



GDAŃSKA CHEMIA AKADEMICKA



**SESJA SPRAWOZDAWCZA SŁUCHACZY STUDIÓW
DOKTORANCKICH**

**przy Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego
i Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej**

Gdańsk, 13.09.2016

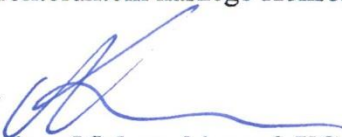
Szanowni Państwo,

W tym roku, organizatorem Sesji Sprawozdawczej Słuchaczy Studiów Doktoranckich jest Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Jest to druga z kolei wspólnie prowadzona Sesja w ramach powołanego w 2015 roku Konsorcjum Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej i Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pn. „**Gdańska Chemia Akademicka**”.

W październiku br. nowoprzyjęci słuchacze rozpoczną naukę na utworzonych w ramach Konsorcjum interdyscyplinarnych, środowiskowych studiach doktoranckich pn. ***International Ph.D. Programme „Chemistry for Health and the Environment” (INTERCHEM)***. Stacjonarne Studia Doktoranckie INTERCHEM prowadzone będą w języku angielskim i będą trwały 4 lata, a ich słuchacze będą uczestniczyć w zajęciach oferowanych przez obydwie Wydziały. Dzięki połączonym siłom, doktoranci studiów **INTERCHEM** będą mogli również korzystać z bogatszej infrastruktury badawczej oraz uzyskać stopnie naukowe doktora we wszystkich dyscyplinach naukowych dziedziny nauk chemicznych, tj. chemii, biochemii, biotechnologii, ochrony środowiska i technologii chemicznej.

Wierzmy, iż tegoroczne wspólne wystąpienia doktorantów obu Wydziałów pozwolą na poznanie tematów badawczych, wymianę myśli naukowych, owocne dyskusje oraz będą inspiracją do podejmowania wspólnych inicjatyw naukowo-badawczych.

Licząc na dalszy rozwój i sukcesy **Gdańskiej Chemii Akademickiej**, życzymy jak najwybitniejszych osiągnięć naukowych i wszelkiej pomyślności w życiu osobistym wszystkim doktorantom naszego Konsorcjum.



dr hab. Mariusz Makowski, prof. UG
Dziekan Wydziału Chemii UG



Prof. dr hab. inż. Sławomir Milewski
Dziekan Wydziału Chemicznego PG

Katedra Analizy Środowiska

Wydział Chemii UG

BADANIE STABILNOŚCI HYDROLITYCZNEJ ORAZ OCENA RYZYKA WYSTĘPOWANIA WYBRANYCH LEKÓW WETERYNARYJNYCH W GLEBACH ROLNICZYCH

mgr Paulina Łukaszewicz, IV rok

Promotor: prof. dr hab. Piotr Stepnowski

Gleba jest niewątpliwie jednym z najważniejszych zasobów naturalnych Ziemi. Jest ona nie tylko siedliskiem życia wielu organizmów, ale i swoistym filtrem zabezpieczającym przed nadmiernym przepływem niepożądanych substancji do innych komponentów środowiska. Dynamiczny rozwój przemysłu czy też intensyfikacja rolnictwa są przyczyną dopływu dużej ilości zanieczyszczeń do gleb. Wśród szerokiej gamy szkodliwych związków znajdują się także leki weterynaryjne. Niemniej jednak wiedza na temat stężeń tych substancji w glebach rolniczych jest wciąż ograniczona, a dla Polski dane takie nie są dostępne.

Dlatego też, w ramach pracy doktorskiej przeprowadzono wstępną ocenę stopnia zanieczyszczenia gleb rolniczych Polski północnej pozostałościami wybranych leków weterynaryjnych. Obiektem badań były farmaceutyki z grupy fluorochinolonów, makrolidów, sulfonamidów, nitroimidazoli oraz tetracyklin. W tym celu na wstępie opracowano i zwalidowano metody analityczne (HPLC-UV oraz LC-MS/MS), dzięki którym oznaczono farmaceutyki w matrycy stałej. Do wydzielania leków z dwóch rodzajów gleb wykorzystano innowacyjną technikę ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym. Dobór warunków izolacji leków z próbek gleb obejmował wybór mieszaniny ekstrakcyjnej, temperatury ekstrakcji, czasu ekstrakcji oraz krotności ekstrakcji. W ramach badań opracowano także warunki doczyszczania ekstraktów techniką ekstrakcji do fazy stałej. Ostatecznie przy użyciu opracowanych metod MAE-LC-MS/MS przeprowadzono analizy próbek gleb pobranych z terenów rolniczych województwa pomorskiego pod kątem występowania wybranych leków. Uzyskane wyniki potwierdziły istnienie problemu zanieczyszczenia środowiska glebowego pozostałościami farmaceutyków weterynaryjnych.

Z uwagi na to, że leki po przedostaniu się do środowiska naturalnego mogą ulegać procesom degradacji, a informacje dotyczące trwałości i aktywności tych substancji w środowisku są wciąż słabo poznane, w ramach niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono także ocenę stopnia degradacji hydrolitycznej wybranych leków weterynaryjnych. W celu zapewnienia najwyższej wiarygodności danych literaturowych eksperymenty wykonano w oparciu o wytyczne Organizacji Europejskiej Współpracy i Rozwoju (OECD 111) w warunkach pH naturalnie występujących w środowisku (pH 4-9). Badaniom poddano wybrane leki z grupy fluorochinolonów, nitroimidazoli, benzoimidazoli oraz fenikoli. Przeprowadzenie testów podstawowych jak i rozszerzonych pozwoliło na określenie stopnia stabilności badanych leków oraz w przypadku leków niestabilnych hydrolitycznie wyznaczenie kinetyki reakcji oraz czasów połowicznego rozpadu.

Praca finansowana ze środków NCN w ramach projektu PRELUDIUM, nr UMO-2014/13/N/ST4/04127: „Poszukiwanie innowacyjnych rozwiązań w aspekcie oznaczania leków przeciwbakteryjnych w glebach rolniczych” oraz projektu OPUS, nr UMO-2011/03/B/NZ8/03010 „Poznanie losów oraz sposobów rozprzestrzeniania się w środowisku wybranych beta-blokerów, leków wprowadzanych jako dodatki do pasz oraz stosowanych w akwakulturze”

OCENA SORPCJI I MOBILNOŚCI WYBRANYCH LEKÓW PRZECIWNOWOTWOROWYCH W ŚRODOWISKU GLEBOWYM

mgr Katarzyna Mioduszevska, IV rok

Promotor: prof. dr hab. Piotr Stepnowski

Choroby nowotworowe są jednym z najpoważniejszych problemów zdrowia publicznego na świecie [1]. Stosowane na szeroką skalę leki przeciwnowotworowe są na ogół szybko wydalane, w dominującej części w formie niezmetylizowanej wraz z niewielką frakcją metabolitów ulegają reakcjom metabolizmu. Głównym źródłem pozostałości tego typu związków w środowisku są zatem ścieki, zarówno szpitalne jak i komunalne [2]. Do środowiska glebowego farmaceutyki mogą trafić w sposób bezpośredni, w wyniku stosowania osadu ściekowego jako nawozu lub przenikania ich do gleb rolniczych na obszarach, gdzie funkcjonują przydomowe oczyszczalnie ścieków. Realne jest także skażenie pośrednie, poprzez spływ powierzchniowy zanieczyszczonych wód.

Prezentowane wyniki badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej dotyczą poznania mechanizmów rozprzestrzeniania się powszechnie stosowanych chemioterapeutyków w środowisku glebowym. Badania mobilności przedstawicieli leków przeciwnowotworowych zrealizowano w teście dynamicznym na dwóch glebach referencyjnych. W teście statycznym stosowanym do wyznaczenia parametrów sorpcji wyznaczono równowagowe współczynniki sorpcji K_d oraz parametry wybranych dwuparametrowych izoterm sorpcji. Określono potencjał sorpcji analitów na różnych glebach rolniczych, a także zbadano wpływ zmiennych warunków otoczenia tj. pH i siły jonowej. Dodatkowo sprawdzono znaczenie obecności innego zanieczyszczenia na zmianę zachowania się związków w badanych układach. W celu zachowania wiarygodności badań, testy wykonano w oparciu o znormalizowane procedury. Otrzymane próbki poddano analizie zwalidowanymi metodami techniką HPLC-UV. Jednym z istotnych parametrów pomagających przewidzieć tempo dystrybucji środowiskowej substancji kwasów lub zasad organicznych (jakimi najczęściej są farmaceutyki przeciwnowotworowe) jest pK_a [3]. Znajomość równowag kwasowo-zasadowych pozwala przewidzieć formę związku w zależności od wartości pH środowiska w którym się znajdzie. Biorąc powyższe po uwagę wyznaczono wartości parametrów pK_a dla cyklofosfamid, ifosfamid, 5-fluorouracylu, metotreksatu oraz imatinibu, a także zaproponowano równania kwasowo-zasadowe dla badanych związków

Opracowano także metody oznaczeń końcowych leków przeciwnowotworowych techniką HPLC-UV, dowiedziono, iż leki przeciwnowotworowe charakteryzują się bardzo różną mobilnością zarówno zależną od budowy chemicznej jak i warunków środowiskowych. Wykazano także, iż obecność współzanieczyszczeń może mieć wpływ na intensywność sorpcji leków przeciwnowotworowych.

Literatura:

- [1] WHO, "World Health Organization <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>," *Cancer: key fact*, 2015.
- [2] N. Negreira, M. López de Alda, and D. Barceló, "Study of the stability of 26 cytostatic drugs and metabolites in wastewater under different conditions," *Sci. Total Environ.*, vol. 482–483, pp. 389–398, Jun. 2014.
- [3] K. Kümmerer, "Pharmaceuticals in the environment," *Annu. Rev. Environ. Resour.*, vol. 35, pp. 57–75, 2010.

ANALITYKA, SORPCJA I OCENA EKOTOKSYKOLOGICZNA MIESZANIN WYBRANYCH FARMACEUTYKÓW WETERYNARYJNYCH W ŚRODOWISKU WODNYM

mgr Alan Puckowski, IV rok

Promotor: prof. dr hab. Piotr Stepnowski

Promotor pomocniczy: dr inż. Anna Białk-Bielińska

Niniejsza praca doktorska obejmuje zadania należące do dziedzin chemii środowiska oraz ekotoksykologii. Przedmiotem badań są dwie grupy intensywnie stosowanych związków chemicznych, farmaceutyki oraz tworzywa sztuczne (mikroplastiki).

Problem pozostałości farmaceutyków w środowisku wodnym stał się jednym z głównych tematów w dziedzinie chemii środowiska i ekotoksykologii w ostatnich latach. Wynika to z faktu, że substancje te są biologicznie aktywne, szeroko wykorzystywane w różnych celach i są regularnie wykryte w środowisku wodnym [1]. Z drugiej strony, przedmiotem niniejszych badań są tak zwane mikroplastiki. Materiały te są szeroko stosowane, stabilne i trafiają do środowiska wodnego za pośrednictwem wielu źródeł. Mikroplastiki są zatem również systematycznie odnajdywane w wodach na całym świecie. Ponieważ są to materiały o charakterze hydrofobowym, ich potencjał aby zmienić biodostępność innych zanieczyszczeń w środowisku wodnym stanowi przedmiot niniejszych badań [2].

W związku z powyższym, głównym celem niniejszej pracy jest przeprowadzenie baterii testów ekotoksykologicznych reprezentatywnych organizmów wodnych, wobec wybranych farmaceutyków oraz ich mieszanin. Badania obejmą także ocenę stopnia sorpcji wykorzystanych leków na powierzchni mikroplastików jak i zbadanie ich stabilności w warunkach poszczególnych testów ekotoksykologicznych, przy zastosowaniu techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

Literatura:

- [1] A. K. Sarmah, M. T. Meyer, and A. B. A. Boxall, *Chemosphere*, 65, 5, 2006.
- [2] A. L. Andrady, *Mar. Pollut. Bull.* 62, 8, 2011.

Praca finansowana ze środków NCN w ramach projektów OPUS, nr 2015/17/B/NZ8/02481 : „Farmaceutyki i produkty ich transformacji w środowisku: analityka, ekotoksykologia i ocena ryzyka” oraz PRELUDIUM nr 2015/17/N/NZ7/04108: „Sorpcja nowopojawiających się zanieczyszczeń środowiska na powierzchni mikroplastików”.

Katedra Biochemii Molekularnej

Wydział Chemii UG

PROJEKTOWANIE I CHEMICZNE SYNTEZY SELEKTYWNYCH INHIBITORÓW MATRYPTAZY-2 NA PODSTAWIE INHIBITORA TRYPSYNY SFTI-1 WYIZOLOWANEGO Z NASION SŁONECZNIKA

mgr Agata Gitlin-Domagalska, IV rok

Promotor: prof. dr hab. Krzysztof Rolka

Promotor pomocniczy: dr Dawid Dębowski

Głównym celem mojej pracy było znalezienie selektywnych i silnych inhibitorów matryptazy-2, enzymu odkrytego w 2002 roku [1]. Należy on do grupy transmembranowych proteaz serynowych typu II, charakteryzujących się umiejscowieniem w błonie komórkowej, za pomocą transmembranowej domeny kotwiczącej, znajdującej się blisko wewnątrzkomórkowego N-końca oraz zewnątrzkomórkową domeną katalityczną typu chymotrypsynowego [2]. Najważniejszą rolą tego enzymu jest kontrola homeostazy żelaza w organizmie [3]. Matryptaza-2, wykazuje dużą homologię sekwencyjną do matryptazy-1, dobrze poznanego enzymu, wydzielanego przez większość tkanek nabłonkowych zdrowego organizmu. Badania [4] dowiodły, że inhibitor trypsyny wyizolowany z nasion słonecznika (SFTI-1) hamuje matryptazę-1, co wraz z wynikami badań współpracującej ze mną grupy, nad peptydomimetycznymi, niskocząsteczkowymi inhibitorami matryptazy-2 [5] dało bazę do zaprojektowania peptydów o potencjalnych właściwościach inhibitorowych wobec matryptazy-2.

Zaprojektowałam 40 analogów SFTI-1 z modyfikowanymi pozycjami 1, 4, 5, 10 i 12, z cyklizacją przez mostek disulfidowy, oraz z dodatkową cyklizacją łańcucha głównego peptydu typu "głowa-ogon" lub "łańcuch boczny-ogon". Po zsyntezowaniu i oczyszczeniu peptydów, przeprowadziłam badania enzymatyczne analogów względem matryptazy-1, matryptazy-2 oraz innych proteaz serynowych- plazminy, trombiny i trypsyny.

W efekcie otrzymałam 2 wysoce selektywne inhibitory matryptazy-2 wykazujące silne własności inhibitorowe względem matryptazy-2, o wartościach K_i odpowiednio 0,43 μM i 0,28 μM . Dodatkowym, niespodziewanym efektem mojej pracy było opracowanie kilku silnych i wysoce specyficznych inhibitorów matryptazy-1, o wartościach K_i rzędu kilku nM.

Literatura:

- [1] Velasco G., Cal S., Quesada V., Saez L., Lopez-Otin S., *J. Biol.Chem.*, 277, 40, 2002.
- [2] Szabo R., Bugge T.H., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 40, 6-7, 2008.
- [3] Folgueras A.R., de Lara F.M., Pendas A.M., Garabaya C., Rodriguez F., Astudillo A., Bernal T., Cabanillas R., Lopez-Otin C., Velasco G., *Blood*, 112, 6, 2008.
- [4] Avrutina O., Fittler H., Glotzbach B., Kolmar H., Empting M., *Org. Biomol. Chem.*, 10, 38, 2012.
- [5] Sisay M.T., Steinmetzer T., Stirnberg M., Maurer E., Hammami M., Bajorath J., Gutschow M., *J. Med. Chem.*, 53, 15, 2010.

Praca finansowana ze środków NCN w ramach projektu PRELUDIUM nr 2014/13/N/ST5/01299 : „Projektowanie, chemiczna synteza i badania enzymatyczne inhibitorów matryptazy-2”.

BADANIE SPECYFICZNOŚCI LUDZKIEGO PROTEASOMU METODAMI CHEMII KOMBINATORYCZNEJ

mgr Natalia Gruba, IV rok

Promotor: prof. dr hab. Adam Lesner

Promotor pomocniczy: dr Magdalena Wysocka

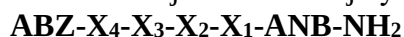
Proteasom ludzki nazywamy proteasomem 26S, zbudowany jest z dwóch części: regulatorowej (proteasom 19S) oraz katalitycznej (proteasom 20S). Podjednostka 19S ma za zadanie rozpoznanie białka znakowanego łańcuchem poliubikwitynowym oraz wprowadzenie go do komory proteasomu 20S, gdzie katalizowana jest reakcja proteolizy. W rdzeniu proteasomu znajduje się sześć podjednostek zawierających centra katalityczne, wykazujące trzy różne specyficzności:

β_1, β_1' – aktywność kaspazopodobna – hydrolizowane wiązanie po karboksylowej stronie reszty aminokwasowej z kwasowym łańcuchem bocznym;

β_2, β_2' – aktywność trypsynopodobna - hydrolizowane wiązanie po karboksylowej stronie reszty aminokwasowej z zasadowym łańcuchem bocznym;

β_5, β_5' – aktywność chymotrypsynopodobna - hydrolizowane wiązanie po resztach aminokwasowych z rozbudowanym, hydrofobowym łańcuchem bocznym [1].

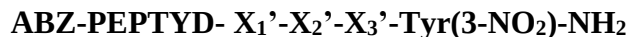
Ekspresja specyficzności substratowej obejmuje głównie pozycje P_4 - P_3' łańcucha peptydowego substratu (według notacji Schechtera i Bergera) [2]. Dla każdej z specyficzności proteasomu zaprojektowałam i zsyntetyzowałam bibliotekę substratów chromogenicznych i fluorescencyjnych w celu określenia sekwencji substratu najwydajniej ulegającego hydrolizie:



gdzie:

- ABZ – kwas 2-aminobenzoowy (donor fluorescencji);
- ANB-NH₂ – amid kwasu 5-amino-2-nitrobenzoowego (akceptor fluorescencji);
- X₁ = Lys, Arg – dla specyficzności trypsynowej,
= Tyr, Phe – dla specyficzności chymotrypsynowej,
= Asp, Glu – dla specyficzności kaspazowej;
- X₂, X₃, X₄ = wszystkie aminokwasy białkowe, z wyjątkiem Cys.

W celu określenia specyficzności substratowej dla pozycji P_1' - P_3' zsyntetyzowałam heptapeptydową bibliotekę substratów fluorescencyjnych dla poszczególnych podjednostek katalitycznych o ogólnym wzorze:



gdzie:

- Tyr(3-NO₂)-NH₂ – amid 3-nitro-L-tyrozyny (akceptor fluorescencji);
- PEPTYD = Val-Val-Ser-Arg – dla specyficzności trypsynowej,
= Val-Val-Ser-Tyr – dla specyficzności chymotrypsynowej,
= Ile-Leu-Met-Asp – dla specyficzności kaspazowej;
- X_{1'}, X_{2'}, X_{3'} = wszystkie aminokwasy białkowe, z wyjątkiem Cys.

Literatura:

[1] S. Borman, *Chemical and Engineering News*, 12, 43, 2000.

[2] L. Schechter, A. Berger, *I. Papain. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27, 157, 1967.

BADANIE MECHANIZMU SPLICINGU PEPTYDOWEGO KATALIZOWANEGO PRZEZ PROTEINAZY SERYNOWE

mgr Natalia Maria Ptaszyńska, IV rok

Promotor/Opiekun naukowy: dr hab. Anna Łęgowska, prof. UG

W 2004 roku proces splicingu peptydowego, został zdefiniowany jako tworzenie peptydu z dwóch fragmentów, które zostały wycięte i połączone w proteasomie z większego polipeptydu [1,2]. Colgrave i współ. [3] i Łęgowska i współ. [4] wykazali, że analogi SFTI-1, podczas inkubacji z odpowiednimi proteinazami, ulegają procesowi splicingu. W wyniku oddziaływania z trypsyną i/albo chymotrypsyną, w analogach SFTI-1 zawierających dwa miejsca reaktywne następuje proteolityczne rozszczepienie tych dwóch miejsc, usunięcie fragmentu środkowego i resynteza jednego miejsca reaktywnego, w efekcie czego powstaje monocykliczny SFTI-1 lub jego analog [Phe⁵]SFTI-1 [4]. Ponieważ zachodzący w analogach SFTI-1 splicing peptydowy wydaje się podobny do tego, który ma miejsce w proteasomie, postanowiłam zweryfikować tę teorię. Jako narzędzie w badaniu mechanizmu splicingu peptydowego zaprojektowałam i otrzymałam serię peptydów zbudowanych z N- i C-końcowego fragmentu SFTI-1 lub ich analogów, połączonych międzycząsteczkowym wiązaniem disulfidowym [5,6]. W wyniku ich inkubacji z odpowiednim enzymem, zaobserwowałam tworzenie nowego wiązania peptydowego i powstanie monocyklicznego SFTI-1. Otrzymane wyniki potwierdziłam przy pomocy HPLC i spektrometrii mas oraz dodatkowo przy pomocy badań rentgenostrukturalnych, których nie wykorzystywano wcześniej w badaniach mechanizmu splicingu. Ponadto, przy użyciu znakowanej wody H₂¹⁸O, udowodniłam, że podobnie jak w proteasomie, proces splicingu peptydowego katalizowany przez proteinazy serynowe zachodzi wg mechanizmu bezpośredniej transpeptydacji.

