

**Załącznik 3**

**Autoreferat  
przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych**

**dr inż. Sylwia Olsztyńska-Janus**

Katedra Inżynierii Biomedycznej  
Wydział Podstawowych Problemów Techniki  
Politechnika Wroclawska

## SPIS TREŚCI

<b>1. DANE PERSONALNE</b>	<b>3</b>
<b>2. WYKSZTAŁCENIE, POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE</b>	<b>3</b>
<b>3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU</b>	<b>3</b>
3.1. INFORMACJE O STAŻACH I SZKOLENIACH NAUKOWYCH	4
3.2. PUBLIKACJE	5
3.3. UDZIAŁ W PROJEKTACH NAUKOWYCH	5
3.4. OSIĄGNIĘCIA DYDAKTYCZNE	5
<b>4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO</b>	<b>6</b>
4.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	6
4.2. LISTA PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	6
4.3. PREZENTACJA CELU NAUKOWEGO I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA	7
4.4. MOLEKULARNY MECHANIZM ODDZIAŁYWANIA PROMIENIOWANIA Z ZAKRESU NIR NA UKŁADY BIOLOGICZNE	11
4.4.1. Wstęp	11
4.4.2. Metodologia badań	14
4.4.3. Wpływ promieniowania NIR na aminokwasy i białka	16
4.4.4. Procesy pierwotne wywołane działaniem promieniowania NIR	22
4.5. BADANIE TKANEK MIĘKKICH ZA POMOCĄ SPEKTROSKOPII OSCYLACYJNEJ – PRACE PRZEGLĄDOWE	23
4.5.1. Opracowanie metody oznaczania stresu oksydacyjnego w procesie hemodializy [H. 5].	27
4.5.2. Opracowanie metody wyznaczania przejść fazowych w skórze [H. 6, 7]	31
4.5.3. Wpływ temperatury i promieniowania UV na strukturę kwasu linolowego [H. 8]	38
4.6. PODSUMOWANIE	49
<b>5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH</b>	<b>51</b>
5.1. OPIS DZIAŁALNOŚCI NAUKOWEJ PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA	51
5.2. OPIS INNEJ DZIAŁALNOŚCI NAUKOWEJ PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA – OPIS CHRONOLOGICZNY	55
5.2.1. Opis prac badawczych związanych z osiągnięciem naukowym	57
5.2.2. Współpraca naukowa nie związana z tematem habilitacji	61
5.2.3. Działalność dydaktyczna	65
5.2.4. Działalność organizacyjna	66
5.2.5. Uzyskane wyróżnienia	67
5.3. PODSUMOWANIE DZIAŁALNOŚCI NAUKOWO-BADAWCZEJ	69

## 1. DANE PERSONALNE

Imię i nazwisko: Sylwia Olsztyńska-Janus  
Data i miejsce urodzenia: ██████████  
Miejsce pracy: Katedra Inżynierii Biomedycznej, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Politechnika Wroclawska  
Stanowisko: Adiunkt naukowo-dydaktyczny

## 2. WYKSZTAŁCENIE, POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE

- 1998–2004 Studia doktoranckie, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Instytut Fizyki, Politechnika Wroclawska.  
Tytuł rozprawy doktorskiej: „Zastosowanie spektroskopii ATR-FTIR do badania molekularnego mechanizmu oddziaływania promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni z aminokwasem – fenyloalaniną”.  
Promotor: dr hab. Małgorzata Komorowska.  
Recenzent: prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki.  
Recenzent: prof. dr hab. Maria Magdalena Szostak.  
Data obrony: 21.09.2004 (*Tytuł doktora nauk fizycznych z wyróżnieniem*)
- 1999–2000 Rok studiów na Université de Sciences et Technologies de Lille (Francja) w ramach programu Erasmus/Socrates (dziedzina: Inżynieria Biomedyczna).
- 1993–1998 Politechnika Wroclawska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Kierunek: Fizyka, Specjalność: Inżynieria Biomedyczna, Zastosowanie komputerów w medycynie.  
Tytuł pracy magisterskiej: „Badanie zmian strukturalnych w błonach podstawnych kłębuszków nerkowych w procesach chorobowych. Badanie metodą spektroskopii EPR”.  
Promotor: dr hab. Małgorzata Komorowska.  
Data obrony: 25.06.1998 (*Tytuł magistra inżyniera z wyróżnieniem*).

## 3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU

- 1.11.2014–aktualnie Adiunkt, Katedra Inżynierii Biomedycznej, Politechnika Wroclawska.  
1.10.2005–31.10.2014 Adiunkt, Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej, Politechnika Wroclawska.  
1.10.2004–30.09.2005 Asystent naukowo-dydaktyczny, Wydziałowy Zakład Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej, Politechnika Wroclawska.  
1.02.2004–30.09.2004 Starszy referent techniczno-inżynierski, Wydziałowy Zakład Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej, Politechnika Wroclawska.  
1.10.1998-30.09.1999 Asystent naukowo-dydaktyczny, Instytut Fizyki, Politechnika Wroclawska.

### 3.1. INFORMACJE O STAŻACH I SZKOLENIACH NAUKOWYCH

- 2016 Praktyka z chemometrii, Uniwersytet Wrocławski (prof. Mirosław A. Czarnecki, 3 miesiące).
- 2010 Praktyka z analizy struktur biologicznych za pomocą technik spektroskopii oscylacyjnej, Uniwersytet Wrocławski (prof. Bogusława Czarnik-Matusiewicz<sup>†</sup>, 2 tygodnie).
- 2006 Dwutygodniowy pobyt w International University Bremen (IUB), Niemcy (finansowanie przez IUB, laureat grantu na Szkołę Letnią "Complex Materials: Cooperative Projects of the Natural, Engineering and Biosciences").
- 2006 Dwutygodniowy pobyt w CEA (Commissariat à l'énergie atomique), Grenoble, Francja (finansowanie przez CEA). Zastosowanie inżynierii biomedycznej w przygotowaniu cienkich warstw z układów biologicznych i badania procesów hydratacji/dehydratacji.
- 2002–2003 Praktyka z czasowo-rozdzielczej spektroskopii fluorescencyjnej, Instytut Technologii Organicznej i Tworzyw Sztucznych, Politechnika Wrocławska (prof. dr hab. inż. Kazimiera Wilk; 3 miesiące).
- 01.–02.2001 1,5 miesięczny staż w Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman (LASIR), Institut de Chimie, Université de Science et Technologies de Lille, Lille, Francja (prof. Nathalie Dupuy).
- 1999–2000 10-cio miesięczny staż w Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman (LASIR), Institut de Chimie, Université de Science et Technologies de Lille, Lille, Francja. Zastosowanie spektroskopii oscylacyjnej do badania układów biologicznych.
- 1999–2000 Kurs Spektroskopii Molekularnej (w języku francuskim), Instytut Fizyki, Université de Science et Technologies de Lille, Lille, Francja (5 miesięcy).
- 1997–1998 Teoretyczna i praktyczna nauka Laserowej Spektroskopii Molekularnej, Instytut Chemii Fizycznej i Teoretycznej, Politechnika Wrocławska (prof. dr hab. inż. Magdalena M. Szostak, 6 miesięcy).
- 1997–1998 Praktyka roczna ze Spektroskopii EPR, NMR i UV-VIS, Instytut Fizyki, Politechnika Wrocławska (dr hab. Małgorzata Komorowska).
- 1997 Praktyka dotycząca metod diagnostycznych, terapeutycznych i fizycznych stosowanych w medycynie; stypendium DAAD, Niemcy:
- Instytut Fizyki, Uniwersytet Humboldta, Berlin,
  - Centrum Medycyny Laserowej, Berlin,
  - Instytut Fizyki, Uniwersytet w Bremen,
  - BIAS, Bremen Institut für Angewandte Systeme,
  - Laboratorium Biofizyki, Uniwersytet w Münster,
  - Uniwersytet Techniczny w Monachium,
  - Medical Electronics and Clinic Rechhts von Isar ROTECH GmbH, Amerang.
- 1996–1997 praktyka dotycząca najnowszych metod diagnostycznych i organizacji sieci szpitalnej, Wojewódzki Szpital Specjalistyczny, Wrocław.

### 3.2. PUBLIKACJE

58 publikacji naukowych składających się z 20 artykułów, 1 monografii, 1 rozdziału w książce międzynarodowej, 7 polskich rozdziałów, 5 zarejestrowanych ustnych referatów konferencyjnych, 22 komunikatów konferencyjnych, 1 streszczenia (abstrakt konferencyjny) i 1 edytorstwa książki międzynarodowej.

Tabela 1. Dane metryczne (z dnia 12.07.2023)

	Web of Science	Scopus	Google Scholar
H-indeks	13	12	14
Wszystkie cytowania	431	429	630
Bez autocytowań	375	351	

### 3.3. UDZIAŁ W PROJEKTACH NAUKOWYCH

Udział w grantach jako wykonawca: 7 krajowych i 2 międzynarodowe (krótkie zestawienie projektów ujęte jest w podpunkcie 5.3, lista projektów znajduje się w załączniku 4). Efektem pracy w grantach są publikacje i udziały w konferencjach krajowych i międzynarodowych, których jestem współautorem:

- Wrovasc nr POIG.01.01.02-02-001/08-00: 10 publikacji (4 artykuły, 1 rozdział międzynarodowy, 2 komunikaty na konferencji międzynarodowej, 3 komunikaty na konferencji krajowej),
- grant aparaturowy nr 6180/IA/119/2012: 11 publikacji (4 artykuły, 1 komunikat na konferencji międzynarodowej i 10 komunikatów na konferencjach krajowych),
- grant europejski FP7-PEOPLE-2012-IAPP nr 324514 (1 publikacja).

### 3.4. OSIĄGNIĘCIA DYDAKTYCZNE

2009–aktualnie Członek Komisji ds. Dyplomowania na studiach I oraz II stopnia na kierunku Inżynieria Biomedyczna, specjalność Optyka Biomedyczna, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Politechnika Wroclawska.

1999–aktualnie nauczyciel akademicki prowadzący różne przedmioty z dyscypliny Inżynieria Biomedyczna w dziedzinie spektroskopii, fizyki, chemii, informatyki i aparatury biomedycznej.

Promotor pomocniczy dwóch doktorantów:

- Katarzyna Niemczyk (data publicznej obrony: 26.05.2017):  
Temat pracy doktorskiej: „Wpływ niektórych czynników stymulacyjnych na wzrost, rozwój oraz właściwości biomechaniczne wybranych roślin”;  
promotor: Prof. Jerzy Detyna, Wydział Mechaniczny, Politechnika Wroclawska;
- Barbara Kmiecik (data publicznej obrony: 5.07.2018):  
Temat pracy doktorskiej: „Stereofotogrametryczna metoda identyfikacji geometrii powierzchni obciążonej mechanicznie przeznaczona do zastosowań biomedycznych”;  
promotor: Prof. Jerzy Detyna, Wydział Mechaniczny, Politechnika Wroclawska.

Opiekun:

- 21 prac dyplomowych magisterskich;
- 41 prac dyplomowych inżynierskich.

#### 4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

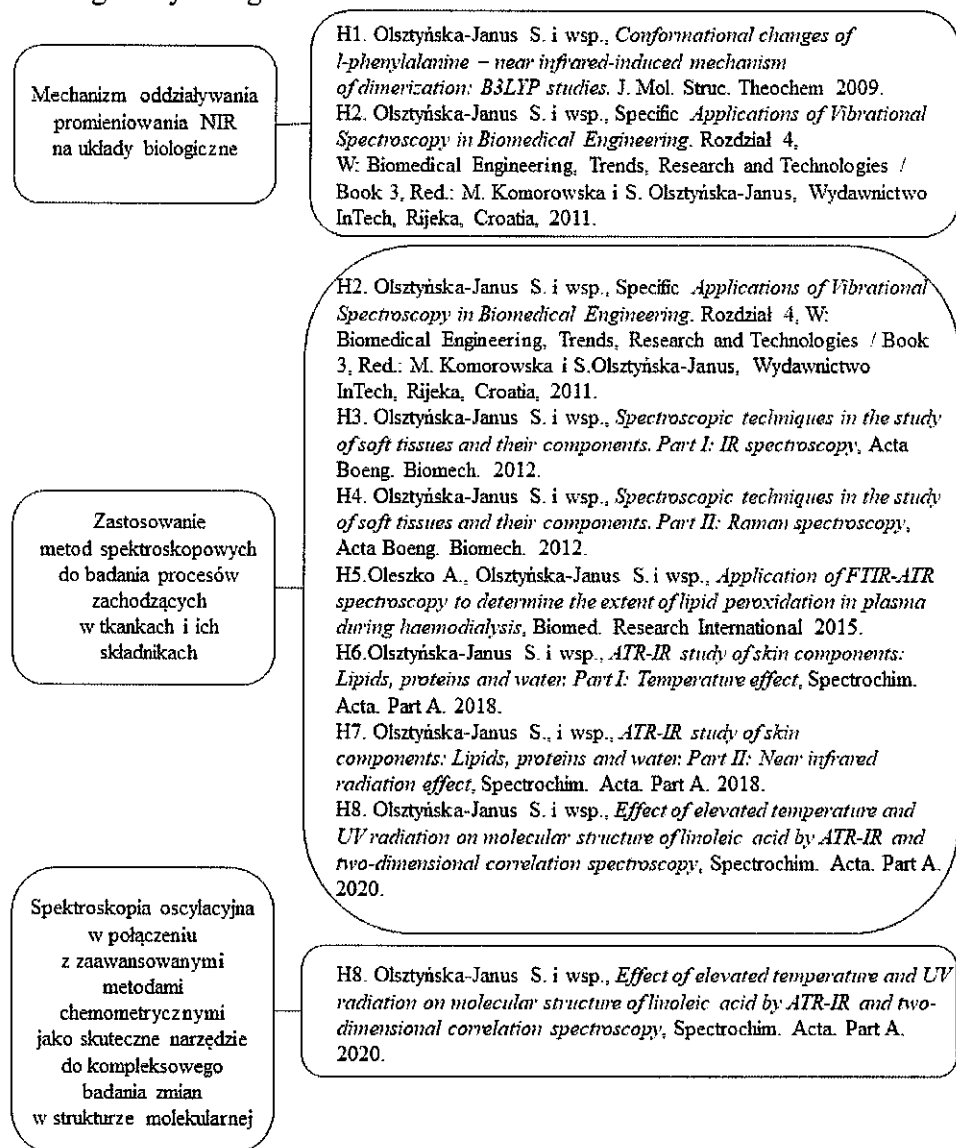
##### 4.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Osiągnięciem naukowym wynikającym z art. 221 ust. 10 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 zm.) jest jednotematyczny cykl publikacji naukowych zatytułowany:

**Wpływ wybranych czynników fizykalnych na cząsteczki i układy biologiczne.**

##### 4.2. LISTA PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Cykl publikacji stanowiących wkład i wykazujących aktywność naukową w dyscyplinie Inżynieria Biomedyczna po otrzymaniu stopnia doktora składa się z następujących ośmiu publikacji uporządkowanych tematycznie (w siedmiu z nich [H. 1–4, 6–8] byłam pierwszym autorem, w sześciu z nich [H. 2–4, 6–8] byłam autorem korespondencyjnym). Badania dotyczą trzech głównych zagadnień:



#### 4.3. PREZENTACJA CELU NAUKOWEGO I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA

Inżynieria Biomedyczna jest interdyscyplinarną dziedziną nauki i techniki, leżącą na styku nauk technicznych, medycznych i biologicznych. Jednym z celów Inżynierii Biomedycznej jest stymulowanie rozwoju medycyny poprzez dostarczanie nowych narzędzi i metod badawczych, tworzenie modeli systemów biologicznych i zachodzących w nich procesów na poziomie molekularnym. Stosowane przeze mnie techniki spektroskopii oscylacyjnej (IR i Raman) wspomagane zaawansowanymi metodami analizy danych takimi jak dwuwymiarowa analiza korelacyjna oraz chemometria wpisują się w założenia nowoczesnej Inżynierii Biomedycznej.

Moim osiągnięciem naukowym stanowiącym podstawę wniosku habilitacyjnego są badania zmian strukturalnych indukowanych podwyższoną temperaturą oraz promieniowaniem NIR (ang. *Near Infrared*) zarówno w cząsteczkach o znaczeniu biologicznym, jak i bardziej złożonych układach biologicznych takich jak tkanki za pomocą spektroskopii oscylacyjnej. Wyniki te zostały opublikowane w jednotematycznym cyklu ośmiu publikacji. Badania zaprezentowane w cyklu prac habilitacyjnych posiadają potencjał aplikacyjny polegający na wykorzystaniu spektroskopii oscylacyjnej jako szybkiej i nieinwazyjnej metody diagnostycznej. Znaczenie moich badań *in vitro* można przedstawić następująco:

- 1) Badania z wykorzystaniem spektroskopii oscylacyjnej na przykładowych układach modelowych mogą pomóc w wyjaśnieniu molekularnego mechanizmu oddziaływania promieniowania niejonizującego, jakim jest promieniowanie z zakresu bliskiej podczerwieni (NIR, ang. *Near infrared*) na układy biologiczne [H. 1, 2, 7].
- 2) Analiza procesów agregacji [H. 3, 4]. Agregacja białek w farmaceutykach ma istotne znaczenie w medycynie, gdyż może prowadzić do zmniejszenia bioaktywności leku i tym samym wpłynąć na siłę działania leku. Agregaty białek mogą wywołać niepożądane skutki immunologiczne, np. wstrząs anafilaktyczny. Istnieje również hipoteza, że choroby neurodegeneracyjne (np. Alzheimer, Parkinson, Huntington, Creutzfeldt-Jakoba), czy choroby nowotworowe są związane z patologią i akumulacją białek.
- 3) Badania procesu utleniania lipidów jako potencjalnego problemu zdrowotnego dotyczącego fizjologii i zdrowia człowieka. Produkty peroksydacji lipidów akumulują się w tkankach i mogą uszkadzać komórki reagując z białkami, lipidami i kwasami

nukleinowymi. W konsekwencji prowadzą do wielu dysfunkcji i stanów patologicznych w organizmie wywołujących m.in. cukrzycę, miażdżycę czy nowotwory. Analiza produktów peroksydacji nie należy do najłatwiejszych, spektroskopia oscylacyjna okazała się jednak szybką i bezpośrednią metodą badania produktów utleniania lipidów [H. 5].

- 4) Badania wpływu temperatury na komponenty tkanek skóry w celu zrozumienia szczegółowych procesów zachodzących podczas termoterapii [H. 6] oraz przewidywania właściwości termicznych innych tkanek. Analiza zmian strukturalnych dla różnych składników skóry indukowanych promieniowaniem z zakresu NIR może pomóc w wyjaśnianiu mechanizmów molekularnych procesów zachodzących podczas światłoterapii [H. 7].
- 5) Badanie wpływu podwyższonej temperatury oraz promieniowania UV na kwas linolowy (LA, z ang. *linoleic acid*), który jest ważnym materiałem budulcowym tkanki skórnej. Kwas linolowy jest niezbędnym kwasem tłuszczowym, który nie może być syntezowany przez nasz organizm. LA jest ważnym składnikiem fosfolipidów błon komórkowych. Dzięki temu, że jest wbudowany w ceramidy cementu międzykomórkowego, które są swoistym uszczelniaczem skóry, LA zapewnia powstanie bariery nieprzepuszczającej cząsteczki wody przez skórę. Jedyną możliwością dostarczenia go do organizmu jest spożywanie w codziennej diecie. Jednak zmiany strukturalne w LA w wyniku działania zewnętrznych czynników fizycznych (takich jak podwyższona temperatura i promieniowanie ultrafioletowe UV) mogą oddziaływać na nasz organizm, zarówno na poziomie struktur komórkowych, jak i w funkcjonowaniu wszystkich komórek naszego organizmu [H. 8].
- 6) Spektroskopowe badania biomateriałów, np. polimerów wykorzystywanych w medycynie. Jedną z podstaw kwalifikacji biomateriałów jest określenie ich struktury, własności fizykochemicznych i oddziaływań z tkanką. Rodzaj materiału i jego struktura wpływają na reakcję komórkową z sąsiadującą tkanką w przypadku np. implantów. Szczególnym ważnym zagadnieniem praktycznym jest badanie procesów biodegradacji biomateriałów, które zachodzą m.in. na skutek utleniania. Potencjał spektroskopii ATR-IR do badania produktów utleniania został zaprezentowany na przykładzie lipidów osocza krwi zwierząt podczas procedury hemodializy [H. 5].



Badania tkanek i ich składników prowadzone są za pomocą wielu różnych technik pomiarowych, wśród których, ważne miejsce zajmują metody spektroskopowe monitorujące efekty oddziaływania promieniowania z materią na poziomie molekularnym.

Na szczególną uwagę zasługuje spektroskopia oscylacyjna (FTIR i Ramana). Jest ona szeroko stosowana w celu uzyskania informacji o strukturze badanych układów biologicznych w warunkach *in situ*, a także *in vivo*. Jest to metoda nieinwazyjna i nie powoduje uszkodzeń badanych materiałów.<sup>[1]</sup> Zmiany parametrów spektralnych na widmach układów biologicznych dostarczają cennych informacji o procesach zachodzących w tkankach na poziomie molekularnym [H. 1–8]. Spektroskopia oscylacyjna pozwala na identyfikację tkanek i ich komponentów, a także na badanie wzajemnych relacji pomiędzy nimi oraz zmian strukturalnych zachodzących na wskutek działania różnych czynników zewnętrznych.<sup>[2]</sup> Spektroskopię oscylacyjną można wykorzystać zarówno do analizy ilościowej, jak i jakościowej.<sup>[3]</sup> Metoda ta nadaje się do badań materiałów w różnym stanie skupienia. Kolejną zaletą tej techniki jest niewielka ilość wymaganej próbki, szybki proces rejestracji widm, oraz co najważniejsze, w przypadku próbek biologicznych, nie jest wymagana preparatyka tkanek. W zastosowaniach biologicznych i medycznych spektroskopia oscylacyjna ma tę zaletę, że widma zawierające dużą ilość informacji możemy otrzymać z nienaruszonej tkanki, a więc bez ingerencji w jej strukturę. Umożliwia to szczegółową analizę chemiczną złożonego materiału biologicznego oraz szybką diagnostykę wszystkich komponentów tkankowych jednocześnie. Metody spektroskopii oscylacyjnej są metodami nowoczesnymi, selektywnymi i relatywnie niedrogimi. Należy podkreślić, że procesy i mechanizmy, które badałam metodami spektroskopowymi można analizować również za pomocą metod chemicznych. Pomimo, że są to proste metody, posiadają one dłuższe procedury ze względu na wymaganą preparatykę, konieczną większą ilość substancji badanej, czy stosowanie dużych ilości odczynników chemicznych, które mogą mieć bezpośredni wpływ na budowę układów biologicznych, czy składników tkanek. Często są to techniki bardzo kosztowne oraz nieobojętne dla środowiska.

Inną zaletą spektroskopii oscylacyjnej jest czułość nawet na małe zmiany strukturalne. Dzięki temu możliwe są badania porównawcze między zdrową a chorobowo zmienioną

---

<sup>1</sup> Olsztyńska-Janus S., *Metoda osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia ATR*. W: Chemia fizyczna, tom 4, rozdział 7.8, Laboratorium fizykochemiczne, Red. L. Komorowski i A. Olszowski, PWN Warszawa, 2013, str. 214–217.

<sup>2</sup> Ogruc Ildiz G., *et al.*, Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 152, 2016, 551–556.

<sup>3</sup> Vibrational Spectroscopy in Diagnosis and Screening, Red. F. Severcan, P.I. Haris, IOS Press, Amsterdam, 2012.

tkanką. Dlatego obecnie techniki spektroskopii oscylacyjnej są z powodzeniem stosowane w diagnostyce klinicznej i badaniu procesów patologicznych, czy chorobowych.<sup>[4,5]</sup> Powszechna dostępność spektrometrów FTIR oraz duża ich uniwersalność sprawia, że spektroskopia oscylacyjna stanie się wkrótce rutynową metodą wykonywania analiz fizykochemicznych w badaniach biomedycznych. Należy jednak uważać na silną absorpcję wody, która utrudnia analizę w spektroskopii FTIR. Natomiast spektroskopia Ramana nadaje się do badania układów biologicznych ze względu na słabą absorpcję pochodzącą od wody oraz mniejsze szerokości pasm. Wadą tej metody jest mniejszy stosunek sygnału do szumu.

W niniejszym autoreferacie podsumowałam wyniki, które otrzymałam za pomocą dwóch metod spektroskopii oscylacyjnej, szczególnie nadających się do badania tkanek: spektroskopii ATR-IR oraz spektroskopii Ramana, które są metodami komplementarnymi.

---

<sup>4</sup> Travo A., *et al.*, Anal. Bioanal. Chem. 406, 2014, 2367–2376.

<sup>5</sup> Wan X., *et al.*, Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc. 122, 2014, 193–197.

