

AUTOREFERAT

dr Anetta Maria Hanć

**Ablacja laserowa z detekcją ICP-MS
w badaniach *in situ* pierwiastków w tkankach miękkich i twardych**



**Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu
Wydział Chemii**

Poznań, 2017r

Spis treści

1. Imię i Nazwisko.
2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe.
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu.
4. Wskazanie osiągnięcia naukowego wynikającego z art.16 ust.2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.2016 r. poz.882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz.1311.)
 - a) Tytuł osiągnięcia naukowego.
 - b) Wykaz publikacji habilitacyjnej stanowiących osiągnięcie naukowe, o którym mowa w art.16 ust.2 ustawy.
 - c) Omówienie celu naukowego i najważniejszych osiągnięć zawartych w pracach stanowiących podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego.
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

1. Imię i Nazwisko: Anetta Maria Hanć (z d. Kanecka)

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

20 VI 2008	stopień doktora nauk chemicznych, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. <i>Tytuł rozprawy:</i> Optymalizacja czynników wpływających na bezpośrednie oznaczanie pierwiastków w stałych próbkach środowiskowych metodami spektroskopowymi SS-ET-AAS, SS-ICP-OES, LA-ICP-MS. <i>Promotor:</i> Prof. dr hab. Danuta Barałkiewicz
01 X 2004 – 30 IX 2008	uczestnik Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
03 VI 2004	tytuł magistra chemii, specjalność: chemia środowiska, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu <i>Tytuł pracy:</i> Studia nad czynnikami warunkującymi prawidłowe oznaczanie kobaltu w osadach ściekowych metodą SS-ET-AAS <i>Promotor:</i> Prof. dr hab. Danuta Barałkiewicz
X 1999 – VI 2004	studia magisterskie, specjalność: chemia środowiska, Wydział Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
1999	egzamin dojrzałości, Liceum Ogólnokształcące im. M. Curie-Skłodowskiej w Pile

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych.

1 X 2009 – do dzisiaj	adiunkt, Pracownia Analizy Spektroskopowej Pierwiastków, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
1 XII 2008 – 30 VI 2009	adiunkt, Pracownia Analizy Spektroskopowej Pierwiastków, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu (umowa na zastępstwo)
28 VII 2014 – 27 VII 2015	urlop macierzyński

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

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,

**Ablacja laserowa z detekcją ICP-MS
w badaniach *in situ* pierwiastków w tkankach miękkich i twardych**

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa),

Wskaźnik IF i punktacja wg. Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego zgodna z rokiem publikacji:

H1. Hanć A., Baralkiewicz D., Piechalak A., Tomaszewska B., Wagner B., Bulska E., An analysis of long-distance root-to-leaf transport of lead in *Pisum sativum* plants by laser ablation–ICP–MS. *International J. Environmental Analytical Chemistry*. 89 (2009) 651–659.

IF₍₂₀₀₉₎=1.703; MNiSW=15pkt; cyt. WoS/Scopus=14/14

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu badań, uczestniczeniu w wykonywaniu pomiarów, interpretacji uzyskanych wyników oraz napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

H2. Hanć A., Komorowicz I., Iskra M., Majewski W., Baralkiewicz D.(2011) Application of spectroscopic techniques: ICP-OES, LA-ICP-MS and chemometric methods for studying the relationships between trace elements in clinical samples from patients with atherosclerosis obliterans. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 399 (2011) 3221-3231.

IF₍₂₀₁₁₎=3.578; MNiSW=40pkt; cyt. WoS/Scopus=11/13

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, doborze metod, wykonaniu analiz metodami LA-ICP-MS i ICP-OES, analizie danych metodami chemometrycznymi, interpretacji uzyskanych wyników oraz napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

H3. Hanć A., Olszewska A., Baralkiewicz D. Quantitative analysis of elements migration in human teeth with and without filling using LA-ICP-MS. *Microchemical Journal* 110 (2013) 61–69.

IF₍₂₀₁₃₎=3.583; MNiSW=30pkt; cyt. WoS/Scopus=8/12

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu procedury pomiarowej, zaplanowaniu i wykonaniu analiz metodą LA-ICP-MS, interpretacji i opracowaniu uzyskanych wyników oraz napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

H4. Hanć A., Piechalak A., Tomaszewska B., Baralkiewicz D. Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry in quantitative analysis and imaging of plant's thin sections. *International Journal of Mass Spectrometry*, 363 (2014) 16-22.

IF₍₂₀₁₄₎=1.972; MNiSW=25pkt; cyt. WoS/Scopus=8/9

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przygotowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu eksperymentu, wykonaniu analiz metodami LA-ICP-MS oraz SN-ICP-MS, analizie danych, interpretacji uzyskanych wyników oraz napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy w całości pracy szacuję na 80%.

H5. Hanć A., Małecka A., Kutrowska A., Bagniewska-Zadworna A., Tomaszewska B., Baralkiewicz D. Direct analysis of elemental biodistribution in pea seedlings by LA-ICP-MS, EDX and confocal microscopy: Imaging and quantification. *Microchemical Journal*, 128 (2016) 305-311.

IF₍₂₀₁₆₎=3.034; MNiSW=35pkt; cyt. WoS/Scopus=0/0

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu koncepcji badań, przygotowaniu planu badań, doborze metod pomiarowych, wykonaniu pomiarów metodą LA-ICP-MS i uczestniczeniu w analizach metodą EDX, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników oraz napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

H6. Sajnog A., Hanć A., Makuch K., Koczorowski R., Barańkiewicz D., Study on quantitative analysis of Ti, Al and V in clinical soft tissues after placing the dental implants by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B. Atomic Spectroscopy*, 125 (2016) 1-10.

IF₍₂₀₁₆₎=3.241; MNiSW=35pkt; cyt. WoS/Scopus=1/2

Mój wkład w powstanie tej pracy obejmuje pomoc w sformułowaniu hipotez badawczych, zaplanowaniu badań, interpretacji wyników badań oraz korygowanie ostatecznej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 40%.

H7. Hanć A., Zduniak P., Erciyaz-Yavuz K., Sajnog A., Barańkiewicz D. Laser ablation-ICP-MS in search of element pattern in feathers. *Microchemical Journal*, 134, 2017, 1-8.

IF₍₂₀₁₆₎=3.034; MNiSW=35pkt; cyt. WoS/Scopus=0/0

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w sformułowaniu hipotez badawczych, opracowaniu procedury pomiarowej, przygotowaniu materiału do badań, przeprowadzeniu analiz metodami LA-ICP-MS oraz SN-ICP-MS, dokonaniu interpretacji wyników pod kątem rozmięszczenia pierwiastków oraz napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

Za osiągnięcie:

łączna wartość wskaźnika IF: **20,145;**

łączna wartość punktacji MNiSW: **215;**

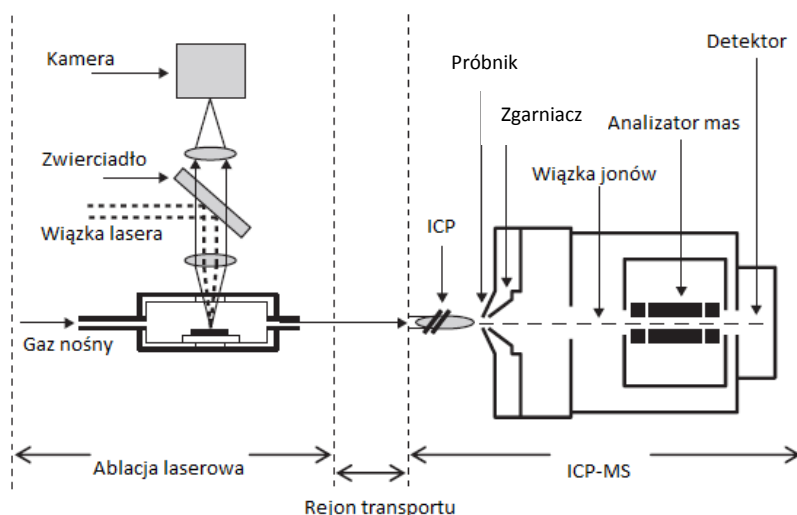
cytowania na podstawie bazy Web of Science: **42**

cytowania na podstawie bazy Scopus: **50**

WPROWADZENIE

Najbardziej rozpowszechnionym sposobem wprowadzania próbki do plazmy jest rozpylenie roztworów, co w przypadku próbek stałych wiąże się z ich rozpuszczeniem, roztwarzaniem lub mineralizacją. Ominięcie etapu przygotowania próbki (przeprowadzenia próbki do roztworu) stało się możliwe dzięki połączeniu układu detekcji (AAS, ICP-OES, ICP-MS) z układem ablacji laserowej (LA). Pierwsze połączenie ablacji laserowej z ICP-MS zostało opisane przez Gray'a w 1985 roku [Gray 1985]. Wyniki uzyskiwane przy zastosowaniu laserów z zakresu podczerwieni zależały od składu matrycy próbki [Gunther 2002]. Dopiero w latach 90-tych odkryto, że zastosowanie lasera emitującego fale z zakresu promieniowania UV zmniejsza zależność procesu ablacji laserowej od składu matrycy i od tego czasu obserwuje się znaczny rozwój tej techniki. Laser impulsowy działający przy długości fali 266 nm emituje promieniowanie, które zostaje zogniskowane na małej powierzchni badanej próbki. W czasie 10 ns laser emituje promieniowanie o mocy około 10^8 W cm⁻², zaś osiągnięta szybkość ogrzewania to 10^6 K s⁻¹. Absorpcja tak dużej porcji energii przez małą powierzchnię próbki prowadzi do zmiany, poprzez konwersję wewnętrzną, w energię oscylacyjną i kinetyczną, co powoduje zerwanie wiązań chemicznych i stopniowe oderwanie z powierzchni próbki stałej materii w postaci cząsteczek, atomów, jonów, elektronów i klasterów. Proces ten nazywa się ablacją termiczną [Johnstone i Rose 2001; Russo 2002a,b]. Ablacja laserowa jest złożonym procesem fizykochemicznym, którego mechanizm wciąż jest badany [Russo 2002a,b; Hattendorf and Gunther 2014]. Usunięta z powierzchni próbki materia jest transportowana do plazmy w postaci aerozolu przy pomocy gazu nośnego, najczęściej argonu. Badany materiał ulega jonizacji w plazmie, następnie jony ulegają rozdzieleniu (masa/ladunek) w analizatorze mas i ostatecznie detekcji, co pozwala

na uzyskanie informacji na temat składu pierwiastków i ich rozmieszczenia w badanej próbce stałej (Rysunek 1).



Rysunek 1. Schemat połączenia aparatury LA-ICP-MS

(Źródło: Inductively Coupled Plasma Spectrometry and Its Applications, S.J. Hill., 2007)

System do ablacji składa się z lasera, komory ablacyjnej oraz przewodów, którymi powstały aerozol jest transportowany do układu ICP-MS. Ze względu na różne rodzaje ośrodków aktywnych oraz systemów pompujących rozróżniamy wiele rodzajów laserów, m.in. lasery neodymowe, tytanowe czy też ekscymerowe. Różnica między laserami wynika między innymi z długości fali promieniowania laserowego. Najczęściej obecnie stosowanymi laserami są te, które emitują promieniowanie o długości fali 266nm, 213nm albo 193nm [Becker 2007], jednak rośnie również zainteresowanie laserami femtosekundowymi [Wiltsche i Gunther 2011]. Skupiona wiązka promieniowania laserowego kierowana jest na próbkę znajdującą się w komorze ablacyjnej. Cylindryczna komora ablacyjna o objętości od 20 cm³ do 80 cm³ jest ograniczona od góry okienkiem kwarcowym przepuszczalnym dla promieniowania laserowego. Próbka umieszczana jest na ruchomym stoliku umożliwiającym przemieszczanie się próbki względem wiązki promieniowania (x, y), a także odpowiednie zogniskowanie wiązki na jej powierzchni (z). Energia potrzebna do usunięcia cząstek z powierzchni badanego materiału zależy od jego właściwości fizykochemicznych, takich jak: skład chemiczny, barwa, temperatura topnienia i wrzenia. Procesy elektronowe i termiczne zachodzące w materiale pod wpływem promieniowania lasera, zależą od stopnia absorpcji, współczynnika rozpraszania światła oraz pojemności i przewodnictwa cieplnego, które mają znaczący wpływ na przebieg procesu ablacji a w tym, między innymi, na rozmiary powstających cząsteczek, morfologię krateru poablacyjnego czy wydajność samego już procesu ablacji [Niemax 2001; Sylvester 2008].

W celu uzyskania miarodajnych wyników oznaczeń z wykorzystaniem ablacji laserowej konieczna jest między innymi odpowiednia optymalizacja parametrów pracy lasera w zależności od właściwości fizykochemicznych próbki oraz opracowanie procedury pomiarowej dostosowanej do celu badań oraz rodzaju analizowanej próbki [Garcia i in.2009]. Ablacja laserowa próbki pozwala zarówno na prowadzenie pomiarów *in situ* w analizowanym materiale, jak również takich, które mogą być prowadzone bezpośrednio *in vivo* w materiale stałym. Do niedawna, w celu poznania zawartości pierwiastków w próbkach stałych, szczególnie na poziomie śladowym, badaną próbkę należało wstępnie zmineralizować lub spopielić w celu uzyskania roztworu. Zabieg ten powodował utratę informacji o przestrzennym ich rozmieszczeniu oraz formie występowania pierwiastków w badanej próbce, dając jedynie uśrednioną zawartość w całej masie próbki. Ponadto, próbki o małej

masie/rozmiarach takie jak próbki kliniczne często nie są reprezentatywne a dane uzyskane po ich mineralizacji niemiernodajne, skutkiem czego mogą być generowane artefakty w badaniach naukowych. Zastosowanie metody LA-ICP-MS pozwala natomiast na poznanie zawartości pierwiastków na powierzchni próbek stałych bez konieczności mineralizacji badanych próbek. Metoda LA-ICP-MS umożliwia również poznanie przestrzennego rozmieszczenia pierwiastków w próbkach o niewielkich wymiarach, rzędu kilku milimetrów i masie kilku miligramów na powierzchni, co jest przydatne podczas badania jednorodności próbek czy też identyfikowania ich składu chemicznego. Możliwy jest także pomiar profilu ciągłego, co daje możliwość obserwacji zmienności składu chemicznego w głąb ciała stałego [Thomas 2002]. Stosowanie tej metody wiąże się często z minimalnym przygotowaniem próbki przed analizą, mikroniszczącym działaniem wobec próbki, analizą wielopierwiastkową, wysoką czułością i niskimi wartościami granicy wykrywalności. Metoda ta daje również możliwość mapowania powierzchni analizowanych próbek stałych czyli przedstawienia danych w postaci dwuwymiarowych map zawartości pierwiastków z rozdzielczością przestrzenną sięgającą 10 μm [Becker 2013; Jurowski i in. 2015].

Niestety metoda LA-ICP-MS ma także pewne ograniczenia wynikające między innymi z właściwości samego źródła energii lasera, różnorodności analizowanych materiałów, czy też niewielkiej liczby handlowo dostępnych stałych substancji wzorcowych o identycznym składzie jak badane próbki [Adams i in., 2002]. Ablacja laserowa jest procesem wielowymiarowym a mechanizmy zachodzące w trakcie jej trwania, takie jak kolimacja, nukleacja, kondensacja czy też aglomeracja, wciąż podlegają badaniom [Hattendorf and Gunther, 2014, Luo i in. 2015]. Podczas procesu ablacji laserowej mamy często do czynienia ze zjawiskiem zwanym frakcjonowaniem, które powoduje, że skład aerozolu docierającego do plazmy nie odzwierciedla oryginalnego składu badanej próbki [Sylvester 2008; Luo i in. 2015]. Wszystkie etapy, począwszy od procesu wytworzenia aerozolu, poprzez jego jonizację w plazmie aż do detekcji w spektrometrze mas, wpływają znacząco na jakość uzyskiwanych wyników. W celu ograniczenia niekorzystnych zjawisk należy opracować: procedurę pomiarową poprzez staranny dobór parametrów pracy systemu do ablacji laserowej oraz kalibrację urządzenia pomiarowego. Parametry pracy lasera, takie jak: długość fali lasera, moc wiązki laserowej, czas trwania pulsu laserowego czy szerokość wiązki, mają istotny wpływ na proces ablacji, gdyż wpływają na ilość materiału ulegającego ablacji. Częstotliwość uderzeń lasera oraz energia promieniowania warunkuje głębokość i profil powstającego po ablacji krateru, determinując w ten sposób intensywność sygnału analitycznego mierzonych izotopów wybranych pierwiastków. Parametry lasera wpływają również na temperaturę materiału wokół obszaru oddziaływania wiązki promieniowania i na szybkość rozproszenia energii doprowadzonej do powierzchni. Optymalizacja tych parametrów w znacznym stopniu wpływa na jakość uzyskiwanych wyników. Natomiast aby wizualizacja rozmieszczenia pierwiastków jak najwierniej odwzorowywała ich rzeczywistą zawartość w próbce stałej, przygotowanie i analiza wzorców do przygotowania krzywej kalibracyjnej musi być przeprowadzona starannie, z uwzględnieniem charakteru, struktury i składu próbki. Niewątpliwie LA-ICP-MS jest metodą analityczną, która może być z powodzeniem zastosowana do wielopierwiastkowej analizy ilościowej próbek stałych bez potrzeby ich wcześniejszego przygotowania, jednak należy wcześniej starannie dobrać/przygotować materiał wzorcowy, zadbać o kompensację interferencji spektralnych oraz przeprowadzić optymalizację parametrów pracy lasera w zależności od charakteru badanej próbki. Ten sposób analizy próbek stałych stał się bardzo użyteczny w takich dziedzinach jak: kryminalistyka, geologia, archeometria czy materiałoznawstwo [Gratuze i in. 2001; Falcone i in. 2006; Regnery i in. 2010; Resano i in. 2010; Szykowska M i in. 2010; Wagner i in. 2012]. Zauważając lukę w światowej literaturze, w swoich badaniach zajęłam się badaniem *in situ* pierwiastków w tkankach miękkich i twardych metodą LA-ICP-MS.

