

## Streszczenie

W rozprawie doktorskiej przedstawiono podsumowanie wyników badań prowadzonych w okresie 2014 – 2017 w ramach studium doktoranckiego. Prowadzone badania miały na celu opracowanie nowych procedur analitycznych pozwalających na ilościową analizę i wizualizację rozmieszczenia pierwiastków, będących składnikami implantów stomatologicznych, na powierzchni błony śluzowej jamy ustnej, przy użyciu metody LA-ICP-MS.

Intensywny rozwój technik analitycznych umożliwia uzyskanie coraz większej ilości informacji z badanego obiektu. Zasadniczo, w celu określenia zawartości pierwiastków, szczególnie na poziomie śladowym, próbkę stałą najpierw się mineralizuje, a następnie analizuje powstały roztwór technikami spektroskopowymi, jak np. SN-ICP-MS, ICP-OES czy AAS. Procedura mineralizacji prowadzi do utraty informacji o przestrzennym rozmieszczeniu i formie występowania pierwiastków w próbce, zapewniając jedynie uśrednioną zawartość analitu w całej masie próbki. Zastosowanie metody LA-ICP-MS pozwala na pomiar zawartości pierwiastków na powierzchni próbki stałej bez potrzeby mineralizacji próbki, generując przestrzenne mapy rozmieszczenia i zawartości analitów o rozdzielczości do 10  $\mu\text{m}$ . Metoda LA-ICP-MS umożliwia analizę próbek o małych wymiarach, rzędu kilku mm i wadze kilku miligramów, takich jak próbki kliniczne. Metoda charakteryzuje się dwuwymiarową analizą powierzchni lub profilu głębokości próbki stałej in-situ, zwykle minimalnym przygotowaniem próbki przed analizą, działaniem mikroniszczącym na próbkę oraz dobrymi wartościami czułości, precyzji i granicy wykrywalności. LA-ICP-MS jest metodą porównawczą, która opiera się na pomiarze sygnałów serii wzorców i ustaleniu zależności kalibracyjnej przed analizą właściwej próbki. Ze względu na brak wzorców i CRMów dedykowanych do analizy tkanek metodą LA-ICP-MS należy opracowywać i stosować alternatywne strategie kalibracji, tak aby warunki fizykochemiczne ablacji wzorców i badanej próbki były zbliżone, umożliwiając poprawną analizę ilościową próbek.

Przeprowadzone studia literaturowe mające na celu pogłębienie posiadanej wiedzy na temat bezpośredniej analizy próbek klinicznych metodą LA-ICP-MS ukazały szerokie możliwości zastosowania tej nowej zaawansowanej metody analitycznej w mapowaniu pierwiastków we fragmentach organów, badaniu mechanizmów chorobowych, oddziaływaniu materiałów protetycznych z otaczającą tkanką, transportem i miejscem działania leków. Jednocześnie pozwoliły zidentyfikować problemy pojawiające się podczas kreowania nowych procedur analitycznych, takie jak: opracowanie odpowiedniej strategii kalibracji tak, aby zapewnić zgodność wzorców i próbki badanej, optymalizacja parametrów aparatury w celu uzyskania intensywnych sygnałów w określonym czasie generując mapy zawartości analitów o pożądanej rozdzielczości przestrzennej, zapewnienie jakości wyników pomiarów, co wymaga stosowania zwalidowanych procedur i zapewnienia spójności pomiarowej przy jednoczesnym braku

odpowiednich CRMów i wzorców, dedykowanych metodzie LA-ICP-MS. W części literaturowej omówiono następujące zagadnienia: (i) podstawy fizykochemiczne metody LA-ICP-MS oraz możliwości i ograniczenia w analizie próbek stałych, takie jak interferencje, frakcjonowanie, konieczność opracowania indywidualnego podejścia do kalibracji, (ii) wybrane strategie kalibracji, (iii) aspekty analizy próbek klinicznych, (iv) przegląd literatury naukowej, w której do badań nad próbkami klinicznymi metodą LA-ICP-MS wdrożono zasady metrologii. W literaturze naukowej często brakuje elementów metrologii chemicznej w pomiarach lub całkowicie jest ona pomijana. Wprowadzenie metrologii w pomiarach chemicznych stanowi istotne i nieodłączne narzędzie umożliwiające uzyskanie miarodajnych i porównywalnych wyników analiz, których osiągnięcie jest możliwe poprzez przeprowadzenie walidacji procedury analitycznej, zapewnienie spójności pomiarowej do wzorca wyższego rzędu i jednostek układu SI oraz przedstawianie wyniku pomiaru wraz z niepewnością.

W części eksperymentalnej przedstawiono sposób opracowania trzech procedur analitycznych w celu uzyskania informacji o rozmieszczeniu i zawartości analizowanych pierwiastków na powierzchni badanych próbek metodą bezpośredniej analizy próbki stałej, LA-ICP-MS. Procedury różniły się sposobem przygotowania próbek i wzorców, zastosowanym materiałem matrycowym wzorców oraz parametrami wiązki laserowej. Do przygotowania wzorców użyto materiału matrycowego o składzie zbliżonym do badanych próbek błony śluzowej – sproszkowanego białka jaja kurzego oraz CRMu będącego sproszkowaną tkanką kormorana. Po dodaniu roztworu analitu uzyskano serię wzorców, które posłużyły do wykreślenia krzywych kalibracyjnych. Aparatura pomiarowa została zoptymalizowana pod kątem uzyskania sygnałów o wystarczającej intensywności, dobrej precyzji i umożliwiającej stworzenie map zawartości analitów na powierzchni próbki o zadowalającej rozdzielczości. Przeprowadzono walidację istotnych parametrów metody analitycznej, takich jak liniowość, granice wykrywalności, precyzję i poprawność, stosując CRMy na bazie mięśni ryb i wołowych. We wszystkich pomiarach zapewniono i wykazano spójność pomiarową poprzez zastosowanie CRMów i roztworów wzorcowych opatrzonych certyfikatem zapewniającym zachowanie spójności z wzorcami wyższego rzędu oraz analizę wzorców metodą odniesienia SN-ICP-MS, po poprzedniej mineralizacji.

Opracowaną i zwalidowaną procedurę analityczną zastosowano do analizy fragmentów błony śluzowej jamy ustnej mającej kontakt z implantami na bazie tytanu i stopu Ti6Al4V. Uzyskane dwuwymiarowe mapy zawartości pierwiastków będących składnikami elementów implantu (Ti, Al, V) wskazują jednoznacznie na obecność dużej ilości tych pierwiastków na powierzchni badanych tkanek. Zastosowanie procedur z wiązką laserową o zmniejszonej średnicy pozwoliło na poprawę rozdzielczości uzyskiwanych map, a zastosowanie mikroskopii optycznej umożliwiło wykonanie fotografii powierzchni tkanek. Wymienione narzędzia wskazały, że głównym źródłem wysokich sygnałów analizowanych pierwiastków są liczne drobiny metaliczne o wymiarach do ok. 100  $\mu\text{m}$ . Drobiny te są

pozostałością po zabiegu implantacji lub uwalniają się podczas użytkowania implantu oraz w wyniku korozji implantu w zmiennym środowisku jamy ustnej.