#### 4.4. MOLEKULARNY MECHANIZM ODDZIAŁYWANIA PROMIENIOWANIA Z ZAKRESU NIR NA UKŁADY BIOLOGICZNE

##### 4.4.1. WSTĘP

Skuteczna inżynieria biomedyczna i medycyna wymagają znajomości dokładnej kontroli procesów zachodzących na poziomie komórkowym i subkomórkowym. W wyniku oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego z materią zachodzą procesy biorące swój początek na poziomie molekularnym. W efekcie może nastąpić zmiana właściwości fizykochemicznych cząsteczek, zmiana konformacyjna (wewnętrzna przemiana struktury) lub nawet ich rozpad. Może mieć to ważne konsekwencje biomedyczne prowadzące np. do biostymulacyjnych efektów terapeutycznych [H. 1, 2, 7].

Głównym celem moich badań było wyjaśnienie pierwotnego i wtórnego mechanizmu działania światła z zakresu bliskiej podczerwieni (NIR). W wielu ośrodkach badawczych na całym świecie prowadzone są obecnie badania nad wpływem promieniowania elektromagnetycznego z zakresu MIR i NIR na układy biologiczne. Promieniowanie NIR jest wykorzystywane zarówno w terapii, jak i diagnostyce medycznej.<sup>[6-9]</sup> Promieniowanie NIR nie wywołuje wyłącznie efektów termicznych (jak dotąd sądzono), ale prowadzi również do reakcji fotochemicznych. Badania wykonane przeze mnie wykazują jednak na fotochemiczny charakter działania światła z tego zakresu. Dowodem na taki mechanizm jest zależność od długości fali. Istotnym celem badań było również udowodnienie transferu protonu w układach biologicznych oraz występowania procesu modyfikacji struktury wody związanej i globalnej pod wpływem promieniowania z zakresu NIR. Należy podkreślić, że wcześniejsze badania wskazywały jedynie pośrednio na obecność tego procesu.<sup>[10-13]</sup> Promieniowanie z zakresu IR ma działanie przeciwbólowe i przeciwzapalne, przyspiesza gojenie się ran, leczy procesy zapalne, opóźnia procesy starzenia się skóry i wzmacnia układ odpornościowy [H. 1, 2, 7].

<sup>6</sup> Guedes G., *et al.*, *Adv Mater.* 33, 2021, e2007761.

<sup>7</sup> Okuyama S., *et al.*, *Oncotarget.* 8(68), 2017, 113194–113201.

<sup>8</sup> Johnstone D.M., *et al.*, *ChronoPhysiology & Therapy* 4, 2014, 1–14.

<sup>9</sup> Cidral-Filho F. J., *et al.*, *Lasers Med. Sci.* 29, 2014, 695–702.

<sup>10</sup> Chludzińska, *et al.*, *Blood Cells, Mol. Dis.* 35, 2005, 74–79.

<sup>11</sup> Komorowska M., *et al.*, *Colloids Surf B* 26, 2002, 223–233.

<sup>12</sup> Komorowska M., *et al.*, *Colloids Surf B* 20, 2001, 309–314.

<sup>13</sup> Komorowska M., *et al.*, *J Photochem Photobiol B* 68, 2002, 93–100.

Promieniowanie IR stosuje się, między innymi, w przewlekłych i podostrych procesach zapalnych i reumatycznych stawów oraz części miękkich kończyn, nerwobólach i zespołach bólowych, naciekach i ropniach tkanek miękkich, oraz innych procesach chorobowych.<sup>[14–19]</sup> Przykładem może być ochronny wpływ promieniowania o długości fali 670 nm (lasery półprzewodnikowe) po radioterapii w procedurze medycznej przeszczepu szpiku kostnego u dzieci. Na skutek chemioterapii lub naświetlań promieniowaniem X obserwuje się powikłania w postaci ciężkiego uszkodzenia błony śluzowej jamy ustnej i przewodu pokarmowego (*mucositis*). Badania wykazały, że po zastosowaniu takiej terapii zmienia się skład śliny: maleje stężenie i aktywność mieloperoksydazy, peroksydazy ślinowej i immunoglobuliny A, co prowadzi do zmniejszonej odporności na stany zapalne. Natomiast po ekspozycji na promieniowanie IR niepożądane efekty ulegają zmniejszeniu.<sup>[20]</sup> Z kolei ekspozycja na promieniowanie NIR indukuje nietermiczne uszkodzenia DNA w komórkach mitotycznych, co może mieć potencjalne zastosowanie w leczeniu nowotworów.<sup>[21]</sup> Promieniowanie z zakresu NIR modyfikuje również działanie enzymów transportu przez błony, a w tym działanie kanałów w błonach biologicznych, wzrost komórek, komunikacji komórek i systemu obronnego. Opisywana aktywność światła związana jest z modyfikacjami na poziomie genów zawiadujących tymi funkcjami komórki. *Karu i in.* wysunęli hipotezę roboczą przyjmującą, że za obserwowane efekty może być odpowiedzialna zmiana potencjałów oksydacyjno-redukcyjnych po obu stronach wewnętrznej błony mitochondrium.<sup>[22]</sup> Jednak jak na razie jest to niepotwierdzona hipoteza.

Promieniowanie o długości fal w zakresie 600–1200 nm jest absorbowane głównie przez takie składniki tkankowe, jak woda, glukoza, hemoglobina, lipidy, aminokwasy, białka, kwasy nukleinowe [H. 2]. Absorpcja w tym zakresie dotyczy nadtonów drgań rozciągających i pasm kombinacyjnych pochodzących od grup polarnych, takich jak –OH, –NH, –SH, czy –POH. Należy podkreślić, że oddziaływanie tego promieniowania na poziomie tkanek czy całego organizmu jest wynikiem reakcji na poziomie komórkowym i molekularnym. Dlatego tak ważne staje się badanie skutków promieniowania, w tym NIR, na poziomie molekularnym dla różnych układów biologicznych. Mimo zaawansowanych

<sup>14</sup> Suresh S., *et al.*, SRM J Res Dent Sci 6, 2015, 53–56.

<sup>15</sup> Dos Santos S.A., *Lasers Med Sci.* 29(3), 2014, 1051–1058.

<sup>16</sup> Chen Y.-J., *et al.*, PLoS One 9, 2014, e89894.

<sup>17</sup> Farivar S., *et al.*, J Lasers Med Sci 5(2), 2014, 58–62.

<sup>18</sup> Jung H.S., *et al.*, JACS 137, 2015, 3017–3023.

<sup>19</sup> Farivar S., *et al.*, J Lasers Med Sci 5(2), 2014, 58–62.

<sup>20</sup> Eells M.T.T., *et al.*, Mitochondrion 4, 2004, 559–567.

<sup>21</sup> Kujawa J., *et al.*, Photomed. Laser Surg. 22, 2004, 504–508.

<sup>22</sup> Karu TI, *et al.*, J Photochem Photobiol 81, 2005, 98–106.

badania laboratoryjnych i klinicznych, pierwotny mechanizm działania promieniowania z zakresu NIR nie jest do końca wyjaśniony.

Energia wiązań wodorowych, która jest w zakresie 12–120 kJ/mol,<sup>[23]</sup> a w białkach dochodzi nawet do 125,5 kJ/mol, jest porównywalna z energią promieniowania NIR (energia fotonów promieniowania NIR w zakresie 700–2000 nm wynosi 171–60 kJ/mol). Oznacza to, że promieniowanie z zakresu NIR może oddziaływać na wiązania wodorowe, w tym również na warstwy hydratacyjne wokół struktur biologicznych. Badania eksperymentalne wody i wodnych roztworów związków organicznych wskazują, że absorpcja fotonów z zakresu NIR (z wykorzystaniem światła laserowego) wpływa znacząco na wodę zwiększając stopień dysocjacji,<sup>[24–26]</sup> co w efekcie może wpływać na strukturę białek i ich funkcjonowanie. *Natzle i in.* zaobserwowali zwiększoną dysocjację wody poprzez jednofotonowe wzbudzenie nadtonów drgań wiązań O–H i O–D. Entalpia reakcji dysocjacji wody ma niską wartość ( $\Delta H_{283} = 60,7$  kJ/mol), a wydajność kwantowa wynosi mniej niż 0,01%. Wzbudzenie światłem laserowym powoduje przejściowy wzrost przewodnictwa roztworu na skutek wzrostu stężenia jonów hydroniowych i wodorotlenowych w roztworze. Wydajność kwantowa reakcji dysocjacji wzrasta wraz ze wzrostem energii fotonów. Okazuje się, że energia fotonów odpowiada drganiom wiązań wodorowych grup –OH. Badania w pracach *Natzle i in.*<sup>[24–26]</sup> wykazały, że fotochemiczny efekt wywołują tylko te cząsteczki wody, które tworzą wiązania wodorowe. Obecność substancji rozpuszczonych nie zmienia procesu dysocjacji wody; natomiast zmienia silnie czas relaksacji międzycząsteczkowej aktywowanych cząsteczek. Wzbudzenia elektronowe cząsteczek powodują zmianę w rozkładzie ładunku, a co za tym idzie wpływają na ich reaktywność. Natomiast absorpcja promieniowania NIR i wzbudzenia oscylacyjne mogą prowadzić do rozpadu wiązań wodorowych oraz wzrostu stężenia jonów hydroniowych i wodorotlenowych. W pracy *Natzle i in.*<sup>[24]</sup> wskazano, że wydajność kwantowa procesu dysocjacji jest funkcją długości fali promieniowania padającego, a obserwowany wzrost przewodnictwa wynika z reakcji wywołanej przez wzbudzenie oscylacyjne pojedynczym fotonem. Proces ten nie jest związany ze zmianą temperatury i nie ustaje bezpośrednio po zakończeniu naświetlania.

Z powyższego wynika, że modyfikacje struktury wody powinny prowadzić do zmian strukturalnych cząsteczek aminokwasów, białek i tkanek. Dlatego też w swoich badaniach

---

<sup>23</sup> Steiner T., Koellner G., *J Mol Biol*, 2001, 305, 535–557.

<sup>24</sup> Natzle W.C., Moore C.B., Goodall D.M., Frisch W., Holzwarth J.F., *J Phys Chem* 1981, 85, 2882–2884.

<sup>25</sup> Natzle W.C., Moore C.B., *J Phys Chem* 1985, 89, 2605–2612.

<sup>26</sup> Phillips G.R., Eyring E.M., *J Phys Chem* 1986, 90, 316–319.

skupiłam się na monitorowaniu zarówno modyfikacji struktury aminokwasów, białek i tkanek (skóry, osocza) wywołanych ekspozycją na promieniowanie NIR, jak i oddziaływań międzycząsteczkowych w obrębie badanych układów biologicznych.

Otrzymane przeze mnie wyniki sugerują, że po absorpcji promieniowania z zakresu NIR dochodzi do osłabienia lub nawet rozerwania wiązań wodorowych, co prowadzi do przeniesienia protonu. Pierwotnym fotoprocесem jest częściowa dehydratacja powierzchni struktur biologicznych (osłabienie oddziaływania pomiędzy cząsteczkami wody a cząsteczkami takimi jak aminokwasy czy białka) z zachodzącą jednocześnie protonacją grup polarnych np. karboksylowych. Z kolei protonacja może wywołać zmiany strukturalne na poziomie molekularnym (np. zmiany konformacyjne), co znacznie wpływa na przebieg procesów metabolicznych zachodzących w organizmach żywych. Stąd mogą wynikać efekty fizjologiczne w skali makro, jak szybsze procesy regeneracyjne, poprawa krążenia czy zmniejszenie procesów zapalnych i bólowych podczas fototerapii promieniowaniem NIR [H. 1, 2, 7].

Działanie promieniowania NIR badane jest metodą *ex-vivo*. *In vitro* badane są hodowle tkankowe, komórkowe lub wyizolowane komórki takie jak krew, leukocyty czy trombocyty. *In vivo* światło jest dozowane poprzez skórę albo poprzez światłowód wprowadzany bezpośrednio do naczyń krwionośnych. Z tego też względu istotnym zagadnieniem jest określenie zakresu spektralnego, jaki jest absorbowany przez skórę i co wydaje się najważniejsze, jak reagują składniki morfotyczne krwi na ten zakres promieniowania [H. 2]. Dlatego jednym z celów mojej pracy była analiza zmian różnych komponentów skóry zwierząt pod wpływem ekspozycji na promieniowanie NIR. Badałam również modyfikacje w składnikach krwi zwierząt poddanych zabiegowi medycznemu jakim jest hemodializa.

#### 4.4.2. METODOLOGIA BADAŃ

Początkowo, do badań wybrałam aminokwas L-fenylalaninę, który jako duża amfifilowa cząsteczka może stanowić prosty układ modelowy białka [H. 1]. Wiadomo jest, że struktura aminokwasów, białek oraz innych biomolekuł, ich biologiczna aktywność i oddziaływania wpływają na wiele procesów fizjologicznych, takich jak biosynteza białek,<sup>[27]</sup>

---

<sup>27</sup> Merrick W., *Microbiol. Rev.*, 1992, 56, 291–315.

replikacja DNA,<sup>[28]</sup> transdukcja sygnału,<sup>[29]</sup> czy transport molekularny.<sup>[30]</sup> Kolejnym krokiem było poszerzenie badań na bardziej złożone układy jak białka oraz tkanki [H. 2, 7].

Do badań zastosowałam specjalnie skonstruowany układ z filtrem szerokopasmowym przepuszczającym promieniowanie NIR z zakresu 700–2000 nm. Źródło światła stanowiła lampa halogenowa. Próbkki były naświetlane przez 15 minut promieniowaniem NIR, gdyż wstępne badania wykazały największą efektywność ekspozycji przy tym czasie naświetlania. Gęstość mocy promieniowania wynosiła 6,5 mW/cm<sup>2</sup>. W celu zabezpieczenia przed przegrzewaniem się próbek, wykorzystano system podwójnego chłodzenia płaszczem wodnym i strumieniem powietrza. W czasie ekspozycji na promieniowanie NIR próbka była mieszana w sposób ciągły w celu zapewnienia jednorodnych warunków podczas naświetlania.

Główną metodą badawczą była spektroskopia ATR-IR, jedna z najbardziej obiecujących technik do badań diagnostycznych na poziomie molekularnym, a jednocześnie pozwalająca wnioskować o procesach zachodzących w skali globalnej [H. 2,3, również H5–8]. Do badań wykorzystałam spektrometr FTIR Nicolet 6700 wraz z przystawką ATR z kryształem diamentowym [H. 2,3, 5–8] oraz spektrometr Ramana [H. 4] (przystawka ATR i mikroskop Ramanowski zostały zakupione w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 6180/IA/119/2012, główny wykonawca). Aby ułatwić interpretację wyników eksperymentalnych, wykonane zostały obliczenia teoretyczne za pomocą teorii funkcjonałów gęstości (DFT, ang. *Density Functional Theory*) struktury badanych układów modelowych [H. 1]. Ponadto zastosowałam zaawansowane metody analizy widm takie jak dwuwymiarowa spektroskopia korelacyjna i analiza korelacyjna metodą ruchomego okna [H. 8].

W celu uzyskania lepszego stosunku sygnału do szumu wykorzystywałam proces ich wygładzania przy użyciu algorytmu *Savitzky'ego-Golaya*.<sup>[31]</sup> Następnie stosując procedury dostępne w programie Microcal Origin (wer. 9.0) wykonywałam korekcję linii bazowej widm, obliczyłam widma pochodnych (I–IV rzędu) i wyznaczyłam dokładne położenia pasm. W kolejnym etapie obliczałam parametry spektralne: intensywność w maksimum absorpcji, absorbancję integralną, szerokość połówkowa.<sup>[32]</sup> Wstępne przygotowanie widm (włączając analizę głównych składowych, PCA, ang. *Principal Component Analysis*) do dwuwymiarowej

<sup>28</sup> Bell S., Dutta A., *Annu. Rev. Biochem.*, 2002, 71, 333–374.

<sup>29</sup> Csepányi-Komi R., *et al.*, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2012, 353, 10–20.

<sup>30</sup> Vale R., *Cell*, 2003, 112, 467–480.

<sup>31</sup> Savitzky A., Golay M.J.E., *Anal. Chem.* 1964, 36, 1627.

<sup>32</sup> Kęcki Z., *Podstawy spektroskopii molekularnej*, PWN, Warszawa, 1998.

spektroskopii korelacyjnej (2DCOS, ang. *Two Dimensional Correlation Spectroscopy*) i analizę metodą ruchomego okna przeprowadzono przy użyciu oprogramowania MATLAB (MathWorks, Inc., USA). Uogólnione widma 2DCOS obliczono zgodnie z algorytmem opracowanym przez *Nodę*,<sup>[33]</sup> natomiast analizę ruchomego okna przeprowadzono metodą zaproponowaną przez *Thomasa* i *Richardsona*.<sup>[34]</sup> Widma 2DCOS i ruchomego okna obliczono przy użyciu oprogramowania pracującego w środowisku Matlab, a jako widmo odniesienia zastosowano widmo uśrednione po czasie.<sup>[35]</sup>

Zastosowanie różnych technik badawczych oraz różnych metod analizy danych gwarantuje komplementarność uzyskanych wyników oraz pozwala na niezależne potwierdzenie zachodzących zmian w badanych układach modelowych.

#### 4.4.3. WPŁYW PROMIENIOWANIA NIR NA AMINOKWASY I BIAŁKA

W poszukiwaniu przyczyn procesu agregacji skupiłam się na zmianach struktury wody wokół układów biologicznych pod wpływem promieniowania z zakresu NIR. Zawartość wody i jej stan w otoczeniu głównych składników komórek powinny wpływać na przebieg procesów zachodzących na poziomie molekularnym. Woda wiąże się z cząsteczkami z powierzchni komórek (białka, aminokwasy, glikoproteiny) przy pomocy wiązań wodorowych, które absorbują promieniowanie NIR. W dalszej warstwie takie cząsteczki otoczone są przez wodę globalną.<sup>[36,37]</sup> Podczas procesu parowania wody z roztworu L-feniloalaniny następuje wzrost stężenia aminokwasu w roztworze. W moich badaniach dodatkowo zaobserwowałam nowe pasmo, które najprawdopodobniej wskazywało na obecność formy dimerycznej aminokwasu.<sup>[38]</sup>

W celu potwierdzenia procesu dimeryzacji, jak i określenia rodzaju dimerów w cząsteczce aminokwasu wykorzystałam symulacje teoretyczne opisywanego zjawiska we współpracy z prof. Józefem Lipińskim<sup>†</sup> z Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej [H. 1]. W literaturze można znaleźć propozycje różnych metod obliczeniowych do badania

<sup>33</sup> Noda I., *Appl. Spectrosc.* 47 (1993) 1329–1336.

<sup>34</sup> Thomas M., Richardson H., *Vib. Spectrosc.* 24 (2000) 137–146.

<sup>35</sup> Czarniecki M.A., *Appl. Spectrosc.* 52 (1998) 1583–1590.

<sup>36</sup> Ignatov I., Mosin O., *J. Med. Phys. Biophys.* 19, 2015, 47–65.

<sup>37</sup> Bagchi B., *Water in Biological and Chemical Processes From Structure and Dynamics to Function*, Cambridge University Press, Cambridge, 2014.

<sup>38</sup> Olsztyńska-Janus S., Dupuy N., Vrielynck L., Komorowska M., *Appl. Spectrosc.* 60(9), 2006, 1040–1053.



struktury układów biologicznych.<sup>[39–41]</sup> W swoich badaniach wykorzystałam metody mechaniki kwantowej B3LYP (ang. *Becke, 3-parameter, Lee–Yang–Parr*) [H. 1] i MP3 (ang. *second-order many-body perturbation theory*).<sup>[42]</sup> Optymalizację geometrii monomeru i dimeru aminokwasu przeprowadzono za pomocą teorii funkcjonału gęstości (DFT), z bazą B3LYP/6-31G\* przy pomocy programu Gaussian 03.<sup>[43]</sup> Dalsza optymalizacja geometrii i wyznaczenie częstotliwości oscylacyjnych została przeprowadzona przy użyciu baz 6-31G\*, 6-311+G\* oraz 6-311+G\*\*. Obliczono względne energie i momenty dipolowe wszystkich możliwych konformerów L-feniloalaniny [H. 1].

Obliczenia teoretyczne pozwoliły zaproponować możliwy mechanizm tworzenia dimerów na przykładzie cząsteczki feniloalaniny (Rys. 1) [H. 1]. Dwie identyczne cząsteczki aminokwasu tworzą wiązanie wodorowe typu  $-C=O\cdots HOOC-$ , dając w konsekwencji cykliczne dimery podobne do tych, jakie tworzą kwasy karboksylowe.<sup>[44]</sup> Tworzenie peptydowych wiązań wodorowych  $C=O\cdots N-H$  jest mniej korzystne energetycznie niż tworzenie międzycząsteczkowych wiązań wodorowych w cyklicznych dimerach. Taka cykliczna struktura wykazuje dużą stabilność termodynamiczną. Aby jednak proces agregacji miał miejsce, cząsteczka aminokwasu musi osiągnąć sprzyjającą temu procesowi geometrię. To właśnie zmiana geometrii cząsteczki zachodzi pod wpływem promieniowania NIR jako bezpośredni efekt absorpcji fotonu, co sugerowałam już we wcześniejszych pracach.<sup>[45,46]</sup>

---

<sup>39</sup> Jáklí I, *et al.*, Quantum Chemical Calculations on Small Protein Models, Ed. G. Náray-Szabó, in: Protein Modelling, Springer, Switzerland, 2014.

<sup>40</sup> Karmakar T., Balasubramanian S., Chem. Phys. Lett. 613, 2014, 5–9.

<sup>41</sup> Migovich M. I., Kel'man V. A., Optics Spectrosc. 117, 2014, 194–200.

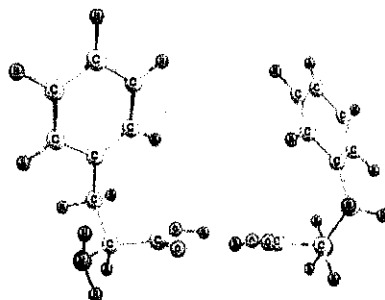
<sup>42</sup> Olsztyńska-Janus S., Szymborska K., Komorowska M., Lipiński J, Acta Bioeng. Biomech. 10(3), 2008, 45–49.

<sup>43</sup> Gaussian 03, Revision C.02, M. J. Frisch, *et al.*, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.

<sup>44</sup> C. Emmeluth, M.A. Suhm, Phys. Chem. Chem. Phys. 5, 2003, 3094–3099.

<sup>45</sup> Olsztyńska S., *et al.*, Acta Bioeng. Biomech., 3, Suppl. 2, 2001, 387–391.

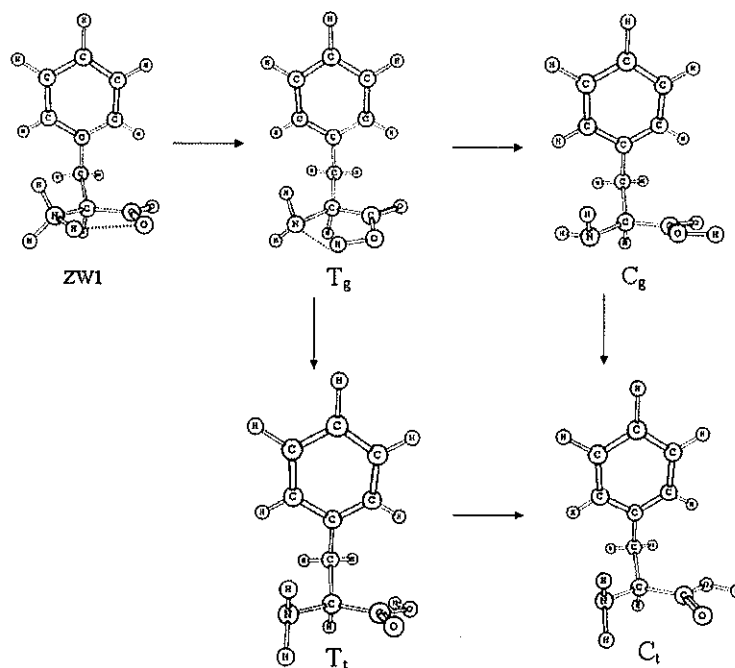
<sup>46</sup> Olsztyńska S., *et al.*, Acta Bioeng. Biomech., 1, 1999, 129–133.



Rys. 1. Struktura cyklicznego dimeru fenyloalaniny (oznaczenia:  $\circ$  atomy C,  $\bullet$  atomy H,  $\circ$  atomy O,  $\circ$  atomy N).