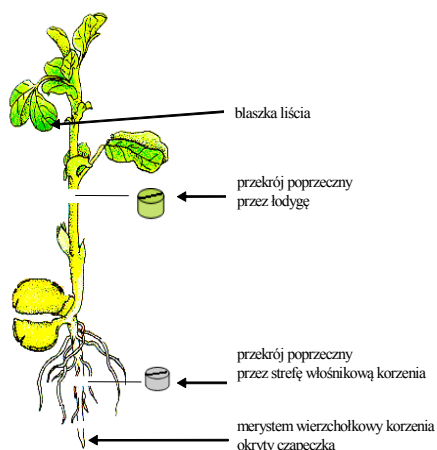
HIPOTEZY BADAWCZE ROZPRAWY HABILITACYJNEJ

Celem podjęcia niniejszych badań, zebranych jako jednotematyczne osiągnięcie naukowe **H1 – H7** w ramach rozprawy habilitacyjnej, było badanie *in situ* pierwiastków w próbkach stałych tkanek miękkich (rośliny, próbki kliniczne) i twardych (zęby, pióra) metodą LA-ICP-MS zwracając szczególną uwagę na: (i) warunki fizykochemiczne procesu ablacji; (ii) wzorcowanie układu pomiarowego LA-ICP-MS; (iii) przygotowanie nowych procedur analitycznych; (iv) wprowadzenie zasad metrologii do prowadzonych pomiarów poprzez wyznaczenie parametrów walidacyjnych metody oraz zapewnienie spójności pomiarowej wyniku pomiaru; (v) praktyczne zastosowanie opracowanych procedur pomiarowych do analizy *in situ* pierwiastków w próbkach rzeczywistych w realizowanych badaniach interdyscyplinarnych z dziedziny biologii, biochemii, medycyny oraz stomatologii.

1. Analiza *in vivo* tkanek miękkich:

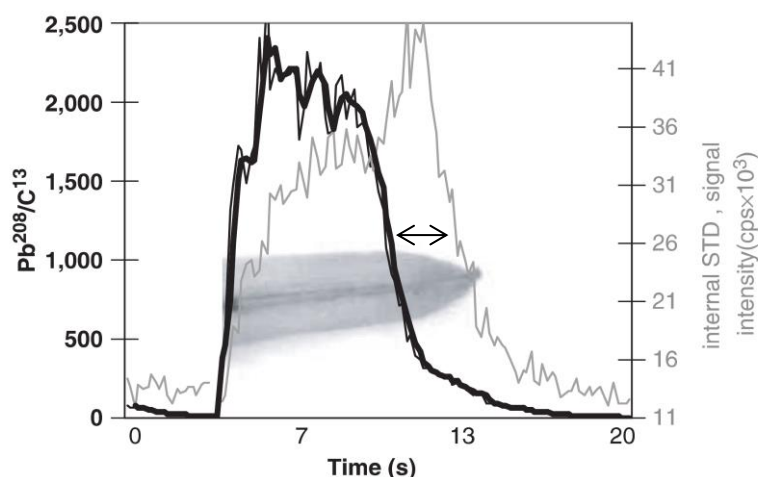
a) próbki biologiczne – tkanki roślinne

Wiele badań dostarcza informacji o zawartości pierwiastków w poszczególnych częściach roślin po ich wcześniejszej mineralizacji i następnie oznaczaniu metodami takimi jak AAS, ICP-OES lub ICP-MS. Znacznie mniej wiadomo na temat rozmieszczenia pierwiastków w różnych komórkach i tkankach roślin, zwłaszcza *in vivo*. Ablacja laserowa z detekcją ICP-MS jest doskonałym sposobem bezpośredniego oznaczania *in vivo* rozmieszczenia pierwiastków w tkankach roślin. W zależności od celu prowadzonych badań a przede wszystkim od materiału jaki poddajemy analizie należy starannie dobrać warunki pomiarowe. Optymalizacja układu do ablacji laserowej polega na doborze następujących parametrów: i) sposób prowadzenia ablacji, który jest determinowany przez cel analizy; ii) częstotliwość impulsów; iii) energia wiązki lasera; iv) szerokość wiązki promieniowania; v) czas trwania procesu ablacji. W toku prowadzonych analiz optymalizacja układu pomiarowego zawsze odbywała się w dwóch krokach. W pierwszym sprawdzano warunki pomiarowe urządzenia według zaleceń producenta urządzenia pomiarowego. Drugi krok procedury doboru warunków fizykochemicznych pomiaru był ściśle związany z analizowaną próbką i z celem analizy a odbywał się na drodze eksperymentalnej. W przypadku analizy tkanek miękkich roślin optymalizacja działania wiązki laserowej na powierzchnię próbki jest niezwykle ważna ze względu na specyfikę materiału (delikatność). W pracy **H1** opisano eksperymentalne podejście do optymalizacji wiązki laserowej stosując metodę jednej zmiennej. Optymalizując poszczególne parametry pracy lasera rejestrowano intensywność sygnału analitycznego węgla (^{13}C) podczas analizy nasady blaszki liściowej próbki rzeczywistej grochu po jej 96h hodowli. Ta część rośliny jest najbardziej delikatna i wrażliwa na działanie wiązki lasera, dlatego została wybrana do ustalenia parametrów analizy roślin metodą LA-ICP-MS [Hoffmann i in. 2000]. Głównym celem analizy roślin grochu było poznanie szlaku migracji Pb z korzenia do pędu. Badania były prowadzone we współpracy z dr Anetą Piechalak i prof. Barbarą Tomaszewską z Zakładu Biochemii Wydział Biologii UAM. Materiał badawczy stanowiły rośliny grochu (*Pisum sativum* L., odmiana Kwesor), które przez biologów traktowane są jako rośliny modelowe. Siewki grochu hodowano hydroponicznie w fitotronach w kontrolowanych warunkach wilgotności, temperatury i naświetlenia [Piechalak i in. 2002, 2003]. Do pomiarów metodą LA-ICP-MS wykorzystano rośliny grochu traktowane przez 96h 0,5 mM roztworem $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ oraz rośliny bez czynnika stresowego, które traktowano jako próbkę kontrolną. Bezpośrednio przed badaniem rośliny grochu podzielono według schematu przedstawionego na rys. 2. Analizie *in vivo* poddano kolejno: (1) merystem wierzchołkowy korzenia okryty czapeczką, (2) przekrój poprzeczny przez strefę włośnikową korzenia, (3) przekrój poprzeczny przez łodygę, (4) blaszkę liścia. W celu zbadania łodygi i strefy włośnikowej korzenia, z tych miejsc w roślinie wycięto ok. 3 mm segmenty, które poddano analizie w przekroju poprzecznym.



Rysunek 2. Schemat miejsc pobierania materiału badawczego z siewki grochu do analizy metodą LA-ICP-MS.

Analizy roślin grochu przedstawione w pracy **H1** były prowadzone w celu poznania szlaku migracji Pb w roślinach. Zastosowanie metody LA-ICP-MS w badaniach roślin grochu traktowanych przez 96 godzin 0,5 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ umożliwiło dokładną lokalizację Pb w tkankach roślinnych. Dzięki zastosowaniu ablacji laserowej szczegółowo zbadano migrację i akumulację pobranego Pb, a także określono poziom Pb przetransportowanego do części nadziemnych roślin. Różnice w ilości zakumulowanego Pb w wybranych częściach rośliny grochu wyrażono jako intensywność sygnału dla oznaczanego pierwiastka. Przeprowadzone badania pokazały, że ponad 90% pobranego przez groch Pb jest akumulowane w tkankach korzenia, natomiast zaledwie kilka procent zostało zdeponowane w częściach nadziemnych (niecały 1% w liściach). Dzięki zastosowaniu ablacji laserowej z czułym układem detekcji, ICP-MS możliwe było wskazanie dokładnych miejsc kumulacji Pb w tkankach grochu, między innymi wykazano/potwierdzono efektywność działania czapeczki korzenia (wierzchołek korzenia zbudowany z tkanki merystematycznej) jako bariery ochronnej przed wnikaniem Pb. Na Rysunku 3 przedstawiono intensywność sygnału analitycznego dla Pb oraz dla wzorca wewnętrznego węgla ^{13}C , w tle zaprezentowano zdjęcie merystemu wierzchołkowego korzenia grochu chronionego przez komórki tworzące czapeczkę korzenia.



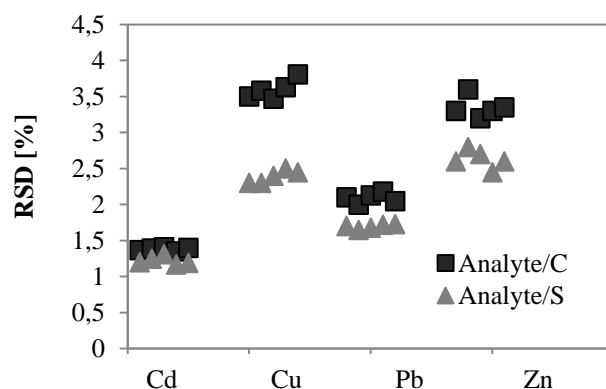
Rysunek 3. Profil akumulacji ołowiu w przekroju podłużnym wierzchołka korzenia (czapeczki, strefy merystematycznej i podziałów komórkowych korzenia). \leftrightarrow Strzałką zaznaczono komórki czapeczki korzenia, które chronią komórki merystematyczne korzenia przed wnikaniem Pb do tkanek rośliny, jako tło wykresu przedstawiono wierzchołek korzenia wraz z śladem po ablacji laserowej (**H1**).

Bardzo niska intensywność sygnału Pb w obrębie wierzchołka korzenia grochu potwierdziła efektywność czapeczki jako bariery ochronnej przed wnikaniem Pb. W większości prezentowanych do tej pory prac poziom Pb w poszczególnych tkankach roślin był określany przy użyciu technik histochemicznych [Seregin 2005]. Zaproponowana procedura analityczna może być pomocna w określeniu zdolności roślin do pobierania, transportu i akumulowania pierwiastków w swoich tkankach. Badania były finansowane z grantu KBN 1 T09D 057 30, w którym byłam wykonawcą.

Wahania w zawartości mikro- i makropierwiastków, obserwowane w czasie adaptacji do warunków stresowych, czyli działanie pierwiastków toksycznych m.in. Cd i Pb oraz w wyższych ilościach Cu i Zn, mogą znacząco wpływać na rozwój roślin. Dlatego oznaczanie *in vivo* miejsc kumulacji i migracji pierwiastków w badanych roślinach staje się istotnym elementem badań. Jednak ze względu na złożony charakter fizykochemiczny ablacji laserowej zastosowanie tej metody do bezpośredniej analizy ilościowej pierwiastków w stałych próbkach roślin wiąże się z przeprowadzeniem złożonego wzorcowania układu pomiarowego. W metodzie LA-ICP-MS kalibracja jest trudniejsza niż w metodach opartych na wykorzystaniu roztworów wodnych. Znaczące trudności są spowodowane między innymi potencjalną niezgodnością matrycy wzorca i próbki oraz zmianami masy odparowywanej próbki. Trudności te wymuszają między innymi dobór odpowiednich wzorców wewnętrznych w prowadzonych analizach oraz poszukiwania nowych strategii kalibracji.

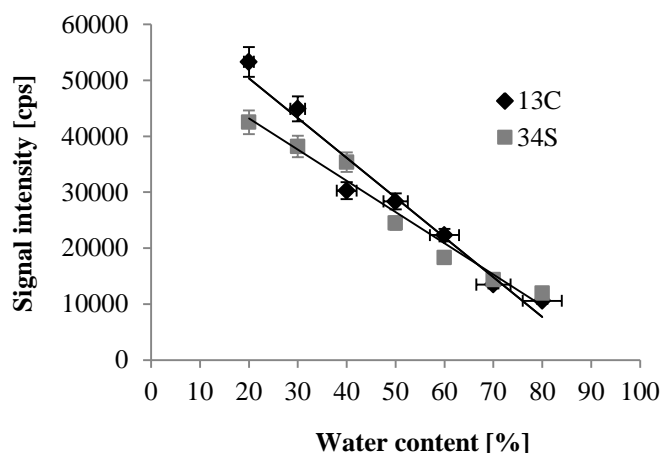
Celem dalszych badań tkanek miękkich roślin, które podjęto w pracach **H4** i **H5** było ilościowe zobrazowanie rozmieszczenia i akumulacji Cd, Cu, Pb i Zn w przekroju poprzecznym korzeni i łodyg grochu. Siewki grochu podobnie jak w badaniach opisanych w pracy **H1** były hodowane hydroponicznie na pożywce Hoaglanda przez 96 godzin. Po tym czasie rośliny przeniesiono do 100-krotnie rozcieńczonej pożywki Hoaglanda, do której dodano roztwór o stężeniu 50 μM pierwiastków w postaci soli: $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, CuSO_4 , CdCl_2 , ZnSO_4 . Materiał roślinny do analiz metodą LA-ICP-MS przygotowano dwiema metodami: i) 3mm segmenty korzenia i łodygi zostały wycięte z roślin i poddane w przekroju poprzecznym analizie *in vivo* metodą LA-ICP-MS; ii) korzenie i łodygi zostały wysuszone, zmielone, przesiane i podzielona na równe porcje o masie 200 mg i sprasowane pod ciśnieniem w tabletki o średnicy 12 mm i grubości 2 mm. Jednym z najważniejszych aspektów pracy **H4** było przygotowanie procedury analitycznej oznaczania Pb, Cd, Zn i Cu w różnych częściach roślin. Analiza ilościowa metodą LA-ICP-MS wiąże się z opracowaniem właściwej strategii wzorcowania, ze względu na brak komercyjnie dostępnych wzorców stałych, które spełniałyby warunki do zastosowania w analizie *in vivo* roślin [Hare i in. 2012]. W celu opracowania procedury analitycznej oznaczania pierwiastków śladowych, takich jak Cd, Cu, Pb i Zn w tkankach roślin metodą LA-ICP-MS przeprowadzono serię eksperymentów związanych z porównaniem trzech strategii kalibracji szczegółowo opisanych w manuskrypcie **H4**. Pierwsza strategia kalibracji opierała się na certyfikowanych materiałach odniesienia roślin (CRM, ang. *certified reference material*) (IC-INCT-OBTL-5 Oriental Basma Tobacco Leaves (ICHTJ, Polska) i NIST SRM 1515 Apple Leaves (USA)), które po sprasowaniu zastosowano do przygotowania dwupunktowej krzywej kalibracyjnej. Druga strategia kalibracji to metoda dodatku wzorca. Wzorce stałe przygotowano poprzez sprasowanie certyfikowanego materiału odniesienia NIST SRM 1515 Apple Leaves o masie 200mg, które wzbogacono odpowiednią objętością roztworu wzorcowego Cd, Cu, Pb i Zn o wzrastających stężeniach tak aby końcowe zawartości wynosiły 1, 5, 50 i 100 $\mu\text{g/g}$ dla Cd, Cu, Pb i 10, 50, 100, 500 $\mu\text{g/g}$ dla Zn. Do jednej części odważonej próbki została dodana woda destylowana i posłużyła jako próbka ślepa. Tak przygotowane próbki wysuszone i zhomogenizowano w młynie agatowym (SPEX SamplePrep LLC, New Jersey) przez 5 min. Następnie próbki skompresowano w tabletki za pomocą prasy hydraulicznej (Pye Unicam, England). Konstrukcja trzeciej strategii kalibracji polegała na przygotowaniu wzorców stałych dopasowanych matrycowo do analizowanych próbek. Rośliny grochu (*Pisum sativum* L.) wyhodowano w kontrolowanych warunkach. Następnie materiał roślinny wysuszone, zmielono, przesiano oraz podzielono na odważki o masie 200mg. Dalsze postępowanie było podobne jak w przypadku Strategii II. Końcowe zawartości przygotowanych wzorców były w zakresie 1-100 $\mu\text{g/g}$ dla Cd, Cu, Pb i 10-500 $\mu\text{g/g}$ dla Zn. W pracy **H4** dużo uwagi

poświęcono na dobór odpowiedniego wzorca wewnętrznego. Powszechnym i niepożądanym zjawiskiem podczas ablacji laserowej jest frakcjonowanie, czyli niestechiometryczne przeprowadzenie pierwiastków z próbki stałej do plazmy [Becker i in. 2007; Koch i in. 2008; Garcia i in. 2009]. W celu zminimalizowania tego zjawiska często stosuje się korekcję sygnału analitu w oparciu o sygnał wzorca wewnętrznego. Dlatego wzorzec wewnętrzny powinien zachowywać się podobnie do oznaczanego analitu podczas procesu ablacji oraz po wprowadzeniu do plazmy, a także być homogenicznie rozmieszczony w próbce. Dla próbek stałych wzorcem wewnętrznym jest najczęściej substancja naturalnie w nich występująca, w stosunkowo dużej ilości. W przypadku analizy próbek biologicznych w tym próbek roślinnych najczęściej stosowanym wzorcem wewnętrznym jest izotop węgla ^{13}C [H1, Hoffman i in. 2000, Becker i in. 2008, Wu i in. 2009]. Jednak badania fizykochemiczne procesu ablacji laserowej pokazują, że zastosowanie izotopu węgla jako wzorca wewnętrznego może być obciążone dużym błędem, z powodu bliskości masy ^{13}C z szeroko rozpowszechnionym izotopem azotu o masie ^{14}N a także z powodu dużego rozpraszania się (strat) węgla podczas ablacji laserowej próbek o bogatych matrycach węglowych. Dodatkowo podczas analizy metodą LA-ICP-MS próbek, których matryca zawiera węgiel dochodzi do powstania dwóch oddzielnych faz: fazy gazowej zawierającej węgiel, CCGS (ang. *carbon-containing gaseous species*) oraz cząstek stałych zawierających węgiel, CCP (ang. *carbon-containing particle*). Zachowanie tych dwóch faz w plazmie jest odmienne, CCGS ulega atomizacji i jonizacji, z kolei CCP ulega dodatkowo odparowaniu, czego skutkiem jest dominacja intensywności sygnału węgla pochodzącego z CCGS [Frick and Gunther 2012]. Pomimo wielu przeciwwskazań do stosowania węgla jako wzorca wewnętrznego wykazano, że jeżeli sygnał analityczny pochodzący od próbki stanowi co najmniej 6% całkowitego sygnału węgla, węgiel może być zastosowany jako wzorzec wewnętrzny w analizie tkanek miękkich [Austin i in. 2011]. Wybór odpowiedniego wzorca wewnętrznego w analizie próbek biologicznych (roślin) jest ograniczona ze względu na trudności w wyborze naturalnie występujących pierwiastków w matrycy próbki. Zawartość i rozmieszczenie pierwiastków w próbkach biologicznych jest różna w różnych tkankach, a w przypadku roślin jest zależna głównie od czynników środowiskowych, takich jak światło słoneczne, temperatura czy dostępność mikroelementów. W manuskrypcie H4 po raz pierwszy w literaturze zaproponowano izotop siarki ^{34}S jako wzorzec wewnętrzny w analizie roślin. Siarka jest pierwiastkiem równomiernie rozmieszczonym w roślinach i jej rozmieszczenie nie ulega wpływom środowiska zewnętrznego. W pracy H4 przeprowadzono analizy, w których porównywano zachowanie siarki jako proponowanego wzorca wewnętrznego i węgla jako najczęściej stosowanego wzorca wewnętrznego. Precyzja pomiaru uzyskana dla ^{34}S jako wzorca wewnętrznego była od 0,5% do 2,5% lepsza niż w przypadku stosowania ^{13}C jako wzorca wewnętrznego, co przedstawiono na Rysunku 4. Analiza *in vivo* roślin związana jest z analizą próbek stałych, które zawierają wodę. Wcześniejsze badania pokazują, że wzorzec ^{34}S podobnie jak ^{13}C jest zależny od zawartości wody w analizowanej próbce i może przechodzić do fazy gazowej podczas ablacji [Frick and Gunther 2012].