Literatura:

- [1] K. Hanada, J.W. Yewdell, J.C. Yang, *Nature*, 427, 252, 2004.
- [2] N. Vigneron, V. Stroobant, J. Chapiro, *Science*, 304, 587, 2004.
- [3] M.L. Colgrave, M.J. Korsinczyk, R.J. Clark, F. Foley, D.J. Craik, *Biopolymers*, 94, 665, 2010.
- [4] A. Łęgowska, A. Lesner, E. Bulak, A. Jaśkiewicz, A. Sieradzan, M. Cydzik, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, K. Rolka, *FEBS J.*, 277, 2351, 2010.
- [5] N. Karna, D. Dębowski, A. Gitlin, A. Łęgowska, K. Rolka, *FEBS J.*, 23, 6213-22, 2013.
- [6] N. Karna, A. Łęgowska, S. Malicki, D. Dębowski, P. Golik, A. Gitlin, P. Grudnik, B. Władyka, K. Brzozowski, G. Dubin, K. Rolka, *ChemBioChem*, 16, 2036, 2015.

Katedra Biotechnologii Molekularnej

Wydział Chemii UG

BIOSYNTETA, OCZYSZCZANIE ORAZ ANALIZA WŁAŚCIWOŚCI BIFUNKCYJNEJ ENDONUKLEAZY RESTRYKCYJNEJ RM.TTHHB27I

mgr Daria Krefft, IV rok

Promotor: prof. dr hab. Piotr Skowron

Promotor pomocniczy: dr Agnieszka Żylicz-Stachula

Endonukleazy restrykcyjne (REazy) wraz z towarzyszącymi im metylotransferazami (MTazami) tworzą w bakteriach system restrykcyjno-modyfikacyjny (R-M). Ten prymitywny odpowiednik układu immunologicznego ma ogromne znaczenie dla organizmów jednokomórkowych, gdyż chroni on genom gospodarza przed integracją z obcym DNA, pochodzącym np. z wirusów. REazy podzielono na 4 Typy: I, II, III i IV. Każdy z czterech typów skupia enzymy, które charakteryzują się podobieństwem cech. Klasyfikacja opiera się na liczbie i organizacji podjednostek, regulacji ekspresji ich genów, wymaganiach dotyczących kofaktorów reakcji, mechanizmie reakcji enzymatycznej i specyficzności wobec sekwencji. Największe znaczenie (m. in. ze względu na określone miejsce trawienia) w nauce i przemyśle mają REazy Typu II. Enzymy Typu II wymagają obecności kofaktora w postaci jonów Mg^{2+} . Nie wymagają udziału S-adenozylometioniny (SAM) i ATP, choć mogą one mieć w wybranych przypadkach działanie stymulujące [1].

SAM oraz jej analogi: sinefungina (SIN), S-adenozylhomocysteina (SAH) i S-adenozyllocysteina (SAC) to związki chemiczne wykazujące szczególny wpływ na aktywność kilku enzymów należących do rodziny 'Thermus'. Rodzina ta składa się z 6 REazo 5 odmiennych specyficznościach: RM.TaqII, RM.TspGWI, RM.TspDTI, RM.TsoI oraz pary izoschizomerów RM.Tth111II/RM.TthHB27I. Białka te, pomimo iż są wyodrębnione z różnych organizmów wykazują podobieństwo w wielu aspektach: masa cząsteczkowa ok. 120 kDa, aktywność REazy i MTazy w jednym łańcuchu polipeptydowym, częściowe trawienie substratowego DNA, cięcie DNA w określonej odległości poza rozpoznawanym miejscem (N11/9) oraz modulacja aktywności przez SAM bądź jej analogi. Wykazują one znaczące podobieństwo sekwencji aminokwasowej (aa) i modułów katalitycznych [2].

Celem prowadzonych przeze mnie badań było zbadanie właściwości biochemicznych RM.TthHB27I oraz klonowanie i optymalizacja ekspresji genu *tthHB27IRM* w komórkach komercyjnie dostępnych szczepów *Escherichia coli*. Ustalono protokół oczyszczania białka oraz zoptymalizowano podstawowe parametry reakcji trawienia, tj. temperaturę, pH oraz siłę jonową. Zbadano wpływ kofaktora SAM oraz jej analogów na aktywność enzymu, a także potwierdzono sekwencję rozpoznawaną przez RM.TthHB27I [3].

Literatura:

- [1] R. J. Roberts, M. Belfort, T. Bestor, A. S. Bhagwat, T. A. Bickle, et al., *Nucleic Acids Research*, 31, 1805-1812, 2003.
- [2] A. Żylicz-Stachula, O. Żołnierkiewicz, A. Lubys, D. Ramanauskaite, G. Mitkaite, J. M. Bujnicki, P. M. Skowron, *BMC Mol Biol*, 13(1): 13, 2012.
- [3] D. Krefft, A. Żylicz-Stachula, E. Mulkiwicz, A. Papkov, J. Jezewska-Frackowiak, P. M. Skowron, *J. Biotechnol.* 194, 67-80, 2015.

ZMIANA SPECYFICZNOŚCI SUBSTRATOWEJ TERMOSTABILNEJ ENDONUKLEAZY RESTRYKCYJNEJ RM.TTHHB27I ZA POMOCĄ INŻYNIERII GENETYCZNEJ MOTYWU KATALITYCZNEGO ORAZ WIĄŻĄCEGO KOFAKTOR

mgr Aliaksei Papkov, IV rok

Promotor/Opiekun naukowy: prof. dr hab. Piotr Skowron

Promotor pomocniczy: dr inż. Joanna Jeżewska-Frąckowiak

Celem projektu doktorskiego było uzyskanie często tnącej formy enzymu RM.TthHB27I, która znajdzie zastosowanie w dalszych badaniach oraz może zostać przydatnym narzędziem w rozwiązywaniu zadań w obszarze biologii molekularnej i w szczególności inżynierii genetycznej. Założeniem, które zostało zweryfikowane w ramach projektu, jest zmiana specyficzności substratowej endonukleazy restrykcyjnej RM.TthHB27I w wyniku mutacji wprowadzonych w obrębie motywów posiadających kluczowe znaczenie dla aktywności tego enzymu. Enzym RM.TthHB27I należy do podtypów IIS/IIG/IIC systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych i jest przedstawicielem odkrytej przez zespół prof. Piotra Skowron rodziny białek typu *Thermus* sp. RM.TthHB27I rozpoznaje sekwencję 5'-CAARCA-3' i rozcina DNA w odległości 11/9-pz [1]. Bifunkcyjna endonukleaza restrykcyjna RM.TthHB27I posiada typowe dla jej podrodziny motywy: motyw katalityczny metylotransferazy NPPW i motyw DPACGSG wiążący S-adenozylometioninę (SAM) [1,2]. Mutacje zostały wprowadzone do genu *tthHB27IRM* przy pomocy mutagenyzy miejscowo-specyficznej z zastosowaniem łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Sekwencja nukleotydowa została zmieniona w regionach, które odpowiadają za wiązanie się enzymu z kofaktorem SAM i za aktywność metylotransferazy TthHB27I. Sekwencje aminokwasowe uzyskane w wyniku wprowadzonych mutacji zostały zdefiniowane na podstawie danych o innych enzymach rodziny białek typu *Thermus*. Dane pochodzące z wcześniejszych badań wykazały wpływ kofaktora SAM oraz jego analogu sinefunginy (SIN) na aktywność enzymów RM.TspGWI i RM.TaqII [3,4]. Sekwencja aminokwasowa w motywie wiążącym kofaktor SAM została zmieniona z DPACGSG na DPAVGTG (motyw występujący w enzymie RM.TspGWI). W motywie katalizującym metylację, sekwencja NPPW została zmieniona na NPPY (sekwencja charakterystyczna dla enzymów RM.TspGWI i RM.TaqII). Uzyskano również warianty enzymu zawierające w sekwencji zarówno motyw NPPY jak i DPAVGTG. Badania biochemiczne nowych wariantów RM.TthHB27I nie potwierdziły pierwotnych założeń dotyczących zmiany specyficzności substratowej, niemniej jednak zostały stworzone warianty białka o nowych właściwościach biochemicznych.

Literatura:

- [1] A. Zylicz-Stachula, O. Zolnierkiewicz, A. Lubys, D. Ramanauskaite, G. Mitkaite, J.M. Bujnicki, P.M. Skowron, *BMC Mol. Biol.* 13, 13, 2012.
- [2] D. Krefft., A. Zylicz-Stachula, E. Mulkiwicz, A. Papkov, J. Jezewska-Frąckowiak, P. M. Skowron, *J. Biotechnol.* 194, p. 67–80, 2015.
- [3] A. Zylicz-Stachula, O. Zolnierkiewicz, J. Jezewska-Frąckowiak, P. M. Skowron, *Biotechniques* 50, 397–406, 2011.
- [4] A. Zylicz-Stachula, O. Zolnierkiewicz, J. Jasiecki, P. M. Skowron, *BMC Genomics* 14(1):370, 2013.

ENDOGENNE INHIBITORY ENKEFALINAZ ORAZ ICH ANALOGI JAKO POTENCJALNE TERAPEUTYKI

mgr Małgorzata Sobocińska, IV rok

Promotor: dr hab. Elżbieta Kamysz, prof. UG

Enkefaliny zaangażowane są w szereg fizjologicznych procesów zachodzących w organizmie począwszy od układu krwionośnego przez immunologiczny, aż do nerwowego. Czas działania enkefalin w warunkach *in vivo* jest krótki ze względu na ich dużą podatność na działanie enzymów je degradujących. Endogenne inhibitory enkefalinaz do których zaliczamy: opiorfinę (QRFSR), sialorfinę (QHNPR) oraz spinorfinę (LVVYPTW), poprzez blokowanie aktywności enkefalinaz zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* nie tylko chronią działanie enkefalin, ale również mogą wpływać na czynność wielu narządów w warunkach fizjologicznych i patologicznych.

Opiorfina jest inhibitorem neutralnej endopeptydazy (NEP) oraz aminopeptydazy N (APN) enzymów katalizujących rozkład enkefalin [1]. Sialorfina jest inhibitorem NEP [2]. Spinorfina jako regulator poziomu enkefalin hamuje aktywność czterech enzymów: NEP, APN, peptydazy dipeptydylowej III (DPPIII) oraz konwertazy angiotensyny (ACE) [3]. Opiorfina, sialorfina i spinorfina są fizjologicznymi modulatorami bólu, wykazują m.in. działanie przeciwpalne, przeciwdepresyjne [1-3].

W ramach realizacji pracy przeprowadzono syntezę i oczyszczanie opiorfiny, sialorfiny i spinorfiny oraz zaprojektowano i otrzymano ich analogi. Syntezę peptydów wykonano metodą syntezy na nośniku stałym (SPPS) przy zastosowaniu chemii Fmoc. Przeprowadzono badania hamowania aktywności enzymatycznej przez opiorfinę, sialorfinę i spinorfinę oraz ich analogii względem NEP i APN w warunkach *in vitro*. Wyznaczono szybkość degradacji (k) i okresy półtrwania ($t_{1/2}$) enkefalin w obecności poszczególnych inhibitorów enkefalinaz. Dla peptydów o najlepszym profilu farmakologicznym prowadzone są badania *in vivo* mające na celu określenie możliwości zastosowania endogennych inhibitorów enkefalinaz jak również ich analogów w leczeniu nieswoistych chorób zapalnych jelit, bólu trzewnym, a także w wybranych chorobach nowotworowych.

Literatura:

- [1] P. Popik, E. Kamysz, J. Kreczko, M. Wróbel, Behav. Brain Res., 213, 88, 2010.
- [2] E. Kamysz, M. Sałaga, M. Sobczak, W. Kamysz, J. Fichna, J. Pept Sci., 19, 166, 2013.
- [3] H. Honda, H. Okutsu, T. Matsuura, T. Miyagi, Y. Yamamoto, T. Hazato, H. Ono, Jpn J Pharmacol, 87, 261, 2001.

Praca finansowana ze środków: NCN w ramach projektu OPUS nr 2013/11/B/NZ7/01301: „Endogenne inhibitory enkefalinaz i ich nowe syntetyczne analogi jako potencjalne leki w terapii chorób układu pokarmowego i bólu trzewnego”, Uniwersytetu Gdańskiego w ramach projektu BMN nr 538-8646-B716-15: „Wpływ wybranych modyfikacji reszty glutaminy w sialorfinie na jej aktywność przeciwbólową” oraz nr 538-8646-B086-15: „Modyfikacje cząsteczki sialorfiny w pozycji pierwszej, a trwałość enkefalin”.

Katedra Chemii Analitycznej

Wydział Chemii UG

W POSZUKIWANIU NOWYCH RECEPTORÓW MOLEKULARNYCH: POCHODNE AMINOANTRACHINONU

mgr Sandra Ramotowska, IV rok

Promotor: dr hab. Beata Grobelna prof. UG

Promotor pomocniczy: dr Dorota Zarzeczkańska

Ważnym aspektem w dziedzinie chemii analitycznej i supramolekularnej jest projektowanie użytecznych receptorów molekularnych. Układy takie powinny być w stanie specyficznie i selektywnie oddziaływać z wybranymi analitami i w prosty sposób sygnalizować zachodzące między nimi oddziaływania.

Ugrupowanie antrachinonowe, dzięki swoim właściwościom, może zachowywać się zarówno jako chromofor jak i elektrofor [1,2]. W związku z tym, aminowe pochodne antrachinonu mogą być elementami struktur supramolekularnych wrażliwych na zmiany pH i potencjału redoks oraz pełnić funkcje chemosensorów [3,4]. Połączenie jednostki sygnalizacyjnej z jonoforową umożliwia detekcję zachodzącej reakcji tworzenia kompleksu.

Na kompleksotwórcze właściwości takich układów, w tym na selektywność wiązania jonów metali, będą miały wpływ modyfikacje struktury jonoforu. Wśród badanych związków element chromoforowy połączony jest m.in. z eterem koronowym przez atom azotu lub włączony bezpośrednio w strukturę makrocyclu. Badanie właściwości kwasowo-zasadowych związków kompleksujących jest niezbędne, aby określić ich zachowanie w rozpuszczalniku, a pośrednio także ich zdolność do tworzenia kompleksów z jonami metalu lub innymi cząsteczkami. Wartość pK_a niesie ze sobą bowiem informacje na temat form protolitycznych uczestniczących w procesie kompleksowania.

Celem przedstawionych badań była charakterystyka spektroskopowa i elektrochemiczna grupy jonoforów pochodnych aminoantrachinonu oraz porównanie ich właściwości kwasowo-zasadowych i kompleksotwórczych.

Literatura:

- [1] E. Kikuta, R. Matsubara, N. Katsube, T. Koike, E. Kimura, *J Inorg Biochem*, 82, 2000.
- [2] J.M. Costa, B. Jeyashri, D. Bethell, *J Electroanal Chem*, 351, 1993.
- [3] T. Ossowski, D. Zarzeczkańska, L. Zalewski, P. Niedziałkowski, R. Majewski, A. Szymańska, *Tetrahedron Lett*, 46, 2005.
- [4] A. Wcisło, A. Cirocka, D. Zarzeczkańska, P. Niedziałkowski, S. Nakonieczna, T. Ossowski *Spectrochim Acta Part A*, 137, 2015.

Praca finansowana ze środków BMN 538-8215-B078-15

SENSORY ELEKTROCHEMICZNE NA BAZIE MODYFIKOWANYCH POWIERZCHNI WĘGLOWYCH

mgr Patrycja Zięba, IV rok

Promotor: prof. dr hab. inż. Tadeusz Ossowski

Promotor pomocniczy: dr hab. inż. Robert Bogdanowicz

Wykorzystanie sensorów elektrochemicznych w analityce jest niezwykle użytecznym i stosunkowo prostym sposobem na identyfikację bioanalitów i analitów środowiskowych. Wśród materiałów wykorzystywanych do projektowania sensorów rosnące zastosowanie obserwuje się dla elektrod diamentowych domieszkowanych borem (ang. *boron-doped diamond*, BDD). Wybór elektrody BDD jako potencjalną platformę do modyfikacji związany jest z jego znakomitymi właściwościami elektrochemicznymi [1]. Materiał ten charakteryzuje się wysoką stabilnością chemiczną i elektrochemiczną, niskim i stabilnym prądem pojemnościowym, szerokim okienkiem elektrochemicznym, słabą zdolnością do adsorpcji oraz łatwością funkcjonalizacji jego powierzchni [2].

Elektrody BDD wykorzystywane do modyfikacji oraz do badań elektrochemicznych wytwarzane były przez zespół dr hab. inż. Roberta Bogdanowicza z Wydziału Elektroniki, Telekomunikacji i Informatyki Politechniki Gdańskiej. Elektrody zmodyfikowane zostały melaminą (2,4,6-triamino-1,3,5-triazyną) z wykorzystaniem procesu elektrochemicznego osadzania na powierzchni [3]. Wiązanie utworzone pomiędzy zewnętrzną powierzchnią elektrody a organiczną strukturą charakteryzuje się wysoką trwałością chemiczną i elektrochemiczną. Uzyskane w ten sposób powierzchnie węglowe posłużyły do badań właściwości elektrochemicznych zmodyfikowanych elektrod jako układów rozpoznawania molekularnego. Wykorzystana została technika różnicowej pulsowej woltamperometrii (DPV).

Zbadane zostały procesy utlenienia adeniny, guaniny, tyminy, cytozyny, uracylu, kofeiny, kwasu moczowego. Wszystkie badania wykonane były również na czystych, niemodyfikowanych elektrodach, co pozwoliło na określenie wpływu zakotwiczonej melaminy na proces redoks. Dodatkowo, porównane zostały procesy redoks następujących grup związków:

- adenina, deoksyadenozyna, monofosforan deoksyadenozyny,
- guanina, deoksyguanozyna, monofosforan deoksyguanozyny.

Literatura:

- [1] J.H.T. Luong, K. B. Male, J.D. Glennon, *The Analyst* 134, 1965, 2009.
- [2] J.V. Macpherson, J. V., *Phys Chem Chem Phys* 17, 2935–2949, 2015.
- [3] P. Niedziałkowski et.al., *Electroanalysis* 28, 211 – 221, 2016.

Praca finansowana ze środków Badań Służących Rozwojowi Młodych Naukowców nr 538-8215-B107-15: „Badania oddziaływań zmodyfikowanych powierzchni węglowych z wybranymi analitami jako etap projektowania sensorów elektrochemicznych”.

Katedra Chemii Biomedycznej

Wydział Chemii UG

BADANIE ODDZIAŁYWAŃ LUDZKIEJ CYSTATYNY C Z MONOKLONALNYM PRZECIWCIAŁEM HCC3

mgr Monika Rafalik, IV rok

Promotor: dr hab. inż. Aleksandra Kołodziejczyk, prof. UG

Promotor pomocniczy: dr Paulina Czaplewska

Ludzka cystatyna C jest niewielkim białkiem (13.3 kDa), które powszechnie występuje w płynach ustrojowych człowieka gdzie głównie pełni rolę inhibitora proteaz cysteinowych. W stanach patologicznych białko to tworzy dimery oraz wyższe formy oligomeryczne, które mogą prowadzić do ich zalegania w różnych organach. Prowadzić to może do powstawania chorób typu amyloidowego. Rzadka mutacja ludzkiej cystatyny C, L68Q, jest przyczyną występowania amyloidowej angiopatii mózgowej (*Hereditary cystatin C amyloid angiopathy, HCCAA*), w wyniku której dochodzi do krwotoków mózgowych nawet u osób w młodym wieku [1].

Znanych jest wiele przeciwciał, które oddziałują z ludzką cystatyną C. Profesor Grubb ze współpracownikami (University of Lund) wykazali, że niektóre z nich w niewielkim stopniu wpływają na hamowanie tworzenia dimerów hCC, natomiast kilka z przebadanych przeciwciał blokuje/hamuje tworzenie dimerów/oligomerów w sposób znaczący. Otrzymane przez wyżej wspomniany zespół badawczy mysie monoklonalne przeciwciała HCC3 hamują tworzenie dimerów hCC w ok. 60% (stosunek molowy HCC3:hCC 1:4) [2].

Obecnie coraz częściej prowadzone są prace dotyczące poznania szczegółów interakcji antygen-przeciwciało, ponieważ wydaje się to istotne w poszukiwaniu i projektowaniu nowych leków dla immunoterapii. W swojej pracy, do wyznaczenia miejsca wiązania się ludzkiej cystatyny C z przeciwciałem HCC3 (epitop) wykorzystałam wiele metod, m.in. chromatografię powinowactwa, trawienia enzymatyczne, test immunoenzymatyczny oraz wymianę wodoru-deuteru sprzężoną ze spektrometrią mas. Ostatnia z wymienionych jest powszechnie znana i chętnie wykorzystywana do badań kompleksów i identyfikacji miejsc oddziaływań, jednakże porównanie wyników uzyskanych różnymi metodami pozwala na bardziej precyzyjne określenie miejsca wiążącego białka do przeciwciała. Moje badania były również ukierunkowane na charakterystykę przeciwciała HCC3 oraz próby wyznaczenia miejsca wiązania przeciwciała do ludzkiej cystatyny C (wyznaczanie paratopu).

Literatura:

[1] A. Grubb, *Adv. Clin. Chem.*, 35, 63-99, 2001.

[2] G. Ostner, V. Lindstrom, AB. Postnikov, TI. Solovyeva, OI. Emilsson, A. Grubb, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 71, 676-682, 2011.