Zanim utworzone zostaną dimery musi zatem dojść najprawdopodobniej do zmiany konformacji aminokwasu na skutek wewnątrzcząsteczkowego transferu protonu. Należy podkreślić, że przeniesienie protonu nie zachodzi spontanicznie; konieczny jest czynnik zewnętrzny (w tym przypadku promieniowanie NIR), aby mógł zajść ten proces. Na skutek przeniesienia protonu w roztworze wodnym aminokwasu z formy jonu obojnaczego powstaje forma obojętna, która posiada wyższą energię. Zmieniają się parametry geometryczne (długości wiązań  $O\cdots H$  i  $N\cdots H$ ) oraz ich miejsca wiążące prowadząc do utworzenia nowych konformerów. Bazując na wynikach teoretycznych obliczeń udowodniono, że możliwa jest fotoindukowana izomeryzacja *trans/cis* aminokwasu (dochodzi do rotacji wokół wiązania  $-O$ , Rys. 2). Forma *trans* jest energetycznie bardziej korzystna niż forma *cis*. Jednakże, na skutek entropowego efektu asocjacji, forma *cis* będzie dominująca w roztworze wodnym i, w rezultacie utworzy dwa mostki wodorowe pomiędzy cząsteczkami aminokwasu, prowadząc do utworzenia nowej, stabilnej konfiguracji. Asocjacja fenyloalaniny zachodzi łatwiej niż w przypadku innych aminokwasów bez pierścieni aromatycznych. Może to wynikać z dodatkowych oddziaływań typu  $\pi\cdots\pi$  pomiędzy pierścieniami aromatycznymi fenyloalaniny, które sprzyjają procesowi dimeryzacji [H. 1]. Badania eksperymentalne potwierdzają, że oddziaływania hydrofobowe mogą ułatwiać procesy agregacji.<sup>[47]</sup>

<sup>47</sup> D. Troitino, L. Bailey, F. Peral, J. Mol. Struct.(Theochem) 767, 2006, 131–138.



Rys. 2. Sugerowany mechanizm izomeryzacji aminokwasów na przykładzie cząsteczki fenylalaniny pod wpływem promieniowania bliskiej podczerwieni (ZW1 – forma jonu obojnego,  $T_g$  – forma *trans gauche*,  $T_t$  – forma *trans trans*,  $C_g$  – forma *cis gauche*,  $C_t$  – forma *cis trans* aminokwasu) [H. 1].

W wyniku procesu agregacji dochodzi do przesunięcia wartości  $pK_a$  aminokwasu, co zostało zbadane za pomocą spektroskopii ATR-IR.<sup>[48]</sup> Na efekt ten może wpływać obecność grup hydrofobowych aminokwasów i białek. Wzrost znaczenia oddziaływań hydrofobowych po naświetlaniu promieniowaniem NIR sprzyja procesom agregacji w układach biologicznych, co może prowadzić do zmian w funkcjonowaniu białek, enzymów i przebiegu procesów metabolicznych. Cząsteczki białek (nawet tkanki) pełnią rolę czujników wychwytyjących modyfikacje strukturalne w obrębie wody otaczającej układy biologiczne. Zmiany w strukturze wody pociągają za sobą modyfikacje sąsiadujących cząsteczek. Wyniki te zostały potwierdzone badaniami na innych aminokwasach, białkach i skórze [H. 2, H. 7].

Moje dalsze badania wykazały, że promieniowanie NIR silnie modyfikuje zarówno inne aminokwasy (glicyna i alanina), jak i białka. Jak się okazało, promieniowanie NIR powoduje zmiany uwodnienia aminokwasów. Zaobserwowałam obecność obojętnych elektrycznie cząsteczek, co zostało potwierdzone pojawieniem się nowych pasm w widmie IR. Brak ładunku może indukować powstawanie silnych oddziaływań pomiędzy grupami  $-COOH$  i  $-COO^-$ , co w konsekwencji prowadzi do agregacji tych cząsteczek. Tworzące się

<sup>48</sup> Olsztyńska-Janus S., Komorowska M., Dupuy N., Appl. Spectrosc. 60(6), 2006, 648–652.

agregaty są bardzo trwałe i nie ulegają rozpadowi nawet w stosunkowo wysokich temperaturach [H. 2]. Obecności aminokwasów o różnym ładunku ułatwia oddziaływanie międzycząsteczkowe, a w tych warunkach mogą powstawać dimery. Wydaje się, że mechanizm agregacji jest związany z neutralizacją cząsteczek aminokwasów [H. 2].

Badalam również wpływ temperatury na strukturę w/w aminokwasów przed i po ekspozycji na promieniowanie NIR. Obserwacja zmian parametrów spektralnych pasm absorpcyjnych na widmach aminokwasów w funkcji temperatury pozwoliła na rozdzielenie strukturalnych efektów działania światła od efektów temperaturowych. Porównanie przeprowadzonych badań i opisanych w literaturze efektów temperaturowych wskazuje na odmienny mechanizm działania promieniowania NIR w porównaniu z wpływem temperatury. Zatem promieniowanie NIR musi wywoływać efekty fotobiologiczne, a nie tylko ciepłne. Wstępne wyniki zostały przedstawione na konferencji w postaci dwóch referatów.<sup>[49,50]</sup> Dodatkowo, zbadałam wpływ długości fal promieniowania NIR na strukturę glicyny w wodzie. Wykazałam, że długości fal aktywnych (długości fal, przy których występują pasma kombinacyjne pochodzące od absorpcji wody) w przypadku tego aminokwasu pokrywają się z długościami fal odpowiadającym drganiom wiązań wodorowych z udziałem wody. Widmo absorpcyjne wody w bliskiej podczerwieni miało podobny charakter do widma promieniowania NIR roztworu glicyny (Rys. 3), co potwierdzałoby zaproponowany mechanizm. Zatem można wnioskować, że pierwszymi absorberami promieniowania NIR są cząsteczki wody [H. 1, H. 2]. Najbardziej aktywne długości fal to: 750, 800, 950, 1000 i 1075 nm. Literatura potwierdza, że przy długościach fal 750 i 800 nm zlokalizowano pasma drgań grup polarnych –OH i –NH,<sup>[51,52]</sup> okolice 950 nm odpowiadają drganiom grup –OH,<sup>[51]</sup> natomiast 1000 nm to długość fal charakterystyczna dla drgań –NH.<sup>[52]</sup>

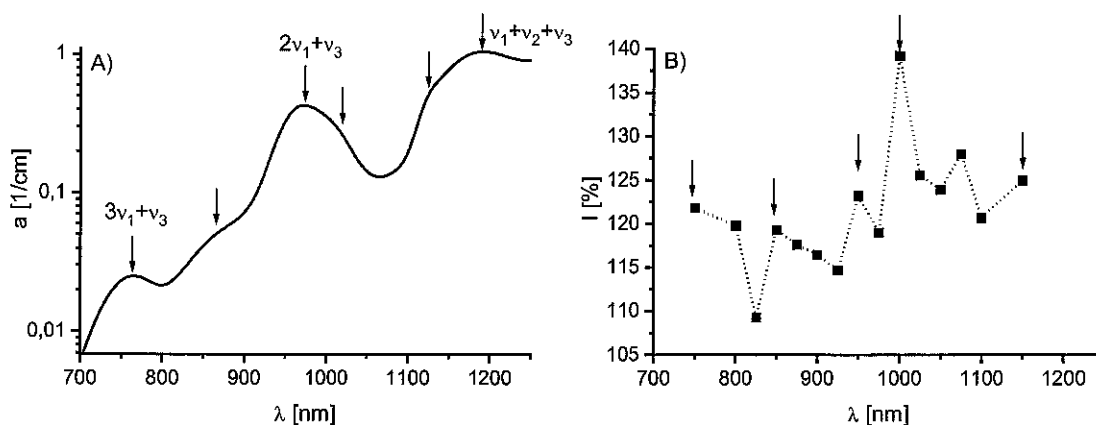
---

<sup>49</sup> Kośnik A., Nowosiad A., Olsztyńska-Janus S., Komorowska M.: *Wpływ promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni i temperatury na struktury prostych aminokwasów – badania spektroskopią ATR*. W: Człowiek-cywilizacja-przyszłość... T. 2, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2009, str. 253–258.

<sup>50</sup> Nowosiad A., Kośnik A., Olsztyńska-Janus S., Komorowska M.: *Zmiany struktury wody pod wpływem promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni i temperatury – badania spektroskopią ATR-FTIR*. W: Człowiek-cywilizacja-przyszłość... T. 2, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2009, str. 247–252.

<sup>51</sup> Kjaergaard H. G., Howard D. L., J. Phys. Chem. A 106, 2002, 258–266.

<sup>52</sup> John U., Nair K.P.R., Spectrochim. Acta Part A 63, 2006, 169–173.



Rys. 3. A) Porównanie widma absorpcyjnego wody w stanie ciekłym oraz widma promieniowania NIR roztworu glicyny (B) (a – absorbancja, I – względny wzrost absorbancji liczony względem próbki nienaświetlanej.

Na rysunku zaznaczono strzałkami długości fal wywołujące największą efektywność działania promieniowania NIR [H. 2].

Badania pokazały, że promieniowanie NIR ma nieco inny wpływ na białka niż na aminokwasy. W przypadku białka absorberami promieniowania są przede wszystkim struktury wody związanej z jego powierzchnią. Woda tworzy z powierzchnią białka wiązania wodorowe, formując pierwszą, drugą i trzecią warstwę hydratacyjną.<sup>[53]</sup> Jeśli naświetlaniu poddany zostanie wodny roztwór białka, to zostanie ono pozbawione (przynajmniej częściowo) warstwy hydratacyjnej. Na skutek wzmożonego przeniesienia protonu (jonów  $H^+$ ) między białkiem a cząsteczkami wody, zmiana ulega przestrzenny rozkład ładunków cząsteczki białka, a w konsekwencji jego struktura. Białko zmienia swoje właściwości fizykochemiczne. Usunięcie wody z powierzchni białka powoduje jego denaturację, co zostało zaobserwowane na przykładowych białkach krwi: albuminie i fibrynogenie. Wiązania wodorowe tworzące struktury wody związanej z powierzchnią białka są tworami bardzo dynamicznymi. Wiązania te nie ulegają całkowitemu rozpadowi, zmienia się tylko ich czas życia. W konsekwencji polarne grupy funkcyjne uzyskują swobodę i mogą zmieniać silnie swoją geometrię, tworząc pary jonowe lub ulegać protonacji. W końcowym efekcie białko może całkowicie zmienić swoją strukturę i utworzyć duże agregaty, podobnie jak ma to miejsce w przypadku aminokwasów. Trwałe agregaty powstają dzięki oddziaływaniom międzycząsteczkowym, które stabilizują cząsteczki badanych struktur biologicznych.

<sup>53</sup> Bhattacharjee N., Biswas P., Biophys. Chem. 158, 2011, 73–80.

Odtwarzająca się struktura wody wokół tych agregatów może także być czynnikiem stabilizującym [H. 2].

#### 4.4.4. PROCESY PIERWOTNE WYWOŁANE DZIAŁANIEM PROMIENIOWANIA NIR

Moje dotychczasowe badania sugerują, że pierwotnym efektem działania promieniowania NIR na obiekty biologiczne (począwszy od pojedynczych cząsteczek, a skończywszy na całych tkankach) jest modyfikacja struktur otaczających je cząsteczek wody. Tę hipotezę potwierdzają wcześniejsze badania, zarówno na całych komórkach (erytrocyty, liposomy), jak i pojedynczych cząsteczkach lub makrocząsteczkach, dlatego też uważa się, że proces ten zachodzi w każdym ośrodku biologicznym. Pierwotna modyfikacja struktur tworzonych przez cząsteczki wody może prowadzić do protonacji i w konsekwencji do procesów wtórnych: agregacji i zmian konformacyjnych. Efekty te mogą wywoływać odpowiedź fizjologiczną organizmów żywych. Przykładowo, aktywność wody może odgrywać ważną rolę w kinetycznym mechanizmie regulacji allosterycznej białek, w przejściu oksyhemoglobiny w formę deoksy, w wewnątrzcząsteczkowym transferze protonu oraz w reakcji izomeryzacji, co potwierdzają także moje badania eksperymentalne i teoretyczne [H. 1, H. 2, H. 7]. Dodatkowo, obserwowane efekty działania promieniowania NIR na materię wykazują silną zależność od dawki i spełniają bez wyjątku prawo Arndta-Schultza.<sup>[54]</sup> Oznacza to, że istnieje optymalna dawka promieniowania wywołująca największe efekty w materii.<sup>[55]</sup> Dawki mniejsze lub większe od optymalnej albo słabo oddziałują, albo hamują indukowane procesy. Zarówno proste cząsteczki, makrocząsteczki, jak i tkanki są czułe na procesy wywołane modyfikacjami w obrębie wody otaczającej układy biologiczne. Wszystkie inne efekty, jakie zachodzą po ekspozycji na promieniowanie NIR są procesami wtórnymi, co wykazałam w moich pracach [H. 1, H. 2, H. 7]. Należy podkreślić, że materiał biologiczny naświetlany promieniowaniem IR/NIR nie ulega uszkodzeniu, w przeciwieństwie do działania promieniowania UV, które ma znacznie wyższą energię. Jest to istotne z punktu widzenia badań medycznych, np. w dermatologii.

Podsumowując, wyniki moich badań [H. 1, H. 2, H. 7] wyraźnie pokazują, że promieniowanie z zakresu NIR rzeczywiście może być efektywne w światłoterapii lub diagnostyce medycznej. Możliwe staje się monitorowanie procesów w układach biologicznych za pomocą metod spektroskopowych, a zwłaszcza spektroskopii

<sup>54</sup> Straburzyński G, Straburzyńska-Lupa A., *Fizjoterapia*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2004.

<sup>55</sup> Komorowska M., Olsztyńska-Janus S., Szymborska-Matek K., *Wykorzystanie oddziaływania światła w bliskiej podczerwieni na struktury biologiczne*. Rozdział 15, W: Optyka Biomedyczna. Wybrane zagadnienia, Red.: H. Podbielska, Wydawnictwo Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2011, 375–386.

w podczerwieni. Zmiany indukowane promieniowaniem NIR mogą odgrywać istotną rolę w wielu procesach zachodzących na poziomie molekularnym, takich jak: transport hydrofilowych i hydrofobowych środków farmaceutycznych (leków) przez liposomy, oddziaływanie tych układów z komórkami nowotworowymi, procesy metaboliczne – wpływ na aktywność enzymów (np. lecytynaz), kondensacja aminokwasów itd. Dlatego też procesy indukowane przez ekspozycję na promieniowanie NIR mogą prowadzić do poważnych konsekwencji, zarówno w medycynie, jak i w inżynierii biomedycznej, gdzie promieniowanie NIR jest stosowane.

#### **4.5. BADANIE TKANEK MIĘKKICH ZA POMOCĄ SPEKTROSKOPII OSCYLACYJNEJ – PRACE PRZEGLĄDOWE**

Badania będące przedmiotem dwóch artykułów zawierających zbiór prac przeprowadzone zostały na przykładowych tkankach, typu: ścięgna, naczynia krwionośne, skóra, erytrocyty i ich cienie oraz na składnikach biologicznych, takich jak: osocze, białka, (np. albumina, hemoglobina), aminokwasy, DNA i depozyty wapnia. Do badań wykorzystano spektroskopię ATR-IR [H. 3] oraz spektroskopię Ramana [H. 4].

#### **Spektroskopia w podczerwieni**

W pracy [H. 3] przedstawiłam przykładowe widma aminokwasów o różnej polarności (glicyny, alaniny, fenyloalaniny), przykładowych komponentów krwi (osocza, erytrocytów) wraz z proponowanymi przypisaniami pasm, które są niezbędne do analizy widm badanych układów. Badania koncentrowały się na analizie procesów zachodzących w aminokwasach podczas zmian protonacji oraz procesów agregacji. Proces agregacji dotyczy zarówno małych cząsteczek (aminokwasów), jak i makrocząsteczek (białek). Cząsteczki poszukując najbardziej stabilnego stanu konformacyjnego przechodzą przez ograniczony podzbiór możliwych stanów, co potwierdza literatura.<sup>[56]</sup> Proces agregacji charakteryzuje się obecnością stanów pośrednich. Trwale zagregowane formy powstają dzięki oddziaływaniom międzycząsteczkowym, które stabilizują poszczególne cząsteczki białka. Oddziaływania te występują pomiędzy częściowo zwiniętymi konformacjami białka.

---

<sup>56</sup> Harris J.R., Milton N.G.N. *Introduction and Technical Survey: Protein Aggregation and Fibrillogenesis*, W: *Protein Aggregation and Fibrillogenesis in Cerebral and Systemic Amyloid Disease*, Ed.: Harris J.R., *Subcellular Biochemistry* 65, 2012, 3–25.

Moje badania wykazały, że zmiany zawartości wody (tj. odwodnienie) mogą spowodować zmiany strukturalne cząsteczek aminokwasów i białek. Prowadzi to do zmiany otoczenia ich grup polarnych i hydrofobowych, a w konsekwencji do zmian w intensywności i położenia pasm w widmie IR. Zmiany protonacji cząsteczek umożliwiają ich modyfikacje konformacyjne, co może, w konsekwencji, prowadzić do procesu agregacji. Podczas procesu agregacji po ekspozycji na promieniowanie NIR na widmach ATR-IR pojawia się nowe pasmo w regionie 1680–1700  $\text{cm}^{-1}$  w przypadku aminokwasów i białek.

Kolejnym zagadnieniem omówionym w pracy [H. 3] jest badanie procesów denaturacji białek przy pomocy spektroskopii IR. Struktura białek może być zmieniona np. przez denaturanty czy stabilizatory obecne w roztworze, jak również przez zmiany temperatury, ciśnienia, pH czy siły jonowej. Struktura białek może zostać osłabiana lub wzmocniana, zależnie od rodzaju bodźca. Badanie tych zmian dostarcza informacji na temat roli rozpuszczalnika w utrzymaniu natywnej konformacji białka. Przeprowadzone badania nad procesami zachodzącymi w wyniku działania temperatury wykazują, że przemiana konformacyjna białek zachodzi w 3 etapach. Pierwszy z nich to początek zmian konformacyjnych, zachodzący od temperatury około 30°C do ok. 44°C. Potem następuje proces rozwijania łańcucha peptydowego i początek przemian związanych ze zjawiskiem agregacji. W konsekwencji procesy te prowadzą do stopniowego spadku intensywności pasma charakterystycznego dla  $\alpha$ -helisy przy ok. 1649–1651  $\text{cm}^{-1}$  na rzecz formowania się dwóch pasm, odpowiednio przy 1618–1620  $\text{cm}^{-1}$  (silne pasmo) i przy 1680–1690  $\text{cm}^{-1}$  (słabe pasmo) na widmach IR. Są to tzw. produkty agregacji, pochodzące od antyrównoległej struktury  $\beta$ . Struktury te są bardzo trwałe i nie ulegają rozpadowi nawet w stosunkowo wysokich temperaturach. Proces agregacji białek zachodzi w przedziale temperatur 44–54°C. Końcowym efektem podwyższania temperatury jest denaturacja, czyli nieodwracalne ścinanie białka w temperaturze 54–68°C, co potwierdzają doniesienia literaturowe.<sup>[57]</sup>

Zwróciłam także uwagę na konsekwencje procesów agregacji białek (zwłaszcza niekontrolowanej agregacji), które mogą mieć istotne znaczenie w medycynie. Prawidłowe funkcjonowanie białek jest bowiem konieczne dla poprawnego działania całego organizmu. Zaburzenia struktury przestrzennej białek mogą indukować procesy patologiczne. Akumulacja patologicznych białek może negatywnie wpływać na metabolizm tkanek i w konsekwencji prowadzić do wielu chorób. Zmiany w domenach lipidów i zmiany

---

<sup>57</sup> Yan Y.-B., *et al.*, *Biophys. J.* 86, 2004, 1682–1690.



konformacyjne białek mogą powstać również na skutek procesów utleniania wywołanych przez wolne rodniki w czasie rozwoju chorób, co jest zgodne z literaturą.<sup>[58]</sup>

Spektroskopia w podczerwieni (w tym również technika ATR) może być użyta do analizy płynów ustrojowych, także osocza i jego zawartości. Przykładowo rejestrowano widma FTIR składników osocza takich jak aminokwasy, kwasy tłuszczowe, albumina, fibrynogen, glukoza, gliceryna, mocznik, czy cholesterol. W widmie FTIR roztworu osocza można się spodziewać głównych pasm białkowych (amid I, amid II), które mogą być markerami modyfikacji konformacyjnych białek w osoczu, co potwierdza także literatura.<sup>[59]</sup>

W pracy [H. 3] opisałam również zastosowania biomedyczne spektroskopii ATR-IR, podając cele diagnostyczne i profilaktyczne. Podstawę medycyny klinicznej stanowi diagnostyka schorzeń, a współczesny rozwój medycyny stawia nowe wymagania w jej zakresie. Niezbędna jest właściwa klasyfikacja schorzenia (z uwzględnieniem podtypów jednostki chorobowej), ocena stopnia zaawansowania schorzenia, w przypadku choroby nowotworowej również rozpoznanie stopnia złośliwości nowotworu. Ponadto, istotnym jest monitorowanie postępów choroby i skuteczności stosowanej terapii. W tym celu konieczne jest stosowanie technik dających możliwość dotarcia do mikro- a nawet nanoobszarów tkanek, czy też umożliwiających poznanie struktury i własności pojedynczych molekuł. Informacja dostarczana przez „konwencjonalne” metody diagnostyki medycznej może niejednokrotnie okazać się niewystarczająca, co pociąga za sobą konieczność stosowania nowych metod badawczych. Współczesny rozwój technik, zwłaszcza fizycznych, otwiera nowe drogi poznawcze dla metod diagnostyki medycznej. Umożliwia dotarcie do informacji o składzie chemicznym tkanek i pojedynczych komórek, budowie molekularnej układów biologicznych, czego nie można było osiągnąć stosowanymi dotychczas metodami diagnostycznymi.

W pracy [H. 3] podkreśliłam, że spektroskopia jako specyficzna metoda analityczna może dostarczać szybko jednoznacznej informacji o składzie biochemicznym tkanek i komórek. Dodatkowe połączenie spektroskopii z mikroskopią stwarza możliwość monitorowania tkanek w mikroobszarach, a tym samym, pozwala na analizę biochemiczną na poziomie molekularnym. Analiza takich składników jak białka, lipidy, węglowodany i kwasy nukleinowe może pozwolić na szybką diagnostykę wielu chorób. Dokładność

---

<sup>58</sup> L. A. Pham-Huy, *et al.*, *Int. J. Biomed. Sci.* 4(2), 2008, 89–96.

<sup>59</sup> Barth A., *Biochim. Biophys Acta* 1767, 2007, 1073–1101.

pomiaru oraz wysoka powtarzalność sprawiają, że spektroskopia oscylacyjna może stać się idealnym nieinwazyjnym narzędziem w inżynierii biomedycznej.

Swoją wiedzę i doświadczenie zdobyte podczas wieloletnich badań tkanek i struktur biologicznych wykorzystałam do przygotowania rozdziałów poświęconych zastosowaniom spektroskopii oscylacyjnej do badania układów biologicznych w dwóch monografiach.<sup>[60,61]</sup>

#### **Spektroskopia Ramana [H. 4]**

W kolejnej pracy [H. 4] wykazałam, że spektroskopia Ramana posiada duży potencjał w badaniach materiałów biologicznych, w tym ludzkich tkanek. Technika ta dostarcza informacji o strukturze cząsteczek i oddziaływaniach na poziomie molekularnym dzięki czemu znajduje zastosowanie w medycynie, jako technika diagnostyczna. Uważa się, że spektroskopia Ramana jest metodą komplementarną do spektroskopii IR. Ze względu na odmienne reguły wyboru, na widmach Ramana lepiej widoczne są drgania niepolarnych fragmentów cząsteczki. Z tego też powodu, absorpcja od wody nie stanowi poważnego problemu w analizie widmowej, w przeciwieństwie do widm IR. Pasma na widmach Ramana mają zazwyczaj mniejsze szerokości niż pasma na widmach IR, co pozwala na lepszą separację różnych składników badanej próbki. Spektroskopia ramanowska pozwala na analizę zmian zachodzących w tkankach pod wpływem procesów chorobowych i czynników patologicznych. Technika ta jest uważana za nieinwazyjną i możliwe jest jej zastosowanie do pomiarów *in vivo*. Procesy chorobowe (np. łuszczyca, nowotwory) i procesy starzenia się powodują zmiany w strukturze biochemicznej tkanek, co znajduje swoje odzwierciedlenie na widmach ramanowskich, dlatego skóra jest jedną z częściej badanych tkanek. Rozpoznanie wielu schorzeń skóry, trudnych do zdiagnozowania jedynie na podstawie obrazu klinicznego, możliwe jest dzięki zastosowaniu spektroskopii oscylacyjnej. W procesach chorobowych można obserwować zmiany spektralne w obrębie pasm lipidów (np. wzrost intensywności pasma drgań lipidów lub zmiany stopnia uwodnienia), co potwierdzają także doniesienia literaturowe.<sup>[62,63]</sup>

---

<sup>60</sup> Olsztyńska-Janus S., *Metoda osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia ATR*. W: Chemia fizyczna, tom 4, rozdział 7.8, Laboratorium fizykochemiczne, Red.: L. Komorowski i A. Olszowski, PWN Warszawa, 2013, str. 214–217.

<sup>61</sup> Olsztyńska-Janus S., Komorowski L., *Widmo oscylacyjne*. W: Chemia fizyczna, tom 4, rozdział 17.8, Laboratorium fizykochemiczne, Red.: L. Komorowski i A. Olszowski, PWN Warszawa, 2013, str. 669–679.

<sup>62</sup> Gniadecka M., *et al.*, *J. Invest. Dermatol.* 122, 2004, 443–449.

<sup>63</sup> Gniadecka M., *et al.*, *J. Mol. Struct.* 661-662, 2003, 405–410.