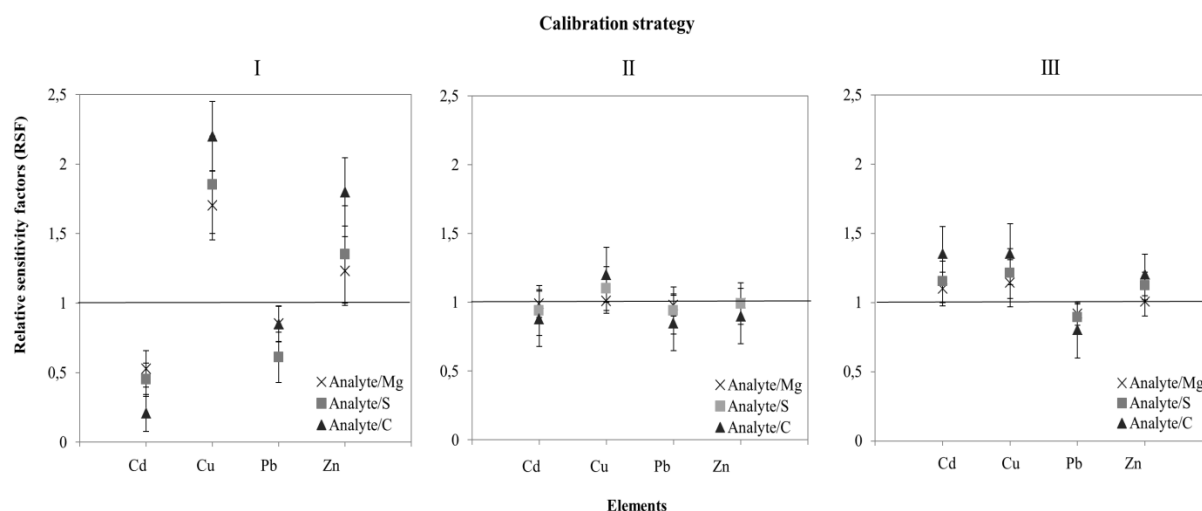
Rysunek 4. Precyzja pomiaru wybranych pierwiastków w zależności od zastosowanego wzorca wewnętrznego w przygotowanej próbce NIST SRM 1515 Apple Leaves (n = 5) (H4).

Dlatego przed przystąpieniem do analizy roślin *in vivo*, zbadano wpływ wody na intensywność jonów badanych pierwiastków podczas analizy metodą LA-ICP-MS. Analizie poddano próbki materiału roślinnego (NIST SRM 1515), które różniły się zawartością wody. Uzyskane wyniki przedstawiono na Rysunku 5.



Rysunek 5. Zależność natężenia sygnałów analitycznych ^{34}S i ^{13}C w zależności od zawartości wody w przygotowanej próbce materiału roślinnego (Apple Leaves NIST SRM 1515 (n = 3) (H4).

Przygotowane strategie kalibracji porównano wyznaczając względny współczynnik czułości, RSF (ang. *relative sensitivity factor*) (Rysunek 6). Dzięki uzyskanym wynikom zweryfikowano różnice w tworzeniu jonów, transporcie oraz oznaczaniu Cd, Cu, Pb i Zn w próbkach roślin metodą LA-ICP-MS. Do porównań oprócz izotopów ^{34}S i ^{13}C jako badanych wzorców wewnętrznych dodano również izotop ^{26}Mg . Magnez jest opisywany w literaturze jako pierwiastek, który nie ulega frakcjonowaniu podczas procesu ablacji, dzięki czemu możliwa była kontrola ewentualnych efektów frakcjonowania.



Rysunek 6. Względny współczynnik czułości dla Cd, Cu, Pb i Zn w zależności od stosowanej strategii kalibracji i wzorca wewnętrznego (H4).

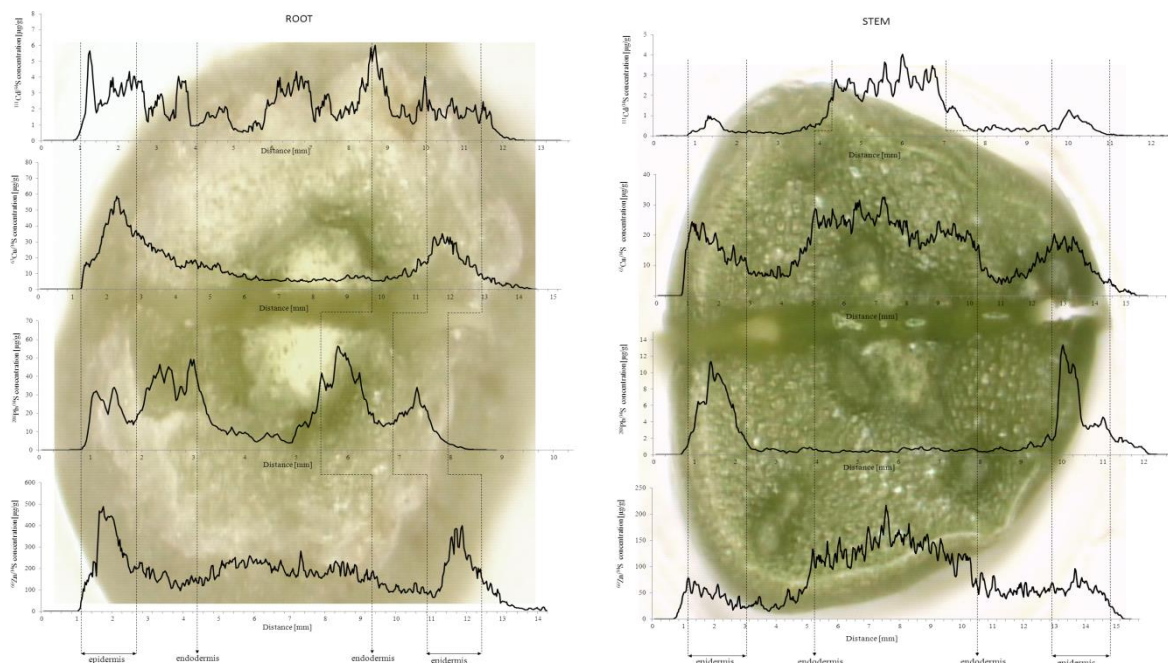
Z trzech porównywanych w manuskrypcie H4 strategii kalibracji do oznaczania Cd, Cu, Pb i Zn w tkankach roślin wybrano metodę dodatku wzorca (strategia II) oraz dodatkowo izotop ^{34}S jak wzorec wewnętrzny. Wybrana krzywa kalibracyjna charakteryzowała się najlepszymi współczynnikami korelacji dla Cd, Pb, Zn $R=0.999$ i dla Cu $R=0.99$. Dodatkowo stosując strategię kalibracji II a jako wzorec wewnętrzny izotop siarki ^{34}S uzyskano RSF bliski 1.

Siarka ma właściwe cechy wzorca wewnętrznego takie jak: możliwość zastosowania do konkretnej metody, brak dodatkowych reakcji z innymi składnikami oznaczanej próbki, równomierne rozmieszczenie w badanej próbce. W pracy **H4** udowodniono, że może być ona stosowana jako wzorec wewnętrzny w badaniu tkanek miękkich roślin. Dokładność opracowanej procedury pomiarowej sprawdzono przy użyciu certyfikowanego materiału odniesienia NIST SRM 1570a Trace Elements in Spinach Leaves. Wyznaczone parametry walidacyjne procedury analitycznej oznaczania Cd, Cu, Pb i Zn metodą LA-ICP-MS zebrano w Tabeli 1.

Tabela 1. Parametry walidacyjne oznaczania Cd, Cu, Pb i Zn metodą LA-ICP-MS (n=10) (**H4**).

Element	Validation parameters of the analytical procedure					Within-laboratory reproducibility		
	Single laboratory precision (CV)				LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Short-term variability (%)	Long-term variability (%)
	Concentration range ($\mu\text{g/g}$)	Relative standard deviation (%)						
Cd	1-100	1.2	0.06	0.20	1.8	3.5		
Cu	1-100	2.7	0.10	0.33	2.9	3.6		
Pb	1-100	1.7	0.05	0.17	1.7	2.9		
Zn	10-500	2.3	0.25	0.83	3.2	5.3		

Opracowaną i opisaną w manuskrypcie **H4** procedurę analityczną ilościowego oznaczania *in vivo* pierwiastków w tkankach miękkich roślin zastosowano do zobrazowania rozmieszczenia i kumulacji pierwiastków w tkankach korzenia i łodygi grochu w przekroju poprzecznym metodą LA-ICP-MS. Zdolność roślin grochu do kumulowania i transportu pierwiastków takich jak Cd, Cu, Pb i Zn z korzenia do łodygi przedstawiono na Rysunku 7.

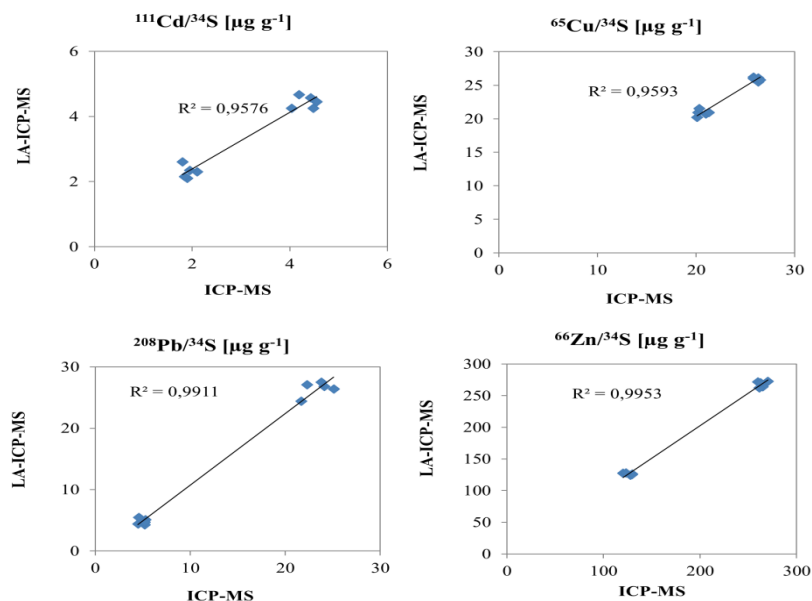


Rysunek 7. Zobrazowanie ilościowego rozmieszczenia Cd, Cu, Pb i Zn w tkankach: (a) korzenia i (b) łodygi rośliny grochu *Pisum sativum* L. metodą LA-ICP-MS (**H4**).

Badania wskazują, że korzenie grochu zgromadziły około dwukrotnie większą ilość Cu oraz Zn w zewnętrznych częściach rośliny - epiderma i egzoderma - niż w wewnętrznych - miękisz kory, endoderma i tkanki naczyniowe. Zawartość Cd była porównywalna we wszystkich analizowanych tkankach, co tym samym potwierdza jego wysoką mobilność.

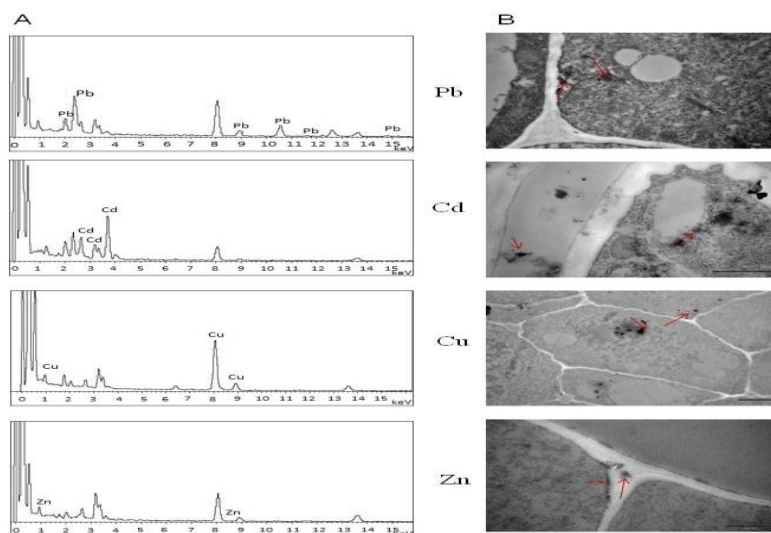
Stosunkowo wysoka zawartość Pb została oznaczona w warstwie epidermy i egzodermy, niewielkie ilości Pb zostały przetransportowane do endodermy i dalej do ksylemu a tylko nieznaczna jego ilość jest transportowana do części nadziemnych roślin. W tkankach łodyg Pb jest obecny tylko na powierzchni, jego niska zawartość w tkankach naczyniowych wskazuje na ograniczony transport z korzenia do łodygi. Endoderma niewątpliwie ogranicza transport Pb w roślinach, ale pozwala na migrację Cd, Cu i Zn. Najwyższe sygnały analityczne dla tych pierwiastków zostały zarejestrowane w tkankach naczyniowych. Dane literaturowe potwierdzają uzyskane wyniki badań [Barańkiewicz i in. 2009]. W dostępnych pracach wykazano, że Pb wiąże się z dużymi kompleksami białkowymi o masie 50kDa, przez co jest mniej mobilny niż Cd, który tworzy kompleksy białkowe o masie około 10kDa. Pierwiastki fizjologicznie potrzebne dla roślin takie jak Cu i Zn były obecne również w innych tkankach łodygi, gdzie zawartość Cd był znikoma.

W ostatnich latach dokonano znacznego postępu naukowego w zrozumieniu mechanizmów fizjologicznych podstawowego wychwytu i transportu pierwiastków w roślinach [Yang i in. 2005; Kopittke i in. 2009; Donner i in. 2012]. Udowodniono, że duża część pierwiastków po pobraniu przez rośliny jest gromadzona w korzeniach. Część pierwiastków jest transportowana z korzeni do pędów przez ksylem [H1; H4; H5; Metzner i in., 2010; Sokołowska i in., 2012; Kutrowska i in., 2014]. W komórkach roślinnych pierwiastki mogą wiązać się z aminokwasami, peptydami, białkami, kwasami organicznymi i często osadzonymi w wakuolach i ścianach komórkowych [Kutrowska i in. 2014]. Wiele badań dostarcza informacji na zawartości pierwiastków w poszczególnych częściach roślin po ich wcześniejszej mineralizacji i następnie oznaczaniu metodami takimi jak AAS, ICP-OES lub ICP-MS. Znacznie mniej wiadomo na temat rozmieszczenia pierwiastków w różnych komórkach i tkankach roślin, zwłaszcza *in vivo*. Ablacja laserowa połączona z ICP-MS jest doskonałym sposobem bezpośredniego oznaczania *in vivo* rozmieszczenia pierwiastków w tkankach roślin. W badaniach przedstawionych w pracach H4 i H5 zastosowano ablację laserową do określenia zawartości Cd, Cu, Pb i Zn w poszczególnych tkankach rośliny modelowej jaką jest groch oraz określenia ich drogi transportu. Do oznaczenia rozmieszczenia Cd, Cu, Pb i Zn metodą LA-ICP-MS w tkankach korzenia roślin grochu zastosowano procedurę analityczną opracowaną i zwalidowaną w pracy H4. Spośród czterech oznaczanych pierwiastków, Cu i Zn są niezbędne do prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin, natomiast Cd i Pb są dla nich pierwiastkami toksycznymi. Jony pierwiastków wnikają do roślin głównie przez korzenie, które są pierwszą barierą ochronną roślin. Znaczna część pierwiastków jest wiązana w ścianie komórkowej korzenia tworząc nierozpuszczalne osady. Część jonów pierwiastków przechodzi do apoplastycznej części korzeni (jest rozproszona pasywnie, aż do następnej bariery w postaci endodermy), a mniejsza część jonów pierwiastków jest transportowana symplastycznie do pędu [Ke i in. 2007; Krzesłowska i in. 2011]. W naszych badaniach (H5) stwierdzono, że zewnętrzne części korzeni grochu, takie jak naskórek i egzoderma, gromadzą około dwa razy więcej Cu i Zn w porównaniu z obszarem wewnętrznym korzeni (miąższ kory, endoderma i tkanki naczyniowe). Stosunkowo duża mobilność Cd, który tworzy kompleksy białkowe o masie poniżej 10kDa, została potwierdzona przez jego równomierny rozkład we wszystkich warstwach analizowanej tkanki. Natomiast największe ilości Pb oznaczono w epidermie i egzodermie. Warstwa endodermy zgromadziła stosunkowo mniejszą ilość Pb ograniczając jego transport do tkanki naczyniowej. Nie stwierdzono gromadzenia się Cu w warstwie endodermy, która jest pierwiastkiem istotnym dla rozwoju roślin. Obserwacje przedstawione w pracy H5 potwierdzają, że endoderma ogranicza translokację Pb w roślinach, chociaż umożliwia przemieszczanie Cd, Cu, Zn. Aby potwierdzić, wyniki uzyskane przy użyciu metodą LA-ICP-MS przeprowadzono dodatkowe analizy metodą ICP-MS. Próbkę korzeni roślin hodowanych w pożywce wzbogaconej oraz próbki korzeni roślin kontrolnych wysuszone, zważono i zmineralizowano. Uzyskane wyniki (Rysunek 7) dla metody LA-ICP-MS oraz ICP-MS były porównywalne w granicach błędu statystycznego.