MAŁOCZĄSTECZKOWE ALLOSTERYCZNE MODULATORY AKTYWNOŚCI PROTEASOMU

mgr Julia Witkowska, IV rok - przedłużenie

Promotor: dr hab. Elżbieta Jankowska, prof. UG

Proteasom jest wielocząsteczkowym kompleksem białkowym odpowiedzialnym za nielizosomalną degradację białek zachodzącą zarówno w cytozolu, jak i jądrze komórkowym. Wraz z ubikwityną tworzy szlak ubikwityno-proteasomalny, który pełni funkcję ochronną usuwając z komórki źle sfałdowane czy uszkodzone białka, a także, poprzez zmianę stężenia białek regulatorowych, wpływa na przebieg większości procesów komórkowych [1]. Z uwagi na zaangażowanie proteasomu w cały szereg procesów zachodzących w komórkach, zaburzenia w jego funkcjonowaniu czynią go odpowiedzialnym lub współodpowiedzialnym za rozwój rozmaitych stanów patologicznych i w związku z tym stanowi on atrakcyjny cel w projektowaniu leków. Proteasom został powiązany z etiologią chorób neurodegeneracyjnych oraz różnymi typami nowotworów.

Jak dotąd, trzy syntetyczne inhibitory proteasomu są stosowane w terapii szpiczaka mnogiego i chłoniaka. Jednak z powodu wywoływanych przez nie lekooporności, ciężkich efektów ubocznych oraz niekorzystnych właściwości farmakodynamicznych poszukiwane są związki o innym mechanizmie działania. Alternatywą mogą być allosteryczne modulatory wiążące się poza miejscem aktywnym i dające możliwość uzyskania większej selektywności terapeutyków [2]. Związki allosteryczne pozwalają nie tylko na hamowanie, ale także na zwiększanie aktywności enzymu, dając możliwość poprawienia efektywności usuwania z komórek utlenionych, częściowo rozładowanych białek będących prekursorami form oligomerycznych [3, 4]. Tego typu związki cieszą się coraz większym zainteresowaniem, jednak zasadniczym problemem przy ich projektowaniu jest brak wiedzy na temat zlokalizowania i wymogów miejsc allosterycznych.

W ramach pracy doktorskiej podjęłam próby określenia miejsc wiązania małowcząsteczkowych aktywatorów i inhibitorów za pomocą krystalografii rentgenowskiej. Dla jednego związku otrzymałam strukturę krystaliczną w kompleksie z drożdżowym proteasomem 20S (pdb: 4ZZG). Jednocześnie poszukiwałam nowych allosterycznych modulatorów, opierając ich sekwencje o naturalne regulatory - białko Blm10 i HIV1-Tat oraz bogaty w reszty proliny i argininy peptyd PR-39.

Literatura:

- [1] K. J. A. Davies, *Biochimie* 83, 301, 2001.
- [2] A. M. Ruschak, M. Slassi, L. E. Kay, A. D. Schimmer, *J. Natl. Cancer Inst.* 103, 1007, 2011.
- [3] P. C. Trippier, K. T. Zhao, S. G. Fox, I. T. Schiefer, R. Benmohamed, J. Moran, D. R. Kirsch, R. I. Morimoto, R. B. Silverman, *ACS Chem. Neurosci.* 9, 823, 2014.
- [4] F. H. Dal Vechio, F. Cerqueira, O. Augusto, R. Lopes, M. Demasi, *Free Radic. Biol. Med.* 67, 304, 2014.

Praca finansowana ze środków NCN w ramach projektu PRELUDIUM nr 2015/17/N/NZ1/01772: „Wykorzystanie rentgenografii strukturalnej do zlokalizowania miejsc wiązania allosterycznych inhibitorów i aktywatorów proteasomu”.

Katedra Chemii Fizycznej

Wydział Chemii UG

ZASTOSOWANIE TECHNIK CHROMATOGRAFICZNYCH I EMISYJNYCH W ANALIZIE ILOŚCIOWEJ WYBRANYCH ZWIĄZKÓW BIOLOGICZNIE AKTYWNYCH W GRUPIE PACJENTÓW PRZEWLEKLE DIALIZOWANYCH

mgr Paweł Błażej Rudnicki, IV rok

Promotor: prof. UG, dr hab. Karol Krzemiński

Promotor pomocniczy: dr n. med. Magdalena Jankowska

Przewlekła dializoterapia u pacjentów z zaburzeniami czynności nerek leczonych metoda dializy związana jest ze zwiększonym ryzykiem pojawiania się niedoboru wielu substancji aktywnych biologicznie w tej grupie osób. Przejawia się to w objawach klinicznych ważnych dla życia i zdrowia pacjentów. Podstawowe przyczyny tego zjawiska klinicyści upatrują w stratach tych wodnorozpuszczalnych związków, związanych z ich regularnym wypłukiwaniem wraz z płynem dializacyjnym. Straty substancji aktywnych biologicznie w przebiegu hemodializy są dość wysokie, przy czym dostępne źródła podają różny procentowy spadek stężenia wodnorozpuszczalnych związków w czasie pojedynczego zabiegu. Przewlekła dializoterapia metodą dializy otrzewnowej (DO) również predysponuje do rozwoju niedoboru aktywnych biologicznie molekuł, o potencjalnie istotnych klinicznie konsekwencjach dla pacjentów z przewlekłą chorobą nerek. Niestety, nieznana jest ani wielkość tych strat, ani czynników je warunkujących. Brak danych w tej dziedzinie u pacjentów leczonych metodą dializy otrzewnowej wynika po części z trudności metodologicznych w oznaczaniu poziomu wielu związków aktywnych biologicznie w dializacie z otrzewnej, a także nieznaności mechanizmów transportu tych substancji przez błonę otrzewnową. Nie jasny jest też wpływ suplementacji na ich zasoby w ustroju oraz wielkość strat z dializatem.

Zasadniczym celem mojej pracy badawczej stało się przede wszystkim opracowanie czułych i powtarzalnych metod analitycznych do oznaczania wybranych związków biologicznie aktywnych w pełnej krwi, surowicy oraz dializacie z otrzewnej. Dodatkowym zadaniem jest ocena poziomu strat oznaczanych związków wypłukiwanych wraz z dializatem u chorych z przewlekłą chorobą nerek leczonych nerkozastępczo metoda dializy. Według mojej wiedzy w przeszłości nie prowadzono tego typu badań. Cel ten osiągnięto dobierając oryginalne układy chromatograficzne i stosując techniki RP-HPLC z ultra-czułą detekcją fluorescencyjną oraz spektrofotometrii stacjonarnej. W ramach pracy zoptymalizowane zostały również metody przygotowywania próbek biologicznych do analiz wyżej wspomnianymi technikami. Zastosowanie zaawansowanych technik statystycznych miało na celu ujawnienie korelacji i zależności pomiędzy wielkością strat badanych związków biologicznie aktywnych a innymi parametrami klinicznymi mogącymi mieć wpływ na wielkość strat.

MODYFIKOWANE NUKLEOZYDY JAKO SUBSTANCJE UWRAŻLIWIAJĄCE DNA NA DZIAŁANIE PROMIENIOWANIA ELEKTROMAGNETYCZNEGO

mgr Magdalena Zdrowowicz, IV rok

Promotor: prof. dr hab. Janusz Rak

Radioterapia należy do najpowszechniej stosowanych metod walki z nowotworami. W celu zwiększenia jej efektywności i bezpieczeństwa powinna być związana z użyciem radiosensybilizatorów, czyli związków potrafiących uczulić DNA komórek nowotworowych na promieniowanie jonizujące. Jednak stosowana w praktyce klinicznej gama radiosensybilizatorów jest zadziwiająco skromna. Modyfikowane nukleozydy (MN) wydają się być szczególnie obiecującymi kandydatami na efektywne, niskotoksyczne promieniouczulacze [1]. Wprowadzenie do cząsteczki zasady odpowiednich podstawników powoduje zwiększenie podatności na degradację indukowaną produktami radiolizy wody.

W ramach niniejszego projektu zsyntezowano i zbadano właściwości sensybilizujące nowego, potencjalnego radiosensybilizatora DNA, tj. 5-tiocyjaniano-2'-deoksyurydyny (SCNdU), zaprojektowanego w oparciu o badania kwantowo-chemiczne pierwszego, kluczowego etapu indukowanej przyłączeniem elektronu degradacji, prowadzącej do powstania reaktywnego rodnika 5-urydyłowego. Podatność SCNU na degradację indukowaną elektronami została zweryfikowana w eksperymencie spektroskopii fotoelektronowej [2]. Mechanizm tego procesu określono z wykorzystaniem techniki elektronowego rezonansu spinowego, jak również stacjonarnej radiolizy sprzężonej z wysokorozdzielczą spektrometrią mas. Uzyskane wyniki czynią z SCNdU niezwykle obiecujący radiosensybilizator, który po wprowadzeniu do DNA będzie prawdopodobnie powodować tworzenie się cytotoksycznych uszkodzeń, takich jak: pęknięcia nici, sieciowanie wewnątrz- i międzyniciowe w obrębie DNA, a także sieciowanie białko-DNA [3].

Modyfikacje strukturalne prowadzą często do pojawienia się fotoreaktywności MZ w zakresie bliskiego nadfioletu. Ta z kolei otwiera drogę do wzbogacenia nimi terapii fotodynamicznej, znacznie bezpieczniejszej niż radioterapia. Stąd innym aspektem prowadzonych badań było zbadanie procesu indukowanej promieniowaniem UV degradacji modelowego fragmentu DNA wielokrotnie znakowanego jednym z MN tj. 5-bromo-2'-deoksycytydyny (BrdC). W tym celu opracowano protokół enzymatycznego znakowania fragmentu DNA BrdC na drodze amplifikacji *in vitro* metodą PCR. Efekty naświetlania promieniowaniem UV o długości fali 300 nm zanalizowano przy użyciu szeregu technik, takich jak: enzymatyczna hydroliza sprzężona z analizą chromatograficzną, spektrometria mas, techniki elektroforetyczne czy denaturująca wysokosprawna chromatografia cieczowa. Analiza uszkodzeń fragmentu DNA pozwoliła ustalić, że tworzenie się wtórnych, pojedynczych pęknięć nici stanowi główny mechanizm uszkodzeń zmodyfikowanego DNA i jest konsekwencją daleko zasięgowego transferu elektronu pomiędzy wzbudzoną brdC a odległą guaniną. Zidentyfikowano również struktury innych produktów fotodegradacji - wewnątrzniczowych dimerów pirymidynowych, w których zasady nukleinowe (C⁺C oraz G⁺C) połączone są wiązaniem kowalencyjnym (sieciowanie wewnątrzniczowe).

Literatura:

- [1] Rak et al, *The Journal of Physical Chemistry B*, 119, 8227-8238, 2015.
- [2] Chomicz et al, *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 4, 2853-2857, 2013.
- [3] Zdrowowicz et al, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17, 16907-16916, 2015.

**Katedra Chemii Ogólnej
i Nieorganicznej
Wydział Chemii UG**

BADANIA FIZYKOCHEMIZNE ZWIĄZKÓW KOORDYNACYJNYCH WYBRANYCH METALI PRZJŚCIOWYCH JAKO POTENCJALNYCH MIMETYKÓW DYSMUTAZY PONADTLENKOWEJ

mgr Joanna Drzeżdżon, IV rok

Promotor: Prof. UG, dr hab. Dagmara Jacewicz

Promotor pomocniczy : dr Dariusz Wyrzykowski

Nadmiar reaktywnych form tlenu prowadzi do powstania stresu oksydacyjnego. Anionorodnik ponadtlenkowy może być usuwany z organizmu poprzez reakcję dysproporcjonowania do nadtlenu wodoru i tlenu cząsteczkowego. Reakcja ta może zachodzić spontanicznie lub być katalizowana przez dysmutazę ponadtlenkową [1-3]. Czynniki usuwającymi nadmiar wolnych rodników są antyoksydanty. Dzieli się je na antyoksydanty enzymatyczne, nieenzymatyczne oraz antyoksydanty sztuczne (zsyntetyzowane przez chemików np. butylohydroksytoluen). Zastosowanie syntetycznych antyoksydantów może pomóc w leczeniu licznych chorób neurodegeneracyjnych i cywilizacyjnych.

Celem pracy była synteza, charakterystyka fizykochemiczna i biomedyczna związków kompleksowych wybranych kationów metali przejściowych takich jak Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} oraz jonu VO^{2+} z ligandami polikarboksylanowymi oraz wybranymi ligandami aromatycznych zasad azotowych. Małocząsteczkowe związki kompleksowe tego typu mogą pełnić rolę mimetyków dysmutazy ponadtlenkowej, których zadaniem jest redukcja anionorodnika ponadtlenkowego stanowiącego najczęstszy czynnik ryzyka stresu oksydacyjnego. Tego typu małocząsteczkowe związki kompleksowe zostały przebadane pod kątem właściwości antyoksydacyjnych metodami fizykochemicznymi i biomedycznymi (na komórkach fibroblastów). Badania dotyczące zachowania związków kompleksowych w roztworze wodnym były prowadzone z zastosowaniem miareczkowań potencjometrycznych, a także za pomocą metody stopped-flow. Aktywność przeciwutleniająca zsyntetyzowanych związków kompleksowych została zbadana wobec anionorodnika ponadtlenkowego testem z użyciem błękitu nitrotetrazoliowego oraz techniką woltamperometrii cyklicznej. Dodatkowo właściwości antyoksydacyjne związków kompleksowych wobec dwóch typów rodników organicznych zbadano testami na DPPH (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl) i ABTS (kwas 2,2-azynobis-3-etylobenzotiazolin-6-sulfonowy). Określone zostały zależności między strukturą otrzymanych związków koordynacyjnych a ich właściwościami biomedycznymi.

Literatura:

- [1] F. Johnson, C. Giulivi, *Mol. Aspects. Med.*, 26, 4, 2005.
- [2] T.M. Buetler, A. Krauskopf, U.T. Ruegg, *News Physiol. Sci.*, 19, 3, 2004.
- [3] I.N. Zelko, T.J. Mariani, R.J. Foltz, *Free Radic. Biol. Med.*, 33, 3, 2002.

Praca finansowana w ramach projektu PRELUDIUM nr 2015/19/N/ST5/00276 : „Związki kompleksowe metali przejściowych jako nowe antyoksydanty - synteza, charakterystyka fizykochemiczna i biomedyczna”

WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE ORAZ KOMPLEKSOTWÓRCZE WITAMINY B₆ WZGLĘDEM JONÓW METALI (II) BLOKU *d*. APLIKACYJNOŚĆ UZYSKANYCH ZWIĄZKÓW KOORDYNACYJNYCH W ŻYCIU CODZIENNYM

mgr Małgorzata Ogryzek, III rok

Promotor: dr hab. Mariusz Makowski, prof. UG,

Promotor pomocniczy: dr Agnieszka Chylewska

Badania aktywności mikrobiologicznej z udziałem kompleksów metali wymagają spełniania przez nie głównie 4 warunków strukturalnych wpływających na ich kolejną aktywność: (1) obecność ligandów bidentnych w kompleksie powoduje większą aktywność mikrobiologiczną związków w stosunku do kompleksów z ligandami monodentnymi (efekt chelatowy); (2) charakter ligandów (pożądane są ligandy posiadające dokumentowaną aktywność); (3) ładunek kompleksu (efektywność przeciwdrobnoustrojowa wzrasta w szeregu kationowy > obojętny > anionowy); (4) charakter przeciwjonu w przypadku kompleksów jonowych (preferowane chlorki lub chlorany(VII)) [1]. Niska masa molowa oraz przeważnie dobra rozpuszczalność w większości środowisk stwarza możliwość ich przenikania przez błony biologiczne na drodze dyfuzji pasywnej. Osiągnięcia chemii koordynacyjnej w projektowaniu nowych związków o potencjalnym działaniu farmakologicznym stanowią istotny wkład w rozwój coraz bardziej skutecznych metod walki z drobnoustrojami.

Celem pracy doktorskiej jest opracowanie prostej i powtarzalnej metody syntezy nowych połączeń koordynacyjnych wybranych jonów metali z izomerami witaminy B₆ (pirydoksamina, pirydoksyna oraz pirydoksaem). W wyniku pracy preparatywnej uzyskano jednordzeniowe kompleksy Ni(II) oraz Cu(II) o stechiometrii metal:ligand równej 1:2, w których bliska sfera koordynacyjna stanowi analogię do obecnie stosowanych metalofarmaceutyków [2]. Realizacja prezentowanych badań opierała się na określeniu wpływu centrum koordynacji na stabilność termiczną, właściwości spektroskopowe, kwasowo-zasadowe oraz elektrochemiczne wybranych do badań ligandów chelatowych [2,3]. Kolejny etap pracy doktorskiej obejmował badania właściwości kompleksotwórczych izomerów witaminy B₆ w roztworze wodnym. Uzyskane wyniki pozwoliły na wyznaczenie stechiometrii oraz wartości stopniowych i skumulowanych stałych trwałości kompleksów Ni(II) oraz Cu(II) tworzących się podczas zlewania roztworów [2,4]. Analiza otrzymanych danych pozwoliła określić kierunek zmian struktury, właściwości fizykochemicznych (w roztworach wodnych i niewodnych) oraz aktywności biologicznej, które wynikają z modyfikacji podstawnika w pozycji 4 pierścienia pirydyny oraz na określenie warunków testów mikrobiologicznych.

Literatura:

- [1] M. Rizzotto, „A Search for Antibacterial Agents”, Dr. Varaprasad Bobbarala (Ed.), ISBN: 978-953-51-0724-8, InTech, DOI: 10.5772/45651, 73 (2012).
- [2] A. Chylewska, M. Ogryzek, R. Hałasa, A. Dąbrowska, L. Chmurzyński, M. Makowski, , *J. Coord. Chem.* 17, 2885, 2014.
- [3] M. Ogryzek, A. Chylewska, P. H. Marek, I. D. Madura, L. Chmurzyński, M. Makowski, *Dyes Pigments*, 2016 (w recenzji)
- [4] A. Chylewska, M. Ogryzek, L. Chmurzyński, M. Makowski, *J. Coord. Chem.* 68, 3761, 2015.

Katedra Chemii Organicznej

Wydział Chemii UG

PROJEKTOWANIE I SYNTEZA INHIBITORÓW PACE4 JAKO POTENCJALNYCH ZWIĄZKÓW PRZECIWNOWOTWOROWYCH

mgr inż. Teresa Łeppek, IV rok

Promotor: prof. dr hab. Adam Prahl

Promotor pomocniczy: dr Anna Kwiatkowska

Peptydy znajdują coraz większe zastosowanie jako leki ze względu na ich wysoką aktywność biologiczną, specyficzność oraz niską toksyczność. Co więcej, synteza tych związków jest stosunkowo prosta i dobrze scharakteryzowana. Jednakże peptydy jako potencjalne środki terapeutyczne wykazują słabą stabilność *in vivo*, która powoduje iż mają one krótki okres półtrwania oraz niewystarczającą biodostępność [1].

Enzym PACE4 należy do rodziny konwertaz probiałkowych, które odgrywają kluczową rolę w wielu procesach fizjologicznych. Odpowiadają one zarówno za prawidłowe funkcjonowanie komórek, jak i za inicjowanie wielu stanów patofizjologicznych, takich jak choroby nowotworowe czy infekcje bakteryjne i wirusowe. Grupa badawcza profesora Roberta Day z Uniwersytetu w Sherbrooke (Kanada) wykazała, że PACE4 jest odpowiedzialny za progresję i proliferację raka prostaty, co spowodowało, iż stał się on atrakcyjnym celem w rozwoju nowych strategii terapeutycznych. Kolejnym krokiem badań realizowanym w tym zespole było zaprojektowanie związku blokującego aktywność tego enzymu, co doprowadziło do otrzymania aktywnego i selektywnego inhibitora PACE4, znanego jako peptyd Multi-Leu (ML), o następującej sekwencji aminokwasowej: Ac-LLLLRVKR-NH₂ [2]. Profil farmakologiczny tego związku został znacząco poprawiony poprzez wstawienie nienaturalnej reszty aminokwasowej (D-Leu) oraz mimetyka argininy (4-amidynobenzylaminy, Amba), odpowiednio na jego N- oraz C-końcu. Modyfikacje te spowodowały znaczący wzrost stabilności uzyskanych analogów w plazmie poprzez zahamowanie aktywności aminoi karboksypeptydaz. Jednakże, aby zwiększyć potencjał terapeutyczny uzyskanego związku wiodącego (Ac-[D-Leu]LLLVRK[Amba]) niezbędne jest wprowadzenie dodatkowych modyfikacji chroniących wiązanie peptydowe pomiędzy resztami: leucyny i argininy (w pozycjach P4 oraz P5 peptydu ML), które jest podatne na hydrolizę przez endopeptydazy [3].

Celem przeprowadzonych badań, realizowanych we współpracy z grupą badawczą Profesora Roberta Day, była poprawa właściwości peptydu Multi-Leu, zwłaszcza polepszenie jego profilu stabilności w plazmie oraz aktywności względem enzymu PACE4. W pierwszym podejściu zaprojektowałam i zsyntezowałam analogi związku wyjściowego zawierające mimetyki reszty argininy (pozycja P4) oraz reszty leucyny (pozycja P5). Drugą zastosowaną strategią była cyklizacja peptydu ML pomiędzy jego C-końcem oraz aminową grupą łańcucha bocznego reszty lizyny wstawioną kolejno w pozycje: P5, P6, P7 oraz P8. Następnie przeprowadziłam makrocyklizację związku typu „głowa-ogon” oraz wprowadziłam do cząsteczki mostek disulfidowy, utworzony przez resztę cysteiny (umieszczoną w pozycji P3 lub P5) oraz resztę kwasu 3-merkaptopropanowego wstawioną w pozycję P8. Aktywność biologiczna wszystkich uzyskanych analogów została określona poprzez wyznaczenie stałych hamowania aktywności enzymatycznej (K_i) względem PACE4 i furyny oraz w testach antyproliferacyjnych (IC₅₀) na liniach komórkowych nowotworu prostaty (DU145, LNCaP).

