

POLITECHNIKA WARSZAWSKA

NAUKI CHEMICZNE

NAUKI ŚCISŁE I PRZYRODNICZE

Rozprawa Doktorska

mgr inż. Jacek Sikorski

**Platforma analityczna oparta na technikach spektroskopowych
do charakteryzowania superparamagnetycznych nanocząstek
tlenku żelaza(II, III) ukierunkowanych na transport do komórek
nowotworowych**

Promotor

dr hab. inż. Magdalena Matczuk

WARSZAWA 2023



NARODOWE CENTRUM NAUKI

**Badania wchodzące w skład rozprawy doktorskiej wykonano w ramach projektu
OPUS 15 Narodowego Centrum Nauki (2018/29/B/ST4/00178).**

**Podziękowania pragnę złożyć przede wszystkim Pani Promotor,
dr hab. inż. Magdalenie Matczuk, bez której ta praca nie miałaby szans powstać.
Za umiejętność stawiania wymagań, ale też niezastąpioną pomoc, życzliwość
i merytoryczne wsparcie, na które zawsze mogłem liczyć.**

**Pragnę podziękować wszystkim pracownikom Katedry Chemii Analitycznej
oraz kolegom i koleżankom doktorantom za dobrą atmosferę i wsparcie w ciągu
ostatnich lat spędzonych na Politechnice Warszawskiej.**

**Dziękuję mojej dziewczynie za cierpliwość i wiarę w moje możliwości, nawet wtedy,
kiedy sam w sobie wątpiłem.**

**W szczególny sposób pragnę podziękować moim rodzicom – tacie, Jackowi
i mamie, Marii – za nieustanną pomoc i wsparcie na każdym etapie mojego życia.
Bez nich nie byłbym teraz w punkcie, w którym jestem.**

Streszczenie Rozprawy Doktorskiej

Platforma analityczna oparta na technikach spektroskopowych do charakteryzowania superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza(II, III) ukierunkowanych na transport do komórek nowotworowych

Choroby nowotworowe stanowią jedną z wiodących przyczyn zgonów na świecie. Potencjalnych narzędzi do walki z tymi chorobami współczesna medycyna upatruje m.in. w wykorzystaniu nanomateriałów, które mogą być zastosowane zarówno do diagnostyki, jak i w terapiach przeciwnowotworowych. Ze względu na swoje właściwości szczególnym zainteresowaniem naukowców cieszą się obecnie superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza (SPIONs). Jednakże, rosnąca liczba nowych, różnorodnie modyfikowanych i sfunkcjonalizowanych SPIONs zaprojektowanych w celach biomedycznych nie przekłada się na liczbę rozwiązań dopuszczonych do użytku klinicznego. Powodem może być brak odpowiednich metodyk, które umożliwiłyby badanie oddziaływań tych nanomateriałów ze składnikami surowicy krwi ludzkiej. Bowiern wydaje się być niezbędnym zrozumienie zmian, którym podlegać będą nowoczesne SPIONs w środowisku fizjologicznym, by za pomocą doboru ich budowy było można znacząco wpływać na efektywność testów klinicznych.

Głównym celem Rozprawy Doktorskiej było opracowanie nowoczesnych metodyk analitycznych opartych na technikach spektroskopowych umożliwiających charakteryzowanie superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza i badanie ich zmian w obecności białek surowicy krwi ludzkiej. Tym samym opracowana platforma analityczna pozwoliłaby na zrozumienie procesów i mechanizmów odpowiedzialnych za tworzenie koron białkowych na powierzchni syntezowanych nanocząstek o potencjalnych zastosowaniach teranostycznych, stanowiąc tym samym istotny krok na drodze do ich ukierunkowania względem komórek nowotworowych.

W pierwszym etapie badań opracowana wcześniej metoda charakteryzowania SPIONs z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej połączonej z tandemową spektrometrią mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcji (CE-ICP-MS/MS) została wykorzystana do zbadania oddziaływań komercyjnie dostępnych nanocząstek tlenku żelaza z albuminą surowicy krwi ludzkiej w symulowanych warunkach fizjologicznych. Potwierdzono utworzenie korony białkowej na powierzchni nanomateriałów i tym samym wykazano stosowalność opracowanej metody do badania oddziaływań SPIONs z pojedynczymi białkami.

Jednakże, ze względu na niewystarczającą jakość rozdzielenia sygnałów pochodzących od wybranych białek (albuminy i transferyny), uniemożliwiająca oznaczanie różnych form SPIONs tworzących się w próbce zawierającej te białka, przeprowadzono reoptymalizację metody, celem uzyskania jak największej jej rozdzielczości.

Równolegle prowadzone były badania nad syntezą nanomateriałów o właściwościach superparamagnetycznych. Otrzymano nanocząstki Fe_3O_4 o pożądanych cechach, a mając na względzie badanie różnych form SPIONs tworzących się w surowicy krwi ludzkiej, zaproponowano alternatywną metodę zmiany selektywności syntezowanych nanocząstek względem wybranych analitów poprzez domieszkowanie. Wykorzystując spektrofotometrię UV/Vis i właściwości magnetyczne otrzymanych nanocząstek potwierdzono wpływ przykładowej domieszki (miedzi) na selektywność otrzymanych nanocząstek względem wybranego analitu (w tym przypadku kuprizonu), potwierdzając użyteczność zaproponowanej metodyki badawczej do planowanych w przyszłości prac doświadczalnych.

W kolejnym etapie badań podjęte zostały próby scharakteryzowania syntezowanych SPIONs za pomocą ICP-MS/MS w trybie analizy pojedynczej cząstki (spICP-MS/MS), jednak ze względu na ograniczenia związane z wielkością nanomateriału (właściwości superparamagnetyczne wykazują nanocząstki o średnicy rdzenia poniżej 30 nm) i parametrem dolnej granicy wykrywalności rozmiaru (LOSD) niemożliwym było wykorzystanie tej techniki do badania rozmiaru nanocząstek. Zaproponowano jednak zastosowanie tej techniki do monitorowania zmian stabilności SPIONs w obecności białek, wykorzystując zjawisko stabilizacji nanomateriałów poprzez tworzącą się koronę białkową. Za pomocą otrzymanych histogramów rozkładu wielkości nanocząstek potwierdzono ograniczenie aglomeracji syntezowanych nanomateriałów pod wpływem ich inkubacji w albuminie lub surowicy krwi ludzkiej, a także wykazano trwałość połączeń powstałych między białkami i SPIONs.

Ostatnim etapem prac było wykorzystanie zoptymalizowanej metody CE-ICP-MS/MS do badania zmian opisanych wcześniej syntezowanych SPIONs w obecności albuminy i transferyny. Jednakże, ze względu na trudne do przezwyciężenia problemy z analizą tych nanomateriałów, zdecydowano się na zastosowanie SPIONs syntezowanych w atmosferze gazu obojętnego i modyfikowanych stabilizatorami ograniczającymi ich aglomerację. Otrzymane elektroferogramy wykazały nietrwałość powstającej korony białkowej w warunkach rozdzielania elektroforetycznego. Zaobserwowano jednak korelację pomiędzy czasami migracji SPIONs i białkami, z którymi były one inkubowane, co potwierdziło jednak

wcześniejszą interakcję nanocząstek z białkami. Otrzymane wyniki wskazują na kluczowy wpływ właściwości magnetycznych na trwałość korony w trakcie analizy – bowiem, pomimo że komercyjnie dostępne nanomateriały wykazywały ograniczoną magnetyczność w porównaniu do tych syntezowanych (ze względu na specyficzne pokrycie), obserwowane połączenia były trwałe w warunkach prądowych.

Opracowane w ramach Rozprawy metodologie analityczne stanowią użyteczne narzędzia do badania oddziaływań SPIONs w próbkach zawierających składniki biologiczne. Pomimo że stosowalność zoptymalizowanej metody CE-ICP-MS/MS jest ograniczona ze względu na nietrwałość korony białkowej w warunkach prowadzonego rozdzielania, to przeprowadzone prace badawcze wciąż stanowią istotny krok na drodze do zrozumienia oddziaływań nanocząstek z białkowymi składnikami krwi.

Słowa kluczowe: techniki spektroskopowe, spektrometria mas, superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza, białka surowicy krwi ludzkiej

Abstract of the Thesis

Analytical platform based on spectroscopic techniques for the characterization of tumor-targeted superparamagnetic iron(II, III) oxide nanoparticles

Cancer is the second leading cause of death worldwide and one of the biggest challenges for public health care. A potential solution to this challenge may lie within nanomedicine, which applies nanomaterials to diagnose and treat different diseases. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) are of great interest among various nanomaterials due to their unique properties. However, despite the growing number of novel SPIONs with potential biomedical applications, there is a lack of proper methodologies that would allow investigation of their interactions with human serum components. The comprehension of transformations of SPIONs in biological media and the impact of specific surface modification and functionalization on those processes is crucial for their future approval for clinical usage.

The main purpose of this Thesis was, therefore, to elaborate on analytical methodologies based on the spectroscopic techniques for the characterization of the SPIONs and investigation of their transformation in the presence of human serum proteins. Understanding the mechanism of protein corona formation on differently modified and functionalized SPIONs would be essential in obtaining cancer-targeted theranostic nanomaterials.

In the first step of the research, the previously developed capillary electrophoresis inductively coupled plasma tandem mass spectrometry (CE-ICP-MS/MS) method for the characterization of SPIONs was used to study the interactions of commercially available iron oxide nanoparticles with human serum albumin in the simulated physiological conditions. The obtained results confirmed the formation of protein corona and demonstrated the applicability of the developed method to study interactions of SPIONs with individual proteins. However, due to the poor resolution between protein signals (albumin and transferrin), monitoring the SPIONs changes in more complex samples was insufficient. For this reason, the method was re-optimized with an emphasis placed on improving the separation of signals of those proteins.

Additionally, the synthesis of iron oxide nanoparticles with superparamagnetic properties was conducted. Fe₃O₄ nanoparticles with the desired characteristics were obtained, and considering the study of various forms of SPIONs forming in human blood serum, an alternative method of changing the selectivity of the synthesized nanoparticles toward

selected analytes by doping was proposed. UV/Vis spectrophotometry methodology utilizing superparamagnetic properties of obtained SPIONs was developed, and the influence of an exemplary admixture (copper) on the selectivity of the obtained nanoparticles towards the selected analyte (in this case – cuprizone) was confirmed.

In the next step of the investigations, attempts to characterize synthesized SPIONs using single particle ICP-MS/MS (spICP-MS/MS) were made. However, due to the limitations related to the size of the nanomaterial (only nanoparticles with a core diameter below 30 nm exhibit superparamagnetic properties) and the limit of size detection (LOSD) parameter, spICP-MS/MS was insufficient to study the size of synthesized nanoparticles. Therefore, a novel spICP-MS/MS methodology, based on the phenomenon of nanomaterials stabilization by protein corona, was presented. The obtained size distribution histograms of SPIONs, showing the reduction of agglomeration of the synthesized nanomaterials, confirmed the impact of their incubation in albumin or human blood serum and demonstrated the stability of the connections formed between proteins and SPIONs.

Optimized CE-ICP-MS/MS methodology was applied to study changes in the previously mentioned SPIONs in the presence of albumin and transferrin. Nevertheless, due to various difficulties, which occurred during the analysis of these nanomaterials, SPIONs synthesized in an inert gas atmosphere and modified with various stabilizers that would limit their agglomeration were used. The obtained electropherograms revealed the formed protein crown's lack of durability under electrophoretic separation conditions. However, a correlation between the migration times of SPIONs and proteins incubated together confirmed interactions between these compounds. Study results indicate the influence of the magnetic properties on the crown's durability during the analysis – commercially available nanomaterials showed limited magnetic properties compared to those synthesized (due to specific surface modification), and their conjugates with proteins were stable under electrophoretic separation conditions.

The analytical methodologies developed in this thesis's frame may find application in examining SPIONs transformations in samples containing biological compounds. Despite the limited applicability of the optimized CE-ICP-MS/MS method under the electrophoretic separation conditions, the conducted research is still an essential step toward understanding the interactions of nanoparticles with protein compounds of human blood.

Keywords: spectroscopic techniques, mass spectrometry, superparamagnetic iron oxide nanoparticles, human serum proteins

Spis treści

Streszczenie Rozprawy Doktorskiej.....	5
Abstract of the Thesis	9
1. Lista publikacji będących podstawą Rozprawy Doktorskiej	13
2. Wstęp	15
2.1. Nanotechnologia a medycyna.....	16
2.2. Superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza	17
2.3. Zastosowania SPIONs.....	17
2.4. Synteza SPIONs.....	19
2.4.1. Synteza rdzeni SPIONs	20
2.4.2. Modyfikacja powierzchni	22
2.4.3. Funkcjonalizacja powierzchni SPIONs.....	22
2.5. Charakteryzowanie parametrów fizyko-chemicznych SPIONs	23
2.6. Korona białkowa.....	24
2.7. Charakteryzowanie oddziaływań SPIONs z białkami	27
2.8. Techniki łączone w badaniu oddziaływań SPIONs z białkami.....	29
2.8.1. Elektroforeza kapilarna i wysokosprawna chromatografia cieczowa	30
2.8.2. Tandemowa spektrometria mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej	31
2.8.3. Elektroforeza kapilarna połączona z tandemową spektrometrią mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej	32
3. Cel pracy	33
4. Przewodnik po publikacjach	35
5. Wykaz publikacji.....	53
6. Oświadczenia współautorów.....	55
7. Bibliografia	67

1. Lista publikacji będących podstawą Rozprawy Doktorskiej

- P1.** J. Kruszewska, J. Sikorski, J. Samsonowicz-Górski, M. Matczuk A CE-ICP-MS/MS method for the determination of superparamagnetic iron oxide nanoparticles under simulated physiological conditions. (2020) *Anal Bioanal Chem.* **412**, 8145-8153.
- P2.** J. Sikorski, N. Obarski, M. Trzaskowski, M. Matczuk Simple Ultraviolet-Visible Spectroscopy-Based Assay for Fast Evaluation of Magnetic Nanoparticle Selectivity Changes after Doping. (2021) *Appl Spectrosc.* **75**, 1305-1311.
- P3.** J. Sikorski, M. Matczuk, A. Kamińska, J. Kruszewska, M. Trzaskowski, A. R. Timerbaev, M. Jarosz Protein-Mediated Transformations of Superparamagnetic Nanoparticles Evidenced by Single-Particle Inductively Coupled Plasma Tandem Mass Spectrometry: a Disaggregation Phenomenon. (2022) *Int J Mol Sci.* **23**, 1088.
- P4.** J. Sikorski, M. Drozd, M. Matczuk Red flags and adversities on the way to the robust CE-ICP-MS/MS quantitative monitoring of self-synthesized magnetic iron oxide(II, III)-based nanoparticle interactions with human serum proteins. (2022) *Molecules.* **27**, 8442.

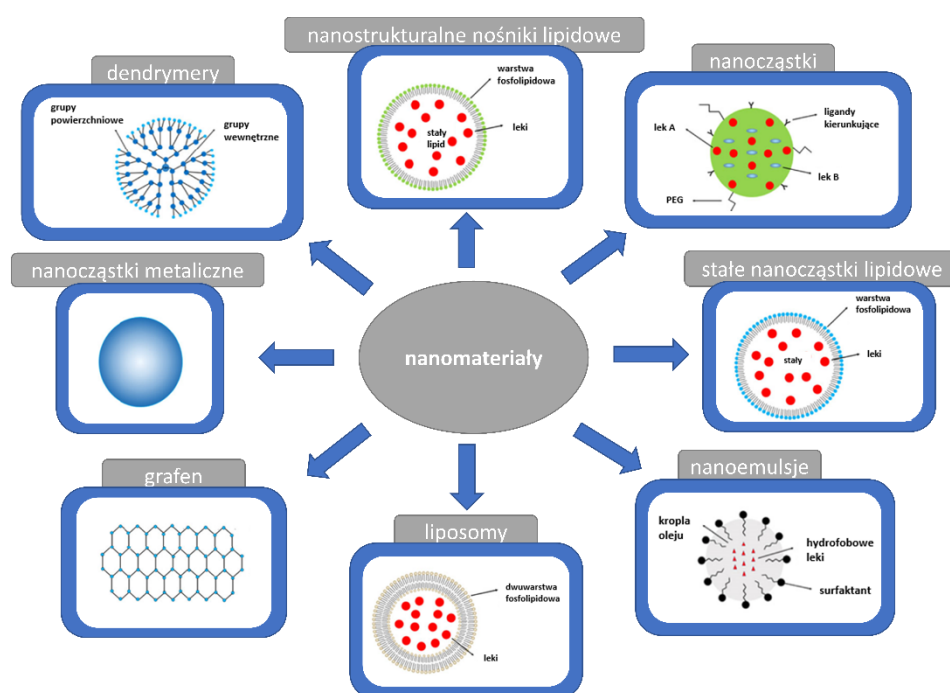
2. Wstęp

Pojęcie nowotworu (z łac. *neoplasma*) odnosi się do grupy chorób wywołanych niekontrolowanym wzrostem i namnażaniem się komórek w ciele ludzkim [1]. W prawidłowo funkcjonującym organizmie komórki mnożą się i różnicują w zależności od zapotrzebowania, a apoptoza, czyli ich zaprogramowana śmierć, wywołana jest wiekiem lub ich uszkodzeniem. Pod wpływem dziedzicznych lub nabytych w wyniku działania różnorodnych czynników zewnętrznych mutacji, organizm ludzki może utracić kontrolę nad tymi procesami [2]. Bezpośrednie przyczyny zmian w materiale genetycznym prowadzące do pojawienia się komórek nowotworowych są różnorodne. Do kluczowych można zaliczyć wystawienie na działanie promieniowania (m.in. Gamma, Rentgena, UV) i niektórych odczynników chemicznych (np. związki azbestu, aflatoksyny), spożywanie wyrobów tytoniowych i alkoholu etylowego, a także infekcje wywołane przez niektóre wirusy (np. HPV). Ponadto niezdrowy tryb życia, brak aktywności fizycznej, nieprawidłowa dieta i otyłość również mogą prowadzić do zachorowania na chorobę nowotworową [3]. Warto również podkreślić, że wraz z wiekiem maleje skuteczność naturalnych mechanizmów naprawczych w organizmie, zwiększając tym samym ryzyko pojawienia się nowotworów [4].

Choroby nowotworowe stanowią jedno z największych wyzwań postawionych przed współczesną medycyną. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia w 2020 roku odpowiadały one za prawie 10 milionów zgonów [5]. Przeprowadzone badania sugerują, że mimo wybuchu pandemii COVID-19, nowotwory są wciąż drugą wiodącą przyczyną śmierci [6,7]. Mimo, że odpowiednia profilaktyka ma ogromne znaczenie i może ograniczyć odsetek zachorowań, to rozwój diagnostyki i terapii pozwalających na wczesne wykrycie i eliminację komórek nowotworowych jest niezbędny. Wśród najczęściej stosowanych, jak dotąd, metod leczenia można wymienić m.in. radioterapię, chemioterapię i bezpośrednią interwencję chirurgiczną. Jednak, pomimo znacznego rozwoju medycyny na przestrzeni ostatnich lat, metody te wciąż podlegają różnego rodzaju ograniczeniom. Operacje chirurgiczne guzów mają największą skuteczność na wczesnych etapach nowotworu (zanim dojdzie do jego przerzutów), a radioterapie i chemioterapie wiążą się z licznymi skutkami ubocznymi ze względu na brak specyficzności [8,9]. Z tego powodu prowadzone są intensywne badania mające na celu opracowanie alternatywnych efektywnych terapii przeciwnowotworowych, a także udoskonalenie metod już istniejących (np. poprzez zastosowanie celowanego systemu dostarczania leków czy wspomaganie bioobrazowaniem).

2.1. Nanotechnologia a medycyna

Nanomedycyna może stanowić potencjalną odpowiedź na postawione zapotrzebowania współczesnej medycyny, dostarczając odpowiednich narzędzi zarówno w obszarze diagnostyki, jak i terapii chorób nowotworowych [10]. Ta interdyscyplinarna dziedzina, łącząca w sobie elementy medycyny, chemii, biologii i inżynierii materiałowej, wykorzystuje nanomateriały – struktury, których przynajmniej jeden z wymiarów przestrzennych mieści się w zakresie 1-100 nm, a wynikające z tego właściwości fizykochemiczne różnią się w stosunku do form makroskalowych wykonanych z tych samych materiałów [11]. Różnice te wynikają przede wszystkim z dużego stosunku powierzchni do objętości tych struktur, skutkując pojawieniem się unikalnych właściwości optycznych, elektrycznych czy magnetycznych [12]. Możliwość biomedycznego wykorzystania nanomateriałów jest ściśle uzależniona od ich wielkości – nanocząstki muszą mieć rozmiar większy niż 6 nm by uniknąć usunięcia przez nerki, i mniejszy niż 200 nm ze względu na zwiększone ryzyko ich wychwycenia przez układ fagocytarny, które skutkuje akumulacją w śledzionie bądź wątrobie [13]. Rysunek 1 przedstawia główne grupy nanomateriałów atrakcyjnych medycznie, które mogą znaleźć zastosowanie w różnego rodzaju terapiach przeciwnowotworowych [12,14].



Rysunek 1. Typy nanomateriałów stosowane w terapiach przeciwnowotworowych

2.2. Superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza

Superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza (z ang. *superparamagnetic iron oxide nanoparticles*, SPIONs), należące do grupy nanocząstek metalicznych, są strukturami nanometrycznymi opartymi o kryształy Fe_3O_4 - żelaza(II) i (III). Cieszą się one obecnie ogromnym zainteresowaniem naukowców ze względu na swoje właściwości [15]. Ich stabilność, mała toksyczność, biokompatybilność, biodegradowalność oraz superparamagnetyzm sprawiają, że materiały te mają ogromny potencjał do bycia wykorzystanymi w teranostyce – jako nanocząstki zastosowane jednocześnie do diagnozy, jak i terapii chorób nowotworowych [16,17]. Właściwości superparamagnetyczne SPIONs są ściśle powiązane z ich wielkością – wykazują je nanocząstki o średnicy rdzenia poniżej 20-30 nm (rozmiar pojedynczej domeny magnetycznej) i mają one zdolność do odwracalnej zmiany momentu magnetycznego pod wpływem działania zewnętrznego pola magnetycznego [15,18]. Właśnie dzięki tym właściwościom mogą one tworzyć stabilne układy koloidalne w matrycach biologicznych i fizjologicznych, a jednocześnie stanowić wielofunkcyjne narzędzie o różnorodnych zastosowaniach teranostycznych [16,19].

