

Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. J. Habera
w Krakowie
ul. Niezapominajek 8
30-239 Kraków
za pośrednictwem:
Rady Doskonałości Naukowej
pl. Defilad 1
00-901 Warszawa
(Pałac Kultury i Nauki, p. XXIV, pok. 2401)

Anna Bratek-Skicki
Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. J. Habera w Krakowie

Wniosek

z dnia 26.10.2020

o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.

Określenie osiągnięcia naukowego będącego podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego :

Adsorpcja białek na nośnikach polimerowych do zastosowań biomedycznych

Wnoszę – na podstawie art. 221 ust. 10 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.) – aby komisja habilitacyjna podejmowała uchwałę w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w głosowaniu **tajnym/jawnym**.

Zostałem poinformowany, że:

Administratorem w odniesieniu do danych osobowych pozyskanych w ramach postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego jest Przewodniczący Rady Doskonałości Naukowej z siedzibą w Warszawie (pl. Defilad 1, XXIV piętro, 00-901 Warszawa).

Kontakt za pośrednictwem e-mail: kancelaria@rdn.gov.pl , tel. 22 656 60 98 lub w siedzibie organu. Dane osobowe będą przetwarzane w oparciu o przesłankę wskazaną w art. 6 ust. 1 lit. c) Rozporządzenia UE 2016/679 z dnia 27 kwietnia 2016 r. w związku z art. 220 - 221 oraz art.

232 – 240 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, w celu przeprowadzenie postępowania o nadanie stopnia doktora habilitowanego oraz realizacji praw i obowiązków oraz środków odwoławczych przewidzianych w tym postępowaniu.

Szczegółowa informacja na temat przetwarzania danych osobowych w postępowaniu dostępna jest na stronie www.rdn.gov.pl/klauzula-informacyjna-rodo.html

Anna Bratek-Skicki

(podpis wnioskodawcy)

Załączniki:

1. Kopia dyplomu potwierdzającego nadanie tytułu doktora.
2. Autoreferat w języku polskim.
3. Dane wnioskodawcy.
4. Wykaz osiągnięć naukowych.
5. Cykl publikacji wchodzących w skład osiągnięcia.
6. Oświadczenia współautorów prac naukowych określające ich wkład w powstanie cyklu publikacji.
7. Oświadczenie o współpracy z firmą Biomex sp. z o.o.
8. Nośnik USB z elektroniczną wersją dokumentów (2 egzemplarze).

Dr Anna Bratek-Skicki

Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk
ul. Niezapominajek 8
30-239 Kraków
e-mail: ncbratek@cyf-kr.edu.pl
tel. +48 600 963 866

Autoreferat

**Adsorpcja białek na nośnikach polimerowych do zastosowań
biomedycznych**

Załącznik 2 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

Kraków 2020

Spis treści

1. Imię i nazwisko	2
2. Posiadane dyplomy	2
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	2
4. Omówienie osiągnięć stanowiących podstawę wniosku habilitacyjnego	3
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego	3
4.2. Publikacje naukowe będące podstawą wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego	3
4.3. Omówienie osiągnięcia naukowego	7
4.3.1. Tło naukowe	7
4.3.1.1. Znaczenie procesu adsorpcji białek	7
4.3.1.2. Czynniki wpływające na adsorpcję białek	8
4.3.1.3. Metody immobilizacji białek	10
4.3.2. Cel pracy	14
4.3.3. Metodologia badań	15
4.3.4. Omówienie najważniejszych wyników z prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego	19
4.3.5. Podsumowanie	44
4.3.6. Bibliografia	46
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.	50
5.1. Omówienie osiągnięć niewchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej	50
5.2. Wykłady	54
5.3. Projekty badawcze	54
5.4. Działalność ewaluacyjna	55
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.	56
6.1. Osiągnięcia dydaktyczne	56
6.2. Działalność popularyzatorska	56
7. Ważne informacje dotyczące kariery zawodowej	57
7.1. Granty, staże naukowe, wyróżnienia	57
7.2. Działalność ewaluacyjna projektów	57
7.3. Podsumowanie dorobku naukowego	57

1. Imię i nazwisko:

Anna Bratek-Skicki

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

- Dyplom magistra chemii – **2002** r. Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Tytuł pracy: „Synteza glicydoamidu i jego stopniowa poliaddycja do amin alifatycznych,” promotor: prof. dr hab. Edgar Bortel.
- Stopień naukowy doktora nauk chemicznych – **2009** r. Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN, Kraków. Tytuł pracy: „Influence of Adsorbed Polyelectrolytes on the Kinetics of Colloid Particle Deposition and the Topology of Their Monolayers,” promotor: prof. dr hab. Zbigniew Adamczyk

3. Informacje o zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

Obecnie

01.07.2018 – obecnie – Senior Postdoctoral Researcher – Vrije Universiteit Brussel, Bruksela, Belgia.

Poprzednie

01.10.2017 – 30.06.2018 – Visiting Researcher – Université Catholique de Louvain, Belgia.

01.10.2015 – 30.09.2017 – Postdoc w ramach indywidualnego stypendium Marii-Skłodowskiej – Curie – Université Catholique de Louvain, Belgia.

01.09.2013 – 31.08.2014 – urlop macierzyński

01.08.2010 – 30.09.2015 – Chemik – Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. J. Habera, Polska Akademia Nauk, Kraków, Polska (od **01.10.2015** r. – urlop bezpłatny).

01.06.2009 – 31.05.2010 – Postdoc – Centre for Bio-Nano Interactions, University College Dublin, Dublin, Irlandia.

01.10.2004 – 31.05.2009 – Studia doktoranckie – Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni, Kraków, Polska.

4. Omówienie osiągnięć stanowiących podstawę wniosku habilitacyjnego

Osiągnięciem naukowym, wynikającym z art. 219 ust. 1, pkt.2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. o stopniach i tytułach naukowych w systemie szkolnictwa wyższego i nauki (Dz. U. 2018, poz.1668) jest cykl powiązanych tematycznie artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych lub w recenzowanych materiałach z konferencji międzynarodowych, które w roku opublikowania artykułu w ostatecznej formie były ujęte w wykazie sporządzonym zgodnie z przepisami wydanymi na podstawie art. 267 ust. 2 pkt 2 lit.b.

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

„Adsorpcja białek na nośnikach polimerowych do zastosowań biomedycznych”

4.2. Publikacje naukowe będące podstawą wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego

[H1] Z. Adamczyk, **A. Bratek-Skicki**, P. Dąbrowska, M. Nattich-Rak, „Mechanisms of Fibrinogen Adsorption on Latex Particles Determined by Zeta Potential and AFM Measurements,” *Langmuir*, **2012**, 28, 1, 474–485. **IF¹ 2012 = 4,187, 5-letni IF₂₀₁₂ = 4,416.**

Jestem współautorką pomysłu i koncepcji badań. Zaplanowałam i wykonałam pełną charakterystykę fibrynogenu i mikrosfer polimerowych w funkcji pH i siły jonowej. Przeprowadziłam obliczenia ładunków mikrosfer polimerowych oraz cząsteczek fibrynogenu w badanych warunkach, zbadałam stabilność otrzymanych mikrosfer z zaadsorbowaną warstwą białka a następnie opracowałam wyniki doświadczalne i skorelowałam je z obliczeniami teoretycznymi, przygotowałam część materiału graficznego, współredagowałam manuskrypt, a po recenzji brałam udział w przygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów oraz w przygotowaniu korekty manuskryptu zgodnie z ich zaleceniami.

Swój wkład w powstanie publikacji szacuję na 50 %.

[H2] **A. Bratek-Skicki**, P. Żeliszewska, Z. Adamczyk, M. Cieśla, „Human Fibrinogen Monolayers on Latex Particles: Role of Ionic Strength,” *Langmuir*, **2013**, 29, 3700-3710. **IF₂₀₁₃ = 4.384, 5-letni IF₂₀₁₃ = 4.489.**

Mój wkład polegał na uczestnictwie w sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji, wykonaniu prac eksperymentalnych dotyczących sprawdzenia

¹ IF i 5-letni IF wg *Journal Citations Reports* (zgodnie z rokiem opublikowania).

stabilności monowarstwy fibrynogenu w różnych siłach jonowych, wykonaniu części pomiarów ruchliwości elektroforetycznej od stężenia fibrynogenu w roztworze z mikrosferami polimerowymi, przygotowaniu próbek lateksu z zaadsorbowanym fibrynogenem i ich pomiarze przy pomocy mikroskopu SEM, analizie danych eksperymentalnych i teoretycznych oraz ich dyskusji, przygotowaniu części wykresów oraz większej części manuskryptu. Po recenzji brałam udział w przygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów oraz w przygotowaniu korekty manuskryptu zgodnie z ich zaleceniami.

Swój wkład w powstanie publikacji szacuję na 55 %.

[H3] A. Bratek-Skicki, P. Żeliszewska, Z. Adamczyk, „Tuning Conformations of Fibrinogen Monolayer on Latex Particles by pH of Adsorption,” *Colloids and Surfaces B; Biointerfaces*, 2013, 103, 482–488. IF₂₀₁₃ = 4,287, 5-letni IF₂₀₁₃ = 4,226.

Mój wkład polegał na uczestnictwie w sformułowaniu celów badawczych oraz zaplanowaniu ich realizacji, sprawdzeniu stabilności monowarstw fibrynogenu o różnym stopniu pokrycia w założonym przedziale czasu, analizie danych eksperymentalnych i teoretycznych oraz ich dyskusji. Po recenzji brałam udział w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz w przygotowaniu korekty manuskryptu według ich zaleceń.

Swój wkład w powstanie publikacji szacuję na 55 %.

[H4] A. Bratek-Skicki, P. Żeliszewska, Z. Adamczyk, „Human Fibrinogen Adsorption on Latex Particles at pH 7,4 Studied by Electrophoretic Mobility and AFM Measurements,” *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2014, 14, 640-648. IF₂₀₁₄ = 3,402, 5-letni IF₂₀₁₄ = 3,632. Artykuł napisany na imienne zaproszenie wystosowane do Habilitantki.

Mój wkład polegał na uczestnictwie w sformułowaniu celów badawczych oraz zaplanowaniu ich realizacji, wykonaniu części pomiarów obejmujących zależność ruchliwości elektroforetycznej od stężenia fibrynogenu w roztworze z mikrosferami polimerowymi, analizie danych eksperymentalnych i teoretycznych oraz ich dyskusji, przygotowaniu części wykresów, większości tekstu manuskryptu, korespondencji z edytorem. Brałam udział w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz w przygotowaniu korekty manuskryptu po recenzji.

Swój wkład w powstanie publikacji szacuję na 55 %.

[H5] Z. Adamczyk, **A. Bratek-Skicki**, P. Żeliszewska, M. Wasilewska, „Mechanisms of Fibrinogen Adsorption at Solid Substrates,” *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2014**, 14,702-729. **IF₂₀₁₄ = 3,402**, 5-letni **IF₂₀₁₄ = 3,632**. Artykuł napisany na imienne zaproszenie wystosowane do **Habilitantki**.

Jestem współautorką koncepcji tej pracy, opisu i analizy danych literaturowych poświęconych mechanizmom adsorpcji fibrynogenu na mikrosferach polimerowych. W pracy skupiono się głównie na osiągnięciach dotyczących ilościowej interpretacji adsorpcji fibrynogenu na mikrosferach polimerowych za pomocą badań ruchliwości elektroforetycznej, pomiarów AFM oraz modeli teoretycznych (Gouy-Chapman, 3D). Przeprowadziłam szczegółowy przegląd literaturowy, przygotowałam większą część manuskryptu, wysłałam pracę do czasopisma. Przygotowałam odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz brałam udział w przygotowaniu korekty manuskryptu zgodnie z ich zaleceniami.

Swój wkład w powstanie publikacji szacuję na 65 %.

[H6] **A. Bratek-Skicki**, P. Żeliszewska, J.M. Ruso, „Fibrinogen: A Journey into Biotechnology,” *Soft Matter*, **2016**, 12, 8639-8653. **IF₂₀₁₆ = 3,889**, 5-letni **IF = 3,632**

Jestem współautorką koncepcji tej pracy przeglądowej opisującej oddziaływanie fibrynogenu z ligandami funkcyjnymi oraz opisującej znaczenie fibrynogenu jako głównego inhibitora surfaktantów płucnych oraz jego adsorpcji na powierzchniach granicznych ciało stałe/ciecz. Przeprowadziłam szczegółowy przegląd literaturowy, przygotowałam większą część manuskryptu, przygotowałam materiał graficzny oraz odpowiedzi na uwagi recenzentów a po recenzji przeprowadziłam korektę manuskryptu zgodnie z ich zaleceniami.

Swój wkład w powstanie publikacji szacuję na 70 %.