Literatura:

- [1] D.J.Craik et al., *Chem Biol Drug Des*, 81, 136-147, 2013.
- [2] C. Levesque et al., *J Med Chem*, 53, 10501-11, 2012.
- [3] A. Kwiatkowska et al. *J Med Chem*, 57, 98-109, 2014 oraz *ChemMedChem*, 11, 289-301, 2016

**Katedra Chemii i Radiochemii
Środowiska
Wydział Chemii UG**

PIERWIASTKI NAGROMADZONE W WYBRANYCH GATUNKACH BOROWIKÓW I WNOSZĄCE RYZYKO DLA ZDROWIA: STATUS I OCENA

mgr Sviatlana Pankavec, IV rok

Promotor/Opiekun naukowy: prof. dr hab. Jerzy Falandysz

Określono zawartość i zbadano współzależności w występowaniu metali ziem rzadkich (Sc, Y, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb i Lu) oraz innych pierwiastków metalicznych i metaloidów (Ag, As, Ba, Be, Bi, Cd, Co, Cs, Cu, Ga, Ge, Hf, Hg, In, Li, Mo, Nb, Ni, Pb, Rb, Sb, Sn, Sr, Ta, Th, Ti, Tl, U, V, W, Zn i Zr) w owocnikach borowika szlachetnego *Boletus edulis* Bull. pozyskanych z trzynastu odlegle położonych od siebie miejsc w kraju. Wysuszony i sproszkowany materiał grzybowy w ilości około 200 mg (kapelusze, trzony i całe owocniki – próbki zbiorcze) mieszano z 3 ml ultra czystego roztworu stężonego kwasu azotowego (65 %) i 1 ml ultra czystego roztworu kwasu fluorowodorowego (48%) w zamykanych naczyniach z politetrafluoroetylenem (PTFE). Naczynia plastikowe wkładano do płaszczy ze stali nierdzewnej - dociskanych ściśle śrubą - a całość umieszczano w nagrzewanej elektrycznie komorze w temperaturze 150 °C, i tak przetrzymywano przez 78 godzin.

Otrzymane roztwory - w celu usunięcia nadmiaru kwasu fluorowodorowego - - odparowywano do sucha w temperaturze 110 °C. Otrzymaną pozostałość rozpuszczano z około 1 ml roztworu stężonego kwasu azotowego i przenoszono ilościowo do naczynia miarowego a zawartość uzupełniano wodą zdemineralizowaną do objętości 50 ml. Przed analizą instrumentalną techniką spektrometrii mas (Quadruple ICM-MS; Finnigan MAT ELEMENT) do analizowanych roztworów materiałów grzybowych, materiałów odniesienia i prób ślepych dozowano wzorzec wewnętrzny - roztwór rodu (Rh) w ilości 10-20 mikrogramów na litr. ^[1] Równolegle z materiałami grzybowymi analizowano materiały odniesienia o znanej zawartości składników mineralnych – liście cytryny (GBW 10020) i glebę (GBW 07405) – wyprodukowane przez *Institute of Geophysical and Geochemical Exploration* w Chinach oraz próby ślepe. Współzależności ilościowe pomiędzy składnikami mineralnymi nagromadzonymi w owocnikach przez borowika szlachetnego zbadano metodą głównych składowych.

Wyniki badań wskazały na znaczną zmienność w składzie owocników borowika szlachetnego pozyskiwanych z różnych obszarów leśnych na terenie kraju, a w tym takich pierwiastków jak Ba, Bi, Ce, Co, Dy, Eu, Er, Gd, Hf, Ho, La, Li, Lu, Nb, Nd, Pr, Sm, Sr, Tb, Th, Tm, Y, Yb, Zr - wartość współczynnika zmienności wyniosła ponad 100 %. Zawartość Sc, Sr, W i U cechowała nieco mniejsza zmienność a najmniejsza (współczynnik zmienności poniżej 20 %) dotyczyła As, Cu, Ge, Hg, Ni, V, Zn.

Literatura:

[1] Liang Q, Grégoire DC. Determination of trace elements in twenty six Chinese geochemistry reference materials by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Geostandards Newsletter*, 2000, 24, 51-63.

ZAWARTOŚĆ NATURALNYCH PIERWIASTKÓW PROMIENIOTWÓRCZYCH W JADALNYCH GRZYBACH WIELKOOWOCNIKOWYCH ZEBRANYCH Z TERENÓW POLSKI PÓŁNOCNEJ

mgr Karolina Szymańska, IV rok

Promotor/Opiekun naukowy: dr hab. Dagmara Strumińska-Parulska

Grzyby i mikroorganizmy symbiotyczne mogą przyczynić się w znacznym stopniu do długotrwałej retencji radionuklidów w warstwach organicznych gleby leśnej, która z kolei stanowi podstawowe miejsce ich deponowania. W wyniku tego procesu, są one łatwo dostępne dla owocników i grzybni, co może być źródłem znacznie wyższego transferu niektórych radionuklidów w ekosystemie leśnym. Spośród analizowanych jadalnych grzybów borowikowatych najwyższe stężenia ^{210}Po i ^{210}Pb zaobserwowano w koźlarzu grabowym (*L. pseudoscabrum*), odpowiednio $0,71\text{--}10,98\text{ mBq}\cdot\text{g}^{-1}$ suchej masy i $0,50\text{--}4,92\text{ mBq}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m. Nieco niższe wartości stężeń ^{210}Po i ^{210}Pb zaobserwowano w próbkach koźlarza czerwonego (*L. aurantiacum*) i koźlarza topolowego (*L. duriusculum*), odpowiednio $0,68\text{--}6,21\text{ mBq}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m. dla ^{210}Po i $0,31\text{--}2,31\text{ mBq}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m. dla ^{210}Pb oraz $0,59\text{--}3,16\text{ mBq}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m. dla ^{210}Po i $0,53\text{--}2,52\text{ mBq}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m. dla ^{210}Pb . Najniższe wartości stężeń aktywności ^{210}Po i ^{210}Pb zmierzono dla koźlarza dębowego (*L. quercinum*) i koźlarza sosnowego (*L. vulpinum*), odpowiednio $0,74\text{--}1,95\text{ mBq}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m. dla ^{210}Po i $0,34\text{--}1,58\text{ mBq}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m. dla ^{210}Pb oraz $1,21\text{--}2,75\text{ mBq}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m. dla ^{210}Po i $0,90\text{--}1,92\text{ mBq}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m. dla ^{210}Pb . Zróżnicowanie w poziomach aktywności ^{210}Po i ^{210}Pb w analizowanych grzybach to wynik ich wzrostu na odmiennych typach gleb oraz dysproporcji w suchym opadzie atmosferycznym. W większości analizowanych próbek, większe stężenia ^{210}Po zaobserwowano w kapeluszach, mniejsze zaś w trzonach; tendencja ta była odmienna w przypadku aktywności ^{210}Pb .

Aktywność ^{210}Po w podłożu glebowym analizowanych grzybów mieściła się w przedziale od $1,42$ do $100,03\text{ mBq}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m. natomiast ^{210}Pb od $1,2$ do $65,52\text{ mBq}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m.

Analiza współczynników nagromadzenia (BCF) i transferu (TF) wykazała, że im wyższy współczynnik nagromadzenia (BCF) tym niższy współczynnik transferu (TF). Zależność ta była najbardziej wyraźna w przypadku owocników koźlarza grabowego, średnie wartości TF dla ^{210}Po i ^{210}Pb były najwyższe (odpowiednio $10,76$ i $7,32$), podczas gdy średnie wartości BCF były najniższe spośród analizowanych grzybów (odpowiednio $0,11$ i $0,01$). Wartość stosunku aktywności $^{210}\text{Po}/^{210}\text{Pb}$ w analizowanych grzybach zawierała się w zakresie od $0,63$ do $7,90$, jednakże w większości badanych próbek była wyższa niż 1 co oznacza iż, owocniki nagromadziły większą ilość polonu ^{210}Po niż ołowiu ^{210}Pb .

Katedra Technologii Środowiska

Wydział Chemii UG

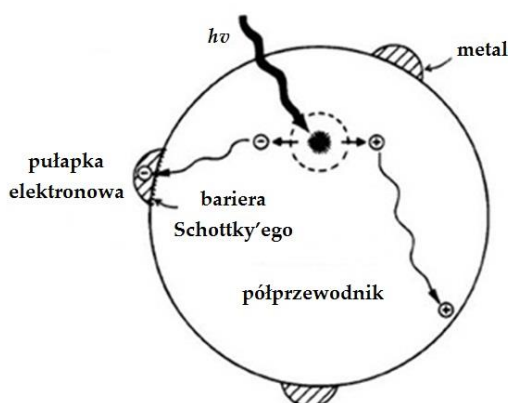
FUNKCJONALNE MATERIAŁY PÓŁPRZEWODNIKOWE: CHARAKTERYSTYKA I ZASTOSOWANIE

mgr inż. Magdalena Diak, IV rok

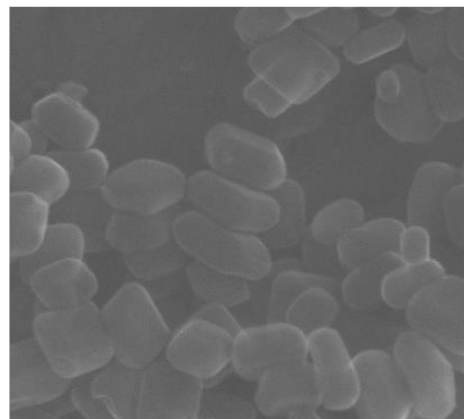
Promotor/Opiekun naukowy: prof. dr hab. inż. Adriana Zaleska-Medynska

Promotor pomocniczy: dr inż. Ewelina Grabowska

Nanocząstki metali z uwagi na zdolność absorpcji promieniowania widzialnego, która jest efektem istnienia powierzchniowego plazmonu, mogą być wykorzystywane do aktywowania TiO_2 promieniowaniem słonecznym [1,2]. Głównym celem pracy było otrzymanie nowych fotokatalizatorów półprzewodnikowych, wykazujących wysoką aktywność fotokatalityczną w procesie degradacji zanieczyszczeń w fazie wodnej. W pierwszym etapie pracy otrzymano TiO_2 o strukturze dekaedrów oraz płytek z wyeksponowanymi płaszczyznami $\{001\}$ i $\{101\}$ a następnie przeprowadzono proces modyfikacji powierzchniowej otrzymanych mikrostruktur nanocząstkami metali szlachetnych [3]. Opracowano metodę otrzymywania fotokatalizatorów typu Rh-TiO_2 oraz Ru-TiO_2 . Dodatkowym celem badań było wyjaśnienie mechanizmu fotokatalitycznej ścieżki degradacji w obecności czystego i modyfikowanego TiO_2 (wodny roztwór fenolu 1- ^{13}C) [4].



Rys. 1 Mechanizm fotokatalitycznej degradacji zanieczyszczeń przy udziale M-TiO_2 [2]



Rys. 2 Zdjęcie TEM otrzymanych dekaedrów TiO_2

Literatura:

- [1] Z. Zheng et al., *J Mater Chem*, 21, 9079-9087, 2011.
- [2] Rodriguez-Lopez, J. L.; Montejano-Carrizales, J. M. and Jose-Yacamán, M., *Appl. Surf. Sci.* 219, 56-63, 2003.
- [3] Diak, M., Grabowska, E., & Zaleska, A., *Appl. Surf. Sci.*, 347, 275-285, 2015.
- [4] Diak, M., Klein, M., Klimczuk, T., Lisowski, W., Remita, H., Zaleska-Medynska, A., & Grabowska, E., *Appl. Catal., B*, doi:10.1016/j.apcatb.2016.06.067, (2016).

Praca finansowana ze środków NCN w ramach projektu SONATA 2 nr UMO-2011/03/D/ST5/05284: „Badanie mechanizmu degradacji zanieczyszczeń na modyfikowanych płaszczyznach $\{101\}$ i $\{001\}$ TiO_2 ”.

KOMPOZYTY PÓLPRAZEWODNIKOWE: METODY OTRZYMYWANIA, CHARAKTERYSTYKA I FOTOAKTYWNOŚĆ

mgr inż. Martyna Marchelek, IV rok

Promotor/Opiekun naukowy: prof. dr hab. inż. Adriana Zaleska-Medynska

Promotor pomocniczy: dr inż. Ewelina Grabowska

W dobie poszukiwań alternatywnych dróg oczyszczania wody i ścieków jeden z głównych celów stanowi poszukiwanie fotokatalizatorów aktywnych pod wpływem światła z zakresu widzialnego (ok. 43% promieniowania docierającego do powierzchni ziemi). Ciesząc się coraz większym zainteresowaniem trójwymiarowe struktury trzeciej generacji, ze względu na swoją rozbudowaną powierzchnię właściwą oraz większą ilość miejsc aktywnych stanowią nadzieję na uzyskanie tanich i wysoce wydajnych fotokatalizatorów, aktywnych pod wpływem światła słonecznego [1,2]. Zastosowanie modyfikacji powierzchniowej i tworzenie kompozytów półprzewodnikowych pozwala na zwiększenie efektywności i selektywności fotodegradacji poprzez zminimalizowanie procesu rekombinacji powstających par elektron-dziura [3,4].

Głównym celem przeprowadzonych dotychczas badań było opracowanie metody otrzymywania kompozytów półprzewodnikowych o zróżnicowanych strukturach. Badano wpływ parametrów prowadzenia syntez hydrotermalnych (czasu reakcji, temperatury oraz ciśnienia) na kształt otrzymanych cząstek. Ponadto zbadano również właściwości fizykochemiczne otrzymanych fotokatalizatorów (UV-Vis, BET, SEM, TEM, XRD, XPS, spektroskopia IR, spektroskopia Ramana). Otrzymane proszki poddawano modyfikacji powierzchniowej nanocząstkami metali szlachetnych (Au, Ag, Pt, Pd, Rh, Ru) w procesie fotodepozycji oraz radiolizy. Aktywność fotokatalityczna była badana w modelowej reakcji degradacji fenolu w fazie wodnej, a także w procesie degradacji toluenu w fazie gazowej w zakresie światła Vis oraz UV-Vis. fazy gazowej. Dodatkowym celem badań było wyjaśnienie mechanizmu ścieżki degradacji materiałów o najwyższej aktywności fotokatalitycznej.

Literatura:

- [1] R. Wang, X. Cai, F. Shen, *Ceramics International* 39 (2013) 9465-9470.
- [2] E. Grabowska, M. Diak, M. Marchelek, A. Zaleska, *Applied Catalysis B: Environmental* 156 (2014) 213-235.
- [3] A. Emeline, V. Kuznetsov, V. Ryabchuk, N. Serpone, *Environmental Science and Pollution Research* 19 (2012) 3666-3675.
- [4] N. Serpone, A. Emeline, *The Journal of Physical Chemistry Letters* 3 (2012) 673-677.

**Katedra Biotechnologii Molekularnej
i Mikrobiologii**
Wydział Chemiczny PG

ZASTOSOWANIE NARZĘDZI BIOLOGII MOLEKULARNEJ W DIAGNOSTYCE DERMATOFITÓZ

mgr inż. Natalia Kobylak, IV rok

Promotor: dr hab. inż. Anna Brillowska-Dąbrowska

Zakażenia grzybicze są coraz większym problemem na całym świecie. Dotyczy to głównie grzybic powierzchniowych skóry, które są wywoływane przez grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Candida* oraz dermatofity. Dermatofity wykazują rzadką zdolność do asymilacji keratyny, co ma zasadnicze znaczenie w patomechanizmie zakażeń. Należą one do trzech rodzajów: *Epidermophyton*, *Microsporum* i *Trichophyton*. Dermatofitozy wymagają długoterminowej terapii z użyciem leków przeciwgrzybiczych, a ich diagnostyka konwencjonalnymi metodami jest czasochłonna oraz niezwykle trudna ze względu na podobieństwo między gatunkami. Dlatego też niezwykle istotne jest wprowadzenie metod molekularnych, które umożliwią identyfikację gatunkową w jak najszybszym czasie i przy jak najmniejszym koszcie.

Celem mojej pracy badawczej jest zaprojektowanie układu real-time PCR, który w pierwszym etapie będzie wykrywał wszystkie dermatofity i różnicował rodzajowo, a w kolejnym etapie zapewniał identyfikację gatunkową. Układy takie w przyszłości umożliwią wykrywanie i szybką identyfikację dermatofitów z próbek otrzymanych bezpośrednio od pacjentów.

W mojej pracy badawczej sprawdziłam możliwość zastosowania starterów wykrywających DNA dermatofitów z zastosowaniem metody real-time PCR oraz zoptymalizowałam warunki reakcji w sposób umożliwiający wstępne odróżnienie DNA grzybów należących do rodzaju *Microsporum* od DNA grzybów należących do rodzaju *Trichophyton* i *Epidermophyton*. Ponadto, opracowałam warunki reakcji umożliwiające wykrywanie DNA *T. rubrum* w reakcji real-time PCR.

W ostatnim roku mojej pracy badawczej opracowałam również układ, który umożliwia identyfikację gatunku *Epidermophyton floccosum* w reakcji real-time. W kolejnym etapie mojej pracy podjęłam się stworzenia układu umożliwiającego identyfikację niezwykle istotnych z klinicznego aspektu gatunków należących do kompleksu *Arthroderma otae*. Zaprojektowałam startery oraz zoptymalizowałam reakcje, które umożliwiły identyfikację zoofilnego gatunku *Microsporum canis* oraz antropofilnych gatunków *Microsporum audouinii*/*Microsporum ferrugineum* zarówno w klasycznej reakcji PCR jak również w real-time PCR.

**BAKTERYJNY I DROŹDŹOWY SYSTEM EKSPRESYJNY DO
PRODUKCJI AKTYWNEJ W NISKIEJ TEMPERATURZE ESTERAZY
Z *PSEUDOMONAS* SP. S9.**

**NOWOCZESNY SYSTEM EKSPRESYJNY DO PRODUKCJI BIAŁEK
REKOMBINANTOWYCH OPARTY O KOMÓRKI
PSYCHROTOLERANCYJNYCH DROŹDŹY-TRANSFORMACJA**

mgr inż. Monika Wicka-Grochocka, IV rok

Promotor: dr hab. inż. Hubert Cieśliński

Promotor pomocniczy: dr inż. Marta Wanarska

Enzymy lipolityczne ze względu na swoje unikalne właściwości takie jak stereo-, chemo- i regiospecyficzność znajdują szereg zastosowań w różnych gałęziach przemysłu. Lipazy i esterazy wykorzystywane są w przemyśle chemicznym (głównie jako dodatki do środków piorących i czyszczących), farmaceutycznym, spożywczym oraz w syntezie organicznej. W ostatnich dziesięciu latach coraz częściej w tym celu wykorzystuje się enzymy o wysokiej aktywności w zakresie niskich temperatur tj. w zakresie od 5 do 15 °C. Prowadzenie reakcji enzymatycznej w niskiej temperaturze, umożliwia syntezę wielu związków labilnych termicznie, obniża koszty produkcji i minimalizuje możliwość zanieczyszczenia produktu mezofilnymi mikroorganizmami chorobotwórczymi.

W ramach Studium Doktoranckiego zidentyfikowałam i scharakteryzowałam aktywną w niskiej temperaturze esterazę z *Pseudomonas* sp. S9. Esteraza ta jest przykładem białka dwudomenowego składającego się z domeny katalitycznej i domeny kotwiczącej białko w błonie komórkowej. W trakcie trwania czwartego roku Studium Doktoranckiego badałam wpływ usunięcia domeny autotransportera na aktywność białka czego wynikiem jest publikacja w czasopiśmie *Acta Biochemica Polonica*. Białko to produkowane było w systemie *E. coli* w postaci nieaktywnej tj. w ciałkach inkluzyjnych i wymagało renaturacji. System ekspresyjny *E. coli* nie sprawdził się w pełni do produkcji esterazy z *Pseudomonas* sp. S9. W dalszym toku badań prowadzonych na czwartym roku postanowiłam przetestować ekspresyjny układ drożdżowy oparty o mezofilne komórki *Pichia pastoris* pod kątem jego przydatności do otrzymania aktywnej formy esterazy z *Pseudomonas* sp. S9 z płynu pohodowlanego. Badania obejmowały konstrukcję wektorów ekspresyjnych, transformację komórek drożdży skonstruowanymi wektorami oraz podjęte próby produkcji czterech wariantów sekwencyjnych esterazy tj. a) SygEstAuto b) SygEst, c) αEstAuto i d) αEst.

Ponadto, w trakcie trwania czwartego roku studiów kontynuowałam swój udział w projekcie, którego celu jest skonstruowanie nowego systemu ekspresyjnego opartego o psychrotolerancyjne komórki drożdży. Układ ten jest dedykowany heterologicznej produkcji enzymów aktywnych w niskiej temperaturze. Stąd, układ ten ma być docelowym układem również dla produkcji badanej esterazy. W tym czasie, mój udział w tym projekcie objął badania nad transformacją wybranego szczepu drożdży skonstruowanymi wcześniej przeze mnie wektorami ekspresyjnymi.

Praca finansowana ze środków NCBiR w ramach projektu PBS1/A9/7/2012 „Nowa, zintegrowana platforma produkcji i oczyszczania białek rekombinantowych w oparciu o komórki drożdżowe”.