Analiza zmian w parametrach spektralnych na widmach oscylacyjnych składników tkankowych pod wpływem różnych czynników fizycznych i chemicznych pozwoliła mi na opracowanie metody oznaczania stresu oksydacyjnego z osocza zwierzęcego w hemodializie oraz wyznaczania przejść fazowych w lipidach w skórze zwierzęcej wraz z obserwacją procesu denaturacji białek i zmian w uwodnieniu badanej tkanki, co opisałam w następujących podrozdziałach.

#### 4.5.1. OPRACOWANIE METODY OZNACZANIA STRESU OKSYDACYJNEGO W PROCESIE HEMODIALIZY [H. 5].

Podczas zabiegu hemodializy ze względu na kontakt krwi pacjenta z powierzchniami drenów i dializatora dochodzi do aktywacji układu immunologicznego<sup>[64]</sup> i wydzielania do osocza reaktywnych form tlenu (RFT)<sup>[65]</sup> przez aktywowane neutrofile i trombocyty.<sup>[66]</sup> Do najbardziej reaktywnych form tlenu występujących w układach biologicznych należą: anion ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru, rodnik hydroksylowy, tlen singletowy, czy kwas podchlorawy. Związki te mogą przedostawać się z komórek do przestrzeni pozakomórkowej i wówczas działają niszcząco na otaczające tkanki. Nagromadzenie się wolnych rodników prowadzi do destrukcji elementów strukturalnych i funkcjonalnych komórek, a nawet zaburzeń homeostazy.<sup>[67]</sup> W konsekwencji tych patologii dochodzi do pojawienia się w organizmie wielu procesów chorobowych (np. chorób układu krążenia, cukrzycy, chorób neurodegeneracyjnych, stanów zapalnych).<sup>[68,69]</sup>

Szczególnie narażone na działanie RFT są lipidy i białka zawarte w osoczu, ulegające peroksydacji.<sup>[64]</sup> Głównym produktem rozpadu lipidów, które uległy peroksydacji podczas zabiegu hemodializy jest dialdehyd malonowy (MDA).<sup>[70]</sup> Najpowszechniej stosowaną metodą wyznaczania stężenia MDA jest oznaczanie produktów jego reakcji z kwasem tiobarbiturowym (*thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS). W technice TBARS wykorzystuje się reakcję dialdehydu malonowego (MDA) z kwasem tiobarbiturowym (TBA), podczas której tworzy się barwny kompleks MDA-TBA absorbujący

<sup>64</sup> Halliwell B., Chirico S., *The American Journal of Clinical Nutrition* 57, 1993, 715–724.

<sup>65</sup> Vilen B. *et al.*, *Biophysical Chemistry* 152, 2010, 164–169.

<sup>66</sup> Klebanoff S., *Annals of Internal Medicine* 93, 1980, 480–489.

<sup>67</sup> Bartosz G., *Druga twarz tlenu: wolne rodniki w przyrodzie*, PWN, Warszawa 2009.

<sup>68</sup> Aruoma O.I., *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75, 1998, 199–212.

<sup>69</sup> Calabrese V., *et al.*, *Journal of the Neurological Sciences* 233, 2005, 145–162.

<sup>70</sup> Lucchi L., *et al.*, *Artificial Organs* 29, 2005, 832–837.

przy 530–535 nm.<sup>[71]</sup> Różnica absorbancji ( $A_{535}-A_{600}$ ) stanowi miarę zawartości TBARS w próbce. Technika TBARS charakteryzuje się niską specyficznością, jest to technika pośrednia badania produktów peroksydacji lipidów. Z TBA mogą reagować inne niż MDA związki, obecne w strukturach biologicznych, np. bilirubina, kwas sialowy, produkty degradacji cukrowców, aldehydy.<sup>[72]</sup> W hemodializie pomimo powstawania MDA w osoczu jego stężenie spada podczas zabiegu, ponieważ jest on usuwany z krwi w dializatorze. Uniemożliwia to zastosowanie metody oznaczania TBARS do badania ilości produktów peroksydacji lipidów osocza podczas hemodializy. Dlatego zaproponowaliśmy wykorzystanie spektroskopii ATR-IR w celu oznaczania stopnia utleniania lipidów zamiast metody TBARS [H. 5].

Eksperyment został wykonany w modelu zwierzęcym (owce), które były dializowane. Na przeprowadzenie eksperymentów uzyskano pozwolenie II Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach we Wrocławiu (nr 10/2013). Próbki krwi pobierane były od pięciu zdrowych klinicznie owiec płci męskiej (baranów rasy merynos polski) o masie ciała od 50 do 60 kg. Dojście naczyniowe uzyskano przez założenie stałego cewnika dwudrożnego French w premedykacji (ksylazyna dożylnie 0,2 mg/kg masy ciała) i nasiękowym znieczuleniu miejscowym (lidokaina 2%). Doświadczenia wykonano przy pomocy aparatu do hemodializy Fresenius 4008B. Zwierzęta poddawane były zabiegom hemodializy trwającym cztery godziny, trzy razy w tygodniu z użyciem dializatora polisulfonowego Fresenius F4HPS oraz standardowych linii krwi (AV-Set, Fresenius, Polska). W ramach tego eksperymentu przeprowadzono pięć zabiegów hemodializy. Podczas każdej hemodializy pobierano trzy próbki krwi w odstępach czasowych: 0 minut (natychmiast po rozpoczęciu zabiegu), po 15 minutach od rozpoczęcia zabiegu i tuż przed zakończeniem krążenia po 240 minutach. Czas poboru drugiej próbki został ustalony na podstawie literatury,<sup>[73]</sup> według której największe zmiany we krwi obserwowane są podczas pierwszych trzydziestu minut hemodializy. Ze względu na konieczność przetransportowania próbek krwi z miejsca pobrania do laboratorium, po pobraniu próbki krwi poddane były wirowaniu, po czym warstwa osocza była odseparowana do dalszych badań. Następnie wyznaczano zawartość TBARS w osoczu i wykonywano ekstrakcję lipidów osocza w celu rejestracji

---

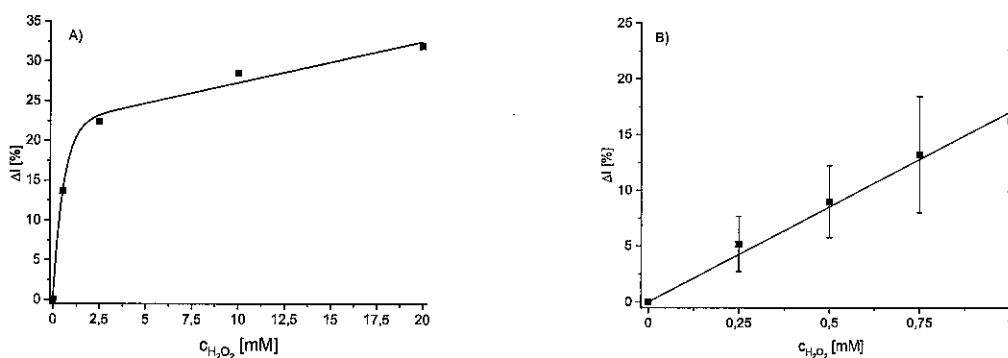
<sup>71</sup> Sinnhuber R., Yu T., *Journal of Food Science* 23, 1958, 626–634.

<sup>72</sup> Knight J., Pieper R., McClellan L., *Clinical Chemistry* 34, 1988, 2433–2438.

<sup>73</sup> Nockher W., *et al.*, *Clinical and Experimental Immunology*, 123, 2001, 49–55.

widm ATR-IR. Lipidy z osocza ekstrahowano metodą Folcha,<sup>[74]</sup> i tworzono zawiesinę, którą poddawano utlenianiu nadtlenkiem wodoru H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w różnych jego stężeniach.

W oparciu o wcześniejsze badania własne, jak i doniesienia literaturowe,<sup>[75]</sup> wybrano do analizy dwa pasma na widmach IR,  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$  przy 2954 cm<sup>-1</sup> i  $\nu(\text{C}=\text{O})$  przy 1737 cm<sup>-1</sup>, odpowiadające asymetrycznym drganiom rozciągającym grupy CH<sub>3</sub> i drganiom rozciągającym grupy C=O. Wraz ze zwiększającym się utlenianiem lipidów wzrasta absorbancja integralna pasma  $\nu(\text{C}=\text{O})$ . Obliczono stosunki absorbancji integralnej pasma  $\nu(\text{C}=\text{O})$  względem pasma  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$  w celu normalizacji wyników. Wyznaczono zależność stosunku absorbancji  $A_{1737}/A_{2954}$  w funkcji stężenia nadtlenku wodoru, która stanowiła krzywą kalibracyjną do drugiej części eksperymentów (Rys. 4A). W wyniku utleniania następuje liniowy wzrost absorbancji pasma  $\nu(\text{C}=\text{O})$  względem pasma  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$  w zakresie stężeń H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> od 0 do 1 mM (Rys. 4B).

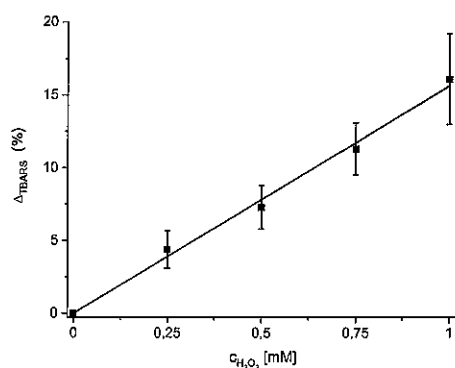


Rys. 4. Zależność stosunku absorbancji integralnej pasma  $\nu(\text{C}=\text{O})/\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$  od stężenia H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w zakresie stężeń od 0 do 20 mM (A) i 0 do 1 mM (B).

W drugiej serii eksperymentów badano stopień peroksydacji w procesie hemodializy. Podczas badań *in vitro* wyznaczono zależność pomiędzy zawartością produktów peroksydacji lipidów wyekstrahowanych z osocza, oznaczonymi metodami TBARS i FTIR-ATR, a ilością nadtlenku wodoru dodanego do próbki osocza. Wykazano silnie liniową zależność pomiędzy stosunkiem absorbancji pasm  $\nu(\text{C}=\text{O})/\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$  oraz stężeniem TBARS, a stężeniem nadtlenku wodoru (Rys. 5).

<sup>74</sup> Folch J., *et al.*, Journal of Biological Chemistry 226, 1957, 497–509.

<sup>75</sup> Kilk K., *et al.*, Free Radical Research 48, 2014, 883–889.



Rys. 5. Zależność zmian stężenia TBARS od stężenia  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Skuteczność proponowanej metody potwierdzono podczas oceny zmian stopnia peroksydacji lipidów osocza w trakcie zabiegu hemodializy owiec. Różnice pomiędzy poszczególnymi parametrami badano przy użyciu parametrycznego testu ANOVA. Jako próg istotności statystycznej przyjęto  $p < 0.05$ . Pomiar metodą ATR-IR wykazał wzrost peroksydacji lipidów osocza po 15 minutach zabiegu o 44% (przy wartości  $p = 0,008$ ), a po 240 minutach o 29% ( $p = 0,036$ ). Oznaczone w tym samym czasie stężenie TBARS było niższe od wartości wyjściowych odpowiednio o 15% ( $p = 0,074$ ) i 40% ( $p = 0,006$ ). Oznaczenie TBARS wykazało spadek ilości drugorzędowych produktów peroksydacji podczas hemodializy po 15 i 240 minutach na skutek oddializowywania MDA. Wyniki, które otrzymaliśmy za pomocą spektroskopii ATR-IR wykazały wzrost ilości produktów peroksydacji, co dowodzi obecności stresu oksydacyjnego podczas hemodializy. Ma to również związek z liczbą neutrofilów i monocytów we krwi, odpowiedzialnych za wydzielanie reaktywnych form tlenu. Wykazano, że największy spadek ich liczby związany z aktywacją i adhezją do dializatora ma miejsce w pierwszych 15 minutach dializy. Po tym czasie liczba komórek powoli wraca do wartości początkowej. Zatem najbardziej intensywne wydzielanie RFT i peroksydacja lipidów mają miejsce w pierwszych minutach hemodializy [H. 5].

Technika ATR-IR pozwoliła na bezpośrednie monitorowanie zmian zachodzących dla pasm pochodzących od drgań grup funkcyjnych lipidów związanych z powstawaniem pierwszorzędowych produktów utleniania. Dlatego zaproponowana metoda nadaje się do szybkiej diagnostyki [H. 5]. Jak pokazano, pasma drgań grup  $-\text{CH}_2$ ,  $-\text{CH}_3$  i  $\text{C}=\text{O}$  mogą być potencjalnymi markerami procesu utleniania lipidów, co może być przydatne w oznaczeniach klinicznych do badania efektów stresu oksydacyjnego w różnych stanach patologicznych lub chorobowych. Prowadzone badania miały charakter interdyscyplinarny i łączyły wiedzę

i umiejętności specjalistów z wielu dziedzin oraz wymagały współpracy z różnymi ośrodkami badawczymi. Badania były realizowane w ramach projektu Wrovasc, w Ośrodku Badawczo-Rozwojowym Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu. Zabiegi hemodializy przeprowadzono we współpracy z Katedrą Biostruktury i Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Praca powstała we współpracy z doktorantem mgr inż. Adamem Oleszko.

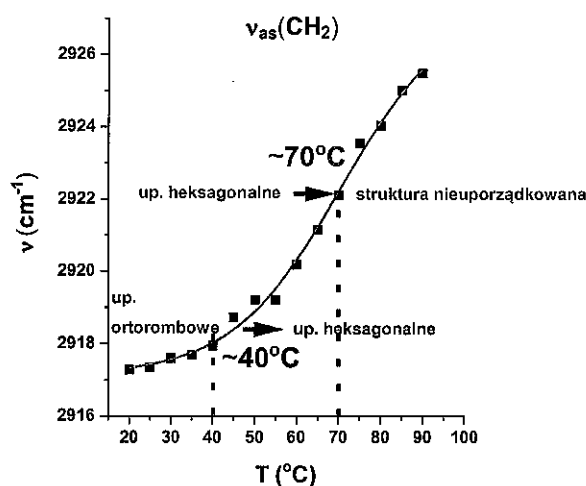
#### **4.5.2. OPRACOWANIE METODY WYZNACZANIA PRZEJŚĆ FAZOWYCH W SKÓRZE [H. 6, 7]**

Różne czynniki fizyczne i fizyko-chemiczne mogą mieć duży wpływ na tkanki, dlatego mogą być stosowane w inżynierii biomedycznej i terapii medycznej. Powszechnie wiadomo, że czynniki te mogą modyfikować funkcje komórek tkankowych, aby dynamicznie dostosowywać się do warunków środowiskowych. Jednak niektóre modyfikacje tkanek są stabilne i mogą prowadzić do nieodwracalnych procesów, które mają poważne konsekwencje dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Zakres tych zmian zależy od rodzaju czynnika modyfikującego oraz jego parametrów takich jak długości fali, gęstości promieniowania, czasu trwania bodźca i sposobu dawkowania. Skóra każdego dnia poddawana jest różnym czynnikom zewnętrznym, które negatywnie wpływają na jej stan. Do najpowszechniej spotykanych czynników należą zmiany klimatu, wahania temperatury, poziomu wilgotności oraz światło słoneczne.

Wiedząc, że ekspozycja na promieniowanie NIR pozytywnie wpływa na różne składniki krwi, wypróbowałam działanie tej metody naświetlania na inną tkankę, jaką jest skóra. Badania te przeprowadziłam we współpracy z prof. Mirosławem Czarneckim z Zespołu Chemometrii i Spektroskopii Stosowanej Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego oraz z prof. Zdzisławem Kiełbowiczem z Katedry i Kliniki Chirurgii, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Badania zostały wykonane za zgodą II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach, działającej przy Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu. Wypreparowane wycinki zdrowej skóry pochodzenia świńskiego (rasa polska biała zwisłoucha), po usunięciu owłosienia oraz nadmiaru tłuszczu pochodzącego z tkanki podskórnej, zostały zamrożone z dodatkiem krioprotektanta (gliceryny). Po odmrożeniu i wypłukaniu gliceryny, rejestrowano widma ATR-IR w funkcji temperatury (w zakresie 20–90°C) zarówno dla tkanki nienaświetlonej jak i poddanej naświetleniu promieniowaniem

z zakresu NIR. Źródłem promieniowania była lampa halogenowa z filtrem 700–2000 nm. Zmiany spektralne wywołane działaniem temperatury na skórę zwierzęcą monitorowałam za pomocą techniki ATR-IR z użyciem przystawki grzewczej GladiATR™ z kryształem diamentowym. Zmiana temperatury była czynnikiem, który umożliwił zbadanie mechanizmu przejść fazowych w lipidach, warunków denaturacji białek oraz modyfikacji struktury wody związanej z białkami [H. 6].

Pasma pochodzące od drgań  $\nu_s(\text{CH}_2)$  i  $\nu_{as}(\text{CH}_2)$  są wrażliwe na stopień uporządkowania lipidów.<sup>[76]</sup> Wzrost temperatury spowodował przesunięcie maksimów tych pasm w kierunku wyższych liczb falowych, odpowiednio o około  $4 \text{ cm}^{-1}$  i  $10 \text{ cm}^{-1}$ , z jednoczesnym spadkiem intensywności. Otrzymane zależności położenia pasm drgań grup  $\text{CH}_2$  w funkcji temperatury przybrały kształt krzywej sigmoidalnej (Rys. 6). Takie zachowanie grup metylenowych spowodowane było wzrostem nieuporządkowania lipidów i zaburzeniem struktury dwuwarstwy lipidowej, co w konsekwencji prowadzi do przejść fazowych.



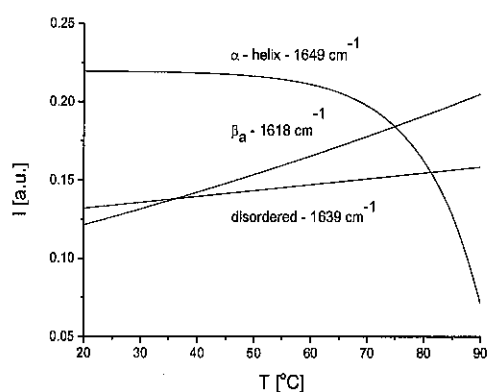
Rys. 6. Zmiana położenia pasma  $\nu_{as}(\text{CH}_2)$  pochodzącego od lipidów w funkcji temperatury. Na rysunku zaznaczono przejścia fazowe w lipidach. Oznaczenia: up – uporządkowanie lipidów. Na rysunku zaznaczono punkty pomiarowe oraz sigmoidalną linię aproksymacji.

Korzystając z zależności przedstawionej na rysunku 6, wyznaczyłam temperatury przejść fazowych dwiema metodami: metodą pierwszej pochodnej i metodą stycznych do funkcji. Do obliczeń wykorzystano intensywności pasm dla symetrycznych i asymetrycznych drgań rozciągających grup  $-\text{CH}_2$ . Średnia temperatura przejścia z fazy ortorombowej w heksagonalną mieściła się w granicach  $39,2\text{--}40,9^\circ\text{C}$ , zaś w przypadku przejścia od

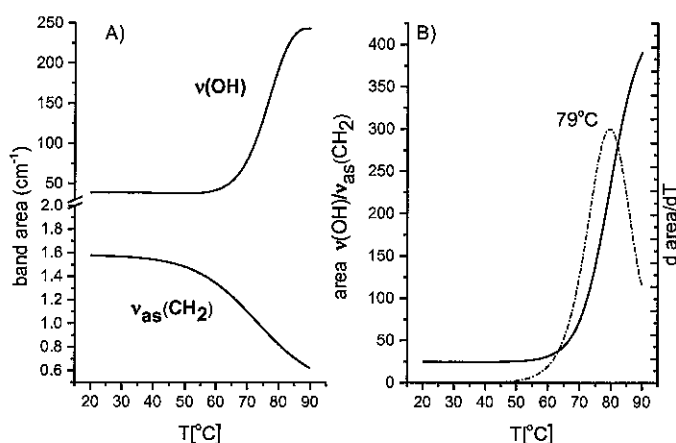
<sup>76</sup> R.N.A.H. Lewis, R.N. McElhane, *Biochimica et Biophysica Acta* 1828, 2013, 2347–2358.



struktury typu żel do fazy ciekłokrystalicznej wynosiła odpowiednio 69–69,2°C. Ponadto, analiza pasm amidowych pozwoliła na obserwację zmian strukturalnych w białkach takich jak przejście od struktury drugorzędowej  $\alpha$ -helisy do struktur  $\beta$  i kłębka statystycznego, w obecności których możliwa jest agregacja (Rys. 7). Procesom tym towarzyszy osłabienie wiązań wodorowych na skutek działania podwyższonej temperatury (Rys. 8) [H. 6]. Dotychczasowe badania koncentrowały się głównie na analizie wybranych regionów spektralnych odpowiadających absorbancji pojedynczych składników tkanki skórnej. W swoich badaniach analizowałam cały zakres spektralny, co umożliwiło na jednoczesne badanie przemian fazowych lipidów oraz modyfikacje struktury białek i cząsteczek wody z nimi związanych. Dlatego też badania te mogą stanowić ważny krok w kierunku lepszego zrozumienia zmian strukturalnych wszystkich składników tkanek na poziomie molekularnym oraz wzajemne korelacje pomiędzy tymi zmianami.



Rys. 7. Zmiany intensywności pasm odpowiadających różnym strukturom drugorzędowym białek w funkcji temperatury [H. 6].



Rys. 8. A) Zmiana pola powierzchni pasma niezwiązanych grup OH  $\{\nu(\text{OH})\}$  i  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$  w funkcji temperatury, B) Stosunek pola powierzchni pasm  $\nu(\text{OH})/\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$  – (linia ciągła) i pierwsza pochodna tego stosunku (linia kreska-kropka) w funkcji temperatury [H. 6].

Największe zmiany zachodzące pod wpływem działania samej temperatury zostały wykryte w obszarach absorpcji wody, białek i lipidów, czyli głównych składników tkanki. Wzrost temperatury wywołał dwufazowe przejścia w lipidach. Jednocześnie, pojawiły się przemiany konformacyjne w białkach prowadzące do postępującego procesu agregacji. Obserwowanym zmianom towarzyszył ubytek wody związanej z białkami. Przeprowadzone badania dostarczają nowych informacji na temat zmian w obrębie w/w komponentów skóry wraz ze wzrostem temperatury. Jednoczesne badania przemian fazowych lipidów oraz modyfikacji białek i struktur tworzonych przez cząsteczki wody pozwoliły na lepsze zrozumienie molekularnego mechanizmu termicznych zmian zachodzących w różnych składnikach tkanki skórnej.

Przeprowadziłam również badania wpływu temperatury na próbki skóry, które zostały poddane działaniu promieniowania NIR [H. 7]. Działanie obu czynników spowodowało szereg zmian w strukturze badanej próbki, co znalazło swoje odzwierciedlenie na widmach ATR-IR. W wyniku ekspozycji na promieniowanie NIR pasmo przy 3620 cm<sup>-1</sup>, odpowiadające drganiom rozciągającym wolnej lub słabo związanej grupy hydroksylowej pochodzącej od wody ( $\nu(\text{OH})^{\text{free}}$ ), ulega przesunięciu w kierunku wyższych liczb falowych o ok. 28 cm<sup>-1</sup> (z ang. *blue-shift*). Pasma drgań grupy OH zaangażowanej w wiązanie wodorowe przy 3499 i 3417 cm<sup>-1</sup> również przesuwają się w tym samym kierunku, odpowiednio o 15 i 13 cm<sup>-1</sup>. Wielkość tego przesunięcia jest odwrotnie proporcjonalna

do siły wiązania wodorowego.<sup>[77]</sup> Kierunek zmian położenia pasm drgań grup OH sugeruje osłabienie wiązań wodorowych pod wpływem ekspozycji na promieniowanie NIR a tym samym populacja cząsteczek wody słabiej związanej rośnie. Osłabionym oddziaływaniom białko-woda towarzyszy wzrost siły oddziaływań białko-białko, o czym może świadczyć przesunięcie pasma amidu A w kierunku niższych liczb falowych o  $3\text{ cm}^{-1}$ . Według *Doyle'a i in.* pasmo drgań rozciągających niezwiązanych grup N-H występuje w zakresie  $3400\text{--}3440\text{ cm}^{-1}$ , podczas pasmo grupy NH zaangażowanej w wiązanie wodorowe przesuwa się w kierunku niższych liczb falowych.<sup>[78]</sup> Obserwowane przesunięcie pasm amidowych (o  $19\text{ cm}^{-1}$ ) z drganiami NH potwierdza, że wiązania wodorowe ulegają osłabieniu. Pasma  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$  i  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$  przesuwiają się również w kierunku niższych liczb falowych, jednak przesunięcia te są bardzo małe. Można traktować to jako dowód na rozpoczynającą się częściową dehydratację, co potwierdzałyby wcześniejsze badania.<sup>[79]</sup> Osłabienie oddziaływań woda-białko wpływa na wzrost siły oddziaływań hydrofobowych, efektem czego jest wzrost intensywności pasma  $\delta(\text{CH}_3)$ .