2.3. Zastosowania SPIONs

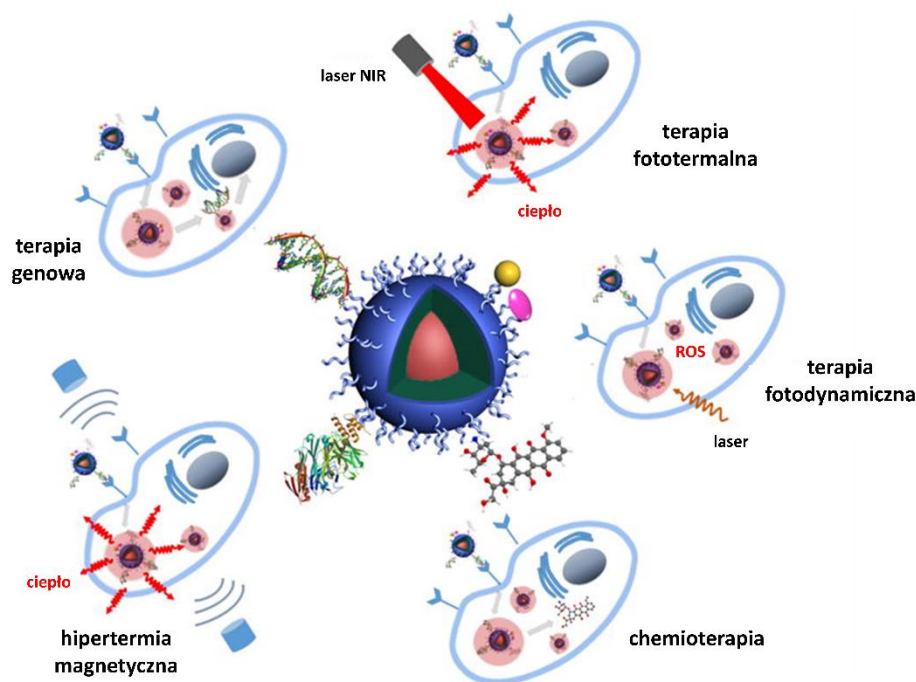
Niektóre ze SPIONs znalazły już zastosowanie w medycynie – kilka z nich zostało dopuszczonych do użytku klinicznego przez Agencję Żywności i Leków jako środki kontrastujące w obrazowaniu rezonansem magnetycznym (z ang. *magnetic resonance imaging*, MRI) [20,21]. Nanomateriały te można uznać za pierwszą generację SPIONs – przeznaczoną wyłącznie do diagnostyki. Prowadzone są jednak badania mające na celu uzyskanie kolejnej generacji nanomateriałów, które łączyłyby funkcje diagnostyczne z terapeutycznymi i pozwoliłyby na precyzyjne dobranie metody leczenia do potrzeb konkretnego pacjenta [22].

SPIONs posiadają szeroki zakres potencjalnych zastosowań wynikających z opisanych wcześniej właściwości [22–24]. W terapii fototermicznej (z ang. *photothermal therapy*, PTT) służą jako nanoosiłki środków absorbujących promieniowanie bliskiej podczerwieni (z ang. *near-infrared radiation*, NIR). Te, pod wpływem napromieniowania światłem lasera, emitują ciepło pozwalające na uśmiercenie komórek nowotworowych w danym obszarze (ablacja guza wywołana wysoką temperaturą) [25,26]. Ponadto, w sytuacji zastosowania zewnętrznego zmiennego pola magnetycznego, same SPIONs mogą stać się źródłem punktowej hipertermii (z ang. *magnetic hyperthermia*) [27,28]. W obu przypadkach powstające ciepło powoduje strukturalne i funkcjonalne uszkodzenia patologicznych komórek będących mniej odpornymi na wysoką temperaturę niż komórki zdrowe. Nawet w przypadku niższych

temperatur (42 °C) może to prowadzić do uwrażliwienia komórek nowotworowych na radioterapię czy chemioterapię, umożliwiając tym samym zmniejszenie stosowanej dawki promieniowania, bądź leku, i ograniczając w ten sposób skutki uboczne leczenia [29,30].

Kolejnym obszarem w zakresie terapii przeciwnowotworowych, w których SPIONs znajdują zastosowanie, jest chemioterapia (z ang. *chemotherapy*). Wynika to z łatwości funkcjonalizacji tych nanocząstek sprawiając, że stanowią one doskonały nośnik różnorodnych substancji terapeutycznych, które łatwo jest związać z powierzchnią nanoobiektów [31]. Wykorzystanie SPIONs jako nanonośników pozwala na wydłużenie czasu krążenia cząsteczek leków we krwi, zwiększając tym samym ich efektywność, a poprzez zastosowanie różnego rodzaju mechanizmów uwalniających transportowane związki (np. uwalnianie indukowane temperaturą, pH lub obecnością konkretnych enzymów) ogranicza ich negatywny wpływ na zdrowe komórki [22,32]. W terapii fotodynamicznej (z ang. *photodynamic therapy*) SPIONs mogą dostarczać środki fotouczulające, które aktywowane promieniowaniem o odpowiedniej długości produkują toksyczne reaktywne formy tlenu (z ang. *reactive oxygen species*, ROS) uśmiercające komórki rakowe w naświetlanym obszarze [33,34]. Kolejnym przykładem jest terapia genowa (z ang. *gene therapy*), gdzie nanocząstki mogą pełnić rolę transportera kwasów nukleinowych. Te z kolei, poprzez zmianę informacji genetycznej komórek nowotworowych (np. prowadzącą do ich apoptozy), mają za zadanie wywołać konkretny efekt terapeutyczny [35]. Ze względu na nietrwałość kwasów nukleinowych, SPIONs pełnią tu dwojaką funkcję – oprócz transportu mają też za zadanie chronić transportowane związki chemiczne przed rozpadem [23]. Co więcej, wykorzystanie zewnętrznego pola magnetycznego do zatężenia i utrzymania nanocząstek w konkretnym miejscu (z ang. *magnetofection*) pozwala na zwiększenie efektywności tej terapii [36].

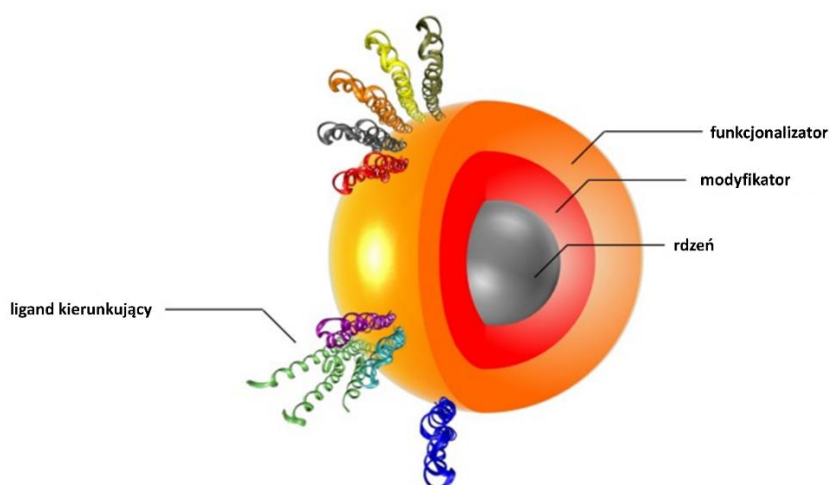
Warto ponadto podkreślić, że ogromną zaletą SPIONs jest zdolność do łączenia różnych terapii w pojedynczej nanopatformie, potencjalnie zwiększając tym samym ich skuteczność w walce z nowotworami (Rysunek 2) [27,32]. Dodatkowo, wspomaganie prowadzonych terapii poprzez zastosowanie MRI pozwala na lokalizację, zdefiniowanie kształtu i wielkości nowotworu, a także umożliwia określenie momentu, w którym stężenie SPIONs w obrębie guza jest największe. Pozwala też na monitorowanie odpowiedzi organizmu i nowotworu na prowadzoną metodę leczenia [25,26,33,34,37]. Takie podejście jest uważane za podstawę teranostyki i stanowić może przyszłość terapii przeciwnowotworowych.



Rysunek 2. Schematyczna ilustracja wielofunkcyjnych SPIONs wraz z ich przykładowymi zastosowaniami (przedrukowano za zgodą Elsevier z [22] str. 1422, ©2017)

2.4. Synteza SPIONs

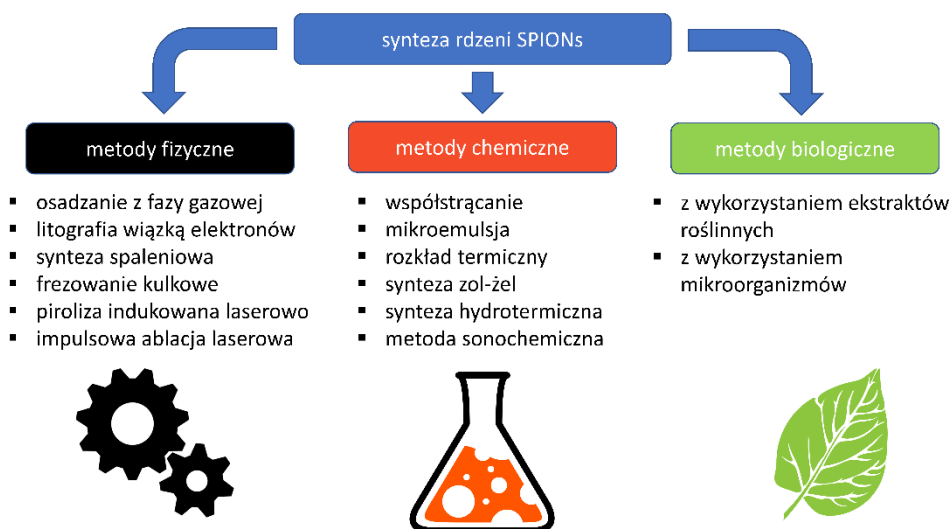
Potencjalne zastosowania biomedyczne nanomateriałów są ściśle uwarunkowane ich strukturą i budową. W syntezie SPIONs o właściwościach wymaganych do zastosowania ich w teranostyce można wyróżnić trzy etapy: syntezę rdzenia nanocząstki, pokrycie nanostruktury odpowiednią modyfikacją, zabezpieczającą rdzeń przed środowiskiem zewnętrznym, a następnie funkcjonalizację powierzchni, której celem jest przyłączenie odpowiednich ligandów nadających konkretne funkcje terapeutyczne (Rysunek 3) [23].



Rysunek 1. Schemat budowy przykładowego wielowarstwowego SPION przeznaczonego do określonych zastosowań teranostycznych [23]

2.4.1. Synteza rdzeni SPIONs

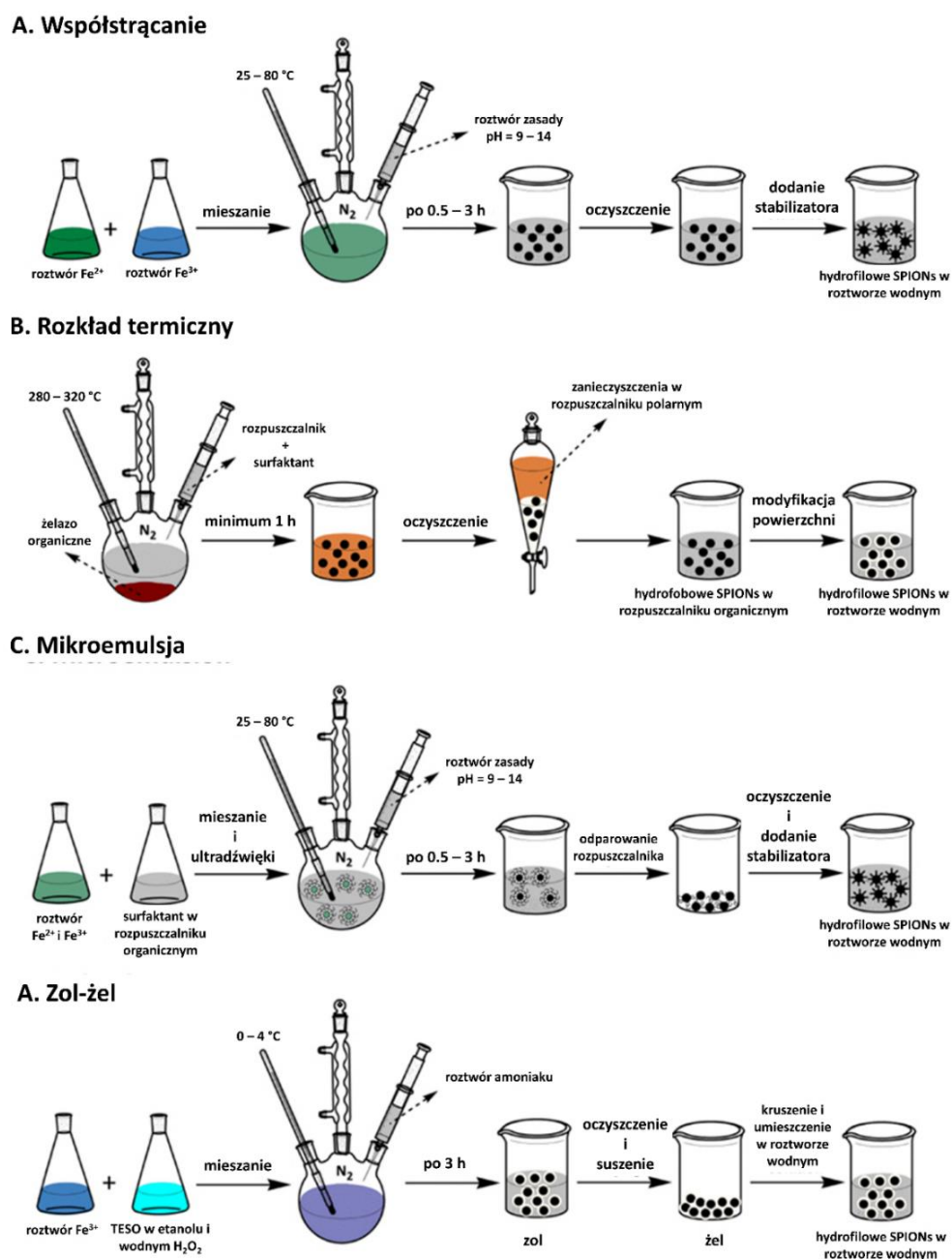
Właściwości magnetyczne SPIONs wynikają ze składu, wielkości i morfologii rdzenia, a otrzymanie nanocząstki o parametrach zapewniających jej superparamagnetyzm jest kluczowe w przypadku późniejszego zastosowania w diagnostyce i terapiach przeciwnowotworowych. Można wyróżnić trzy rodzaje metod syntezy: fizyczne, chemiczne i biologiczne (Rysunek 4) [21].



Rysunek 4. Podział metod syntezy rdzeni SPIONs wraz z przykładami

Metody fizyczne (do których można zaliczyć m.in. osadzanie z fazy gazowej, litografię wiązką elektronów, czy pirolizę indukowaną laserowo) charakteryzują się brakiem precyzyjnej kontroli nad wielkością syntezowanych nanomateriałów [38]. Z kolei w przypadku metod biologicznych (wykorzystujących mikroorganizmy lub ekstrakty roślinne), uzyskane SPIONs wykazują dużą biokompatybilność, jednak należy zaznaczyć, że wydajność procesów syntezy jest mała, a rozkład wielkości otrzymanych nanocząstek szeroki [21,39]. W związku z przedstawionymi wadami fizycznych i biologicznych metod syntezy SPIONs, do najczęściej stosowanych metod należą te oparte na procesach chemicznych [40]. Wśród nich, w kontekście otrzymywania nanomateriałów o zastosowaniach teranostycznych, do najbardziej znaczących można zaliczyć metody: współstrącania, zol-żel, mikroemulsji i rozkładu termicznego. Metoda współstrącania, polegająca na jednoczesnym strącaniu jonów żelaza(II) i żelaza(III) w obecności zasady i jest najprostszą, a także najwydajniejszą, spośród wymienionych metod, co stanowi o jej dużej popularności [41–43]. Mniej powszechne metody, mikroemulsji

i rozkładu termicznego, pozwalają na lepszą kontrolę rozmiaru i morfologii SPIONs o średnicy rdzenia poniżej 20 nm [44–46]. Z kolei metoda zol-żel jest preferowana dla otrzymania nanocząstek większych niż 20 nm i podczas procesów pokrywania ich powłokami krzemionkowymi [47,48]. Schematyczne postępowanie prowadzące do syntezy SPIONs za pomocą ww. metod zostało zamieszczone na Rysunku 5.



Rysunek 5. Schemat postępowania w trakcie syntezy SPIONs w powszechnie stosowanych metodach chemicznych: współstrącania (A), rozkładu termicznego (B), mikroemulsji (C) i zol-żel (D) (przedrukowano za zgodą Elsevier z [21] str. 304, ©2019)

2.4.2. Modyfikacja powierzchni

Stabilność SPIONs w zawiesinach uwarunkowana jest przez oddziaływania hydrofobowo-hydrofilowe, magnetyczne i van der Waalsa [49]. Niemodyfikowane w żaden sposób nanocząstki tworzą aglomeraty celem zmniejszenia wysokiej energii powierzchniowej (spowodowanej ich dużym stosunkiem powierzchni do objętości), co jednocześnie prowadzi do ograniczenia ich właściwości superparamagnetycznych [50]. Modyfikacja powierzchni syntezowanych SPIONs pozwala na uzyskanie nanostruktur wykazujących stabilność w złożonych matrycach biologicznych, a w konsekwencji ograniczenie niepożądanych procesów aglomeracji. Ponadto stosowane powłoki mogą chronić nanocząstki przed utlenianiem, zwiększać ich biokompatybilność względem organizmu ludzkiego, a także ułatwiać przyłączanie konkretnych ligandów funkcyjnych lub cząsteczek leków w trakcie procesów funkcjonalizacji [21,51,52]. Modyfikacja SPIONs może być przeprowadzana z wykorzystaniem np. kwasów tłuszczowych, aminokwasów, metali i ich tlenków. Jednak do tej pory materiały polimerowe stanowią najpopularniejszą grupę związków chemicznych wykorzystywanych w tym celu. Należy podkreślić, że w przypadku projektowania nanocząstek do potencjalnych zastosowań biomedycznych niezwykle ważnym jest, by użyty w procesie modyfikator spełniał określone kryteria. Przede wszystkim powinien być nietoksyczny, biokompatybilny i biodegradowalny. Pośród wielu dostępnych materiałów polimerowych warunki te spełniają m.in. dekstran i glikol polietylenowy (PEG), co powoduje, że to właśnie ich pochodne są najczęściej stosowane do modyfikacji powierzchni SPIONs [21,25,34,37,53]. Warto też zwrócić uwagę, że niewątpliwą zaletą zastosowania PEG jest wydłużenie czasu przebywania modyfikowanych SPIONs w układzie krwionośnym, które wynika z zabezpieczenia nanoobjektów przed usunięciem z organizmu w wyniku działania układu fagocytarnego i zależy często od rodzaju końcowej grupy funkcyjnej łańcucha PEG [53–55].

2.4.3. Funkcjonalizacja powierzchni SPIONs

Jak wspomniano powyżej, celem funkcjonalizacji jest nadanie cząstkom SPIONs konkretnych właściwości chemicznych i funkcji poprzez przyłączanie do powierzchni modyfikowanej nanocząstki wybranych ligandów i biocząsteczek [56]. Przyłączanie tych związków przeprowadzane jest w oparciu o jeden z czterech mechanizmów: (I) związane ze zjawiskiem chemisorpcji, np. przez grupy tiolowe, (II) adsorpcję elektrostatyczną odmiennie naładowanych cząsteczek na powierzchni SPIONs, (III) wiązania kowalencyjne pomiędzy określonymi grupami funkcyjnymi, (IV) wiązania niekowalencyjne oparte na powinowactwie układu receptor–ligand [57]. Ze względu na zasadę ich działania,

funkcjonalizatory można podzielić na dwie grupy. Pierwszą z nich stanowią związki o działaniu terapeutycznym, które dostarczone przez SPIONs do komórek nowotworowych mają na celu wywołanie określonej odpowiedzi, która prowadzi do ich uszkodzenia lub zniszczenia. Do tej grupy można zaliczyć wymienione już wcześniej leki, kwasy nukleinowe czy środki fotouczulające [31–35]. Drugą grupę stanowią związki, które odpowiadają za celowany transport nanocząstek do ognisk nowotworowych.

Z analizy źródeł literaturowych wynika, że biodystrybucja SPIONs w organizmie ludzkim może się odbywać na dwa sposoby [58]. Pierwszym z nich jest bierny transport nanocząstek do nowotworów, który wynika ze zwiększonej przepuszczalności i retencji nanomateriałów w obrębie naczyń guza w stosunku do tkanek zdrowych (z ang. *enhanced permeation and retention effect*, EPR) [59]. Podobne zjawiska w organizmie mają miejsce także w przypadku stanów zapalnych, co może prowadzić do zmniejszenia efektywności biernego transportu nanomateriałów do miejsc objętych nowotworami [60]. Ponadto, w przypadku tego podejścia, kluczowym jest dobór odpowiedniej modyfikacji, która umożliwi wydłużenie czasu cyrkulacji SPIONs we krwi. Jej zastosowanie ułatwia samodzielny transport nanocząstek do patologicznych komórek zanim zostaną one usunięte przez układ fagocytarny [59]. Z kolei transport aktywny związany jest z funkcjonalizacją powierzchni nanocząstek konkretnymi ligandami kierującymi, które specyficznie rozpoznają i następnie łączą się z receptorami umiejscowionymi na powierzchni komórek nowotworowych [61]. Skutkuje to zwiększoną akumulacją nanomateriałów w obszarze guza, ograniczając tym samym negatywny wpływ innych cząsteczek transportowanych przez nanocząstki na zdrowe tkanki. Warto też zwrócić uwagę na unikalną dla SPIONs możliwość wspomagania procesu polem magnetycznym, która może stanowić alternatywę bądź metodę wspomagającą transportu aktywnego [62]. Wśród najpopularniejszych ligandów wykorzystywanych do celowanego transportu opisywanych nanoobjektów można wymienić m.in. kwas foliowy, transferynę, peptydy RGD (składające się z sekwencji argininy, glicyny i kwasu asparaginowego), przeciwciała monoklonalne i aptamery [63–67].