KONSTRUKCJA REKOMBINANTOWYCH DROŹDŹY *DEBARYOMYCES MACQUARIENSIS* D50

mgr inż. Ewelina Krajewska, IV rok

Promotor: prof. dr hab. Józef Kur

Promotor pomocniczy: dr inż. Marta Wanarska

Wzrost zapotrzebowania na białka wykazujące aktywność w niskiej temperaturze pociąga za sobą konieczność opracowywania technologii umożliwiających ich wydajną produkcję i oczyszczanie. Pomimo faktu, iż do obecnej chwili opracowano wiele układów ekspresyjnych umożliwiających ekspresję heterologicznych genów, są one oparte głównie o komórki mezofilnych lub termotolerancyjnych bakterii i drożdży. W związku z wysoką termolabilnością białek aktywnych w niskich temperaturach, systemy te nie są optymalne dla ich wydajnej produkcji z uwagi na to, że temperatura wzrostu tych mikroorganizmów jest równa lub wyższa od 30°C. Układ ekspresji oparty na psychrotolerancyjnym drożdżowym gospodarzu ekspresyjnym jest potencjalnie najlepszym systemem dla wydajnej produkcji enzymów pochodzących z organizmów zimnolubnych. Drożdże łączą zalety prokariotycznych i eukariotycznych systemów ekspresji ponieważ umożliwiają szybki przyrost biomasy oraz sekrecję białek na zewnątrz komórek, dzięki czemu otrzymuje się wstępnie oczyszczony preparat. Ponadto, drożdże jako komórki eukariotyczne są zdolne do przeprowadzania modyfikacji potranslacyjnych, a co za tym idzie pozwalają na otrzymanie prawidłowo sfałdowanych białek.

W ramach pracy nad nową platformą do produkcji białek w psychrotolerancyjnym gospodarzu drożdżowym przeprowadzono transformację komórek wyselekcjonowanego wcześniej gospodarza ekspresyjnego *Debaryomyces macquariensis* D50 serią wektorów ekspresyjnych. Wszystkie skonstruowane wektory zawierały sekwencje umożliwiające rekombinację z genomem wybranego gospodarza drożdżowego. Ponadto, w celu przetestowania funkcjonalności nowego drożdżowego systemu ekspresji, skonstruowano również plazmidy rekombinantowe zawierające geny kodujące β -galaktozydazy aktywne w niskiej temperaturze, umożliwiające produkcję tych białek w drożdżach *Pichia pastoris* oraz *Debaryomyces macquariensis* D50.

Praca finansowana ze środków NCBiR w ramach projektu PBS1/A9/7/2012: „Nowa, zintegrowana platforma produkcji i oczyszczania białek rekombinantowych w oparciu o komórki drożdżowe”.

Katedra Chemii Analitycznej

Wydział Chemiczny PG

NOWE METODYKI ANALITYCZNE Z WYKORZYSTANIEM TECHNIKI MIKROEKSTRAKCJI W UKŁADZIE CIECZ-CIECZ

mgr inż. Paulina Bigus, IV rok

Promotor: prof. dr hab. inż. Jacek Namieśnik

Promotor pomocniczy: dr inż. Marek Tobiszewski

Przygotowanie próbki do analizy jest podstawowym etapem wielu procedur analitycznych, szczególnie tych, w przypadku których nie ma możliwości bezpośredniego oznaczenia zawartości analitów zarówno z powodu zbyt niskiego poziomu stężenia w próbkach, jak i obecności substancji przeszkadzających. Dodatkowo, coraz większa częstotliwość i liczba przeprowadzanych analiz wymuszana przez obowiązujące uregulowania prawne i dyrektywy oraz dążność do zapewnienia rzetelności uzyskiwanych wyników pomiarowych stawiają przed analitykiem niełatwe wyzwanie. Zabiega się, aby nowo opracowane metodyki były zgodne z zasadami zielonej chemii wynikającymi z koncepcji zrównoważonego rozwoju [1].

Badania prowadzone w trakcie poprzednich okresów sprawozdawczych były ukierunkowane na opracowanie nowych metodyk analitycznych opartych na technice mikroekstrakcji w układzie ciecz-ciecz w celu oznaczenia wybranych związków organicznych (związki z grupy WWA, trihalometany, chlorofenole, związki cynoorganiczne) w próbkach ciekłych [2]. Stosowanie technik mikroekstrakcyjnych ma szereg zalet w stosunku do tradycyjnych rozwiązań. Jako najważniejsze można wymienić:

- niewielkie zużycie rozpuszczalników organicznych
- wysoki odzysk analitów
- oraz krótki czas przygotowania próbki.

W ramach realizacji pracy doktorskiej podjęto próbę stosowania lżejszych od wody i/lub mało toksycznych rozpuszczalników organicznych mogących pełnić rolę odczynników ekstrahujących. Ponadto podjęto próbę wytypowania różnych par rozpuszczalników (ekstrahującego i dyspergującego) mogących znaleźć zastosowanie jako zielone mieszaniny rozpuszczalników organicznych w technice DLLME. Otrzymane wyniki posłużyły jako dane wejściowe do analizy przy pomocy algorytmu TOPSIS. Algorytm TOPSIS służy do wspomagania podejmowania złożonych decyzji, w tym przypadku pozwolił na branie pod uwagę uciążliwości środowiskowej rozpuszczalników na równie z parametrami analitycznymi. Zastosowanie techniki TOPSIS jest istotnym elementem nowości naukowej prowadzonych badań optymalizacyjnych [3].

Literatura:

- [1] P. Bigus, S. Tsakovski, V. Simeonov, J. Namieśnik, M. Tobiszewski, *Anal. Bioanal. Chem.*, 408, 3833, 2016.
- [2] M. Tobiszewski, P. Bigus, J. Namieśnik, *Anal. Methods* 6, 6678, 2014.
- [3] P. Bigus, J. Namieśnik, M. Tobiszewski, *J. Chromatogr. A* 1446, 21, 2016.

Praca finansowana ze środków NCN w ramach projektu IUVENTUS PLUS nr IP2014 048173: „Zastosowanie techniki mikroekstrakcji w układzie ciecz-ciecz w celu oznaczenia chlorofenoli w próbkach ciekłych”.

PORÓWNANIE LIPIDOWYCH ODCISKÓW PALCA SZCZEPÓW GRONKOWCA ZŁOCISTEGO Z WYKORZYSTANIEM TECHNIKI WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ SPRZĘŻONEJ ZE SPEKTROMETRIĄ MAS I ZAAWANSOWANYCH TECHNIK CHEMOMETRYCZNYCH

mgr inż. Weronika Hewelt-Belka, IV rok

Promotor: prof. dr hab. inż. Agata Kot-Wasik

Pojawienie się nowych rozwiązań w zakresie instrumentacji oraz metodyk analitycznych, szczególnie dotyczących wysokosprawnej chromatografii cieczonej sprzężonej ze spektrometrią mas umożliwiło dynamiczny rozwój nauk –omicznych, w tym lipidomiki. Dostępne narzędzia analityczne w połączeniu z technikami chemometrycznymi i statystycznymi umożliwiają przeprowadzenie analiz próbek biologicznych i wyodrębnienie informacji na temat powiązania składu chemicznego ze stanem fizjologicznym komórki bądź organizmu. W tym kontekście możliwe stało się również przeprowadzenie porównawczych analiz lipidomicznych ekstraktów lipidów komórek mikroorganizmów charakteryzujących się zróżnicowanym fenotypem, także w odniesieniu do zagadnienia oporności i wrażliwości na antybiotyki. Wskazanie zmian lipidomicznych pomiędzy szczepami wrażliwymi i opornymi na antybiotyki może być pomocne w zrozumieniu mechanizmu oporności mikroorganizmów na różnej klasy antybiotyki.

W rozprawie doktorskiej wykorzystano techniki wysokosprawnej chromatografii cieczonej sprzężonej z wysokorozdzielczą spektrometrią mas (LC-Q-TOF-MS) do analizy lipidomicznej ekstraktów z komórek szczepów gronkowca złocistego. Niecelowaną lipidomikę zastosowano w celu określenia różnic fenotypowych pomiędzy szczepami gronkowca złocistego, w kontekście występowania zjawiska antybiotykooporności i stosowania alternatywnych metod leczenia infekcji wywoływanych przez tą bakterię (terapia fotodynamiczna) [1-3].

W minionym roku akademickim przeprowadzono porównawczą analizę lipidomiczną dwóch szczepów *S. aureus* różniących się obecnością lub brakiem znanych genów, niepowiązanych bezpośrednio z metabolizmem lipidów. Ponadto przygotowano manuskrypt rozprawy doktorskiej, który obecnie jest w trakcie recenzji.

Literatura:

- [1] W. Hewelt-Belka, J. Nakonieczna, M. Belka, T. Bączek, J. Namieśnik, A. Kot-Wasik, *J Chrom A*, 1362, 62, 2014.
- [2] W. Hewelt-Belka, J. Nakonieczna, M. Belka, T. Bączek, J. Namieśnik, A. Kot-Wasik, *J Proteome Res*, 15, 3, 2016.
- [3] J. Nakonieczna, M. Kossakowska-Zwierucho, M. Filipiak, W. Hewelt-Belka, M. Grinholc, K. P. Bielawski, *Appl Microbiol Biotechnol*, 100, 3, 2016.

Praca finansowana ze środków NCN w ramach projektu PRELUDIUM 7nr 2014/13/N/ST4/0389: „Porównanie lipidowych odcisków palca szczepów gronkowca złocistego z wykorzystaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczonej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-Q-TOF-MS) i zaawansowanych technik chemometrycznych.”

OPRACOWANIE NOWYCH NARZĘDZI ANALITYCZNYCH DO OCENY ZAWARTOŚCI ESTRÓW MCPD W PRÓBKACH TŁUSZCZÓW SPOŻYWCZYCH

mgr inż. Renata Jędrkiewicz, IV rok

Promotor: prof. dr hab. inż. Jacek Namieśnik

Promotor pomocniczy dr inż. Justyna Gromadzka

3-monochloropropano-1,2-diol (3-MCPD) oraz jego izomer - 2-monochloropropano-1,3-diol (2-MCPD) zaliczane są do grupy ksenobiotyków, które potencjalnie mogą wykazywać właściwości kancerogenne oraz genotoksyczne. Wzmózione zainteresowanie przedstawicieli świata nauki tymi związkami, które ma miejsce od 2000 r. jest związane ze stwierdzeniem znacznych ilości 3-MCPD i 2-MCPD w formie estrów wyższych kwasów tłuszczowych w olejach i tłuszczach roślinnych oraz produktach spożywczych przetwarzanych w wysokiej temperaturze zawierających znaczące ilości frakcji lipidowej. Na podstawie wyników badań toksykologicznych można stwierdzić, że estry MCPD ulegają reakcji hydrolizy w przewodzie pokarmowym do wolnych chloropropanoli, które wykazują aktywność nefrotoksyczną oraz powodują bezpłodność. W 2014 r. Eksperti Europejskiej Agencji ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) zalecili monitorowanie zawartości estrów MCPD w wyżej wymienionych produktach, natomiast w 2016 r. wydane zostało oświadczenie określające dopuszczalną dzienną dawkę spożycia 3-MCPD na poziomie 1.8 µg na kg masy ciała na dobę. W związku z tym uzasadnione jest opracowanie procedur analitycznych zapewniających możliwość uzyskania miarodajnych informacji o poziomach zawartości tych analitów w badanych próbkach w krótkim czasie i przy niewielkich nakładach finansowych.

Dotychczas opracowane procedury oznaczania estrów MCPD zaliczyć można do dwóch kategorii: procedur pośrednich i bezpośrednich. Tok postępowania analitycznego procedur pośrednich obejmuje hydrolizę estrów do postaci wolnych dioli, derywatyzację grup hydroksylowych oraz oznaczanie ilościowe uzyskanych pochodnych z wykorzystaniem techniki GC-MS. Procedury bezpośrednie natomiast polegają na oznaczaniu poszczególnych estrów (zarówno mono- jak i diestrów) bez poprzedzającego etapu konwersji chemicznej z wykorzystaniem techniki LC-MS bądź SFC-MS.

W ostatnim okresie sprawozdawczym została opracowana nowa procedura oznaczania estrów MCPD w próbkach tłuszczów spożywczych wykorzystująca pośredni tok postępowania analitycznego (hydroliza estrów) oraz jednoczesną ekstrakcję i derywatyzację uwolnionych chloropropanoli. W porównaniu z dotychczas stosowanymi procedurami pośrednimi, nowa metodyka pozwala na uzyskanie informacji o ilości estrów MCPD w danej próbce w znacznie krótszym czasie. Opracowana procedura została zastosowana do oznaczenia poziomu zawartości analitów w próbkach różnego typu produktów spożywczych dostępnych na polskim rynku. Podjęto również próbę opracowania bezpośredniej procedury oznaczania mono- oraz diestrów 3-MCPD oraz 2-MCPD wykorzystującej ditlenek węgla w stanie nadkrytycznym jako medium ekstrakcyjne do izolacji analitów z próbek tłuszczowych oraz fazę ruchomą podczas rozdzielania chromatograficznego.

Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju w ramach projektu LIDER nr 11/171/L-3/11/NCBR/2012 : „Opracowanie nowych procedur analitycznych umożliwiających oznaczanie 3-MCPD i 1,3-DCP w olejach i tłuszczach spożywczych w laboratoriach przemysłowych”.

OPRACOWANIE NOWYCH METODYK OZNACZANIA ZWIĄZKÓW BIOAKTYWNYCH I ZAPACHOWYCH W PRÓBKACH OWOCÓW MIECHUNKI PERUWIAŃSKIEJ (PHYSALIS PERUVIANA) ORAZ INNYCH "SUPEROWOCÓW" JAKO NARZĘDZIA DO OCENY ICH WALORÓW ZDROWOTNYCH I SENSORYCZNYCH

mgr inż. Magdalena Kupska, IV rok

Promotor: prof. dr hab. inż. Jacek Namieśnik

Promotor pomocniczy dr inż. Justyna Gromadzka

Owoce stanowią ważny składnik diety człowieka nie tylko ze względu na ich wartość odżywczą, ale także ze względu na obecność w nich składników prozdrowotnych. Przedmiotem badań były próbki owoców miechunki peruwiańskiej (*Physalis peruviana*) badane pod kątem wykrycia, identyfikacji oraz ilościowego oznaczenia związków charakteryzujących się właściwościami prozdrowotnymi oraz smakowo-zapachowymi. Uzyskane informacje będą stanowiły podstawę do zakwalifikowania tych owoców do grupy superowoców oraz do większego ich rozpowszechnienia.

Przeprowadzono optymalizację warunków oznaczania wybranych związków lotnych w owocach miechunki peruwiańskiej z wykorzystaniem ekstrakcji w rurce w połączeniu z chromatografią gazową i spektrometrią mas na etapie oznaczeń końcowych (ITEX/GC-MS). Zastosowana technika ekstrakcji umożliwia w sposób szybki i łatwy wykonanie analiz na bardzo niskim poziomie stężeń oznaczanych związków. W technice tej adsorpcja analitów następuje w wypełnionej sorbentem mikro pułapce umieszczonej pomiędzy strzykawką a igłą. Analiza polega na kilkukrotnym pobieraniu i wypompowywaniu mieszaniny znajdującej się

w fazie nadpowierzchniowej próbki. Zostały zbadane takie parametry procesu ekstrakcji jak czas i temperatura inkubacji próbki, temperatura desorpcji, objętość pobieranej mieszaniny gazowej z fazy nadpowierzchniowej, szybkość desorpcji, ilość ruchów tłoka strzykawki podczas procesu sorpcji analitów na złożu, szybkość procesu aspiracji/despiracji. Określono granicę wykrywalności i oznaczalności dla wybranych związków, wyznaczono liniowość metody oraz zbadano parametr określający ilość analitów jaka pozostaje na złożu ekstrakcyjnym po procesie w danych warunkach prowadzenia eksperymentu.

Zoptymalizowaną metodę z powodzeniem zastosowano do ilościowego oznaczenia 24 związków stanowiących główny udział we frakcji lotnej owoców miechunki peruwiańskiej, w tym 14 monoterpenów, 4 estry, 4 alkohole, 1 aldehyd, 1 węglowodór. Największą wartość stężenia otrzymano dla 2-metylo-1-butanolu, 1-butanolu, benzaldehydu, geraniolu oraz butanianu etylu (102.8 - 175.2 µg/kg). Uzyskane wyniki wskazują, że technika ekstrakcji w rurce jest dobrą alternatywą do oznaczania lotnych oraz średniolotnych związków w porównaniu do powszechnie stosowanych technik ekstrakcji. Zastosowana technika pozwala na ograniczenie użycia rozpuszczalników organicznych na etapie przygotowania próbek do analizy.

*Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu PRELUDIUM nr UMO-2012/07/N/ST4/00629 : „Opracowanie nowych metodyk oznaczania związków bioaktywnych i zapachowych w próbkach owoców miechunki peruwiańskiej (*Physalis peruviana* L.) oraz innych "superowoców" jako narzędzia do oceny ich walorów zdrowotnych i sensorycznych.”.*

**OPRACOWANIE NOWYCH METODYK ANALITYCZNYCH
UŻYTECZNYCH DO OCENY NALEWEK, LIKIERÓW I OKOWIT
OWOCOWYCH PRZY WYKORZYSTANIU ELEKTRONICZNYCH
ZMYŚŁÓW, TECHNIK CHROMATOGRAFICZNYCH
I SPEKTROSKOPOWYCH ORAZ OCENY SESNORYCZNEJ**

mgr inż. Magdalena Śliwińska, IV rok

Promotor: prof. dr hab. inż. Waldemar Wardencki

Promotor pomocniczy : dr inż. Tomasz Dymerski

W Polsce do najczęściej spożywanych produktów alkoholowych wytwarzanych z owoców należą nalewki, likiery oraz okowity. Nalewka to tradycyjny polski napój spirytusowy wytwarzany w warunkach domowych. Do przygotowania nalewek stosuje się najczęściej następujące składniki: owoce lub zioła, alkohol oraz cukier. W niektórych wypadkach dodawana jest również woda, aby końcowa moc alkoholu produktu wynosiła od 30% do 60% (obj.), zależnie od preferencji konsumentów. Wraz z przystąpieniem Polski do Unii Europejskiej zwiększyła się świadomość promowania regionalnych produktów. W konsekwencji w sklepach wzrosła ilość napojów spirytusowych etykietowanych nazwą *nalewka*. Pomimo tego, nie powstały żadne uregulowania prawne na temat tego rodzaju trunku [1].

W przeciwieństwie do nalewek, likiery i okowity zostały wpisane do rejestru napojów spirytusowych produkowanych w Uni Europejskiej. Według uregulowań prawnych likier to napój spirytusowy wytwarzany w drodze aromatyzowania m.in. alkoholu etylowego, słodzony i z dodatkiem wyrobów pochodzenia rolniczego lub środków spożywczych o minimalnej zawartości alkoholu 15% (obj.) [2]. Natomiast okowity owocowe zostały zdefiniowane w rozporządzeniu Uni Europejskiej jako napoje spirytusowe wytworzone wyłącznie w drodze fermentacji alkoholowej i destylacji mięsistych owoców lub moszczu owoców, jagód lub warzyw o zawartość alkoholu z owoców nie niższej niż 37,5% (obj.) [3]. Istnieje nie wiele doniesień literaturowych na temat badań polskich nalewek, likierów i okowit. W celu poszerzenia stanu wiedzy w tej tematyce, wykonane zostały badania za pomocą różnych narzędzi analitycznych, a mianowicie za pomocą: elektronicznego języka i nosa, dwuwymiarowej chromatografii gazowej, spektroskopii UV-VIS i Ramana, a także analizy sensorycznej.

Celem wykonanych prac badawczych było określenie autentyczności domowych nalewek z wiśni w porównaniu z komercyjnymi likierami, a także okowit ze śliwek ze względu na pochodzenie geograficzne oraz nalewek z jabłek ze względu na pochodzenie botaniczne. Dodatkowo przeprowadzono badania dotyczące oceny jakości kaszubskiej nalewki "*Onisiówka*" oraz dotyczące określenia wpływu warunków produkcji nalewek z wiśni na walory smakowe i zapachowe finalnego produktu.

Literatura:

- [1] M. Śliwińska, P. Wiśniewska, T. Dymerski, W. Wardencki, J. Namieśnik, *Food Anal. Method.* 9, 2670, 2016.
- [2] Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 110/2008 z dnia 15 stycznia 2008 r.
- [3] M. Śliwińska, P. Wiśniewska, T. Dymerski, W. Wardencki, J. Namieśnik, *Flav. Frag. J.* 30, 197, 2015.

OSZACOWANIE RYZYKA ŚRODOWISKOWEGO W WYNIKU DZIAŁANIA MIESZANIN WYBRANYCH ZWIĄZKÓW WYKAZUJĄCYCH AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNĄ

mgr inż. Monika Wieczerek, IV rok

Promotor: prof. dr hab. inż. Jacek Namieśnik

Promotor pomocniczy: dr inż. Błażej Kudlak

Farmaceutyki to związki biologicznie aktywne, które w znacznym stopniu nie podlegają biodegradacji, co może prowadzić do ich akumulacji w środowisku. Trudności przysparza nie tylko określenie poziomów stężeń pozostałości farmaceutyków w poszczególnych elementach środowiska, ale także poznanie losu środowiskowego tych substancji, wszystkich procesów, jakim mogą podlegać oraz interakcji z innymi związkami chemicznymi [1].

Badania przeprowadzone w katedrze Chemii Analitycznej zostały ukierunkowane na wyznaczenie potencjału toksyczności wybranych farmaceutyków, ich mieszanin, wpływu zmiany pH i współobecności jonów na toksyczność tych związków wobec organizmów testowych. Wybrane farmaceutyki są wykorzystywane w leczeniu depresji, zaburzeń hormonalnych, infekcji bakteryjnych oraz mające właściwości przeciwzapalne i regulujące poziom lipidów we krwi (tj. diklofenak (sól sodowa), chloramfenikol, chlorowodorek oksytetracykliny, chlorowodorek fluoksetyny, gemfibrozyl, androstendion, estron, progesteron, ketoprofen, diazepam). W celu oszacowania ryzyka narażenia środowiska wybrane związki oraz ich mieszaniny zostały poddane badaniom z wykorzystaniem baterii mikrobiotestów (tj. OSTRACODTOXKIT FTM, MICROTOXKIT[®], PHYTOTOXKIT FTM, test kometkowy, XenoScreen YES/YAS[®]).