Analizując wyznaczone temperatury przejść fazowych lipidów po ekspozycji na promieniowanie NIR można zauważyć, że średnia temperatura przejścia z fazy ortorombowej w heksagonalną, wyznaczona z intensywności pasm  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$  i  $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ , jest wyższa odpowiednio o  $5,1^\circ\text{C}$  i  $6,2^\circ\text{C}$  w stosunku do próbek nienaświetlonych. Wyższe temperatury przejść fazowych dla próbek naświetlanych wskazują na stabilniejsze uporządkowanie lipidów i ochronną rolę promieniowania NIR. Uzyskane wyniki wydają się być racjonalne, ponieważ aby zmienić konformację łańcuchów węglowodorowych z *trans* na *gauche*, należy stymulować układ wyższą energią. Otrzymane wyniki pokazują, że ekspozycja na promieniowanie NIR nie wpływa na temperaturę przejścia z fazy heksagonalnej do nieuporządkowanej. Należy zwrócić uwagę, że temperatury przemian fazowych próbek biologicznych poddanych promieniowaniu NIR zostały wyznaczone po raz pierwszy. W przypadku przejścia od struktury typu żel do fazy ciekłokrystalicznej nie zauważono znaczących zmian po ekspozycji na promieniowanie NIR. Dla próbek naświetlonych temperatura tego przejścia wzrosła jedynie o ok.  $0,5\text{--}1^\circ\text{C}$  i mieści się w granicach błędów pomiarowych [**H. 6**].

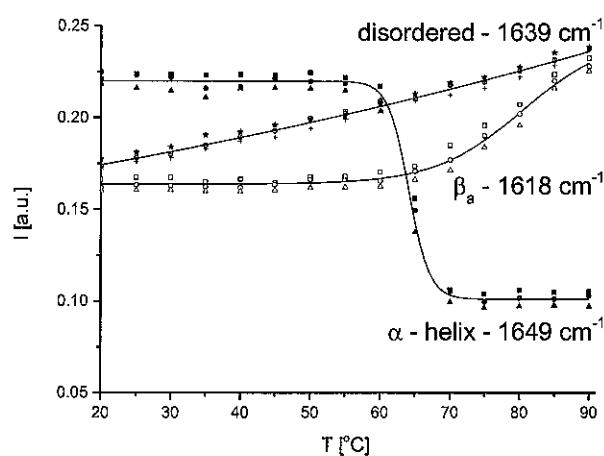
Wykonałam także analizę zmian drugorzędowych struktur w białkach skóry. Analiza pasma amidu I wykazała, że wraz ze wzrostem temperatury pozycje pasm przypisanych do

<sup>77</sup> Maréchal Y., J. Mol. Struct. 416 (1997) 133–143.

<sup>78</sup> Doyle B.B., et al., Biopolymers 14, 1975, 937–957

<sup>79</sup> Maeda Y., et al., Langmuir 17(24), 2001, 7535–7539.

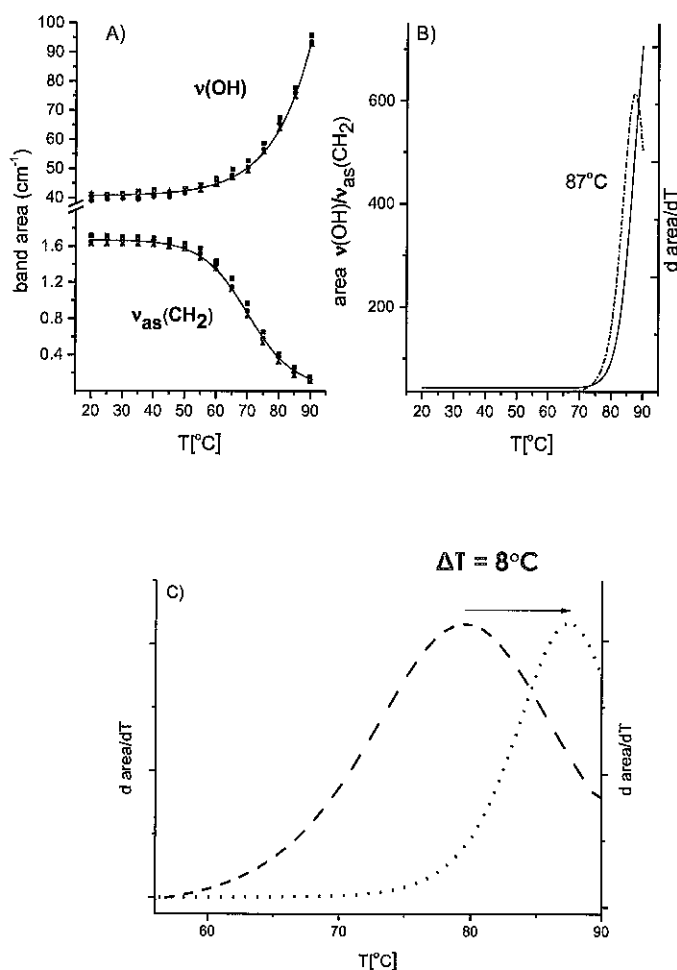
$\alpha$ -helisy i struktur nieuporządkowanych przesuwają się w kierunku niższych liczb falowych. Rosnąca temperatura prowadzi do powstania wiązań międzycząsteczkowych charakterystycznych dla antyrównoległych agregatów. Proces ten rozpoczyna denaturację białek. Rozwinięcie natywnej formy białek ( $\alpha$ -helisy) skutkuje utworzeniem antyrównoległych struktur  $\beta$ . Uzyskane wyniki sugerują, że pierwsze zmiany konformacyjne w strukturze białka zaczynają się powyżej 40 °C, a proces denaturacji jest kontynuowany do 52 °C. Dla skóry naświetlanej promieniowaniem NIR, struktura  $\alpha$ -helisy jest stabilna do 57 °C, a temperatura denaturacji przesuwa się w kierunku wyższych wartości (>60 °C) (Rys. 9) [H. 7].



Rys. 9. Zmiany intensywności pasm odpowiadających różnym strukturom drugorzędowym białek w funkcji temperatury dla naświetlonych próbek skóry [H. 7].

Zmiany parametrów pasm odpowiadających lipidom, białkom i wodzie sugerują destrukcyjny wpływ temperatury na warstwę rogową naskórka. Podwyższona temperatura osłabia oraz rozrywa wiązania wodorowe powodując zmniejszenie liczby cząsteczek wody oddziałujących z białkiem, co ma bezpośredni wpływ na oddziaływania hydrofobowe. Stosując promieniowanie NIR przed ogrzewaniem, obserwujemy proces częściowego odwodnienia próbki przy jednoczesnym wzroście siły oddziaływań hydrofobowych, które stabilizują strukturę różnych składników skóry. Efekt ten obserwowano również w poprzednich badaniach [H 2]. Ekspozycja skóry na promieniowanie NIR prowadzi do wzrostu temperatury przemian fazowych, przy których następuje denaturacja białek i rozpad wiązań wodorowych między wodą a środowiskiem polarnym (Rys. 10) [H. 7]. Po ekspozycji na promieniowanie NIR białka są bardziej odporne na denaturację termiczną i proces ten zachodzi w wyższej temperaturze (87 °C dla próbek naświetlanych)

w porównaniu z próbkami nienaświetlanymi (79 °C) (Rys. 10C) [H. 6], co sugeruje ochronne działanie promieniowania NIR na skórę [H. 7].



Rys. 10. Zależność pola powierzchni pasm  $v(\text{OH})$  i  $v_{\text{as}}(\text{CH}_2)$  w funkcji temperatury (uśredniona dla trzech serii eksperymentalnych) (A), stosunek powierzchni pasma  $v(\text{OH})/v_{\text{as}}(\text{CH}_2)$  (linia ciągła) i pierwsza pochodna tego stosunku (linia kreska-kropka) w funkcji temperatury (B). Porównanie pierwszych pochodnych stosunku  $v(\text{OH})/v_{\text{as}}(\text{CH}_2)$  przed (linia przerywana) i po (linia kropkowana) ekspozycji na promieniowanie NIR (C) [H. 7].

Badania oddziaływania temperatury i promieniowania NIR na skórę [H. 6,7] wskazują, że oba te czynniki mają istotny wpływ na przejścia fazowe lipidów, denaturację białek oraz modyfikację warstw hydratacyjnych. Wyniki otrzymane z badań na zwierzętach potwierdzają, że wstępna dehydratacja powierzchni *stratum corneum* na skutek ekspozycji na promieniowanie NIR wpływa na zmianę przejść fazowych w lipidach, co pociąga za sobą zmiany konformacyjne w drugorzędowych strukturach białek, przy czym stosunek ilości

białek do lipidów również ulega zmianie. Prawdopodobnie promieniowanie NIR działa ochronnie, podwyższając temperatury przejść fazowych, przy których dochodzi do zmian w obrębie w/w struktur [H. 7].

Inne wyniki spektroskopowych badań skóry (IR i Ramana) zostały opublikowane w pracach, które nie wchodzą w skład cyklu prac habilitacyjnych.<sup>[80,81]</sup>

#### 4.5.3. WPŁYW TEMPERATURY I PROMIENIOWANIA UV NA STRUKTURĘ KWASU LINOLOWEGO [H. 8]

Poszerzając swój warsztat badawczy, oprócz klasycznych metod analizy danych spektralnych, zastosowałam również dwuwymiarową analizę korelacyjną (2DCOS, z ang. *two-dimensional correlation spectroscopy*), analizę ruchomego okna (z ang. *moving window analysis*), oraz analizę głównych składowych (PCA, z ang. *Principal Component Analysis*) w celu pełniejszej eksploracji wielowymiarowych danych. Te zaawansowane metody analizy pozwalają na otrzymanie bardziej szczegółowych informacji z sygnału analitycznego, jaki stanowią widma oscylacyjne, i coraz częściej stają się narzędziem stosowanym do badań biomedycznych. Wyniki otrzymane przeze mnie ukazują duży potencjał spektroskopii 2DCOS i metod chemometrycznych do skutecznej, skринingowej oceny próbek pochodzenia biologicznego [H. 8].

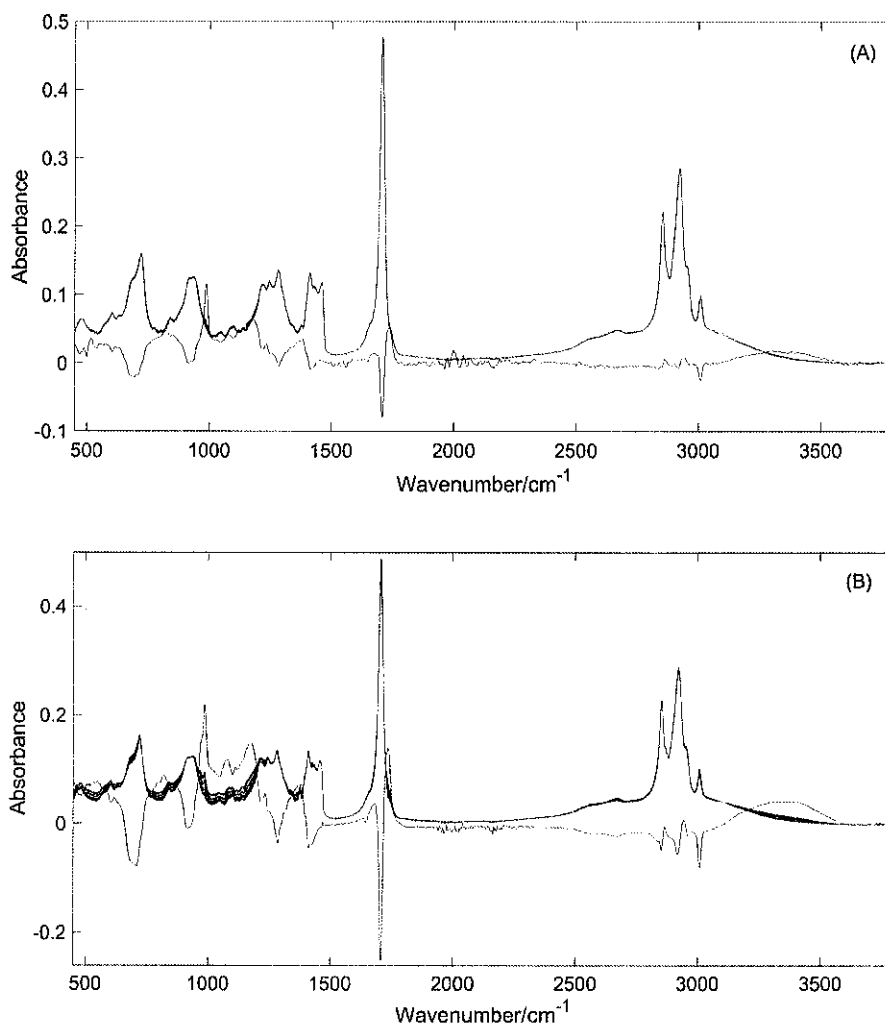
Za pomocą spektroskopii ATR-IR zbadałam wpływ podwyższonej temperatury (44 °C) i promieniowania ultrafioletowego (UV) na strukturę molekularną kwasu linolowego (LA, z ang. *linoleic acid*). Analiza zależnych od czasu widm ATR-IR LA przed i po naświetlaniu promieniowaniem UV ujawniła zmiany strukturalne w cząsteczkach LA. Jednak zakres tych zmian był znacznie większy dla próbek, które poddano wcześniej promieniowaniu UV. Podczas 24-godzinnego eksperymentu utrzymywano stałą temperaturę, dlatego zmiany spektralne wynikają ze stosunkowo powolnych procesów, które wymagają więcej energii, jak np. izomeryzacja *cis/trans*, rozrywanie wiązań podwójnych C=C i częściowe rozrywanie wiązań wodorowych w asocjatach. Jako efekt uboczny tych zmian strukturalnych można zaobserwować zmiany orientacji łańcuchów bocznych LA. Co ciekawe, grupy metylowe

---

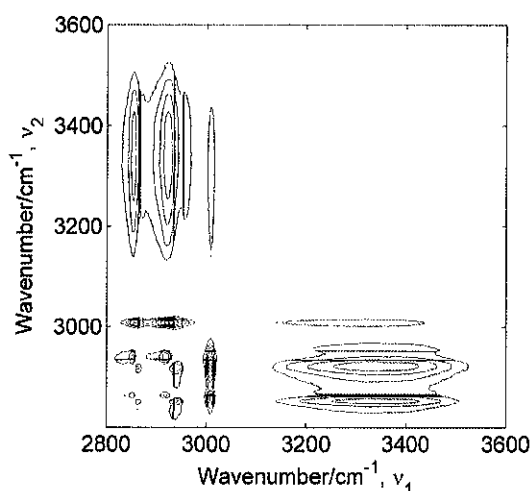
<sup>80</sup> Dębińska K., Olsztyńska-Janus S., Kielbowicz Z., Wpływ procesu suszenia na widma Ramana skóry, *Interdyscyplinarność badań naukowych 2014 [Dokument elektroniczny]: praca zbiorowa/pod red. Jarosława Szreka*. Wrocław: Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, 2014. str. 44–49.

<sup>81</sup> Kmiecik B., Olsztyńska-Janus S., Detyna J., Kielbowicz Z., Charakterystyka struktur poszczególnych warstw skóry za pomocą spektroskopii FTIR-ATR, *Współczesna myśl techniczna w naukach medycznych i biologicznych: V symposium*, Wrocław: Oddział Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, 2014. str. 49–50.

i metylenowe wykazują nieco inne zachowanie, co sugeruje złożony mechanizm reorientacji łańcuchów węglowodorowych (Rys. 11, 12).



Rys. 11. Zależne od czasu widma ATR-IR LA przed (A) i po (B) naświetlaniu promieniowaniem UV wraz z widmami różnicowymi (linie czerwone). Widma różnicowe [widmo(24h)–widmo(0h)] zostały pomnożone 10 (A) i 5 (B) razy, aby były lepiej widoczne w tej skali [H. 8].



Rys. 12. Dwuwymiarowe widmo asynchroniczne w zakresie 2800–3600  $\text{cm}^{-1}$  po naświetlaniu promieniowaniem UV. Na czerwono i niebiesko zaznaczono odpowiednio piki dodatnie i ujemne [H. 8].

Zmiany spektralne w funkcji czasu, zwłaszcza dla próbek nienaświetlonych, były niewielkie. Aby lepiej je wyeksponować, zostały obliczone widma różnicowe (widmo<sub>(24h)</sub>–widmo<sub>(0h)</sub>, Rys. 11). Widma różnicowe dostarczają informacji o zakresie i względnym kierunku zmian intensywności pasm. Dodatnie piki zyskują na intensywności wraz z upływem czasu, podczas gdy ujemne piki wykazują na odwrotne zachowanie.

Aby określić dokładne położenia pasm, wykorzystano widma drugich pochodnych w różnych zakresach spektralnych. Położenia te wykorzystano, aby przypisać pasma do drgań odpowiednich fragmentów cząsteczki LA. Analiza skupiła się na kilku wybranych i dobrze zdefiniowanych obszarach spektralnych. Pasma położone przy 3008  $\text{cm}^{-1}$  odpowiada drganiom rozciągającym grupy *cis* –CH przy wiązaniu podwójnym C=C.<sup>[82]</sup> Pasma to służy jako wskaźnik stopnia nienasycenia lipidów.<sup>[83]</sup> Zauważono, że intensywność tego pasma maleje z czasem, co jest widoczne na Rys. 11. Można zatem stwierdzić, że zarówno w przypadku próbek ciemnych (nienaświetlonych), jak i naświetlanych promieniowaniem UV stopień nienasycenia maleje. Jak łatwo można zauważyć (Rys. 11), zmiany te są znacznie większe dla próbki naświetlonej. Przy liczbach falowych 2925  $\text{cm}^{-1}$  i 2853  $\text{cm}^{-1}$  pojawiają się dwa intensywne pasma pochodzące od antysymetrycznych i symetrycznych drgań rozciągających grup metylenowych ( $\nu_{as}(\text{CH}_2)$  i  $\nu_s(\text{CH}_2)$ ),<sup>[84]</sup> podczas gdy odpowiadające drgania grupy metylowej pojawiają się jako punkty przegięcia przy liczbach falowych 2955

<sup>82</sup> Muik B., *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 593, 2007, 54–67.

<sup>83</sup> F.R. van de Voort, *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71, 1994, 243–253.

<sup>84</sup> Vlachos N., *et al.*, *Anal. Chim. Acta*, 573-574 (2006) 459–465.



i  $2871\text{ cm}^{-1}$ . Pasma te są charakterystyczne dla lipidów, fosfolipidów, błon i tkanek i są wrażliwe na zmiany temperatury lub organizacji łańcucha [H. 6–8]. Godnym uwagi jest fakt, że pasma grupy metylenowej zmniejszają intensywność, podczas gdy pasma drgań grup metylowych wykazują odwrotną tendencję, sugerując złożony mechanizm zmian w łańcuchach węglowodorowych. Kolejny ważny zakres spektralny, od  $1800$  do  $1600\text{ cm}^{-1}$ , obejmuje intensywne pasmo przy  $1706\text{ cm}^{-1}$ , które zostało przypisane do drgań rozciągających grupy C=O w cyklicznych dimerach LA.<sup>[85]</sup> Widmo różnicowe ujawniło obecność dwóch składników zmieniających intensywność w przeciwnym kierunku. Intensywność pasma przy  $1706\text{ cm}^{-1}$  maleje, podczas gdy pasmo przy  $1736\text{ cm}^{-1}$  wykazuje odwrotne zachowanie. Ponieważ grupa karbonylowa bierze udział w tworzeniu cyklicznych dimerów, obecność tych pasm może świadczyć o częściowym rozrywaniu wiązań wodorowych w dimerach cyklicznych i tworzeniu się otwartych dimerów, jak wcześniej sugerowano na podstawie widm FT-IR kwasu oleinowego w podwyższonej temperaturze.<sup>[85]</sup> Tak zwany obszar daktyloskopowy, (leżący poniżej  $1500\text{ cm}^{-1}$ ) posiada unikalny wzór pasm na widmach LA. Ten zakres spektralny jest trudny do przypisania ze względu na obecność wielu nakładających się pasm. Z drugiej strony jest on bardzo ważny dla identyfikacji. Widma różnicowe pokazały, że niektóre pasma w tym regionie zwiększają intensywność, podczas gdy inne stają się słabsze. Co ciekawe, widma te ujawniły wyraźny dodatni pik w okolicach  $980\text{ cm}^{-1}$ , podczas gdy na widmach oryginalnych przy tej liczbie falowej widać było jedynie punkt przegięcia. Obecność dodatniego pik w pobliżu  $980\text{ cm}^{-1}$  na widmie różnicowym sugeruje wzrost populacji konformerów *trans*. Aby potwierdzić ten wynik, przeprowadzono analizę metodą ruchomego okna i dwuwymiarową analizę korelacyjną (2DCOS).

#### ***Analiza metodą ruchomego okna czasowo-zależnych widm ATR-IR LA***

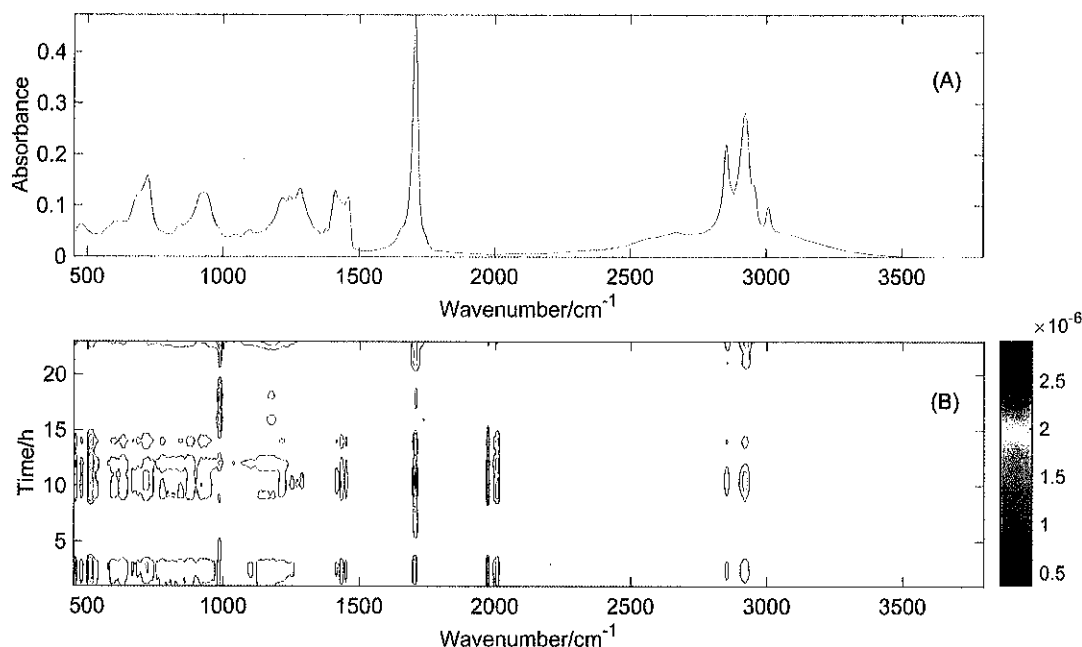
Analiza widm różnicowych wykazała jednoznacznie, że zakres zmian spektralnych dla próbek naświetlanych promieniowaniem UV jest znacznie wyższy niż w przypadku próbek nienaświetlanych. Jednak kierunek zmian jest podobny w obu przypadkach. Jak można było zauważyć (Rys. 11), promieniowanie UV ma największy wpływ na pasmo przy  $980\text{ cm}^{-1}$ , które odpowiada konformacji *trans*. Również pasmo drgań rozciągających grupy C=O w pobliżu  $1700\text{ cm}^{-1}$  wykazuje znaczne zmiany intensywności. Należy także wspomnieć o szerokim dodatnim paśmie w zakresie  $3200\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ , pochodzącym od drgań rozciągających zasocjowanej grupy OH od wody. Mniej widoczne są szerokie i bezkształtne

---

<sup>85</sup> Czarniecki M.A., *et al.*, Appl Spectrosc. 47 (1993) 2157–2161.

zmiany w zakresie  $2500\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$  nakładające się na pasma drgań rozciągających grup metylowych i metylenowych. To szerokie pasmo pochodzi od silnie związanej grupy OH w cyklicznych dimerach. Ujemna intensywność tych pików sugeruje malejącą populację dimerów cyklicznych. Obserwowanym zmianom intensywności towarzyszą niewielkie przesunięcia położenia pasm [H. 8].

Klasyczne metody analizy widm dostarczyły jedynie ograniczoną ilość informacji, w szczególności dla serii danych z niewielkimi zmianami spektralnymi (widma przed naświetleniem). Dlatego do badań zastosowałam uogólnioną dwuwymiarową analizę korelacyjną wraz z analizą ruchomego okna. Analiza ruchomego okna okazała się bardzo przydatna, gdyż dostarczyła informacji o zmianach intensywności pasm w funkcji zaburzenia (w tym przypadku był to czas wygrzewania) dla poszczególnych liczb falowych (Rys. 13–15).