2.5. Charakteryzowanie parametrów fizyko-chemicznych SPIONs

Wraz ze zwiększającą się liczbą opracowywanych nanomateriałów o różnorodnych modyfikacjach i funkcjonalizacjach powierzchni pojawia się zapotrzebowanie na odpowiednie metodyki analityczne pozwalające na ocenę ich parametrów. Etap ten ma kluczowe znaczenie w przypadku prób syntezy nanocząstek projektowanych do konkretnych celów biomedycznych. Nanomateriały te powinny bowiem spełniać określone wymagania

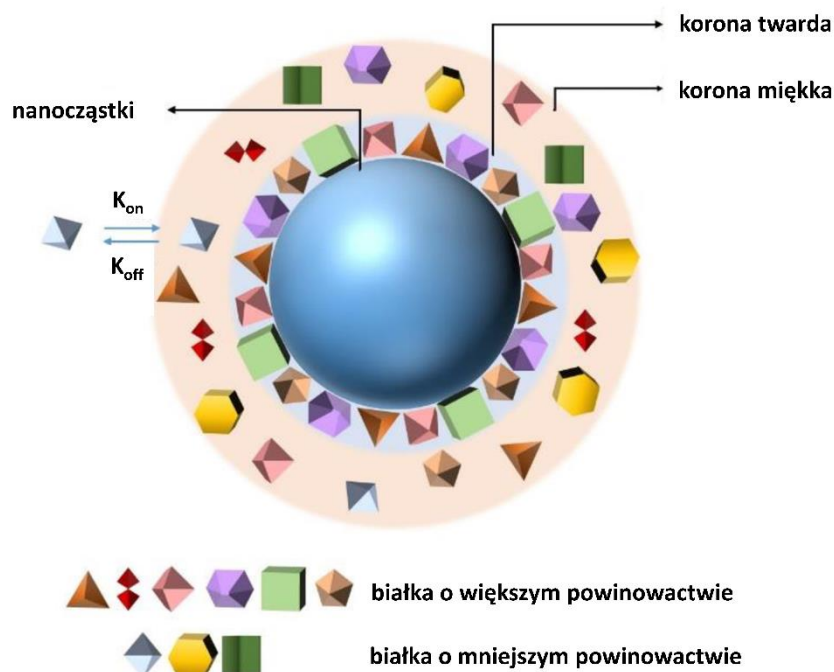
w zależności od ich późniejszego przeznaczenia. Szereg technik znajduje zastosowanie w badaniu parametrów fizyko-chemicznych SPIONs – w dalszej części rozprawy przybliżono najpopularniejsze z nich [68–70].

Dyfrakcja rentgenowska (z ang. *X-ray diffraction*, XRD) jest oparta na elastycznym rozpraszaniu promieniowania rentgenowskiego na badanym materiale i pozwala na ocenę jego struktury krystalicznej (m.in. typu sieci krystalicznej) i rozmiaru nanocząstek [71–74]. Dynamiczne rozpraszanie światła (z ang. *dynamic light scattering*, DLS) umożliwia charakteryzację wielkości SPIONs w zawiesinach i emulsjach (określenie ich średnicy hydrodynamicznej) w oparciu o szybkość poruszania się cząstek na skutek ruchów Browna [37,72]. Z kolei pomiar ruchliwości elektroforetycznej mierzonej po przyłożeniu pola elektrycznego pozwala na otrzymanie informacji o ζ – potencjale (potencjale zeta), parametrze opisującym ładunek powierzchniowy SPIONs (który jest ściśle powiązany ze stabilnością nanomateriału) [72]. Wykorzystanie technik mikroskopowych z kolei, np. transmisyjnej mikroskopii elektronowej (z ang. *transmission electron microscopy*, TEM) i skaningowej mikroskopii elektronowej (z ang. *scanning electron microscopy*, SEM) dostarcza informacji o morfologii, rozmiarze rdzenia i monodispersyjności nanocząstek poprzez zastosowanie wiązki elektronów padającej na powierzchnię nanomateriału (SEM) lub przechodzącej przez badany materiał (TEM) [72,74]. Spektroskopia fourierowska w podczerwieni (z ang. *Fourier-transform infrared Spectroscopy*, FTIR) pozwala na określenie składu powierzchni i potwierdzenie modyfikacji czy funkcjonalizacji poprzez identyfikację konkretnych wiązań pomiędzy atomami (w oparciu o zjawisko pochłaniania światła podczerwonego przy określonych częstotliwościach związanych z energiami drgań tych wiązań), a magnetometria wibracyjna (z ang. *vibrating-sample magnetometry*, VSM) wykorzystując zjawisko indukcji magnetycznej umożliwia zbadanie właściwości magnetycznych SPIONs [71,75].

2.6. Korona białkowa

Przy projektowaniu nanomateriałów o potencjalnych zastosowaniach teranostycznych niezbędnym jest uwzględnienie procesów i przemian, którym będą one podlegały po wprowadzeniu do środowiska fizjologicznego. W momencie ekspozycji na aktywne składniki krwi ludzkiej, SPIONs zostają otoczone przez białka obecne w surowicy, które tworzą tzw. koronę białkową [76]. Przyczyną tego procesu jest duża energia powierzchniowa nanocząstek, prowadząca do adsorpcji składników białkowych na ich powierzchni. Obecnie przyjęta hipoteza opisująca budowę korony białkowej sugeruje, że składa się ona z dwóch

warstw – miękkiej i twardej – które różnią się tym, jak ściśle białka związane są z powierzchnią nanomateriału (Rysunek 6).



Rysunek 6. Schematyczne przedstawienie obecnej hipotezy budowy korony białkowej [77]

Powstała powłoka może stabilizować SPIONs, ograniczając w ten sposób ich ewentualną aglomerację [78,79]. Ponadto ma ona kluczowe znaczenie w procesach fagocytozy. Immunoglobuliny, będące jednymi z najliczniejszych białek tworzących koronę, odpowiadają za stymulację układu odpornościowego do usunięcia nanocząstek [80]. Modyfikacja powierzchni SPIONs (np. za pomocą PEG) ogranicza adsorpcję białek poprzez tworzenie bariery sterycznej i tym samym chroni nanomateriał przed opsonizacją (przyłączeniem do jego powierzchni cząsteczek promujących fagocytozę). Należy jednak podkreślić, że stosowane modyfikacje nie są wystarczające do całkowitego ograniczenia procesu tworzenia się korony białkowej [81].

Powstała powłoka w znaczący sposób wpływa na oddziaływania nanocząstek z ich otoczeniem chemicznym [82]. Jest to także jeden z powodów, przez które aktywny transport SPIONs z wykorzystaniem ligandów kierujących nie wyszedł jak dotąd poza fazę testów przedklinicznych [83]. Powstająca korona białkowa może maskować cząsteczki, którymi sfunkcjonalizowane zostały nanocząstki, blokując tym samym oddziaływania między ligandami kierującymi a powierzchnią komórek nowotworowych [82]. Występowanie tego zjawiska sygnalizuje potrzebę uwzględnienia procesów adsorpcji białek na powierzchni nanocząstek podczas projektowania SPIONs o konkretnych zastosowaniach teranostycznych.

Źródła literaturowe wskazują, że istnieje możliwość kontrolowania składu tworzącej się korony białkowej. Wykazana została zależność pomiędzy stosowanymi modyfikacjami powierzchni SPIONs, a budową powstającej korony [84–87]. Co więcej, skład i rozmiar nanoobjektów także mają znaczący wpływ na strukturę tworzącej się powłoki [88,89]. Poprzez modyfikację tych parametrów i zastosowanie odpowiednich modyfikatorów w trakcie syntezy można wpłynąć na skład korony białkowej, a tym samym na biodystrybucję SPIONs w organizmie [90].

Wykorzystanie transferyny może być potencjalnym rozwiązaniem problemu przysłaniania ligandów kierujących przez koronę białkową. Transferyna jest białkiem surowicy krwi ludzkiej odpowiedzialnym za celowany transport jonów żelaza do komórek nowotworowych [64]. Komórki te wykazują nadekspresję receptora transferyny ze względu na zwiększone zapotrzebowanie na żelazo w trakcie procesów kancerogenezy [91]. Prowadzone już były próby wykorzystania transferyny jako liganda kierującego, jednak nie przyniosły one jak dotąd oczekiwanych efektów. W przeprowadzonych badaniach *in vitro* nie odnotowano istotnych różnic w akumulacji SPIONs sfunkcjonalizowanych transferyną w stosunku do tych bez transferyny [92]. Przyczyn tego można upatrywać w sposobie prowadzenia funkcjonalizacji – była ona realizowana w warunkach laboratoryjnych, a otrzymane nanocząstki były następnie wprowadzane do środowiska fizjologicznego. Źródła literaturowe podkreślają, że korona białkowa ma dynamiczną (tzn. zmieniającą się w czasie pod względem składu) strukturę [93]. Zgromadzone na powierzchni SPIONs białka, w tym początkowo przyłączona transferyna, zostają zastąpione przez inne, liczniejsze lub wykazujące większe powinowactwo względem nanocząstek białka surowicze znajdujące się we krwi. Rozwiązaniem tego problemu może być funkcjonalizacja SPIONs „*in situ*”, czyli po wprowadzeniu do krwiobiegu. Według danych literaturowych istnieje możliwość wpłynięcia na skład powstającej korony. Implikuje to hipotezę, że odpowiednia modyfikacja i funkcjonalizacja powierzchni pozwoliłaby na otrzymanie nanocząstek, które po kontakcie z białkami surowicy krwi ludzkiej łączyłyby się selektywnie z transferyną. Jednak do podjęcia prób otrzymania takich nanocząstek potrzebne są odpowiednie narzędzia, które umożliwią dokładne zbadanie oddziaływań pomiędzy SPIONs a białkami surowicy krwi ludzkiej, oraz zgłębienie mechanizmów odpowiedzialnych za tworzenie korony białkowej i jej skład. Zrozumienie tych oddziaływań pozwoli w przyszłości na podjęcie prób efektywnej funkcjonalizacji powierzchni SPIONs transferyną już we wnętrzu organizmu ludzkiego.

2.7. Charakteryzowanie oddziaływań SPIONs z białkami

Wstępna ocena właściwości SPIONs i przedkliniczna obserwacja zmian form chemicznych w matrycach biologicznych powinny być nieodzownym elementem ich ewaluacji, jeśli mają one zostać wprowadzone do użytku medycznego. Jednakże, wykonywane jak dotąd badania skupiają się w głównej mierze na posyntetycznej charakterystyce podstawowych parametrów otrzymanych nanomateriałów. Natomiast, jeśli podejmują zagadnienia ich interakcji ze związkami biologicznymi, to ograniczają się zwykle do symulowania oddziaływań tylko z wybranym związkiem, pomijając wpływ pozostałych składników matrycy (np. innych białek występujących w surowicy krwi ludzkiej) na kształt zachodzących w zawiesinach zmian. W konsekwencji, mimo ogromnej liczby różnorodnych nanomateriałów, które zostały opracowane na przestrzeni ostatniej dekady, tylko kilka z nich zostało dopuszczonych do komercyjnego użytku [94]. Z tego względu kluczowym wydaje się zaproponowanie odpowiednich narzędzi i metodyk, które umożliwiłyby badanie oddziaływań SPIONs ze składnikami surowicy krwi ludzkiej i zmian tych nanomateriałów w matrycach biologicznych. Zarysowaną problematykę można podzielić na trzy aspekty, które powinny zostać uwzględnione zanim zaprojektowane nanomateriały będą mogły trafić do użytku klinicznego [95].

Pierwszy aspekt dotyczy składu powstającej korony białkowej. Analiza proteomiczna typu „bottom-up” jest główną metodą badawczą wykorzystywaną w tym celu. Jest ona oparta o analizę mas peptydów uzyskanych w wyniku enzymatycznego trawienia powstałej wokół SPIONs korony [96,97]. W proteomice typu „shotgun” mieszanina białek poddawana jest trawieniu proteolitycznemu, a następnie otrzymane peptydy rozdzielane są z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (z ang. *high-performance liquid chromatography*, HPLC). W niektórych przypadkach przed modułem HPLC wykorzystywana jest dodatkowo jedno- lub dwuwymiarowa elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (z ang. *polyacryamide gel electrophoresis*, PAGE) [86]. Następnie otrzymana mieszanina peptydów jest analizowana za pomocą tandemowej spektrometrii mas (z ang. *tandem mass spectrometry*, MS/MS) z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie (z ang. *electrospray ionization*, ESI) lub z jonizacją laserową wspomaganą matrycą (z ang. *matrix assisted laser desorption and ionization*, MALDI). Uzyskane dane porównywane są z informacjami zawartymi w bazach danych w celu identyfikacji unikatowych peptydów i ich sekwencji, prowadząc w ten sposób do poznania białek budujących koronę [90]. Alternatywną, mniej skomplikowaną techniką analityczną pozwalającą na otrzymanie wstępnych informacji na temat składu korony białkowej

jest SDS-PAGE (elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności dodecylsulfanu sodu). Próbkę SPIONs z białkami poddawana jest denaturacji termicznej, rozdzielana elektroforetycznie w obecności związku redukującego, a następnie na podstawie położenia otrzymanych prążków (i porównania ich z wzorcami o znanych masach cząsteczkowych) identyfikowane są białka budujące koronę [85,86,98]. Właściwości magnetyczne SPIONs są niewątpliwą zaletą w przypadku przygotowywania tego typu próbek i rozdzielania połączeń SPIONs z białkami od nieprzereagowanych białek w przypadku obu opisanych technik [99]. Należy jednak podkreślić, że ze względu na dynamiczną strukturę korony nie osiąga ona stanu równowagi, a analiza jej składu może przynosić różniące się wyniki pomiędzy równoległe przygotowanymi próbkami [100].

Kolejnym aspektem koniecznym do poruszenia w przypadku badania oddziaływań SPIONs ze składnikami białkowymi jest ich stabilność w matrycach biologicznych. W badaniach tych zastosowanie znajdują opisane wcześniej techniki służące charakteryzowaniu powierzchni nanocząstek. Zarówno DLS, jak i pomiar ζ – potencjału pozwalają na obserwację zmian parametrów powierzchni pod wpływem tworzącej się korony – jej średnicy hydrodynamicznej i ładunku powierzchniowego, które umożliwiają otrzymanie informacji o stabilności nanomateriałów i ich skłonności do tworzenia aglomeratów [101,102]. Istotną kwestią związaną z tym aspektem badań jest także trwałość stosowanych nanomateriałów w matrycach zawierających składniki biologiczne. Związki obecne w surowicy mogą inicjować stopniowe uwalnianie jonów żelaza, prowadząc tym samym do powolnego rozpadu nanocząstek. Z tego powodu ważnym jest sprawdzenie stabilności i trwałości SPIONs w soli fizjologicznej buforowanej fosforanami, a jeśli to możliwe to także w środowisku nierozcieńczonej surowicy krwi ludzkiej [103]. W literaturze zaproponowana w tym celu została metoda wykorzystująca spektrometrię mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie z podwójnym ogniskowaniem (z ang. *sector field inductively coupled plasma mass spectrometry*), która umożliwia monitorowanie degradacji nanocząstek Fe_3O_4 w oparciu o uwalniane przez nie jony żelaza [104].

Ostatnim aspektem o kluczowym znaczeniu dla opracowania nanocząstek o potencjalnych zastosowaniach medycznych jest określenie kinetyki procesów zachodzących na ich powierzchni po wprowadzeniu do matrycy biologicznej. Różnorodne białka wykazują odmienny stopień powinowactwa względem odpowiednio zmodyfikowanych i sfunkcjonalizowanych SPIONs. Przyjmuje się, że białka o większym powinowactwie będą tworzyły koronę „twardą”, a te o mniejszym „miękką” [105]. Jednak procesy i mechanizmy

odpowiadające za tworzenie się powłoki białkowej są wciąż nieznane. Jedna z opisanych w literaturze teorii podaje, że bezpośrednio po wprowadzeniu SPIONs na ich powierzchni będzie następowała przede wszystkim adsorpcja składników najbardziej powszechnych, a dopiero z czasem będą one zastępowane przez składniki wykazujące większe powinowactwo. Inny scenariusz zakłada przewagę białek preferowanych pod względem kinetycznym na początku tworzenia się korony, a dopiero z czasem zastępowanie ich przez te, które występują w większej ilości (np. albuminę) [95].

Zrozumienie kinetyki procesów, którym podlegają SPIONs po wprowadzeniu do krwiobiegu, jest niezbędne ze względu na istotę parametru jakim jest czas w prowadzeniu procesów diagnostycznych i terapeutycznych z wykorzystaniem nanocząstek. Prowadzone badania nad SPIONs powinny uwzględniać czas cyrkulacji tych nanomateriałów w organizmie i zmiany, którym podlegać będzie korona białkowa w trakcie jego trwania.

Do badania tych zmian wykorzystane mogą być wymienione wcześniej techniki. W literaturze przedstawiono zastosowanie SDS-PAGE i FTIR do monitorowania wpływu czasu inkubacji na skład wykształconej korony białkowej [85]. Jego znaczenie zostało także wykazane dla takich parametrów jak średnica hydrodynamiczna czy ζ – potencjał, których wartości ulegały zmianom wraz ze stopniową modyfikacją składu powłoki białkowej [98]. Opisane jest także zastosowanie spektrometrii mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (z ang. *inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS) do monitorowania zmian zawartości siarki i określonych metali obecnych w strukturze metaloprotein a budujących koronę w czasie prowadzenia doświadczenia [106].

2.8. Techniki łączone w badaniu oddziaływań SPIONs z białkami

Opisane wyżej techniki nie są jednak wystarczające do zrozumienia procesów adsorpcji białek na powierzchni nanocząstek i opisu mechanizmów, które im odpowiadają. Do poznania zasad, od których zależy powinowactwo konkretnych białek do zaprojektowanych SPIONs, potrzeba narzędzi pozwalających na jednoczesne rozdzielanie i wykrywanie różnych form SPIONs, tworzących się w próbkach zawierających składniki białkowe surowicy krwi ludzkiej. Potencjalną odpowiedzią na takie zapotrzebowanie mogą być techniki łączone. Charakteryzowanie powstających połączeń między SPIONs i białkami może być realizowane poprzez zastosowanie wysokosprawnych technik rozdzielania form, takich jak elektroforeza kapilarna (z ang. *capillary electrophoresis*, CE) czy HPLC, sprzężonych z czułymi modułami ich identyfikacji i oznaczania [107,108].

2.8.1. Elektroforeza kapilarna i wysokosprawna chromatografia cieczowa

Zarówno CE, jak i HPLC powszechnie wykorzystywane są do rozdzielania białek celem ich późniejszej identyfikacji za pomocą odpowiednich detektorów [109–111]. Jednak w przypadku SPIONs w literaturze można znaleźć jedynie pojedyncze przykłady zastosowania wybranych technik rozdzielania do badania tych nanomateriałów. Jak dotąd z powodzeniem przeprowadzone zostały próby rozdzielania SPIONs o różnych modyfikacjach powierzchni za pomocą elektroforezy kapilarnej [112]. Opisane są także zastosowania strefowej elektroforezy kapilarnej (z ang. *capillary zone electrophoresis*, CZE) do badania nanometrycznych struktur tlenku żelaza. W przeprowadzonych pracach badawczych podkreślona jest istotność wpływu ładunku powierzchniowego nanomateriałów na procesy adsorpcji nanomateriałów do wewnętrznej powierzchni kapilary – zalecane jest zastosowanie odpowiednich modyfikacji powierzchni nanocząstek (np. cytrynianem lub wodorotlenkiem tetrametyloamoniowym, TMAOH) w celu zmiany ich ładunku powierzchniowego na ujemny lub modyfikacji powierzchni kapilary kationowym surfaktantem [113,114]. Ponadto warto też zaznaczyć, że w podjętych pracach badawczych wykorzystujących CE podkreślany jest wielokrotnie wpływ składu buforu pracującego na jakość otrzymywanych sygnałów pochodzących od SPIONs [115,116]. W opisanych przykładach w połączeniu z elektroforezą do detekcji nanomateriałów wykorzystywane były detektory UV/Vis lub z matrycą diodową (z ang. *diode array detector*, DAD). W przypadku wykorzystania HPLC do rozdzielania magnetycznych nanocząstek w literaturze opisanych przykładów jest jeszcze mniej. Technika ta została wykorzystana do badania metabolitów nanocząstek tlenku żelaza powstających po ich inkubacji w symulowanych warunkach kwasu żołądkowego i w hodowlach komórkowych (Caco-2 i HT-29). W drugim przypadku wykorzystanie chromatografii cieczowej pozwoliło na rozdzielenie powstających w wyniku tego doświadczenia różnych form żelaza (monodispersyjnych nanocząstek, ich agregatów i żelaza w formie jonowej) [117]. Przy czym, w przypadku kiedy założeniem prowadzonych badań była próba symulacji warunków fizjologicznych (i wspomniana ewentualna funkcjonalizacja „*in situ*”) – elektroforeza kapilarna wydaje się stanowić lepszy wybór. Rozdzielenie zachodzi w łagodnych warunkach buforu fizjologicznego, w przeciwieństwie do HPLC, gdzie często wymagane jest użycie jako fazy ruchomej rozpuszczalników organicznych. Ponadto w przypadku chromatografii niezbędne jest także zastosowanie dodatkowo związków powierzchniowo czynnych celem elucji nanomateriałów z kolumny – te z kolei mogą prowadzić do zaburzenia procesów tworzenia się korony białkowej wokół nanocząstek [118]. Zastosowanie CE cechuje się dodatkowo małym zużyciem próbki i umożliwia uzyskanie większej rozdzielczości metody

niż w przypadku wykorzystania HPLC – co wydaje się mieć kluczowe znaczenie dla rozdzielania różnych form SPIONs, powstających w próbkach surowicy krwi ludzkiej. Ponadto w wykorzystywanym mechanizmie rozdzielania anality nie oddziałują z elementami układu (jak np. w przypadku wypełnienia kolumny w HPLC), dzięki czemu ich wpływ na tworzącą się koronę białkową powinien być ograniczony.

2.8.2. Tandemowa spektrometria mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej

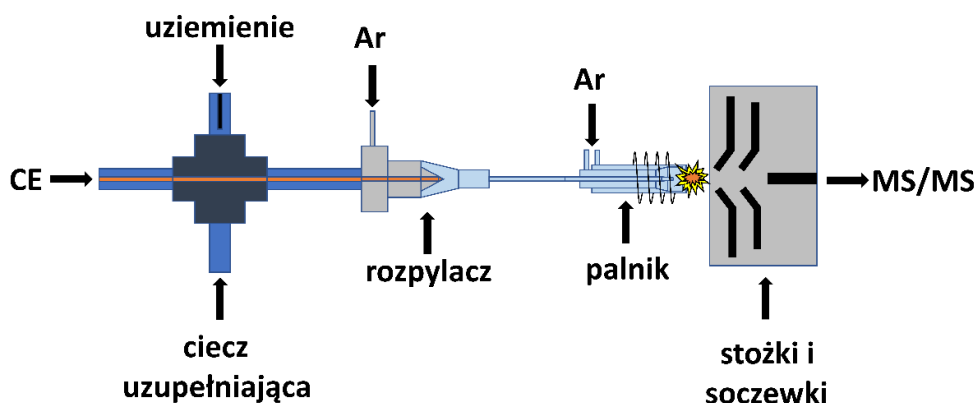
Spektrometria mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej stanowi jedną z wiodących technik w analizie elementarnej. Umożliwia ona oznaczanie metali i metaloidów na poziomie ultraśladowym w zróżnicowanych matrycach, cechując się przy tym dużą czułością i małymi wartościami granic wykrywalności [119].

