scanning Electron Microscopy, SEM). Wyniki uzyskane podczas mojego stażu naukowego, zostały zaprezentowane na konferencjach naukowych (np. Meeting of the International Society of Electrochemistry w Salonikach, Grecja, 2004). Zostały także opublikowane w 2 artykułach, w czasopiśmie z listy filadelfijskiej (Stobiecka et al., 2005, Hepel and Stobiecka, 2007).

W 2004 roku zostałam przyjęta na stanowisko asystenta w Zakładzie Biosensorów PAN. W ramach współpracy między Polską Akademią Nauk i Czeską Akademią Nauk, w latach 2007-2008, wyjechałam na 2 krótkoterminowe staże naukowe do Brna. Pracowałam jako research assistant w laboratoriach prof. E. Palecka i prof. M. Fojty. Podczas mojego pobytu badałam elektrochemię histonów na węglowych i rtęciowych elektrodach używając adsorpcyjnej woltametrii inwersyjnej (adsorptive stripping voltammetry, ADSV) i innych metod elektrochemicznych (CV, SWV, DPV). Zdobyłam również doświadczenie w znakowaniu kwasów nukleinowych związkami chelatującymi metale oraz w badaniu elektrochemii tiolowanych kwasów nukleinowych zaadsorbowanych na wiszącej elektrodzie rtęciowej.

Wiedzę i doświadczenie zdobyte podczas staży naukowych wykorzystałam w badaniach prowadzonych podczas przygotowania mojej pracy doktorskiej. Tematyka pracy doktorskiej dotyczyła opracowania elektrochemicznego i piezoelektrycznego bioczuJNIKA służącego do wykrywania genetycznie zmodyfikowanej soi Roundup Ready. Piezoelektryczny bioczuJNIK był oparty o chemicznie modyfikowane złote elektrody napylone na powierzchnię kwarcu. Przedmiotem badań pracy doktorskiej była optymalizacja procesu przyłączenia sondy oligonukleotydowej do powierzchni złotej elektrody oraz optymalizacja procesu hybrydyzacji

sondy z oligonukleotydem o komplementarnej sekwencji w roztworze badanej próby. Warto podkreślić, że przedstawiony biocujnik wykrywał modyfikację genetyczną w próbkach zawierających genomowe DNA, bez konieczności stosowania reakcji PCR. W elektrochemicznym biocujniku do modyfikacji złotych elektrod wykorzystałam cząsteczki dipirometenu zawierające w pozycji mezo grupę -COOH. Dipirometeny po immobilizacji na powierzchni elektrod złotych i wiązaniu kationów Cu^{2+} tworzyły aktywną redoks monowarstwę. Została ona następnie wykorzystana do przyłączania cząsteczek oligonukleotydów zmodyfikowanych grupą -NH₂. Zaletą tak przygotowanej modyfikacji, było wykonywanie pomiarów elektrochemicznych bez obecności w roztworze elektrolitu, aktywnych elektrochemicznie cząsteczek markera redoks i bardzo czuła odpowiedź opracowanego sensora na przyłączenie nici DNA. Wyniki badań zawarte w pracy doktorskiej opublikowałam w 2 artykułach, w czasopismach z listy filadelfijskiej (Stobiecka et al., 2007, Szymańska et al., 2008) oraz zaprezentowałam podczas kilku ustnych i posterowych wystąpień na konferencjach i sympozjach. Do czasu uzyskania stopnia naukowego doktora nauk rolniczych mój dorobek naukowy składał się z 4 publikacji naukowych opublikowanych w czasopismach ze współczynnikiem oddziaływania (Impact Factor, IF).

Pracę doktorską zatytułowaną "Opracowanie biocujników do oznaczania genetycznie zmodyfikowanej soi" recenzowali: prof. dr hab. R. Amarowicz z Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie i prof. dr hab. T. Twardowski z Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Decyzją Rady Naukowej IRZiBŻ otrzymałam tytuł naukowy doktora nauk rolniczych w dyscyplinie technologii żywności i żywienia dnia 26. 02. 2009 roku. Rada Naukowa IRZiBŻ PAN przyznała mi wyróżnienie za pracę doktorską i jej obronę.

Podczas mojej pracy w Zakładzie Biosensorów, zajmowałam się również pomiarami potencjometrycznymi. Potencjometrię wykorzystywałam do badania oddziaływań między neutralnymi formami anilin a pochodnymi kaliksarenów. Wyniki z badań zostały opublikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej (Poduval et al., 2010).