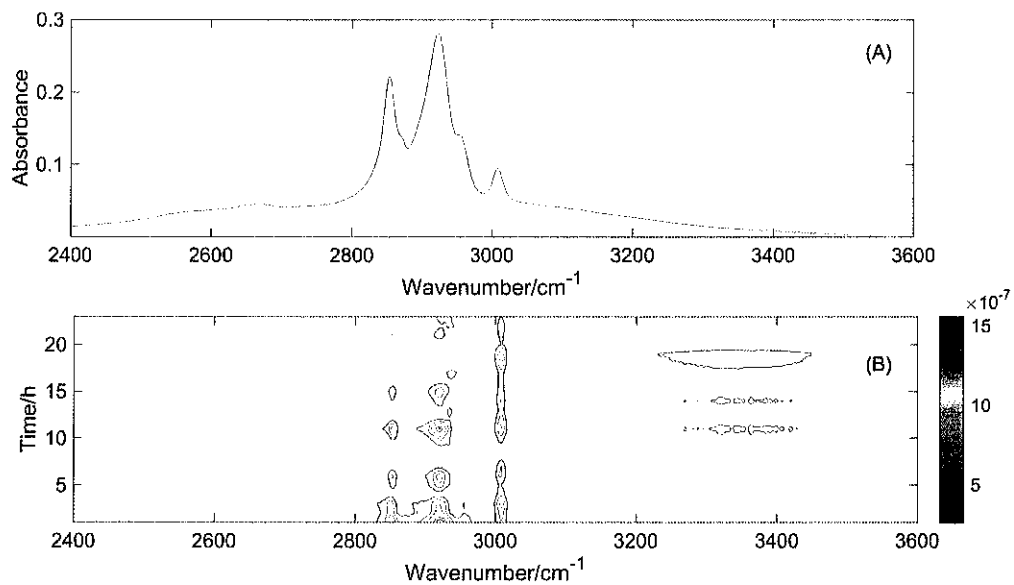


Rys. 13. Widmo średnie (A) i wykres konturowy otrzymany z analizy ruchomego okna (B) dla czasowo-zależnych widm ATR-IR nienaświetlanego LA. Skala kolorów pokazuje zakres zmian intensywności [H. 8].

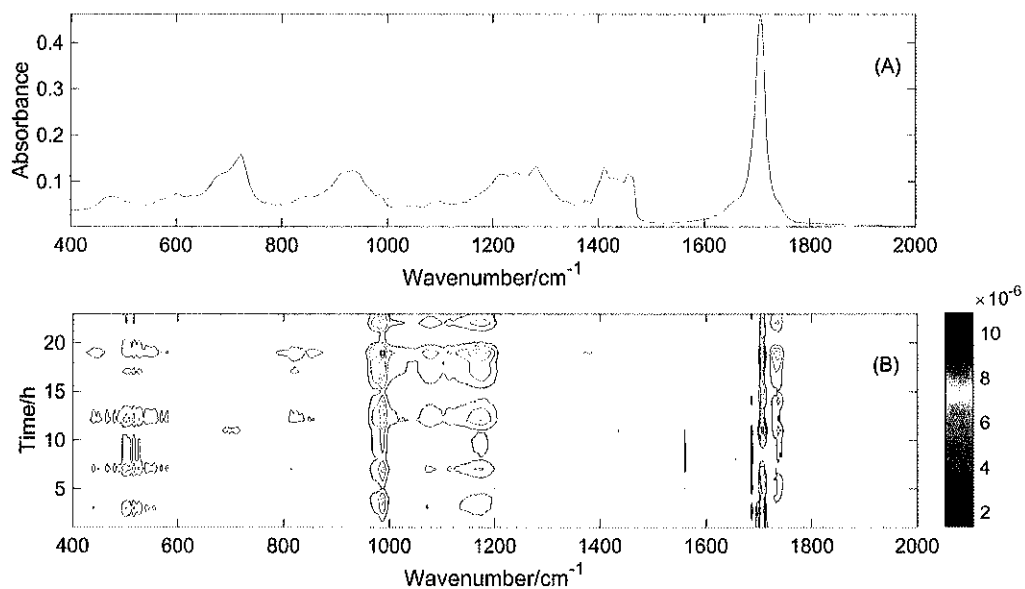
Aby ułatwić interpretację otrzymanych wykresów konturowych, dla porównania przedstawiono widmo uśrednione po czasie (Rysunki 13A, 14A). Okazało się, że zakres zmian spektralnych dla próbek nienaświetlonych jest bardzo mały ( $<3 \cdot 10^{-6}$ ). Pomimo tak małej amplitudy zmian, na widmach można zauważyć systematyczny ciąg zmian dla pasma drgań rozciągających grupy C=O w pobliżu  $1700\text{ cm}^{-1}$  (Rys. 13). Co ciekawe, zaobserwowałam wyraźne zmiany intensywności w okolicach  $980\text{ cm}^{-1}$ , choć przy tej liczbie

falowej nie występuje znacząca absorbancja na widmie średnim. Poza tym, niektóre zmiany spektralne pochodzą od drgań rozciągających grup metylenowych i metylowych. Należy zauważyć, że zmiany intensywności dla grup C=O i CH w funkcji czasu mają podobny charakter. Dzięki analizie ruchomego okna zaobserwowano, że zmiany spektralne dla pasma przy  $980\text{ cm}^{-1}$  (forma *trans*) występują znacznie później niż dla innych pasm. Największe zmiany pojawiają się między 15 a 20 godziną eksperymentu (Rys. 13).

Z kolei dla próbki naświetlanej promieniowaniem UV (Rys. 14) analiza ruchomego okna wykazała, że zmiany spektralne w obszarze drgań rozciągających CH ( $2800\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ ) były znacznie słabsze ( $1,5 \cdot 10^{-6}$ ) niż w obszarze liczb falowych poniżej  $2000\text{ cm}^{-1}$  ( $12 \cdot 10^{-6}$ ). Zakres zmian spektralnych dla widm zarejestrowanych po naświetlaniu promieniowaniem UV jest znacznie większy niż dla próbki nienaświetlanej. Pasma grupy C=O ujawniło dwie składowe, które są nieznacznie przesunięte w czasie (Rys. 14). Ponadto zależności czasowe zmian intensywności grupy C=O i pasma przy  $980\text{ cm}^{-1}$  dla naświetlanej próbki są bardziej podobne. Okazało się, że zmiany spektralne dla pasma drgań rozciągających grupy CH przy  $3008\text{ cm}^{-1}$  są podobne jak dla pasma przy  $980\text{ cm}^{-1}$ , podczas gdy zmiany intensywności dla alifatycznych grup CH pojawiają się znacznie wcześniej. Ponadto, w zakresie spektralnym  $3200\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$  zaobserwowano szerokie pasmo pochodzące od zasocjowanej grupy OH. Najprawdopodobniej, pojawienie się tego pasma jest spowodowane rozrywaniem wiązań wodorowych, w które zaangażowane są grupy OH.



Rys. 14. Widmo średnie (A) i wykres konturowy otrzymany z analizy ruchomego okna (B) dla czasowo-zależnych widm ATR-IR w zakresie 2400-3600 cm<sup>-1</sup> dla naświetlanego LA. Skala kolorów pokazuje zakres zmian intensywności [H. 8].

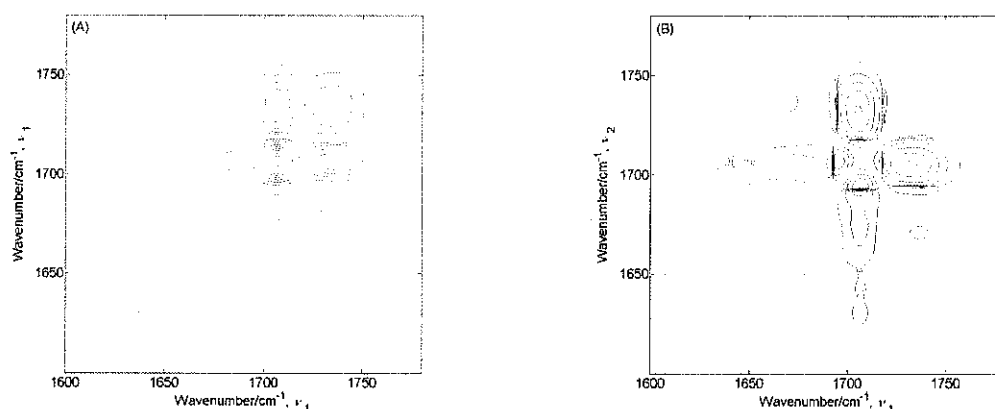


Rys. 15. Widmo średnie (A) i wykres konturowy otrzymany z analizy ruchomego okna (B) dla czasowo-zależnych widm ATR-IR w zakresie 400-2000 cm<sup>-1</sup> dla naświetlanego LA. Skala kolorów pokazuje zakres zmian intensywności [H. 8].

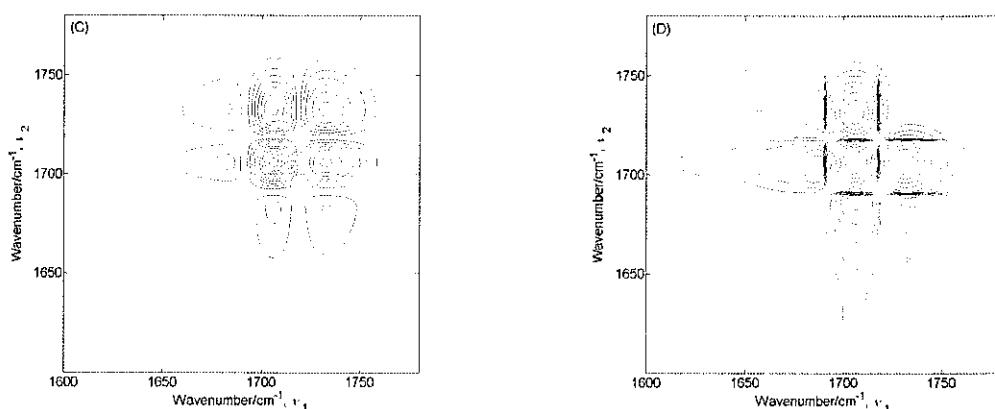
### *Dwuwymiarowa analiza korelacyjna (2DCOS) czasowo-zależnych widm ATR-IR LA*

Za pomocą oprogramowania pracującego w środowisku Matlab obliczyłam dwuwymiarowe korelacyjne widma synchroniczne i asynchroniczne, gdzie widmem odniesienia było widmo uśrednione po czasie. Intensywności pików na widmach 2DCOS dla próbki naświetlonej są około 10 razy wyższe niż odpowiednie intensywności dla próbki nienaświetlonej. Jednak układ pików na widmach korelacyjnych dla obu rodzajów próbek jest podobny. Oznacza to, że mechanizm zmian strukturalnych, spowodowany upływem czasu, zarówno dla próbek nienaświetlonych, jak i po naświetlaniu jest identyczny, co potwierdzałoby wcześniejsze wnioski. Analiza 2DCOS rozdzieliła pasmo grupy karbonylowej na trzy składowe znajdujące się przy 1736, 1706 i 1686  $\text{cm}^{-1}$  (Rys. 16). Widma asynchroniczne pokazują, że zmiany intensywności przy 1706  $\text{cm}^{-1}$  są inne niż przy 1736 i 1686  $\text{cm}^{-1}$ . Zatem można wywnioskować, że pik ten ma inne pochodzenie w porównaniu z dwoma pozostałymi pikami pochodzącymi od grupy karbonylowej. Piki przy 1736 i 1706  $\text{cm}^{-1}$  zostały zidentyfikowane już w widmach różnicowych i przypisano je odpowiednio do wolnej i zasocjowanej grupy karbonylowej. Natomiast pik przy 1686  $\text{cm}^{-1}$  został zidentyfikowany jedynie na widmach asynchronicznych. Pochodzenie tego piku nie zostało jeszcze w pełni wyjaśnione, ale jest wielce prawdopodobne, że jego pochodzenie jest związane ze zmianą położenia pasma drgań grupy karbonylowej.

T.



UV.



Rys. 16. 2D synchroniczne (A, C) i asynchroniczne (B, D) wykresy konturowe w zakresie 1600–1780  $\text{cm}^{-1}$  obliczone z czasowo-zależnych widm ATR-IR LA przed (A, B) i po (C, D) naświetlaniu promieniowaniem UV.

Na czerwono i niebiesko zaznaczono odpowiednio piki dodatnie i ujemne [H. 8].

Na wykresach konturowych w zakresie 2800–3600  $\text{cm}^{-1}$  najsilniejsza asynchroniczność występuje pomiędzy pikami pochodzącymi od symetrycznych i asymetrycznych drgań grupy  $\text{CH}_2$  a pikiem przy liczbie falowej 3008  $\text{cm}^{-1}$ , co wskazuje na odmienny charakter zmian spektralnych. Dodatkowo, piki drgań grup metylenowych zostały rozdzielone na dwie składowe. Z dużym prawdopodobieństwem można założyć, że składowe wysokoczęstościowe pochodzą od grupy metylowej. Sugeruje to, że zachowanie grup metylowych i metylenowych jest nieco odmienne, co potwierdziły już wcześniej widma różnicowe. Podobne różnice w zachowaniu się grup metylowych i metylenowych zaobserwowano na widmach NMR ciekłego *cis*-9-oktadecen-1-olu.<sup>[86]</sup> Ponadto, istnieje

<sup>86</sup> Iwahashi M., *et al.*, J. Phys. Chem. 99 (1995) 4155–4161.

wyraźna asynchroniczność pomiędzy pikami pochodzącymi od grup metylenowych i pikiem pochodzącym od grupy OH, podczas gdy asynchroniczność między pikiem grupy OH i pikiem przy  $3008\text{ cm}^{-1}$  jest wyraźnie słabsza (Rys. 16). Można zatem stwierdzić, że rozpad dimerów cyklicznych i rozrywanie podwójnych wiązań C=C są bardziej skorelowane w porównaniu z reorientacją łańcuchów kwasu tłuszczowego. Powyższa obserwacja jest w pełni uzasadniona, ponieważ pierwsze dwa procesy wymagają znacznie większego nakładu energii w porównaniu z reorientacją łańcuchów.

Podsumowując, początkowym celem tych badań miała być analiza procesu utleniania LA pod wpływem podwyższonej temperatury oraz promieniowania UV. Jednak otrzymane wyniki nie dostarczyły dowodów na wystąpienie tego procesu w zastosowanych warunkach eksperymentalnych. Zamiast tego uzyskane wyniki dostarczają cennych informacji o zmianach strukturalnych w LA wynikających z podwyższonej temperatury i promieniowania UV. Okazało się, że zależne od czasu widma LA, który przechowywano przez 24 godziny w temperaturze  $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ujawniają stosunkowo niewielkie zmiany, które są ledwo zauważalne na widmach ATR-IR. Amplituda tych zmian wzrasta po naświetlaniu próbki promieniowaniem UV. Dwuwymiarowa analiza korelacyjna widm otrzymanych z próbek przed i po naświetleniu ujawniła, że pomimo różnej amplitudy zmian intensywności dla obu próbek, molekularny mechanizm tych zmian wydaje się być podobny. Pierwotnym procesem obserwowanym w LA jest izomeryzacja *cis/trans*, na co wskazuje wyraźny wzrost intensywności pasma przy  $980\text{ cm}^{-1}$ . Pomimo stosunkowo niewielkiej intensywności na widmie ATR-IR, pasmo to wydaje się być doskonałym markerem dla tego procesu. Analiza metodą ruchomego okna ujawniła, że w przypadku próbek nienaświetlanych izomeryzacja *cis/trans* jest wolniejsza niż inne zmiany strukturalne. Natomiast po ekspozycji na promieniowanie UV proces ten rozpoczyna się wcześniej i jest skorelowany z innymi zmianami strukturalnymi. Chociaż temperatura podczas eksperymentu była stała ( $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), można zaobserwować zmiany intensywności dla pasma grupy OH. Zmiany te pojawiają się jako szerokie pasmo w zakresie  $3200\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ , i jest ono skutkiem częściowego rozrywania dimerów cyklicznych i tworzenia się słabszych wiązań wodorowych.<sup>[87]</sup> Wynik ten jest zgodny ze zmianami spektralnymi obserwowanymi dla grupy C=O. Spadek intensywności dla pasm drgań rozciągających CH alkenu ( $3008\text{ cm}^{-1}$ ) i drgań poza płaszczyznę ( $960\text{ cm}^{-1}$ ) sugeruje, że niektóre wiązania podwójne są zrywane, co zmniejsza stopień nienasycenia LA.

---

<sup>87</sup> Czarniecki M.A., Chem. Phys. Lett. 368 (2003) 115–120.

Podobne wyniki uzyskano badając inne nienasycone kwasy tłuszczowe.<sup>[88]</sup> Wszystkim tym zmianom towarzyszą zmiany orientacji łańcuchów alifatycznych. Co ciekawe, podczas tego procesu grupy metylowa i metylenowa wykazują nieco odmienne zachowanie. Zatem można wnioskować, że reorientacja łańcuchów alifatycznych jest procesem złożonym. Być może jedynie część łańcucha zmienia swoją orientację, wskutek czego część grup metylenowych zachowuje swoją pierwotną orientację. Takie zachowanie może generować piki na widmie asynchronicznym. Praca ta pokazuje, że spektroskopia ATR-IR w połączeniu z dwuwymiarową analizą korelacyjną i analizą ruchomego okna jest efektywnym narzędziem do kompleksowego badania zmian w strukturze molekularnej kwasów tłuszczowych wywołanych różnymi czynnikami takimi jak podwyższona temperatura czy promieniowanie UV [H. 8].

---

<sup>88</sup> Lam H.Y., *et al.*, *Appl. Spectrosc.* 73 (2019) 1308–1316.



#### 4.6. PODSUMOWANIE

Do najważniejszych osiągnięć i wyników naukowych, które zostały opisane w cyklu prac habilitacyjnych zaliczam:

- a) Wykazanie pionierskich badań mechanizmu oddziaływania promieniowania NIR na struktury biologiczne z wykorzystaniem spektroskopii oscylacyjnej, potwierdzenie zmian konformacyjnych w tych strukturach po ekspozycji na promieniowanie NIR [H. 1, 2]. **Udowodnienie, że działanie promieniowania NIR jest typu fotochemicznego**, a nie, jak wcześniej sądzono, jedynie termicznego [H. 1, 2, 7].
- b) Określenie procesów pierwotnych – modyfikacji struktur wody wokół powierzchni układów biologicznych, prowadzących do transferu protonu [H. 2]. **Wykazanie, że strukturami ulegającymi modyfikacji po ekspozycji na promieniowanie NIR w pierwszej kolejności są woda i warstwy hydratacyjne**. Potwierdzeniem tego faktu jest amplituda zmian spektralnych dla wody zachodzących podczas naświetlania promieniowaniem. Wykazałam słuszność tej hipotezy poprzez badanie układów modelowych [H. 1,2].
- c) Udowodnienie występowania w fenyloalaninie procesu agregacji, wzmacnianego na skutek zwiększonych oddziaływań hydrofobowych. Potwierdzenie procesów agregacji, które mogą prowadzić do zmian równowagi kwasowo-zasadowej aminokwasu fenyloalaniny. Wykazanie, że zmiany konformacyjne w cząsteczkach aminokwasów są poprzedzone procesem reorganizacji, np. na drodze izomeryzacji [H. 1, 2].
- d) **Potwierdzenie procesu zmian konformacyjnych dla większych struktur biologicznych (białka, tkanki) po ekspozycji na promieniowanie NIR [H. 2,7]**. Wykazanie, że pierwotne procesy fotochemiczne polegają na absorpcji energii w zakresie NIR przez nadtony drgań rozciągających grup tworzących wiązania wodorowe, co prowadzi do zmian protonacji cząsteczek, a brak ładunku sprzyja procesom agregacji [H. 1, 2, 7]. Wykrycie odporności agregatów na działanie temperatury. Zaobserwowanie, że ekspozycja na promieniowanie NIR wykazuje działanie ochronne [H. 2, 7].

- e) Wskazanie na możliwości aplikacyjne spektroskopii oscylacyjnej (ATR-IR i Ramana) do badań strukturalnych tkanek i ich komponentów, zarówno w postaci stałej, jak i roztworów wodnych. Zastosowanie spektroskopii w badaniu m.in.:
- procesów zachodzących w tkankach i ich składnikach do celów diagnostycznych i profilaktycznych, m.in. badania agregacji białek, analiza zmian uwodnienia wokół struktur biologicznych [H. 2–4],
  - stresu oksydacyjnego w lipidach osocza krwi poddanej hemodializie [H. 5],
  - efektów temperaturowych i naświetlania promieniowaniem NIR komponentów skóry, wyznaczenie przejść fazowych lipidów w skórze z widm oscylacyjnych przed i po naświetlaniu promieniowaniem NIR [H. 6, 7],
  - efektów temperaturowych i naświetlania promieniowaniem UV w kwasie linolowym [H. 8].
- f) **Wykazanie, że spektroskopia oscylacyjna w połączeniu z zaawansowanymi metodami analizy danych takimi jak dwuwymiarowa analiza korelacyjna (2DCOS) i analiza ruchomego okna jest skutecznym narzędziem do kompleksowego badania zmian w strukturze molekularnej nienasyconych kwasów tłuszczowych, wywołanych takimi czynnikami jak podwyższona temperatura czy promieniowanie UV [H. 8]. Udowodniłam, że główną przyczyną zmian obserwowanych w widmie IR LA była izomeryzacja *cis/trans*. Analiza ruchomego okna ujawniła, że w przypadku próbek nienaświetlanych proces ten jest wolniejszy niż inne zmiany strukturalne. Po naświetleniu proces ten staje się szybszy i bardziej skorelowany z innymi zmianami strukturalnymi. Z kolei dwuwymiarowa analiza korelacyjna dała dowody na częściowy rozpad dimerów cyklicznych i tworzenie się słabszych wiązań wodorowych. Procesom tym towarzyszą zmiany konformacji łańcuchów alkilowych.**

## 5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

### 5.1. OPIS DZIAŁALNOŚCI NAUKOWEJ PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

W latach 1993–1998 studiowałam na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki, na kierunku Fizyka, w specjalności Inżynieria Biomedyczna. W roku akademickim 1997/1998 wykonywałam pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Komorowskiej pracę magisterską pod tytułem: „*Badanie zmian strukturalnych w błonach podstawnych kłębuszków nerkowych w procesach chorobowych. Badania metodą spektroskopii Paramagnetycznego Rezonansu Elektronowego*”. Wykazałam, że technika EPR jest przydatna w diagnostyce zmian w strukturze błon podstawnych pod wpływem neuraminidazy, aktywnej przy infekcjach wirusowych. Praca magisterska została zrealizowana przy współpracy z Akademią Medyczną: prof. dr hab. A. Steciwko i lek. chorób wewnętrznych B. Sapilakiem. Efektem tej współpracy jest publikacja w czasopiśmie medycznym <sup>[89]</sup> oraz zaprezentowany komunikat <sup>[90]</sup> na międzynarodowej konferencji 4<sup>th</sup> Symposium ”Free Radicals in Biology and Medicine” w Łodzi, 1998.<sup>[90]</sup>

Po zakończeniu studiów magisterskich, rozpoczęłam studia doktoranckie na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki w Instytucie Fizyki, w zakresie Inżynierii Biomedycznej, pod opieką naukową dr hab. Małgorzaty Komorowskiej i prof. Jana Gomułkiewicza. Przedmiotem moich badań były fotoprocesy zachodzące w materiałach biologicznych pod wpływem naświetlania promieniowaniem z zakresu bliskiej podczerwieni (NIR).

Ze względu na niewyjaśniony mechanizm molekularny działania promieniowania z zakresu NIR na tkanki i struktury biologiczne, zajęłam się badaniami wpływu promieniowania NIR na przykładowe małe cząsteczki, jakimi są aminokwasy (fenyloalanina, dihydroksyalanina), stosując spektroskopię UV-VIS. Wstępne wyniki wskazujące na modyfikacje struktur wody związanej z aminokwasami zostały opublikowane w postaci

---

<sup>89</sup> Sapilak B. J., Steciwko A., **Olsztyńska S.**, Komorowska M., *Polska Medycyna Rodzinna* 4(3), 2002, 371–375.