Technika ICP-MS znalazła już zastosowanie w badaniu SPIONs – wykorzystywana jest m.in. do oznaczania zawartości żelaza pochodzącego z nanocząstek zakumulowanych w narządach myszy i szczurów czy wchłanianych przez określone szczepy komórek nowotworowych [56,120,121]. Warto jednak podkreślić, że analiza ^{56}Fe (najbardziej powszechnego izotopu żelaza) za pomocą ICP-MS obarczona jest występowaniem poliatomowych interferencji spektralnych (m.in. $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$ pochodzących od gazu stosowanego do podtrzymywania płomienia plazmy i $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}$ od składników matrycy) [122]. Wykorzystanie tandemowej spektrometrii mas (z ang. *tandem mass spectrometry*, MS/MS) stanowi jedną ze strategii umożliwiających ograniczenie tego problemu poprzez zastosowanie komory kolizyjno-reakcyjnej, która pozwala na zminimalizowanie wpływu wymienionych interferencji spektralnych na wynik oznaczenia [123]. Przy czym należy zwrócić uwagę, że ze względu na przeznaczenie opracowywanych metodyk (badania oddziaływań SPIONs z białkami) wybór gazu kolizyjno-reakcyjnego powinien być podporządkowany nie tylko ograniczeniu występujących interferencji względem żelaza, ale także względem sygnału siarki (będącej składnikiem cysteiny i metioniny – aminokwasów budujących białka) [124]. Oznaczanie małych stężeń siarki (jako najpowszechniejszego izotopu ^{32}S) było przez długi okres funkcjonowania techniki ICP-MS niemożliwe ze względu na występowanie interferencji poliatomowych (m.in. $^{16}\text{O}_2$) – dopiero zastosowanie komory z użyciem tlenu jako gazu reakcyjnego pozwoliło na monitorowanie jej sygnału, dzięki zmianie stosunku masy do ładunku analitu ($^{32}\text{S}^{16}\text{O}$) [125].

2.8.3. Elektroforeza kapilarna połączona z tandemową spektrometrią mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej

Mimo że połączenie CE-ICP-MS/MS nie zostało jak dotąd wykorzystane do badania oddziaływań magnetycznych nanocząstek Fe_3O_4 ze składnikami surowicy krwi ludzkiej, to w źródłach literaturowych opisane zostało skuteczne wykorzystanie CE-ICP-MS do badania oddziaływań innych nanomateriałów (nanocząstek złota i kropek kwantowych) z białkami surowicy krwi ludzkiej [126,127]. To potwierdza potencjał tej techniki do planowanych prac badawczych. Należy jednak zaznaczyć, że ze względu na różnicę w stosowanych przepływach cieczy między modułami takie sprzężenie aparaturowe wymaga zastosowania specjalnego łącznika (interfejsu) wykorzystującego połączenie krzyżowe. Jego zastosowanie umożliwia doprowadzenie do próbki tzw. cieczy uzupełniającej – rozcieńczonego roztworu buforu pracującego z dodatkiem wzorca wewnętrznego. Z jednej strony umożliwia to zamknięcie obwodu elektrycznego w procesie elektroforezy kapilarnej, a z drugiej pozwala na efektywny transport małych objętości próbki do źródła jonów po jej początkowym rozdzielaniu w kapilarze. Jednakże, ze względu na niestabilność pracy tego połączenia, wymagane jest znaczne doświadczenie operatora i jego biegłość w obsłudze tych dwóch modułów i łącznika. Z tego powodu tylko kilka zespołów badawczych na świecie zajmuje się zastosowaniem tej techniki w prowadzonych pracach badawczych, a źródła literaturowe opisujące jej wykorzystanie, w porównaniu z innymi technikami łączonymi, są nieliczne.

Schemat opisanego układu został zaprezentowany na Rysunku 6.



Rysunek 6. Schemat połączenia aparaturowego ICP-MS/MS

3. Cel pracy

Choroby nowotworowe, będące drugą wiodącą przyczyną zgonów na świecie, stanowią jedno z największych wyzwań postawionych przed współczesną służbą zdrowia. Potencjalnych rozwiązań medycyna upatruje w nanotechnologii, dziedzinie nauki wykorzystującej nanomateriały do diagnostyki i terapii chorób nowotworowych. Szczególnym zainteresowaniem naukowców cieszą się obecnie superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza (SPIONs), które ze względu na swoje właściwości mogą być wykorzystane zarówno do diagnostyki, jak i terapii chorób nowotworowych. Jednak zanim nanomateriały te będą mogły trafić do użytku klinicznego niezbędnym jest zrozumienie procesów i zmian, którym podlegają po wprowadzeniu do organizmu ludzkiego. Brak odpowiednich narzędzi pozwalających na efektywne monitorowanie tych zmian stanowi jedną z głównych przyczyn niewielkiego udziału nowoczesnych SPIONs w badaniach klinicznych poświęconych nowotworom.

Głównym celem niniejszej rozprawy było opracowanie nowoczesnych metodyk analitycznych opartych na technikach spektroskopowych, które umożliwiłyby charakteryzowanie SPIONs o potencjalnych zastosowaniach teranostycznych i badanie ich oddziaływań z białkowymi składnikami surowicy krwi ludzkiej.

Szczególny nacisk położono na możliwość wykorzystania techniki sprzężonej – elektroforezy kapilarnej z tandemową spektrometrią mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie, zakładając jego użyteczność jako narzędzia do badania zmian superparamagnetycznych nanocząstek w obecności białek. Zgodnie z przyjętą hipotezą badawczą, opracowaną wcześniej w zespole metodę CE-ICP-MS/MS oznaczania komercyjnie dostępnych SPIONs postanowiono wykorzystać do zbadania oddziaływań różnorodnych syntezowanych nanocząstek tego typu z albuminą (najbardziej powszechnym białkiem surowicy) i transferyną (potencjalnym ligandem kierującym nanomateriał na transport aktywny do komórek nowotworowych). Ponadto, opierając się na wnioskach wypływających z dotychczasowych doniesień literaturowych, założono możliwość wykorzystania tandemowej spektrometrii mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie w trybie analizy pojedynczej cząstki do charakteryzowania parametrów syntezowanych SPIONs. Kolejną przyjętą hipotezą badawczą była możliwość zastosowania prostego rozwiązania opartego na technice spektrofotometrycznej do opracowania metodyki badania zmian selektywności domieszkowanych SPIONs względem wybranych analitów, co stanowiłoby skuteczną metodę weryfikacji ich efektywnego kierunkowania na cele nowotworowe w przyszłości.

Opracowana w ten sposób platforma analityczna stanowiłaby zestaw narzędzi do przedklinicznego weryfikowania poprawności syntezy/modyfikacji nanomateriałów tlenku żelaza pod kierunkiem ich preferencyjnego transportu do komórek nowotworowych poprzez wykorzystanie zjawiska tworzenia połączeń z wybranymi białkami we wnętrzu organizmu ludzkiego (zgodnie z ideą funkcjonalizacji *in situ*). Zrozumienie procesów oddziaływania białek z powierzchnią nanocząstek stanowiłoby znaczący krok na drodze do ich wprowadzenia do użytku klinicznego.

4. Przewodnik po publikacjach

Publikacje, w oparciu o które została przygotowana niniejsza rozprawa, będą opisane w ramach tej pracy oznaczeniami od **P1** do **P4**. W przypadku odnoszenia się do treści zawartych w elektronicznych materiałach dodatkowych tych publikacji zostaną zastosowane oznaczenia od **ESM-P1** do **ESM-P4**. W sytuacji, gdy będzie wymagane odniesienie się do konkretnego rysunku bądź tabeli z publikacji lub materiałów dodatkowych wykorzystane zostaną ich oryginalne numery, np. **Tabela P2-1** lub **Rys. ESM-P4-S3**. Rysunki i tabele, które nie znajdują się w publikacjach a zostały przygotowane wyłącznie na potrzeby tego opracowania, będą oznaczane numerycznie, wg kolejności ich występowania w niniejszej rozprawie.

Tematyka rozprawy doktorskiej jest próbą odpowiedzi na zarysowaną we wstępie literaturowym lukę badawczą i dotyczy opracowania platformy bioanalitycznej umożliwiającej charakteryzowanie oddziaływań medycznie atrakcyjnych superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza (SPIONs) z białkowymi składnikami surowicy krwi ludzkiej. Podczas pierwszego etapu badań wykorzystano komercyjnie dostępne SPIONs, by zoptymalizować niezbędne metodyki analityczne służące ich monitorowaniu. Następnie prowadzono prace nad syntezą SPIONs i monitorowaniem ich oddziaływań z pojedynczymi białkami transportującymi krwi – albuminą i transferyną, a także z surowicą krwi ludzkiej.

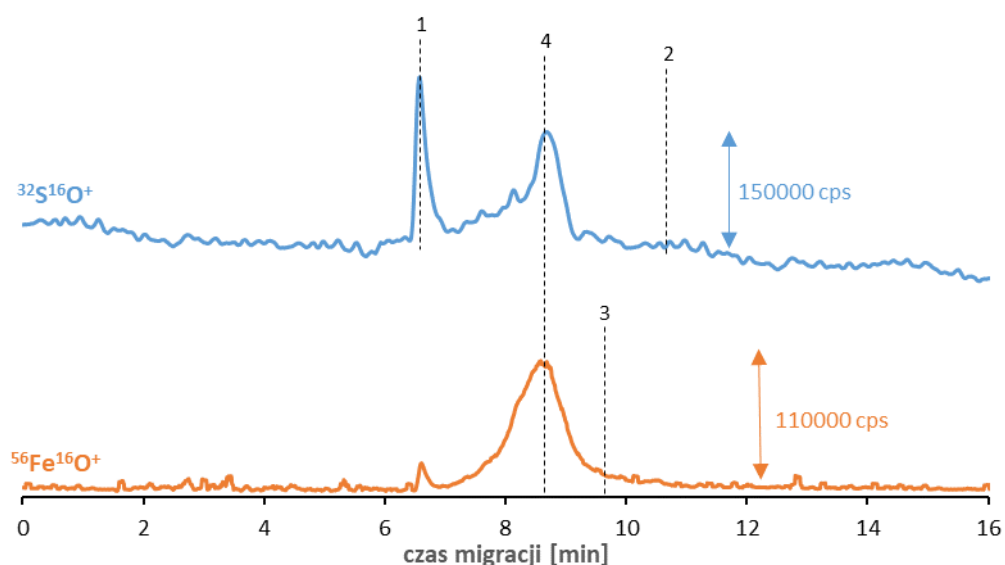
Jako punkt wyjściowy do badań prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy zastosowano metodę, opartą na technice CE-ICP-MS/MS, oznaczania SPIONs (**P1**), w której wykorzystano komorę kolizyjno-reakcyjną oraz tlen jako gaz reakcyjny. Umożliwiło to jednoczesne określenie poziomu zliczeń izotopów siarki (pochodzącego od jonu reakcyjnego $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$, będącego markerem białek zawierających cysteinę i metioninę) i żelaza (pochodzącego od jonu reakcyjnego $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^+$, będącego markerem SPIONs). Monitorowano także liczbę zliczeń jonu $^{51}\text{V}^{16}\text{O}^+$ – pochodzącego od wzorca wewnętrznego a zasysanego wraz z cieczą uzupełniającą. Obserwacja tego ostatniego umożliwiła kontrolę stabilności przepływu próbki między modułami i efektywności doprowadzania analitów do plazmy. Założeniem prowadzonych badań było jak najwierniejsze symulowanie warunków panujących w organizmie ludzkim zarówno podczas przygotowania próbki, jak i jej analizy. Elektroforetyczne bufory pracujące miały pH ludzkiej krwi (tj. 7,4) a kapilarę rozdzielającą utrzymywano w temperaturze 37 °C. Próbki przygotowywane były w buforze symulującym środowisko fizjologiczne (10 mM bufor fosforanowy z dodatkiem 100 mM chlorku sodu, pH 7,4 – tzw. bufor inkubacyjny). Parametry opracowanej metody przedstawiono w **Tabeli P1-1**).

Tabela P1-1. Parametry pracy CE-ICP-MS/MS stosowane do badania oddziaływań SPIONs i albuminy surowicy krwi ludzkiej

Parametry pracy CE	
Bufor pracujący	Wodorowęglan amonu, 20 mM, pH 7,4
Napięcie	+ 18 kV
Temperatura	37 °C
Prąd	26-27 μ A
Parametry pracy ICP-MS/MS	
Moc plazmy	1550 W
Odległość palnika	8,0 mm
Przepływ gazu rozpylającego	1,00 L min ⁻¹
Przepływ gazu reakcyjnego (O ₂)	0,48 mL min ⁻¹
Monitorowane izotopy	$^{56}\text{Fe}^+ \rightarrow ^{56}\text{Fe}^+$, $^{56}\text{Fe}^+ \rightarrow ^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^+$, $^{51}\text{V}^+ \rightarrow ^{51}\text{V}^{16}\text{O}^+$, $^{32}\text{S}^+ \rightarrow ^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$

Prowadzone w ramach rozprawy badania rozpoczęto od sprawdzenia stosowalności przedstawionej powyżej metody w matrycach zawierających białka. Przygotowane próbki, zawierające komercyjnie dostępne SPIONs (o średnicy rdzenia 20 nm, pokryte amifilowym polimerem i zakończone grupami karboksylowymi, producent: Ocean NanoTech, USA) i albuminę ludzką (będącą najbardziej powszechnym białkiem w surowicy krwi), inkubowano przez 30 min w buforze inkubacyjnym w temperaturze 37 °C. Analizie poddano także próbki zawierające pojedyncze reagenty, celem określenia ich charakterystycznych czasów migracji. Zastosowane stężenia indywiduów chemicznych (30 μ g Fe mL⁻¹ dla SPIONs i 1 mg mL⁻¹ dla albuminy) zostały dobrane w oparciu o dane literaturowe dotyczące bezpiecznych dawek nanocząstek stosowanych podczas badań na myszach dla różnego rodzaju terapii przeciwnowotworowych, uwzględniając przelicznik średniej masy ciała (70 kg) i objętości krwi (5 L) u dorosłego człowieka [128,129].

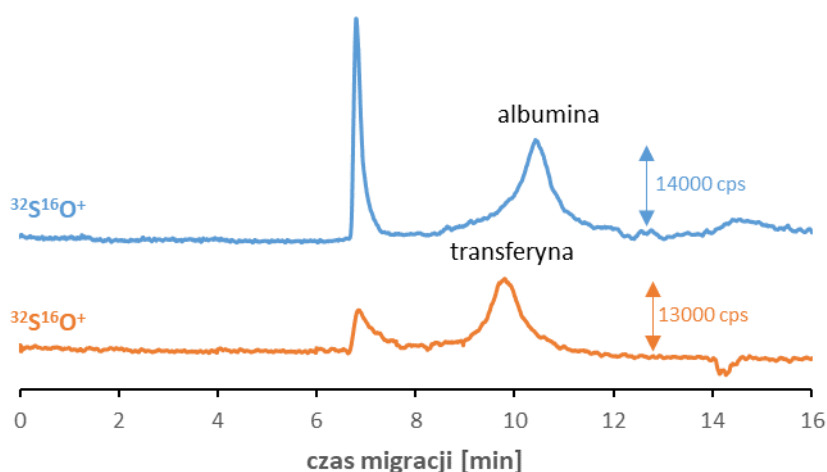
Przebieg elektroferogramów, zarejestrowanych dla próbki zawierającej opisaną powyżej mieszaninę SPIONs i albuminy, względem jonów $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$ i $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^+$ (patrz **Rys. P1-4**) wskazuje na oddziaływanie SPIONs z albuminą. Obserwowane sygnały pochodzące od siarki i żelaza mają taki sam czas migracji, który jest odmienny względem czasów otrzymanych podczas rozdzielania pojedynczych reagentów. Na podstawie otrzymanych wyników potwierdzono powstanie koron białkowych na powierzchni nanocząstek. Uwagę należy zwrócić także na występowanie dodatkowego sygnału pochodzącego od form siarki (oznaczony na rysunku numerem 1) o czasie migracji krótszym niż sygnał pochodzący od albuminy (nr 4). Jego występowanie zaobserwowano na elektroferogramach uzyskanych dla wszystkich analizowanych próbek, w których stosowany był fosforanowy bufor inkubacyjny, gdyż związki te mają zdolność do adsorpcji zanieczyszczeń siarki, także z powietrza [130]. Obecność tych zanieczyszczeń była niemożliwa do wyeliminowania pomimo zastosowania odczynników o czystości do analizy ultraśladowej, w związku z tym sygnał ten wykorzystano jako punkt odniesienia, pozwalający na precyzyjne porównanie względnych czasów migracji analitów pomiędzy analizami prowadzonymi w różnych dniach i obliczenie rozdzielczości metody.



Rysunek P1-4. Elektroferogram CE-ICP-MS/MS zarejestrowany dla próbki zawierającej SPIONs zakończone grupami karboksylowymi ($30 \mu\text{g Fe mL}^{-1}$, sygnał $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^+$) i albuminę (1 mg mL^{-1} , sygnał $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$) w buforze inkubacyjnym po 30 min inkubacji w temperaturze fizjologicznej; sygnał pochodzący od buforu inkubacyjnego (1), albumina (2), SPIONs (3), połączenie SPIONs z albuminą (4)

Otrzymane wyniki potwierdziły możliwość stosowania metody w analizie próbek zawierających SPIONs i pojedyncze białka. W kolejnym etapie prac założono stosowalność

opracowanej metody do badania próbek zawierających inne białka oraz surowicę krwi ludzkiej. Początkowo przeprowadzono analogiczne doświadczenia do tych z zastosowaniem albuminy, jednak badanym białkiem była transferyna – potencjalny transporter żelaza do komórek nowotworowych. Na **Rysunku 1** porównano elektroferogramy zarejestrowane dla próbek zawierających albuminę i transferynę.



Rysunek 1. Elektroferogramy CE-ICP-MS/MS zarejestrowane dla próbek zawierających albuminę (1 mg mL^{-1}) i transferynę (1 mg mL^{-1}) w buforze inkubacyjnym; sygnał $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$

Pomimo tego, że opisana metoda pozwala na jednoczesne monitorowanie jonów siarki i żelaza w próbkach zawierających pojedyncze białka i nanocząstki, analizując wyżej przedstawione dane można wywnioskować, że jej rozdzielczość jest niewystarczająca, by móc analizować próbki zawierające mieszaniny białek lub surowicę. Z tego powodu podjęto się re-optimizacji metody celem uzyskania całkowitego rozdzielenia sygnałów pochodzących od dwóch głównych białek surowicy ludzkiej i poprawy granicy wykrywalności metody względem obu izotopów (**P4**).

Rozdzielczość względem sygnałów białek w kolejnych etapach badań policzono korzystając ze wzoru

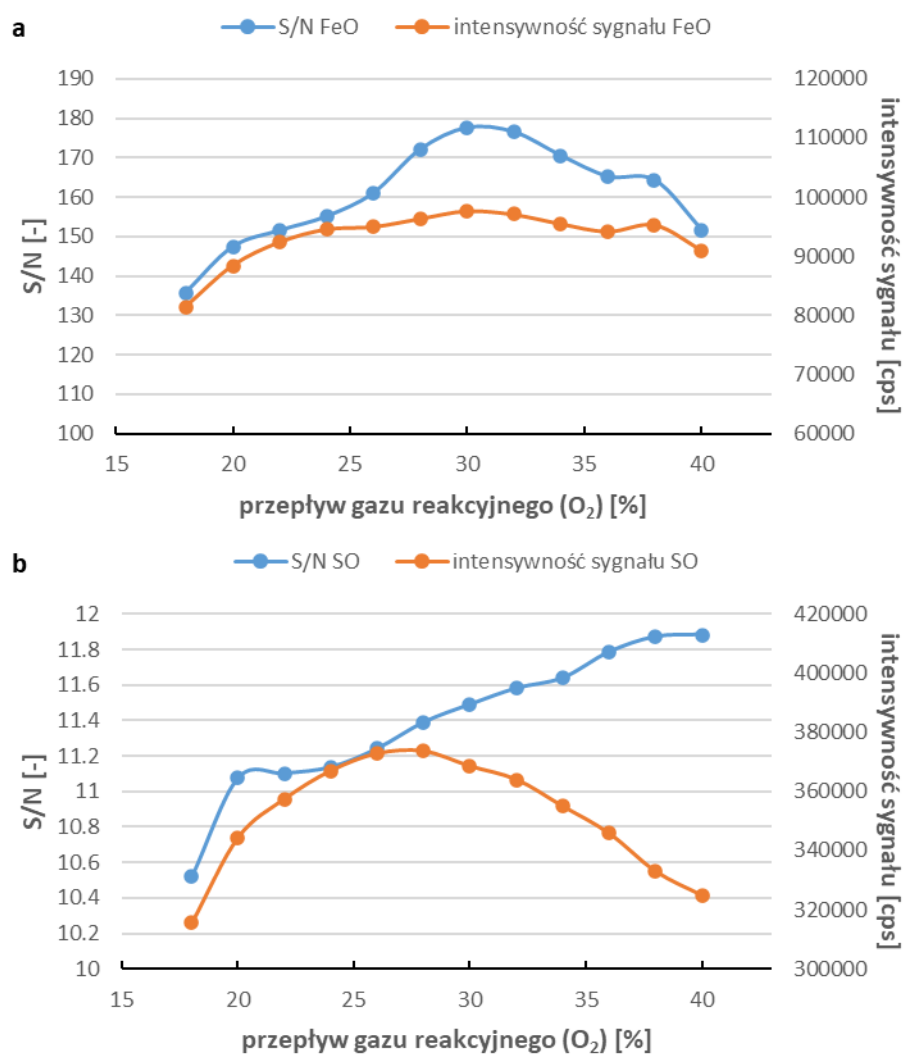
$$R = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{(w_{b1} + w_{b2})}$$

gdzie:

t_R – czas retencji analitu;

w_b – szerokość sygnału analitu przy podstawie.