Tematyka badań będących przedmiotem mojego zainteresowania po uzyskaniu stopnia doktora:

- Biomarkery stresu oksydacyjnego: glutation, homocysteina, cysteina i nitrotyrozyna
- Agregacja nanocząstek złota indukowana cząsteczkami biomarkerów i jonami metali
- Badanie uszkodzeń DNA wywołanych działaniem herbicydów za pomocą metod elektrochemicznych i fluorescencyjnych
- Badanie uszkodzeń DNA, wywołanych przez wytwarzanie reaktywnych form tlenu przez katechol i parakwat w obecności jonów Cu(II) w wyniku reakcji Fentona, za pomocą metod elektrochemicznych i fluorescencyjnych
- Wpływ antyoksydantów na zmniejszenie uszkodzeń DNA
- Oddziaływanie nanocząstek złota z cząsteczkami barwników fluorescencyjnych i transfer energii między nimi
- Opracowanie nowej metody do wykrywania homocysteiny i jonów rtęci (II) za pomocą fluorescencyjnych sond nukleotydowych typu „sygnalizator molekularny”
- Mitochondrialne biosensory służące do badania komórkowych procesów ochronnych przed hypoksją i reperfuzyją
- Wykorzystanie surwiwiny, która jest potencjalnym markerem nowotworowym do badania procesu apoptozy

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora przyjąłem zaproszenie prof. M. Hepel i wyjechałem na naukowy staż podoktorski. W SUNY Potsdam pracowałem jako postdoctoral research scholar w latach 2008-2011. Podczas stażu, dominującą tematyką moich badań było opracowanie nowych sensorów do wykrywania biomarkerów stresu oksydacyjnego (glutationu, homocysteiny, cysteiny, nitrotyrozyny) i badanie indukowanej agregacji nanocząstek złota (AuNP). Technikami, które wykorzystywałem podczas pomiarów była rezonansowa spektroskopia rozpraszania światła, spektroskopia absorpcyjna, technika nanowagi kwarcowej oraz spektroskopie: fluorescencyjna i Ramana. Wyniki badań z tej tematyki opublikowałem w 11 pracach oryginalnych (7 pracach opublikowanych w czasopiśmie ze współzynnikiem IF (Stobiecka et al., 2012, Stobiecka and Hepel, 2011a, Stobiecka and Hepel, 2011b, Stobiecka and Hepel, 2010, Stobiecka et al., 2010d, Stobiecka et al., 2010b, Hepel and Stobiecka, 2011a),

oraz 4 pracach opublikowanych w recenzowanych czasopismach anglojęzycznych bez współczynnika IF (Hepel and Stobiecka, 2011c, Stobiecka et al., 2010c, Stobiecka et al., 2009, Reed et al., 2010) i 3 rozdziałach w książkach (Stobiecka and Hepel, 2011d, Hepel and Stobiecka, 2012, Hepel and Stobiecka, 2011b). Część publikacji z tematyki nanocząstek złotych i markerów stresu oksydacyjnego wchodzi w skład osiągnięcia naukowego omówionego powyżej, będącego przedmiotem mojej rozprawy habilitacyjnej.

Poza głównym tematem badań dotyczącym biomarkerów stresu oksydacyjnego, podczas stażu podoktorskiego badałam również wpływ herbicydów: atrazyny (Hepel and Stobiecka, 2010), parakwatu (Stobiecka et al., 2011)) i katecholu na oksydacyjne uszkodzenia DNA (Hepel et al., 2011, Hepel et al., 2012c). Barwnik Nile Blue (NB) interkaluje do podwójnej helisy DNA dając w badaniach elektrochemicznych dobrze zdefiniowane piki redoks. Dzięki obserwacji zmian w katodowym prądzie barwnika NB otrzymanym przed i po interakcji DNA z herbicydami, mogłam wykryć uszkodzenia DNA. Po interakcji dsDNA z atrazyną prąd katodowy barwnika NB wzrastał w porównaniu z prądem katodowym barwnika przed interakcją dsDNA z herbicydem. Było to spowodowane zmianą konformacji formy B-DNA dwuniciowego DNA pod wpływem działania atrazyny. Symulacja molekularna potwierdziła rozwijanie podwójnej nici DNA pod wpływem herbicydu i wzrost upakowania barwnika redoks wewnątrz nici DNA. W wyniku interakcji DNA z atrazyną, nastąpiło wydłużenie cząsteczki DNA spowodowane wzrostem odległości między sąsiednimi zasadami azotowymi. Parakwat podobnie jak atrazyna powodował rozwijanie podwójnej helisy DNA. Herbicyd ten w obecności H_2O_2 zapoczątkowuje tworzenie się reaktywnych form tlenu takich jak HO^\bullet i $O_2^{\bullet-}$, które powodują uszkodzenia DNA. Po interakcji DNA z parakwatem również następował wzrost prądu piku katodowego barwnika. Długotrwałe działanie herbicydu spowodowało jednak obniżenie prądu piku katodowego NB. Wywołane to było fragmentacją lub częściowym przerwaniem łańcucha DNA. Krótsze odcinki DNA mogły dlatego upakować mniej cząsteczek aktywnego elektrochemicznie barwnika. Innym związkiem, który powoduje uszkodzenia DNA jest katechol. W obecności jonów miedzi (II) wykazuje on działanie prooksydacyjne, powoduje utlenienie guaniny i cięcie DNA wywołane działaniem rodników hydroksylowych. W moich badaniach skupiałam się nad wpływem antyoksydantów (m.in. glutationu) na zmniejszenie procesu utleniania guaniny i uszkodzeń DNA. Wyniki badań dotyczące tej tematyki, opublikowałam w 3 pracach oryginalnych (1 pracy opublikowanej w czasopiśmie ze współczynnikiem IF (Hepel