<sup>90</sup> Sapilak B. J., Steciwko A., **Olsztyńska S.**, Komorowska M., *Effect of neuraminidase on the structure of rabbit kidney glomerular basement membranes: spin label study*, 4<sup>th</sup> Symposium ”Free Radicals in Biology and Medicine” 1998, Łódź, Poland, str. 154.

artykułu zatytułowanego „*Light therapy for mechanical damages*” w Acta of Bioengineering and Biomechanics w 1999 roku.<sup>[91]</sup>

W tym samym roku odbyłam 9-cio miesięczny staż w ramach programu Socrates/Erasmus na Université des Sciences et Technologies de Lille (Francja), w laboratorium LASIR – Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman. Współpracowałam tam z prof. N. Dupuy i dr L. Vrielynck. Odbycie praktyki zawodowej w tym ośrodku pozwoliło mi na zapoznanie się z teoretycznymi podstawami technik spektroskopowych oraz umożliwiło zdobycie praktycznego doświadczenia w ich zastosowaniu do badań materiałów biologicznych i substancji nieorganicznych. Brałam również udział w grantie polsko-francuskim D.E.A. LARMORA „Laser, Rayonnement atmospherique”. Badania sponsorowane były także przez Ministère Chargé de la Recherche, Région Nord-Pas-de-Calais and Fonds Européen de Développement Economique des Régions (2000–2002). Efektem współpracy były dwa komunikaty konferencyjne zatytułowane „*Vibrational spectroscopy of herbicides derived from phenylurea*” na konferencji Conference de Jeunes Rechercheurs, Villeneuve d’Ascq, Francja, 1999r.<sup>[92]</sup> oraz drugi „*Infrared spectroscopy of phenylurea – humic acid complexes*” na konferencji, 10<sup>th</sup> International Meeting of the International Humic Substances Society, Toulouse, Francja, 2000r.<sup>[93]</sup>

Na początku 2001 roku, dzięki zaproszeniu otrzymanemu z laboratorium LASIR w Uniwersytecie USTL (Francja), ponownie odbyłam staż pozwalający na kontynuowanie moich dotychczasowych badań. Staż miał na celu pogłębienie wiedzy praktycznej dotyczącej zastosowania metod spektroskopii oscylacyjnej do badań strukturalnych materiałów biologicznych do celów diagnostycznych. Jednym z ważniejszych osiągnięć naukowych zdobytych w laboratorium LASIR było opracowanie nowej metody wyznaczania wartości  $pK_a$  dla L-fenylalaniny z intensywności pasm na widmach ATR-IR. Metoda wyznaczania  $pK_a$  została opublikowana w Applied Spectroscopy w 2001 roku (liczba cytowań: 58).<sup>[94]</sup> Wyniki te zostały również zaprezentowane na międzynarodowej konferencji 9<sup>th</sup> European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, w Pradze w 2001 roku.<sup>[95,96]</sup>

---

<sup>91</sup> Olsztyńska S., Dziamska A., Komorowska M., Acta Bioeng. Biomech. 1(1), 1999, 129–133.

<sup>92</sup> Olsztyńska-Janus S., Vrielynck L., Saab J., Dupuy N., *Vibrational spectroscopy of herbicides derived from phenylurea*, Conference de Jeunes Rechercheurs, Villeneuve d’Ascq, Francja, 1999.

<sup>93</sup> Dupuy N., Vrielynck L., Olsztyńska-Janus S., Saab J., *Infrared spectroscopy of phenylurea-humic acid complexes*, 10<sup>th</sup> International Meeting of the International Humic Substances Society, Toulouse, Francja, 2000.

<sup>94</sup> Olsztyńska S., Komorowska M., Vrielynck L., Dupuy N., Applied Spectroscopy 55(7), 2001, 901–907.

<sup>95</sup> Olsztyńska S., Komorowska M., Vrielynck L., Dupuy N., *ATR-FTIR spectroscopic investigation of L-phenylalanine: effect of pH*, 9<sup>th</sup> European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Praga, Czechy, 2001, str. 221

Dodatkowo w czasie pobytu w laboratorium LASIR badałam efekty termiczne zachodzące w strukturze aminokwasu przed i po ekspozycji na NIR przy pomocy spektroskopii ATR-IR. Zaobserwowałam modyfikacje strukturalne wywołane działaniem podwyższonej temperatury. Porównanie widm roztworów nie naświetlonych i naświetlonych promieniowaniem NIR wykazało na istnienie różnic strukturalnych pomiędzy obydwojma rodzajami próbek. Obserwowane efekty wywołane wzrostem temperatury i zmiany strukturalne zachodzące pod wpływem promieniowania NIR były odmienne. Badałam również wpływ modyfikatorów struktury wody na strukturę w/w amfifilowego aminokwasu. Wyniki zostały zaprezentowane w postaci 1 referatu i 3 posterów na 26<sup>th</sup> European Congress on Molecular Spectroscopy, Villeneuve d'Ascq, Francja, 2002r.<sup>[97,98]</sup> oraz na 27<sup>th</sup> European Congress on Molecular Spectroscopy, Kraków, 2004r.<sup>[99,100]</sup> Zaobserwowałam również procesy agregacji. Należy podkreślić, że procesy agregacji mają istotne znaczenie w medycynie. Agregacja białek w farmaceutykach może zmniejszyć bioaktywność leku i dzięki temu wpływa na siłę działania leku. Agregaty białek mogą również wywołać bardzo niepożądane skutki immunologiczne, taki jak wstrząs anafilaktyczny.<sup>[101]</sup> Istnieje również hipoteza, że choroby neurodegeneracyjne (np. Alzheimer, Parkinsona, Huntingtona, Creutzfeldta-Jakoba), czy choroby nowotworowe są związane z patologią i akumulacją białek.<sup>[102–104]</sup>

W celu potwierdzenia procesów agregacji zastosowałam spektroskopię fluorescencyjną. W latach 2002–2003 odbyłam praktykę z czasowo-rozdzielczej spektroskopii fluorescencyjnej w Instytucie Technologii Organicznej i Tworzyw Sztucznych na wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Kazimierzy Wilk i dr inż. Beaty Domagalskiej. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w postaci referatu

---

<sup>96</sup> Olsztyńska S., Dupuy N., Vrielynck L., Komorowska M., *Vibrational study of L-phenylalanine infrared spectra, molecular structure and crystallization kinetics*, 9<sup>th</sup> European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Praga, Czechy, 2001, str. 220.

<sup>97</sup> Olsztyńska S., Komorowska M., Vrielynck L., Dupuy N., *ATR-FTIR study of L-phenylalanine: NIR radiation effect*, 26<sup>nd</sup> European Congress on Molecular Spectroscopy, Villeneuve d'Ascq, Francja, 2002, str. 33.

<sup>98</sup> Chludzińska L., Olsztyńska S., Komorowska M., *An antioxidant effects of Near infrared radiation on human erythrocyte membranes monitored by ESR spectroscopy*, 26<sup>nd</sup> European Congress on Molecular Spectroscopy, Villeneuve d'Ascq, Francja, 2002, str. 214.

<sup>99</sup> Olsztyńska S., Komorowska M., *Ion effect on L-phenylalanine aqueous solution: Role of water structure*, 27<sup>nd</sup> European Congress on Molecular Spectroscopy, Kraków, 2004, str. 390.

<sup>100</sup> Olsztyńska S., Komorowska M., *NIR radiation effect on the structure of solvation shells of L-phenylalanine*, 27<sup>nd</sup> European Congress on Molecular Spectroscopy, Kraków, 2004, str. 389.

<sup>101</sup> Boulet-Audet M., Byrne B., Kazarian S. G., *Anal. Chem.* 86, 2014, 9786–9793.

<sup>102</sup> Thal D. R., Fändrich M., *Acta Neuropathol* 129, 2015, 163–165.

<sup>103</sup> Wiszniewska M., Członkowska A., *Polski Przegląd Neurologiczny* 10(3), 2014, 1–11.

<sup>104</sup> Szwed A., Miłowska K., *Postepy Hig Med Dosw* 66, 2012, 187–195.

z tytułu „*Aggregation of L-phenylalanine amino acid*” na konferencji *Surfactants and Dispersed Systems in Theory and Practice* w Polanicy Zdroju 2003 roku.<sup>[105]</sup>

Efektom kilku lat pracy badawczej pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Komorowskiej była rozprawa doktorska z tytułu „Zastosowanie spektroskopii ATR-FTIR do badania molekularnego mechanizmu oddziaływania promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni – fenyloalanina”. Obrona rozprawy doktorskiej odbyła się w dniu 21.09.2004 r. przed Radą Naukową Instytutu Fizyki Politechniki Wrocławskiej.

W tym okresie byłam też zatrudniona na etacie starszego referenta techniczno-inżynierskiego na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki, w Wydziałowym Zakładzie Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej Politechniki Wrocławskiej. Do moich obowiązków należała opieka laboratoryjna, zakup aparatury i materiałów laboratoryjnych, odczynników chemicznych.

W trakcie studiów doktoranckich otrzymałam stypendia: Stypendium Erasmus/Sokrates na pobyt w USTL (Lille, Francja, 1999/2000) i staż naukowy w laboratorium LASIR oraz stypendium doktoranckie (1999–2003).

---

<sup>105</sup> Olsztyńska S., Domagalska B.W., Komorowska M., *Aggregation of L-phenylalanine amino acid*, w: ed. Wilk K.A., *Surfactants and dispersed systems in theory and practice*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2003, 405–409.

## 5.2. OPIS INNEJ DZIAŁALNOŚCI NAUKOWEJ PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA – OPIS CHRONOLOGICZNY

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora we wrześniu 2004 roku zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta naukowo-dydaktycznego na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki Politechniki Wrocławskiej w Wydziałowym Zakładzie Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej. Prowadziłam prace badawcze z zakresu inżynierii biomedycznej dotyczące w ogólności oddziaływania światła na struktury biologiczne, jak i nieinwazyjnych metod diagnostycznych.

Oprócz rozwoju technik i metodologii badań zapoczątkowanych w czasie pracy nad doktoratem zainteresował mnie również inny problem, a mianowicie poszukiwanie nieinwazyjnego, a zarazem szybkiego narzędzia diagnostycznego procesów biologicznych zachodzących na poziomie molekularnym. Z punktu widzenia badań biomedycznych bardzo ważne jest znalezienie tanich, szybkich, a zarazem nieinwazyjnych metod badania płynów ustrojowych, tkanek oraz biomateriałów. Zaawansowane techniki spektroskopowe dają możliwość uzyskania informacji o strukturze, oddziaływaniach cząsteczkowych, czy procesach zachodzących na poziomie molekularnym. Współczesna diagnostyka coraz częściej wykorzystuje wyniki badań na poziomie zmian molekularnych. Metody te pozwalają na przeprowadzenie analiz jakościowych i ilościowych. Na szczególną uwagę zasługują techniki spektroskopii oscylacyjnej. Są one technikami o najbardziej uniwersalnym zastosowaniu, poczynając od fizyki ciała stałego po zaawansowane metody diagnostyczne w medycynie. Umożliwiają czułą analizę składu badanego materiału, włącznie z jego obrazowaniem, stanowiąc bardzo nowoczesną metodę diagnostyczną, np. tkanek. Techniki spektroskopii oscylacyjnej stają się konkurencyjne w porównaniu do metod obecnie stosowanych w medycynie z uwagi na możliwość prowadzenia badań i analiz materiałów biologicznych, nie powodując ich destrukcji. Techniki te są stosunkowo szybkie, niektóre z nich umożliwiają badania *in vivo*. Umożliwiają wykrywanie zmian w tkankach już we wczesnym etapie ich powstawania, w związku z tym mogą być zastosowane do diagnostyki procesów chorobowych, nawet na bardzo wczesnych etapach rozwoju patologii, w monitorowaniu zastosowanej terapii bądź leczenia.

Wykorzystując duże możliwości techniki ATR-IR skoncentrowałam swoją uwagę na badaniu mechanizmu molekularnego działania promieniowania NIR na bardziej skomplikowane struktury biologiczne. Początkowo badania wykonywałam we współpracy z prof. Natalie Dupuy i dr Laurence Vrielynck z Université des Sciences et Technologies

de Lille (Francja). Wyniki zostały przedstawione na Seminarium Ogólnopolskim „Polish Photoscience Seminars”, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, 2005r.<sup>[106]</sup> na międzynarodowej konferencji 11<sup>th</sup> European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Aschaffenburg, Niemcy, 2005r.<sup>[107,108]</sup> oraz opublikowane w czasopiśmie z Listy filadelfijskiej Applied Spectroscopy w 2006 roku.<sup>[48]</sup> W swoich badaniach wykazałam, że promieniowanie NIR jest absorbowane głównie przez wodę zarówno związaną, jak i globalną. Zmiany w strukturze wody wywołują efekty wtórne zachodzące w interfejsie na granicy struktura badana–środowisko wodne.

W tym samym roku zostałam laureatem grantu umożliwiającego udział w Szkole Letniej "Complex Materials: Cooperative Projects of the Natural, Engineering and Biosciences, International University Bremen (IUB), Bremen, Niemcy; finansowanie przez IUB). Przedstawiłam tam wyniki uzyskane z badania oddziaływania promieniowania NIR na strukturę fenyloalaniny w referacie zatytułowanym „*Phenylalanine response to NIR radiation: ATR-FTIR study*”<sup>[109]</sup>. Dwutygodniowy pobyt w International University Bremen (IUB) wykorzystałam na poznanie innych technik eksperymentalnych do badania struktur biologicznych.

Skoro promieniowanie NIR wywołuje zmiany struktury wody w układach biologicznych, to konieczne staje się dalsze badanie stanów hydratacji. W celu podwyższenia kwalifikacji w zakresie tworzenia cienkich warstw układów biologicznych oraz badania procesów hydratacji/dehydratacji za pomocą spektroskopii FTIR, odbyłam dwutygodniowy staż pod kierunkiem prof. Yvesa Maréchal (CEA, Commissariat à l'énergie atomique, Grenoble, Francja). Nabyte umiejętności wykorzystałam w dalszych badaniach. Wyniki badań zostały opublikowane w artykule w Applied Spectroscopy w 2006r. („*Water evaporation analysis of L-phenylalanine from initial aqueous solutions to powder state by vibrational spectroscopy*”).<sup>[110]</sup>

---

<sup>106</sup> Olsztyńska S., *pKa shifts of L-phenylalanine – NIR radiation effect*, Seminarium Ogólnopolskie „Polish Photoscience Seminars”, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, 2005.

<sup>107</sup> Olsztyńska S., Komorowska M., *Consequences of dehydration induced by NIR radiation: ATR-FTIR study*, 11<sup>th</sup> European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Aschaffenburg, Niemcy, 2005.

<sup>108</sup> Olsztyńska S., Komorowska M., *Control of biological systems after NIR radiation – investigations of NIR exposure induced structural effects in L-phenylalanine by ATR-FTIR spectroscopy*, 11<sup>th</sup> European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Aschaffenburg, Niemcy, 2005.

<sup>109</sup> Olsztyńska S., *Phenylalanine response to NIR radiation: ATR-FTIR study*, Summer School: “Complex Materials: Cooperative Projects of the Natural, Engineering and Biosciences”, International University Bremen, Bremen, Niemcy, 2006.

<sup>110</sup> Olsztyńska-Janus S., Dupuy N., Vrielynck L., Komorowska M.: *Water evaporation analysis of L-phenylalanine from initial aqueous solutions to powder state by vibrational spectroscopy*. Applied Spectroscopy 60(9), 2006, 1040–1053.



### 5.2.1. OPIS PRAC BADAWCZYCH ZWIĄZANYCH Z OSIĄGNIĘCIEM NAUKOWYM

Opisane wcześniej prace były następnie kontynuowane podczas doktoratu, jednak odnosiły się do innych aspektów wykorzystania promieniowania NIR. Natomiast kolejne prace opisane poniżej dotyczą badania bardziej rozbudowanych struktur biologicznych za pomocą spektroskopii oscylacyjnej oraz dwuwymiarowej analizy korelacyjnej i metod chemometrycznych, co pozwoliło na uzyskanie nowych informacji na temat struktury badanych układów.

W styczniu 2007 uzyskałam grant na badania własne zatytułowany „Kontrola układów biologicznych w światłoterapii – badania wywołane promieniowaniem z zakresu bliskiej podczerwieni (NIR)” finansowany przez Centrum Inżynierii Biomedycznej Politechniki Wrocławskiej (nr 331878). Dzięki temu mogłam rozpocząć badania wpływu promieniowania NIR na wodę i inne struktury biologiczne. Badania te wykazały, że ekspozycja na promieniowanie NIR silnie modyfikuje zarówno inne aminokwasy, jak i białka. W przypadku białek absorberami promieniowania są przede wszystkim struktury wody związanej z powierzchnią białka.<sup>[111,112]</sup>

Jednocześnie ważnym zadaniem prowadzonych badań była teoretyczna symulacja mechanizmu efektów obserwowanych doświadczalnie. W tym celu w roku 2007 roku nawiązałam współpracę z prof. Józefem Lipińskim<sup>†</sup> (Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska). Obliczenia zostały przeprowadzone za pomocą dwóch metod mechaniki kwantowej: MP2 i B3LYP (B3LYP to jedna z wielu przybliżonych metod DFT – teorii funkcjonałów gęstości, natomiast MP2, to metoda Møllera-Plesseta II rzędu, jedna z metod uwzględniania korelacji oparta na funkcji falowej). Metody kwantowo-mechaniczne potwierdziły procesy agregacji oraz określiły geometrię cząsteczek i warunki, w jakich może zachodzić ten proces. Wyniki przedstawiłam na XV Krajowej Konferencji Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej we Wrocławiu, 2007r.<sup>[113]</sup>, na konferencji międzynarodowej 12<sup>th</sup>

---

<sup>111</sup> Nowosiad A., Kośnik A., **Olsztyńska-Janus S.**, Komorowska M., *Changes in water structure induced by the near-infrared radiation and temperature – ATR-FTIR spectroscopy studies*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 247–252.

<sup>112</sup> Kośnik A., Nowosiad A., **Olsztyńska-Janus S.**, Komorowska M., *Effect of near-infrared radiation and temperature on the structure of simple amino acid – ATR-FTIR spectroscopy studies*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 253–258.

<sup>113</sup> **Olsztyńska-Janus S.**, Szymborska K., Komorowska M., Lipiński J.: *Usefulness of spectroscopy for biomedical engineering*, In: Biocybernetics and Biomedical Engineering, XIV National Conference Biocybernetics and Biomedical Engineering Wrocław, 2008.

European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules <sup>[114]</sup> oraz opublikowałam w postaci dwóch artykułów: „*Conformational changes of L-phenylalanine – near infrared-induced mechanism of dimerization: B3LYP studies*”, Journal of Molecular Structure: Theochem (2009) [H. 1] oraz „*Usefulness of spectroscopy for biomedical engineering*”, Acta of Bioengineering and Biomechanics (2008).<sup>[115]</sup>

W roku 2009 tematyka moich badań była w dalszym ciągu związana z poszukiwaniami procesów pierwotnych i wtórnych molekularnego mechanizmu działania promieniowania NIR na komponenty tkanek. Tym razem skupiłam się na badaniu struktur tworzonych przez cząsteczki wody i innych aminokwasów (glicyny, alaniny). Inne struktury biologiczne również są wrażliwe na działanie promieniowania NIR. Obserwowane efekty zależą silnie od długości fali padającej. Maksimum efektów zaobserwowałam dla długości fal aktywnych dla drgań grup pochodzących od sąsiadującej wody. Rezultatem badań są dwa referaty na VII Konferencji Naukowej dla młodych naukowców zorganizowanej przez Politechnikę Wrocławską, Wrocław, 2009.<sup>[116,117]</sup>

W uznaniu moich osiągnięć i wiedzy w dziedzinie biospektroskopii w roku 2010 otrzymałam zaproszenie z Wydawnictwa Intech do napisania rozdziału w książce anglojęzycznej z dziedziny Inżynierii Biomedycznej. We współpracy z prof. Bogusławą Czarnik-Matuszewicz<sup>†</sup> z Uniwersytetu Wrocławskiego oraz prof. Małgorzatą Komorowską z Politechniki Wrocławskiej powstał rozdział zatytułowany „*Specific Applications of Vibrational Spectroscopy in Biomedical Engineering*” w: Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies, wydawnictwo InTech, Rijeka, Croatia, 2011.[H. 2] W rozdziale zostały opisane zalety spektroskopii oscylacyjnej w badaniach strukturalnych materiałów biologicznych oraz fotochemiczne i terapeutyczne podstawy działania światła w zakresie NIR, na podstawie wyników badań spektroskopowych takich cząsteczek, jak aminokwasy, białka i DNA.

---

<sup>114</sup> **Olsztyńska-Janus S.**, Szymborska K., Komorowska M., K. Palewska, Lipiński J. *Mechanism of dimerization as a consequence of Near Infrared exposure on phenylalanine*, 12<sup>th</sup> European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Bobigny (Paris region), Francja, 2007.

<sup>115</sup> **Olsztyńska-Janus S.**, Szymborska K., Komorowska M., Lipiński J.: *Usefulness of spectroscopy for biomedical engineering*. Acta of Bioengineering and Biomechanics 10(3), 2008, 45–49.

<sup>116</sup> Kośnik A., Nowosiad A., **Olsztyńska-Janus S.**, Komorowska M.: *Effect of near-infrared radiation and temperature on the structure of simple amino acids – ATR-FTIR spectroscopy studies*. VII Naukowa Konferencja Studentów, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2009, str. 253–258.

<sup>117</sup> Nowosiad A., Kośnik A., **Olsztyńska-Janus S.**, Komorowska M.: *Changes in water structure induced by the near-infrared radiation and temperature – ATR-FTIR spectroscopy studies*. VII Naukowa Konferencja Studentów, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2009, str. 247–252.

W tym samym roku zostałam poproszona przez wydawnictwo Intech (Croatia) o edytorstwo monografii zatytułowanej *Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies*<sup>[118]</sup>. Podjęłam się tego wyzwania wspólnie z Prof. Małgorzatą Komorowską. Efektem naszej współpracy jest książka anglojęzyczna dotycząca najnowszych trendów w Inżynierii Biomedycznej opublikowana w roku 2011 przez Wydawnictwo Intech.

W roku 2012 otrzymałam kolejne zaproszenie do napisania publikacji w Special Issue czasopisma *Structural Chemistry* poświęconym prof. dr hab. Małgorzacie Witko, członkowi korespondentowi Polskiej Akademii Nauk, z okazji 40-lecia Jej pracy naukowej. W publikacji „*Conformational changes of L-phenylalanine induced by Near Infrared radiation. ATR-FTIR studies*” zaprezentowałam modyfikacje strukturalne aminokwasu indukowane ekspozycją na promieniowanie NIR.<sup>[119]</sup> W uznaniu moich osiągnięć zostałam również zaproszona do wygłoszenia referatu zatytułowanego „*Non-thermal effects of exposure to Near Infrared radiation in biological structures*” na konferencji *Vibrational Biospectroscopy and Imaging. Modern Techniques of Raman and IR imaging with Chemometric Analysis*, organizowanej przez Uniwersytet Jagielloński w Krakowie w 2013r<sup>[120]</sup>.

Ze względu na prowadzone badania i stosowane metody zespół naukowy, którego jestem członkiem, wystąpił o grant aparaturowy do Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Dzięki dofinansowaniu (nr grantu 6180/IA/119/2012, główny wykonawca) zorganizowałam w pełni wyposażone laboratorium Biospektroskopii w ramach Środowiskowego Laboratorium Bio-Optyki. Oprócz spektrometru EPR laboratorium posiada spektrometry UV-VIS, spektrometr FTIR z kilkoma przystawkami ATR oraz zestaw do badań strukturalnych z układami obrazowania mikroskopowego (mikroskop FTIR oraz mikroskop ramanowski). Od samego początku jestem kierownikiem tego laboratorium, które stanowi centrum badawcze dla środowiska wrocławskiego.

Prowadzę też badania we współpracy z instytucjami naukowymi. W ramach swojej działalności naukowej za pomocą spektroskopii oscylacyjnej (ATR-IR, Raman) badałam większe struktury biologiczne i tkanki miękkie (np. krew i jej składniki, skórę). Efektem badań w ramach utworzonego centrum oraz współpracy z Wojewódzkim Szpitalem

---

<sup>118</sup> *Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies/Book 3*, Eds. M. Komorowska i S. Olsztyńska-Janus, InTech, Rijeka, Croatia, 2011.

<sup>119</sup> Olsztyńska-Janus S., Komorowska M., *Conformational changes of L-phenyl-alanine induced by Near Infrared radiation. ATR-FTIR studies*, *Structural Chemistry* 23, 2012, 1399–1407.

<sup>120</sup> Olsztyńska-Janus S., Komorowska M., „*Non-thermal effects of exposure to Near Infrared radiation in biological structures*”, *Conference of Vibrational Biospectroscopy and Imaging. Modern Techniques of Raman and IR imaging with Chemometric Analysis*, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, 2013.

Specjalistycznym we Wrocławiu oraz Wydziałem Mechanicznym Politechniki Wrocławskiej są dwie opublikowane prace: *“Spectroscopic techniques in the study of soft tissues and their components. Part I: IR spectroscopy”*, [H. 3] oraz *“Spectroscopic techniques in the study of soft tissues and their components. Part II: Raman spectroscopy”*, [H. 4] opublikowane w Acta of Bioengineering and Biomechanics w 2012r. Badania te prowadziłam w ramach grantu Wrovasc – Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej, finansowanego przez Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka, na lata 2007–2014. Pokazałam potencjał metod spektroskopii oscylacyjnej w analizach biomedycznych. W pierwszej pracy omówiono zastosowanie spektroskopii w podczerwieni do badania tkanek miękkich i ich komponentów, oraz analizy procesów: hydratacji i denaturacji DNA, oddziaływań DNA z metalami i badania wpływu pH na strukturę DNA, procesów agregacji aminokwasów, denaturacji białek, badania osocza i erytrocytów. W przedstawionych pracach zwrócono uwagę na zastosowania biomedyczne spektroskopii IR do celów diagnostycznych i profilaktycznych, z uwzględnieniem chorób nowotworowych. W drugiej pracy opisałam zastosowanie spektroskopii Ramana do badania skóry, naczyń krwionośnych, kości, denaturacji DNA, oddziaływania DNA z metalami i analizy wpływu pH na strukturę DNA.