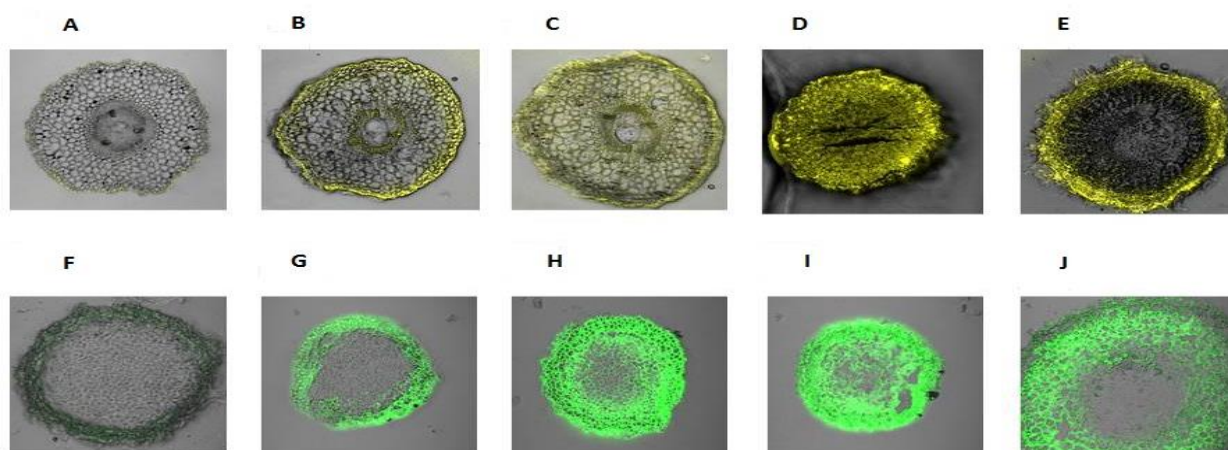
Rysunek 7. Porównanie zawartości Cd, Cu, Pb i Zn w korzeniach i łodygach roślin oznaczone metodą ICP-MS i metodą LA-ICP-MS (n = 5) (H4).

W celu potwierdzenia wyników analiz uzyskanych metodą LA-ICP-MS na temat wychwytu i translokacji pierwiastków w roślinach oraz wskazania dokładnej lokalizacji metali w ultrastrukturze komórkowej wykonano analizy techniką mikroskopii elektronowej z przystawką do mikroanalizy rentgenowskiej (EDX). Analizy metodą EDX przeprowadzono w Laboratorium Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie. Uzyskane obrazy po mikroanalizie rentgenowskiej przekrojów korzeniowych strefy merystematycznej roślin traktowanych Pb, Cu, Cd i Zn przez 72 h wykazały, że komórki uległy zniszczeniu w porównaniu z komórkami roślin kontrolnych. Na widmach promieniowania elektromagnetycznego oraz na obrazach elektronowo-mikroskopowych (Rysunek 8) obserwowaliśmy złogi metali w ścianie komórkowej, błonie komórkowej, wakuolach, cytoplazmie i organelach, takich jak: mitochondria i peroksysony.



Rysunek 8. Widma promieniowania elektromagnetycznego (A) uzyskanego z analizy miejsc w komórkach korzeni grochu hodowanego w obecności metali: Pb, Cu, Cd i Zn (B) obrazy wykonane metodą mikroskopii elektronowej z przystawką do mikroanalizy rentgenowskiej (EDX) (strzałkami zaznaczono miejsca kumulacji oznaczanych metali) (H5).

Adsorpcja pierwiastków śladowych w ścianach komórkowych jest jednym z mechanizmów obronnych roślin, przeciwko toksycznemu działaniu pierwiastków co obserwowaliśmy również podczas analizy metodą LA-ICP-MS (**H4**, **H5**). Prowadzone badania pokazują, że konsekwencją działania nadmiaru pierwiastków na roślinę jest występowanie stresu oksydacyjnego, przejawiającego się wzmożoną produkcją reaktywnych form tlenu, RFT (ang. *reactive oxygen species*) takich jak: anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet-}$), nadtlenek wodoru (H_2O_2), rodnik hydroksylowy (OH^{\bullet}) oraz powstawanie fitochelatyn [Połec-Pawlak i in. 2007; Barańkiewicz i in. 2008; Barańkiewicz i in. 2009; Małecka i in. 2012]. W pracy **H5**, w celu zlokalizowania miejsc generowania RFT w obrębie komórek roślin grochu hodowanych z dodatkiem oznaczanych pierwiastków (Cd, Cu, Pb, Zn), przeprowadzono analizy z wykorzystaniem techniki mikroskopii konfokalnej. Badania wykonała dr Arleta Małecka z Zakładu Biochemii i Biotechnologii UAM. W celu wykrycia RFT w komórkach roślinnych stosowano inkubację tkanek korzeni grochu ze znacznikami fluorescencyjnymi, takimi jak: 2',7'-dichlorofluoresceina i dihydroetydium. W czasie analizy zaobserwowano zwiększone wytwarzanie anionorodnika ponadtlenkowego $O_2^{\bullet-}$ i nadtlenku wodoru H_2O_2 w komórkach korzeni grochu. Anionorodnik $O_2^{\bullet-}$ i H_2O_2 były widoczne głównie w epidermie, korze pierwotnej i w endodermie (Rysunek 9), co potwierdza, że są to tkanki korzeniowe odpowiedzialne za gromadzenie pierwiastków śladowych przenikających do korzeni.



Rysunek 9. Wykrywanie *in situ* anionorodnika ponadtlenkowego $O_2^{\bullet-}$ (u góry) i nadtlenku wodoru (u dołu) techniką mikroskopii konfokalnej z wykorzystaniem znaczników fluoroscencyjnych w przekrojach poprzecznych korzeni grochu roślin kontrolnych (A,B) oraz traktowanych metalami Pb, Cu, Cd and Zn o stężeniu 50 μ mol przez 24 godziny. W górnym rzędzie znacznikiem fluorescencyjnym była dihydroetydyna (B) $Pb(NO_3)_2$ (C) $CuSO_4$ (D) $CdCl_2$ (E) $ZnSO_4$ w dolnym rzędzie znacznikiem fluorescencyjnym była 2',7' dichlorofluoresceina (G) $Pb(NO_3)_2$ (H) $CuSO_4$ (I) $CdCl_2$ (J) $ZnSO_4$ (**H5**).

Prawie równomierne rozmieszczenie Cd, jak wykazały analizy metodą LA-ICP-MS, zostało potwierdzone intensywną fluorescencją dla próbek korzeni grochu inkubowanych jonami Cd. W mniejszym stopniu intensywna fluorescencja obserwowana była dla roślin inkubowanych jonami Cu, podczas gdy RFT w przypadku roślin wystawionych na działanie odpowiednio Pb i Zn były zlokalizowane w ściśle określonych strefach korzenia (epiderma i endoderma) grochu. Wynikiem badań przeprowadzonych w pracy **H5** było poznanie ilościowego rozmieszczenia pierwiastków (Cu, Zn, Cd, Pb) w tkankach korzeni grochu metodą LA-ICP-MS i EDX, na poziomie tkanek i organelli komórkowych w odniesieniu do negatywnego wpływu tych pierwiastków, co potwierdzono oznaczając RFT techniką mikroskopii konfokalnej.

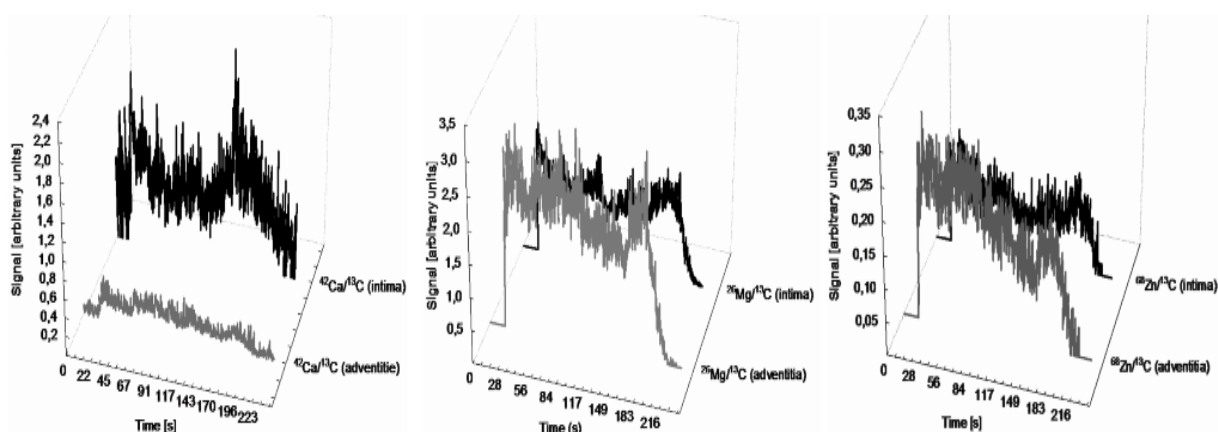
b) Próbki medyczne

Ablacja laserowa to doskonałe narzędzie w analizie próbek medycznych ze względu na zwykle niewielką ilość materiału wymaganą do badań oraz fakt, że w większości przypadków jedynie niewielkie ilości materiału dostępne są do analiz. Ablacja laserowa z detekcją ICP-MS znalazła zastosowanie w bezpośredniej analizie tkanek miękkich takich jak tętnice i żyły oraz błona śluzowa, co zostało opisane w manuskryptach odpowiednio **H2** i **H6**.

- tętnice i żyły

Z fizjologicznego punktu widzenia wyróżnić można dwie grupy pierwiastków: (i) niezbędne do przebiegu procesów metabolicznych i życiowych (tj. Ca, Cu, Mn, Zn, Mg, Cr); (ii) toksyczne, szkodliwe dla zdrowia (tj. Pb, As, Cd, Al, Tl). Wśród pierwiastków śladowych, istotnych dla człowieka, Cu i Zn odgrywają szczególną rolę w układach biologicznych. Zachwianie równowagi stężeń pierwiastków śladowych w organizmie człowieka budzi zainteresowanie jako możliwy czynnik ryzyka chorób, między innymi układu sercowo-naczyniowego [raport WHO, 1972]. Jony Cu i Zn wchodzą w skład metaloenzymów umożliwiając ich funkcję katalityczną w reakcjach utleniania lub redukcji substratu, hydrolityczną oraz stabilizującą strukturę białka enzymatycznego. Nie zostały dotąd poznane współzależności stężeń Cu i Zn oraz metaloprotein odpowiedzialnych za ich metabolizm i transport w surowicy krwi i ścianie tętniczej. Szczególne znaczenie w funkcjonowaniu ściany naczyniowej mają również główne makropierwiastki Ca i Mg, które są niezbędne w szeregu procesów metabolicznych i działaniu enzymów [Iskra i in. 2002]. W badaniach przedstawionych w pracy **H2** skoncentrowano się na problemie rozmieszczenia i gromadzenia niezbędnych makro i mikropierwiastków w ścianie tętniczej w miażdżycy tętnic, co stanowiło nowe podejście do zagadnienia udziału jonów metali w patogenezie chorób naczyń. W ścianie naczyniowej odbywa się szereg reakcji prowadzących do zmian patologicznych, w tym peroksydacja lipidów, gromadzenie produktów tego procesu, tworzenie komórek piankowatych, nacieków lipidowych, blaszki miażdżycowej, włóknienie i zwapnienie. W ścianie tętniczej natomiast powstają złogi lipidowe ulegające zwapnieniu w wyniku tworzenia się trudno rozpuszczalnych soli wapnia i magnezu, głównie węglanów i szczawianów. W związku z tym, w wyniku okluzji i wymiany jonowej mogą pojawiać się również inne kationy w tym pierwiastków, które docierają do ściany naczyniowej z krwią.

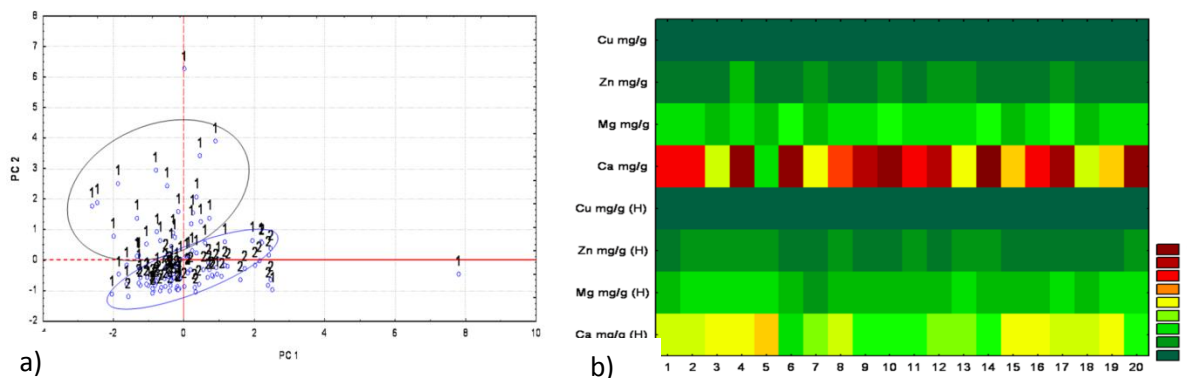
Bezpośrednim celem pracy **H2** było: (i) zbadanie stężeń pierwiastków Ca, Mg, Cu i Zn w surowicy krwi i ścianie tętniczej w miażdżycy tętnic (AO, ang. *atherosclerosis obliterans*) u ludzi; (ii) określenie wpływu miażdżycy tętnic kończyn dolnych na lokalizację, miejsce gromadzenia składników mineralnych oraz pierwiastków śladowych w ścianie tętniczej; (iii) określenie zależności pomiędzy pierwiastkami za pomocą metod chemometrycznych. Próbki tkanek miękkich oraz próbki krwi pochodziły od dwóch grup chorych: pierwsza grupa od której pobierane były próbki tętnic to chorzy na przewlekłą miażdżycową niedrożność tętnic kończyn dolnych (PMNT), natomiast drugą grupę, od której pobierano próbki ścian żylnych, stanowili chorzy na przewlekłą niewydolność żylną (PNŻ). Próbki tkanek oraz krew zostały pobrane przez Prof. W. Majewskiego podczas zabiegów operacyjnych przeprowadzonych w Klinice Chirurgii Ogólnej i Naczyń Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. W celu analizy metodą LA-ICP-MS z próbek tkanek wyodrębniono wycinki błony: wewnętrznej *łac. tunica intima*, środkowej *łac. tunica media* i zewnętrznej *łac. tunica adventitia* o powierzchni 5x5 mm oraz blaszki miażdżycowe, które umieszczono na szkiełku mikroskopowym. Po przygotowaniu procedury pomiarowej analizy próbek tkanek miękkich metodą LA-ICP-MS (**H2**) próbki poddano analizie jakościowej. Badano rozmieszczenia wybranych pierwiastków po stronie zewnętrznej i po stronie wewnętrznej w ścianie tętnicy aorty brzusznej (Rysunek 10).



Rysunek 10. Rozmieszczenie Ca, Mg i Zn po stronie zewnętrznej i wewnętrznej w ścianie tętniczej aorty brzusznej pobranej od chorych na miażdżycę tętnic. Analizy przeprowadzono metodą LA-ICP-MS (H2).

Miażdżyca tętnic rozwija się w błonie wewnętrznej, dlatego stronę zewnętrzną tętnic analizowano w celach porównawczych. W ścianie tętnicy po stronie zewnętrznej zarejestrowano znacznie niższe intensywności sygnałów analitycznych pierwiastków w porównaniu ze stroną wewnętrzną. Intensywność sygnału analitycznego dla Ca, który odgrywa znaczącą rolę w patogenezie miażdżycy zarejestrowano około 3-krotnie większą po stronie wewnętrznej ściany niż po jej stronie zewnętrznej. Podobne rozmieszczenie zaobserwowano dla Mg. Takie rozmieszczenie Ca i Mg potwierdza odkładanie się tych pierwiastków w ścianie tętniczej. Ca i Mg odkładają się w postaci soli nieorganicznych. Złogi tworzące się w ludzkiej ścianie tętniczej zawierają głównie sole fosforanu wapnia oraz węglanu magnezu [Tomazic i in. 1994]. Pierwiastki te (Ca, Mg, Zn, Cu) zostały oznaczone również w wyodrębnionej ze ściany blaszce miażdżycowej i tutaj intensywność sygnału zarówno dla Ca jak i dla Mg była około 8-krotnie wyższa niż po stronie wewnętrznej ściany tętnicy. W procesie biomineralizacji ściany tętniczej i blaszki miażdżycowej biorą również udział niektóre pierwiastki śladowe. Stwierdzono, że wyższe stężenie Cu w blaszce miażdżycowej w porównaniu ze ścianą tętniczą spowodowane jest adsorpcją białek zawierających Cu na powierzchni hydroksyapatytu, co może zapobiegać przemieszczaniu się Cu do ściany tętniczej. W próbkach ścian sygnał analityczny Cu był niewykrywalny. W przypadku części próbek ściany tętniczej chorych możliwe było wyodrębnienie widocznych blaszek miażdżycowych od otaczającej je tkanki. Średnie stężenie analizowanych pierwiastków okazało się znacznie wyższe niż w otaczającej tkance. Największe różnice stwierdzono w przypadku Ca oraz Mg, których stężenia były wyższe niż w tkankach. Ciekawy jest natomiast fakt, iż w blaszce miażdżycowej zarejestrowano sygnał analityczny pochodzący od Pb. Można przypuszczać, iż w złogach (blaszce miażdżycowej) kumulowane są pierwiastki nie pełniące żadnej funkcji w organizmie człowieka a wręcz pierwiastki toksyczne dla organizmów żywych.