[H7] A. vander Straeten, **A. Bratek-Skicki**, L. Germain, C. d'Haese, P. Eloy, C.A. Fustin, C. Dupont-Gillain, „Protein-Polyelectrolyte Complexes to Improve the Biological Activity of Proteins in Layer-by-Layer Assemblies,” *Nanoscale*, **2017**, 9, 17186-17192. **IF₂₀₁₇ = 7,233**, 5-letni **IF₂₀₁₇ = 7,713**.

Mój wkład polegał na uczestnictwie w sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji, wykonaniu części prac eksperymentalnych dotyczących charakterystyki kompleksów białko/polielektrolit obejmujących pomiary ruchliwości elektroforetycznej oraz współczynników dyfuzji. Przeprowadziłam analizę danych

eksperymentalnych, brałam udział w przygotowaniu tekstu manuskryptu, korekcie manuskryptu według zaleceń recenzentów oraz opracowaniu odpowiedzi na ich pytania.

Swój wkład w powstanie publikacji szacuję na 40 %.

[H8] A. vander Straeten, **A. Bratek-Skicki**, A.M. Jonas, C.-A. Fustin, C. Dupont-Gillain, „Integrating Proteins in Layer-by-Layer Assemblies Independently of their Electrical Charge,” *ACS Nano*, **2018**, 12 (8), pp 8372–8381. **IF₂₀₁₈ = 13.942, 5-letni IF₂₀₁₈ = 13.951.**

Mój wkład polegał na uczestnictwie w sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji, wykonaniu części prac eksperymentalnych dotyczących pomiarów ruchliwości elektroforetycznej, współczynników dyfuzji utworzonych kompleksów w badanych warunkach pH i siły jonowej oraz stabilności utworzonych kompleksów białko/polielektrolit. Przeprowadziłam analizę danych eksperymentalnych i teoretycznych, brałam udział w przygotowaniu tekstu manuskryptu, korekcie manuskryptu według zaleceń recenzentów oraz opracowaniu odpowiedzi na ich pytania.

Swój wkład w powstanie publikacji szacuję na 40 %.

[H9] **A. Bratek-Skicki**, P. Eloy, M. Morga, C. Dupont-Gillain, „Reversible Protein Adsorption on Mixed PEO/PAA Polymer Brushes: Role of Ionic Strength and PEO Content,” *Langmuir*, **2018**, 34 (9), pp 3037–3048. **IF₂₀₁₈ = 3,683, 5-Letni IF₂₀₁₈ = 4,147.**

Mój wkład polegał na sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji, wykonaniu większości prac eksperymentalnych obejmujących pomiary kinetyki adsorpcji i desorpcji białek na homo i -heterogenicznych szczotkach polimerowych utworzonych z PAA i PEO. Wykonałam pełną charakterystykę szczotek polimerowych za pomocą spektroskopii fotoelektronów (X- Ray Photoelectron Spectroscopy) i mikroskopii sił atomowych (AFM), przeprowadziłam analizę danych eksperymentalnych. Przygotowałam cały manuskrypt wraz z obliczeniami i materiałem graficznym z wyjątkiem wykresów przedstawiających wyniki pochodzące z pomiarów potencjału przepływu. Po recenzji, przygotowałam odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz korektę manuskryptu według ich zaleceń.

Swój wkład w powstanie publikacji szacuję na 80 %.

[H10] **A. Bratek-Skicki**, V. Cristaudo, J. Savocco, S. Nootens, P. Morsomme, A. Delcorte, C. Dupont-Gillain, „Mixed Polymer Brushes for the Selective Capture and Release of Proteins,” *Biomacromolecules*, **2019**, 20, 2, 778-789. **IF₂₀₁₉ = 6.092, 5-Letni IF₂₀₁₉ = 5.775.**

Mój wkład polegał na sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji, wykonaniu wszystkich prac eksperymentalnych dotyczących kinetyk tworzenia szczotek polimerowych (kwas poli(akrylowy) – PAA, tlenek poli(etylenu)-PEO) oraz monitorowaniu procesu adsorpcji białek (z mieszaniny fibrynogen/lizozym/albumina) za pomocą mikrowagi kwarcowej. Przeprowadziłam pomiary służące identyfikacji zaadsorbowanych białek na powierzchni złota za pomocą spektrometrii mass (Time of Flight Ion Mass Spectrometry) połączonej z analizą głównych składowych (Principal Component Analysis) oraz elektroforezy żelowej. Przygotowałam cały manuskrypt wraz z materiałem graficznym z wyjątkiem wykresów przedstawiających wyniki uzyskane metodą ToF-SIMS. Po recenzji, przygotowałam odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz korektę manuskryptu według ich zaleceń.

Swój wkład w powstanie publikacji szacuję na 80 %.

[H11] A. Bratek-Skicki, „Design of Ultra-Thin PEO/PDMAEMA Polymer Coatings for Tunable Protein Adsorption,” *Polymers*, 2020, 12(3), 660. IF₂₀₁₉ = 3,426, 5-letni IF= 3,636.

Jestem autorem pomysłu i koncepcji badań. Sformułowałam cele badawcze, zaplanowałam i wykonałam wszystkie prace eksperymentalne oraz napisałam manuskrypt. Po recenzji przygotowałam odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz przeprowadziłam korektę manuskryptu według ich zaleceń.

Swój wkład w powstanie publikacji szacuję na 100 %.

Podsumowanie cyklu publikacji wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej

Liczba publikacji: **11**

Sumaryczny IF zgodnie z datą opublikowania: **57,888**.

Sumaryczny 5-letni IF: **60,513**.

Liczba cytowań (z dn. 15.10.2020): **176** (*Web of Science*)

Liczba cytowań bez autocytowań (z dn. 15.10.2020): **150** (*Web of Science*)

4.3. Omówienie osiągnięcia naukowego

4.3.1 Tło naukowe

4.3.1.1 Znaczenie procesu adsorpcji białek

Adsorpcja białek na powierzchniach stałych jest powszechnym procesem odgrywającym istotną rolę w wielu zastosowaniach medycznych, farmaceutycznych, analitycznych i biotechnologicznych. Adsorpcja białek może być zjawiskiem zarówno pożądanym jak i niepożądanym. W wielu reakcjach zachodzących na syntetycznych

macierzach zewnątrzkomórkowych, adsorpcja białka jest zjawiskiem niezbędnym do prawidłowego rozwoju tkanki. Natomiast w przypadku implantów biomedycznych mających kontakt z płynami ustrojowymi adsorpcja białek jest zjawiskiem niepożądanym, które może prowadzić do zakrzepicy lub wystąpienia stanów zapalnych zagrażających zdrowiu lub życiu pacjenta [1-9]. W wielu badaniach analitycznych niespecyficzna adsorpcja białka na powierzchni chipu bądź biosensora może doprowadzić do nieprawidłowego odczytu bądź uszkodzenia urządzenia. Z tego powodu poznanie mechanizmów adsorpcji białek, opracowanie nowych metod mających na celu kontrolowanie procesów adsorpcji na różnych powierzchniach jest niesamowicie istotnym zagadnieniem skupiającym uwagę wielu badaczy.

4.3.1.2 Czynniki wpływające na adsorpcję białek

Właściwości białek a adsorpcja

Białka są złożonymi biopolimerami zbudowanymi z 20 aminokwasów, które określają ich strukturę pierwszorzędową. Cząsteczki białek posiadają również strukturę drugorzędową, która jest wynikiem obecnych wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych. Z kolei struktura trzeciorzędowa jest określona poprzez mostki wodorowe, oddziaływania jonowe i oddziaływania van der Waalsa. W przypadku białek zbudowanych z kilku łańcuchów polipeptydowych możliwa jest struktura czwartorzędowa. Molekuły białek w większości przypadków są asymetryczne, a tylko w wyjątkowych przypadkach mają kształt kulisty. Najczęściej występują w formie elipsoidy, litery Y jak immunoglobuliny lub serco-kształtnej, jak w przypadku albuminy ludzkiej (HSA). Białka w roztworze poruszają się swobodnie, a po adsorpcji przyjmują określoną orientację. Ich orientacja określa, która część przylega do powierzchni, a która jest wyeksponowana do roztworu. Jest to niezwykle istotne jeśli mamy do czynienia z białkami enzymatycznymi czy receptorami, gdyż niewłaściwa orientacja biomolekuły wpływa na jej funkcjonalność [8]. Adsorpcja białek z roztworu do powierzchni zachodzi poprzez jeden bądź kilka głównych mechanizmów transportu: dyfuzję, konwekcję termiczną, przepływ masowy. Ponadto transport białek, gradienty stężenia, temperatura, rozmiar białka, jak i prędkość przepływu mają znaczący wpływ na adsorpcję białek do powierzchni stałej. Dyfuzja małych białek jest szybsza niż dużych, gdyż mniejsze białka docierają do powierzchni szybciej, natomiast duże biomolekuły wiążą się z powierzchnią mocniej ze względu na ich rozmiar. Co więcej, mogą one również wypychać wcześniej zaadsorbowane mniejsze białka, co jako pierwszy zaobserwował i opisał Leo Vroman [10].

Środowisko zewnętrzne

Warunki środowiska określone przez temperaturę, pH, siłę jonową czy rodzaj buforu wywierają ogromny wpływ na właściwości białek a w konsekwencji na ich proces adsorpcji. Głównym czynnikiem regulującym adsorpcję białek jest wzrost entropii spowodowany uwolnieniem z powierzchni cząsteczek wody oraz jonów, a także przeorganizowaniem struktury białka. Ilość zaadsorbowanego białka na powierzchni rośnie wraz ze wzrostem temperatury, która wpływa na równowagę termodynamiczną oraz kinetykę adsorpcji białek. Wyższa temperatura wywołuje zwiększoną dyfuzję molekuł białek w kierunku powierzchni adsorpcyjnej. Bardzo ważnym czynnikiem jest również pH i siła jonowa roztworu, które wpływają na stan elektrostatyczny białka. W pH równym punktowi izoelektrycznemu (pI) ładunki na powierzchni białka są skompensowane, a cała molekula jest elektrycznie obojętna. W pH niższym niż pI, białko jest dodatnio naładowane, zaś w pH wyższym niż pI ujemnie naładowane. Jeżeli powierzchnia adsorpcyjna jest również naładowana, wówczas proces adsorpcji jest również kontrolowany przez oddziaływania elektrostatyczne. Oprócz oddziaływań białko-powierzchnia istnieją dodatkowo oddziaływania między białkami, które mogą powodować zwiększenie lub zmniejszenie upakowania na powierzchni, co z kolei może być regulowane siłą jonową roztworu. Zbyt wysoka siła jonowa może jednak sprzyjać tworzeniu agregatów białek.

Właściwości powierzchni a adsorpcja

Ważnymi parametrami powierzchni, które wpływają na proces adsorpcji białek jest ładunek, polarność, energia powierzchniowa, morfologia oraz chropowatość. Białka w trakcie adsorpcji przyjmują orientację, która zapewnia im minimum energii swobodnej, wynika to z oddziaływań kulombowskich, wiązań wodorowych, van der Waalsa i wzrostu entropii. Ze względu na heterogeniczny charakter białek (ładunek, hydrofobowość) przyjmuje się, że adsorpcja białek na powierzchniach hydrofobowych odbywa się przy udziale fragmentów hydrofobowych białka, natomiast jeśli adsorpcja zachodzi na powierzchniach naładowanych, wtedy białka eksponują do roztworu fragmenty o ładunku przeciwnym [11]. Te wyjątkowe właściwości białek powodują że proces adsorpcji jest skomplikowany, a jego zrozumienie stanowi duże wyzwanie dla badaczy.