Technika ATR-IR została również zaproponowana do badania pierwszorzędowych produktów utleniania lipidów w hemodializie. Zastosowanie spektroskopii ATR-IR pozwoliło na oznaczenie stresu oksydacyjnego w osoczu podczas hemodializy. Badania przeprowadzono we współpracy z Ośrodkiem Badawczo-Rozwojowym Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu oraz współpracy z Uniwersytetem Przyrodniczym we Wrocławiu, gdzie przeprowadzano zabiegi hemodializy na zwierzętach. Uzyskane wyniki badań zostały zaprezentowane na konferencji Ko-oper Interdyscyplinarność badań naukowych w 2014r., oraz opublikowane w postaci artykułu *„Application of FTIR-ATR spectroscopy to determine the extent of lipid peroxidation in plasma during haemodialysis,”* w czasopiśmie BioMed Research International (2015) [H. 5].

Aktualnie prowadzę interdyscyplinarne badania naukowe, obejmujące różne nurty. Pierwszy z nich jest kontynuacją próby wyjaśnienia mechanizmu działania promieniowania NIR na struktury biologiczne, w szczególności procesów zachodzących na poziomie molekularnym. W tym celu badam za pomocą spektroskopii ATR-IR bardziej złożone obiekty (tkanki), jakimi są skóra i krew. Określiłam przejścia fazowe lipidów w skórze, modyfikacje w warstwach hydratacyjnych i zmiany konformacyjne białek w funkcji temperatury przed i po ekspozycji na promieniowanie NIR. Badania wskazały na obniżenie temperatury przejścia,

co potwierdzałoby ochronne działanie NIR. Wyniki moich badań wskazują, że lipidy i białka stają się bardziej odporne na działanie czynników zewnętrznych po ekspozycji na promieniowanie NIR. Badania zostały przeprowadzone we współpracy z prof. Mirosławem Czarneckim z Uniwersytetu Wrocławskiego oraz z prof. Zdzisławem Kielbowiczem z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Efektem współpracy są dwie publikacje „*ATR-IR study of skin components: Lipids, proteins and water. Part I: Temperature effect*” oraz „*ATR-IR study of skin components: Lipids, proteins and water. Part II: Near infrared radiation effect*” w czasopiśmie *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* (2018r.) [H. 6, H. 7]. Wyniki badań były prezentowane na konferencji międzynarodowej (XXXIV European Congress on Molecular Spectroscopy, EUCMOS, w 2018r.) i krajowej (X sympozjum: Współczesna myśl techniczna w naukach medycznych i biologicznych w 2018r. i 2019r.).

Podjęłam się również próby przeanalizowania oddziaływania podwyższonej temperatury i promieniowania UV na strukturę kwasu linolowego (LA). Wykorzystałam do tego celu klasyczne metody analizy danych spektralnych, jak również dwuwymiarową analizę korelacyjną, analizę ruchomego okna oraz analizę głównych składowych. Pod wpływem podwyższonej temperatury i promieniowania UV dochodzi do modyfikacji strukturalnych w cząsteczkach LA, przy czym amplituda zmian jest znacznie większa po naświetlaniu próbki. W procesie pierwotnym dochodzi do izomeryzacji *cis/trans*, osłabienia wiązań wodorowych i częściowego rozrywania dimerów cyklicznych. Pod wpływem rozrywania wiązań podwójnych zmniejsza się stopień nienasycenia próbki kwasu tłuszczowego LA. Wszystkim tym zmianom towarzyszą zmiany orientacji łańcuchów alifatycznych [H. 8].

Należy podkreślić, że opracowanie metodologii badań było bardzo czasochłonne, wymagało sporych nakładów finansowych i zaangażowania wielu osób. Równie duże wyzwanie stanowiło przygotowanie stanowisk doświadczalnych, wykonanie eksperymentów i szczegółowej analizy danych eksperymentalnych, które dotyczyły zmian w strukturach biologicznych zachodzących na poziomie molekularnym.

### **5.2.2. WSPÓLPRACA NAUKOWA NIE ZWIĄZANA Z TEMATEM HABILITACJI**

Wraz z doktorantką B. Kmiecik rozpoczęłam badania oddziaływania promieniowania NIR na osocze i erytrocyty wypreparowane z krwi pochodzącej od świń podłączonych do aparatury ECMO i ECLA (wspomaganie oddychania), którym podawano leki przeciwzakrzepowe (klopidogrel i aspiryna). ECMO (z ang. *extracorporeal membrane*

*oxygenation*) oznacza pozaustrojowe utlenowanie krwi, zaś ECLA (z ang. *extracorporeal lung assist*) – pozaustrojowe wspomaganie płuc. Okazuje się, że promieniowanie NIR zmniejsza stres oksydacyjny wywołany podłączeniem do krążenia pozaustrojowego. Eksperymenty przeprowadzone zostały we wspólnym projekcie badawczym z Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz Instytutem Zootechniki w Krakowie-Balicach. Wstępne badania są bardzo obiecujące i ich wyniki zostały przedstawione na konferencji the Advanced Infrared and Raman Spectroscopy (AIRS) w Łochowie w 2012r. W przygotowaniu są dwie publikacje. Dodatkowo we współpracy z dr inż. Bartoszem Krawczykiem (Katedra Systemów i Sieci Komputerowych, Wydział Mechaniczny Politechniki Wrocławskiej) zostały przeprowadzone obliczenia statystyczne z wykorzystaniem metody chemometrycznej PCA i metod klasyfikacji. W obliczeniach analizowano parametry spektralne widm ATR-IR próbek osocza pobranych w różnym czasie krążenia pozaustrojowego. Zastosowano różne metody klasyfikacji dających najlepsze rezultaty.<sup>[121,122]</sup> Przebadano kilka klasyfikatorów, m.in. metodę Maszyny Wektorów Wspierających (SVM), drzewo decyzyjne indukowane według algorytmu C4.5 za pomocą indeksu Giniego z przycinaniem liści, czy sieci neuronowe, które można zastosować do analiz danych biomedycznych.<sup>[123–126]</sup> Metody statystyczne pozwoliły na wyodrębnienie grupy naświetlanych zwierząt od grupy kontrolnej i grupy zwierząt, którym poddano leki przeciwzakrzepowe. Wyniki obliczeń przedstawiono na Konferencji Statystycznej, Wrocławskie Obchody 100-lecia Istnienia Polskiego Towarzystwa Statystycznego, Wrocław, 2012r.

Drugi nurt moich prac badawczych związany jest z badaniami kinetyki odbudowy mikrostruktury tiksotropowej smaru litowego we współpracy z dr inż. Maciejem Paszkowskim z Wydziału Mechanicznego Politechniki Wrocławskiej. Badania ATR przeprowadzone przez mnie określiły zmiany strukturalne smaru litowego podczas procesu relaksacji. Wyniki ATR wraz z badaniami reologicznymi przedstawiono w formie komunikatu na konferencji tribologicznej World Tribology Congress, Torino (Włochy, 2013r.) oraz dwóch publikacji naukowych w czasopismach *Industrial Lubrication and*

---

<sup>121</sup> Woźniak M., *et al.*, *Information Fusion* 16, 2014, 3–17.

<sup>122</sup> Wilk T., *et al.*, *Neurocomput.* 75, 2012, 195–193.

<sup>123</sup> Alpaydın E., *Introduction to Machine Learning*, 2nd edition, The MIT Press, Cambridge, MA, USA, London, UK, 2010.

<sup>124</sup> Surowka A.D., *et al.*, *Analyst* 2015, 140, 2015, 2428–2438.

<sup>125</sup> You Z.-H., *et al.*, *Proc. BMC Bioinformatics* 2013, 14(Suppl 8): S10.

<sup>126</sup> Garg A.X., *et al.*, *J. Am. Med. Assoc.* 293, 2005, 1223–1238.

Tribology,<sup>[127]</sup> oraz Tribology Letters w 2014r.<sup>[128]</sup> Pierwszy z nich,<sup>[127]</sup> został uznany przez edytorów czasopisma jako artykuł wyróżniający („*Outstanding Paper*”) w roku 2014.

Trzeci nurt badań dotyczy modyfikacji tkanek roślinnych pod wpływem czynników fizycznych i chemicznych we współpracy z prof. J. Detyną (Wydział Mechaniczny, Politechnika Wrocławska) i prof. H. Bujakiem (Uniwersytet Wrocławski). Kierowałam badaniami spektroskopowymi dr inż. Katarzyny Niemczyk, której byłam również promotorem pomocniczym od 1.10.2012r. Wykonano próbne widma ATR-IR zielistki Sternberga za pomocą nowo zakupionego mikroskopu IR. Widma ATR-IR liści przeanalizowano ze względu na różną zawartość wody. Zmiany hydratacji wpływają istotnie na widma ATR-IR tkanki roślinnej. Zaobserwowano duże zróżnicowanie w położeniu i względnej intensywności pasm oscylacyjnych. Badania wykazały, że istnieje możliwość zastosowania spektroskopii w podczerwieni (ATR-IR) do ilościowych badań utraty wody w tkankach roślinnych. Wyniki badań zostały przedstawione na konferencji *Vibrational Biospectroscopy and Imaging. Modern Techniques of Raman and IR imaging with Chemometric Analysis*, w Krakowie w 2013r.<sup>[129]</sup> oraz na konferencji *Ko-oper Interdyscyplinarność Badań Naukowych*, w Szklarskiej Porębie w 2013r.<sup>[130]</sup>

Dodatkowo rozpoczęłam współpracę z doktorantami dr hab. Marty Kopaczyńskiej, prof. PWr. Na przełomie 2014/2015 mgr inż. Aleksandra Foerster odbywała staż w laboratorium Spektroskopii Oscylacyjnej pod moim kierunkiem. Podczas stażu zaznajomiła się z podstawami spektroskopii IR z uwzględnieniem metody ATR. Metoda ATR została użyta do zidentyfikowania grup funkcyjnych powierzchni badanego materiału. Za pomocą spektroskopii ATR-IR oceniano powierzchnie dysków ze stali nierdzewnej 316L, stosowanej w produkcji stentów wieńcowych i obwodowych. Część wyników badań została dołączona do publikacji w czasopiśmie *Journal of Biomedical Materials Research: Part A* w roku 2016.<sup>[131]</sup>

---

<sup>127</sup> Paszkowski M., **Olsztyńska-Janus S.**, *Ind. Lub. Tribol.* 2 (66) (2014), 223-237.

<sup>128</sup> Paszkowski M., **Olsztyńska-Janus S.**, *I. Wilk, Tribol. Lett.* 56, 2014, 107-117

<sup>129</sup> Grabowska K., **Olsztyńska-Janus S.**, Detyna, J., *ATR-FTIR vibrational spectroscopy as a tool to study of Chlorophytum comosum*, *Vibrational Biospectroscopy and Imaging. Modern Techniques of Raman and IR imaging with Chemometric Analysis*, Kraków, 2013, str. 26.

<sup>130</sup> Grabowska K., **Olsztyńska-Janus S.**, Detyna, J., *Spektroskopia oscylacyjna ATR-FTIR jako narzędzie do badań strukturalnych zielistki Sternberga*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej Wrocław 2013, str. 238-241.

<sup>131</sup> Foerster A., Hołowacz I., Sunil Kumar G.B., Anandakumar S., Wall J.G., Wawrzyńska M., Paprocka M., Kantor A., Kraskiewicz H., **Olsztyńska-Janus S.**, Hinder S.J., Biały D., Podbielska H., Kopaczyńska M., *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 104(4), 2015, 821-832.

Swoją wiedzę i doświadczenie w obszarze fotobiologii, mechanizmu działania promieniowania NIR oraz zastosowania metod oscylacyjnych do badaniach tkanek i struktur biologicznych wykorzystałam do napisania rozdziałów w monografiach [H. 6] <sup>[1,132-134]</sup>.

Efektom dotychczasowej pracy naukowej jest 58 publikacji naukowych, w tym 20 artykułów, 1 podręcznik, 1 rozdział w książce międzynarodowej, 7 rozdziałów w książkach w języku polskim, 5 zarejestrowanych referatów, 22 komunikatów konferencyjnych, 1 streszczenie (abstrakt konferencyjny) oraz 1 redaktorstwo pracy zbiorowej międzynarodowej.

---

<sup>132</sup> Komorowska M., **Olsztyńska-Janus S.**, *Podstawowe pojęcia fotochemii i fotobiologii*. Rozdział 4, W: *Optyka Biomedyczna. Wybrane zagadnienia*, Red.: H. Podbielska, Wydawnictwo Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2011, str. 129–136.

<sup>133</sup> Komorowska M., **Olsztyńska-Janus S.**, Szymborska-Małek K., *Wykorzystanie oddziaływania światła w bliskiej podczerwieni na struktury biologiczne*. Rozdział 15, W: *Optyka Biomedyczna. Wybrane zagadnienia*, Red.: H. Podbielska, Wydawnictwo Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2011, str. 375–386.

<sup>134</sup> **Olsztyńska-Janus S.**, L. Komorowski, *Widmo oscylacyjne*. W: *Chemia fizyczna*, tom 4, rozdział 17.8, Laboratorium fizykochemiczne, Red. L. Komorowski i A. Olszowski, PWN Warszawa, 2013, str. 669–679.



### 5.2.3. DZIAŁALNOŚĆ DYDAKTYCZNA

Od roku 2009 jestem Członkiem Komisji ds. Dyplomowania na studiach I oraz II stopnia na kierunku Inżynieria Biomedyczna, specjalność Optyka Biomedyczna, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Politechnika Wrocławska.

W ciągu kilku lat pracy zawodowej byłem dodatkowo promotorem dwudziestu jeden prac magisterskich i czterdziestu jeden prac inżynierskich. Dwie osoby spośród moich dyplomantów ukończyły studia doktoranckie na Politechnice Wrocławskiej. Wiele z tych prac uzyskało ocenę celującą, a dwie prace uzyskały pierwszą (w 2013r.) i trzecią (w 2012r.) nagrodę na najlepszą pracę magisterską w dziedzinie Inżynierii Biomedycznej w konkursie zorganizowanym przez Stowarzyszenie Elektryków Polskich, Oddział Wrocław. Niektóre prace kończyły się opublikowaniem wyników w materiałach konferencyjnych lub publikacjami.

Recenzowałem również prace dyplomowe w dziedzinie Inżynierii Biomedycznej (12 prac magisterskich oraz 19 prac inżynierskich).

Od kilku lat współpracuję z doktorantami, ucząc ich badania i analizowania struktur biologicznych, technik spektroskopowych oraz komputerowej analizy danych eksperymentalnych. Dnia 26.05.2017r. odbyła się publiczna obrona mgr inż. Katarzyny Niemczyk, której byłem promotorem pomocniczym, a promotorem głównym był dr hab. inż. Jerzy Detyna, prof. nadzw. PWr. Praca na temat: *„Wpływu niektórych czynników stymulacyjnych na wzrost, rozwój oraz właściwości biomechaniczne wybranych roślin”* została wyróżniona (Politechnika Wrocławska, Wydział Mechaniczny). Od 1.10.2013 roku w ramach wkładu w rozwój kadry naukowej byłem promotorem pomocniczym kolejnego doktoranta na ww. wydziale, a mianowicie mgr inż. Barbary Kmiecik, której promotorem głównym był dr hab. inż. Jerzy Detyna, prof. nadzw. PWr. Tematyka pracy dotyczyła *„Stereofotogrametrycznej metody identyfikacji geometrii powierzchni obciążonej mechanicznie przeznaczonej do zastosowań biomedycznych”* i prowadzona była w ramach *Studiów Interdyscyplinarnych w języku angielskim* (data otwarcia przewodu 19.03.2014). Praca została obroniona dnia 5.07.2018r. Współpracowałem również z innymi doktorantami ucząc ich spektroskopii oscylacyjnej IR i Ramana, m.in. mgr inż. Adamem Oleszką, mgr inż. Katarzyną Szymborską, mgr inż. Hanną Misiak, mgr inż. Katarzyną Wysocką-Król, mgr inż. Aleksandrą Foerster, mgr inż. Robertem Michalem, mgr inż. Maciejem Dudą.

Oprócz badań naukowych prowadziłam różne zajęcia dydaktyczne (fizykochemiczne i komputerowe) na kierunkach Fizyka i Fizyka Techniczna (specjalność Inżynieria Biomedyczna), m.in. Analizę Danych Spektroskopowych jako zajęcia autorskie: wykład, projekt, laboratorium. Do wielu z nich przygotowywałam materiały dydaktyczne, jak np. do Podstaw Chemii Ogólnej (ćwiczenia rachunkowe), Fizykochemii Materiałów (ćwiczenia rachunkowe), Pakietów Matematycznych z oprogramowaniem Matlaba (wykład i laboratorium), Technologii informacyjnych (laboratorium), Języków programowania (laboratorium), Programowania w języku C (laboratorium). W roku akademickim 2020-2022r. opanowałam nowy materiał z trzech przedmiotów: Pakiety obliczeniowe (laboratorium), Mikrokontrolery z programowaniem w języku Assembler (laboratorium) oraz Wstęp do programowania w języku Python (laboratorium).

Prowadzę również staże dydaktyczno-naukowe. W dniach 1.08–30.09.2013 mgr inż. A. Skotny, doktorantka Akademii Medycznej, odbywała staż w laboratorium Spektroskopii Oscylacyjnej pod moim kierunkiem. Podczas stażu zaznała się z podstawami spektroskopii IR i metody ATR, obsługi spektrometru IR i mikroskopu IR. Poznała procedury przygotowania próbek biologicznych do badań spektroskopii oscylacyjnej, analizy danych spektroskopowych. W ramach stażu rozpoczęliśmy badania probiotyków za pomocą technik spektroskopii oscylacyjnej, co zaowocowało zaprezentowaniem wyników na V Sympozjum Współczesna Myśl Techniczna w Naukach Medycznych i Biologicznych we Wrocławiu (2014r.). Próbuje udoskonalić potencjalne zastosowanie tych technik do badania wybranych leków.

#### **5.2.4. DZIAŁALNOŚĆ ORGANIZACYJNA**

W latach 2005–2007 brałam aktywny udział w pracach Komisji Programowej (Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Politechnika Wrocławska), pracującej nad zmianami programowymi na Politechnice Wrocławskiej dla kierunku Fizyka zgodnie z Programem Bolońskim. Przygotowywałam program nauczania i plany studiów dla specjalności Inżynieria Biomedyczna na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki Politechniki Wrocławskiej na rok akademicki 2005/2006 i 2006/2007.

W roku 2011 byłam współorganizatorem i sekretarzem międzynarodowej konferencji 18th Meeting of the European Association for Red Cell Research, która odbyła się w dniach

12–15.05.2011. Do moich obowiązków należały wszelkie prace administracyjne, redakcja książki abstraktów, przygotowania organizacyjne i opieka nad uczestnikami konferencji.

W trakcie pracy zawodowej wykazałam się również aktywnością w pracy na rzecz Wydziału Podstawowych Problemów Techniki oraz Instytutu Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej. Brałam udział w tworzeniu Laboratorium Fizykochemicznego, byłam odpowiedzialna za zakup głównej aparatury laboratoryjnej, materiałów i odczynników chemicznych. W roku 2011 byłam odpowiedzialna za całościowy remont Laboratorium Fizykochemicznego oraz zakup mebli laboratoryjnych.

W ramach popularyzacji nauki brałam aktywny udział na Dniach Otwartych Wydziału Podstawowych Problemów Techniki Politechniki wrocławskiej w latach 2006–2015 i reprezentowałam Politechnikę Wrocławską na targach TARED w latach 2006–2014. W maju 2016r. brałam aktywny udział w wycieczce dydaktyczno-naukowej dla studentów zagranicznych z Inżynierii Biomedycznej z University of Twente z Holandii. Studenci zaznajamiali się z funkcjonowaniem laboratoriów w Katedrze Inżynierii Biomedycznej, w tym Laboratorium Biospektroskopii. Studenci mieli możliwość zapoznania się z aparaturą spektroskopową, jak również z możliwościami badań struktur biologicznych na przykładzie prowadzonych przeze mnie eksperymentów. Organizowałam również wycieczki uczniów ze szkół średnich po laboratorium Biospektroskopii demonstrując potencjalne możliwości zastosowania metod spektroskopowych w różnych dziedzinach nauki i przemysłu.

Swoją wiedzę naukową i organizacyjną wykorzystałam do stworzenia Laboratorium Spektroskopii Oscylacyjnej, którego jestem obecnie kierownikiem. Utworzenie tego laboratorium od podstaw wymagało ode mnie dużego nakładu pracy i czasu. Jego sprawne funkcjonowanie wiązało się z licznymi dodatkowymi obowiązkami, które współdzieliłam z pracą naukowo-dydaktyczną.

#### **5.2.5. UZYSKANE WYRÓŻNIENIA**

Za swoją pracę zostałam wyróżniona nagrodami m.in.: „Outstanding Paper” (I miejsce) za wyróżniającą pracę naukową w czasopiśmie *Industrial Lubrication and Tribology* za rok 2014 (2015 r.), nagroda JM Rektora Politechniki Wrocławskiej za wyróżniający się wkład w działalność Uczelni (2012 r.), Medal Brązowy za Długoletnią Służbę na Rzecz Politechniki Wrocławskiej nadany przez Prezydenta Rzeczypospolitej Polskiej (2012 r.), Wyróżnienie Rektora za pracę w zmianach programowych na Politechnice Wrocławskiej dla kierunku

Fizyka (specjalność Inżynieria Biomedyczna) zgodnie z programem Bolońskim (2008 r.), nagroda dyrektora Instytutu Fizyki za wyróżnioną pracę doktorską (2004 r.). W trakcie swojej pracy zawodowej otrzymałam też stypendia: Stypendium International University Bremen (IUB) w Niemczech, na Szkołę Letnią "*Complex Materials: Cooperative Projects of the Natural, Engineering and Biosciences*" (2006 r.), Stypendium CEA (Commissariat à l'énergie atomique) we Francji na odbycie stażu w w/w ośrodku badawczym (2006 r.).

W latach 2022–2023 wzięłam udział w dwóch szkoleniach dydaktycznych: szkoleniu świadomościowym i warsztatach z zakresu pracy z osobami z różnymi rodzajami niepełnosprawności w procesie dydaktycznym w ramach projektu „Politechnika równych szans” (31.01.2022) oraz szkoleniu i warsztatach "TACY SAMI, A ŚCIANA MIĘDZY NAMI, czyli o różnorodności członków grup zajęciowych” w ramach projektu „Doskonałość dydaktyczna uczelni. AKCJA-INSPIRACJA" (5.07.2023). Szkolenia odbyły się na Politechnice Wrocławskiej we Wrocławiu.

Chciałabym nadmienić, że w latach 2007/2008 oraz w roku 2009 miałam dwie przerwy w pracy naukowej z powodu urlopów macierzyńskich i opieki nad dziećmi.

### 5.3. PODSUMOWANIE DZIAŁALNOŚCI NAUKOWO-BADAWCZEJ

Sumaryczne zestawienie informacji na temat dorobku naukowo-badawczego zestawiałam w poniższej tabeli:

Wyszczególnienie		Przed doktoratem	Po doktoracie	RAZEM
<b>ORYGINALNE OPUBLIKOWANE PRACE NAUKOWE, MONOGRAFIE I PUBLIKACJE KSIĄŻKOWE</b>				
Artykuły		3	17	20
Redaktorstwo monografii i prac zbiorowych międzynarodowych		0	1	1
Współautorstwo monografii i rozdziały w książkach		0	9	9
Materiały konferencyjne	krajowe	0	20	20
	międzynarodowe	0	2	2
Referaty konferencyjne	krajowe	0	2	2
	międzynarodowe	0	3	3
Streszczenia konferencyjne	krajowe	0	0	0
	międzynarodowe	0	1	1
suma		3	55	58
<b>UDZIAŁ W KONFERENCJACH NAUKOWYCH</b>				
Wygłoszenie referatów na konferencjach naukowych	krajowe	0	7	7
	międzynarodowe	1	4	5
Prezentacja posterów na konferencjach naukowych	krajowe	3	25	28
	międzynarodowe	12	20	32
suma		16	56	72
<b>UDZIAŁ W POJEKTACH BADAWCZYCH</b>				
Udział w projektach jako wykonawca	krajowe	3	4	7
	międzynarodowe	1	1	2
<b>POZOSTAŁA DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWO-BADAWCZA</b>				
Nagrody za działalność naukową		0	3	3
Recenzje artykułów opublikowanych w czasopiśmie		0	5	5
Udział w komitetach konferencyjnych lub redakcyjnych		0	3	3
<b>WSKAŹNIKI OCENY DOROBKU NAUKOWEGO</b>				
Indeks Hirscha według bazy Web of Science		h = 13		
Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (bez autocytowań)		n = 375		
Sumaryczna wartość punktacji ministerialnych MNiSW/MEiN		314		
Sumaryczny impact factor według listy Journal Citation Reports		IF = 34,296		

*Sylwia Ostygińska-Janusz*  
(podpis wnioskodawcy)