Parametry pracy detektora ICP-MS/MS, opisane w **P1**, zostały zmodyfikowane celem zmniejszenia wartości granicy wykrywalności względem sygnałów $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$ i $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^+$ poprzez wykonanie rozbudowanej optymalizacji przepływu gazu reakcyjnego (tlenu). Miała ona na celu nie tylko maksymalne zwiększenie liczby zliczeń wybranych jonów, ale także wyznaczenie jak największego stosunku sygnału analitu do szumu linii bazowej (z ang. *signal to noise ratio*, S/N patrz **Rys. ESM-P4-S1**). Na podstawie otrzymanych wyników za optymalny przepływ gazu reakcyjnego uznano $0,45 \text{ mL min}^{-1}$ (odpowiadający 30% maksymalnego przepływu).



Rysunek ESM-P4-S1. Optymalizacja przepływu gazu reakcyjnego (O₂) w oparciu o intensywność sygnałów i stosunek sygnału analitu do szumu linii bazowej $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^+$ i $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$

Następnie rozpoczęto badania mające na celu optymalizację parametrów rozdzielania, prowadzącą do uzyskania jak najlepszej rozdzielczości pomiędzy sygnałami pochodzącymi

od albuminy i transferyny. Informacje znajdujące się w literaturze okazały się mało pomocne, gdyż jak dotąd w badaniach nanomateriałów zawierających żelazo nie zastosowano tandemowego ICP-MS, służącego także do jednoczesnego monitorowania siarki. Natomiast bufor pracujący, używane jak dotąd w badaniu innych metalonanocząstek, nie odnalazłyby zastosowania (np. popularne bufor Gooda takie jak HEPES czy PIPES, zawierające w swojej strukturze siarkę). Z tego powodu poszukiwania odpowiedniego buforu pracującego, jak i pozostałych parametrów metody CE (objętości dozowanej próbki i przykładanego napięcia), prowadzone były w następujący sposób: najpierw sprawdzano rozdzielczość po zastosowaniu różnych składów BGE (np. wodorowęglan amonu z dodatkiem chlorku sodu lub Tris-NaOH z dodatkiem glicyny), a jeśli rezultaty były obiecujące, to przeprowadzano optymalizację objętości dozowanej próbki (w zakresie od 20 mbar przez 5 sekund do 50 mbar przez 5 sekund) oraz przykładanego napięcia (od + 10 kV do + 25 kV). Ze względu na znaczne problemy w poprawieniu jakości rozdzielania podczas optymalizacji testowano także zastosowanie elementów tworzenia warstw elektroforetycznych (z ang. *stacking*, poprzez wydłużanie czasu dozowania lub dozowanie wody przed próbką) czy izotachoforezy (wykorzystanie jonu wiodącego i kończącego o odmiennych ruchliwościach w BGE, np. kwas cytrynowy, askorbinowy lub tricyna jako jony kończące, chlorek sodu jako jon wiodący, a Tris-NaOH jako przeciwjon) [131,132].

Spośród testowanych składów BGE zastosowanie Tris-HCl przyniosło najlepsze rezultaty, będące kompromisem pomiędzy jakością sygnałów, rozdzielczością dwóch wzorców białek a stabilnością działania połączenia elektroforezy ze spektrometrem mas. Optymalizacja metody rozdzielania, opartej o jego wykorzystanie, opisana została szczegółowo w **P4**. W tym etapie prac wykorzystano ponownie komercyjnie dostępne SPIONs pokryte amfifilowym polimerem i zakończone grupami karboksylowymi (o średnicy rdzenia 25 nm, producent: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), a do badania rozdzielczości metody wykorzystano mieszaninę albuminy i transferyny z surowicy krwi ludzkiej o stężeniach wzorców po 1 mg mL⁻¹. Wszystkie próbki wykonano w buforze inkubacyjnym.

W pierwszej kolejności sprawdzono wpływ stężenia buforu Tris-HCl na rozdzielczość sygnałów białek. Stwierdzono pogorszenie jakości sygnałów i stabilności linii bazowej wraz z jego zwiększeniem (od 5 do 20 mM), więc za optymalne uznano stężenie 5 mM. W kolejnym etapie optymalizowano objętość dozowanej próbki. Zaobserwowano, że wraz ze zmniejszaniem stosowanej objętości poprawia się rozdzielczość metody. Do dalszych etapów badań wybrano dozowanie hydrodynamiczne 20 mbar przez 5 sekund

(patrz **Rys. ESM-P4-S2**). Następnie sprawdzono wpływ napięcia przyłożonego do kapilary na rozdzielanie sygnałów białek i nanocząstek. Jak przewidywano, zmniejszenie wartości tego parametru spowodowało wydłużenie czasu analizy i odstępu pomiędzy czasami migracji dla wzorców białek. Wiązało się to jednak ze zwiększeniem szerokości otrzymanych sygnałów przy podstawie i tym samym pogorszeniem parametru rozdzielczości. Przyłożenie napięcia +15 kV pozwoliło na uzyskanie najlepszej możliwej rozdzielczości sygnałów – mimo iż otrzymana wartość (0,85) wskazuje, że nie udało się uzyskać rozdzielania sygnałów białek do linii bazowej, to jest ona wystarczająca by móc określić ewentualne oddziaływania SPIONs z badanymi białkami w oparciu o przebieg elektroferogramów i czasy migracji poszczególnych reagentów (patrz **Rys. ESM-P4-S3**). Zoptymalizowane parametry metody rozdzielania, wykorzystywane w późniejszych badaniach oddziaływań SPIONs z albuminą i transferyną, przedstawiono w **Tabeli P4-2**.

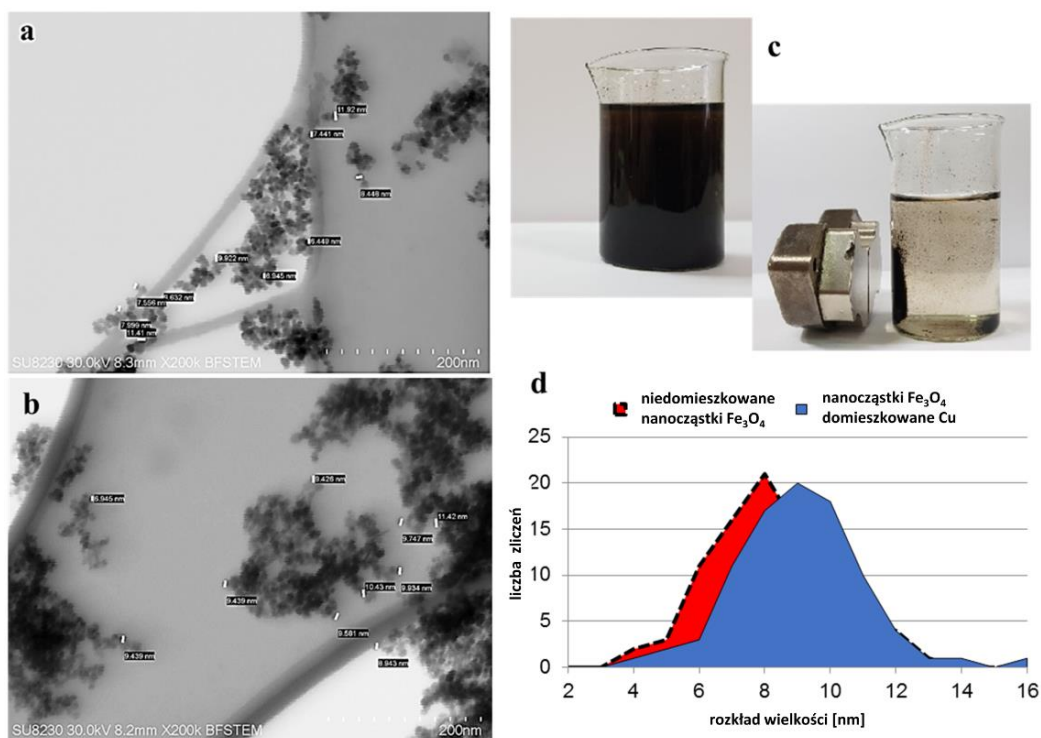
Tabela P4-2. Parametry pracy CE stosowane do badania oddziaływań SPIONs z wybranymi białkami

Parametr	
Bufor pracujący	Tris-HCl, 5 mM, pH 7,4
Temperatura	37 °C
Napięcie	+15 kV
Prąd	6-7 μ A
Objętość próbki	50 mbar \times 5 s
Kapilara	Kapilara ze stopionej krzemionki pokryta warstwą poliimidu, $d_{wew} = 75 \mu\text{m}$, $d_{zew} = 375 \mu\text{m}$, długość 70 cm

Kolejnym etapem pracy badawczej było określenie parametrów analitycznych opracowanej metody badania obu białek (albuminy i transferyny) oraz SPIONs. Otrzymano zadowalające wyniki względem liniowości przygotowanych krzywych kalibracyjnych ($R^2 \geq 0,995$), odzysku z kapilary ($\geq 80\%$), powtarzalności ($\leq 5\%$) i odtwarzalności ($\leq 8\%$) czasów migracji względem wszystkich reagentów. Pomimo, że powtarzalność pól powierzchni otrzymanych sygnałów była wystarczająca, to odtwarzalność nie spełniała postawionego kryterium

(patrz **Tabela P4-3**). Żeby zoptymalizowana metoda mogła być używana do analizy ilościowej zarówno SPIONs, jak i białek, wymagane było przeprowadzenie codziennej kalibracji.

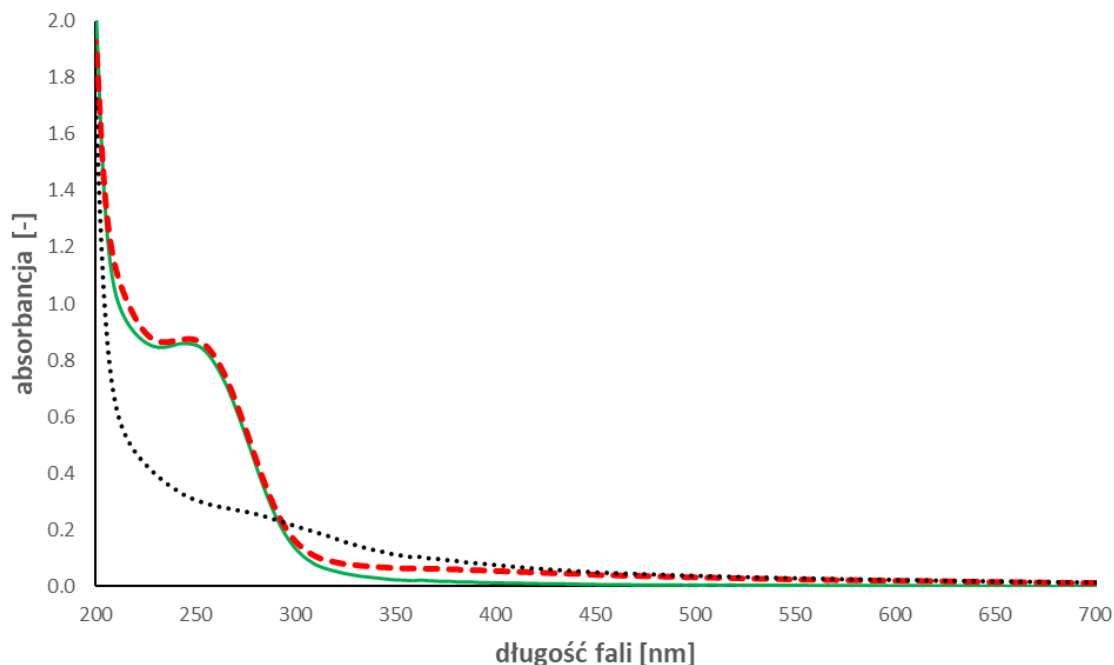
Równoległe do badań nad opracowaniem metodyk charakteryzowania oddziaływań SPIONs z białkami surowicy krwi ludzkiej prowadzone były doświadczenia mające na celu opracowanie sposobu syntezy nanocząstek Fe_3O_4 o właściwościach superparamagnetycznych. Nanocząstki te mogłyby w przyszłości być wykorzystane jako podstawa do dalszych modyfikacji i funkcjonalizacji umożliwiających zwiększenie ich selektywności względem transferyny (**P2**). W oparciu o zmodyfikowaną metodę Massarta [133] zsyntezowano nanocząstki tlenku żelaza, których rozmiar rdzeni oszacowano przy użyciu skaningowej transmisyjnej mikroskopii elektronowej w polu jasnym (BF-STEM). Otrzymane zdjęcia mikroskopowe (**Rys. P2-3**) potwierdziły, że ich średnica (średnio $8,34 \pm 1,78$ nm) znajduje się w zakresie, dla którego nanomateriały wykazywać powinny właściwości superparamagnetyczne. Właściwości te potwierdzono za pomocą magnesu – nanocząstki wykazywały bowiem namagnesowanie tylko po przyłożeniu zewnętrznego pola magnetycznego.



Rysunek P2-3. Zdjęcia BF-STEM niepomieszkowanych (a) i domieszkowanych Cu nanocząstek Fe_3O_4 (b), oddzielenie syntezowanych nanocząstek od roztworu wodnego z wykorzystaniem zewnętrznego pola magnetycznego (c), rozkład wielkości rdzeni syntezowanych nanocząstek Fe_3O_4 (d)

Mając dodatkowo na względzie, że założono wykorzystanie opracowanych metodyk do badania różnych form SPIONs, tworzących się w surowicy krwi ludzkiej, podjęto próby dostosowywania selektywności syntezowanych nanocząstek względem wybranych analitów. Jak zostało objaśnione we wstępie literaturowym, modyfikacja i funkcjonalizacja powierzchni nanomateriału mają wpływ na skład tworzących się koron białkowych. Jako prosty, możliwy do przeprowadzenia na etapie syntezy rdzeni, sposób ukierunkowania nanocząstek na wybrane związki zaproponowano domieszkowanie SPIONs wybranymi metalami. W trakcie syntezy do mieszaniny reakcyjnej, przed strąceniem, dodany był roztwór innego niż żelazo pierwiastka metalicznego w formie jonowej. Biorąc pod uwagę, że transferyna odpowiada we krwi nie tylko za transport żelaza, ale także innych metali [134], domieszkowanie odpowiednimi jonami mogłoby stanowić alternatywną metodę zwiększenia powinowactwa nanocząstek względem tego białka (idea funkcjonalizacji *in situ*), co omówiono w części literaturowej niniejszej rozprawy. W celu potwierdzenia użyteczności domieszkowania jako etapu syntezy mogącego mieć zastosowanie do zmian selektywności nanocząstek względem innych analitów zaproponowano prostą metodę spektrofotometryczną UV/Vis (**P2**). Ważnym parametrem prowadzonych doświadczeń było uzyskanie poprawnego domieszkowania nie pogorszającego właściwości superparamagnetycznych otrzymywanych nanomateriałów. Jako przykładowy pierwiastek domieszkujący do przetestowania użyteczności metody przy badaniu SPIONs zaproponowano miedź, tworzącą barwny związek z kuprizonem w środowisku alkalicznym [135]. Nanocząstki domieszkowane miedzią syntezowano w analogiczny sposób do materiałów niedomieszkowanych – stosując metodę współstrącania. Do wykrywania obecności miedzi w strukturze SPIONs zastosowano optyczną spektrometrię emisyjną (OES), potwierdzając powodzenie przejętego sposobu prowadzenia domieszkowania. Dodatkowo otrzymane zdjęcia BF-STEM wykazały niewielkie zwiększenie średnicy nanocząstek (9,12 nm, **Rys. P2-3**). Pomimo wprowadzenia miedzi do struktury Fe₃O₄, także właściwości magnetyczne otrzymanych SPIONs pogorszyły się jedynie w niewielkim stopniu – nanomateriał wciąż łatwo oddzielał się od roztworu z wykorzystaniem zewnętrznego pola magnetycznego, jednak w dłuższym czasie. By sprawdzić użyteczność procesu domieszkowania do kierunkowania nanomateriału na oddziaływanie z analitem, otrzymane SPIONs zostały umieszczone w roztworze kuprizonu (**Rys. P2-2**). Na podstawie zarejestrowanych w zakresie od 200 do 700 nm widm spektrofotometrycznych, z maksimum absorpcji dla kuprizonu przy długości fali 263 (**Rys. P2-7**), zaobserwowano, że po 5 min interakcji reagentów i następnie usunięciu (z wykorzystaniem pola magnetycznego) nanocząstek domieszkowanych miedzią z roztworu kuprizonu nastąpiło zmniejszenie stężenia tego związku chemicznego w roztworze. Było

to przesłanką do potwierdzenia dominującej roli domieszki w procesie selektywnego łączenia się z analitem, gdyż zjawiska tego nie notowano względem nanocząstek nieomieszkowanych miedzią.



Rysunek P2-7. Widma UV/Vis zarejestrowane dla roztworów nanocząstek Fe₃O₄ i/lub kuprizonu (zielona linia ciągła – kuprizon, czerwona linia kreskowana – kuprizon + Fe₃O₄, czarna linia kropkowana – kuprizon + Fe₃O₄ domieszkowane Cu)

W kolejnym etapie prac w celu scharakteryzowania otrzymanych nanocząstek zostały podjęte próby opracowania metody badania SPIONs z wykorzystaniem spICP-MS/MS (P3). Technika ta stanowi skuteczne narzędzie do charakteryzowania parametrów nanocząstek. Pozwala ona m.in. na pomiar rozkładu wielkości ich rdzeni, dyspersyjności czy stężenia (liczba nanocząstek w 1 mL zawiesiny). Optymalizację metody spICP-MS/MS rozpoczęto od wyboru gazu stosowanego w komorze reakcyjno-kolizyjnej. Podobnie jak w przypadku analizy Fe₃O₄ za pomocą konwencjonalnego trybu pracy tandemowego spektrometru mas, i tutaj zastosowanie komory kolizyjno-reakcyjnej pozwoliło na ograniczenie problemu interferencji spektralnych w badaniu żelaza. Według danych literaturowych wykorzystanie wodoru jako gazu kolizyjno-reakcyjnego umożliwia lepsze niż w przypadku innych gazów (np. amoniaku i helu) wyodrębnienie sygnałów pochodzących od Fe₃O₄ w stosunku do sygnałów tła, i to ten gaz został wybrany do dalszych badań [136]. Następnie przeprowadzono optymalizację przepływu gazu, ponownie stosując metodę opartą o monitorowanie liczby zliczeń i stosunku

sygnału do szumu dla roztworów wybranych wzorców. Najmniejszą wartość granicy wykrywalności (stosunek S/N), a także zadowalającą liczbę zliczeń dla $^{197}\text{Au}^+$ (materiału odniesienia potrzebnego do obliczenia efektywności rozpylania cieczy) uzyskano dla przepływu 5 mL min^{-1} . W kolejnym etapie sprawdzono wpływ szerokości iniektora palnika (1,5 mm vs. 2,5 mm) na wartość granicy wykrywalności rozmiaru (z ang. *limit of size detection*, LOD) – parametru, w oparciu o który oprogramowanie rozróżnia sygnały pochodzące od izotopu żelaza w formie nanometrycznej od tych pochodzących od formy rozpuszczonej (jonowej) metalu. Zastosowanie węższego iniektora pozwoliło na zmniejszenie jego wartości. Parametry zoptymalizowanej metody analitycznej zebrano w **Tabeli P3-1**.

Opracowana metoda spICP-MS/MS została następnie wykorzystana do zbadania parametrów fizyko-chemicznych syntezowanych SPIONs opisanych w **P2**. Przygotowane próbki nanocząstek w buforze inkubacyjnym rozcieńczono w wodzie do stężeń wymaganych podczas analizy w trybie analizy pojedynczej cząstki (około 500 ng Fe L^{-1}). Nanocząstki Fe_3O_4 mają predyspozycje do tworzenia aglomeratów w środowisku wodnym, jeśli ich powierzchnia nie zostanie odpowiednio zabezpieczona przez modyfikację [137]. Otrzymane za pomocą spICP-MS/MS wyniki potwierdziły to założenie – na otrzymanych histogramach rozkładu wielkości rdzeni pojawiają się sygnały dla nanoobjektów nawet 400-nanometrowych.

Otrzymane zdjęcia BF-STEM potwierdziły, że średnia średnica otrzymanych nanomateriałów wynosiła poniżej 10 nm, ale nanocząstki zebrane były w duże skupiska aglomeracyjne. Było to powodem uzyskania zawyżonych sygnałów spICP-MS/MS w momencie docierania chmury jonowej aglomeratu do detektora. Ponadto, w przypadku wykorzystania opracowanej metody do charakteryzowania SPIONs, istnieje także ograniczenie związane z wartością LOD. Było to powodem kontynuowania prac nad syntezą nanocząstek o pożądanym parametrach (m.in. większej średnicy rdzenia). Wykorzystana wcześniej metoda syntezy została zmodyfikowana. Zwiększenie temperatury prowadzenia syntezy i zmiana stosunku soli żelaza na drugim i trzecim stopniu utlenienia pozwoliło na otrzymanie większych nanoobjektów. Warunki prowadzonej syntezy zamieszczono w **Tabeli 1**.