4.3.1.3 Metody immobilizacji białek

Mikrosfery polimerowe

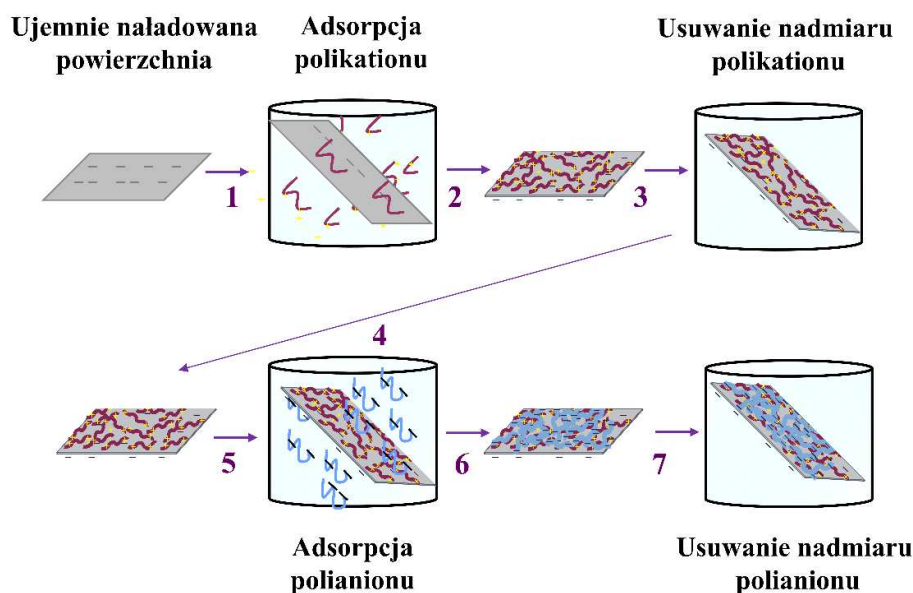
Adsorpcja białek na różnych nośnikach również sferycznych jest jednym ze sposobów ich immobilizacji i znajduje wiele zastosowań w medycynie, biokatalizie i przemyśle biomedycznym. Analiza danych literaturowych wykazała, że pomimo ogromnego znaczenia tego procesu, oraz licznych zastosowań praktycznych brakuje jest ilościowego opisu procesów nieodwracalnej adsorpcji białek [8-11]. Opis taki wymaga dogłębnej wiedzy dotyczącej właściwości białek w roztworach, ich struktury, kształtu, konformacji, stopnia hydratacji, ładunku, etc. Istotny wpływ na wyżej wymienione właściwości mają takie czynniki jak pH roztworu, siła jonowa czy temperatura. Dodatkowo, po dogłębnym przeglądzie literaturowym nie znaleziono badań związanych z kinetyką tworzenia warstw białkowych, jak również ich stabilności w różnych warunkach. Jest to głównie spowodowane szerokim zastosowaniem metod pośrednich do których możemy zaliczyć elipsometrię czy oznaczanie izotopowe. Aby zrozumieć proces adsorpcji należy najpierw określić strukturę powstałych warstw białkowych stosując metody bezpośrednie takie jak mikroskopia sił atomowych. Właściwości warstw białkowych można też badać za pomocą potencjału przepływu. Niestety, metoda ta jest niezwykle czuła dla niskich pokryć, przez co trudne jest wyznaczenie maksymalnego pokrycia.

W dalszej części tego autoreferatu skupiono się na modelowym układzie cząstka polimerowa-białko i opisano ilościowy proces adsorpcji fibrynogenu na ujemnie naładowanych mikrosferach polimerowych. Adsorpcja fibrynogenu na cząstkach polimerowych była rzadko badana, pomimo tego, że określenie mechanizmów jego adsorpcji na mikrosferach polimerowych ma ogromne znaczenie w zastosowaniach praktycznych m.in. w testach immunologicznych. Nieliczne badania dotyczące tematu przeprowadzono w grupie Prof. Santore, w których wykorzystano ujemnie naładowaną krzemionkę o średnicy 1000 nm jako powierzchnię adsorbującą dla fibrynogenu [12]. Ilość zaadsorbowanego fibrynogenu wyznaczono za pomocą techniki TIRF, aczkolwiek wyniki tych badań nie były interpretowane w sposób ilościowy.

Metoda „warstwa po warstwie” (ang. *Layer-by-Layer - LbL*)

Zachowanie właściwości białek, jak i zapobieganie ich denaturacji stanowią główne wyzwania w opracowaniu nowych technologii związanych z adsorpcją białek [13]. Wykazano, że immobilizacja białek na powierzchniach warstw polielektrolitowych gwarantuje zachowanie ich właściwości. Dzieje się to dzięki silnej hydratacji, efektywnemu oddziaływaniu białka z

przeciwnie naładowanymi powierzchniami (cząsteczkami) prowadzącemu do inwersji ładunku całego układu oraz do zmian sił powierzchniowych [14-21]. Proces adsorpcji polielektrolitów zachodzi głównie dzięki długo zasięgowym oddziaływaniom elektrostatycznym i jest zależny od natury substratu, jego ładunku jak również właściwości roztworu [22,23]. W zależności od grup funkcyjnych polielektrolity można podzielić na polikationy, polianiony oraz poliamfolity zawierające zarówno grupy kationowe, jak i anionowe. Kontrolowana adsorpcja różnego rodzaju polielektrolitów prowadzi do powstania wielowarstwowych filmów, które znalazły szerokie zastosowanie w wielu dziedzinach m.in. w biotechnologii, farmacji czy medycynie. Takie multiwarstwy są tworzone głównie przez naprzemienną adsorpcję przeciwnie naładowanych polielektrolitów, określaną mianem „warstwa po warstwie” (ang. *Layer-by-Layer* – LbL). Schemat tworzenia multiwarstw polielektrolitowych metodą LbL został przedstawiony na **Rys.1**.



Rys.1. Schemat tworzenia wielowarstwowych filmów polielektrolitowych metodą LbL.

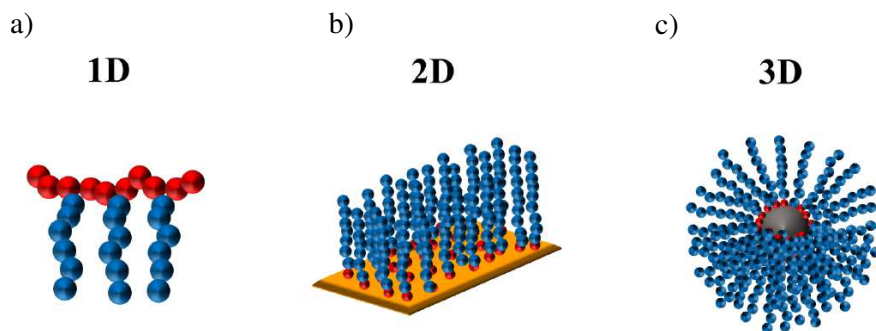
Główną zaletą multiwarst jest możliwość wprowadzania w ich struktury różnych aktywnych cząstek, bądź związków takich jak DNA, wirusy czy leki przeciwnowotworowe [24-26]. W literaturze przedstawiono możliwość wprowadzenia białek w struktury polielektrolitowe zastępując polikation lub polianion wybranym białkiem. Podejście to stwarza jednak wiele ograniczeń związanych z heterogenicznym rozkładem ładunku występującym w białkach. W związku z tym, pH, siła jonowa oraz rodzaj polielektrolitu muszą być tak dobrane,

aby zapewnić efektywny wzrost grubości powłok polimerowych a co za tym idzie ilość wprowadzanego białka. W przeciwnym przypadku, wzajemne odpychanie się podobnie naładowanych grup funkcyjnych białka lub/i polielektrolitu może doprowadzić do zahamowania wzrostu multiwarstw, bądź do dezaktywacji biomolekuł. W literaturze przedstawiona została efektywna metoda immobilizacji białek metodą LbL, niemniej jednak możliwa była ona tylko w wąskim zakresie pH [27-32]. Z tego powodu koniecznym było wprowadzenie nowego podejścia, w którym heterogeniczny charakter białek oraz anizotropia ich ładunku zostaną wyeliminowane. Rozwiązaniem, które spełnia ten warunek są kompleksy białkowo-polielektrolitowe (ang. *protein-polyelectrolyte complexes* - PPCs). Idea wstępnego tworzenia kompleksów, a następnie ich wprowadzania w struktury polielektrolitowe metodą LbL była praktykowana już na samym początku jej powstania, co prowadziło do tworzenia struktur o różnej architekturze i funkcjonalności. Wychodząc naprzeciw potrzebie tworzenia funkcjonalnych struktur białkowo-polielektrolitowych powrócono do tej metody w taki sposób, aby aktywność białek, ich struktura, a co za tym idzie funkcjonalność nie zostały zmienione. Stało się to jednym z głównych celów badawczych opisanych szczegółowo w dalszej części tego autoreferatu.

Szczotki polimerowe

Kolejną, dynamicznie rozwijającą się metodą immobilizacji białek na powierzchniach stałych jest metoda oparta na wykorzystaniu szczotek polimerowych. Termin szczotki polimerowe jest pojęciem ogólnym, który w szerokim znaczeniu oznacza materiały z doszczepioną do podłoża warstwą łańcuchów polimerowych. Umownie takie materiały dzieli się na trzy grupy: 1D, 2D oraz 3D, co oznacza odpowiednio szczotki polimerowe jedno-, dwu- i trójwymiarowe (**Rys. 2**). Szczotki polimerowe 1 D składają się z polimeru liniowego (ang. *backbone*) pełniącego rolę szkieletu do którego dołączone są odpowiednio łańcuchy innego polimeru (ang. *side chains*). W zależności od ilości łańcuchów bocznych związanych ze szkieletem definiuje się gęste lub luźne szczotki polimerowe [33-36].

Szczotki polimerowe typu 2 D są tworzone na powierzchniach płaskich do których dołączone są łańcuchy polimerowe, a ich liczba przypadająca na 1 nm² określa gęstość szczepienia. Gdy powierzchnie substratów na których szczepione są polimery mają kształt kulisty powstają szczotki polimerowe typu 3D [33].



Rys.2. Schemat szczotek polimerowych typu a) 1D, b) 2D, c) 3D.

Istnieją trzy główne metody szczepienia szczotek polimerowych: „szczepianie do” (ang. *grafting to*), „szczepianie od” (ang. *grafting from*) i „szczepianie przez” (ang. *grafting through*) [33]. Każda z tych metod ma pewne ograniczenia, ale jednocześnie oferuje wiele różnych korzyści. W metodzie „szczepiania do” uprzednio zsyntetyzowane i scharakteryzowane łańcuchy polimerowe doszczepia się do odpowiedniego podłoża. W tym przypadku uzyskanie dużych gęstości szczepienia jest raczej niemożliwe ze względu na dużą zawadę steryczną. W metodzie „szczepienia od” łańcuchy polimerowe syntetyzuje się bezpośrednio z określonego podłoża. Dzięki temu możliwe jest uzyskanie założonej długości łańcuchów oraz dużych gęstości szczepień. W metodzie „szczepienia przez” szczepienia dokonuje się poprzez grupy zdolne do polimeryzacji.

W literaturze wiele uwagi poświęca się szczotkom polimerowym, które reagują na bodźce zewnętrzne takie jak pH, siła jonowa, światło czy pole magnetyczne (ang. *stimuli-responsive brushes*) [37-41]. Mogą one być wykorzystywane jako materiały funkcyjne np. nanokompozyty, substancje stabilizujące różne dyspersje, nośniki substancji aktywnych czy materiały o znaczeniu biologicznym. Polielektrolitowe szczotki polimerowe zasługują na szczególną uwagę ze względu na to, że ich zmiany konformacyjne (ang. *swelling/deswelling*) można kontrolować takimi parametrami, jak pH, siła jonowa roztworu, wartościowość jonów rozpuszczalnika czy gęstością upakowania na powierzchni, a przez to wpływać na proces adsorpcji. W odpowiednim roztworze szczotki te mogą być rozciągnięte i zdolne do szybkiego wychwytywania białek lub innych analitów, a w innych zwinięte i zdolne do ich usuwania.

Zwiększenie powierzchni adsorpcyjnej szczotek polimerowych wynikające z ich struktury może zwiększać wydajność i/lub czułość urządzeń analitycznych, które wykorzystują ich właściwości. Urządzenia takie mogą być wykorzystane jako absorbenty membranowe,

mikromacierze białkowe i modyfikowane płytki stosowane w spektrometrii typu MALDI (ang. *matrix-assisted laser desorption/ionization*) do wychwytywania białek. Metody te bazują na tworzeniu kompleksów z metalami (np. Ni^{2+}), wiązaniu kowalencyjnym czy adsorpcji fizycznej. Jednakże, dużym problemem jest opracowanie metody, która pozwalałaby na czasową i selektywną adsorpcję białka z jej mieszaniny. Interesujące w tym aspekcie są szczotki polimerowe utworzone z dwóch różnych polimerów, które odpowiednio reagowałyby na bodźce środowiska zewnętrznego. Połączenie dwóch lub kilku polimerów budujących szczotkę pozwala nie tylko na wprowadzenie różnej funkcjonalności, ale wpływa również na morfologię takiego układu [39]. Uhlmann et al. [40] badali adsorpcję α -laktalbuminy i α -chymotrypsyny na szczotkach polimerowych złożonych z dwóch polielektrolitów: słabej polizasady (poli(2-winylopirydyny) (P2VP)) oraz słabego polikwasu (kwasu poli(akrylowego) (PAA)). Zmieniając pH i siłę jonową roztworu regulowano ilość zaadsorbowanych białek. Mieszane szczotki polimerowe złożone z polimeru adsorbującego białko oraz polimeru, który zapobiega adsorpcji białek wydaje się być szczególnie interesujące ze względu na możliwość sterowania procesem adsorpcji. Przykładem takiego układu mogą być szczotki zbudowane z poli(tlenku etylenu) (PEO) oraz poli(kwasu akrylowego-b-styrenu) (PAA-PSS) badane przez Hoy et al. [41]. Właściwości szczotek były zmieniane przez ilość wprowadzonego PEO do powierzchni adsorpcyjnej natomiast adsorpcja białek była kontrolowana za pomocą siły jonowej, pH oraz stężenia jonów Ca^{2+} . Niestety układ ten nie był odpowiedni do uzyskania całkowitej desorpcji białek.