Przeprowadzono również analizy ilościowe próbek klinicznych metodą ICP-OES po ich wcześniejszej mineralizacji. Wyniki oznaczeń Ca, Mg, Zn i Cu w surowicy krwi i w ścianie tętniczej wskazują na różnice stężeń między badanymi grupami. Średnie stężenia Zn i Cu w surowicy krwi są wyższe aniżeli w grupie kontrolnej, natomiast stężenie Ca jest niższe niż w próbce kontrolnej. Stężenie magnezu zarówno w próbce kontrolnej jak i w próbkach surowicy krwi było porównywalne. Uzyskane wyniki poddano analizie chemometrycznej korzystając z programu Statistica (wersja 8.0). W celu zbadania różnic w stężeniach pierwiastków pomiędzy grupą chorych na AO a zdrową grupą użyto metod chemometrycznych, takich jak: analiza głównych składowych (PCA) (Rysunek 11a) i wykresy sekwencyjne 3W danych surowych (ang. *discrete row data plot*) (Rysunek 11b).



Rysunek. 11a i b. Różnice w stężeniach pierwiastków w osoczu krwi (a) i w tkankach (b) pomiędzy grupą chorych na chorobę miażdżycową (1) a grupą kontrolną (2 lub H) przedstawione za pomocą metod chemometrycznych: (a) metoda głównych składowych; b) wykres danych surowych (H2).

W pracy H2 określono rozmieszczenia w tkankach naczyniowych Ca i Mg, istotnych w procesie mineralizacji blaszki miażdżycowej, oraz pierwiastków Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Se, V, Zn, które pełnią ważne role w procesach enzymatycznych. Stężenie Ca, Mg, Cu, Zn w surowicy i ścianie tętniczej w badanych grupach oraz w różnych częściach ściany tętniczej w PMNT wskazuje na przemieszczanie się tych pierwiastków z surowicy do ściany tętniczej i ich gromadzenie w błonie wewnętrznej oraz blaszce miażdżycowej w przypadku jej utworzenia.

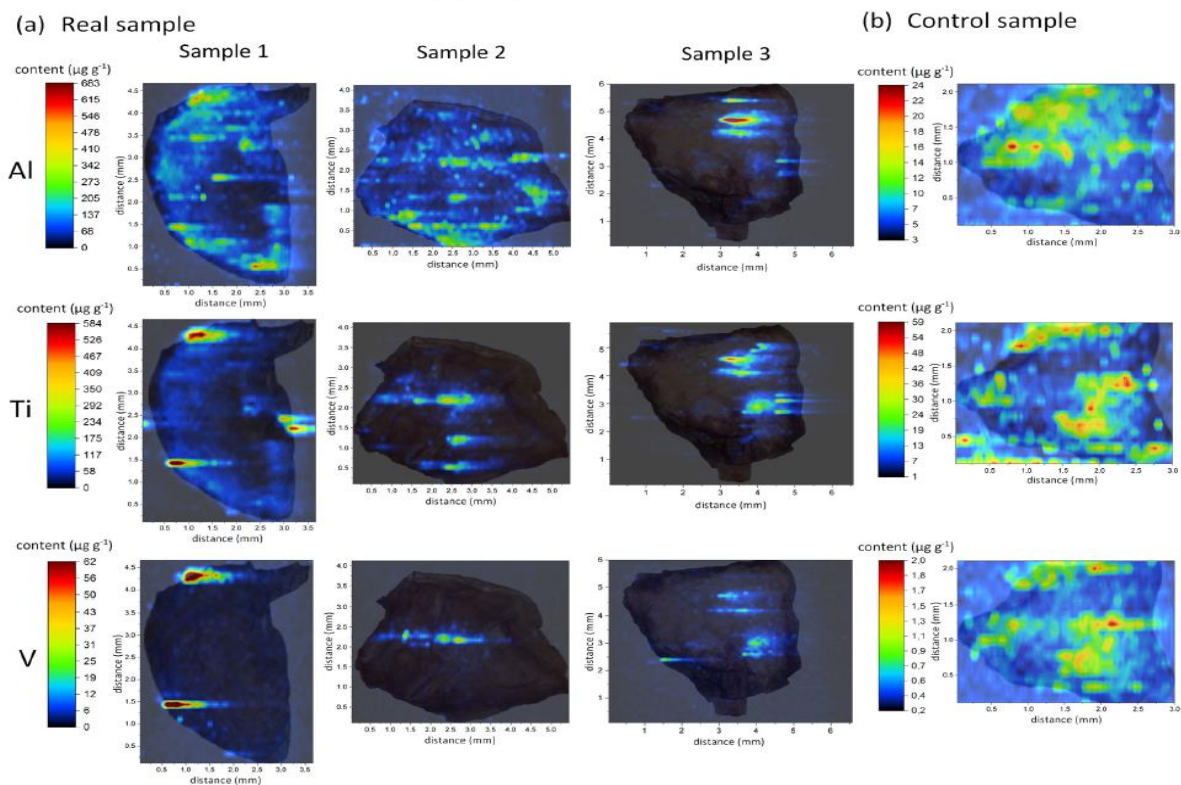
- błona śluzowa jamy ustnej

Drugim rodzajem tkanek miękkich, które poddano analizie metodą LA-ICP-MS były tkanki błony śluzowej jamy ustnej pobrane przed i po zabiegu implantacji. Uściślając badania opisane w pracy H6 dotyczyły wpływu implantów metalowych na bazie tytanu i jego stopu na tkanki miękkie człowieka. Aby uzyskać miarodajne dane ilościowe, opracowano i zwalidowano metodę analityczną w oparciu o wzorce dopasowane matrycowo oraz wykonano analizę certyfikowanego materiału odniesienia. W pracy po raz pierwszy zaproponowano zastosowanie wzorców stałych dopasowanych matrycowo przygotowanych na bazie białka jaja kurzego jako matrycy. Opracowaną procedurę pomiarową sprawdzono przy użyciu CRM ERM-BB422 Fish muscle. Wyznaczone parametry procedury analitycznej oznaczania Ti, Al i V metodą LA-ICP-MS zebrano w Tabeli 2.

Tabela 2. Parametry walidacyjne procedury analitycznej oznaczania Al, Ti i V metodą LA-ICP-MS (H6).

Validation parameter of the analytical procedure	Element					
	Strategy I			Strategy II		
	Al	Ti	V	Al	Ti	V
Concentration range ($\mu\text{g g}^{-1}$)	10-500	10-500	4-50	1-500	1-500	1-50
Single laboratory precision – CV (%)	5.0	4.6	4.1	4.8	4.6	4.4
Within-laboratory reproducibility (%)	5.4	5.1	4.6	4.8	4.6	4.5
IDL ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0.83	0.78	0.24	0.24	0.55	0.10
IQL ($\mu\text{g g}^{-1}$)	2.5	2.4	0.73	0.72	1.7	0.30
MDL ($\mu\text{g g}^{-1}$)	4.8	0.84	0.58	1.8	1.5	0.82
MQL ($\mu\text{g g}^{-1}$)	14	2.5	1.8	5.3	4.4	2.5
Recovery (%)	87	95	95	100	104	104

W celu zobrazowania rozmieszczenia pierwiastków pochodzących z implantu na powierzchni fragmentów błony śluzowej jamy ustnej wykonane zostały mapy zawartości Ti, Al i V przy użyciu metody LA-ICP-MS. Pierwszy raz w literaturze (H6) przedstawiono wyniki ilościowe wskazujące, że analizowane pierwiastki występują na powierzchni tkanek w dużych ilościach na bardzo małych obszarach. Odpowiedzialna za to jest obecność drobin metalicznych o wymiarach rzędu nm i μm uwalnianych podczas zabiegu implantacji lub z implantu w wyniku działania sił mechanicznych lub korozji elektrochemicznej występujących podczas użytkowania implantu i kontaktu ze środowiskiem jamy ustnej i płynów ustrojowych. Niniejsza praca, poprzez zastosowanie techniki ablacji laserowej, pozwoliła na stworzenie map zawartości pierwiastków na powierzchni badanych tkanek bez konieczności poddawania ich mineralizacji (Rysunek 12).



Rysunek 12. Mapy ilościowego rozmieszczenia Ti, Al i V na powierzchni błony śluzowej jamy ustnej pobranej od pacjentów po zabiegu implantacji stomatologicznej (a) oraz próbki kontrolna pobrana przed zabiegiem (b) (H6).

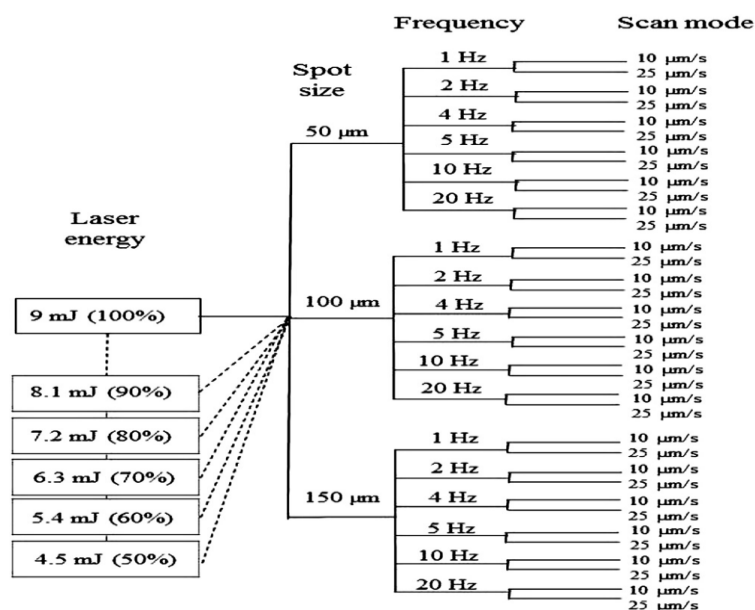
Mineralizacja jest najczęściej spotykanym sposobem przygotowania próbek stałych mających kontakt z implantami, jednakże w jej wyniku następuje bezpowrotna utrata informacji o przestrzennym rozmieszczeniu analitów i uzyskiwana jest wyłącznie wartość uśredniona dla całej próbki. Opisane wyniki badań pozwoliły na wyciągnięcie wniosku, że największy wpływ na ogólną zawartość pierwiastków w tkankach miękkich ma obecność drobin metalicznych, w przeciwieństwie do większości badań o zbliżonej tematyce, które zwiększony poziom metali w tkance tłumaczą uwalnianiem jonów w wyniku korozji elektrochemicznej. Badania w kierunku interakcji implantów z organizmem człowieka są istotne ze względu na potencjalne skutki zdrowotne dla użytkownika implantu [Matusiewicz i in. 2014]. Dalsze badania mogą przyczynić się do poprawy właściwości mechanicznych i biokompatybilności implantów, co wpłynie na poprawę jakości życia pacjentów.

2) Analiza *in situ* tkanek twardych:

- próbki medyczne (zęby) i próbki biologiczne (pióra)

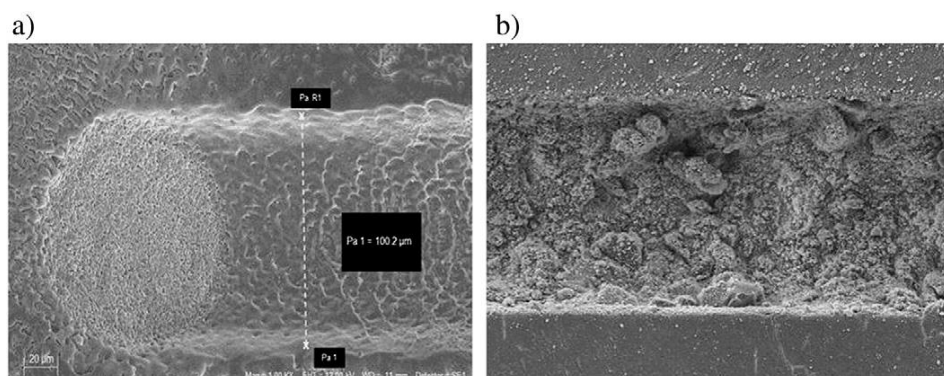
Wykorzystanie ablacji laserowej stanowi bardzo efektywny sposób prowadzenia bezpośrednich pomiarów *in situ* w niemal wszystkich materiałach stałych. Należy jednak pamiętać, że wiarygodność wyników uzyskanych dzięki zastosowaniu metody LA-ICP-MS zależy od optymalizacji i kalibracji całego układu pomiarowego. W pracach **H3** i **H7** głównym celem było przygotowanie procedury analitycznej ilościowego oznaczania pierwiastków *in situ* w badanych próbkach tkanek twardych.

Ustalenie warunków fizykochemicznych procesu ablacji lasera jest bardzo ważnym etapem w analizie ilościowej gdyż determinuje istotne parametry procedury pomiarowej tj. czułość i dokładność pomiarów analitycznych. Parametry lasera w pracach **H3** i **H7** były optymalizowane metodą jednej zmiennej wg. schematu zamieszczonego na Rysunku 13.



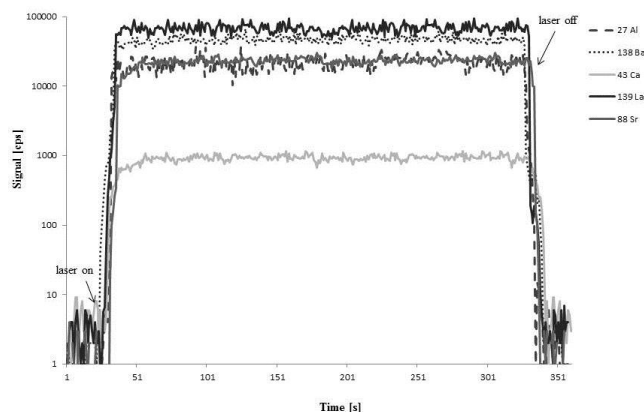
Rysunek 13. Schemat parametrów pracy lasera poddanych optymalizacji w celu analizy tkanek twardych (**H3**).

W celu weryfikacji poprawności/jakości prowadzonego procesu ablacji zastosowano technikę skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) do oceny kształtu krateru powstałego po ablacji zarówno po analizie wzorców jak i próbek rzeczywistych. Przykładowe zdjęcie krateru przedstawiono na Rysunku 14 (**H3**).



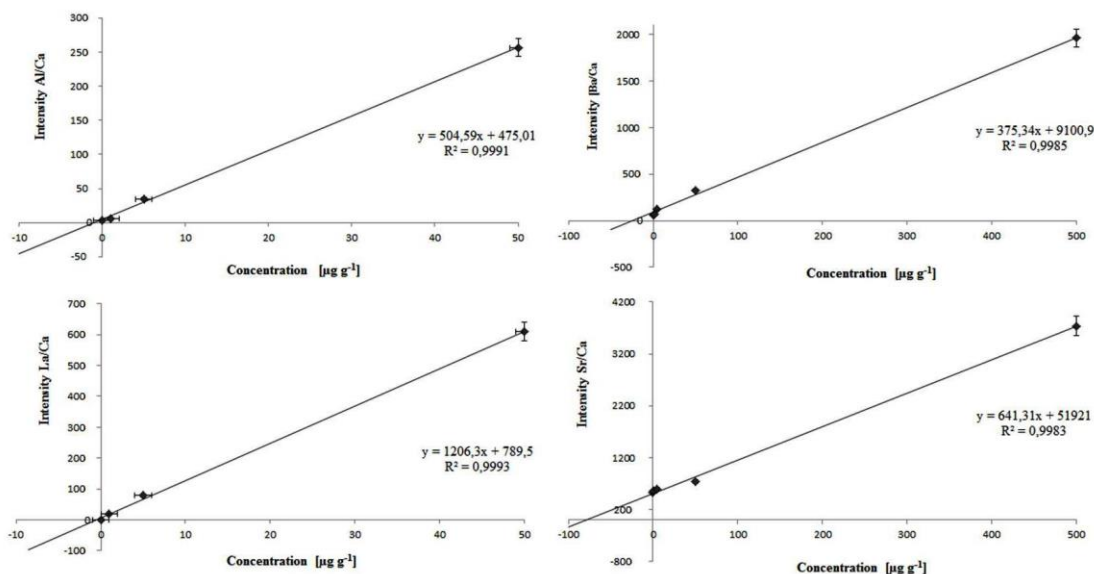
Rysunek 14. Zdjęcia krateru po ablacji: (a) próbki rzeczywistej zęba, (b) przygotowanego wzorca stałego uzyskane po zastosowaniu skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) (**H3**).