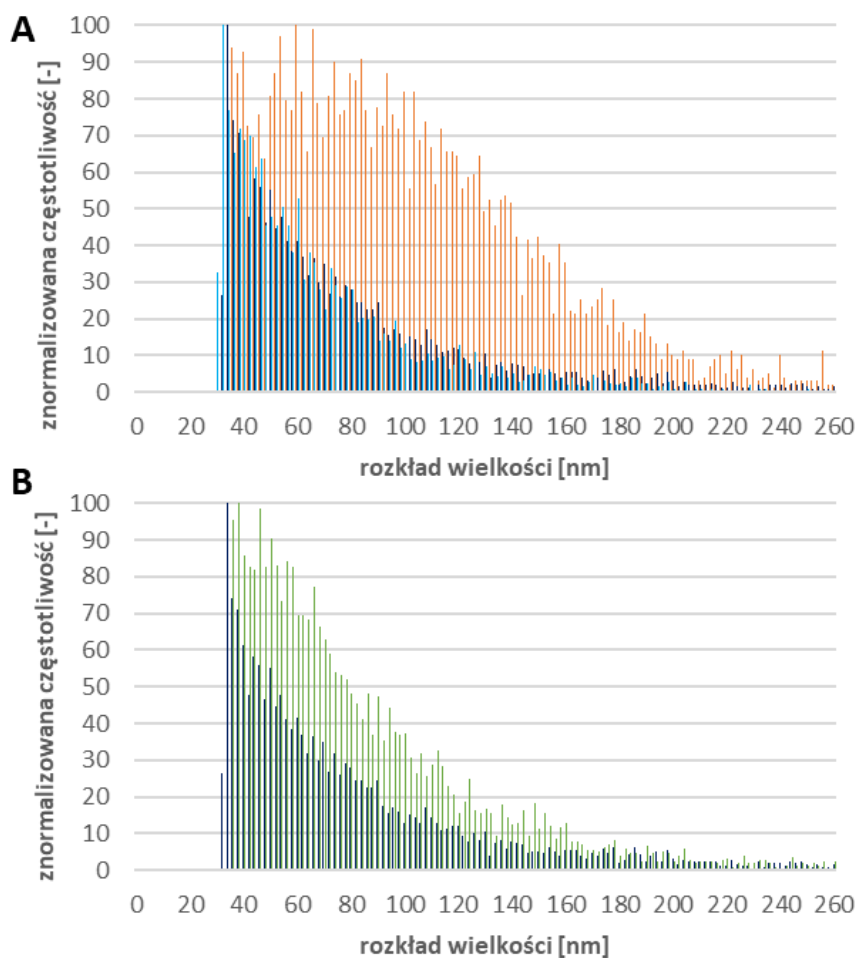
Tabela 3. Warunki syntezy SPIONs

odczynniki	FeSO_4 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, NaOH	FeSO_4 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, NaOH
stosunek molowy $\text{Fe}^{2+} : \text{Fe}^{3+}$	1 : 1	3 : 2
szybkość mieszania	300 RPM	300 RPM
temperatura	22 °C	80 °C
średnica nanocząstek	8,34 nm	16,68 nm

Mimo że otrzymano SPIONs o większej średnicy rdzenia - średnio 16,68 nm (patrz **Rys. P3-1**), to ich rozmiar znajdował się poniżej LODS wyznaczanego za pomocą spICP-MS/MS. Dalsze próby modyfikacji metody w celu zwiększenia średnicy nanocząstek skutkować mogłyby utratą ich właściwości superparamagnetycznych. Z tego powodu zdecydowano się na zmianę podejścia w sposobie wykorzystania opracowanej metody spICP-MS/MS. Pomimo że nie można jej było wykorzystać do charakteryzowania otrzymanych nanocząstek w sposób typowy dla tej techniki, została ona zastosowana po raz pierwszy do efektywnego monitorowania zmian stabilności SPIONs w obecności białek surowicy krwi ludzkiej.

Jak wspomniano we wprowadzeniu literaturowym, korona białkowa na powierzchni nanomateriału może ograniczać procesy jego aglomeracji. Potwierdzono ten fakt wykorzystując opracowaną metodę spICP-MS/MS, inkubując syntezowane SPIONs z białkami. Na wygenerowanych histogramach (patrz **Rys. P3-2A**) widoczne jest przesunięcie rozkładu wielkości rdzeni nanocząstek inkubowanych z surowicą w kierunku mniejszych wartości w stosunku do próbki zawierającej jedynie badany nanomateriał. Powstanie koron białkowych wokół SPIONs ograniczało zatem ich oddziaływanie między sobą. Ponadto sprawdzona została stabilność powstałych połączeń pomiędzy nanocząstkami a białkami – próbka SPIONs po ich inkubacji z surowicą została poddana ultrasączeniu (na filtrach o zdefiniowanej wielkości porów – 100 kDa). Dzięki temu etapowi prac oddzielono nieoddziałujące z powierzchnią nanomateriału białka. Mimo ich usunięcia, czyli przesunięcia stanu równowagi reakcji, korona białkowa pozostała trwała a stopień aglomeracji nanocząstek nie zwiększył się. Sprawdzone także wpływ inkubacji SPIONs z albuminą i porównano z wynikami uzyskanymi dla próbek zawierających surowicę (**Rys. P3-2B**). W przypadku inkubacji nanocząstek z pojedynczym białkiem aglomeracja także była ograniczona, jednak w mniejszym stopniu niż w przypadku zastosowania surowicy. Wyniki te wskazują na udział także innych białek (m.in. glikoprotein czy immunoglobulin) w zachodzących na powierzchni nanoobjektów procesach.

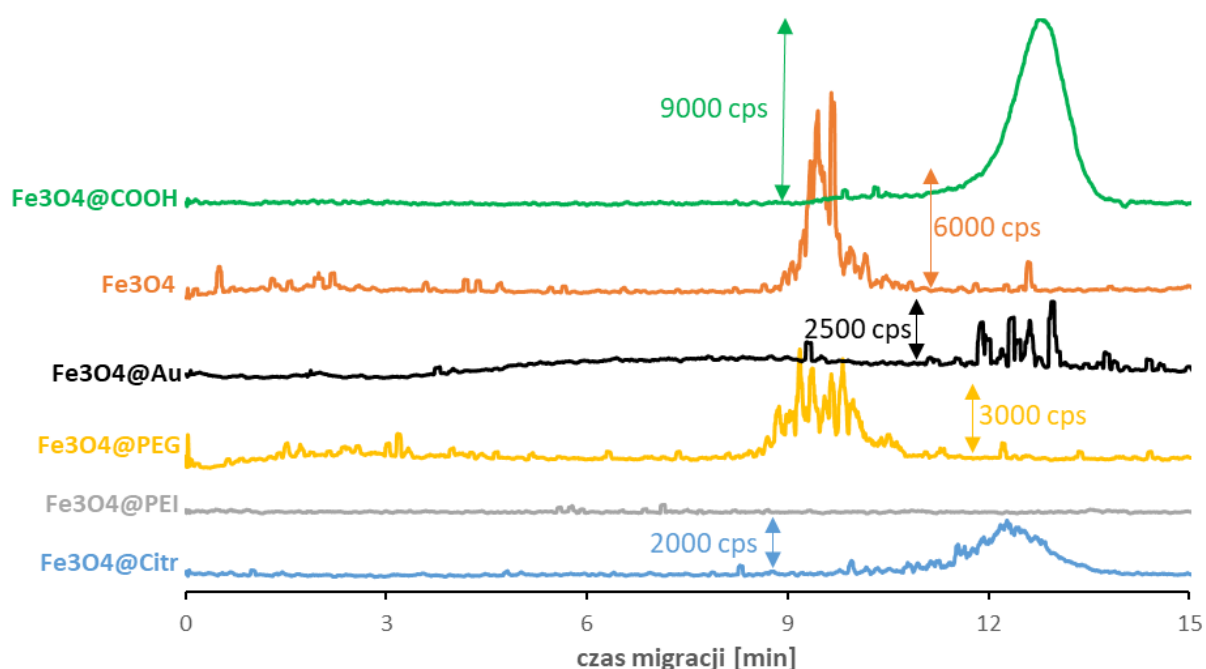
Ostatnią częścią prac w ramach prezentowanej rozprawy było zastosowanie opracowanej metodyki CE-ICP-MS/MS (**P1** i **P4**) do badania zmian syntezowanych SPIONs w obecności białek: albuminy i transferyny (**P4**). Początkowo rozdzielaniu elektroforetycznemu poddano próbki nanocząstek syntezowanych wg metodyki opracowanej w ramach **P3** (zawierające $15 \mu\text{g Fe mL}^{-1}$, przygotowane w buforze inkubacyjnym), jednak



Rysunek P3-2. Rozkład wielkości syntezowanych nanocząstek Fe_3O_4 otrzymany przy użyciu spICP-MS/MS: (A, pomarańczowy), inkubowanych z surowicą krwi ludzkiej (A, B, czarny), z przeprowadzoną ultrafiltracją (A, niebieski), i inkubowanych z albuminą (B, zielony), bez ultrafiltracji przeprowadzenie analiz było utrudnione ze względu na problemy związane z zaburzeniem transportu próbki i niestabilnością linii bazowej, co uniemożliwiło jednoznaczną interpretację wyników i znacznie pogarszało jakość otrzymywanych sygnałów.

Założono, że zaistniałe trudności były związane z aglomeracją niemodyfikowanych nanocząstek, a inkubacja z białkami poprawi ich stabilność i umożliwi efektywną analizę. Niestety i wtedy otrzymane wyniki dalekie były od przyjętych standardów interpretacji elektroforetycznej. W celu dokładniejszego zbadania przyczyn tego zjawiska i przeciwdziałania mu zdecydowano się na wykorzystanie nanocząstek Fe_3O_4 , syntezowanych w atmosferze gazu obojętnego, o dużym stopniu monodispersyjności i modyfikowanych stabilizatorami ograniczającymi ich aglomerację. Badania prowadzono we współpracy z Katedrą Biotechnologii Medycznej, Wydziału Chemicznego i Centrum Zaawansowanych

Materiałów i Technologii Politechniki Warszawskiej, gdzie tworzono nanoobiekty i wstępnie je charakteryzowano. Przygotowano pięć rodzajów SPIONs: stabilizowane odpowiednio za pomocą glikolu polietylenowego (PEG, $\text{Fe}_3\text{O}_4@PEG$), polietylenoiminy (PEI, $\text{Fe}_3\text{O}_4@PEI$) i cytrynianu sodu ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Citr$), a także nanocząstki bez modyfikacji powierzchni – standardowe (Fe_3O_4) i domieszkowane jonami złota ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$, których poprawność domieszkowania weryfikowano za pomocą metodyki przedstawionej w **P2**). Sposób prowadzenia syntezy został opisany w **P4**. Analiza elektroferogramów CE-ICP-MS/MS względem poszczególnych rodzajów nanocząstek ($15 \mu\text{g Fe mL}^{-1}$) bez dodatku białek (**Rys. P4-3**) potwierdziła, że modyfikacje powierzchni nanomateriałów w istotny sposób wpływają na ich parametry i oddziaływania z powierzchnią kapilary.



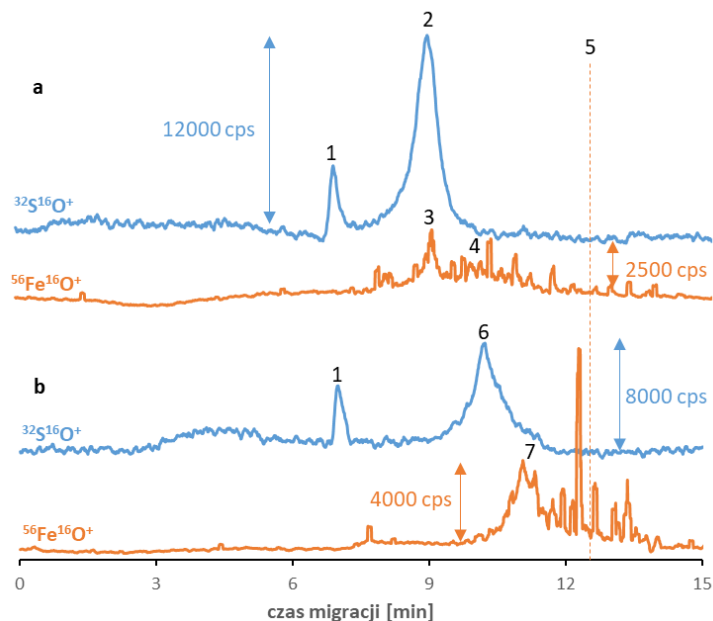
Rysunek P4-4. Elektroferogramy CE-ICP-MS/MS zarejestrowane dla próbek zawierających różne nanocząstki: komercyjnie dostępne zakończone grupami karboksylowymi (zielony), niemodyfikowane (pomarańczowy), domieszkowane złotem (czarny), modyfikowane PEG (żółte), PEI (szary), cytrynianem (niebieski), dla sygnału $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^+$

Mimo rdzeni zsyntezowanych w identyczny sposób (dla wszystkich nanocząstek z wyjątkiem domieszkowanych złotem) zarówno ich czas migracji, jak i jakość obserwowanych sygnałów elektroforetycznych różniły się znacząco. Interpretacja elektroferogramu dla $\text{Fe}_3\text{O}_4@PEI$ okazała się niemożliwa ze względu na silne oddziaływania polietylenoiminy (grupy $-\text{NH}_3^+$) z powierzchnią kapilary (grupy $-\text{SiO}^-$). W przypadku Fe_3O_4 i $\text{Fe}_3\text{O}_4@PEG$ zauważono, że ich aglomeracja powoduje znaczne poszerzenie sygnałów analitycznych

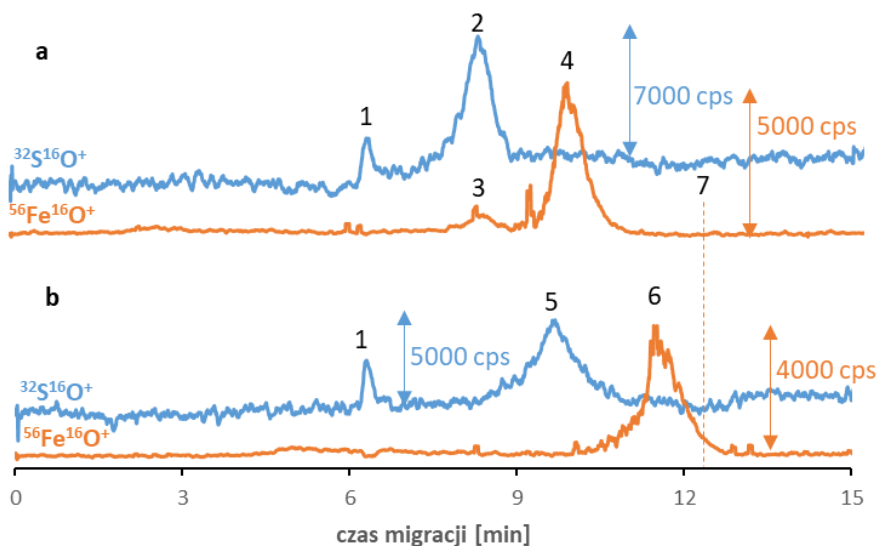
i pogorszenie ich jakości. Podczas gdy dla niemodyfikowanych nanocząstek zjawisko to było przewidywalne, to dla tych modyfikowanych PEG powodów wystąpienia tego efektu można doszukiwać się w desorpcji modyfikatora pod wpływem warunków prowadzenia rozdzielania elektroforetycznego. PEG wykazuje bowiem najmniejsze powinowactwo do SPIONs spośród stosowanych stabilizatorów i mógł ulegać odłączeniu od powierzchni nanocząstek. Mimo że dla **Fe₃O₄@Citr** otrzymano sygnał elektroforetyczny najlepszej jakości ze wszystkich testowanych nanomateriałów, to porównując go do komercyjnie dostępnych SPIONs (**Fe₃O₄@COOH**) nie uzyskano jego dobrej charakterystyki. Warto jednak podkreślić, że zastosowanie otoczki z polimeru amfifilowego w materiałach komercyjnych, pomimo poprawy jakości sygnału, niesie za sobą znaczne pogorszenie właściwości magnetycznych. Syntezowane nanomateriały natomiast szybko magnesowały się po przyłożeniu zewnętrznego pola magnetycznego.

Rozważając analizy z wykorzystaniem **Fe₃O₄@Au**, otrzymywane sygnały pochodzące od wolnych nanocząstek były złej jakości, jednak to właśnie dla tego typu nanomateriału w największym stopniu zauważalny był wpływ białek z matrycy próbki na poprawę jakości otrzymanego sygnału elektroforetycznego (patrz **Rys. ESM-P4-S10**). Inkubacja nanocząstek zarówno z transferyną (1 mg mL⁻¹), jak i w jeszcze większym stopniu z albuminą (1 mg mL⁻¹) umożliwiła wyodrębnienie na elektroferogramie dobrej jakości sygnału izotopu żelaza.

Analogiczne badania przeprowadzono względem pozostałych syntezowanych nanocząstek. Pomimo że badania przeprowadzone w ramach **P3**, a także liczne doniesienia literaturowe, potwierdzają oddziaływania SPIONs z białkami, to wbrew oczekiwaniom nie zaobserwowano nałożenia się czasów migracji sygnałów pochodzących od siarki (marker białek) i żelaza (marker SPIONs), sugerującego powstanie połączenia między tymi indywidualami, które zanotowano w ramach badań opisanych w **P1** (nanocząstki komercyjne o słabych właściwościach magnetycznych). W oparciu o otrzymane wyniki (**Rys. P4-4**, **Rys. P4-5** i **Rys. P4-ESM-S8**) można jednak zaobserwować, że czas migracji sygnału pochodzącego od SPIONs zmienia się przed i po inkubacji ze wzorcami białek. Korelacja ta jest najwyraźniejsza w przypadku **Fe₃O₄@Citr** (**Rys. P4-4**). Jest to przesłanką do potwierdzenia występowania słabych oddziaływań między reagentami – nietrwałych w warunkach rozdzielania elektroforetycznego.



Rysunek ESM-P5-S10. Elektroferogramy CE-ICP-MS/MS zarejestrowane dla próbek nanocząstek $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ($10\text{-}20\ \mu\text{g Fe mL}^{-1}$) inkubowanych przez 6 h z transferyną (**a**, $1\ \text{mg mL}^{-1}$) i albuminą (**b**, $1\ \text{mg mL}^{-1}$) w buforze fizjologicznym; sygnał pochodzący od buforu inkubacyjnego (1), transferyna (2), Fe związane z transferyną (3), $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ (4 i 7), $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ nieinkubowane z białkami (5), albumina (6); sygnały $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^+$ i $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$



Rysunek P4-4. Elektroferogramy CE-ICP-MS/MS zarejestrowane dla próbek nanocząstek $\text{Fe}_3\text{O}_4@Citr$ ($10\text{-}20\ \mu\text{g Fe mL}^{-1}$) inkubowanych przez 6 h z transferyną (**a**, $1\ \text{mg mL}^{-1}$) i albuminą (**b**, $1\ \text{mg mL}^{-1}$) w buforze fizjologicznym; sygnał pochodzący od buforu inkubacyjnego (1), transferyna (2), Fe związane z transferyną (3), $\text{Fe}_3\text{O}_4@Citr$ (4 i 6), albumina (5), $\text{Fe}_3\text{O}_4@Citr$ nieinkubowane z białkami (7); sygnały $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^+$ i $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$

W myśl tego założenia korona białkowa, wykształcona w trakcie inkubacji z albuminą bądź transferyną, ulega rozpadowi podczas analizy z zastosowaniem przykładanego napięcia. Ponadto, porównując wyniki badań opisane w **P1** i **P4**, zauważyć można, że powodem różnic w trwałości korony białkowej, podczas analizy za pomocą CE-ICP-MS/MS, może być intensywność właściwości magnetycznych testowanych nanomateriałów. Z jednej strony ograniczona magnetyczność (spowodowana specyficznym pokryciem komercyjnie dostępnych SPIONs) w pozytywny sposób wpływa na trwałość połączeń z białkami. Z drugiej strony, to właśnie syntezowane nanocząstki, wykazujące dużo silniejsze właściwości superparamagnetyczne, są poszukiwanymi medycznie materiałami umożliwiającymi zastosowanie nowoczesnych rozwiązań w diagnostyce i leczeniu chorób nowotworowych w przyszłości. Tworzy to dylemat, czy w pracy badawczej analityka skupiać się na tworzeniu metod z użyciem modelowych nanocząstek, które są proste w opracowaniu, a ich wyniki przewidywalne, choć o ograniczonej medycznej przydatności? Czy tych, które uwzględniają specyfikę syntezowanych cząstek Fe_3O_4 o pożądanym medycznie parametrach, ale jednocześnie ich opracowanie wiąże się z wieloma trudnościami spowodowanymi właściwościami tych nanomateriałów? W przypadku omawianych w ramach rozprawy hipotez konieczne są dalsze długofalowe badania, które pozwoliłyby na opracowanie metodyk alternatywnych do zaproponowanych, np. z udziałem technik frakcjonowania w polu sił czy wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Podsumowując, za swoje najważniejsze osiągnięcia badawcze, uzyskane w ramach rozprawy, uważam:

- opracowanie szybkiej i prostej metody badania zmian selektywności nanocząstek względem wybranych analitów opartej o ich właściwości superparamagnetyczne z wykorzystaniem spektrofotometrii UV/Vis i zastosowanie jej do zbadania wpływu domieszkowania nanocząstek miedzią na zmianę ich selektywności względem kurpizonu;
- opracowanie metody badania zmian stabilności superparamagnetycznych nanocząstek Fe_3O_4 w obecności białek surowicy krwi ludzkiej z wykorzystaniem spICP-MS/MS i wykazanie wpływu tworzącej się korony białkowej na ograniczenie stopnia aglomeracji niemodyfikowanych nanocząstek;
- optymalizację metody opartej na CE-ICP-MS/MS do badania oddziaływań SPIONs z białkami surowicy krwi ludzkiej – albuminą i transferyną;

- wykazanie wpływu magnetyczności nanocząstek Fe_3O_4 na możliwość monitorowania ich oddziaływań z białkami surowicy krwi ludzkiej z wykorzystaniem metody opartej o rozdzielanie elektroforetyczne.

5. Wykaz publikacji

- P1.** *A CE-ICP-MS/MS method for the determination of superparamagnetic iron oxide nanoparticles under simulated physiological conditions* (<https://doi.org/10.1007/s00216-020-02948-3>)
- P2.** *Simple Ultraviolet–Visible Spectroscopy-Based Assay for Fast Evaluation of Magnetic Nanoparticle Selectivity Changes After Doping* (<https://doi.org/10.1177/00037028211028669>)
- P3.** *Protein-Mediated Transformations of Superparamagnetic Nanoparticles Evidenced by Single-Particle Inductively Coupled Plasma Tandem Mass Spectrometry: A Disaggregation Phenomenon* (<https://doi.org/10.3390/ijms23031088>)
- P4.** *Red Flags and Adversities on the Way to the Robust CE-ICP-MS/MS Quantitative Monitoring of Self-Synthesized Magnetic Iron Oxide(II, III)-Based Nanoparticle Interactions with Human Serum Proteins* (<https://doi.org/10.3390/molecules27238442>)

6. Oświadczenia współautorów

- prof. dr hab. inż. Maciej Jarosz (P3)
- prof. Andrei R. Timerbaev (P3)
- dr hab. inż. Magdalena Matczuk (P1-P4)
- dr inż. Norbert Obarski (P2)
- dr inż. Maciej Trzaskowski (P2, P3)
- dr inż. Marcin Drozd (P4)
- dr inż. Joanna Kruszewska (P1, P3)
- mgr inż. Jan Samsonowicz-Górski (P1)
- mgr inż. Agnieszka Kamińska (P3)

prof. dr hab. inż. Maciej Jarosz
Katedra Chemii Analitycznej
Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska

Warszawa, 12 grudnia 2022 roku

Oświadczenie

Oświadczam, że w publikacji:

1. J. Sikorski, M. Matczuk*, A. Kamińska, J. Kruszewska, M. Trzaskowski, A. R. Timerbaev, M. Jarosz, Protein-Mediated Transformations of Superparamagnetic Nanoparticles Evidenced by Single-Particle Inductively Coupled Plasma Tandem Mass Spectrometry: a Disaggregation Phenomenon, Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 1088

mój wkład pracy polegał na dyskusji merytorycznej podczas realizacji badań w ramach projektu, na którego realizację zapewniłem fundusze (kierownictwo projektu NCN OPUS 15).