4.3.2. Cel pracy

Biorąc pod uwagę problemy związane z adsorpcją białek głównym celem przeprowadzonych badań było opracowanie nowych metod immobilizacji białek na powierzchniach polimerowych, a w szczególności:

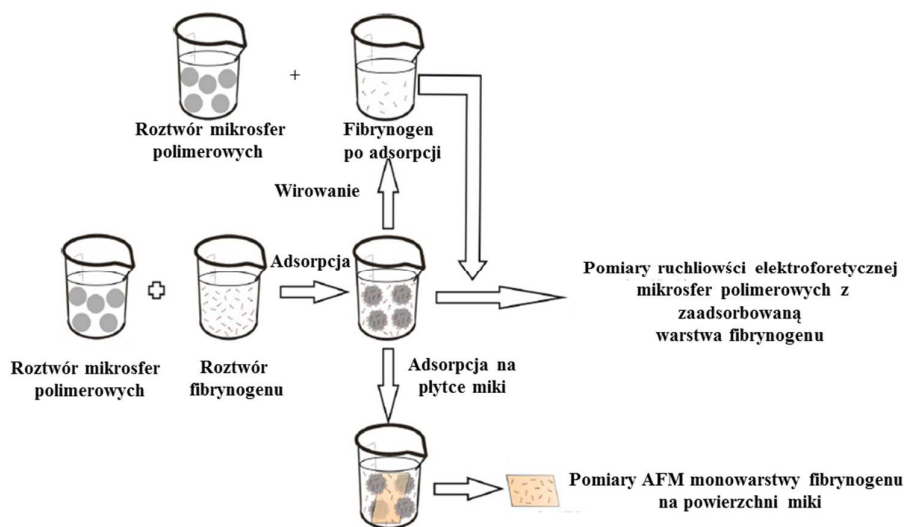
1. Określenie mechanizmów adsorpcji fibrynogenu, jako białka modelowego na mikrosferach polimerowych, stabilności tworzonych warstw oraz pokryć maksymalnych.
2. Określenie mechanizmu powstawania kompleksów białkowo-polielektrolitowych wykorzystywanych do wprowadzania dużych ilości białek w filmy polielektrolitowe wytwarzane metodą LbL przy zachowaniu ich aktywności biologicznej.
3. Opracowanie metody wytwarzania szczotek polimerowych umożliwiających efektywną i selektywną adsorpcję białek z roztworów mieszaniny białek.

Przeprowadzone badania umożliwiają lepsze zrozumienie mechanizmów adsorpcji białek, zachodzących na różnych powierzchniach polimerowych. Ponadto, określenie warunków w których zachodzi kontrolowana adsorpcja lub desorpcja białek może znaleźć zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu np. w biokatalizie, w testach immunologicznych o wysokiej czułości, czy w procesach selektywnego dostarczania leków.

4.3.3. Metodologia badań

Mikrosfery polimerowe

Adsorpcja fibrynogenu ludzkiego oraz wołowego była prowadzona na ujemnie naładowanych mikrosferach polimerowych mających średnicę 810 nm (wyznaczoną z pomiarów DLS), syntezowanych według procedury Godwina [42]. Pierwszy etap badań obejmował charakterystykę fizykochemiczną białek oraz mikrosfer polimerowych w szerokim zakresie pH (3,0 - 10,0) oraz siły jonowej ($I = 10^{-3} \text{ M} - 0,15 \text{ M}$). Proces adsorpcji fibrynogenu na mikrosferach był monitorowany za pomocą pomiarów ruchliwości elektroforetycznej, a jego maksymalne pokrycie zostało wyznaczone przez określenie ilości fibrynogenu pozostałego po adsorpcji metodą mikroskopii sił atomowych (AFM). Na **Rys. 3** przedstawiono schemat zastosowanych metod eksperymentalnych.



Rys. 3. Schemat procedury zastosowanej do określenia maksymalnego pokrycia fibrynogenu na mikrosferach polimerowych.

W metodzie pierwszej, niezwiązane cząsteczki fibrynogenu, które pozostały w roztworze po adsorpcji na mikrosferach polimerowych były adsorbowane na powierzchni miki. Następnie przy użyciu mikroskopii sił atomowych określono ich stężenie w suspensji po

adsorpcji. W metodzie drugiej za pomocą wirówki laboratoryjnej oddzielono cząstki polimerowe z zaadsorbowanym fibrynogenem. Następnie zdekantowano roztwór z nadmiarowym białkiem i dodano do niego odpowiednią ilość mikrosfer, po czym określono stężenie białka poprzez pomiar ruchliwości elektroforetycznej otrzymanej suspensji.

Kompleksy polielektrolitowo-białkowe (ang. *protein-polyelectrolyte complexes – PPCs*)

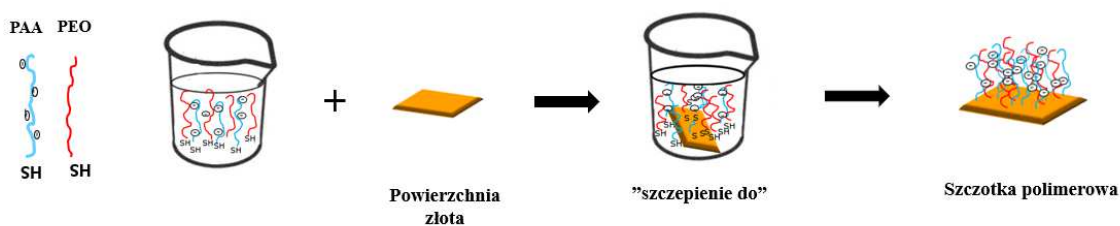
Do tworzenia kompleksów białkowo-polielektrolitowych wykorzystano poli(styreno-4-sulfonianu sodu) (PSS) o masie molowej $M_n = 7540$ g/mol oraz roztwory lizozymu, którego punkt izoelektryczny występuje w pH 11,3. Lizozym jest enzymem hydrolitycznym, rozkładającym peptydoglikan występujący w ścianach komórkowych bakterii. Drugim polielektrolitem wykorzystywanym do tworzenia pokryć polielektrolitowych był chlorowodorek poli(alliloaminy) (PAH) o masie molowej $M_n = 17\,500$ g/mol. Powstawanie wielowarstwowych pokryć z wbudowanymi kompleksami PPCs było zapoczątkowane przez utworzenie stabilnej multiwarstwy [PAH- PSS]₂ na powierzchni złota. Następnym krokiem było naprzemienne wprowadzenie kompleksów lizozym/PSS oraz PAH-u.

Kompleksy były tworzone w szerokim zakresie pH (3,0, 5,0, 7,5, 9,6) przy zastosowaniu różnych buforów (kwasu 2-[4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynylo] etanosulfonowego soli sodowej (HEPES), buforu cytrynowego, octanowego i węglowego), oraz różnej siły jonowej (10, 200, 800 mM) regulowanej chlorkiem sodu. Objętość roztworu lizozymu była utrzymywana na stałym poziomie, podczas gdy PSS i bufor były dodawane w taki sposób, aby otrzymać różne wartości stosunku teoretycznego ładunku PSS-u do ładunku lizozymu, (-)/(+) (od 0 do 2) oraz żeby stężenie lizozymu pozostawało stałe. Ładunek lizozymu obliczono w funkcji pH na podstawie jego sekwencji aminokwasowej za pomocą PDB 2PQR [43]. Tworzenie kompleksów białkowo-polielektrolitowych było badane za pomocą turbidymetrii, mikrowagii kwarcowej, dynamicznego rozpraszania światła oraz mikroskopii sił atomowych.

Szczotki polimerowe (ang. *polymer brushes*)

Szczotki polimerowe były szczepione na powierzchni złota metodą „szczepienia do” z wykorzystaniem grupy tiolowej obecnej na jednym z końców łańcucha polimerowego. Zastosowano trzy rodzaje polimerów: kwas poli(akrylowy) (PAA) o masie molowej $M_n = 2000$ g/mol, poli (2- (dimetyloamino) metakrylan etylu) (PDMAEMA) o masie molowej $M_n = 8500$ g/mol oraz poli(tlenek etylenu) o masie molowej $M_n = 1100, 2000, 5000$ g/mol. PAA jest słabym anionowym polielektrolitem, którego stopień jonizacji zależy od pH roztworu. Wraz ze

wrostem pH jego ładunek wzrasta w związku z deprotonacją grup karboksylowych, co sprawia, że PAA jest zdolny do pęcznienia tj. wchłaniania i zatrzymywania wody. PDMAEMA jest słabym polielektrolitem kationowym którego stopień jonizacji również zależy od pH roztworu. Dla $\text{pH} < 9,0$ jest dodatnio naładowany, co jest wynikiem protonacji trzeciorzędowych grup aminowych. Poli(tlenek etylenu) (PEO), znany również jako poli(glikol etylenowy), (PEG), jest polimerem charakteryzującym się elastycznością łańcuchów oraz wysokim stopniem uwodnienia, co powoduje, że będąc zakotwiczony na powierzchni przeciwdziała adsorpcji białek. Szczotki polimerowe w przedstawionej pracy tworzone były poprzez równoczesne szczepienie PAA oraz PEO na powierzchni złota jak to zostało przedstawione na **Rys. 4**.



Rys. 4. Schemat tworzenia szczotek polimerowych metoda „szczepienia do” na powierzchni złota [45].

Właściwości adsorpcyjne szczotek polimerowych były zmieniane poprzez zastosowanie różnego stosunku masowego PEO/PAA (100/0, 10/90, 50/50, 0/100) oraz różnej masy molowej PEO (PEO1- 1100 g/mol, PEO2-2000 g/mol, PEO5- 5000 g/mol) podczas gdy masa molowa PAA była stała ($M_n = 2000$ g/mol).

Do badania adsorpcji i desorpcji białek na szczotkach polimerowych zostały wybrane trzy białka różniące się: kształtem, wielkością oraz ładunkiem. Białkami tymi były: albumina ludzka (ang. *human serum albumin* - HSA), lizozym (Lyz) i fibrynogen ludzki (Fb). HSA jest białkiem globularnym, będącym głównym składnikiem osocza krwi, o masie cząsteczkowej 66 kDa, wykazującym punkt izoelektryczny przy $\text{pH } 5,0$ [46]. Lyz jest białkiem kationowym o masie cząsteczkowej 14,4 kDa [47]. HSA jest białkiem miękkim, które po adsorpcji może zmieniać konformację, podczas gdy lizozym jest uznawany za białko twarde, które nieznacznie zmienia swoją konformację. Fb jest bardzo dużym białkiem o masie 340 kDa, które odgrywa istotną rolę w procesach krzepnięcia krwi i zostało wybrane do badań ze względu na jego zdolność adsorpcji powyżej jego punktu izoelektrycznego (iep. 5,8) [48]. Procesy adsorpcji białek były prowadzone w roztworze o $\text{pH } 7,4$ lub $9,00$ oraz sile jonowej $I = 10^{-3}$ M, $I = 10^{-2}$ M, natomiast procesy desorpcji były przeprowadzone w $\text{pH } 9,0$, dla siły jonowej $0,15$ M regulowanej chlorkiem sodu.

Metody instrumentalne

Polimerowe układy wykorzystane do adsorpcji białek charakteryzowano różnymi komplementarnymi technikami z których najważniejsze są: dynamiczne rozpraszanie światła (DLS), mikroelektroforeza z analizą dopplerowską (LDA), turbidymetria, mikroskopia sił atomowych (AFM), mikrowaga kwarcowa (QCM), spektroskopia fotoelektronów w zakresie promieniowania X (XPS), spektrometria masowa wtórnych jonów z analizatorem czasu przelotu (ToF-SIMS), pomiary potencjału przepływu oraz elektroforeza żelowa.

Metody teoretyczne

Wyniki eksperymentalne dotyczące adsorpcji fibrynogenu na mikrosferach polimerowych były analizowane w oparciu o model teoretyczny Gouya–Chapmana (GC) oraz model elektrokinetyczny 3D. W modelu GC zakłada się, że cała powierzchnia substratu po adsorpcji pokryta jest zaadsorbowanymi molekułami o równomiernym ładunku powierzchniowym (σ) zdefiniowanym równaniem 1. Zaadsorbowane cząsteczki traktowane są jako płaskie obiekty 2D, które adsorbują się między łańcuchami polimerycznymi na powierzchni mikrosfer [49]. Zgodnie z założeniami wypadkowy ładunek powierzchniowy wytworzony przez adsorpcję molekuł, w tym przypadku fibrynogenu można wyznaczyć z równania:

$$\sigma = \sigma_0 + N_f N_c \quad (1)$$

gdzie: σ_0 to gęstość ładunku powierzchniowego mikrosfer niepokrytych białkiem [$e \text{ nm}^{-2}$], N_f – stężenie powierzchniowe fibrynogenu [μm^{-2}], N_c – ilość ładunków na cząsteczkach fibrynogenu wyznaczona z ruchliwości elektroforetycznej [e].