Poznanie procesów zachodzący w środowisku jest dużym wyzwaniem, jednakże ta kwestia nie powinna być zaniedbywana. Zanieczyszczenia środowiska mogą przyczynić się do nieodwracalnych zmian w ekosystemach a w dalszej perspektywie wpływać, na jakość życia ludzi, dlatego tak istotne są wcześniejsze badania i rozpoznanie zagrożeń związanych z zanieczyszczeniem środowiska [2].

Literatura:

[1] M. Wieczerek, B. Kudlak, J. Namieśnik, *Crit Rev Anal Chem.* 45, 131, 2015.

[2] M. Wieczerek, B. Kudlak, J. Namieśnik, *Environ Int.* 10.1016/j.envint.2016.05.017

Praca finansowana ze środków NCN, w ramach projektu PRELUDIUM 5 nr DEC-2013/09/N/NZ8/03247 pt.: „Wstępne badania nt. oznaczania poziomów ekotoksyczności wybranych farmaceutyków i oddziaływań biologicznych między nimi w rzeczywistych warunkach środowiskowych”.

WYKORZYSTANIE ZAAWANSOWANYCH TECHNIK ANALITYCZNYCH DO ROZRÓŻNIANIA DESTYLATÓW ROLNICZYCH, WÓDEK I WHISKY

mgr inż. Paulina Wiśniewska, IV rok

Promotor: prof. dr hab. inż. Waldemar Wardencki

Promotor pomocniczy: dr inż. Tomasz Dymerski

Napoje alkoholowe można podzielić na piwa, wina i napoje spirytusowe, czyli te sporządzane na bazie alkoholu etylowego pochodzenia rolniczego. Destylat pochodzenia rolniczego (spirytus surowy) wg Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) [1] oznacza płyn alkoholowy otrzymywany w drodze destylacji, po fermentacji alkoholowej określonych produktów rolnych, który nie posiada właściwości alkoholu etylowego czy napoju spirytusowego, lecz nadal zachowuje zapach i smak użytych surowców. W przypadku określenia przez producentów surowca, destylat musi być otrzymywany wyłącznie z tego surowca. Destylaty rolnicze są wykorzystywane do produkcji napojów spirytusowych, w tym wódek i whisky. Do produkcji wódki najczęściej wykorzystuje się destylaty żytnie lub mieszane np. z żyta, jęczmienia i pszenicy, natomiast w przypadku whisky wykorzystuje się oprócz wyżej wymienionych destylatów również destylaty kukurydziane, które znajdują się w whisky amerykańskiej. Wódka czysta nie zawiera żadnych dodatków, natomiast do whisky dodaje się karmel w celu jej zabarwienia. Dodatkowo w przeciwieństwie do większości wódek, whisky poddawana jest procesowi leżakowania, gdzie nabiera specyficznego smaku i aromatu. Ze względu na ogromną różnorodność wśród wyżej wymienionych alkoholi oraz na coraz większe wymagania konsumentów, które dotyczą określenia jakości pitych trunków, należy prowadzić badania mające na celu sprawdzanie autentyczności wódek i whisky. Wytyczne zawarte w regulacjach pranych UE są przyczyną opracowania nowych i tanich technik analitycznych umożliwiających określenie pochodzenia botanicznego napojów spirytusowych [1-2].

Celem prac badawczych było sprawdzenie przydatności wybranych technik analitycznych do określania jakości i pochodzenia botanicznego destylatów rolniczych, wódek i whisky. Do badań wykorzystano takie urządzenia jak: elektroniczne nosy, w których wykorzystano ultra szybką chromatografię gazową, spektrometrię mas czy czujniki typu MOS, oraz użyto dwuwymiarowy chromatograf gazowy sprzężony ze spektrometrem mas, spektroskop UV-vis, elektroniczne języki, których zasada działania jest oparta na zastosowaniu spektroskopii w podczerwieni. Ponadto, do celów porównawczych zastosowano analizę sensoryczną.

Literatura

[1] Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 110/2008 z dnia 15 stycznia 2008 r. w sprawie definicji, opisu, prezentacji, etykietowania i ochrony oznaczeń geograficznych napojów spirytusowych oraz uchylające rozporządzenie Rady (EWG) nr 1576/89.

[2] Ustawa z dnia 13 września 2002 r. o napojach spirytusowych nr 1362/166 DZ. U. 10582- 10589.

**Katedra Chemii i Technologii
Materiałów Funkcjonalnych
Wydział Chemiczny PG**

WIELOCZUJNIKOWA PLATFORMA POTENCJOMETRYCZNA DO MONITOROWANIA PARAMETRÓW JAKOŚCI WÓD W EKOSYSTEMACH WODNYCH

mgr inż. Artur Jasiński, IV rok

Promotor: prof. dr hab. inż. Maria Bocheńska

Środowisko wodne tworzy bardzo złożony ekosystem podatny na ciągłe zmiany parametrów fizycznych i chemicznych. Jednakże w środowisku naturalnym produkty wydalone przez ryby i zwierzęta wodne ulegają rozcieńczeniu w znacznej ilości wody, co zmniejsza potencjalne zagrożenia. Niestety w zamkniętych ekosystemach wodnych uboczne produkty przemiany materii mogą się gromadzić w ilościach toksycznych dla zamieszkujących je zwierząt [1]. Zjawisko to ma miejsce na przykład w rybich stawach hodowlanych lub w szeroko pojętej akwarystyce.

Chcąc utrzymać równowagę biologiczną należy nieustannie monitorować szereg istotnych parametrów potrzebnych do oceny jakości wód, która pozwoli na utrzymanie zdrowej flory i fauny danego układu wodnego.

W tym celu podjęto próbę stworzenia nowej platformy potencjometrycznej, wykonanej technologii *solid contact*, gdzie skupiono się na jednoczesnym wyznaczeniu takich parametrów jak: pH, twardość wody, stężenia jonów: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} . Wcześniejsze nasze badania udowodniły, że platforma tego typu, wyposażona w odpowiednie elektrody jonoselektywne, zdolna była monitorować kilka jonów jednocześnie [2].

Literatura:

- [1] M.A. Mitchell, T.N. Tully, *Zwierzęta egzotyczne*, Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2010.
- [2] A. Jasiński, M. Urbanowicz, M. Guziński, M. Bocheńska, *Electroanalysis* 27 (2014) 745.

CHARAKTERYSTYKA FOTOELEKTROCHMEICZNA HYBRYD NIEORGANICZNO-ORGANICZNYCH ZAWIERAJĄCYCH WANADAN BIZMUTU ORAZ PEDOT:PSS

mgr inż. Konrad Trzeciński, IV rok

Promotor: prof. dr hab. Anna Lisowska-Oleksiak

Jednym z najbardziej perspektywicznych materiałów zdolnych do konwersji energii słonecznej w energię chemiczną jest wanadan bizmutu. Tym, co wyróżnia BiVO_4 wśród innych fotokatalizatorów jest obecność dwóch typów przerw energetycznych [1]. Stosunkowo wąska przerwa energetyczna (2.5 eV) [2] sprawia, że materiał ten absorbuje znaczną część światła widzialnego, co jest jego dużą zaletą w porównaniu z najczęściej stosowanym ditlenkiem tytanu. Dodatkowo, fotowzbudzone nośniki ładunków charakteryzują się długim czasem życia (40 ns). Niestety, niska mobilność elektronów ($4 \cdot 10^{-2} \text{ cm}^2/\text{V} \cdot \text{s}$) [3] sprawia, że nośniki nie mogą być efektywnie wykorzystywane na reakcje utleniania i generowanie anodowego fotoprądu. Wśród wielu metod modyfikacji wanadanu bizmutu mających na celu poprawę jego właściwości fotokatalitycznych, bardzo rzadko wykorzystuje się polimery przewodzące. Jedną z nielicznych prac o właściwościach fotokatalitycznych układu BiVO_4 /polimer przewodzący dotyczyła złącza nieorganiczno-organicznego składającego się z wanadanu bizmutu i polianiliny. Materiał ten wykazywał poprawioną efektywność rozkładu organicznych zanieczyszczeń, ale tylko w obecności nadtlenu wodoru, który był prekursorem rodników hydroksylowych [4].

W tej pracy zostaną zaprezentowane wyniki dotyczące warstw FTO/ BiVO_4 /PEDOT:PSS pełniących rolę fotoanod. Warstwa polimeru przewodzącego została nałożona na powierzchnię wanadanu bizmutu drogą elektrochemiczną. Otrzymane materiały elektrodowe zostały zbadane za pomocą metod pozwalających na zdefiniowanie struktury, zbadanie morfologii oraz właściwości optycznych (XRD, spektroskopia Ramana, SEM, spektroskopia UV-Vis). Elektrody zostały poddane testom fotoelektrochemicznym w elektrolicie wodnym z dodatkiem i bez dodatku hydrochinonu, pełniącego rolę zmiatacza dziur. Na podstawie otrzymanych wyników oraz wzajemnego położenia pasm energetycznych BiVO_4 oraz PEDOT:PSS zaproponowany został schemat przepływu nośników ładunku oraz generowania fotoprądu.

Literatura:

- [1] J.K. Cooper, S. Gul, F.M. Toma, L. Chen, S. Liu, J. Guo, J.W. Ager, J. Yano, I.D. Sharp, *J Phys Chem C* 119, 2969, 2015.
- [2] Q. Jia, K. Iwashina, A. Kudo, *PNAS* 109, 11564, 2012.
- [3] F.F. Abdi, T.J. Savenije, M.M. May, B. Dam, R. Van De Krol, *J. Phys. Chem. Lett.* 4, 2752, 2013.
- [4] M. Shang, W. Wang, S. Sun, J. Ren, L. Zhou, L. Zhang, *J. Phys. Chem. C*, 113, 20228, 2009.

Katedra Chemii Nieorganicznej

Wydział Chemiczny PG

SYNTEZA, BADANIA STRUKTURALNE I SPEKTROSKOPOWE KOMPLEKSÓW CYNKU I KADMU Z LIGANDEM TRIS(2,6-DIIZOPROPYLOFENOKSY)SILANOTIOLANOWYM

mgr inż. Agnieszka Jabłońska, IV rok

Promotor: dr hab. inż. Anna Dołęga

Pojęcie kompleksy modelowe w odniesieniu do syntetycznej chemii bionieorganicznej, oznacza takie proste związki kompleksowe, które odzwierciedlają wiernie fizyczne i chemiczne właściwości centrum aktywnego danego enzymu. Niskocząsteczkowe kompleksy metali naśladujące strukturę centrum aktywnego enzymu są łatwiejsze do otrzymania oraz oczyszczenia niż ich enzymatyczne odpowiedniki. Pozwala to w dokładny sposób scharakteryzować koordynację jonu metalu, co pozwala zrozumieć mechanizm działania enzymu [1]. W niniejszej pracy podjęto próby syntezy biomimetycznych kompleksów β - anhidrazy węglanowej oraz dehydrogenazy alkoholowej przy użyciu ligandów silanotiolanowych. Ligandy tiolanowe stosowane są bardzo często zamiast cysteiny do syntezy prostych modeli centrów aktywnych białek. Pośród olbrzymiej liczby ligandów tiolanowych ciekawą grupę stanowią krzemoorganiczne tiole [2]. Związkiem wykorzystywanym do syntezy związków modelowych był tris(2,6-diizopropylfenoksy)silanotiol (TDST) – jako hydrofobowa cząsteczka tiolu o dużej zawadzie sterycznej umożliwiająca otrzymanie kompleksów jednordzeniowych [3-6].

Literatura:

- [1] G. Parkin, *Chem. Rev.* 105, 699, 2004.
- [2] A. Dołęga, *Coord. Chem. Rev.* 254, 916, 2010.
- [3] A. Dołęga, W. Marynowski, K. Baranowska, M. Śmiechowski, J. Stangret, *Inorg. Chem.* 51, 836, 2012.
- [4] A. Jabłońska, Ł. Ponikiewski, K. Ejmont, A. Herman, A. Dołęga, *J. Mol. Struct.* 1054-1055, 359, 2013.
- [5] A. Dołęga, A. Jabłońska, A. Pladzyk, Ł. Ponikiewski, W. Ferenc, J. Sarzyński, A. Herman, *Dalton Trans.* 43, 12766, 2014.
- [6] A. Jabłońska, J. Bender, D. Gudat, Ł. Ponikiewski, A. Dołęga, *Polyhedron* 115, 219, 2016.

Praca finansowana ze środków NCN w ramach projektu OPUS, nr 2013/09/B/ST5/03479 „Funkcjonalizowane organoksylany, organoksylantiole, organoksylanole oraz ich połączenia z metalami przejściowymi”.

Katedra Chemii Organicznej

Wydział Chemiczny PG

ZASTOSOWANIE ODDZIAŁYWAŃ MIĘDZYCZĄSTECZKOWYCH, ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM WIĄZAŃ HAŁOGENOWYCH, W KONSTRUOWANIU STRUKTUR PONADCZĄSTECZKOWYCH

mgr inż. Katarzyna Eichstaedt, IV rok

Promotor: prof. dr hab. inż. Tadeusz Połoński

Promotor pomocniczy: dr hab. inż. Teresa Olszewska

Nadrzędnym celem inżynierii kryształu, dzięki któremu zawdzięcza swój dynamiczny rozwój jest możliwość racjonalnego projektowania ciał stałych. Właściwości fizykochemiczne materiałów użytkowych wynikają bezpośrednio ze sposobu ułożenia i wzajemnych relacji ich składników w fazie stałej. Dzisiejszy stan wiedzy pozwala na projektowanie struktur prostych, dwuskładnikowych układów z dużym współczynnikiem sukcesu. [1]

Badania prowadzone na czwartym roku stanowiły rozszerzenie prac dotyczących formowania skomplikowanych układów typu polipseudorotaksanów z wykorzystaniem permetylowanej cząsteczki pillar[5]arenu (**MeP5A**) stanowiącej obręcz pseudorotaksanu. Kluczowy przy konstruowaniu tego typu systemów okazał się dobór cząsteczki gościa 1,4-bis(imidazol-1-ylo)butanu (**bib**), który dzięki wysokiemu powinowactwu do wbudowywania się w kanał **MeP5A** utworzył relatywnie trwałe (w roztworze) pseudorotaksany. Pozwoliło to na jego wykorzystanie podczas współkrystalizacji z odpowiednią halogenopochodną. Uzyskane przeze mnie wyniki udowodniły, że trójskładnikowe układy ponadcząsteczkowe można uzyskać w względnie prosty sposób z wykorzystaniem powszechnie dostępnej metody krystalizacji. [2]. Celem kolejnej serii eksperymentów prowadzonej na ostatnim roku studium doktoranckiego było wykorzystanie cząsteczek o rdzeniu benzo-2,1,3-selenadiazolowym do formowania układów ponadcząsteczkowych. Przeprowadzone badania opierały się na zastosowaniu wolnej pary elektronowej atomu azotu nie biorącego udziału w cyklicznym syntonie $[\text{Se}-\text{N}]_2$ do współuczestniczenia w międzycząsteczkowych wiązaniach halogenowych lub wodorowych. [3] Dodatkowo rozwinięty został wątek samoasocjacji soli *N*-metylobenzo-2,1,3-chalkogenadiazoli. W toku prowadzonych badań zaobserwowałam możliwość tworzenia się innego typu syntonu $[\text{Se}-\text{X}^-]_2$ współzawodniczącego z syntonem $[\text{Se}-\text{N}]_2$ w procesie samoasocjacji selenadiazoli w ciele stałym. Odkrycie tego typu zainspirowało mnie do syntezy kilkunastu soli, w których spodziewałam się wystąpienia takiego syntonu. Badania rozszerzyłam o analizę soli *N*-metylobenzo-2,1,3-tiadiazoliowych.

Literatura:

- [1] (a) G. R. Desiraju, *Crystal Engineering: The Design of Organic Solids*, Elsevier, Amsterdam, 1989; (b) G. R. Desiraju, *The Crystal as a Supramolecular Entity*, Wiley, Chichester, 1995; (c) J. C. MacDonald, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.* 2383, 1994; (d) G. R. Desiraju, *Angew. Chem. Int. Ed.* 46, 8342, 2007. (e) J. J. Atwood, J. W. Steed, *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*, Marcel Dekker, New York, 2004.
- [2] K. Eichstaedt, B. Wicher, M. Gdaniec, T. Połoński, *CrystEngComm.*, 2016, accepted manuscript.
- [3] K. Eichstaedt, A. Wasilewska, B. Wicher, M. Gdaniec, T. Połoński, *Cryst. Growth Des.*, 16, 1282, 2016.

SYNTEZA I AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA NOWYCH AMINOKWASOWYCH POCHODNYCH ADENOZYNY ORAZ ICH KONIUGATÓW Z KWASEM MYKOFENOLOWYM

mgr inż. Michał Prejs, IV rok

Promotor: prof. dr hab. inż. Krystyna Dzierzbicka

Promotor pomocniczy: dr inż. Grzegorz Cholewiński

Jedną z metod projektowania nowych substancji biologicznie czynnych jest kowalencyjne łączenie związków o różnych mechanizmach działania. W swojej pracy postanowiłem otrzymać koniugaty kwasu mykofenolowego (MPA) posiadającego właściwości immunosupresyjne z adenozyną wykazującą szerokie spektrum aktywności, w tym przeciwzapalne, przeciwartymiczne, przeciwnowotworowe [1]. Stwarza to szansę optymalizacji właściwości terapeutycznych pochodnych kwasu mykofenolowego.

Obecny etap prac obejmował syntezę aminokwasowych pochodnych adenozyiny, a następnie przyłączenia do nich MPA. Do reakcji kondensacji Fmoc-chronionych aminokwasów z 2',3'-izopropylidenoadozyny wykorzystałem estyfikacyjną Yamaguchi. Optymalizacja warunków polegała na porównaniu rozpuszczalników i zasad niezbędnych do generowania odpowiedniego anionu karboksylanowego. Do tworzenia wiązania estrowego zastosowano także z powodzeniem DCC. Badania aktywności biologicznej otrzymanych związków są prowadzone w Katedrze Immunologii Klinicznej i Transplantologii GUMed we współpracy z prof. Piotrem Trzonkowskim.

Literatura:

[1] M. Samsel, K. Dzierzbicka, *Pharmacol. Rep.* 2011, 63, 601-617.

Praca finansowana ze środków NCN w ramach projektu OPUS nr 2013/11/B/NZ7/04838 „Nowe potencjalne leki immunosupresyjne oparte na strukturze adenozyiny i kwasu mykofenolowego– synteza i aktywność biologiczna”.

**Katedra Chemii Technologii i
Biotechnologii Żywności**
Wydział Chemiczny PG

KWASY NUKLEINOWE W ŻYWNOSCI: RODZAJE I ZAWARTOŚĆ W SUROWCACH I PRZETWORZONYCH PRODUKTACH ŻYWNOSCIOWYCH

mgr inż. Joanna Głazowska, IV rok

Promotor: dr hab. inż. Agnieszka Bartoszek-Pączkowska

Promotor pomocniczy: dr inż. Robert Tylingo

Celem badań prowadzonych w ramach projektu doktorskiego w Katedrze Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności jest określenie składu i formy występowania kwasów nukleinowych (KN) obecnych w żywności oraz przemian jakim podlegają w trakcie procesów przetwarzania.

KN występują przede wszystkim w produktach spożywczych zawierających struktury komórkowe: DNA głównie w jądrach komórkowych oraz RNA głównie w cytoplazmie. Toteż ich źródłem w diecie są przede wszystkim pokarmy zawierające tkanki szybko rosnące lub te, które zachowały potencjał do wzrostu i regeneracji. Ponadto, z dostępnych nielicznych pozycji literaturowych wiadomo, że przetwarzanie żywności takie jak gotowanie, smażenie w głębokim tłuszczu czy obróbka mikrofalami pozwalają na zachowanie fragmentów DNA surowca roślinnego lub zwierzęcego o wystarczającej jakości oraz ilości umożliwiającej ich wykorzystanie w bioanalizie prowadzonej technikami wykorzystywanymi głównie w biologii molekularnej. Oznacza to, że przetworzenie żywności nie pozbawia jej KN, natomiast nie są dobrze poznane ich przemiany w trakcie obróbki kulinarnej.

W przeprowadzonych badaniach jako modelowy składnik żywności wykorzystano mięso wieprzowe. Poddane zostało ono różnym rodzajom obróbki termicznej oraz nietermicznej: gotowaniu w wodzie, gotowaniu na parze, smażeniu, pieczeniu, grillowaniu, grillowaniu z udziałem mikrofal, mikrofalowaniu, peklowaniu oraz suszeniu. Następnie przeprowadzono charakterystykę jakościową oraz ilościową KN obecnych w surowym i przetworzonym mięsie. W tym celu zaadoptowano do badań żywności metody stosowane obecnie głównie w naukach medycznych i biologii molekularnej. Przeprowadzono ocenę morfologii jąder komórkowych w mięsie jako organelli zawierających DNA. Określono także wpływ obróbki na fragmentację KN obecnych w pojedynczych jądrach komórkowych dzięki zastosowaniu testu kometowego. Ostatnim etapem było sporządzenie profili fragmentacji wyizolowanych KN technikami elektroforetycznymi.