et al., 2012c) oraz 2 pracach opublikowanych w recenzowanych anglojęzycznych czasopismach bez współczynnika IF (Stobiecka et al., 2010a, Prance et al., 2010)), 5 rozdziałach w książkach (Stobiecka et al., 2011, Hepel et al., 2011, Hepel and Stobiecka, 2011d, Hepel et al., 2012b, Stobiecka, 2013) oraz jednej książce (Hepel and Stobiecka, 2010).

W laboratorium prof. M. Hepel zajmowałam się również syntezą monodispersyjnych nanocząstek złota i srebra różnych rozmiarów (AuNP, AgNP) oraz złotymi nanoprętami (AuNR) o stosunku długości do szerokości równym 2:1 i 4:1. Badałam agregację nanocząstek złota pokrytych kwasem merkaptopropionowym pod wpływem jonów metali, takich jak: Cd^{2+} , Pb^{2+} i Zn^{2+} . W zależności od przygotowania próby otrzymywałam dwa rodzaje agregatów (Hepel et al., 2012a). Między poszczególnymi nanocząstkami powstawały wiązania wodorowe a także koordynacyjne wiązania między częściowo zdeprotowanymi grupami karboksylowymi znajdującymi się na nanocząstkach złota i jonami metali. Badałam również interakcję AuNP z różnymi barwnikami fluorescencyjnymi (rodamina B, kumaryny, fluoresceina, fluorone black) i transfer energii między barwnikami a AuNP (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET). Stwierdziłam, że nanocząstki złota będące akceptorem energii, powodują wygaszanie sygnału fluorescencyjnego barwników będących donorem w procesie transferu energii w ich wzbudzonym stanie elektronowym. Wyniki badań z tej tematyki opublikowałam w czasopiśmie z listy filadelfijskiej (Stobiecka and Hepel, 2011c) i rozdziale w książce (Hepel et al., 2012a).

Moje kolejne badania wykonane podczas stażu podoktorskiego dotyczyły wykrywania homocysteiny i jonów rtęci (II) za pomocą fluorescencyjnych sond nukleotydowych typu „sygnalizator molekularny”. Sondami tego typu są oligonukleotydy, których zasady nukleinowe na końcach 5' i 3' są do siebie komplementarne. Dzięki temu końce sondy hybrydują w niskich temperaturach i tworzą charakterystyczną strukturę złożoną z „podstawy” i „pętli” (inaczej „spinki do włosów”). Sondy posiadają kowalentnie przyłączony na jednym końcu fluorofor generujący sygnał fluorescencyjny (donor). Na drugim końcu oligonukleotydu znajduje się cząsteczka wygaszająca fluorescencję (akceptor). W obecności komplementarnej do „pętli” nici DNA, następuje zmiana konformacji sondy w taki sposób, że „podstawa” ulega dehybrydyzacji i sonda daje fluorescencyjny sygnał (włączenie sygnału: ON). Podczas nieobecności komplementarnej nici DNA, „podstawa” sondy molekularnej pozostaje zhybrydowana (wyłączenie sygnału: OFF). Z powodu rezonansowego przeniesienia energii (FRET) między fluoroforem i akceptorem, dochodzi do wyciszenia fluorescencji fluoroforu.