Znając wypadkowy ładunek powierzchniowy, potencjał dzeta badanych cząstek można obliczyć z następującego wzoru

$$\zeta = \pm \frac{2kT}{e} \ln \frac{|\bar{\sigma}| + \left(\bar{\sigma}^2 + 4\right)^{1/2}}{2} \quad (2)$$

gdzie: znak $\pm$ związany jest ze znakiem σ , $\bar{\sigma}$ jest bezwymiarową gęstością ładunku elektrokinetycznego, wyznaczoną z zależności $\bar{\sigma} = \sigma / (2\epsilon k T n_b)^{1/2}$.

W modelu elektrokinetycznym 3D zakłada się, że rozkład ładunku na powierzchni zaadsorbowanych molekuł jest trójwymiarowy [49]. Zgodnie z założeniami potencjał dzeta powierzchni pokrytej cząstkami można obliczyć z następującego równania:

$$\zeta(\Theta) = F_i(\Theta)\zeta_i + F_p(\Theta)\zeta_p \quad (3)$$

gdzie: $F_i(\Theta)$ oraz $F_p(\Theta)$ są funkcjami bezwymiarowymi zależnymi od pokrycia mikrosfer białkiem oraz od kształtu białka, Θ jest pokryciem mikrosfer obliczonym na podstawie wzoru:

$$\Theta = S_g N_f \quad (4)$$

gdzie: S_g to pole przekroju cząsteczki fibrynogenu wyrażone w $[\text{nm}^2]$ [49].

Wszystkie metody eksperymentalne oraz teoretyczne zostały szczegółowo opisane w załączonych publikacjach [H1-H11].

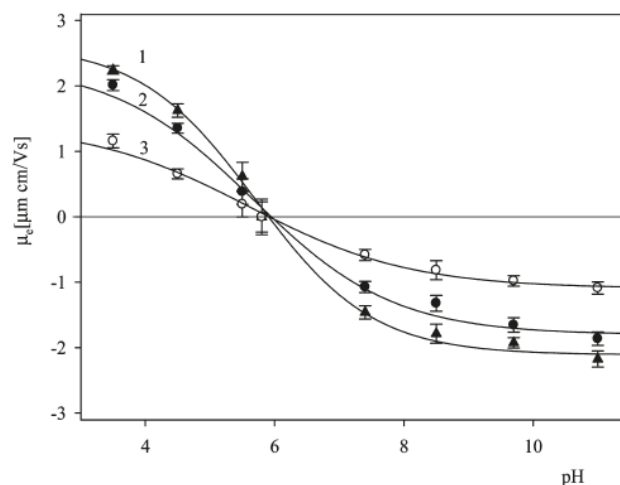
4.3.4 Omówienie najważniejszych wyników z prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Adsorpcja białek na powierzchniach stałych odgrywa istotną rolę w wielu procesach biochemicznych oraz w wielu gałęziach biotechnologicznych. Na szczególną uwagę zasługuje adsorpcja białek na nośnikach koloidalnych np. na powierzchniach lateksów polistyrenowych. Materiały te są wykorzystywane w tzw. testach aglutynacyjnych służących do diagnozy wielu chorób m.in. reumatoidalnego zapalenia stawów, twardziny czy zespołu Sjögrena. Metoda ta opiera się na wykorzystaniu mikrocząsteczek lateksu opłaszczonych specyficznymi przeciwciałami monoklonalnymi. Zmodyfikowane w ten sposób mikrocząsteczki inkubuje się z pobranym płynem ustrojowym. Jeśli zawiera on badany antygen, następuje widoczna makroskopowo aglutynacja. Przeciwciała monoklonalne są białkami o charakterystycznej budowie, mające zdolność do specyficznego oddziaływania z odpowiednim antygenem. Jednak, aby mogło dojść do takiego oddziaływania konieczna jest odpowiednia orientacja przeciwciała na zaadsorbowanej powierzchni.

Mając na uwadze powyższe fakty, w pracach **H1-H4** skupiono się na przeprowadzeniu badań umożliwiających opracowanie metod służących do określenia mechanizmów adsorpcji, orientacji białka oraz maksymalnego pokrycia biomolekuł na powierzchniach mikrosfer polimerowych. Wybrany białkiem modelowym był fibrynogen, białko osocza krwi odpowiedzialne za procesy krzepnięcia.

W pracy [H1] przeprowadzono dokładną charakterystykę fizykochemiczną ujemnie naładowanych mikrosfer polimerowych oraz fibrynogenu wołowego. Wykazano, że fibrynogen tworzy stabilne roztwory dla stężeń poniżej 5000 mg L^{-1} w zakresie $\text{pH} < 5,0$ oraz dla $\text{pH} > 6,0$ [49]. Wykonano pomiary ruchliwości elektroforetycznej oraz współczynników dyfuzji fibrynogenu dla trzech stężeń NaCl 10^{-3} , 10^{-2} , $0,15 \text{ M}$ oraz pH w zakresie $3,5 - 11,0$. Wartości współczynników dyfuzji były niezależne od stężenia roztworu, co było dowodem na to, że cząsteczki białka w roztworze nie oddziaływały ze sobą.

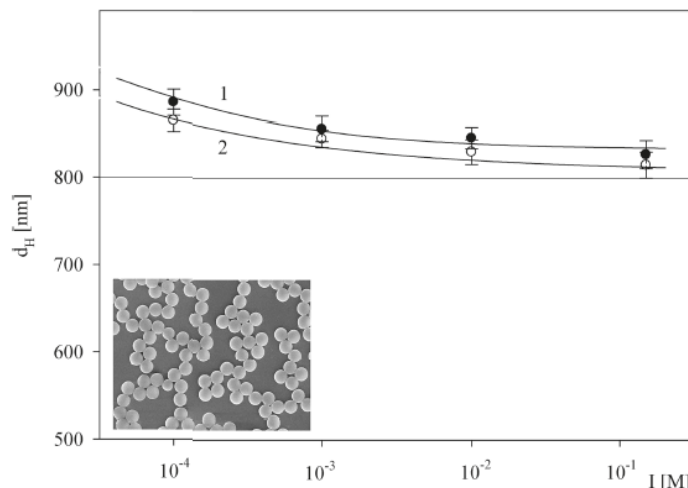
Następnie wyznaczono zależność ruchliwości elektroforetycznej cząsteczek fibrynogenu w funkcji pH dla trzech stężeń NaCl 10^{-3} , 10^{-2} , $0,15 \text{ M}$ (Rys.5). Wykonane zostały również pomiary współczynnika dyfuzji mikrosfer polimerowych, które wykazały, że ich średnica hydrodynamiczna maleje wraz ze wzrostem siły jonowej od 860 nm dla 10^{-4} M NaCl do wartości 810 nm dla 10^{-2} M NaCl, powyżej której wartość średnicy pozostaje stała. Efekt



Rys. 5. Zależność ruchliwości elektroforetycznej cząsteczek fibrynogenu wołowego od pH dla trzech sił jonowych regulowanych NaCl, $T = 298 \text{ K}$, $c_f = 500 \text{ ppm}$: 1) 10^{-3} , 2) 10^{-2} , 3) $0,15 \text{ M}$ [49].

ten związany jest z obecnością na powierzchni mikrosfer łańcuchów polimerowych, które opadają wraz ze wzrostem siły jonowej co jest wynikiem słabszego odpychania między naładowanymi łańcuchami (Rys. 6).

Pomiary ruchliwości elektroforetycznej mikrosfer polimerowych wykazały, że posiadają one ujemny ładunek elektryczny co związane jest z obecnością na ich powierzchni silnych grup kwasowych.



Rys. 6. Zależność średnicy hydrodynamicznej mikrosfer polimerowych od siły jonowej: 1) pH 7,4, 2) pH 3,5 W lewym dolnym rogu przedstawiono zdjęcie mikrosfer polimerowych na micy wykonane za pomocą SEM [49].

W kolejnym etapie monitorowano proces adsorpcji fibrynogenu na badanych mikrosferach za pomocą ruchliwości elektroforetycznej (**Rys. 7**) w zależności od stężenia białka wyrażonego za pomocą stężenia powierzchniowego N_f wyrażonego równaniem:

$$N_f = 2\sqrt{\frac{Dt}{\pi}} n_f \quad (5)$$

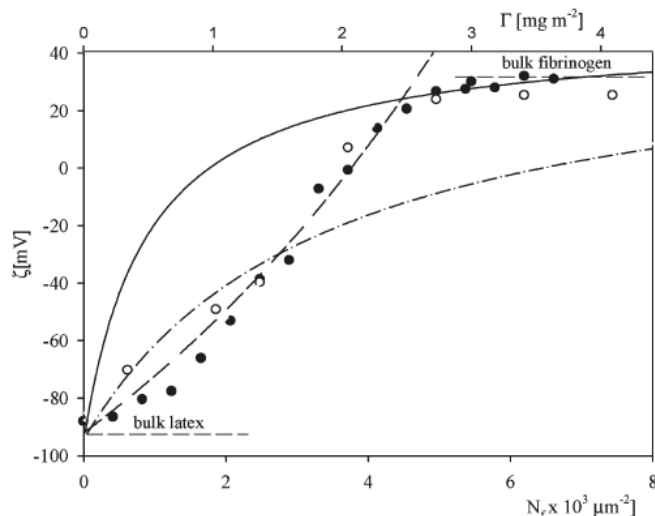
gdzie: D to współczynnik dyfuzji fibrynogenu [$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$], n_f to stężenie liczbowe fibrynogenu w roztworze wyrażone następującym równaniem:

$$n_f = \frac{10^{-6} c_f A_v}{M_w} \quad (6)$$

gdzie c_f stężenie wagowe fibrynogenu w roztworze, A_v to liczba Avogadra, M_w to masa molowa fibrynogenu. Pomiary wykonano dla trzech stężeń mikrosfer polimerowych 40, 60 oraz 100 mg L^{-1} . Na początku wyznaczono potencjał dzeta mikrosfer w danych warunkach, następnie w warunkach dyfuzyjnych tworząco monowarstwy fibrynogenu przez zmieszanie roztworu mikrosfer z roztworami fibrynogenu o różnym stężeniu (czas adsorpcji wynosił 10 min).

Model Gouyachapmana dla rozworu NaCl osile jonowej 10^{-3} M dobrze opisuje przebieg krzywej kinetycznej dla $N_f < 4 \times 10^3 \mu\text{m}^{-2}$. Wskazuje to na znaczną penetrację molekuł fibrynogenu w warstwie polimerycznej na powierzchni mikrosfer. Dla niskiej siły jonowej grubość podwójnej warstwy elektrycznej jest porównywalna z wielkością fibrynogenu. Jednak

dla $N_f > 4 \times 10^3 \mu\text{m}^{-2}$, model adsorpcji w orientacji płaskiej jest bardziej odpowiedni, co sugeruje, że wszystkie dostępne miejsca w podwójnej warstwie elektrycznej zostały

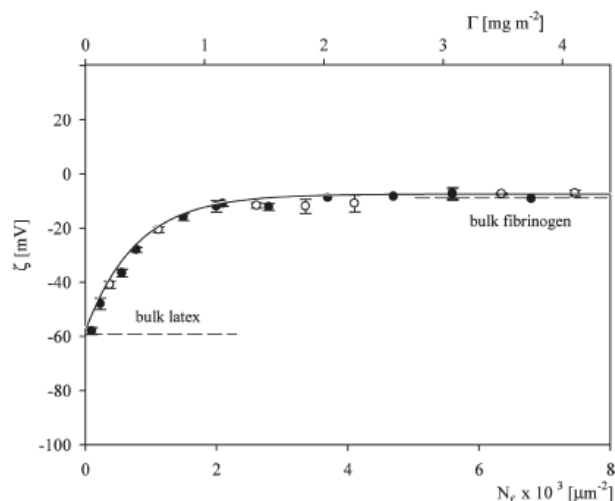


Rys. 7. Zależność potencjału zeta mikrosfer pokrytych fibrynogenem ζ w funkcji stężenia powierzchniowego fibrynogenu N_f [μm] (oś dolna) i pokrycia powierzchniowego fibrynogenu Γ_f [mg m^{-2}] (oś górna). Punkty reprezentują wyniki eksperymentalne (10^{-3} M NaCl, pH 3,5), $T = 298$ K, dla różnych stężeń mikrosfer polimerowych c_i 60 mg L^{-1} (o) oraz 40 mg L^{-1} (•). Linia ciągła reprezentuje wyniki teoretyczne uzyskane z modelu 3D zakładającego adsorpcję fibrynogenu w orientacji planarnej przy efektywnym polu przekroju cząsteczki $S_g = 128 \text{ nm}^2$, linia przerywana przedstawia wyniki obliczone z modelu Gouy-Chapmanna, a linia przerywana pokazuje wyniki teoretyczne obliczone z modelu elektrokinetycznego zakładającego losową adsorpcję fibrynogenu przy efektywnym przekroju cząsteczki równym $S_g = 35 \text{ nm}^2$ [49].

wypełnione molekułami fibrynogenu, a dalsza adsorpcja zachodzi głównie w orientacji zbliżonej do równoległej. Dla najwyższej siły jonowej wynoszącej 0,15M model GC okazał się całkowicie nieadekwatny. Wskazuje to na minimalną penetrację molekuł białka w warstwie rozmytej. W tym przypadku, wyniki teoretyczne bazujące na modelu elektrokinetycznym dobrze opisują wyniki eksperymentalne wskazując jednoznacznie na orientację płaską cząsteczek fibrynogenu (**Rys. 8**).