Przeprowadzone badania dostarczyły informacji dotyczących obecnych w badanym mięsie KN na poziomie tkankowym oraz komórkowym. Podczas analizy morfologicznej, stwierdzono obecność jąder komórkowych we wszystkich badanych próbkach mięsa (zarówno surowych, jak i przetworzonych). KN wyizolowane z próbek mięsa suszonego oraz grillowanego charakteryzowały się wyraźną regularną fragmentacją, charakterystyczną dla degradacji enzymatycznej. Fragmenty KN wyizolowane z mięsa surowego charakteryzowały się największą masą molekularną (powyżej 10 kbp) i nieznaczną degradacją.

Podsumowując, w mięsie poddanym obróbce kulinarnej KN nie ulegają całkowitej degradacji, lecz raczej tylko fragmentacji pod wpływem działania czynników fizyko-chemicznych lub obecnych w nim endonukleaz. Proces obróbki kulinarnej mięsa nie wpływał znacząco na morfologię jąder komórkowych obecnych w komórkach mięśni. Co za tym idzie, są one obecne w spożywanych przez ludzi produktach mięsnych.

AKTYWNOŚĆ CHEMOPREWENCYJNA WYBRANYCH BIOAKTYWNYCH FITOZWIĄZKÓW NA TLE METABOLOMU ZAWIERAJĄCYCH JE ROŚLIN

mgr inż. Izabela Koss-Mikołajczyk, IV rok

Promotor: dr hab. inż. Agnieszka Bartoszek

Promotor pomocniczy: dr inż. Barbara Kusznerewicz

Badania epidemiologiczne wykazały, że dieta bogata w owoce i warzywa zawierające bioaktywne fitozwiązki wykazuje znacznie większy potencjał chemoprewencyjny niż suplementy diety zawierające wyizolowane fitozwiązki. Może to oznaczać, że matryca roślinna ma wpływ na prozdrowotne działanie nieodżywczych metabolitów wtórnych, ale w literaturze naukowej trudno jest znaleźć badania poświęcone temu problemowi.

W badaniach prowadzonych w ramach pracy doktorskiej wykorzystywane są pary owoców lub warzyw należących do tego samego gatunku, ale różniących się zasadniczo zawartością określonych grup związków o wysokim potencjale biologicznym. Są to następujące rośliny jadalne: malina żółta i czerwona; winogrona białe i czerwone; morwa biała i czarna; porzeczka biała, czerwona i czarna; mirabelka żółta i czerwona; figa żółta i czerwona; opuncja żółta, pomarańczowa i czerwona; burak biały i czerwony; kapusta biała i czerwona i kalafior biały i fioletowy, zawierające lub nie fitozwiązki z grupy antocyjanów lub betalain. W ramach zaplanowanych badań porównana została matryca roślinna par owoców i warzyw (m.in. skład i zawartość cukrów, białek i wody), jak również zostały wykonane profile biologicznie aktywnych metabolitów wtórnych z grupy antocyjanów i betalain. Przeprowadzono także prace służące ocenie następujących właściwości chemoprewencyjnych w systemach bezkomórkowych i modelach ludzkich linii w hodowli komórkowej dla wspomnianych par roślin jadalnych w trakcie których oznaczono takie parametry jak: aktywność przeciwutleniająca, wpływ na wzrost komórek eukariotycznych, aktywność mutagenna, działanie antygenotoksyczne, wpływ na aktywność wybranych enzymów detoksykacyjnych fazy 2 oraz na aktywność α -amylazy i α -glukozydazy.

Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu PRELUDIUM nr 2015/19/N/NZ9/02921: „Porównanie potencjału chemoprewencyjnego różnych odmian wybranych owoców jadalnych”.

Katedra Technologii Chemicznej

Wydział Chemiczny PG

MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWANIA NOWYCH METOD EKSPERYMENTALNYCH DO BADANIA ZJAWISKA KONWEKCYJNEJ WYMIANY CIEPŁA

mgr inż. Hubert Denda, IV rok

Promotor: prof. dr hab. inż. Witold M. Lewandowski

Promotor pomocniczy: dr inż. Michał Ryms

Konwekcja swobodna, jest sposobem wymiany ciepła, związanym z ruchem materii w płynach. Polega na wzajemnym oddziaływaniu pól temperatur i prędkości na siebie [1]. Zmiana temperatury wywołuje różnice gęstości płynu, który pod wpływem sił wyporu zaczyna się poruszać. Z kolei ruch płynu intensyfikuje dalszą wymianę energii.

Badania pól temperatur i prędkości [2] mają więc istotne znaczenie dla lepszego zrozumienia i poznania mechanizmów przebiegu zjawiska wymiany ciepła i dlatego istotne jest poszukiwanie nowych bardziej precyzyjnych, szybszych, prostszych i łatwiejszych metod do wyznaczania tychże pól temperatur i prędkości jest niezmiernie ważne.

Badania prowadzone nad metodą do wyznaczania profili prędkości udowodniły, że na podstawie fotografii cząstek opadających w strumieniu konwekcyjnym da się wyznaczyć rozkład prędkości wzdłuż normalnej do powierzchni płyty grzejnej. Uzyskane w trakcie pomiarów rozkłady charakteryzowały się jednak słabą powtarzalnością, a metoda okazała się wrażliwa na zewnętrzne zaburzenia ruchu powietrza.

Metoda do wyznaczania pól temperatur przyniosła z to bardziej obiecujące rezultaty [3]. Przeprowadzone badania świadczą, że przy pomocy kamery termowizyjnej możliwe jest nie tylko badanie rozkładu temperatur na powierzchni, ale również rozkładu pól temperatur w kierunku prostopadłym do badanego obiektu. Otrzymane wyniki okazały się na tyle precyzyjne, że można z nich wyznaczyć pole rozkładu gradientów temperatur oraz wartości lokalnych współczynników wnikania ciepła. Umożliwia to wyznaczenie metodą gradientową lokalnych i globalnej wartości liczby Nusselta, a więc i lokalnych i globalnych strumieni ciepła od grzanego lub do ogrzewanego obiektu.

Literatura:

- [1] E.R.G. Eckert, Heat Mass Transfer. McGraw Hill Text, New York, 1959, str. 311-333.
- [2] W.M.Lewandowski, P.Kubski, *Wärme u. Stoffübertragung* 17, 149, 1983.
- [3] W.M.Lewandowski, M.Ryms, H. Denda, E. Klugmann-Radziemska, *Int. J. of Heat and Mass Transfer* 78, 2014

Praca finansowana ze środków NCN, w ramach projektu PRELUDIUM 9, nr UMO-2015/17/N/ST8/02716: „Nowe metody eksperymentalne do badania zjawiska konwekcyjnej wymiany ciepła”.

WPLYW WIELKOŚCI I KSZTAŁTU NANOCZĄTEK ZŁOTA NA WŁAŚCIWOŚCI POWIERZCHNIOWE I AKTYWNOŚĆ FOTOKATALITYCZNĄ Au-TiO₂

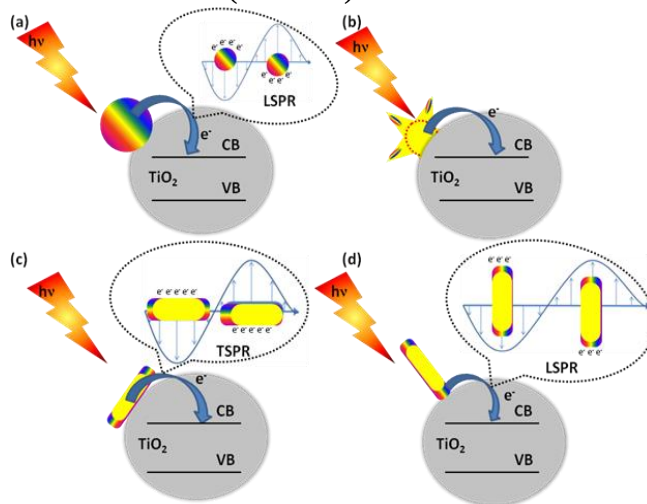
mgr inż. Anna Gołębiewska, IV rok

Promotor: prof. dr hab. inż. Adriana Zaleska-Medynska

W wyniku istnienia zlokalizowanego powierzchniowego plazmonu (LSPR) nanocząstki złota absorbują światło z zakresu promieniowania widzialnego, co umożliwia ich zastosowanie w fotokatalizie heterogenicznej. Sposób dystrybucji nanocząstek metali na powierzchni półprzewodników oraz kształt i wielkość nanocząstek metalicznych powodują odmienne właściwości powierzchniowe i fotokatalityczne.

Badania obejmowały otrzymywanie nanokompozytów na bazie TiO₂ modyfikowanych nanocząstkami złota w kształcie sfer, prętów oraz gwiazd. Zbadano wpływ wielkości i geometrii złota oraz rodzaju matrycy TiO₂ na właściwości powierzchniowe próbek Au-TiO₂ oraz na efektywność procesu degradacji fenolu pod wpływem promieniowania z zakresu widzialnego. Najwyższą aktywność fotokatalityczną wykazała próbka zbudowana z amorficznego TiO₂ modyfikowanego nanosferami złota. Szybkość degradacji fenolu wynosiła 1,9 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{min}^{-1}$ i była trzy razy wyższa w porównaniu do mikrosfer TiO₂. W przypadku serii fotokatalizatorów typu Au-TiO₂ zaobserwowano spadek aktywności fotokatalitycznej w kolejności: Au_{sfer}/TiO₂ > Au_{pręty}/TiO₂ > Au_{gwiazdy}/TiO₂.

Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowano mechanizm wzbudzenia TiO₂ modyfikowanego cząstkami złota o różnym kształcie, który oparty jest na oddziaływaniu ładunku powierzchniowego z zewnętrznym polem elektromagnetycznym (Rys.1.). Charakterystyka fotokatalizatorów obejmowała ocenę morfologii otrzymanych kompozytów (SEM/TEM), powierzchni właściwej BET, struktury krystalicznej i wielkości krystalitów (XRD), zdolności absorpcyjne (UV-VIS) oraz analizę składu powierzchni (XPS) i ocenę ilości złota osadzonego na powierzchni TiO₂ (ICP-MS).



Rys.1. Mechanizm wzbudzenia TiO₂ modyfikowanego cząstkami złota w kształcie (a) sfer, (b) gwiazd, (c-d) prętów

**OPRACOWANIE I WDROŻENIE INNOWACYJNYCH METOD
MODYFIKACJI POWIERZCHNI ELEKTROD MAJĄCYCH
ZASTOSOWANIE W MIKROBIOLOGICZNYCH OGNIWACH
PALIWOWYCH**

mgr inż. Milena Jabłońska, IV rok

Promotor: dr hab. inż. Marek Lieder

Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe (MOP) są szansą na efektywną degradację związków organicznych z jednoczesnym generowaniem energii. Należy więc wprowadzić nowoczesne metody modyfikacji elektrod w MOP. Wykorzystano w tym celu elektrody, których materiałem bazowym jest podłoże węglowe w formie papieru i filcu grafitowego. Modyfikacje anody opierają się na zmianie powierzchni, np. pokrycie jej warstwą PDDA metodą LbL, powłoką grafenową oraz oczyszczaniu z użyciem plazmy tlenowej. Imobilizacja tych warstw na powierzchni materiału bazowego ma na celu zmianę ładunku powierzchniowego z ujemnego na dodatni (+), co powoduje szybki wzrost biofilmu i jego trwałość na powierzchni elektrody. Wykonane zostały prekursory elektrod z aeroelu grafenowego oraz jego modyfikacje przez domieszkowanie jonami Fe^{2+} oraz Mn^{2+} . Każda z modyfikowanych elektrod została poddana takim pomiarom jak kąt zwilżania, potencjał Zeta oraz określenie jej przewodnictwa. Wyznaczono też całkowitą przewodność elektryczną w funkcji temperatury metodą cztero-punktową. Wykonano serię analiz spektroskopowych i mikroskopowych (głównie SEM) dla wszystkich otrzymanych materiałów. Nieodłączną częścią badań, były analizy elektrochemiczne, za pomocą których można wyznaczyć efektywność pracy mikrobiologicznego ogniwa paliwowego z zastosowaniem wyżej wymienionych materiałów elektrodowych.

**BADANIA WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNYCH FRAKCJI
LITOLOGICZNYCH ORAZ PARAMETRÓW TECHNICZNYCH
W ODNIESIENIU DO WZBOGACALNOŚCI UROBKU
W KGHM POLSKA MIEDŹ S.A.**

mgr Katarzyna Księżniak, IV rok

Promotor: prof. dr hab. inż. Jan Hupka
Promotor pomocniczy: dr inż. Witold Pawlos

Pierwszy etap badań obejmował analizę mineralogiczną, litologiczną i granulometryczną rudy miedzi ze szczególnym uwzględnieniem formacji łupkowych. Rozpatrując problem flotowalności ziaren skrajnych przeprowadzono dodatkową analizę litologiczną, mineralogiczną oraz charakterystykę granulometryczną dla wybranych półproduktów i produktów ciągu technologicznego oraz określono wpływ podstawowych parametrów nastawy maszyny flotacyjnej na efektywność procesu flotacji, a następnie zaproponowano warunki hydrodynamiczne dla procesu flotacji wstępnej. Zestawiono oraz podsumowano raporty technologiczne dotyczące dotychczasowych prób optymalizacji układów technologicznych w Zakładach Wzbogacania Rud KGHM Polska Miedź S.A.

Omówiono efekty pracy nad określeniem parametrów pracy maszyn flotacyjnych w warunkach przemysłowych, jak również przedstawiono rezultaty laboratoryjnych eksperymentów flotacji, prowadzonych w zmiennych warunkach hydrodynamicznych, tj. przy zmiennych wartościach prędkości obrotowej wirnika, gęstości pulpy flotacyjnej, objętości powietrza oraz odczynników flotacyjnych. Uzyskane efekty potwierdziły słuszność tez dysertacji oraz wykazały wrażliwość badanych układów na zmienne warunki prowadzenia procesu. Stwierdzono, że dla poprawy uzysku miedzi (ϵ , %) wymagany jest zapewnienie warunków hydrodynamicznych dobranych dla każdej komory flotacyjnej dla danego stadium procesu flotacji. Szczególną uwagę zwrócono na fakt, że zmiana warunków hydrodynamicznych w celi flotacyjnej sprawia, że do koncentratu (fazy pianowej) kierowany jest materiał o różnym uziarnieniu. Rozdział wielkości ziaren siarczków miedzi w fazie pianowej zależy od nastawy parametrów maszyny flotacyjnej.

N-DOMIESZKOWANE WĘGLOWE UKŁADY KATALITYCZNE DO ELEKTROREDUKCJI TLENU

mgr inż. Maria Rybarczyk, IV rok

Promotor: dr hab. inż. Marek Lieder

Domieszkowane materiały węglowe, ze względu na swoje właściwości, znajdują wiele zastosowań, np. w celu konwersji i magazynowania energii, konstruowania materiałów elektrodowych dla ogniw paliwowych [1-5]. Reakcja redukcji tlenu (ORR) charakteryzuje się wysokim nadpotencjałem. Poznanie mechanizmów spowalniających ORR jest bardzo ważne dla rozwoju alternatywnych źródeł energii elektrycznej, takich jak ogniwa paliwowe (np. bioogniwa enzymatyczne, mikrobiologiczne ogniwa paliwowe). Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe to obiecująca technologia podczyszczania ścieków z jednoczesną generacją prądu. Materiał elektrodowy dla części katodowej musi spełniać następujące warunki: być używany wielokrotnie bez strat masy oraz aktywności, tani i jednocześnie odporny na zatrucie przez substancje pochodzące z biodegradacji związków organicznych w biotycznej komorze anody. Z wstępnych badań oraz przeglądu literaturowo-patentowego wynika, że domieszkowane azotem materiały węglowe obniżają nadpotencjał redukcji tlenu faworyzując bezpośrednią redukcję [2-4].

Chitozan jest odnawialnym źródłem otrzymywania materiałów węglowych domieszkowanych azotem. W ramach prowadzonych prac zbadano hydrotermalnie karbonizowany, domieszkowany azotem metodą in-situ, chitozan i jego potencjał do zastosowań w ORR.

Celem badań jest otrzymanie i charakterystyka trwałych, odpornych na wybrane zanieczyszczenia organiczne węglowych układów katalitycznych do elektroredukcji tlenu z biopolimeru chitozanu o wysokiej zawartości azotu i ich odpowiednia modyfikacja.

Za pomocą krzywych polaryzacyjnych wyznaczono potencjał ORR i zestawiono z układem odniesienia domieszkowanym platyną. Powierzchnia oraz struktura scharakteryzowana została z wykorzystaniem technik: spektroskopii XPS, Ramana oraz mikroskopowych AFM, TEM oraz SEM.

Literatura:

- [1] M.-M. Titirici and M. Antonietti, *Chem. Soc. Rev.* 39, 103, 2010.
- [2] N. Brun, S. A. Wohlgemuth, P. Osiceanu and M. M. Titirici, *Green Chem.* 15, 2514, 2013.
- [3] M. Vikkisk, I. Kruusenberg, U. Joost, E. Shulga, I. Kink and K. Tammeveski, *Appl. Catal., B* 147, 369, 2014.
- [4] M.K. Rybarczyk, M. Lieder and M. Jablonska, *RSC Adv.* 5, 44969, 2015.
- [5] M.K. Rybarczyk, H.-J. Peng, Ch. Tang, M. Lieder, Q. Zhang, M.-M. Titirici, *Green Chem.* 2016; DOI: 10.1039/C6GC00612D (w druku).

BADANIE AGREGACJI MICELARNEJ NIEJONOWYCH ZWIĄZKÓW POWIERZCHNIOWO CZYNNYCH W IMIDAZOLIOWYCH CIECZACH JONOWYCH

mgr inż. Anna Selwent, IV rok

*Promotor: prof. dr hab. inż. Jan Hupka
Promotor pomocniczy: dr inż. Justyna Łuczak*

Rozpuszczalniki niewodne zdolne do wspierania micelizacji surfaktantów stanowią niewielką grupę i są to głównie lotne rozpuszczalniki organiczne. Jednakże zaobserwowano, że szereg cieczy jonowych także posiada tę właściwość, a w związku z ich niemierzalną prężnością par stanowią alternatywę bardziej przyjazną środowisku [1]. Zjawisko agregacji micelarnej w cieczach jonowych nie zostało jeszcze w pełni poznane i systematycznie opisane, a liczba dotychczas scharakteryzowanych układów surfaktant/ciecz jonowa jest niewielka. W związku z powyższym celem prowadzonych badań jest poszerzenie oraz usystematyzowanie wiedzy na temat agregacji micelarnej surfaktantów niejonowych w imidazoliowych cieczach jonowych oraz opisanie wpływu wybranych czynników na ten proces.

Zakres badań obejmuje wyznaczanie parametrów opisujących zjawisko adsorpcji surfaktantu na granicy faz ciecz jonowa/powietrze oraz parametrów opisujących micelizację w roztworze, w temperaturach 15, 25, 35 i 45°C. W tym celu wyznaczono napięcie powierzchniowe, gęstość, lepkość, przewodnictwo oraz rozkład wielkości cząstek w funkcji stężenia surfaktantu w wybranych cieczach jonowych. W badaniach zastosowano imidazoliowe ciecze jonowe o 2-8 atomach węgla w łańcuchu alkilowym kationu oraz wybranych anionach([BF₄], [PF₆],[TfO], [Tf₂N]), oraz surfaktanty Triton X-100, Triton X-114, Triton X-45, Tween 20, Tween 60 i Tween 80. Badaniu poddano ponad 80 układów. Zaobserwowano, że użycie cieczy jonowej o mniejszym kationie, w obrębie danego anionu, ułatwia micelizację badanych surfaktantów. Rodzaj anionu wpływa na wartość wzrost CMC następująco: [BF₄] > [PF₆] > [TfO]. Zastosowanie cieczy jonowych z anionem [Tf₂N], lub o 8 atomach węgla w kationie, niezależne od obecnego przeciwjonu, uniemożliwia micelizację [2]. Surfactanty Tween, posiadające więcej łańcuchów oksyetylenowanych niż pochodne Triton X, sprzyjają zarówno niższym wartościom CMC, jak i bardziej efektywnym obniżeniem napięcia powierzchniowego cieczy jonowych. Ponadto podwyższenie temperatury w obrębie danego układu skutkuje początkowo obniżeniem, a następnie wzrostem wartości CMC, osiągając minimum w 25-35°C [3].

Literatura:

- [1] T. Inoue, H. Yamakawa *J. Colloid Interf. Sci.*, 356(2), 798-802, 2011.
- [2] J. Łuczak, A. Latowska, J. Hupka *Colloid Surface A*, 471, 26-37, 2015.
- [3] A. Selwent, J. Łuczak, *J. Mol. Liq.*, 221, 557-566, 2016.

BADANIA NAD ZAGOSPODAROWANIEM ORGANICZNEJ FRAKCJI ODPADÓW KOMUNALNYCH

mgr inż. Nikola Śniadecka, IV rok

Promotor: prof. dr hab. inż. Jan Hupka

Obszar prowadzonych badań dotyczy zagadnień związanych z zagospodarowaniem organicznej frakcji odpadów komunalnych, wyselekcjonowanej ze zmieszanych odpadów komunalnych oraz czystej frakcji organicznej zbieranej selektywnie. Zagospodarowanie odpadów odbywa się z zastosowaniem przetwarzania biologicznego w procesie fermentacji metanowej. Frakcja bioodpadów analizowana jest pod względem składu surowcowego w cyklu miesięcznym i rocznym, natomiast na cele procesu średnio co dwa tygodnie. Analiza składu surowcowego jest istotnym elementem badań z uwagi na brak homogeniczności i powtarzalności składu odpadów, tym samym pomocna jest w prognozowaniu potencjału biogazotwórczego w odniesieniu do sezonowości składu odpadów.