Sondy nukleotydowe typu „sygnalizator molekularny” mają potencjalne zastosowanie w diagnostyce medycznej jako warstwy rozpoznania międzymolekularnego. Mogą służyć do wykrywania kwasów nukleinowych, śladowych ilości jonów rtęci (II), biomarkerów stresu oksydacyjnego, patogenów, badania oddziaływań kwasów nukleinowych z białkami i stosowane są do identyfikacji markerów cząsteczkowych w komórkach nowotworowych, przez co umożliwiają wczesną diagnozę chorób i ich leczenie. W moich badaniach wykorzystywałam niedopasowanie tymina-tymina (T-T), które wiązało jony Hg^{2+} tworząc kompleks T-Hg-T i umożliwiało całkowitą hybrydyzację “podstawy” (Stobiecka et al., 2012). Po dodatku Hcys, następowało odwracalne wychwytywanie jonów rtęci przez cząsteczki Hcys i tworzenie się stabilnego kompleksu $\text{Hg}(\text{Hcys})_2\text{H}_2$. Odpowiedź sondy typu „sygnalizator molekularny” na jony Hg^{2+} i Hcys była analizowana w oparciu o model odwracalnego oddziaływania sondy z tymi analitami. Przez dopasowanie parametrów modelu do danych eksperymentalnych wyznaczyłam stałe tworzenia K_{THgT} dla kompleksu T-Hg-T. Parametry te zostały otrzymane podczas pomiarów fluorescencyjnych oraz analiz widmowych $^1\text{H-NMR}$. Z przeprowadzonych przeze mnie badań jasno wynika, że metoda ta jest bardzo czułą techniką, która może być użyta do wykrywania różnych analitów. Sondy doskonale nadawały się do wykrywania niskich stężeń jonów rtęci (II) i biomarkera stresu oksydacyjnego homocysteiny. Limit detekcji (LOD) dla jonów Hg^{2+} wynosił $\text{LOD} = 19 \text{ nM}$, w oparciu o metodę 3σ , a dla Hcys: $\text{LOD} = 23 \text{ nM}$. Otrzymane wyniki opublikowałam w czasopiśmie z listy filadelfijskiej (Stobiecka et al., 2012).

Po powrocie ze stażu podoktorskiego w Stanach Zjednoczonych, 28. 12. 2011 roku zostałam zatrudniona w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego (SGGW) w Warszawie. Do chwili obecnej pracuję w Katedrze Fizyki na stanowisku adiunkta. Wykorzystując moje doświadczenie zdobyte zarówno podczas pracy w Zakładzie Biosensorów Żywności pod kierunkiem prof. dr hab. J. Radeckiego PAN w Olsztynie, jak i moich pobytów na zagranicznych stażach naukowych w laboratoriach: prof. E. Palecka, prof. M. Fojty i prof. M. Hepel, włączyłam się w nurt badań prowadzonych w Katedrze dotyczących badań procesów mitochondrialnych.

W 2012 roku otrzymałam grant dla młodych pracowników nauki przyznawany przez Szkołę Główną Gospodarstwa Wiejskiego obejmujący badania nad mitochondriami. Wstępne wyniki uzyskane podczas badań, będą prezentowane na 223 Konferencji Towarzystwa Elektrochemicznego (223rd ECS Meeting) w Toronto, w Kanadzie, w dniach 12-16. 05. 2013 roku.