Następnie określono stężenie cząsteczek fibrynogenu po procesie adsorpcji. Zaobserwowano, że w początkowym etapie adsorpcji, po dodaniu niewielkiej ilości fibrynogenu (0,1–1,0 mg L^{-1}) wszystkie cząsteczki fibrynogenu adsorbowały się na powierzchni mikrosfer. Natomiast w przypadku dodawania większych ilości białka, gdy monowarstwa była już nasycona, w roztworze zaczynały pojawiać się wolne cząsteczki fibrynogenu. Zostały one zaadsorbowane na powierzchni miki i zobrazowane za pomocą mikroskopii sił atomowych. W ten sposób wyznaczono maksymalne pokrycie fibrynogenu na powierzchni mikrosfer polimerowych, było ono prawie 50% większe niż wartość wyznaczona teoretycznie i eksperymentalnie dla powierzchni płaskiej [50]. Porównanie otrzymanych wyników pozwoliło stwierdzić, że

obecność łańcuchów polimerycznych ma duży wpływ na adsorpcję białek na powierzchni mikrocząstek.



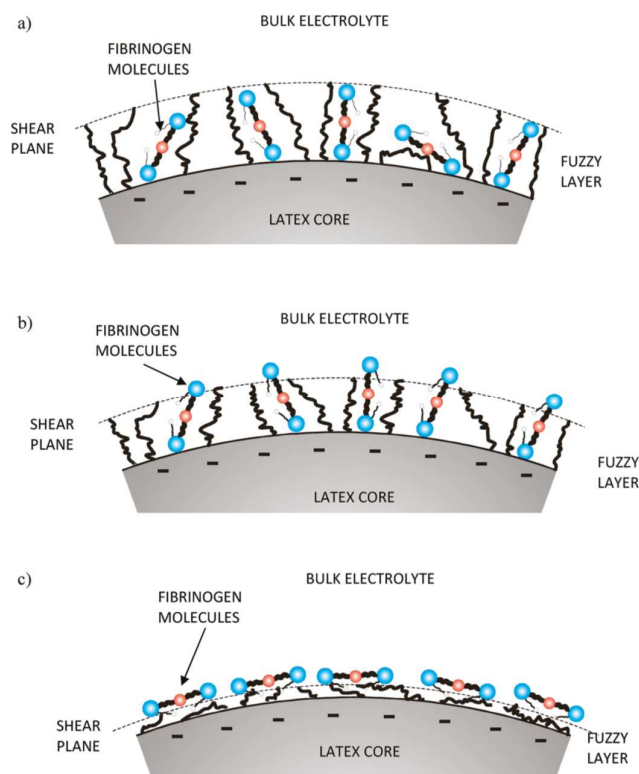
Rys. 8. Zależność potencjału dzeta mikrosfer ζ od pokrycia fibrynogenem Γ [mg m^{-2}] (oś górna) i stężenia powierzchniowego N_f [μm^{-2}] (oś dolna). Pełne punkty reprezentują dane doświadczalne otrzymane dla stężenia mikrosfer $c_l = 60 \text{ mg L}^{-1}$, puste punkty przedstawiają stężenie mikrosfer $c_l = 40 \text{ mg L}^{-1}$; stężenie chlorku sodu wynosiło $0,15 \text{ M}$, pH $7,4$. Linia ciągła przedstawia wyniki teoretyczne obliczone na podstawie trójwymiarowego modelu elektrokinetycznego przy założeniu adsorpcji równoległej fibrynogenu przy efektywnym polu przekroju cząsteczki równym $S_g = 128 \text{ nm}^2$ [49].

Porównanie danych eksperymentalnych otrzymanych dla adsorpcji fibrynogenu w pH $= 3,5$ z obliczeniami teoretycznymi wykazuje, że model GC nie opisuje we właściwy sposób mechanizmu adsorpcji w tych warunkach. Wartości potencjałów dzeta są o wiele niższe, niż te wyznaczone doświadczalnie, co wskazuje na niepełną penetrację fibrynogenu w rozmytej warstwie polimerowej. Dane eksperymentalne porównano też z obliczeniami teoretycznymi zakładającymi adsorpcję płaską. Niestety, dla niskich pokryć model ten nie opisywał w sposób zadowalający otrzymanych wyników badań. Natomiast dla wyższych stężeń fibrynogenu obliczenia teoretyczne zgadzały się z wynikami eksperymentalnymi. Na tej podstawie można stwierdzić, że adsorpcja fibrynogenu na mikrosferach polimerowych przebiega w dwóch etapach. W początkowej fazie cząsteczki fibrynogenu zapełniają puste miejsca częściowo penetrując do wnętrza mikrosfer, a następnie w miarę wzrostu pokrycia ze względu na brak wolnych miejsc adsorpcyjnych cząsteczki, powodują adsorpcję kolejnych molekuł w orientacji płaskiej. Dla pH powyżej $5,8$ (pH $7,4$ i pH $9,7$) w których cząsteczki fibrynogenu wykazują ujemny ładunek powierzchniowy zaobserwowano znaczącą adsorpcję na ujemnie naładowanych mikrosferach, co świadczy o heterogenicznym rozkładzie ładunku na powierzchni cząsteczki fibrynogenu. Co więcej, na podstawie badań stabilności monowarstwy

w czasie, wykazano, że cząsteczki fibrynogenu w badanych warunkach adsorbują się nieodwracalnie.

Otrzymane wyniki umożliwiły sformułowanie dwóch mechanizmów adsorpcji fibrynogenu na powierzchni mikrosfer polimerowych (**Rys. 9**):

1. mechanizm adsorpcji nieorientowanej, który występuje w niskich siłach jonowych, podczas którego adsorbowane biomolekuły penetrują rozmytą warstwę polimeryczną,
2. mechanizm adsorpcji płaskiej, który występuje dla $\text{pH} > 5,8$ oraz w wyższych siłach jonowych. W tych warunkach molekuły fibrynogenu są naładowane ujemnie, a grubość warstewki polimerycznej jest mniejsza, co uniemożliwia penetrację przez cząsteczki fibrynogenu.



Rys.9. Schematyczne przedstawienie adsorpcji fibrynogenu na mikrosferach polimerowych. (a) adsorpcja zgodna z modelem Gouy'a Chapman'a. (b) adsorpcja w orientacji prostopadłej. (c) adsorpcja w orientacji równoległej.

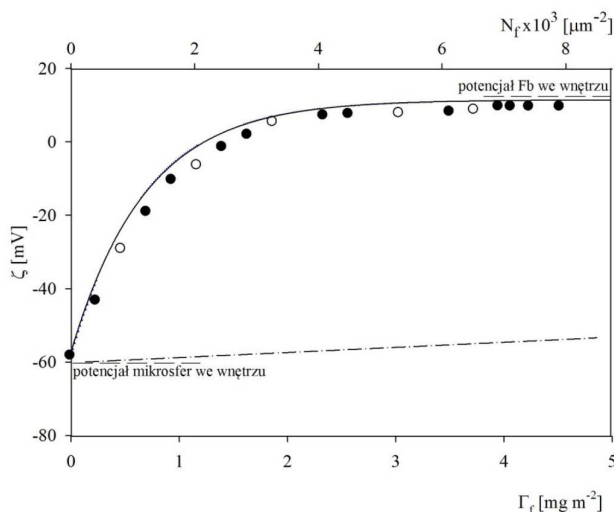
W publikacji 2 [H2] zbadano mechanizm adsorpcji fibrynogenu ludzkiego na powierzchni ujemnie naładowanych mikrosfer polimerowych oraz wyznaczono maksymalne pokrycia w zależności od siły jonowej regulowanej chlorkiem sodu. W pierwszym etapie wykonano charakterystykę fizykochemiczną fibrynogenu ludzkiego, a w szczególności wyznaczono punkt izoelektryczny który wynosił 5,8 i był zgodny z punktem izoelektrycznym

fibrynogenu wołowego. Zbadano również ruchliwość elektroforetyczną fibrynogenu ludzkiego, która była niższa od wartości uzyskanych dla fibrynogenu wołowego. Badania adsorpcji przeprowadzono dla siły jonowej równej 10^{-3} , 10^{-2} , 0.15 M oraz pH 3,5 [49]. Stężenie fibrynogenu zostało przeliczone na pokrycie nominalne fibrynogenu na powierzchni mikrosfer za pomocą równania:

$$\Gamma_f = \frac{v_s c_f}{S_l} \quad (7)$$

gdzie: v_s – objętość próbki [L], c_f – stężenie fibrynogenu w badanej próbce [mg L^{-1}], S_l – powierzchnia mikrosfer [$\text{m}^2 \text{g}^{-1}$], Γ_f – pokrycie fibrynogenem [mg m^{-2}].

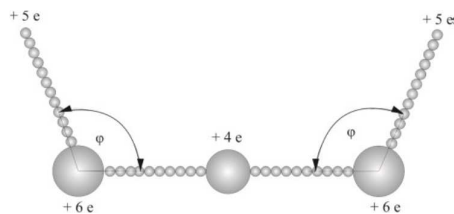
Zależność potencjału dzeta mikrosfer z zadsorbowaną warstwą Fb od stopnia pokrycia wykazała, że dla wszystkich badanych sił jonowych oraz dla $\Gamma_f < 1 \text{ mg m}^{-2}$ występuje wzrost potencjału dzeta wraz ze zwiększaniem się stopnia pokrycia (**Rys. 10**), podczas gdy dla wyższych pokryć zmiany te są znacznie mniejsze. Podobnie do wyników otrzymanych z badań nad fibrynogenem wołowym, model GC dobrze opisuje wyniki tylko dla niskich pokryć



Rys. 10. Zależność potencjału dzeta mikrosfer ζ od pokrycia fibrynogenem Γ_f (oś dolna) [mg m^{-2}] i stężenia powierzchniowego N_f [μm^{-2}] (oś górna). Punkty pełne przedstawiają wyniki doświadczalne wyznaczone dla stężenia mikrosfer c_l 60 mg L^{-1} , puste punkty reprezentują stężenie mikrosfer równe 40 mg L^{-1} ; stężenie NaCl = 0,15 M, pH 3,5. Linia ciągła przedstawia wyniki teoretyczne uzyskane na podstawie modelu elektrokinetycznego 3D, linia przerywana - wyniki teoretyczne dla modelu GC [49].

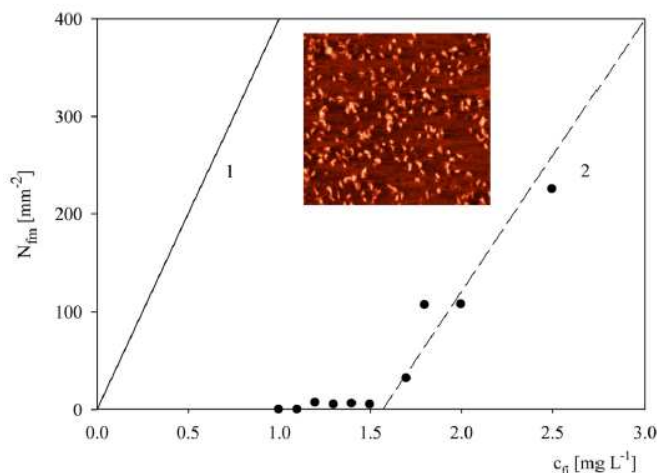
($\Gamma_f < 0,5 \text{ mg m}^{-2}$) i dla niskich sił jonowych. Natomiast dla wyższych stężeń fibrynogenu oraz wyższych sił jonowych, model GC znacząco niedoszacowuje wartości potencjału dzeta. Z drugiej strony, model teoretyczny 3D dobrze opisuje wyniki eksperymentalne otrzymane dla sił jonowych 10^{-2} M, 0,15M.