Z poważaniem,

prof. dr hab. inż. Maciej Jarosz





**Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical
Chemistry of the Russian Academy of Sciences (VIGAN)**

Kosygin Street, 19, 119991, Moscow, Russian Federation

Re.: statement of contribution

Vienna, November 29, 2022

To whom it might concern:

Dear Madam/Sir:

Herewith, I state that in the joint publication with Jacek Sikorski, M.Sc.

J. Sikorski, M. Matczuk*, A. Kamińska, J. Kruszewska, M. Trzaskowski, A. R. Timerbaev, M. Jarosz, Protein-Mediated Transformations of Superparamagnetic Nanoparticles Evidenced by Single-Particle Inductively Coupled Plasma Tandem Mass Spectrometry: a Disaggregation Phenomenon, *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 1088,

my contribution consisted of the conceptualization of the manuscript (together with Dr. Matczuk), edition of the draft text composed by other co-authors, and proofreading.

Sincerely,

Andrei R. Timerbaev

Research Professor

Warszawa, 15 grudnia 2022 roku

dr hab. inż. Magdalena Matczuk

Katedra Chemii Analitycznej

Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska

Oświadczenie

Oświadczam, że w publikacjach:

1. J. Kruszewska, J. Sikorski, J. Samsonowicz-Górski, M. Matczuk*, A CE-ICP-MS/MS method for the determination of superparamagnetic iron oxide nanoparticles under simulated physiological conditions, Anal. Bioanal. Chem. 2020, 412, 8145-8153

Mój wkład pracy polegał na autorstwie koncepcji badawczej, zaplanowaniu doświadczeń, kalibracji aparatury, częściowym wykonaniu pomiarów (optymalizacja metody) oraz opiece merytorycznej nad pracą doświadczalną mgr inż. Jacka Sikorskiego, dotyczącą oddziaływań nanomateriału z białkiem. Współuczestniczyłam w interpretacji otrzymanych wyników i jestem pomysłodawcą sposobu ich dyskusji. Jestem autorem koncepcji manuskryptu, napisanego we wstępnej formie przez innych współautorów, a następnie edytowanego i przygotowanego do wysyłki do czasopisma przeze mnie.

2. J. Sikorski, N. Obarski, M. Trzaskowski, M. Matczuk*, Simple Ultraviolet-Visible Spectroscopy-Based Assay for Fast Evaluation of Magnetic Nanoparticle Selectivity Changes after Doping, Appl. Spectrosc. 2021, 75

Mój wkład pracy polegał na zapewnieniu wsparcia merytorycznego podczas prowadzonych badań i stworzeniu ogólnej koncepcji publikacji. Ponadto koordynowałam interpretację wyników otrzymanych przez mgr inż. Jacka Sikorskiego i redagowałam tekst publikacji otrzymany od niego. Odpowiadałam też za prowadzenie korespondencji z edytorami i recenzentami.

3. J. Sikorski, M. Matczuk*, A. Kamińska, J. Kruszewska, M. Trzaskowski, A. R. Timerbaev, M. Jarosz, Protein-Mediated Transformations of Superparamagnetic Nanoparticles Evidenced by Single-Particle Inductively Coupled Plasma Tandem Mass Spectrometry: a Disaggregation Phenomenon, Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 1088

Mój wkład pracy polegał na autorstwie koncepcji badawczej i wsparciu merytorycznym. Ponadto, wraz z prof. A.R. Timerbaevem stworzyłam ogólny plan publikacji, koordynowałam poprawność interpretacji wyników oraz redagowałam tekst publikacji otrzymany od współautorów. Odpowiadałam też za prowadzenie korespondencji z edytorami i recenzentami.

4. J. Sikorski, M. Drozd, M. Matczuk*, Red flags and adversities on the way to the robust CE-ICP-MS/MS quantitative monitoring of self-synthesized magnetic iron oxide(II, III)-based nanoparticle interactions with human serum proteins, Molecules 2022, 27, 8442

Mój wkład pracy polegał na stworzeniu ogólnej koncepcji prac badawczych, koordynowaniu poprawności wykonywanych przez mgr. Jacka Sikorskiego doświadczeń, interpretacji wyników i sposobu ich przedstawienia w manuskrypcie. Ponadto redagowałam tekst publikacji otrzymany od mgr inż. Jacka Sikorskiego i odpowiadałam za prowadzenie korespondencji z edytorami i recenzentami.

*Magdalena
Matczuk*

Warszawa, 1 grudnia 2022 roku

dr inż. Norbert Obarski

Katedra Chemii Analitycznej

Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska

Oświadczenie

Oświadczam, że w publikacji:

1. J. Sikorski, N. Obarski, M. Trzaskowski, M. Matczuk*, Simple Ultraviolet-Visible Spectroscopy-Based Assay for Fast Evaluation of Magnetic Nanoparticle Selectivity Changes after Doping, Appl. Spectrosc. 2021, 75

Mój udział polegał na zapewnieniu wsparcia teoretycznego z zakresu spektrofotometrii UV/Vis i optycznej spektrometrii emisyjnej. Ponadto konsultowałem koncepcję badań z mgr inż. Jackiem Sikorskim, biorąc pod uwagę informacje uzyskiwane podczas syntezy nanomateriałów, planowania doświadczeń i dyskusji wyników.

Z poważaniem,

dr inż. Norbert Obarski



Warszawa, 6 grudnia 2022 roku

dr inż. Maciej Trzaskowski

Centrum Zaawansowanych Materiałów i Technologii CEZAMAT

Oświadczenie

Oświadczam, że w publikacjach:

1. J. Sikorski, N. Obarski, M. Trzaskowski, M. Matczuk*, Simple Ultraviolet-Visible Spectroscopy-Based Assay for Fast Evaluation of Magnetic Nanoparticle Selectivity Changes after Doping, Appl. Spectrosc. 2021, 75
2. J. Sikorski, M. Matczuk*, A. Kamińska, J. Kruszewska, M. Trzaskowski, A. R. Timerbaev, M. Jarosz, Protein-Mediated Transformations of Superparamagnetic Nanoparticles Evidenced by Single-Particle Inductively Coupled Plasma Tandem Mass Spectrometry: a Disaggregation Phenomenon, Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 1088

Mój udział polegał na wykonaniu pomiarów i interpretacji otrzymanych wyników uzyskanych za pomocą techniki BF-STEM a dotyczących nanomateriałów zsyntezowanych przez mgr inż. Jacka Sikorskiego.

Z poważaniem,

dr inż. Maciej Trzaskowski



Warszawa, 6 grudnia 2022 roku

dr inż. Marcin Drozd

Katedra Biotechnologii Chemicznej

Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska

i Centrum Zaawansowanych Materiałów i Technologii CEZAMAT

Oświadczenie

Oświadczam, że w publikacji:

1. J. Sikorski, M. Drozd, M. Matczuk*, Red flags and adversities on the way to the robust CE-ICP-MS/MS quantitative monitoring of self-synthesized magnetic iron oxide(II, III)-based nanoparticle interactions with human serum proteins, *Molecules* 2022, 27, 8442

Mój udział polegał na syntezie nanomateriałów użytych w trakcie badań, przygotowaniu opisu ich syntezy, przeprowadzeniu pomiarów ich ζ -potencjału i udostępnieniu zdjęć wykonanych za pomocą techniki STEM. Ponadto uczestniczyłem, wraz z innymi współautorami, w interpretacji otrzymanych wyników i edycji treści manuskryptu.

Z poważaniem,

dr inż. Marcin Drozd



Warszawa, 5 grudnia 2022 roku

dr inż. Joanna Kruszewska

Katedra Chemii Analitycznej

Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska

Oświadczenie

Oświadczam, że w publikacjach:

1. J. Kruszewska, J. Sikorski, J. Samsonowicz-Górski, M. Matczuk*, A CE-ICP-MS/MS method for the determination of superparamagnetic iron oxide nanoparticles under simulated physiological conditions, *Anal. Bioanal. Chem.* 2020, 412, 8145-8153

Mój wkład pracy polegał na przygotowaniu próbek i roztworów niezbędnych podczas optymalizacji metody CE-ICP-MS/MS oraz częściowej interpretacji otrzymanych wyników badań. W porozumieniu z dr Matczuk przygotowałam pierwszą wersję manuskryptu pracy (poza sekcją **Monitoring of carboxyl SPIONs changes after interaction with human serum albumin**), w tym dokonałam przeglądu literatury przedmiotu (sekcja **Introduction**).

2. J. Sikorski, M. Matczuk*, A. Kamińska, J. Kruszewska, M. Trzaskowski, A. R. Timerbaev, M. Jarosz, Protein-Mediated Transformations of Superparamagnetic Nanoparticles Evidenced by Single-Particle Inductively Coupled Plasma Tandem Mass Spectrometry: a Disaggregation Phenomenon, *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 1088

Mój wkład pracy polegał na przygotowaniu pierwszej wersji sekcji **Introduction** manuskryptu, a także zapewnienia wsparcia merytorycznego prowadzonych doświadczeń z wykorzystaniem techniki spICP-MS/MS. Dodatkowo odpowiadałam za przygotowanie wstępnego projektu wykresów zamieszczonych w manuskrypcie.

z poważaniem,

dr inż. Joanna Kruszewska



Warszawa, 30 listopada 2022 roku

mgr inż. Jan Samsonowicz-Górski

Katedra Chemii Analitycznej

Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska

Oświadczenie

Oświadczam, że w publikacji:

1. J. Kruszewska, J. Sikorski, J. Samsonowicz-Górski, M. Matczuk^{*}, A CE-ICP-MS/MS method for the determination of superparamagnetic iron oxide nanoparticles under simulated physiological conditions, *Anal. Bioanal. Chem.* 2020, 412, 8145-8153

Mój wkład w pracę polegał na przygotowaniu próbek i roztworów niezbędnych podczas pomiarów CE-ICP-MS/MS, a stosowanych w badaniu oddziaływań nanocząstek tlenku żelaza z albuminą ludzką. Pracę wykonywałem pod opieką dr Magdaleny Matczuk w ramach przedmiotu Badania Naukowe (podczas 6 semestru studiów inżynierskich na kierunku Technologia Chemiczna).

Z poważaniem,

mgr inż. Jan Samsonowicz-Górski

Jan Samsonowicz-Górski

Warszawa, 8 grudnia 2022 roku

mgr. inż. Agnieszka Kamińska

Katedra Chemii Analitycznej

Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska

Oświadczenie

Oświadczam, że w publikacji:

1. J. Sikorski, M. Matczuk*, A. Kamińska, J. Kruszewska, M. Trzaskowski, A. R. Timerbaev, M. Jarosz, Protein-Mediated Transformations of Superparamagnetic Nanoparticles Evidenced by Single-Particle Inductively Coupled Plasma Tandem Mass Spectrometry: a Disaggregation Phenomenon, *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 1088

Mój wkład pracy dotyczył wykonania części pomiarów, dotyczących optymalizacji metody spICP-MS/MS - prace prowadziłam w ramach mojej pracy dyplomowej inżynierskiej, której kierownikiem był prof. Maciej Jarosz. Przygotowałam także pierwszą wersję fragmentu tekstu dotyczącą badań optymalizacyjnych.

Z poważaniem,

mgr. inż. Agnieszka Kamińska



7. Bibliografia

- 1 National Cancer Institute, <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (dostęp online 11.12.2022)
- 2 C. Pfeffer, A. Singh Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. (2018) *Int J Mol Sci.* **19**, 448.
- 3 C. B. Blackadar Historical review of the causes of cancer. (2016) *World J Clin Oncol.* **7**, 54.
- 4 American Cancer Society, <https://www.cancer.org/healthy/cancer-causes.html> (dostęp online 11.12.2022)
- 5 World Health Organization, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (dostęp online 11.12.2022)
- 6 H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. (2021) *CA Cancer J Clin.* **71**, 209–249.
- 7 M. S. Shiels, A. T. Haque, A. Berrington de González, N. D. Freedman Leading Causes of Death in the US During the COVID-19 Pandemic, March 2020 to October 2021. (2022) *JAMA Intern Med.* **182**, 883.
- 8 E. Bidram, Y. Esmaili, H. Ranji-Burachaloo, N. Al-Zaubai, A. Zarrabi, A. Stewart, et al. A concise review on cancer treatment methods and delivery systems. (2019) *J Drug Deliv Sci Technol.* **54**, 101350.
- 9 D. T. Debela, S. G. Muzazu, K. D. Heraro, M. T. Ndalama, B. W. Mesele, D. C. Haile, et al. New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. (2021) *SAGE Open Med.* **9**, 205031212110343.
- 10 J. Shi, P. W. Kantoff, R. Wooster, O. C. Farokhzad Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. (2017) *Nat Rev Cancer.* **17**, 20–37.
- 11 K. H. Bae, H. J. Chung, T. G. Park Nanomaterials for cancer therapy and imaging. (2011) *Mol Cells.* **31**, 295–302.

- 12 R. Zhu, F. Zhang, Y. Peng, T. Xie, Y. Wang, Y. Lan Current Progress in Cancer Treatment Using Nanomaterials. (2022) *Front Oncol.* **12**,.
- 13 A. Albanese, P. S. Tang, W. C. W. Chan The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. (2012) *Annu Rev Biomed Eng.* **14**, 1–16.
- 14 Z. Cheng, M. Li, R. Dey, Y. Chen Nanomaterials for cancer therapy: current progress and perspectives. (2021) *J Hematol Oncol.* **14**, 85.
- 15 N. Mauro, M. A. Utzeri, P. Varvarà, G. Cavallaro Functionalization of Metal and Carbon Nanoparticles with Potential in Cancer Theranostics. (2021) *Molecules.* **26**, 3085.
- 16 M. Meng Lin, H.-H. Kim, H. Kim, M. Muhammed, D. Kyung Kim Iron oxide-based nanomagnets in nanomedicine: fabrication and applications. (2010) *Nano Rev.* **1**, 4883.
- 17 G. Kandasamy, D. Maity Recent advances in superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) for in vitro and in vivo cancer nanotheranostics. (2015) *Int J Pharm.* **496**, 191–218.
- 18 P. I. P. Soares, J. Romão, R. Matos, J. C. Silva, J. P. Borges Design and engineering of magneto-responsive devices for cancer theranostics: Nano to macro perspective. (2021) *Prog Mater Sci.* **116**, 100742.
- 19 M. Musielak, I. Piotrowski, W. M. Suchorska Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) as a multifunctional tool in various cancer therapies. (2019) *Rep Pract Oncol Radiother.* **24**, 307–314.
- 20 R. Qiao, C. Yang, M. Gao Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: from preparations to in vivo MRI applications. (2009) *J Mater Chem.* **19**, 6274.
- 21 S. M. Dadfar, K. Roemhild, N. I. Drude, S. von Stillfried, R. Knüchel, F. Kiessling, et al. Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications. (2019) *Adv Drug Deliv Rev.* **138**, 302–325.
- 22 K. Li, H. Nejadnik, H. E. Daldrop-Link Next-generation superparamagnetic iron oxide nanoparticles for cancer theranostics. (2017) *Drug Discov Today.* **22**, 1421–1429.
- 23 O. L. Gobbo, K. Sjaastad, M. W. Radomski, Y. Volkov, A. Prina-Mello Magnetic Nanoparticles in Cancer Theranostics. (2015) *Theranostics.* **5**, 1249–1263.

- 24 S. Khizar, N. M. Ahmad, N. Zine, N. Jaffrezic-Renault, A. Errachid-el-salhi, A. Elaissari
Magnetic Nanoparticles: From Synthesis to Theranostic Applications. (2021)
ACS Appl Nano Mater. **4**, 4284–4306.
- 25 X. Song, H. Gong, S. Yin, L. Cheng, C. Wang, Z. Li, et al. Ultra-Small Iron Oxide Doped
Polypyrrole Nanoparticles for In Vivo Multimodal Imaging Guided Photothermal
Therapy. (2014) *Adv Funct Mater.* **24**, 1194–1201.
- 26 X. Liu, X. Lin, M. Wu, R. Lin, B. Li, J. Liu SPION@Cu_{2-x}S nanoclusters for highly
sensitive MRI and targeted photothermal therapy of hepatocellular carcinoma.
(2016) *J Mater Chem B.* **4**, 4119–4129.
- 27 C. A. Quinto, P. Mohindra, S. Tong, G. Bao Multifunctional superparamagnetic iron
oxide nanoparticles for combined chemotherapy and hyperthermia cancer treatment.
(2015) *Nanoscale.* **7**, 12728–12736.
- 28 R. D. Piazza, W. R. Viali, C. C. dos Santos, E. S. Nunes, R. F. C. Marques, P. C. Morais,
et al. PEGlatyon-SPION surface functionalization with folic acid for magnetic
hyperthermia applications. (2020) *Mater Res Express.* **7**, 015078.
- 29 A. Bettaieb, P. K. Wrzal, D. A. Averill-Bates Hyperthermia: Cancer Treatment and
Beyond in (2013) *Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches*, InTech
- 30 Y. Sakaguchi, L. C. Stephens, M. Makino, T. Kaneko, F. R. Strebels, L. L. Danhauser,
et al. Apoptosis in tumors and normal tissues induced by whole body hyperthermia
in rats. (1995) *Cancer Res.* **55**, 5459–64.
- 31 N. Peng, B. Wu, L. Wang, W. He, Z. Ai, X. Zhang, et al. High drug loading and
pH-responsive targeted nanocarriers from alginate-modified SPIONs for anti-tumor
chemotherapy. (2016) *Biomater Sci.* **4**, 1802–1813.
- 32 M. Li, W. Bu, J. Ren, J. Li, L. Deng, M. Gao, et al. Enhanced Synergism of Thermo-
chemotherapy For Liver Cancer with Magnetothermally Responsive Nanocarriers.
(2018) *Theranostics.* **8**, 693–709.
- 33 L. Yan, A. Amirshaghghi, D. Huang, J. Miller, J. M. Stein, T. M. Busch,
et al. Protoporphyrin IX (PpIX)-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle
(SPION) Nanoclusters for Magnetic Resonance Imaging and Photodynamic Therapy.
(2018) *Adv Funct Mater.* **28**, 1707030.

- 34 L. Yan, L. Luo, A. Amirshaghghi, J. Miller, C. Meng, T. You, et al. Dextran-Benzoporphyrin Derivative (BPD) Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle (SPION) Micelles for T₂ -Weighted Magnetic Resonance Imaging and Photodynamic Therapy. (2019) *Bioconjug Chem.* **30**, 2974–2981.
- 35 X. Wang, B. Chen, X. Yang, J. Zhang, L. Zhao, J. Tang Functionalized Superparamagnetic Nanoparticles for Highly-Efficient Gene Delivery. (2013) *J Nanosci Nanotechnol.* **13**, 746–750.
- 36 L. Prosen, S. Prijic, B. Music, J. Lavrencak, M. Cemazar, G. Sersa Magnetofection: A Reproducible Method for Gene Delivery to Melanoma Cells. (2013) *Biomed Res Int.* **2013**, 1–11.
- 37 K. Hayashi, M. Nakamura, W. Sakamoto, T. Yogo, H. Miki, S. Ozaki, et al. Superparamagnetic Nanoparticle Clusters for Cancer Theranostics Combining Magnetic Resonance Imaging and Hyperthermia Treatment. (2013) *Theranostics.* **3**, 366–376.
- 38 B. K. Sodipo, A. A. Aziz Recent advances in synthesis and surface modification of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with silica. (2016) *J Magn Magn Mater.* **416**, 275–291.
- 39 H. Vali, B. Weiss, Y.-L. Li, S. K. Sears, S. S. Kim, J. L. Kirschvink, et al. Formation of tabular single-domain magnetite induced by *Geobacter metallireducens* GS-15. (2004) *Proc Natl Acad Sci USA.* **101**, 16121–16126.
- 40 M. Mahmoudi, S. Sant, B. Wang, S. Laurent, T. Sen Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. (2011) *Adv Drug Deliv Rev.* **63**, 24–46.
- 41 P. Pawlik, B. Blasiak, J. Depciuch, M. Pruba, D. Kitala, S. Vorobyova, et al. Application of iron-based magnetic nanoparticles stabilized with triethanolammonium oleate for theranostics. (2022) *J Mater Sci.* **57**, 4716–4737.
- 42 S. Arsalani, Y. Hadadian, E. E. Mazon, E. J. Guidelli, E. Kava, A. P. Ramos, et al. Uniform size PEGylated iron oxide nanoparticles as a potential theranostic agent synthesized by a simple optimized coprecipitation route. (2022) *J Magn Magn Mater.* **564**, 170091.

- 43 D. T. M. Thanh, N. T. Phuong, D. T. Hai, H. N. Giang, N. T. Thom, P. T. Nam, et al. Influence of Experimental Conditions during Synthesis on the Physicochemical Properties of the SPION/Hydroxyapatite Nanocomposite for Magnetic Hyperthermia Application. (2022) *Magnetochemistry*. **8**, 90.
- 44 D. Liu, J. Lai, R. Wang, L. Ye, Y. Tian Reverse Microemulsion Synthesis of Fe₃O₄ – Ag₂S Heteronanocrystals for Dual-Modal Imaging-Guided Photothermal Tumor Ablation. (2019) *ACS Biomater Sci Eng*. **5**, 6196–6206.
- 45 M. A. Malik, M. Y. Wani, M. A. Hashim Microemulsion method: A novel route to synthesize organic and inorganic nanomaterials. (2012) *Arab J Chem*. **5**, 397–417.
- 46 A. Lassenberger, T. A. Grünwald, P. D. J. van Oostrum, H. Rennhofer, H. Amenitsch, R. Zirbs, et al. Monodisperse Iron Oxide Nanoparticles by Thermal Decomposition: Elucidating Particle Formation by Second-Resolved in Situ Small-Angle X-ray Scattering. (2017) *Chem Mater*. **29**, 4511–4522.
- 47 M. E. Lorkowski, P. U. Atukorale, K. B. Ghaghada, E. Karathanasis Stimuli-Responsive Iron Oxide Nanotheranostics: A Versatile and Powerful Approach for Cancer Therapy. (2021) *Adv Healthc Mater*. **10**, 2001044.
- 48 M. M. G. Saldívar-Ramírez, C. G. Sánchez-Torres, D. A. Cortés-Hernández, J. C. Escobedo-Bocardo, J. M. Almanza-Robles, A. Larson, et al. Study on the efficiency of nanosized magnetite and mixed ferrites in magnetic hyperthermia. (2014) *J Mater Sci Mater Med*. **25**, 2229–2236.
- 49 A. v. Samrot, C. S. Sahithya, J. Selvarani A, S. K. Purayil, P. Ponnaiah A review on synthesis, characterization and potential biological applications of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. (2021) *Curr Res Green Sustain Chem*. **4**, 100042.
- 50 A. K. Gupta, M. Gupta Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. (2005) *Biomaterials*. **26**, 3995–4021.
- 51 M. Muthiah, I.-K. Park, C.-S. Cho Surface modification of iron oxide nanoparticles by biocompatible polymers for tissue imaging and targeting. (2013) *Biotechnol Adv*. **31**, 1224–1236.