W 2012 roku złożyłam również wnioski do Narodowego Centrum Nauki na konkurs SONATA oraz do Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach programu Iuventus Plus. W 2013 roku otrzymałam granty na realizację Projektów zatytułowanych „Nowe mitochondrialne biosensory do badania komórkowych mechanizmów ochronnych przed uszkodzeniem przez hipoksję” (PLN 500 000,00) oraz „Wykorzystanie wielofunkcyjnych nanocząstek złota i nukleotydowych sond fluorescencyjnych typu "sygnalizator molekularny" do badania nowotworów i procesów mitochondrialnych” (PLN 375 000,00). Moim celem jest skonstruowanie nowatorskiego biosensora umożliwiającego badanie mechanizmów chroniących komórki przed uszkodzeniami wywołanymi hipoksją i reperfuzją w modelowych układach: liposomach i mitoplastach naśladujących procesy zachodzące w mitochondriach. Kolejnym celem jest poznanie mechanizmu apoptozy wykorzystując surwiwinę, która jest białkiem z rodziny inhibitorów apoptozy i potencjalnym markerem w terapii nowotworowej. W szczególności pracuję nad wyjaśnieniem następujących procesów: (i) wydzielanie cytochromu c z mitochondriów inicjujące kaskadę procesów prowadzących do apoptozy komórek, (ii) wzrost objętości mitochondriów podczas hipoksji, (iii) zmiany w transporcie jonów i procesach redoks białek łańcucha oddechowego prowadzących do generowania reaktywnych form tlenu, które powodują uszkodzenia DNA, białek i lipidów oraz (iv) badanie oddziaływań nanocząstek złota z przeciwciałem i sondami nukleotydowymi typu „sygnalizator molekularny” skierowanymi bezpośrednio przeciwko surwiwinie. Metodami badawczymi, które stosuję w projektach są: relaksacyjne techniki elektrochemiczne (DPV, SWV), elektrochemiczna nanowaga kwarcowa (EQCN), technika elastycznego rozpraszania światła (RELS) oraz wysokoczęstotliwościowa spektroskopia immitacyjna monokryształu kwarcowego (QCI). Mój dorobek naukowy po obronie pracy doktorskiej obejmuje 16 prac oryginalnych, 9 rozdziałów w książkach i 1 książkę. Część wyników została również zaprezentowana na zjazdach krajowych i międzynarodowych (37 komunikatów konferencyjnych).

Podsumowanie:

Mój dorobek naukowy obejmuje 30 recenzowanych publikacji, w tym 14 prac opublikowanych w czasopiśmie z listy filadelfijskiej, 9 rozdziałów w książkach i 1 książkę, oraz 53 komunikaty zawierające wystąpienia posterowe i referaty.

Publikacje z badań wykonanych przed obroną pracy doktorskiej	
Artykuły w czasopismach z listy filadelfijskiej	5
Komunikaty zawierające wystąpienia ustne i posterowe	13
Publikacje z badań wykonanych po obronie pracy doktorskiej	
Artykuły w czasopismach z listy filadelfijskiej	9
Artykuły w recenzowanych anglojęzycznych czasopismach bez współczynnika oddziaływania IF	6
Rozdziały w książkach	9
Książki	1
Komunikaty zawierające wystąpienia ustne i posterowe	40
Sumaryczny współczynnik oddziaływania IF	49.702
Sumaryczne punkty MNiSW	576

Literatura:

- ACKERSON, C. J., SYKES, M. T. & KORNBERG, R. D. 2005. Ligand exchange between GSH and thiolated oligonucleotides on AuNP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102, 13383.
- BECKMAN, J. S., YE, Y., ANDERSON, G., CHEN, J., ACCAVITTI, M., TARPEY, M. & WHITE, C. 1994. NT is a biomarker of atherosclerosis. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 375, 81-88.
- BENGTSSON, A., JOHNSON, J., HILL, P., MULIGAN, J., LEVITEN, D., INSKO, M. & AL., E. 2008. Use of mono-bromo-bimane to derivatize sulfide levels during atmospheric hydrogen sulfide exposure and intravenous sulfide infusion. *FASEB J.*, 22, 749-750.
- CERIELLO, A., QUAGLIARO, L., CATONE, B., PASCON, R., PIAZZOLA, M. & AL, B. B. E. 2002. Role of hyperglycemia in nitrotyrosine postprandial generation. *Diabetes Care*, 25, 1439-1443.
- GATES, A. T., FAKAYODE, S. O., LOWRY, M., GANEA, G. M., MARUGESHU, A., ROBINSON, J. W., STRONGIN, R. M. & WARNER, I. M. 2008. Gold nanoparticle sensor for homocysteine thiolactone-induced protein modification. *Langmuir*, 24, 4107-4113.
- GERDON, A. E., WRIGHT, D. W. & CLIFFEL, D. E. 2005. Quartz crystal microbalance detection of glutathione-protected nanoclusters using antibody recognition. *Anal. Chem.*, 77, 304-310.
- HEPEL, M., BLAKE, D., MCCABE, M., STOBIECKA, M. & COOPERSMITH, K. 2012a. Assembly of Gold Nanoparticles Induced by Metal Ions. In: HEPER, M. & ZHONG, C. J. (eds.) *Functional Nanoparticles for Bioanalysis, Nanomedicine & Bioelectronic Devices, Volume 1*. Washington DC: Oxford University Press Inc American Chemical Society.
- HEPEL, M. & STOBIECKA, M. 2007. Interactions of adsorbed albumin with underpotentially deposited copper on gold piezoelectrodes. *Bioelectrochemistry* 70, 155-164.
- HEPEL, M. & STOBIECKA, M. 2010. *Interactions of Herbicide Atrazine with DNA*, New York, Nova Science Publishers.
- HEPEL, M. & STOBIECKA, M. 2011a. Comparative kinetic model of fluorescence enhancement in selective binding of monochlorobimane to glutathione. *J. Photoch. Photobio. A*, 225, 72-80.
- HEPEL, M. & STOBIECKA, M. 2011b. Detection of Oxidative Stress Biomarkers Using Novel Nanostructured Biosensors. In: SERRA, P. A. (ed.) *New Perspectives in Biosensors Technology and Applications*. Vienna: InTech.