Zgodnie z danymi zawartymi w literaturze przedmiotu odpady komunalne stanowią atrakcyjny surowiec do procesów beztlenowych, zarówno jako surowiec, jak i współ-substrat [1-5]. Średnio, uzysk biogazu o zawartości 55-72% CH₄ [1,3-6] dla czystej frakcji organicznej zawiera się w granicach 330-529 dm³CH₄/kg s.m. [3,4,6]. Dla frakcji zanieczyszczonych odpadami inertnymi (tworzywa sztuczne, szkło, tekstylia), jak również uboższych w białka i tłuszcze, wydajność biogazowa jest niższa i wynosi 230-360 dm³CH₄/kg s.m.[1,5].

Celem badań było wykonanie pełnej charakterystyki organicznej frakcji odpadów komunalnych jako surowca do procesu fermentacji metanowej. W pracy podjęto się próby oszacowania zdolności do rozkładu odpadów komunalnych w warunkach beztlenowych, jak również oszacowania potencjału biogazotwórczego na podstawie podstawowych informacji o substracie.

Literatura:

- [1] P.H.L.Nguyen, P. Kuruparan, C. Visvanathan, *Biores. Techn.* 98, 380–387, 2007.
- [2] J. Bohdziewicz, M. Kuglarz, A. Kwarcia-Kozłowska, *Proc. of ECOpole*, 5, 1,191-196, 2011.
- [3] Y. Zhang, C.J. Banks, S. Heaven, *J. Environ. Manage.* 104, 166-174, 2012.
- [4] J.D. Browne, J.D. Murphy, *App. Energy* 104, 170–177, 2013.
- [5] D. Elango, M. Pulikesi, P. Baskaralingam, V. Ramamurthi, S. Sivanesan, *J. Hazard. Mater.* 141, 301–304, 2007.
- [6] B. Zhu, R. Zhang, P. Gikas, J. Rapport, B. Jenkins, X. Li, *Bioresour. Technol.* 101, 6374–6380, 2010.

Praca wykonana w ramach Projektu 'Pomeranian Biogas Model' dofinansowanego z Grantów Norweskich w ramach Programu Polsko-Norweskiej Współpracy Badawczej (POM-BIOGAS), którego operatorem jest Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (Project Contract No. Pol-Nor/202919/57/2013).

Katedra Technologii Leków i Biochemii

Wydział Chemiczny PG

**ODPOWIEDŹ KOMÓRKOWA INDUKOWANA PRZEZ
PRZECIWNOWOTWOROWĄ POCHODNĄ AKRYDYNY, C-1748
W KOMÓRKACH RAKA TRZUSTKI. ROLA EKSPRESJI ENZYMÓW
METABOLIZUJĄCYCH W MODULACJI TEJ ODPOWIEDZI.**

mgr inż. Barbara Borowa-Mazgaj, IV rok

Promotor: prof. dr hab. inż. Zofia Mazerska

Promotor pomocniczy: dr hab. Ewa Augustin

Rak trzustki należy do najbardziej złośliwych i opornych na leczenie nowotworów, stąd konieczne są badania podstawowe, które przyczynią się do lepszego poznania biologii nowotworu, przyczyn lekooporności, czy mechanizmu działania chemoterapeutyków.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie mechanizmu działania C-1748 wobec komórek wybranych linii raka trzustki oraz określenie roli enzymów metabolizujących ksenobiotyki w końcowej odpowiedzi biologicznej tych komórek na działanie C-1748. Wykazałam, że komórki raka trzustki charakteryzowały się wysoką, wrażliwością na działanie związku. W zależności od badanej linii komórkowej, C-1748 indukował m.in. apoptozę, starzenie komórkowe oraz katastrofę mitotyczną. Nowym, jak dotąd niepoznanym mechanizmem działania związku było hamowanie autofagii, czemu towarzyszył wzrost poziomu kropli tłuszczowych. Co więcej, zastosowanie kombinacji C-1748 z inhibitorem autofagii – wortmaniną wywierało synergistyczny efekt zarówno na proces autofagii jak i apoptozy w porównaniu do zastosowania samego C-1748. W drugiej części badań wykazałam, że nadekspresja enzymów metabolizujących C-1748 (CPR i CYP3A4) w komórkach AsPC-1, które były najbardziej odporne na działanie C-1748, skutkowałą zwiększoną wrażliwością tych komórek na cytotoksyczne i proapoptotyczne działanie pochodnej C-1748 w porównaniu do komórek AsPC-1 typu dzikiego.

**MOLECULAR BASIS AND ASSESSMENT OF SHELTERIN
COMPLEX: TRF PROTEINS DIMER-FORMING DOMAINS (TRFH)
AND THEIR INTERACTIONS WITH TIN2_{TBM} AND APOLLO_{TBM}**

mgr inż. Umesh Kalathiya, IV rok

Promotor: prof. dr hab. inż. Maciej Baginski

A group of proteins interacting with telomeric DNA is named shelterin complex (TRF1, TRF2, POT1, RAP1, TIN2, and TPP1) [1,2]. Shelterin is a six protein complex that can function in smaller subsets to regulate the length of telomeres and to protect them. Telomeres are nucleoprotein complexes and specialized heterochromatic structures present at the ends of eukaryotic chromosomes which ensure their proper function. Human telomeres are maintained by the shelterin complex in which only two closely related proteins, TRF1 and TRF2 make high-affinity contact directly with double-stranded telomeric DNA [1,3]. TIN2 connects TRF1 to TRF2 and this link contributes to the stabilization of TRF2 on telomeres. TRF2 recruits a number of other factors required for telomere protection, including Apollo which is also involved in DNA repair [1].

To elucidate the molecular basis of these interactions, we have employed MD simulations of TRF1_{TRFH}-TIN2_{TBM} and TRF2_{TRFH}-TIN2_{TBM}/Apollo_{TBM} complexes and without respective partners. MD study addressed structural and dynamical comparison of protein-peptide complexes especially including H-bond interactions and covered residues which may regulate binding of TRF proteins with peptides, especially focusing on interactions described in crystallographic data. Residues showing selective and common function in both proteins TRF1_{TRFH} and TRF2_{TRFH}, forming a stable hydrogen bond network with TIN2_{TBM} or Apollo_{TBM} peptides were traced [4]. Our study revealed that TIN2_{TBM} forms a well-defined binding mode with TRF1_{TRFH} as compared to TRF2_{TRFH}, and that the binding pocket of TIN2_{TBM} is deeper for TRF2_{TRFH} protein than Apollo_{TBM}. Efforts were made to explain mutation done in crystallographic work for TRF proteins using data from MD. Our MD data together with previous X-ray structure bring a detailed view of the TRF-peptide binding mode and the structure of TRF1/2 binding pockets [4]. Particular TRF-peptide interactions were very specific for protein-peptide complex formation, TRF proteins could be used as a potential target for design of inhibitors/drugs modulating telomere machinery and for anticancer therapy.

Literatura:

- [1] T. De Lange, *Genes Dev.*, 19, 2100, 2005.
- [2] D. Broccoli, A. Smogorzewska, L. Chong, T. de Lange, *Nat. Genet.* 17, 231, 1997.
- [3] A. Smogorzewska, B. vanSteensel, A. Bianchi, S. Oelmann, M. R. Schaefer, G. Schnapp, T. deLange, *Mol. Cell. Biol.* 20, 1659, 2000.
- [4] U. Kalathiya, M. Padariya, M. Baginski, *Eur. Biophys. J.* DOI: 10.1007/s00249-016-1157-7, 2016.

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF IRON OXIDE/SILICA CORE-SHELL NANOPARTICLES

mgr Ahmet Kertment, IV rok

*Promotorzy: prof. dr hab. inż. Ryszard Andruszkiewicz /
prof. dr hab. inż. Sławomir Milewski*

Biologically compatible magnetic iron oxide nanoparticles (IONPs) are excellent materials for nano-medicinal applications with a variety of methods reported for their preparation in different size and morphologies. Chemical properties of IONPs, allowing numerous different surface engineering methods, makes them highly desirable materials to work with for colloidal chemists. However, chemically susceptible nature of the IONPs also requires a protection from biological environments. Therefore, coating the IONP surfaces with a thick layer of silica, resulting in iron oxide/silica core-shell (IONPs@SiO₂) nano-structures, is one of the most widely practiced applications, mainly due to the readily available silica precursors with a variety of organic functionalities and biocompatible nature of the resulting silicon oxide formations. Yet difficulties in preparation of these valuable materials, usually resulting in poly-dispersed formations, makes the IONPs@SiO₂ preparations difficult to achieve. Hereby, we would like to demonstrate the preparation methods of the aqueously well dispersed IONPs@SiO₂ structures suitable for biological applications that are characterized by TEM, FT-IR/Raman spectroscopy and Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) techniques.

Katedra Technologii Polimerów

Wydział Chemiczny PG

**BADANIA MIKROSTRUKTURY ALIFATYCZNYCH POLIURETANÓW DO
ZASTOSOWAŃ MEDYCZNYCH Z ZASTOSOWANIEM TRANSMISYJNEJ
MIKROSKOPII ELEKTRONOWEJ (TEM)**

mgr inż. Iga Gubańska, IV rok

Promotor: prof. dr hab. inż. Helena Janik

Promotor pomocniczy: dr inż. Justyna Kucinska-Lipka

Poliuretany to tworzywa sztuczne wykorzystywane między innymi, jako materiały biomedyczne do otrzymywania sztucznych zastawek serca, protez naczyniowych, cewników czy rusztowań tkankowych do regeneracji tkanek miękkich i tkanek twardych [1]. To szerokie spektrum wykorzystania PUR zawdzięcza się ich segmentowej budowie składającej się z segmentów sztywnych oraz giętkich. Segmenty sztywne to produkt reakcji diizocyjanianów i małowartościowego przedłużacza łańcucha natomiast segmenty giętkie powstają najczęściej w reakcji diizocyjanianów z makrodiolami. Segmenty sztywne i giętkie tworzą mikrostrukturę materiałów PUR. Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM) to technika która z powodzeniem jest wykorzystywana do badania mikrostruktury poliuretanów, co potwierdzają liczne doniesienia literaturowe [2]. Dzięki zastosowaniu TEM możliwe jest ustalenie stopnia krystaliczności PUR, mieszalności faz oraz stopnia separacji fazowej. Są to cenne informacje, które umożliwiają określenie rozpuszczalności materiałów poliuretanowych, dobór odpowiednich metod przetwórstwa oraz ocenę jednorodności otrzymanych materiałów. Podczas IV roku SD przeprowadziłam badania TEM otrzymanych niemodyfikowanych i modyfikowanych kwasem askorbinowym PUR w celu ustalenia ich mikrostruktury. Kwas askorbinowy wykorzystany został w celu poprawy biokompatybilności otrzymywanych PUR. Z przeprowadzonych badań TEM wynika, iż we wszystkich badanych próbkach PUR możemy dostrzec układ heterogeniczny a zatem wyróżnić należy matrycę i fazę rozproszoną. Morfologia matrycy w przypadku wszystkich próbek jest podobna i charakterystyczna dla poliuretanów nieusieciowanych. Ma wygląd struktur niepromienistych z charakterystycznymi wgłębieniami i wzniesieniami. Natomiast zaobserwowano różnice pomiędzy próbkami w przypadku wyglądu i ilości fazy rozproszonej. Faza ta ma kształt kulisty o różnej wielkości. Kwas askorbinowy, niewłączony w strukturę chemiczną PUR, pozostaje w matrycy, co obserwuje się, jako liczne wtrącenia i charakterystyczny kontrast. Ponadto zaobserwowano, że wraz ze wzrostem zawartości kwasu askorbinowego zwiększała się zdolność materiału do tworzenia mikropęcherzy, zamkniętych w matrycy poliuretanu. Kwas askorbinowy może w związku z powyższym przyczyniać się do częściowego spieniania próbek w skali mikrometrycznej. W obu typach badanych PUR zaobserwowano istnienie globul, jednak nie zaobserwowano struktur promienistych, charakterystycznych dla poliuretanów usieciowanych, co dowodzi, iż założenie, że mamy otrzymywać termoplasty zostało potwierdzone. Do tej pory nie przeprowadzono jeszcze kompleksowych badań mikrostruktury poliuretanów alifatycznych z zastosowaniem techniki TEM. W kolejnym roku SD planowane jest zakończenie prowadzonych badań uzupełniających oraz napisanie rozprawy doktorskiej.

Literatura:

[1] H. Janik, *Polimery*, LV (6), 419, 2010

[2] J. Kucińska-Lipka, I. Gubańska, H. Janik, M. Pokrywczynska, T. Drewna, *Reactive & Functional Polymers*, 97, 105, 2015

THE USE OF RECYCLED POLYURETHANE FOAM AND CRUMB RUBBER FOR ASPHALT MODIFICATIONS

mgr inż. Mohamed Sulyman, IV rok

Supervisor: prof. dr hab. inż. Józef . Haponiuk

Assistant supervisor: dr inż. Maciej . Sienkiewicz

In the last few years, production of polyurethane foam (PUF) has been rapidly increased worldwide. Because PUF has a very wide applications. In 2011, China alone produced about 7.5million tons of PU, which give a large amount of wastes. So far in many countries particularly in developing countries, the management of these waste is still carried out to open area for disposal by burning.

This study investigating the feasibility of using scrap polyurethane foam (PUF) obtained from production process and post-consumed shoes and crumb rubber(CR) obtained from used tires as singular additives composed of binary asphalt-polymer blend and admixture additives composed of ternary asphalt-polymer blend. The experiments was carried out at reaction temperature of 210°C with a high-speed mixing of 6000 rpm for 60min in dose percentages of (5- 15)%. Ternary asphalt polymer blends were studied using three different weight fraction of CR:PUF (25:75, 50:50, and 75:25) respectively. Basic and rheological properties of final modified asphalt were investigated and compared with the virgin asphalt. The results and data obtained showed that investigated properties of binary and ternary asphalt-polymer blends were improved as well as, the modifier type and its content levels are playing an important factors in the experiments. Based upon the experimental results of this study, following results are obtained: 1) 15% was the best content level for both CR and PUF as well as, CR:PUF admixture, 2)Temperature sensitivity was decreased by 57%, 77%, and 72% for 15%CR, 15%PUF, 15%(75%CR:25%PUF) respectively, 3) Viscous flow results showed that, viscosity at 60°C has been increased by 8-16 times at low shear rate, and by 2- 4 times at high shear rate in dependence on the modifier types, while PUF-Modified-asphalt shows the highest viscosity at high shear rate, 4) Complex modulus (G^*) and rutting resistance parameter ($G^*/\sin \delta$) were also increased by 5-9 times more than virgin asphalt. While, phase angle(δ) was decreased by (5-10) times less than virgin asphalt, 5) An increase in complex modulus and decrease in phase angle indicates high elastic behaviour of the asphalt binder, which is decreases the permanent deformation, 6) From an environmental and economic point of view, the use of both CR and PUF instead of virgin polymer modifiers is possible and preferable recycling method for these wastes, resulting in cost savings, lower energy consumption and lower environmental pollution.

SYNTEZA, STRUKTURA CHEMICZNA I WYBRANE WŁASNOŚCI NOWYCH BEZ-IZOCYJANIANOWYCH POLIURETANÓW

mgr inż. Marcin Włoch, IV rok

Promotor: dr hab. inż. Janusz Datta, prof. nadzw. PG

Bez-izocyjanianowe poliuretany (ang. Non-Isocyanate PolyUrethanes, NIPUs) stanowią alternatywę do powszechnie wykorzystywanych w przemyśle materiałów poliuretanowych w postaci pianek elastycznych, sztywnych, elastomerów czy powłok. Polimery te otrzymywane są z diizocyjanianów, polioli oraz małowartościowych przedłużaczy łańcucha (głównie dioli lub diamin). NIPU mogą być otrzymywane w wyniku reakcji związków zawierających co najmniej dwa cykliczne ugrupowania węglanowe oraz związków zawierających co najmniej dwie pierwszorzędowe grupy aminowe i bez użycia problematycznego diizocyjanianu [1].

W ramach przeprowadzonych prac badawczych otrzymano szereg nowych bez-izocyjanianowych poliuretanów, w tym materiały ze związków pochodzenia naturalnego (m.in. epoksydowanego oleju sojowego oraz aminowej pochodnej zdimeryzowanych kwasów tłuszczowych). Półprodukty zakończone cyklicznymi ugrupowaniami węglanowymi uzyskano w wyniku modyfikacji chemicznej komercyjnej żywicy epoksydowej i sieciowano wybranymi diaminami. Wyniki z tych prac badawczych zaprezentowałem podczas Sesji Sprawozdawczych w ubiegłych latach.

Podczas wystąpienia zaprezentuję wyniki badań wybranych własności mechanicznych (m.in. własności przy statycznym rozciąganiu oraz twardości) oraz stabilności termicznej (zbadanej metodą analizy termogravimetrycznej).

Literatura:

[1] J. Datta, M. Włoch, *Polym. Bull.*, 73, 1459, 2016.

Pracownia Genetyki Bakterii

Wydział Chemiczny PG

REGULATED ASSEMBLY OF LIPOPOLYSACCHARIDE AND SENSING OF ITS ALTERATIONS IN *ESCHERICHIA COLI*

mgr inż. Anna Stupak, IV rok

Promotor: Prof. Satish Raina

The *rpoE* gene encodes a RNA polymerase subunit which is essential for the viability of *Escherichia coli*. RpoE is a part of the bacterial extracytoplasmic stress response regulon that controls transcription initiation of genes whose products are involved in synthesis and transport of outer membrane components. As is often the case with alternative sigma factors, RpoE is tightly regulated at transcriptional and post-translational level.

The transcriptional regulation of the *rpoE* gene has not been fully understood. Initially two promoters were identified, out of which one is positively autoregulated by RpoE. However, transcription from upstream region is sustained under several stress and non-stress conditions and in response to some LPS defects, entry into the stationary phase, high osmolarity and cold shock.

Mapping of 5' ends of *rpoE* mRNA identified five new transcriptional initiation sites (P1 to P5) located distal to the autoregulated promoter. Thus, several single-copy chromosomal *rpoEP-lacZ* promoter fusions were constructed and analyzed for their activity. Experiments showed that these promoters are activated in response to unique signals. Out of these, three major promoters, P2, P3 and P4, are recognized by RpoN, RpoD and RpoS sigma factors respectively. The RpoS-regulated *rpoEP4* promoter exhibits the highest basal activity and its activity is modulated by RssB, PcnB, FliZ and exposure to increased osmolarity in accordance to its positive regulation by RpoS. The RpoN-recognized P2 promoter is positively regulated by QseE/F two-component system and NtrC activator. Transcription from the RpoD-regulated P3 promoter is induced upon severe defects in the LPS composition and overproduction of certain lipoproteins. The P3 promoter is positively regulated by Rcs system and by the global regulator CRP. The activity of *rpoEP3* promoter is also induced upon overexpression of a novel non-coding RNA *rirA* (RfaH interacting RNA). *RirA* is generated by the processing of 5'UTR of the *waaQ* mRNA. Its overexpression causes decrease in LPS content and defects in O-antigen incorporation. In the presence of RNAP, *RirA* binds LPS regulator *RfaH* known to prevent premature transcriptional termination of *waaQ* and *rfb* operons whose encoding genes are involved in the LPS core and O-antigen biosynthesis. Excess of *RirA* could titrate out *RfaH* causing LPS defects and increase in the *rpoEP3* promoter activity. Described results revealed a complex network in the regulation of the *rpoE* transcription by multiple sigma factors.

*Praca finansowana ze środków NCN w ramach projektu OPUS nr 2013/11/B/NZ2/02641:
„Charakterystyka nowego niezbędnego do życia białka TPR LapB oraz nowego niekodującego RNA,
które wspólnie regulują składanie endotoksyny”*

Indeks autorów

Bigus Paulina, 40
Borowa-Mazgaj Barbara, 67

Denda Hubert, 59
Diak Magdalena, 33
Drzeżdżon Joanna, 25

Eichstaedt Katarzyna, 53

Gitlin-Domagalska Agata, 8
Głazowska Joanna, 56
Goląbiewska Anna, 60
Gruba Natalia, 9
Gubańska Iga, 71

Hewelt-Belka Weronika, 41

Jabłońska Agnieszka, 51
Jabłońska Milena, 61
Jasiński Artur, 48
Jędrkiewicz Renata, 42

Kalathiya Umesh, 68
Kertment Ahmet, 69
Kobylak Natalia, 36
Koss-Mikołajczyk Izabela, 57
Krajewska Ewelina, 38
Kreffft Daria, 12
Księżniak Katarzyna, 62
Kupska Magdalena, 43

Łeppek Teresa, 28
Łukaszewicz Paulina, 4

Marchelek Martyna, 34
Mioduszevska Katarzyna, 5

Ogryzek Małgorzata, 26

Pankavec Sviatlana, 30
Papkov Aliaksei, 13
Prejs Michał, 54
Ptaszyńska Natalia Maria, 10
Puckowski Alan, 6

Rafalik Monika, 19
Ramotowska Sandra, 16
Rudnicki Paweł Błażej, 22
Rybarczyk Maria, 63

Selwent Anna, 64
Sobocińska Małgorzata, 14
Stupak Anna, 75
Sulyman Mohamed, 72
Szymańska Karolina, 31

Śliwińska Magdalena, 44
Śniadecka Nikola, 65

Trzeciński Konrad, 49

Wicka-Grochocka Monika, 37
Wieczerek Monika, 45
Wiśniewska Paulina, 46
Witkowska Julia, 20
Włoch Marcin, 73

Zdrowowicz Magdalena, 23
Zięba Patrycja, 17