- 52 M. Esmaili, H. Dezhmpanah, M. Hadavi Surface modification of super paramagnetic iron oxide nanoparticles via milk casein for potential use in biomedical areas. (2021) *J Biomol Struct Dyn.* **39**, 977–987.
- 53 A. J. Cole, A. E. David, J. Wang, C. J. Galbán, H. L. Hill, V. C. Yang Polyethylene glycol modified, cross-linked starch-coated iron oxide nanoparticles for enhanced magnetic tumor targeting. (2011) *Biomaterials.* **32**, 2183–2193.
- 54 M. L. Mojica Piscioti, E. Lima, M. Vasquez Mansilla, V. E. Tognoli, H. E. Troiani, A. A. Pasa, et al. *In vitro* and *in vivo* experiments with iron oxide nanoparticles functionalized with DEXTRAN or polyethylene glycol for medical applications: Magnetic targeting. (2014) *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* **102**, 860–868.
- 55 E. K. U. Larsen, T. Nielsen, T. Wittenborn, H. Birkedal, T. Vorup-Jensen, M. H. Jakobsen, et al. Size-Dependent Accumulation of PEGylated Silane-Coated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles in Murine Tumors. (2009) *ACS Nano.* **3**, 1947–1951.
- 56 L. Zhu, Z. Zhou, H. Mao, L. Yang Magnetic nanoparticles for precision oncology: theranostic magnetic iron oxide nanoparticles for image-guided and targeted cancer therapy. (2017) *Nanomedicine.* **12**, 73–87.
- 57 R. A. Sperling, W. J. Parak Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. (2010) *Philos Trans A: Math, Phys Eng Sci.* **368**, 1333–1383.
- 58 F. Danhier, O. Feron, V. Pr at To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. (2010) *J Control Release.* **148**, 135–146.
- 59 J. E. Rosen, L. Chan, D.-B. Shieh, F. X. Gu Iron oxide nanoparticles for targeted cancer imaging and diagnostics. (2012) *Nanomedicine.* **8**, 275–290.
- 60 M. C. Garnett, P. Kallinteri Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles. (2006) *Occup Med (Chic Ill).* **56**, 307–311.
- 61 K. Błaszczak-Świątkiewicz, P. Olszewska, E. Mikiciuk-Olasik Zastosowanie nanocząsteczek w leczeniu i diagnostyce nowotworów. (2013) *Nowotwory. J Oncol.* **63**, 320–330.

- 62 M. Fontes de Paula Aguiar, J. Bustamante Mamani, T. Klei Felix, R. Ferreira dos Reis, H. Rodrigues da Silva, L. P. Nucci, et al. Magnetic targeting with superparamagnetic iron oxide nanoparticles for in vivo glioma. (2017) *Nanotechnol Rev.* **6**, 449–472.
- 63 H. Choi, S. R. Choi, R. Zhou, H. F. Kung, I.-W. Chen Iron oxide nanoparticles as magnetic resonance contrast agent for tumor imaging via folate receptor-targeted delivery1. (2004) *Acad Radiol.* **11**, 996–1004.
- 64 D. Högemann-Savellano, E. Bos, C. Blondet, F. Sato, T. Abe, L. Josephson, et al. The Transferrin Receptor: A Potential Molecular Imaging Marker for Human Cancer. (2003) *Neoplasia.* **5**, 495–506.
- 65 X. Montet, K. Montet-Abou, F. Reynolds, R. Weissleder, L. Josephson Nanoparticle Imaging of Integrins on Tumor Cells. (2006) *Neoplasia.* **8**, 214–222.
- 66 D. Artemov, N. Mori, B. Okollie, Z. M. Bhujwala MR molecular imaging of the Her-2/neu receptor in breast cancer cells using targeted iron oxide nanoparticles. (2003) *Magn Reson Med.* **49**, 403–408.
- 67 M. V. Yigit, D. Mazumdar, H.-K. Kim, J. H. Lee, B. Odintsov, Y. Lu Smart “Turn-on” Magnetic Resonance Contrast Agents Based on Aptamer-Functionalized Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. (2007) *ChemBioChem.* **8**, 1675–1678.
- 68 S. Mourdikoudis, R. M. Pallares, N. T. K. Thanh Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. (2018) *Nanoscale.* **10**, 12871–12934.
- 69 A. Ali, H. Zafar, M. Zia, I. ul Haq, A. R. Phull, J. S. Ali, et al. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. (2016) *Nanotechnol Sci Appl.* **9**, 49–67.
- 70 S. E. Sandler, B. Fellows, O. T. Mefford Best Practices for Characterization of Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications. (2019) *Anal Chem.* **91**, 14159–14169.
- 71 J. Matos, M. Gonçalves, L. Pereira, B. Vieira, J. Waerenborgh SPIONs Prepared in Air through Improved Synthesis Methodology: The Influence of γ -Fe₂O₃/Fe₃O₄ Ratio and Coating Composition on Magnetic Properties. (2019) *Nanomaterials.* **9**, 943.

- 72 T. Strączek, S. Fiejdasz, D. Rybicki, K. Goc, J. Przewoźnik, W. Mazur, et al. Dynamics of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Various Polymeric Coatings. (2019) *Materials*. **12**, 1793.
- 73 S. Upadhyay, K. Parekh, B. Pandey Influence of crystallite size on the magnetic properties of Fe₃O₄ nanoparticles. (2016) *J Alloys Compd.* **678**, 478–485.
- 74 H. Deng, X. Li, Q. Peng, X. Wang, J. Chen, Y. Li Monodisperse Magnetic Single-Crystal Ferrite Microspheres. (2005) *Angew Chem Int Ed.* **117**, 2842–2845.
- 75 L. Shang, Q. Wang, K. Chen, J. Qu, Q. Zhou, J. Luo, et al. SPIONs/DOX loaded polymer nanoparticles for MRI detection and efficient cell targeting drug delivery. (2017) *RSC Adv.* **7**, 47715–47725.
- 76 J. Wolfram, Y. Yang, J. Shen, A. Moten, C. Chen, H. Shen, et al. The nano-plasma interface: Implications of the protein corona. (2014) *Colloids Surf B Biointerfaces.* **124**, 17–24.
- 77 Y. Li, J.-S. Lee Insights into Characterization Methods and Biomedical Applications of Nanoparticle–Protein Corona. (2020) *Materials*. **13**, 3093.
- 78 R. Bilyy, H. Unterweger, B. Weigel, T. Dumych, S. Paryzhak, V. Vovk, et al. Inert Coats of Magnetic Nanoparticles Prevent Formation of Occlusive Intravascular Co-aggregates With Neutrophil Extracellular Traps. (2018) *Front Immunol.* **9**, 2266.
- 79 M. A. Wells, A. Abid, I. M. Kennedy, A. I. Barakat Serum proteins prevent aggregation of Fe₂O₃ and ZnO nanoparticles. (2012) *Nanotoxicology.* **6**, 837–846.
- 80 H. S. Goodridge, D. M. Underhill, N. Touret Mechanisms of Fc Receptor and Dectin-1 Activation for Phagocytosis. (2012) *Traffic.* **13**, 1062–1071.
- 81 I. Hamad, O. Al-Hanbali, A. C. Hunter, K. J. Rutt, T. L. Andresen, S. M. Moghimi Distinct Polymer Architecture Mediates Switching of Complement Activation Pathways at the Nanosphere–Serum Interface: Implications for Stealth Nanoparticle Engineering. (2010) *ACS Nano.* **4**, 6629–6638.
- 82 E. Mahon, A. Salvati, F. Baldelli Bombelli, I. Lynch, K. A. Dawson Designing the nanoparticle–biomolecule interface for “targeting and therapeutic delivery”. (2012) *J Control Release.* **161**, 164–174.

- 83 N. Akhtar, H. A. Mohammed, M. Yusuf, A. Al-Subaiyel, G. M. Sulaiman, R. A. Khan SPIONs Conjugate Supported Anticancer Drug Doxorubicin's Delivery: Current Status, Challenges, and Prospects. (2022) *Nanomaterials*. **12**, 3686.
- 84 C. Vogt, M. Pernemalm, P. Kohonen, S. Laurent, K. Hultenby, M. Vahter, et al. Proteomics Analysis Reveals Distinct Corona Composition on Magnetic Nanoparticles with Different Surface Coatings: Implications for Interactions with Primary Human Macrophages. (2015) *PLoS One*. **10**, e0129008.
- 85 A. Jedlovszky-Hajdú, F. B. Bombelli, M. P. Monopoli, E. Tombácz, K. A. Dawson Surface Coatings Shape the Protein Corona of SPIONs with Relevance to Their Application in Vivo. (2012) *Langmuir*. **28**, 14983–14991.
- 86 W. Mekseriwattana, T. Thiangtrongjit, O. Reamtong, P. Wongtrakoongate, K. P. Katewongsa Proteomic Analysis Reveals Distinct Protein Corona Compositions of Citrate- and Riboflavin-Coated SPIONs. (2022) *ACS Omega*. **7**, 37589–37599.
- 87 L. E. González-García, M. N. MacGregor, R. M. Visalakshan, A. Lazarian, A. A. Cavallaro, S. Morsbach, et al. Nanoparticles Surface Chemistry Influence on Protein Corona Composition and Inflammatory Responses. (2022) *Nanomaterials*. **12**, 682.
- 88 M. Zhu, G. Nie, H. Meng, T. Xia, A. Nel, Y. Zhao Physicochemical Properties Determine Nanomaterial Cellular Uptake, Transport, and Fate. (2013) *Acc Chem Res*. **46**, 622–631.
- 89 M. Lundqvist, J. Stigler, G. Elia, I. Lynch, T. Cedervall, K. A. Dawson Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. (2008) *Proc Natl Acad Sci USA*. **105**, 14265–14270.
- 90 G. Stepien, M. Moros, M. Pérez-Hernández, M. Monge, L. Gutiérrez, R. M. Fratila, et al. Effect of Surface Chemistry and Associated Protein Corona on the Long-Term Biodegradation of Iron Oxide Nanoparticles In Vivo. (2018) *ACS Appl Mater Interfaces*. **10**, 4548–4560.
- 91 T. R. Daniels, T. Delgado, J. A. Rodriguez, G. Helguera, M. L. Penichet The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. (2006) *Clin Immunol*. **121**, 144–158.

- 92 W. Jiang, H. Xie, D. Ghoorah, Y. Shang, H. Shi, F. Liu, et al. Conjugation of Functionalized SPIONs with Transferrin for Targeting and Imaging Brain Glial Tumors in Rat Model. (2012) *PLoS One*. **7**, e37376.
- 93 M. Lundqvist, J. Stigler, T. Cedervall, T. Berggård, M. B. Flanagan, I. Lynch, et al. The Evolution of the Protein Corona around Nanoparticles: A Test Study. (2011) *ACS Nano*. **5**, 7503–7509.
- 94 A. C. Anselmo, S. Mitragotri Nanoparticles in the clinic. (2016) *Bioeng Transl Med*. **1**, 10–29.
- 95 A. R. Timerbaev How well can we characterize human serum transformations of magnetic nanoparticles? (2020) *Analyst*. **145**, 1103–1109.
- 96 J. Kruszewska, J. Zajda, M. Matczuk How to effectively prepare a sample for bottom-up proteomic analysis of nanoparticle protein corona? A critical review. (2021) *Talanta*. **226**, 122153.
- 97 H. Zhang, R. Wu Proteomic profiling of protein corona formed on the surface of nanomaterial. (2015) *Sci China Chem*. **58**, 780–792.
- 98 C. Gräfe, M. von der Lüche, A. Weidner, P. Globig, J. H. Clement, S. Dutz, et al. Protein corona formation and its constitutional changes on magnetic nanoparticles in serum featuring a polydehydroalanine coating: effects of charge and incubation conditions. (2019) *Nanotechnology*. **30**, 265707.
- 99 A. Weidner, C. Gräfe, M. von der Lüche, H. Remmer, J. H. Clement, D. Eberbeck, et al. Preparation of Core-Shell Hybrid Materials by Producing a Protein Corona Around Magnetic Nanoparticles. (2015) *Nanoscale Res Lett*. **10**, 282.
- 100 D. Bonvin, D. Chiappe, M. Moniatte, H. Hofmann, M. Mionić Ebersold Methods of protein corona isolation for magnetic nanoparticles. (2017) *Analyst*. **142**, 3805–3815.
- 101 W. Mekseriwattana, S. Srisuk, R. Kriangsaksri, N. Niamsiri, K. Prapainop The Impact of Serum Proteins and Surface Chemistry on Magnetic Nanoparticle Colloidal Stability and Cellular Uptake in Breast Cancer Cells. (2019) *AAPS Pharm Sci Tech*. **20**, 55.
- 102 S.-M. Yu, A. Laromaine, A. Roig Enhanced stability of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in biological media using a pH adjusted-BSA adsorption protocol. (2014) *J Nanoparticle Res*. **16**, 2484.

- 103 M. Mirković, M. Radović, D. Stanković, Z. Milanović, D. Janković, M. Matović, et al. ^{99m}Tc–bisphosphonate–coated magnetic nanoparticles as potential theranostic nanoagent. (2019) *Mater Sci Eng C*. **102**, 124–133.
- 104 O. v. Kuznetsova, O. B. Mokhodoeva, V. v. Maksimova, R. Kh. Dzhenloda, M. Jarosz, V. M. Shkinev, et al. High-resolution ICP-MS approach for characterization of magnetic nanoparticles for biomedical applications. (2020) *J Pharm Biomed Anal*. **189**, 113479.
- 105 T. Kopac Protein corona, understanding the nanoparticle–protein interactions and future perspectives: A critical review. (2021) *Int J Biol Macromol*. **169**, 290–301.
- 106 O. v. Kuznetsova, M. Jarosz, B. K. Keppler, A. R. Timerbaev Toward a deeper and simpler understanding of serum protein-mediated transformations of magnetic nanoparticles by ICP-MS. (2021) *Talanta*. **229**, 122287.
- 107 D. Pröfrock, A. Prange Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry (ICP-MS) for Quantitative Analysis in Environmental and Life Sciences: A Review of Challenges, Solutions, and Trends. (2012) *Appl Spectrosc*. **66**, 843–868.
- 108 B. Michalke Review about Powerful Combinations of Advanced and Hyphenated Sample Introduction Techniques with Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS) for Elucidating Trace Element Species in Pathologic Conditions on a Molecular Level. (2022) *Int J Mol Sci*. **23**, 6109.
- 109 P. M. Opallage, M. de Silva, R. C. Dunn Dual detection high-speed capillary electrophoresis for simultaneous serum protein analysis and immunoassays. (2022) *Sci Rep*. **12**, 1951.
- 110 S. Meyer, D. Clases, R. Gonzalez de Vega, M. P. Padula, P. A. Doble Separation of intact proteins by capillary electrophoresis. (2022) *Analyst*. **147**, 2988–2996.
- 111 M.-I. Aguilar HPLC of Peptides and Proteins, Humana Press, New Jersey, pp. 9–22.
- 112 H. Baharifar, A. R. Fakhari, H. Ziyadi, M. A. Oghabian, A. Amani, R. Faridi-Majidi Influence of polymeric coating on capillary electrophoresis of iron oxide nanoparticles. (2014) *J Iran Chem Soc*. **11**, 279–284.
- 113 F. d’Orlyé, A. Varenne, P. Gareil Size-based characterization of nanometric cationic maghemite particles using capillary zone electrophoresis. (2008) *Electrophoresis*. **29**, 3768–3778.

- 114 F. d'Orlyé, A. Varenne, T. Georgelin, J.-M. Siaugue, B. Teste, S. Descroix, et al. Charge-based characterization of nanometric cationic bifunctional maghemite/silica core/shell particles by capillary zone electrophoresis. (2009) *Electrophoresis*. **30**, 2572–2582.
- 115 M. N. Alves, P. N. Nesterenko, B. Paull, P. R. Haddad, M. Macka Separation of superparamagnetic magnetite nanoparticles by capillary zone electrophoresis using non-complexing and complexing electrolyte anions and tetramethylammonium as dispersing additive. (2018) *Electrophoresis*. **39**, 1429–1436.
- 116 N. Vanifatova, B. Spivakov, J. Mattusch, U. Franck, R. Wennrich Investigation of iron oxide nanoparticles by capillary zone electrophoresis. (2005) *Talanta*. **66**, 605–610.
- 117 J. G. Fernández, C. Sánchez-González, J. Bettmer, J. Llopis, N. Jakubowski, U. Panne, et al. Quantitative assessment of the metabolic products of iron oxide nanoparticles to be used as iron supplements in cell cultures. (2018) *Anal Chim Acta*. **1039**, 24–30.
- 118 B. Franze, C. Engelhard Fast Separation, Characterization, and Speciation of Gold and Silver Nanoparticles and Their Ionic Counterparts with Micellar Electrokinetic Chromatography Coupled to ICP-MS. (2014) *Anal Chem*. **86**, 5713–5720.
- 119 L. Balcaen, E. Bolea-Fernandez, M. Resano, F. Vanhaecke Inductively coupled plasma – Tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS): A powerful and universal tool for the interference-free determination of (ultra)trace elements – A tutorial review. (2015) *Anal Chim Acta*. **894**, 7–19.
- 120 J. T.-W. Wang, U. Martino, R. Khan, M. Bazzar, P. Southern, D. Tuncel, et al. Engineering red-emitting multi-functional nanocapsules for magnetic tumour targeting and imaging. (2020) *Biomater Sci*. **8**, 2590–2599.
- 121 E. Russell, V. Dunne, B. Russell, H. Mohamud, M. Ghita, S. J. McMahon, et al. Impact of superparamagnetic iron oxide nanoparticles on in vitro and in vivo radiosensitisation of cancer cells. (2021) *Radiat Oncol*. **16**, 104.
- 122 T. W. May, R. H. Wiedmeyer A Table of Polyatomic Interferences in ICP-MS. (1998) *At Spectrosc*. **19**, 150-155.
- 123 A. Rua-Ibarz, E. Bolea-Fernandez, G. Pozo, X. Dominguez-Benetton, F. Vanhaecke, K. Tirez Characterization of iron oxide nanoparticles by means of single-particle

- ICP-mass spectrometry (SP-ICP-MS) – chemical *versus* physical resolution to overcome spectral overlap. (2020) *J Anal At Spectrom.* **35**, 2023–2032.
- 124 D. M. Townsend, K. D. Tew, H. Tapiero Sulfur containing amino acids and human disease. (2004) *Biomed Pharmacother.* **58**, 47–55.
- 125 J. Gong, M. J. Solivio, E. J. Merino, J. A. Caruso, J. A. Landero-Figueroa Developing ICP-MS/MS for the detection and determination of synthetic DNA-protein crosslink models via phosphorus and sulfur detection. (2015) *Anal Bioanal Chem.* **407**, 2433–2437.
- 126 M. Matczuk, J. Legat, A. R. Timerbaev, M. Jarosz A sensitive and versatile method for characterization of protein-mediated transformations of quantum dots. (2016) *Analyst.* **141**, 2574–2580.
- 127 M. Matczuk, K. Anecka, F. Scaletti, L. Messori, B. K. Keppler, A. R. Timerbaev, et al. Speciation of metal-based nanomaterials in human serum characterized by capillary electrophoresis coupled to ICP-MS: a case study of gold nanoparticles. (2015) *Metallomics.* **7**, 1364–1370.
- 128 H. Wu, K. Cheng, Y. He, Z. Li, H. Su, X. Zhang, et al. Fe₃O₄ -Based Multifunctional Nanospheres for Amplified Magnetic Targeting Photothermal Therapy and Fenton Reaction. (2019) *ACS Biomater Sci Eng.* **5**, 1045–1056.
- 129 G. K. Thirunavukkarasu, K. Cherukula, H. Lee, Y. Y. Jeong, I.-K. Park, J. Y. Lee Magnetic field-inducible drug-eluting nanoparticles for image-guided thermo-chemotherapy. (2018) *Biomaterials.* **180**, 240–252.
- 130 Z. Yuan, S. Duan, J. Shen, Y. Liu Sulfur Capacity of Sodium Phosphate Buffer Solution. (2019) *J Chem Eng Jpn.* **52**, 204–209.
- 131 G. Garcia-Schwarz, A. Rogacs, S. S. Bahga, J. G. Santiago On-chip Isotachophoresis for Separation of Ions and Purification of Nucleic Acids. (2012) *J Vis Exp.* **61**, 3890.
- 132 P. Blatný, F. Kvasnička Application of capillary isotachophoresis and capillary zone electrophoresis to the determination of inorganic ions in food and feed samples. (1999) *J Chromatogr A.* **834**, 419–431.
- 133 A. Bee, R. Massart, S. Neveu Synthesis of very fine maghemite particles. (1995) *J Magn Magn Mater.* **149**, 6–9.

- 134 J. B. Vincent, S. Love The binding and transport of alternative metals by transferrin. (2012) *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* **1820**, 362–378.
- 135 F. Benetti, M. Ventura, B. Salmi, S. Ceola, D. Carbonera, S. Mammi, et al. Cuprizone neurotoxicity, copper deficiency and neurodegeneration. (2010) *Neurotoxicology.* **31**, 509–517.
- 136 E. Bolea-Fernandez, D. Leite, A. Rua-Ibarz, T. Liu, G. Woods, M. Aramendia, et al. On the effect of using collision/reaction cell (CRC) technology in single-particle ICP-mass spectrometry (SP-ICP-MS). (2019) *Anal Chim Acta.* **1077**, 95–106.
- 137 O. Hakami, Y. Zhang, C. J. Banks Influence of aqueous environment on agglomeration and dissolution of thiol-functionalised mesoporous silica-coated magnetite nanoparticles. (2015) *Environ Sci Pollut Res.* **22**, 3257–3264.