- HEPEL, M. & STOBIECKA, M. 2011c. Microsensor Arrays for Determination of Biomarkers of Oxidative Stress, In: *Bioelectronics, Biointerfaces, and Biomedical Applications*. ECS Trans., 35 (7), 125-134.
- HEPEL, M. & STOBIECKA, M. 2011d. Novel DNA-Hybridization Biosensors for Studies of Atrazine Interactions with DNA. In: DANIELS, J. A. (ed.) *Advances in Environmental Research*. New York: Nova Science
- HEPEL, M. & STOBIECKA, M. 2012. Detection of Oxidative Stress Biomarkers Using Functional Gold Nanoparticles. In: MATIJEVIC, E. (ed.) *Fine Particles in Medicine and Pharmacy*. New York: Springer Sci Publ.
- HEPEL, M., STOBIECKA, M. & NOWICKA, A. 2012b. Nanogravimetric and voltammetric DNA-biosensors for screening of herbicides and pesticides. In: PREEDY, V. R. & PATEL, V. (eds.) *Biosensors and Environmental Health*. New York: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- HEPEL, M., STOBIECKA, M., PEACHEY, J. & MILLER, J. 2011. DNA-protective mechanisms of antioxidant glutathione intervention in catechol-mediated oxidative DNA damage in the presence of copper(II) ions. In: ANDREESCU, S. & HEPEL, M. (eds.) *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention and Therapy*. 2011: Oxford University Press.
- HEPEL, M., STOBIECKA, M., PEACHEY, J. & MILLER, J. 2012c. Intervention of glutathione in pre-mutagenic catechol-mediated DNA damage in the presence of copper(II) ions. *Mutation Research*, 735, 1– 11.
- HOELDKE, R. D., BRYNER, K. D., MCNEILL, D. R., HOBBS, G. R., RIGGS, J. E. & AL., S. S. W. E. 2002. Nitrosative stress, uric acid, and peripheral nerve function in early type 1 diabetes. *Diabetes*, 51, 2817-2825.
- JAMES, S. J., MELNYK, S., JERNIGAN, S., CLEVES, M. A., HALSTED, C. H., WONG, D. J., CUTLER, P., BORIS, M., BOCK, K., BRADSTREET, J. J., BAKER, S. B. & GAYLOR, D. W. 2006. Metabolic endophenotype and related genotypes are associated with oxidative stress in children with autism. *Am. J. Med. Genetics*, 141B, 947-956.
- KAMENCIC, D., LYON, A., PATERSON, P. G. & JUURLINK, B. H. J. 2000. Monochlorobimane fluorimetric method to measure tissue glutathione. *Anal. Biochem.*, 286, 35-37.
- KAUR, H. & HALLIWELL, B. 1994. NT in rheumatoid arthritis. *FEBS Lett.*, 350, 9-12.
- KOHEN, R. & NYSKA, A. 2002. Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol. Pathol.*, 30, 620–650.
- KOŁODZIEJCZYK, J. 2010. 3-nitrotyrosine as a marker of oxidative stress in vitro and in vivo. *Journal of Laboratory Diagnostics*, 46 141-145.
- LAKOWICZ, J. R. 2006. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, New York, Springer.
- LEE, J.-S., ULMANN, P. A., HAN, M. S. & MIRKIN, C. A. 2008. A DNA-gold nanoparticle-based colorimetric competition assay for the detection of cysteine. *Nano Lett.*, 8, 529-533.
- LEE, K. S. & EL-SAYED, M. A. 2006. Gold and Silver Nanoparticles in Sensing and Imaging: Sensitivity of Plasmon Response to Size, Shape, and Metal Composition. *J. Phys. Chem. B*, 110, 19220.
- LIM, I. I. S., IP, W., CREW, E., NJOKI, P. N., MOTT, D. & ZHONG, C. J. 2007. Homocysteine-mediated reactivity and assembly of gold nanoparticles. *Langmuir*, 23, 826-833.
- LIM, I. M. S., MOTT, D., IP, W., NJOKI, P. N., PAN, Y., ZHOU, S. & ZHONG, C. J. 2008. Interparticle interactions in glutathione mediated assembly of gold nanoparticles. *Langmuir*, 24, 8857-8863.
- LINK, S. & EL-SAYED, M. A. 1999. Spectral properties and relaxation dynamics of surface plasmon electronic oscillations in gold and silver nanodots and nanorods. *J. Phys. Chem. B*, 103, 8410-8426.
- MILLIS, K. K., LESKO, S. A. & GAMCSIK, M. P. 1997. Formation, intracellular distribution and efflux of glutathione-bimane conjugates in drug-sensitive and -resistant MCF-7 cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 40, 101-111.