Analizy ilościowe metodą LA-ICP-MS wymagają stałych wzorców odniesienia potrzebnych do sporządzenia krzywych kalibracyjnych. Materiały odniesienia, dostępne komercyjnie zostały najczęściej wytworzone z myślą o innych technikach analitycznych, dlatego ich zastosowanie w metodzie LA-ICP-MS nie zawsze jest możliwe ze względu na brak homogeniczności próbki albo niedopasowanie matrycy próbki. Dlatego w celu prowadzenia analiz ilościowych metodą LA-ICP-MS zarówno próbek zębów (**H3**) jak i próbek piór (**H7**) należało przygotować i zwalidować nowe procedury analityczne oznaczania wybranych pierwiastków w ww. tkankach twardych. Informacja o zawartości pierwiastka jest ściśle związana z miejscem ablacji i nie reprezentuje składu całej próbki. Jednakże w przypadku tworzenia wzorców, pożądana jest jak największa homogeniczność i równomierny rozkład analitu. Obecnie na rynku niedostępne są certyfikowane materiały odniesienia przeznaczone do analizy tkanek twardych metodą LA-ICP-MS. Konieczne jest zatem zastosowanie alternatywnych strategii wzorcowania. Takie wzorce powinny odtwarzać skład matrycy próbki, uwzględniając czynniki przeszkadzające, tak aby powstały w czasie ablacji aerosol był jak najbardziej zbliżony składem do aerosolu wytworzonego w czasie analizy próbki. W literaturze można znaleźć niewiele opracowanych procedur kalibracji na potrzeby analizy pierwiastkowej tkanek twardych przy użyciu metody LA-ICP-MS [Miliszkievicz i in. 2015]. W pracach tych kierowano się przede wszystkim zasadą, aby skład pierwiastkowy wzorców odpowiadał składowi badanych próbek oraz aby wzorce były homogeniczne. Niejednokrotnie nie brano pod uwagę matrycy próbki, co w przypadku analizy ilościowej ma znaczenie priorytetowe. W opublikowanych pracach badawczych najczęściej zwracano uwagę na jakościowy skład pierwiastkowy, natomiast w celu analizy ilościowej wykonywano mineralizację próbki, przez co utracono ważne informacje dotyczące rozmieszczenia pierwiastków w próbce stałej [Ek i in. 2004; Castro i in. 2010]. Etap związany z przygotowaniem krzywej kalibracyjnej, zarówno w przypadku analizy pierwiastkowej zębów (**H3**) jak i piór (**H7**), polegał na przygotowaniu krzywej kalibracyjnej przy użyciu wzorców dopasowanych matrycowo (ang. „*in-house*” *matrix-matched solid standard*). W przypadku analizy zębów, wzorce przygotowano z rzeczywistych próbek zębów stałych nie leczonych stomatologicznie, które poddano zmieleniu i przesianiu. Do określania wielkości ziarna zmielonych zębów zastosowano dyfraktometr proszkowy, XRD (Bruker Corporation, Niemcy), gdzie określono średnią wielkość otrzymanych cząstek w zakresie od 1nm do 2,7nm. Wielkość ziaren w przypadku analizy metodą LA-ICP-MS jest istotnym parametrem, gdyż poprawia precyzję pomiarów i spójność cząstek podczas formowania granulatu bez konieczności stosowania środków wiążących [H3; Arroyo i in. 2009]. Do ilościowego oznaczania pierwiastków przygotowaną matrycę próbki (sproszkowane zęby) podzielono na odważki (0,2g) i wzbogacono doświadczalnie dobranymi objętościami roztworów wzorcowych (Al, Ba, Sr, La) o wzrastających stężeniach, następnie próbki wysuszone i sprasowano pod ciśnieniem, tak otrzymane tabletki posłużyły za wzorce stałe. Końcowa zawartość przygotowanych wzorców stałych wynosiła 1, 5, 50 µg/g dla Al, La oraz 1, 5, 50, 500 µg/g dla Ba, Sr. Jedna porcja próbki nie została wzbogacona i była stosowana jako ślepa próbka. Zanim przygotowane wzorce zastosowano do sporządzenia krzywej kalibracyjnej przeprowadzono szereg doświadczeń sprawdzając ich właściwości fizykochemiczne podczas procesu ablacji. Między innymi sprawdzano homogeniczność przygotowanych wzorców, co przedstawiono na Rysunku 15. Jako wzorzec wewnętrzny wybrano izotop wapnia ⁴³Ca, którego równomierne rozmieszczenie zostało zarejestrowane w przygotowanych wzorcach.



Rysunek 15. Stabilność i homogeniczność przygotowanych wzorców stałych. Analizie poddano tabletkę o stężeniu 50 $\mu\text{g/g}$, szybkość skanowania 50 $\mu\text{m/s}$ i długość drogi ablacyjnej 6 mm ($n=5$) (H3).

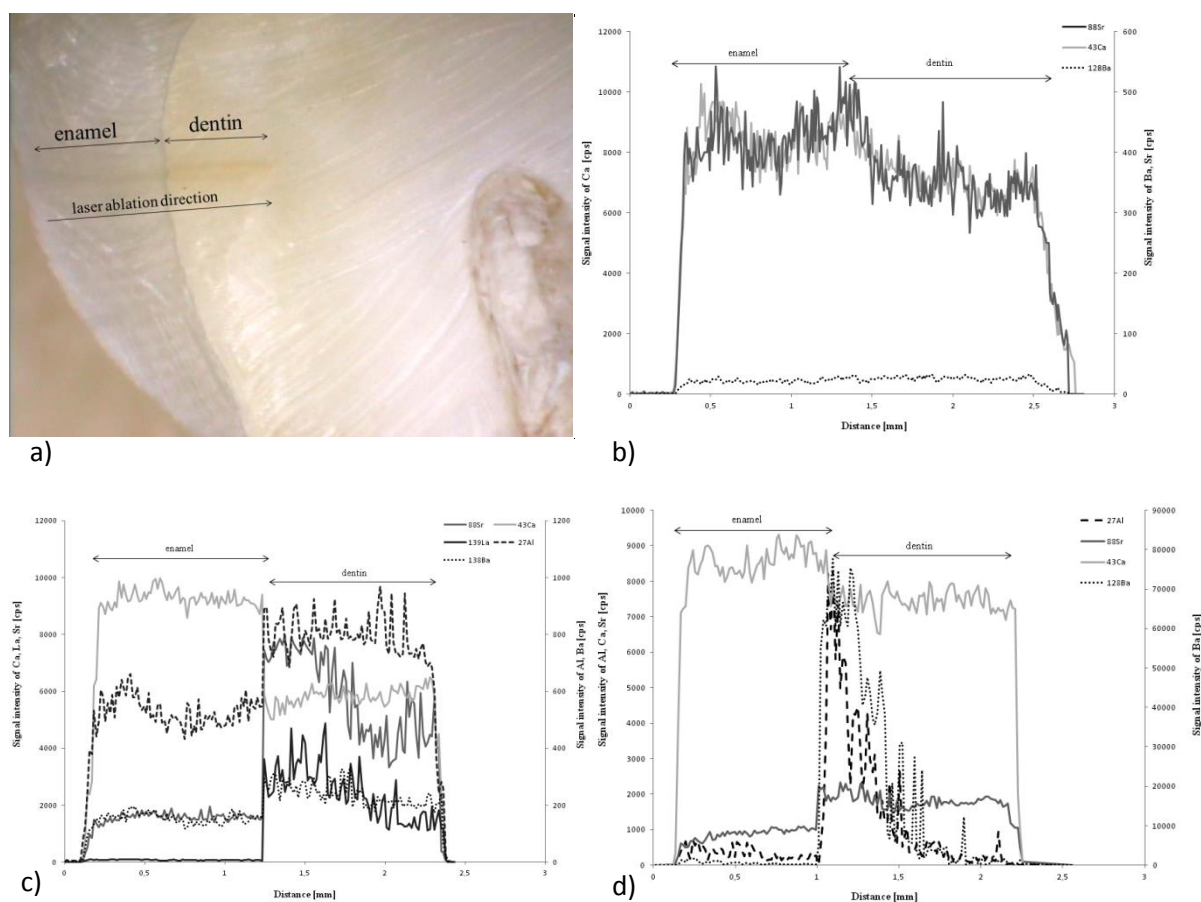
Tak przygotowane wzorce stałe posłużyły do przygotowania krzywych kalibracyjnych, które przedstawiono na rysunku 16.



Rysunek 16. Krzywe kalibracji otrzymane dla serii przygotowanych wzorców stałych dopasowanych matrycowo. Wzorcem wewnętrznym, zastosowany do normalizacji uzyskanych sygnałów analitycznych był izotop wapnia ^{43}Ca ($n = 5$) (H3).

Przygotowaną procedurę analityczną zweryfikowano poprzez zastosowanie certyfikowanego materiału odniesienia (CRM Bone Ash 1400, NIST), który, podobnie jak wzorce stałe, przed analizą sprasowano pod ciśnieniem. W CRM zawartość pierwiastków jest potwierdzona certyfikatem a oznaczana matryca zgodna z matrycą próbki. Pozwoliło to na zweryfikowanie, czy zastosowana technika optymalizacji aparatury oraz przygotowana procedura pomiarowa są prawidłowe, skutkują miarodajnymi wartościami pomiarów i nadają się do założonego celu. Stosując CRM wyznaczono takie parametry walidacyjne jak: LOD, LOQ, precyzję, odzysk. Opracowaną procedurę analityczną zastosowano do ilościowego zbadania rozmieszczenia wybranych pierwiastków w próbkach zębów stałych (szkliwo, zębina). W przygotowanych próbkach zębów oznaczano pierwiastki będące składnikami materiałów dentystrycznych użytych do wypełniania ubytków w zębach (materiały szkło-jonomerowe i kompozytowe). Oznaczanymi pierwiastkami były ^{27}Al , Sr^{88} , ^{138}Ba i ^{139}La . Pierwiastki te nie

uczestniczą w szlaku metabolicznym organizmu ludzkiego, ponadto mogą odznaczać się działaniem szkodliwym lub toksycznym na organizm ludzki. W wyniku porównania próbek zębów z wypełnieniami z próbkami zębów z grupy kontrolnej oszacowano stopień zmiany zawartości danego pierwiastka w obrębie poszczególnych tkanek zęba. Uzyskane wyniki przedstawiono na przykładzie zaprezentowanym na Rysunku 17. Analiza uzyskanych danych metodą LA-ICP-MS pozwoliła na stwierdzenie, że w zębach leczonych stomatologicznie ma miejsce migracja jonów pierwiastków wchodzących w skład materiałów dentystrycznych do zębiny i dalej do szkliwa.



Rysunek 17 a, b, c, d. Obrazowanie migracji Al, Ba, La, Sr w przekroju podłużnym zęba (a) w zależności od stosowanego wypełnienia: szkło-jonomerowym (c) i kompozytowym (d). Na rysunku (b) zaprezentowano rozmieszczenie pierwiastków w próbce kontrolnej (H3).

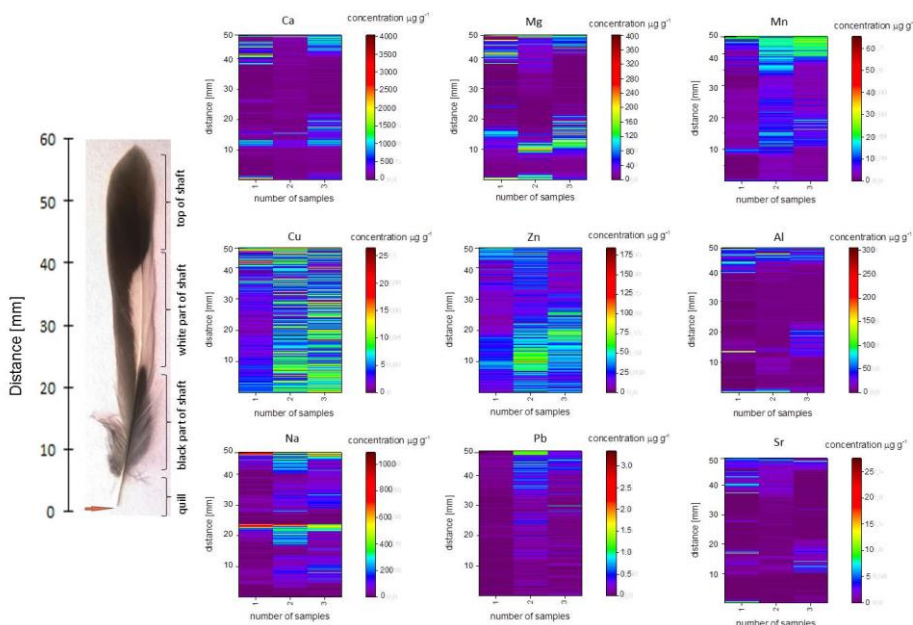
W pracy H7 badania skupiły się na przygotowaniu procedury oznaczania piór metodą LA-ICP-MS. Analizie poddano pióra (dwie sterówki) pobrane od muchołówki małej (łac. *Ficedula parva*) z rzędu wróblowatych, w celu określenia ilościowego rozmieszczenia pierwiastków w zależności od koloru pióra a także miejsca analizy (dudka, stosina, wierzchołek). W tym celu konieczne było opracowanie nowej procedury analitycznej ze szczególnym uwzględnieniem etapu kalibracji, który wiązał się przede wszystkim z przygotowaniem wzorców dopasowanych matrycowo oraz dobraniem odpowiedniego wzorca wewnętrznego. Dotychczas nie opracowano procedury oznaczania pierwiastków w piórach metodą LA-ICP-MS. Metoda ta została jedynie zastosowana do analiz jakościowych [Ek i in. 2004]. Badanie eksperymentalne rozpoczęło od poszukiwania materiału, który posłużyłby za matrycę wzorców. W tym celu zastosowano odpowiednio dobraną ilościowo mieszaninę glutationu oraz handlowo dostępnych aminokwasów takich jak: glicyna, cysteina, leucyna i izoleucyna. Aminokwasy budują keratynę, która w 79% stanowi główny budulec piór. Przygotowaną

mieszaninę poddano homogenizacji i podzielono na odważki, które wzbogacono mieszaniną wielopierwiastkowych roztworów wzorcowych takich pierwiastków jak: Al, Ba, Ca, Cu, Mg, Mn, Pb, Sr, Zn. Wzorce przygotowano podobnie jak w opisie podanym w pracy **H3**. Zawartość pierwiastków w przygotowanych wzorcach stałych mieściła się w zakresie od $1 \mu\text{g g}^{-1}$ do $500 \mu\text{g g}^{-1}$. Uzyskane wzorce zweryfikowano pod względem zawartości poprzez ich mineralizację i oznaczanie metodą SN-ICP-MS (SN, ang. *solution nebulization*) a także oznaczono ich homogeniczność i trwałość. Regresję krzywej kalibracyjnej wyznaczono metodą najmniejszych kwadratów a w celu uzyskania jak najlepszego dopasowania krzywej uzyskane wyniki rzeczywiste porównano z wynikami po normalizacji. Do normalizacji zastosowano wzorzec wewnętrzny siarki ^{34}S . Uzyskane wyniki pokazały, że lepsze dopasowanie ($R=0,99$ i $R=0,999$) uzyskano dla krzywej kalibracyjnej po uwzględnieniu normalizacji, dlatego izotop ^{34}S stosowano jako wzorzec wewnętrzny w całej analizie. Uzyskanie miarodajnych wyników, które odzwierciedlają rzeczywistą zawartość analitów w próbkach rzeczywistych jest niezwykle ważną kwestią w chemii analitycznej. Dlatego w pracy **H7**, podobnie jak w pozostałych pracach, również zadbano o określenie parametrów walidacyjnych metody: liniowości, granicy wykrywalności (LOD), granica oznaczalności (LOQ), precyzji, odtwarzalności i dokładności. Spójność pomiarowa wyników pomiarów została zapewniona i wykazana przy użyciu certyfikowanego materiału odniesienia włosów ludzkich NCS ZC 81002b (China National Analysis Center for Iron and Steel, China). Określone parametry analityczne przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Parametry walidacyjne opracowanej procedury analitycznej (**H7**).

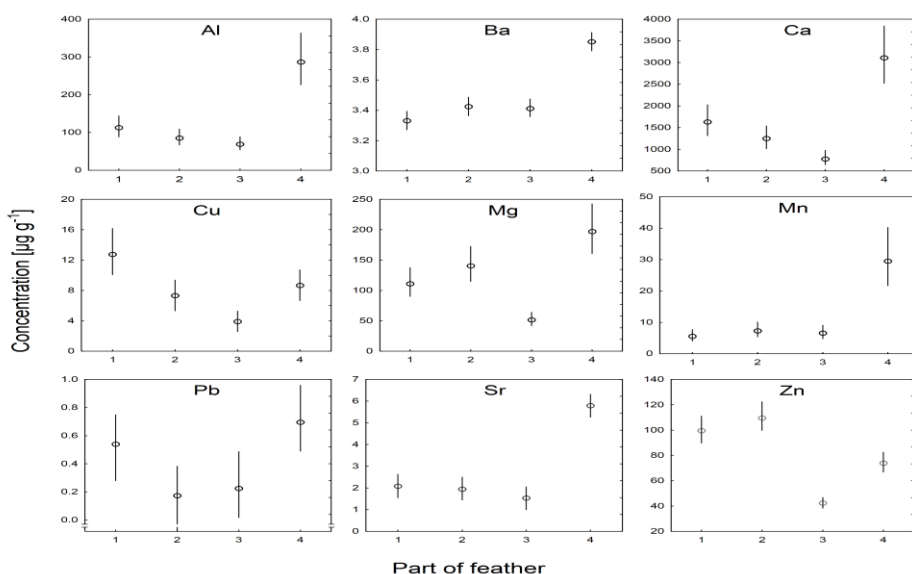
Validation parameter of the analytical procedure	Element								
	^{24}Mg	^{27}Al	^{43}Ca	^{55}Mn	^{65}Cu	^{66}Zn	^{88}Sr	^{138}Ba	^{208}Pb
Concentration range [$\mu\text{g g}^{-1}$]	5-500	5-500	5-500	1-50	5-500	5-500	1-50	5-500	1-50
Single laboratory precision – CV [%]	5.0	5.2	4.6	4.1	4.8	4.6	4.4	4.5	3.6
Within-laboratory reproducibility [%]	5.4	5.5	5.1	4.6	4.8	5.0	4.5	4.3	4.0
LOD [$\mu\text{g g}^{-1}$]	3.1	4.8	2.1	0.58	1.8	1.5	0.82	2.7	0.55
LOQ [$\mu\text{g g}^{-1}$]	9.3	14	6.3	1.8	5.3	4.4	2.5	5.4	1.65
Recovery [%]	91	87	95	95	100	104	104	93	96

Większość dostępnych danych literaturowych dotyczących zawartości podstawowych i śladowych pierwiastków w piórach małych ptaków dotyczy ich zawartości po mineralizacji [Ek i in. 2004; Adout i in. 2007; Perez-Lopez i in. 2008], gdzie traci się znaczną część informacji. W pracy **H7** zastosowano opracowaną procedurę oznaczania pierwiastków w piórach, co umożliwiło ich zbadanie w dwóch aspektach. Z jednej strony przeprowadzono ilościową analizę pierwiastkową wzdłuż piórka badając rozmieszczenie pierwiastków w zależności od analizowanej części piórka. A z drugiej strony podjęto próbę określenia rozkładu pierwiastków w kontekście zmian w pigmentacji piór. Parametry pracy lasera zostały tak dobrane i zoptymalizowane aby analiza była prowadzona bez zatrzymywania lasera. Rozmieszczenie pierwiastków przedstawiono na Rysunku 18. Nie zawsze możliwe było przeprowadzenie ablacji laserowej do końca pióra, ponieważ w pewnym momencie wiązka lasera była większa niż stosina pióra ($<50 \mu\text{m}$), wtedy laser był zatrzymywany, stąd rozbieżności pomiędzy długością pióra a długością analizy.



Rysunek 18. Rozmieszczenie pierwiastków w stosinie pióra w zależności od miejsca prowadzenia ablacji laserowej. Na zdjęciu sterówka pióra muchołówki małej oraz zaznaczony kierunek ablacji laserowej (H7).