Do obliczeń teoretycznych został użyty model kulkowy cząsteczki fibrynogenu przedstawiony na **Rys. 11**. Wyniki eksperymentalne zostały porównane z obliczeniami teoretycznymi, które wykazały, że większość cząsteczek fibrynogenu zaadsorbowana była w orientacji prostopadłej.



Rys. 11. Model cząsteczki fibrynogenu, użyty w obliczeniach teoretycznych dla pH 3,5. Cząsteczka ta składa się z 23 kul o różnych średnicach. Zewnętrzne kule mają średnicę 6,7 nm, środkowa 5,3 nm a pozostałe mają średnicę 1,5 nm. Kąt φ dla pH 3,5 wynosił 108° [49].

Podobnie jak w publikacji 1 [H1] pokrycia maksymalne zostały wyznaczone za pomocą mikroskopii AFM (**Rys.12**). Pomiary te wykonano dla trzech sił jonowych i zaobserwowano spadek pokrycia maksymalnego wraz ze spadkiem siły jonowej od wartości 3,6 mg m⁻² ($I = 0,15$ M) do 1,8 mg m⁻² ($I = 10^{-3}$ M), który został wyjaśniony wzrostem zasięgu oddziaływań elektrostatycznych między zaadsorbowanymi biomolekułami.

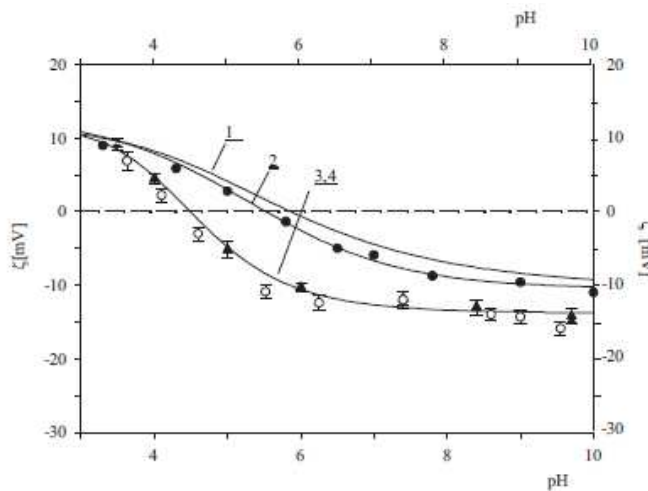


Rys. 12. Zależność stężenia powierzchniowego fibrynogenu na mice N_{fm} (wyznaczonego za pomocą mikroskopii AFM) od nominalnego stężenia fibrynogenu w roztworze wyjściowym c_f dla stężenia NaCl = 0,15 M i pH 3,5., 1 - linia referencyjna obliczona z równania 5, 2 – dane doświadczalne, linia przerywana: fit liniowy danych doświadczalnych [49].

W publikacji 3 [H3] głównym celem badań było określenie właściwości monowarstw fibrynogenu wołowego a w szczególności ich stabilności na powierzchni mikrosfer polimerowych tworzonych w różnych warunkach pH i siły jonowej. Stabilność wyznaczono za pomocą cykli pH podczas których adsorpcję prowadzono w pH 3,5 lub 7,4 a następnie

zmieniano pH do wartości 9,7, aby znów powrócić do wyjściowej wartości pH przy której miała miejsce adsorpcja fibrynogenu.

Wykazano brak różnic między pierwszym, a trzecim cyklem dla pełnych monowarstw ($\Gamma_f = 3,5 \text{ mg m}^{-2}$) utworzonych w pH 3,5 oraz 7,4. Dzięki temu potwierdzona została ich stabilność dla zakresu pH 3,5 – 9,7. Wyniki te wskazują na to, że nie występuje desorpcja cząsteczek fibrynogenu z powierzchni cząstek i jest on nieodwracalnie zaadsorbowany. Porównanie cyklu pH dla cząstek z warstwą fibrynogenu utworzonej w pH 3,5 oraz w pH 7,4 pokazało, że punkt izoelektryczny wynosił odpowiednio 4,5 i 5,4 (**Rys. 13**). Uzyskane wyniki wykazały, że orientacja zaadsorbowanych cząsteczek fibrynogenu na powierzchni mikrosfer jest różna w zależności od pH przy którym zachodzi adsorpcja. W celu zweryfikowania tej hipotezy sprawdzono wpływ pokrycia na charakterystykę monowarstwy. W tym celu wykonano dodatkowe cykle pH dla warstw z pokryciem równym $\Gamma_f = 0,7, 1,4$ oraz $2,0 \text{ mg m}^{-2}$.

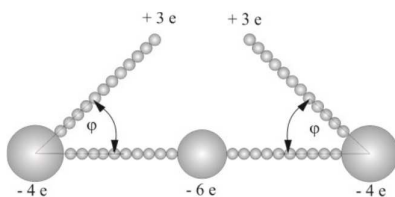


Rys. 13. Zależność potencjału dzeta od cykli pH (adsorpcja w $I = 0,15 \text{ M NaCl}$). Punkty i linia 2 – pokrycie fibrynogenu $3,5 \text{ mg m}^{-2}$, adsorpcja w pH 7,4, punkty i linia 3 – pokrycie fibrynogenu $2,0 \text{ mg m}^{-2}$, adsorpcja w pH 7,4, punkty i linia 4 – pokrycie fibrynogenu $3,5 \text{ mg m}^{-2}$ adsorpcja w pH 3,5. Linia 1 przedstawia wyniki uzyskane dla roztworu wolnego fibrynogenu. [51].

Eksperymenty wykazały, że potencjał dzeta monowarstwy fibrynogenu zaadsorbowanej w pH 7,4 jest wyższy niż monowarstwy utworzonej w pH 3,5. Dodatkowo wraz ze zmniejszaniem pokrycia, w wyniku przeprowadzonych cykli pH zaobserwowano zmniejszenie wartości punktu izoelektrycznego. Porównując wyniki uzyskane dla monowarstw utworzonych w różnych warunkach pH, potwierdzono zaproponowane we wcześniejszej pracy mechanizmy adsorpcji cząsteczek fibrynogenu, adsorpcję prostopadłą dla pH 3,5 oraz adsorpcję płaską dla pH 7,4. Rezultatem przeprowadzonych badań było opracowanie nowej metody wyznaczenia punktu izoelektrycznego białka, przy pomocy badań ruchliwości elektroforetycznej jego monowarstwy na powierzchni mikrosfer polimerowych. Zaletą takiego rozwiązania jest

zastosowanie małej ilości użytego białka w porównaniu do tradycyjnych metod instrumentalnych.

W publikacji 4 [H4] analizowano wpływ heterogenicznego rozkładu ładunku fibrynogenu na jego adsorpcję na ujemnie naładowanych mikrosferach polimerowych. Badania prowadzono w pH 7,4 oraz dla sił jonowych 10^{-3} , 10^{-3} , 0,15 M. Pomiaru ruchliwości elektroforetycznej fibrynogenu wykazały, że w pH 7,4 jego cząsteczki są ujemnie naładowane, co powinno wykluczyć proces adsorpcji, gdyż mikrosfery polimerowe były również naładowane ujemnie. Podobnie jak w przypadku fibrynogenu wołowego, fibrynogen ludzki posiada heterogeniczny rozkład ładunku. Wykazano, że w pH 7,4 łańcuchy boczne fibrynogenu są dodatnio naładowane (**Rys.14**), a reszta cząsteczki posiada ładunek ujemny co sprawia, że możliwa jest adsorpcja na ujemnie naładowanych powierzchniach.

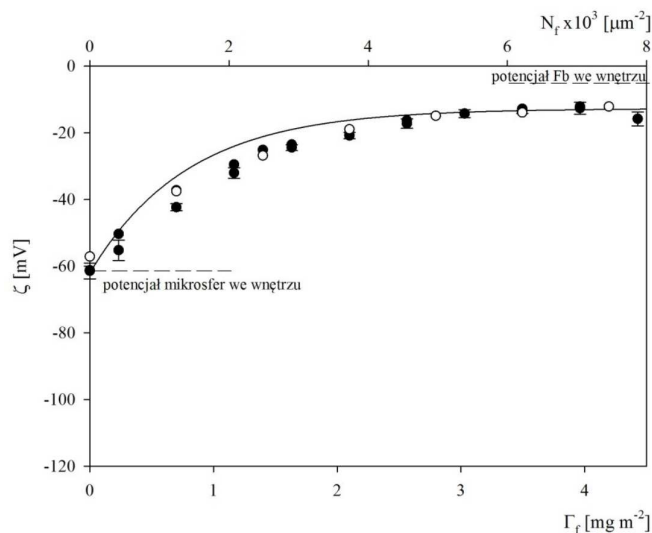


Rys. 14. Model cząsteczki fibrynogenu, wykorzystany do obliczeń teoretycznych dla pH 7,4 [52].

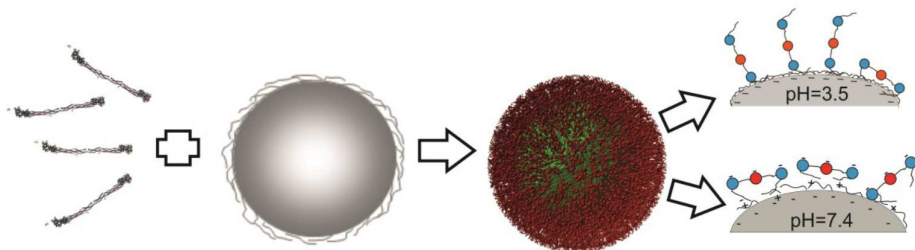
Najpierw określono zmiany ruchliwości elektroforetycznej mikrosfer polimerowych w zależności od ilości zaadsorbowanego białka w pH 7,4 oraz dla sił jonowych 10^{-3} , 10^{-3} , 0,15M. Analizując przebieg krzywej, zaobserwowano mniejszy wzrost wartości potencjału dzeta w funkcji pokrycia w porównaniu z wynikami otrzymanymi dla pH 3,5. Dane eksperymentalne zostały porównane z danymi teoretycznymi uzyskanymi w oparciu o model elektrokinetyczny 3D (linia ciągła na **Rys. 15**). Jak przedstawiono na wykresie, widać dobrą zgodność danych teoretycznych z wynikami doświadczalnymi. Wartość pokrycia maksymalnego dla siły jonowej 0,15 M była mniejsza w pH 7,4 niż w pH 3,5 i wynosiła $3,2 \text{ mg m}^{-2}$. Wskazuje to na inny mechanizm adsorpcji w pH 7,4 w porównaniu z mechanizmem mającym miejsce w pH 3,5.

Wykazano ponadto, że wraz ze spadkiem stężenia NaCl zmniejsza się stopień pokrycia mikrosfer cząsteczkami fibrynogenu, co świadczy o wzroście oddziaływań elektrostatycznych między zaadsorbowanymi biomolekułami. Zaproponowano dwa mechanizmy adsorpcji które zostały przedstawione na **Rys. 16**. Adsorpcja fibrynogenu w pH 3,5 zachodzi głównie w orientacji prostopadłej w związku z koncentracją ujemnego ładunku na końcach cząsteczki.

Z kolei, w pH 7,4 fibrynogen adsorbuje się w orientacji prostopadłej dzięki dodatniemu ładunkowi, obecnemu na łańcuchach bocznych.



Rys.15. Zależność potencjału dzeta mikrosfer polimerowych ζ od pokrycia fibrynogenu f (oś dolna) oraz od stężenia powierzchniowego fibrynogenu N_f (oś górna) dla $I = 0,15$ M i pH 7,4. Pełne punkty $c_f = 60$ mg L⁻¹, punkty puste $c_f = 40$ mg L⁻¹. Linia ciągła przedstawia wyniki teoretyczne obliczone z modelu 3D [52].



Rys. 16. Mechanizm adsorpcji fibrynogenu ludzkiego dla pH 3,5 i 7,4.

Wyniki uzyskane z pracach [H1-H4] wraz z dogłębnym przeglądem literaturowym zostały podsumowane w dwóch pracach przeglądowych [H5-H6].