- MIRKIN, C. A., LETZINGER, R. L., MUCIC, R. C. & STORHOFF, J. J. 1996. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature*, 382, 607-609.
- MOCANU, A., CERNICA, I., TOMOAI, G., BOBOS, L. D., HOROVITZ, O. & M.TOMOAI-COTISEL 2009. Self-assembly characteristics of gold nanoparticles in the presence of cysteine. *Colloids Surfaces A*, 338, 93-101.
- NOBLE, M., MAYER-PROSCHEL, M. & PROSCHEL, C. 2005. Redox regulation of precursor cell function: insights and paradoxes. *Antioxidants Redox Signal.*, 5, 1456-1467.
- NUTIU, R. & LI, Y. 2005. Aptamers with fluorescence signaling properties. *Methods*, 37, 16-25.
- PODUVAL, R., KURZATKOWSKA, K., STOBIECKA, M., DEHAEN, W. F. A., DEHAEN, W., RADECKA, H. & RADECKI, J. 2010. Systematic study of interaction of the neutral form of anilines with undecylcalix[4]resorcinarene derivatives by means of potentiometry. *Supramolecular Chemistry*, 22, 413-419.
- PRANCE, A., COOPERSMITH, K., STOBIECKA, M. & HEPEL, M. 2010. Biosensors for the Detection of DNA Damage by Toxicants. *ECS Transactions*, 33, 3-15.
- REED, Z., PRANCE, A., STOBIECKA, M. & HEPEL, M. 2010. Resonance Elastic Light Scattering and Plasmonic Phenomena in Glutathione-Mediated Gold Nanoparticle Assembly. *ECS Transactions*, 28, 43-57.
- RUSIN, O., LUCE, N. N. S., AGBARIA, R. A., ESCOBEDO, J. O., JIANG, S., WARNER, I. M., DAWAN, F. B., LIAN, K. & STRONGIN, R. M. 2004. Visual Detection of Cysteine and Homocysteine. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 438-439.
- SMITH, M., HARRIS, P., SAYRE, L., BECKMAN, J. & PERRY, G. 1997. NT is a biomarker of Alzheimer's. *J. Neurosci.*, 17, 2653-2657.
- SODERDAHL, T., ENOKSSON, M., LUNDBERG, M., HOLMGREN, A., OTTERSEN, O. P., ORRENIUS, S., BOLCSFOLDI, G. & COTGREAVE, I. A. 2003. Visualization of the compartmentalization of glutathione and protein-glutathione mixed disulphides in cultured cells. *FASEB J.*, 17, 124-126.
- STOBIECKA, M. 2013. Novel DNA-Biosensors for Studies of GMO, Pesticides and Herbicides. In: RINKEN, T. (ed.) *State of the Art in Biosensors - Environmental and Medical Applications* InTech.
- STOBIECKA, M., CIEŚLA, J. M., JANOWSKA, B., TUDEK, B. & RADECKA, H. 2007. Piezoelectric Sensor for Determination of Genetically Modified Soybean Roundup Ready in Samples not Amplified by PCR. *Sensors* 7, 1462-1479.
- STOBIECKA, M., COOPERSMITH, K., CUTLER, S. & HEPEL, M. 2010a. Novel DNA-Hybridization Biosensors for Studies of DNA Underwinding Caused by Herbicides and Pesticides, in: "Electrochemical Nano/Bio Systems 2". *ECS Trans.*, 28 (34), 1-12.
- STOBIECKA, M., COOPERSMITH, K. & HEPEL, M. 2010b. Resonance Elastic Light Scattering (RELS) Spectroscopy of Fast Non-Langmuirian Ligand-Exchange in Glutathione-Induced Gold Nanoparticle Assembly. *J. Colloid Interface Sci*, 350, 168-177.
- STOBIECKA, M., CUTLER, S., REED, Z., PRANCE, A. & HEPEL, M. 2010c. Detection of Oxidative Stress Biomarker Homocysteine Utilizing Resonance Elastic Light Scattering. *ECS Transactions*, 28, 115-128.
- STOBIECKA, M., DEEB, J. & HEPEL, M. 2009. Molecularly-templated polymer matrix films for biorecognition processes: sensors for evaluating oxidative stress and redox buffering capacity. *Electrochem. Soc. Trans.*, 19, 15-32.
- STOBIECKA, M., DEEB, J. & HEPEL, M. 2010d. Ligand exchange effects in gold nanoparticle assembly induced by oxidative stress biomarkers: Homocysteine and cysteine. *Biophys. Chem.*, 146, 98-107.
- STOBIECKA, M. & HEPEL, M. 2010. Rapid functionalization of metal nanoparticles by moderator-tunable ligand-exchange process for biosensor designs. *Sensors Actuators B*, 149, 373-380.
- STOBIECKA, M. & HEPEL, M. 2011a. Double-shell gold nanoparticle-based DNA-carriers with poly-L-lysine binding surface. *Biomaterials*, 32, 3312-3321.