W pracy H7, po raz pierwszy w literaturze, opisano ilościowe rozmieszczenie pierwiastków w piórach metodą LA-ICP-MS. Metoda ta pozwoliła na zaobserwowanie rozmieszczenia pierwiastków w zależności od koloru stosiny pióra i miejsca analizy, co było dotychczas niemożliwe przy użyciu metod, w których próbki musiały być przeprowadzone do roztworu. Uzyskane wyniki wskazują, że istnieje związek między zawartością pierwiastka i częścią pióra, a także pigmentacją analizowanych piór. Stosując analizy statystyczne takie jak uogólnione liniowe modele mieszane, GLMM (ang. *generalized linear mixed models*) sprawdzono, czy istnieje związek między zawartością pierwiastków w piórze a kolorem/strefą stosiny, jednocześnie kontrolując efekt zmienności pomiędzy analizowanymi próbkami/osobnikami. Wszystkie otrzymane wyniki były istotne statystycznie na poziomie mniejszym niż 0,0001 (Rysunek 19)



Rysunek 19. Zawartości pierwiastków w zależności od miejsca prowadzenia pomiaru i koloru stosiny (1-dudka, 2-część czarna, 3-część czarno-biała, 4-część biała) (H7).

Ostatecznie stwierdzono statystycznie istotny związek między pigmentacją stosiny a rozmieszczeniem pierwiastków, które uważa się, że biorą udział w syntezie melaniny (Ca, Cu, Zn). Z drugiej strony, na końcach piór oznaczono najwyższe zawartości toksycznych pierwiastków, takich jak Al, Pb i Sr, co można wytłumaczyć czasem i dynamiką wzrostu piór oraz funkcją melanin w detoksykacji organizmu. Metoda LA-ICP-MS stosowana w analizie piór jest doskonałym narzędziem, ze względu na możliwość analizy małych próbek o niskiej masie. Pióra do badań zostały pobrane przez dr hab. Piotra Zduniaka z Zakładu Biologii i Ekologii Ptaków Wydziału Biologii UAM w Poznaniu oraz prof. Kiraz Erciyaz-Yavuz z Ornithological Research Center, Ondokuz Mayıs University w Turcji. Etyka badań ornitologicznych pozwala na pobranie tylko dwóch piór z ogona ptaka. Tak mała masa próbki (szczególnie piór ptaków z rzędu wróblowatych, które były przedmiotem badań) stosowana w analizach metodami wymagającymi mineralizacji stwarza niebezpieczeństwo generowania niemiarodajnych wyników, a co za tym idzie, artefaktów.

PODSUMOWANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO WRAZ Z ELEMENTAMI NOWOŚCI I WKŁADEM DO DYSCYPLINY

Omówione prace dotyczące metody ablacji laserowej z detekcją ICP-MS w badaniach *in situ* pierwiastków w tkankach miękkich i twardych zostały opublikowane we wiodących czasopismach z dziedziny analityki chemicznej (International Journal of Environmental Analytical Chemistry, Microchemical Journal, Analytical and Bioanalytical Chemistry, International Journal of Mass Spectrometry, Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy). Artykuły mają charakter interdyscyplinarny i ukazują możliwości analityczne nowej, zaawansowanej metody analitycznej LA-ICP-MS oraz jej praktyczne zastosowania w badaniach z dziedziny biologii, biochemii, medycyny i stomatologii.

Rezultatem prac przedstawionych jako monotematyczne osiągnięcie naukowe jest poszerzenie wiedzy z zakresu: 1) analityki chemicznej, poprzez prezentowanie nowych koncepcji procedur analitycznych oznaczania pierwiastków metodą ablacji laserowej z detekcją ICP-MS; 2) praktycznego zastosowania ablacji laserowej z detekcją ICP-MS w badaniach *in situ* pierwiastków w tkankach miękkich i twardych.

1) Osiągnięcia z zakresu analityki chemicznej:

- ustaliłam warunki fizykochemiczne ablacji laserowej w celu uzyskania stabilnych w czasie sygnałów o dużej intensywności i niskich wartościach odchylenia standardowego w analizie tkanek miękkich (**H1, H2, H4 – H6**) i twardych (**H3, H7**). Badania prowadziłam w kierunku ustalenia parametrów procesu ablacji takich jak: energia wiązki, częstotliwość pracy lasera, średnica wiązki, szybkość próbkowania dynamicznego,
- opracowałam nowe homogeniczne i dopasowane matrycowo wzorce stałe w postaci tabletek wykorzystując: (i) sprasowany certyfikowany materiał odniesienia, który wzbogacałam roztworem wzorcowym oznaczanych analitów (**H3, H4**) (ii) stały materiał dopasowany matrycowo do analizowanych próbek wzbogacałam roztworem wzorcowym (sproszkowane rośliny (**H5**); białko jaja kurzego (**H6**), mieszanina aminokwasów (**H7**)),
- zaprojektowałam strategię kalibracji i wyznaczyłam krzywe kalibracyjne oznaczenia *in situ* pierwiastków w: tkankach miękkich roślin (**H4, H5**), błonie śluzowej (**H6**) i tkankach twardych zębów (**H3**) oraz w piórach (**H7**). Efektem tych prac było uzyskanie stabilnych sygnałów analitycznych oznaczanych pierwiastków i wysoka precyzja oznaczeń,
- ważnym osiągnięciem w moich badaniach było zastosowanie po raz pierwszy izotopu siarki ^{34}S jako wzorca wewnętrznego w celu kompensacji interferencji niespektralnych do oznaczania *in vivo* pierwiastków w tkankach roślin,

jednocześnie wykazując jej fizykochemiczne właściwości jako wzorca wewnętrznego w analizie metodą LA-ICP-MS (**H4**), zamiast powszechnie używanego izotopu węgla ^{13}C , którego stosowanie może być obciążone dużym błędem. Korzystając z opracowanej procedury i zdobytej eksperymentalnie wiedzy na temat zachowania się izotopu siarki ^{34}S podczas analiz metodą LA-ICP-MS z sukcesem zastosowałam siarkę jako wzorzec wewnętrzny w analizach innych tkanek miękkich (**H5**, **H6**) oraz tkanek twardych (**H7**), co po raz pierwszy opisałam we wskazanych pracach,

- poprzez wprowadzenie zasad metrologii do opracowanych, nowych procedur analitycznych badania pierwiastków metodą LA-ICP-MS zapewniłam, że otrzymane wyniki są miarodajne. Przeprowadziłam pełną walidację nowych procedur analitycznych, niezbędną w analizie śladowej, wyznaczając takie parametry walidacyjne jak: precyzja, powtarzalność, poprawność, liniowość, granica wykrywalności, granica oznaczalności, dokładność. We wszystkich pomiarach zapewniłam spójność pomiarową wyniku pomiaru oznaczanych pierwiastków w tkankach miękkich (**H4**, **H5**, **H6**) i twardych (**H3**, **H7**) metodą LA-ICP-MS, co jest niezmiernie ważne w analizie chemicznej, a nadal często pomijane w pracach naukowych, gdzie stosuje się metody porównawcze a podawane wyniki są deklaracją wyniku,
- zaprojektowałam procedury analityczne oznaczania metodą LA-ICP-MS pierwiastków w próbkach tkanek (**H6**, **H7**), co pozwoliło na uzyskanie informacji dotyczących rozmieszczenia i homogeniczności pierwiastków w próbkach o małej masie (mapowanie).

2) Możliwości zastosowania nowych procedur analitycznych w analizie próbek rzeczywistych, badania interdyscyplinarne;

a) W tkankach miękkich – biologicznych:

- opracowaną procedurę obrazowania jakościowego (**H1**) i ilościowego pierwiastków (**H4**) zastosowałam do wyznaczenia *in vivo* profilu akumulacji Pb w przekroju podłużnym wierzchołka korzenia oraz poprzecznym korzenia, łodygi i liścia. W wyniku badań wykazałam/potwierdziłam efektywność działania czapeczki korzenia (wierzchołek korzenia zbudowany z tkanki merystematycznej) jako bariery ochronnej przed wnikaniem Pb (**H1**). Przeprowadziłam ilościowe obrazowanie rozmieszczenia *in vivo* Pb, Cd, Cu i Zn w tkankach korzenia i łodygi grochu w przekroju poprzecznym metodą LA-ICP-MS. Dzięki możliwości analizy *in vivo* wskazałam drogę transportu pierwiastków takich jak Cd, Cu, Pb i Zn z korzenia do pędu. Stosując metodę EDX dokładnie wskazałam miejsce kumulacji oznaczanych metali w komórkach roślin a zastosowanie mikroskopii konfokalnej potwierdziło analizy prowadzone metodą LA-ICP-MS (**H5**).

b) W tkankach miękkich – klinicznych:

- ablację laserową połączoną z ICP-MS zastosowałam w celu analizy tętnic i żył, co po raz pierwszy opisałam w literaturze światowej (**H2**). Dzięki właściwemu opracowaniu warunków fizykochemicznych pracy lasera i odpowiednio przygotowanej procedurze pomiarowej możliwe było zbadanie przemieszczania się Ca, Mg, Cu i Zn z surowicy krwi do ściany tętniczej i ich gromadzenie w błonie wewnętrznej oraz w blaszce miażdżycowej u chorych na miażdżycę naczyń. Zastosowanie metody LA-ICP-MS pozwoliło na

określenie wpływu miażdżycy naczyń na lokalizację, miejsce gromadzenia składników mineralnych oraz pierwiastków śladowych takich jak Ca, Mg, Cu i Zn w ścianie tętniczej (H2). Ważnym elementem niniejszej pracy było również zastosowanie metod chemometrycznych PCA, CA oraz wykresów sekwencyjnych danych surowych, które pozwoliły na właściwą interpretację wielowymiarowych danych i wykazanie istotnych różnic w stężeniach badanych pierwiastków w surowicy krwi i próbkach ścian tętnic pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną.

- miałam udział w opracowaniu procedury analitycznej bezpośredniej analizy tkanek miękkich pochodzenia medycznego co pozwoliło na opisanie po raz pierwszy w literaturze wpływu implantów zębowych na zawartość Ti, Al i V w otaczających tkankach (H6). Zastosowanie nowej strategii kalibracji opartej na białku jajka kurzego (wzorce stałe dopasowane matrycowo) umożliwiło przygotowanie mapy wizualizacji pierwiastków w tkance błony śluzowej jamy ustnej po kontakcie z implantem (H6).

c) W tkankach twardych – klinicznych:

- ustaliłam warunki fizykochemiczne procesu ablacji laserowej tkanek twardych oraz zastosowałam opracowaną procedurę analityczną do wizualizacji pierwiastków (H3), dzięki czemu określiłam ilościowo stopień migracji Al, Ba, La i Sr z wypełnień stosowanych w leczeniu stomatologicznym do tkanek zęba. Dzięki zastosowaniu techniki ablacji laserowej możliwe było zobrazowanie rozmieszczenia pierwiastków w poszczególnych tkankach zęba: zębina i szkliwo, co jest istotne dla badań w stomatologii.

d) W tkankach twardych – biologicznych:

- prowadziłam studia nad tokiem postępowania w analizie *in situ* biologicznych tkanek twardych metodą LA-ICP-MS, co dało możliwość ilościowego zobrazowania pierwiastków w piórach małych ptaków wędrownych, co po raz pierwszy opisałam w literaturze (H7). Uzyskane wyniki badań potwierdziły istotny związek między rozmieszczeniem pierwiastków w zależności od koloru stosiny pióra (udział Ca, Cu, Zn w syntezie melaniny) i miejsca analizy, co było dotychczas niemożliwe przy użyciu metod analitycznych gdzie próbki musiały być przeprowadzone do roztworu.

Podsumowując, prace badawcze opisane w omówionych publikacjach związane są z rozwijaniem i rzeczywistym zastosowaniem zaawansowanej metody analitycznej, ablacji laserowej z detekcją ICP-MS. Warto podkreślić, że poprzez lepsze poznanie procesu ablacji laserowej, studium i walidację nowych procedur analitycznych oraz zapewnienie spójności pomiarowej oznaczania *in situ* pierwiastków w tkankach miękkich i twardych dowiedziono, że nowo opracowane procedury analityczne umożliwiają uzyskanie miarodajnych wyników badań prowadzonych na poziomie interdyscyplinarnym, które nie były możliwe do uzyskania dotychczas dostępnymi technikami analitycznymi.

LITERATURA:

- Adams F., Adriaens A., Bogaerts A., *Anal Chim Acta*, 456 (2002) 63 – 75.
Adout A., Hawlena D., Maman R., Paz-Tal O., Karpas Z., *Int. J Mass Spectrom.* 345 (2007)109-116.
Arroyo L., Trejos T., Gardinali PR., Almirall JR., *Spectrochim Acta Part B*, 64 (2009) 16–25.
Austin C., Fryer F., Lear J., Bishop D., Hare D., Kirkup L., McDonagh A., Doble P. *J Anal At Spectrom*, 26 (2011) 1494-1501.
Baralkiewicz D., Kózka M., Kachlicki P., Piechalak A., Tomaszewska B. *Int J Environ Anal Chem*, 88 (2008) 979-988.
Baralkiewicz D., Kózka M., Piechalak A., Tomaszewska B., Sobczak P. *Talanta*, 79 (2009) 493-498.
Becker J.S. "Inorganic Mass Spectrometry. Principles and Applications" John Wiley & Sons (2007)

- Becker J.S., Dietrich R.C., Matusch A., Pozebon D., Dressler V.L. *Spectrochim Acta Part B*, 63 (2008) 1248-1252.
- Becker J.S., Zoriy M.V., Becker J.S., Dobrowolska J., Matusch A., *J. Anal. At. Spectrom.* 22 (2007) 736–744.
- Becker J.S., *Mass Spectrom.*, 48 (2013) 255-268.
- Donner E., de Jonge M.D., Kopittke P.M., Lombi E., *Plant Mineral Nutrients*, 953 (2012) 143-159.
- Ek K.H., Morrison G.M., Lindberg P., Rauch S., *Arch Environ Contam Toxicol*, 47 (2004) 259-269.
- Falcone R., Sommariva, Verita M. *Microchim Acta*, 155 (2006) 137-140.
- Frick D.A and Gunther D. *J. Anal. At. Spectrom.*, 27 (2012) 1294-1303.
- Garcia C., Lindner H., Niemax K. *J Anal At Spectrom* ,24 (2009) 14-26.
- Garcia C.C., Lindner H., Niemax K., *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 14–26.
- Gratuze B., Blet-Lemarquand M., Barrandon J. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 247 (2001) 645-656 .
- Gray A.L. *Analyst*, 110 (1985), 551–556.
- Günther D. *Anal Bioanal Chem*, 372 (2002) 31-32.
- Hare, D.J., Austin, C.E., Doble P., *The Analyst*, 137(2012) 1527-1537.
- Hattendorf B. and Günther D., Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LA-ICPMS) In *Handbook of Spectroscopy: Volume 2*, edited by Gauglitz, Günter, and David S. Moore, 647-697, Weinheim: Wiley-VCH, 2014.
- Hoffmann E., Ludke C., Skole J., Stephanowitz H., Ulrich E, Colditz D. *Fres J Anal Chem*, 367 (2000) 579 – 585.
- Iskra M., Majewski W., Piorunska-Stolzmam M., *Magnesium Research*, 15 (2002) 279–285.
- Jurowski, K., Buszewski, B., Piekoszewski, W. *Crit Rev Anal Chem*, 35 (2015) 334-347.
- Ke W., Xiong Z.T., Chen S., Chen J., *Environ Exp Bot*, 59 (2007) 59–67.
- Koch J., Walle M., Dietiker R., Gunther D., *Anal Chem*, 80 (2008) 915-921.
- Kopittke P. M., Menzies N. W., de Jonge M. D., McKenna B. A., Donner E., Webb R. I., Paterson D. J., Howard D. L., Ryan C. G., Glover C. J., Scheckel K. G., Lombi E., *Plant Physiol.* 156 (2011) 663–673.
- Krzyszowska M., *Acta Physiol Plant*, 33 (2011) 35-51.
- Kutrowska A., Szelaż M., *Acta Physiol. Plant*, 36 (2014)1957-1968.
- Luo T., Wang Y., Hu Z., Günther G., Liu Y., Gao S., Li M., Hu S. *J Anal At Spectrom*, 30 (2015) 941-949.
- Malecka A., Piechalak A., Mensinger A. Baralkiewicz D., Tomaszewska B. ,*Polish J Environ Stud*, 21 (2012) 1721-1730.
- Matusiewicz H., *Acta Biomaterialia*, 10 (2014) 2379-2403.
- Metzner H., Schneider R.U., Breuer U., Thorpe M.R., Schurr U., Schroeder W.H., *Plant Physiol*, 152 (2010) 1030-1043.
- Miliszkiwicz, N., Walas, S., Tobiasz, A. *J Anal At Spectrom*, 30 (2015) 327-338.
- Niemax K., *Fresenius J Anal Chem*, 370 (2001) 332–340.
- Pérez-López M., de Mendoza M.H., Beceiro A.L., Rodríguez F.S., *Ecotoxicol Environ Saf*, 70 (2008) 154–162.
- Piechalak, A., Tomaszewska, B., Baralkiewicz, D., Malecka, A., *Phytochemistry*, 60 (2002) 153-162 .
- Piechalak, A., Tomaszewska, B., Baralkiewicz, D., *Phytochemistry*, 64 (2003) 1239-1251.
- Poleć-Pawlak K., Ruzik L., Lipiec E., *Talanta*, 72 (4) 1564-1572.
- Raport WHO (1972) *Trace Elements ad Cardiovascular Disease* 51-59.
- Regnery J., Stoll B., Jochum K.P. *Geostandards and Geoanalytical Research*, 34, 1 (2010) 19-38.
- Resano M., García-Ruiz E., Vanhaecke F. *Mass Spectrometry Reviews*, 29, 1 (2010) 55-78.
- Russo R.E., Mao X., Liu H., Gonzalez J., Mao S.S. *Talanta* ,57 (2002) 425–451 146.
- Russo R.E., Mao X., Mao S.S. *Anal Chem*, 1 (2002) 70-77.
- Seregin, I.V., Shpigun, L.K., Ivanov, V.B., *Russ. J. Plant Physiol*, 51 (2005) 525-533 .
- Sokolowska K., Zagórska-Marek B., *Am. J. Bot.*, 99 (2012) 1745-1755.
- Sylvester P.J., *Mineral.Ass.Canada Short Course*, 40 (2008) 67–78.
- Szynkowska, M. I., Czerski, K., Paryjczak, T., Parczewski, A. *Surf. Interface Anal.*, 42 (2010) 429–437
- Thomas R. *Spectroscopy*, 17 (2002) 27 – 33.
- Tomazic B.B., Brown W.E., Scoen F.J. *J. Biomed. Mater. Res.*, 28 (1994) 35-47.
- Wagner, B., Nowak, A., Bulska, E., Hametner, K., Gunther, D. *Anal Bioanal Chem* ,402 (2012)1667-1671.
- Wiltsche H., Gunther D., *Anal Bioanal Chem* ,399 (2011) 2167-2174.
- Wu B., Zoriy M., Chen Y., Becker J.S. *Talanta* ,78 (2009) 132-137.
- Yang X., Feng Y., He Z., Stoffella P.J., *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 18 (2005) 339–35.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk chemicznych moje zainteresowania naukowe były związane z bezpośrednim oznaczaniem pierwiastków w stałych próbkach metodami atomowej spektrometrii absorpcyjnej. Celem prowadzonych badań była optymalizacja parametrów procedury analitycznej wpływających na bezpośrednie oznaczanie wybranych

pierwiastków w stałych próbkach środowiskowych metodami należącymi do analitycznej spektrometrii atomowej, takimi jak: SS-ET-AAS oraz SS-ICP-OES. W pracy zoptymalizowano metody bezpośredniego oznaczania Co metodą SS-ET-AAS oraz Ca, Cd, Cr, Cu, Mg, Ni, Pb, Zn metodą SS-ICP-OES w stałych próbkach osadów ściekowych i w próbkach roślinnych. Próbki stałe analizowano w postaci zawiesin (SS, ang. *Slurry Sampling*). Uzyskane rezultaty badań zostały opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym i krajowym (zał.5 Barańkiewicz i in. 2007, II A.15; Barańkiewicz i in., 2006, II A.16; Barańkiewicz i in. 2005, II A.17; Hanć A., Barańkiewicz D. 2006, II C.13; Hanć i in. 2006, II C.6). Prowadziłam również badania związane z walidacją metod analitycznych oznaczania pierwiastków w próbkach wody metodami: FAAS, ICP-OES i ICP-MS. Wyniki badań zostały opublikowane w takich pracach jak: Barańkiewicz i in. 2008, IIA.13; Barańkiewicz i in. 2007, IIA.14).

Po uzyskaniu stopnia doktora moje zainteresowania koncentrują się głównie na optymalizacji, opracowywaniu i zastosowaniu nowych procedur analitycznych a także na porównawczej ocenie nowych i już stosowanych procedur analitycznych; prowadzeniu pomiaru analitycznego metodami: FAAS, ET-AAS, HG-AAS, CV-AAS, ICP-OES, ICP-MS, LA-ICP-MS oraz statystycznej interpretacji jego wyniku (metody chemometryczne); pobieraniu i przygotowaniu próbek do analiz metodami spektroskopowymi. W czasie swojej pracy badawczej szczególną uwagę poświęciłam analizie jakościowej, ilościowej, strukturalnej oraz monitoringowi próbek biologicznych, środowiskowych, klinicznych oraz żywności. W ramach prowadzonych prac można wyodrębnić takie główne nurty jak:

- **analiza próbek klinicznych metodą SN-ICP-MS**

Miarodajne wyniki analiz wymagają zastosowania zwalidowanych procedur oraz czułych i wiarygodnych technik analitycznych. Do takich technik niewątpliwie należy technika ICP-DRC-MS, która jest niezwykle użytecznym narzędziem w analizie próbek klinicznych ze względu na szeroki zakres oznaczanych stężeń i niskie wartości granic wykrywalności. Analiza próbek klinicznych jest niezwykle ważna, gdyż uzyskane wyniki często wpływają bezpośrednio na zdrowie i jego ochronę. Opracowując procedury analityczne oznaczania pierwiastków w próbkach klinicznych [zał. 5 Markiewicz i in. 2017, II A.8; Łukasik-Głębocka i in. 2014 i 2013, IIA.2, IIC-I.4; Hanć i in. 2010, IIC-I.8] przeprowadzono optymalizację parametrów pracy ICP-MS w tym dynamicznej komory reakcyjnej, służącej do redukcji interferencji spektralnych.

Pierwszym rodzajem oznaczanych próbek klinicznych były krew, osocze, mocz i treści żołądka [zał.5 p. IIA.2; IIC.4]. Próbki przed analizą metodą ICP-DRC-MS poddano mineralizacji wspomaganą mikrofalami (model Mars 5; CEM Corporation, USA). Następnie przeprowadzono optymalizację parametrów pracy ICP-MS w tym komory DRC tak aby uzyskać maksymalną intensywność sygnału analitycznego dla Ba, który był celem analizy. W celu redukcji interferencji towarzyszących oznaczaniu ^{138}Ba zastosowano ^{103}Rh jako wzorzec wewnętrzny oraz komorę DRC, gdzie jako gaz reakcyjny zastosowano amoniak. Przeprowadzono walidację procedury analitycznej wyznaczając parametry procedury analitycznej: precyzję pośrednią, powtarzalność, granice wykrywalności i oznaczalności oraz dokładność. Spójność pomiarową wyniku pomiaru zapewniono stosując dwa certyfikowane materiały odniesienia (Seronorm Trace Elements Serum L-2; TM-28.4 - fortified lake water). Procedurę opracowano na potrzeby analizy próbek klinicznych pobranych od pacjenta po zatruciu chlorkiem baru oraz od pacjentów zdrowych (bez objawów zatrucia). Badania były realizowane we współpracy z dr Magdaleną Łukasik-Głębocką z Zakładu Medycyny Ratunkowej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu i dr Kariną Sommerfeld z Zakładu Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Drugim rodzajem próbek klinicznych poddanych analizom były płyny owodniowe, których skład pierwiastków niezbędnych i toksycznych jest istotnym czynnikiem w rozwoju embrionu i

plodu [II A.8]. Badania były prowadzone we współpracy z dr hab. Joanną Suliburską z Katedry Higieny Żywności Człowieka Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu oraz z dr n. med. Rafałem Kocyłowskim z Kliniki Perinatologii i Ginekologii Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi. Celem badań było opracowanie nowej procedury analitycznej do analizy wielopierwiastkowej 18 pierwiastków (Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Mg, Mn, Ni, Pb, Sb, Se, Sr, U, V i Zn) w próbkach płynu owodniowego z zastosowaniem ICP-MS. W tym przypadku charakterystyka procedury analitycznej a także właściwości wyniku analitycznego były szczególnie ważne. Optymalizując procedurę zastosowano komorę DRC z dwoma gazami reakcyjnymi, amoniakiem i tlenem, wykazując, że tlen efektywnie eliminuje interferencje spektralne dla As, Se i Sb i może być stosowany w wielopierwiastkowej analizie tych pierwiastków, natomiast amoniak można zastosować do eliminacji zakłóceń oznaczania Ca, V, Al, Mn, Cr. Szczegółową procedurę walidacji i ocenę właściwości wyników przeprowadzono za pomocą trzech certyfikowanych materiałów referencyjnych (Seronorm Trace Elements Serum L-2; SLRS-6 – river water; TM-28.4 - fortified lake water). Uzyskane niskie wartości granic wykrywalności dla wszystkich oznaczanych analitów, w zakresie od 0,37 ng L⁻¹ dla U do 56 µg L⁻¹ dla Ca, umożliwiły ich oznaczenie na poziomie śladowym, a nawet ultra-śladowym. Na podstawie danych z walidacji procedury analitycznej oszacowano niepewność rozszerzoną (U, k=2) oznaczenia 18 pierwiastków w próbkach płynu owodniowego, zamiast powszechnie stosowanych wartości SD. Pełna charakterystyka procedury analitycznej i wyników uzyskanych pomiarów potwierdziły, że nowa procedura, która po raz pierwszy została opisana w literaturze, może być skutecznie zastosowana do oznaczania szerokiego spektrum pierwiastków w próbkach płynu owodniowego.

- **analiza próbek biologicznych (rośliny) metodami spektrometrycznymi**

Oznaczanie pierwiastków w różnych częściach roślin ukierunkowane jest na poznanie mechanizmów obronnych u roślin wyższych, które jako pierwsze w łańcuchu pokarmowym narażone są na zanieczyszczenie środowiska przyrodniczego. Poszerzenie wiedzy na temat mechanizmów związanych z pobieraniem jonów pierwiastków z gleby może przyczynić się do zastosowania roślin w fito- lub ryzoremediacji skażonego środowiska. Analizy materiału roślinnego prowadzono w celu oszacowania zdolności roślin (groch, gorczyca, kukurydza, lucerna) do absorpcji, akumulacji i transportu metali śladowych do części nadziemnych roślin [zał.5 Kutrowska i in. 2017 II A.1; Małecka i in. 2012 II A.10; Hanć i in. 2013 II C-I.1; Małecka i in. 2013 II C-I.2; Piechalak i in. 2013 II C-I.3; Małecka i in. 2012 II C-I.5; Piechalak i in. 2016 II C-I.6; Piechalak i in. 2012 II C-II.1; Hanć i in. 2009 II C-II.2]. Badania były oraz nadal są realizowane wraz z zespołem badawczym Prof. dr hab. Barbary Tomaszewskiej z Zakładu Biochemii Wydziału Biologii, UAM. W celu analizy jakościowej i ilościowej pierwiastków w materiale roślinnym opracowano i zwalidowano nowe procedury analityczne z zastosowaniem metod analitycznych (AAS, ICP-MS, LA-ICP-MS) oraz technik mikroskopowych (SEM, EDX i mikroskop konfokalny). Na drodze adaptacji do niesprzyjających warunków środowiskowych, rośliny wykształciły mechanizmy zaangażowane w detoksykację ksenobiotyków. W obszarze prowadzonych badań były analizy systemu detoksykacyjnego u roślin rosnących w obecności jonów metali ciężkich [IIC-I; IIC-I.2; IIC-I.3]. Ponadto, badano poziom stresu oksydacyjnego w tkankach roślin, które w obecności czynników stresowych uruchamiają system antyoksydacyjny, eliminując nadmiar reaktywnych form tlenu (RFT) i tym samym chronią struktury komórkowe przed uszkodzeniami [IIA.10, IIC-I.5; IIC-I.6]. Badania były realizowane w ramach dwóch grantów MNiSzW N N305 381138 oraz MNiSzW N N310 107840, w którym byłam wykonawcą. Przedmiotem badań była również synergia roślin i mikroorganizmów glebowych promujących wzrost roślin [II A.1]. Wykonano eksperyment gdzie prowadzono uprawę współrzędną gorzycy sarepskiej z kukurydzą lub lucerną dodatkowo wspomaganą bakteriami endofitycznymi wspomagającymi wzrost roślin (PGPB, ang. *plant growth promoting bacteria*). W badaniach wykorzystano glebę pobraną z terenu nieużytków w Piekarach Śląskich, woj. Śląskie, zanieczyszczonych cynkiem i ołowiem w wyniku wieloletniego działania huty metali

nieżelaznych. Badania zawartości Cd, Cu, Pb, Zn w roślinach wybranych do eksperymentu oznaczałam metodą SN-ICP-MS po ich uprzedniej mineralizacji. Część wyników badań została opublikowana a pozostałe wyniki są opracowywane i przygotowywane do druku.

Inny aspekt badań z wykorzystaniem roślin był związany ze zwiększającym się stężeniem pyłu zawieszonego w powietrzu, który jest nośnikiem pierwiastków śladowych oraz wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA). W tym celu analizom poddano życicę wielokwiatową (*Lolium multiflorum*), jako potencjalny bioindykator pierwiastków z powietrza. Badania możliwości kumulacyjnych życicy były prowadzone w ramach projektu badawczego (N N305 054040). W projekcie realizowanym przez Katedrę Ekologii i Ochrony Środowiska, Wydziału Melioracji i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu byłam wykonawcą. W wyniku prowadzonych badań wykazano możliwość stosowania życicy wielokwiatowej jako bioindykatora w zanieczyszczeniach powietrza pierwiastkami Cd, As, Pb czy Ni jak również WWA. Wyniki uzyskanych badań zostały częściowo opublikowane w pracach (zał. 5 Budka i in. 2015 IIA.7; Borowiak i in. 2014 IIA.9; Zbierska i in. 2012 IIC-I.7). Aktualnie jest przygotowywana kolejna publikacja dotycząca wpływu różnych czynników na zastosowanie życicy wielokwiatowej do biomonitoringu pierwiastków śladowych.

- **oznaczania pierwiastków w próbkach żywności (grzyby) metodami SN-ICP-MS oraz F-AAS**

Uczestniczyłam w badaniach nad zróżnicowaniem efektywności akumulacji pierwiastków przez grzyby dzikorosnące oraz uprawne pochodzące z Polski oraz z Chin [zał. 5 Drewnowska i in. 2017, IIA3; Falandysz i in. 2017, IIA4; Falandysz i in. 2017, IIA5]. Badania realizowane są we współpracy z zespołem badawczym Prof. dr hab. Jerzego Falandysza z Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. W celu przeprowadzenia analiz grzybów zoptymalizowałam procedury analityczne oznaczania pierwiastków metodą SN-ICP-MS. Przygotowanie procedur wiązało się z przygotowaniem próbek grzybów do analiz (mineralizacja), optymalizacją parametrów urządzenia pomiarowego i wykonaniem pomiarów. Spójność pomiarową zapewniono poprzez stosowanie certyfikowanych materiałów odniesienia (IC-CS-M-4 mushrooms powder oraz SLRS-7 river water) a także metodę dodatku wzorca. Uzyskane dotychczas wyniki badań wskazują na istotne zróżnicowanie efektywności akumulacji pierwiastków w poszczególnych częściach grzyba (kapelusze/trzon) w zależności od miejsca ich pochodzenia. Badania pokazują, że grzyby są dobrym źródłem składników mineralnych, głównie K, P, Mg, Ca, w owocnikach różnych gatunków występują także pierwiastki śladowe takie jak Cu, Zn, Mn, Mo, Fe ale mogą one również kumulować pierwiastki toksyczne takie jak As, Cd, Pb, Ni. Wyniki badań wskazują na dużą a w porównaniu z roślinami nawet wyższą, zdolność grzybów do pobierania i kumulacji pierwiastków z gleb w zależności od miejsca pochodzenia [IIA4; IIA5]. Prowadzono również badania dotyczące wpływu procesów kulinarnych takich jak suszenie, mrożenie, blanszowanie czy peklowanie na skład pierwiastkowy grzybów. W badaniach wykazano, że marynowanie octem ma wpływ na skład ich pierwiastkowy, co zostało po raz pierwszy opisane w literaturze [IIA3]. Blanszowanie i dalsza obróbka kulinarna owocników grzybów o około 60% obniża zawartość takich pierwiastków jak Cd, Co, Cu, Mn, Pb, Ni, Rb, Tl i Zn a także o około 10% zawartości Ba i Cr. Wyniki badań pokazują, że obróbka kulinarna taka jak blanszowanie lub blanszowanie i marynowanie, może pomóc w zmniejszeniu zawartości pierwiastków toksycznych z grzybów, ale jednocześnie może pozbawiać ich części pierwiastków istotnych fizjologicznie. Badania dotyczące tematu zawartości pierwiastków w grzybach surowych i przetworzonych są obecnie kontynuowane.

- **zastosowanie metod chemometrycznych do interpretacja wyników pomiarów analitycznych**

Zastosowanie nowoczesnych technik analitycznych umożliwia uzyskanie wyników, które są źródłem informacji o stanie poszczególnych elementów środowiska i zachodzących w nim procesów w czasie i przestrzeni. W wyniku badań środowiskowych uzyskuje się duże ilości informacji o obiektach badań a w ich interpretacji często pomocne stają się metody statystyczne. W pracach badawczych [zał 5. Chudzińska i in. IIA.6; Hanć i in. IIA.12; Komorowicz i in. IIC-I.9; Hanć i in. IIC-II.3] w celu klasyfikacji, projekcji oraz modelowania uzyskanych wyników badań stosowane były wielowymiarowe techniki chemometryczne. W badaniach dotyczących zanieczyszczenia pierwiastkami osadów ściekowych [Hanć i in. IIA.12; Hanć i in. IIC-II.3] zastosowanie technik chemometrycznych (CA, PCA, wykresy sekwencyjne danych surowych) pozwoliło na zidentyfikowanie źródeł zanieczyszczenia osadów ściekowych w zależności od zakładów przemysłowych skupionych w obrębie zlewni osadów ściekowych. Natomiast w pracy Chudzińska i in. [IIA.6] oznaczono metodą SN-ICP-MS zawartość pierwiastków (Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn) oraz Hg metodą przepływo-wstrzykowej atomowej spektrometrii absorpcyjnej (FIAS-CVAAS) w tkankach i narządach trzech gatunków ryb z jeziora Swarzędzkiego. Badania prowadzone były w ramach współpracy z Prof. dr hab. Ryszardem Gołdynem z Zakładu Ochrony Wód Wydziału Biologii, UAM. W celu oceny potencjalnego ryzyka związanego ze spożyciem tych ryb przez zwierzęta, jak również ludzi zastosowano wielowymiarowe techniki chemometryczne. Stosując metody CA oraz wykresy sekwencyjne danych surowych wykazano istotne różnice w zawartości pierwiastków w zależności od badanej części ryby (mięśnie, wątroba, szkielet). Natomiast zastosowanie metody PCA wykazało różnice w kumulacji pierwiastków w zależności od gatunku ryb. Uzyskane wyniki oceniono pod kątem ich dokładności oraz zapewniono spójność pomiarową wyniku pomiaru stosując certyfikowany materiał odniesienia (ERM BB422 Fish Muscle).

Pełna lista publikacji, rozdziałów w monografii, komunikatów, konferencji wraz z moim dorobkiem dydaktyczno-organizacyjnym została przedstawiona w **Załączniku nr 5** (Wykaz opublikowanych prac naukowych lub twórczych prac zawodowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki.)

Poznań, 1 sierpnia 2017r

Anetlda Hauc'