- STOBIECKA, M. & HEPEL, M. 2011b. Effect of buried potential barrier in label-less electrochemical immunodetection of glutathione and glutathione-capped gold nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.*, 26, 3524-3530.
- STOBIECKA, M. & HEPEL, M. 2011c. Multimodal coupling of optical transitions and plasmonic oscillations in rhodamine B modified gold nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13, 1131-1139.
- STOBIECKA, M. & HEPEL, M. 2011d. Nitrotyrosine as a Biomarker of Diabetes. In: BERHARDT, L. V. (ed.) *Advances in Medicine and Biology*. New York: Nova Science Publishers.
- STOBIECKA, M., HEPEL, M. & RADECKI, J. 2005. Transient conformation changes of albumin adsorbed on gold piezoelectrodes. *Electrochim. Acta*, 50, 4873-4887.
- STOBIECKA, M., MOLINERO, A. A., CHALUPA, A. & HEPEL, M. 2012. Mercury/homocysteine ligation-induced ON/OFF-switching of a T-T mismatch-based oligonucleotide molecular beacon. *Anal. Chem.*, 84, 4970-4978.
- STOBIECKA, M., PRANCE, A., COOPERSMITH, K. & HEPEL, M. 2011. Antioxidant Effectiveness in Preventing Paraquat-Mediated Oxidative DNA Damage in the Presence of H₂O₂. In: ANDREESCU, S. & HEPEL, M. (eds.) *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy*. Washington: American Chemical Society.
- SZUMSKA, M., WIELKOSZYŃSKI, T. & TYRPIEŃ, K. 2012. 3-nitrotyrosine determination as nitrosative stress marker and health attitudes of medical students considering exposure to environmental tobacco smoke. *Przegląd Lekarski*, 69, 798-802.
- SZYMAŃSKA, I., STOBIECKA, M., ORLEWSKA, C., ROHAND, T., JANSSEN, D., DEHAEN, W. & RADECKA, H. 2008. Electroactive Dipyrromethene-Cu(II) Self-Assembled Monolayers: Complexation Reaction on the Surface of Gold Electrodes. *Langmuir*, 24, 11239-11245.
- TSENG, W. L., LEE, K. H. & CHANG, H. T. 2005. Using Nile Red-adsorbed gold nanoparticles to locate glutathione within erythrocytes. *Langmuir*, 21, 10676-10683.
- UEHARA, N., OOKUBO, K. & SHIMIZU, T. 2010. Colorimetric Assay of Glutathione Based on the Spontaneous Disassembly of Aggregated Gold Nanocomposites Conjugated with Water-Soluble Polymer. *Langmuir*, 26, 6818-6825.
- WANG, W., ESCOBEDO, J. O., LAWRENCE, C. M. & STRONGIN, R. M. 2004. Direct detection of homocysteine. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 3400-3401.
- ZHANG, F. X., HAN, L., ISRAEL, L. B., DARAS, J. G., MAYE, M. M., LY, N. K. & ZHONG, C. J. 2002. Colorimetric detection of thiol-containing amino acids using gold nanoparticles. *Analyst*, 127, 462-465.