W publikacji 5 [H5], będącej artykułem przeglądowym, podsumowano wyniki badań poświęcone mechanizmom adsorpcji fibrynogenu na powierzchniach międzyfazowych ciało stałe/ciecz oraz stabilności utworzonych monowarstw białka. Osiągnięcia przedstawione w pracach H1-H4 zestawiono z wynikami uzyskanymi w innych ośrodkach badawczych. Artykuł podzielono na trzy główne części. Na wstępie krótko opisano znaczenie adsorpcji białek w biologii, medycynie i naukach pośrednich. Ponadto krótko zreferowano trudności związane z ilościowym opisem procesu adsorpcji białek na różnych powierzchniach. W kolejnej części przedstawiono fizykochemiczną charakterystykę cząsteczek fibrynogenu obejmującą pomiary dynamicznego rozpraszania światła, ruchliwości elektroforetycznej oraz lepkości. Następnie

analizowano możliwe konformacje molekuly fibrynogenu i efektywny rozkład ładunku dla różnych wartości pH oraz siły jonowej ze szczególnym uwzględnieniem konformacji częściowo-zwiniętej (ang. *semi-collapsed*) charakterystycznej dla warunków fizjologicznych (pH 7,4, $I = 0,15M$). W części trzeciej dokładnie została omówiona adsorpcja fibrynogenu na powierzchniach hydrofobowych oraz hydrofilowych wraz z ograniczeniami i zaletami stosowanych metod badawczych. Szeroko dyskutowana była również adsorpcja fibrynogenu jako białka modelowego na mikrosferach polimerowych ze względu na duże znaczenie tego procesu w testach diagnostycznych. W części tej szczegółowo omówiono również zagadnienia odwracalności adsorpcji, orientacji cząsteczek fibrynogenu i maksymalnego pokrycia.

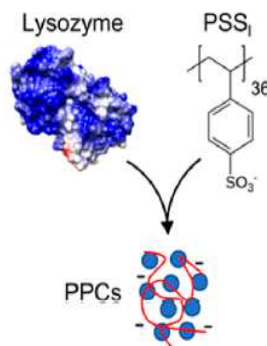
Przedstawiono również stabilność monowarstw fibrynogenu utworzonych na mikrosferach polimerowych w odniesieniu do cyklicznych zmian pH i siły jonowej. W końcowej sekcji analizowano osadzanie modelowych cząstek polimerowych na monowarstwach fibrynogenu wraz z uwzględnieniem występujących oddziaływań co pozwoliło uzyskać cenne informacje o orientacjach cząsteczek fibrynogenu. Na podstawie przedstawionych danych eksperymentalnych i teoretycznych opisujących rozkład ładunku, wielkość cząsteczki fibrynogenu możliwe było określenie konformacji makromolekuł jak również prawdopodobnych mechanizmów adsorpcji fibrynogenu na powierzchniach stałych wraz z wyznaczeniem maksymalnych pokryć [53].

W **publikacji 6 [H6]**, będącej artykułem przeglądowym, przedstawiono badania poświęcone określeniu struktury fibrynogenu, zmianom konformacyjnym w różnych warunkach, oddziaływaniom z ligandami i różnymi powierzchniami, których zrozumienie jest podstawą do opracowywania nowych funkcjonalnych materiałów mogących mieć zastosowanie w biotechnologii. W pierwszej części skoncentrowano się na pełnej charakterystyce cząsteczki fibrynogenu bazując na dostępnych danych eksperymentalnych i teoretycznych. Następnie omówiono zmiany konformacyjne molekuly fibrynogenu w zależności od zmian różnych parametrów takich jak pH, temperatura, obecność ligandów wraz z zaletami i ograniczeniami stosowanych metod badawczych opisywanych w literaturze. W kolejnej części zreferowano wyniki badań poświęcone oddziaływaniom fibrynogenu z ligandami i lekami. Przedstawiono również szeroki zakres metod eksperymentalnych i teoretycznych niezbędnych do opisanie rodzaju oddziaływań między ligandami (lekami) a fibrynogenem. Kolejna sekcja poświęcona była adsorpcji fibrynogenu na różnych powierzchniach granicznych np. powietrze/woda wraz z dyskusją stosowanych technik badawczych i modeli teoretycznych z uwzględnieniem wielkości, powierzchni oddziałujących

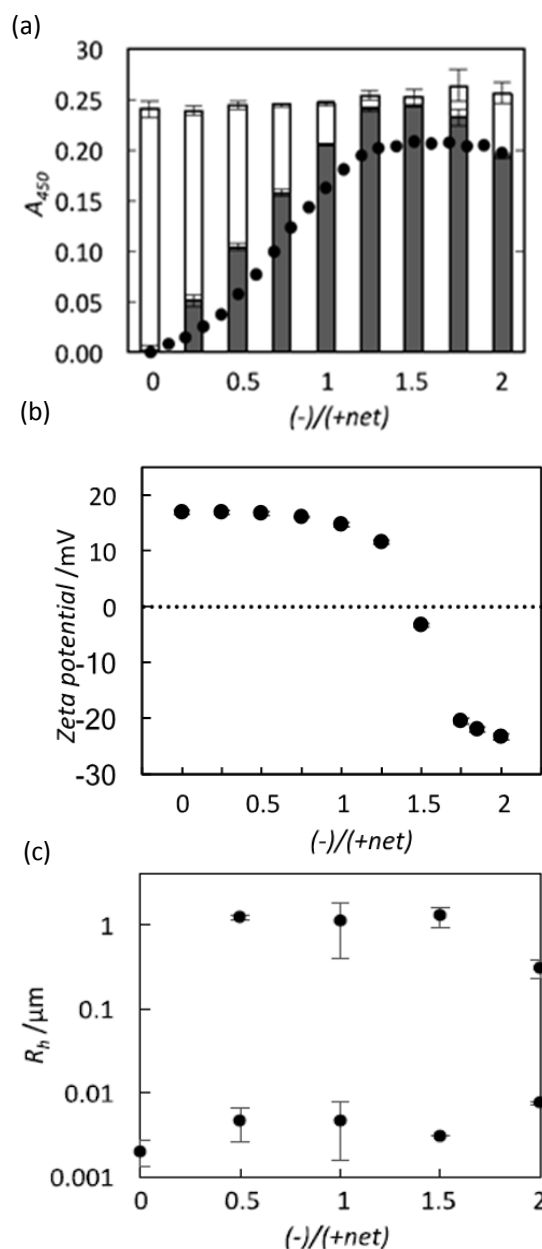
z cząsteczkami fibrynogenu. W następnej części szczególną uwagę zwrócono na procesy adsorpcji fibrynogenu na powierzchniach granicznych ciało stałe/ciecz. W ostatniej części opisano oddziaływania fibrynogenu z nanocząsteczkami w których skoncentrowano się na zmianach konformacyjnych i orientacji biomolekuł zmieniających się podczas adsorpcji, co ma kluczowy wpływ na wiele procesów np. agregację, toksyczność czy sygnalizację [54].

Prace [H5] i [H6] podsumowują zagadnienia dotyczące immobilizacji białek na mikrosferach polimerowych. W dalszej części skoncentrowano się na innym sposobie immobilizacji białek jakim jest metoda oparta na tworzeniu kompleksów białkowo-polielektrolitowych. W metodzie tej globalny ładunek kompleksów może być zmieniany w zależności od ilości oraz ładunku stosowanych substratów, a samą adsorpcję można łatwo regulować za pomocą takich parametrów jak pH, siła jonowa czy masa molowa polielektrolitu. Powyższa idea powstała na bazie doniesień literaturowych dotyczących tworzenia kompleksów polielektrolitowo-polielektrolitowych, które były opisywane w literaturze równoległe z rozwojem techniki „warstwa po warstwie” [55-63]. Po włączeniu kompleksów białkowo-polielektrolitowych do struktur multiwarstwowych, aktywność immobilizowanego białka powinna być zachowana z powodu wysokiego stopnia uwodnienia charakterystycznego dla filmów polielektrolitowych [64].

W publikacji 7 [H7] opracowano metodę tworzenia kompleksów białkowo-polielektrolitowych (PPCs) z lizozymu oraz PSS-u. Kompleksy te mogą służyć jako elementy budulcowe w celu immobilizacji białek na powierzchniach, co ma zasadnicze znaczenie w projektowaniu efektywnych bioreaktorów. Lizozym był kompleksowany z łańcuchami PSS o masie molowej 7450 g/mol (PSS₁) w pH 7,5. Tworzenie PPCs zostało schematycznie przedstawione na **Rys.17**.



Rys. 17. Tworzenie kompleksów (PCCs) z lizozymu i PSS₁ [65].



Rys. 18. (a) Znormalizowana absorbancja kompleksów lizozym/PSS w funkcji $(-)/(+net)$ w pH 7,5 (czarne punkty) w buforze HEPES. Szare słupki reprezentują ilość lizozymu obecnego w kompleksach po odwirowaniu zaś niebieskie jego ilość w roztworze, (b) zależność potencjału dzeta kompleksów w funkcji $(-)/(+net)$, (c) Promień hydrodynamiczny [μm] kompleksów w funkcji stosunku teoretycznego ładunku PSS do lizozymu $(-)/(+net)$ [65].

Proces tworzenia kompleksów monitorowano metodą turbidymetryczną zmieniając stosunek ładunku PSS-u i lizozymu ($(-)/PSS/(+)/Lys$) (PPCs_0.5, PPCs_1.0, PPCs_1.5, PPCs_2.0). Ładunek białka policzono na podstawie sekwencji aminokwasowej i wynosił on +8, podczas, gdy ładunek PSS_I wynikający z jego struktury wynosił -36. Absorbancja przy 450 nm (A_{450}) wzrastała wraz ze wzrostem $(-)/PSS/(+)/Lys$ aż do osiągnięcia maksymalnej wartości ok. 0.21 dla $(-)/PSS/(+)/Lys = 1,25$. Następnie, powstałe kompleksy zostały odwirowane i określono ilość lizozymu w odwirowanych kompleksach (osadzie) i w roztworze.

Ilość lizozymu w kompleksach wzrastała aż do osiągnięcia maksymalnej wartości dla $(-)/PSS/(+)/Lys = 1,25$ po czym obserwowano niewielki spadek przy $(-)/PSS/(+)/Lys$ między 1,5 a 2,0 (**Rys.18a**). Zmierzono również zmiany potencjału dzeta PPCs w funkcji $(-)/PSS/(+)/Lys$, które są przedstawione na **Rys.18b**. Obniżenie potencjału dzeta lizozymu wywołane powstawaniem kompleksów z ujemnie naładowanymi łańcuchami pojawia się dla $(-)/PSS/(+)/Lys = 1,5$. Dalsze zwiększanie ilości wprowadzanego PSS-u prowadziło do powstania ujemnie naładowanych kompleksów z wartością potencjału dzeta równą wartości charakterystycznej dla PSS-u. Największa wartość absorbancji odpowiada największej ilości białka obecnego w kompleksach wyznaczonej po ich odwirowaniu, co jest zgodne z zastosowanymi modelami teoretycznymi przedstawionymi w literaturze [55-60]. Wyniki te sugerują, że powstałe kompleksy posiadają strukturę typu rdzeń-korona z neutralną domeną zlokalizowaną wewnątrz wraz z ujemnie naładowanymi łańcuchami na zewnątrz.

Na **Rys. 18c** przedstawiono zależność promienia hydrodynamicznego kompleksów w funkcji $(-)_{PSS}/(+)_{Lys}$. Na wykresie można zaobserwować dwie grupy cząstek, pierwsza o rozmiarach ok. 3 nm, odpowiadająca wielkości swobodnego lizozymu oraz druga z promieniem hydrodynamicznym ok. 1 μm odpowiadająca wielkości utworzonych kompleksów. Kompleksy powstałe w stosunku $(-)_{PSS}/(+)_{Lys}$ powyżej 1,5 były ujemnie naładowane. Do budowy multiwarstw wykorzystano dwa rodzaje kompleksów, dodatnio naładowane utworzone w stosunku $(-)_{PSS}/(+)_{Lys} = 0,5$ oraz ujemnie naładowane dla których $(-)_{PSS}/(+)_{Lys} = 1,5$. Aby zmniejszyć wpływ podłoża na proces adsorpcji kompleksów, we wszystkich eksperymentach dwie pierwsze warstwy były utworzone z PAH-u oraz PSS-u posiadającego masę molową równą 70 000 g/mol (PSS_h). Następnie, utworzono kolejne warstwy z następujących substratów: (i) PAH z PPCs_0,5 [PAH-PPCs_0,5], (ii) PAH z lizozymem [PAH-Lys], (iii) lizozym z PSS_h [Lys-PSSh], (iv) PAH z PSS_l [PAHPSSh], (v) PAH z PPCs_2 [PAH-PPCs_2]. Dodatnio naładowane kompleksy utworzone w $(-)_{PSS}/(+)_{Lys} = 0,5$ nie zostały zaadsorbowane na dodatnio naładowanej warstwie PAH-u (i). Kiedy PAH był adsorbowany naprzemiennie z dodatnio naładowanym lizozymem (ii), również nie obserwowano wzrostu masy warstw polielektrolitowych. Z kolei naprzemienna adsorpcja ujemnie naładowanego PSS-u z dodatnio naładowanym lizozymem (iii) doprowadziła do powstania pięciu warstw utworzonych na dwóch pierwszych warstwach minimalizujących wpływ podłoża. Natomiast, największy przyrost warstw polielektrolitowych był obserwowany dla ujemnie naładowanych kompleksów utworzonych w stosunku $(-)_{PSS}/(+)_{Lys} = 2$ [65].

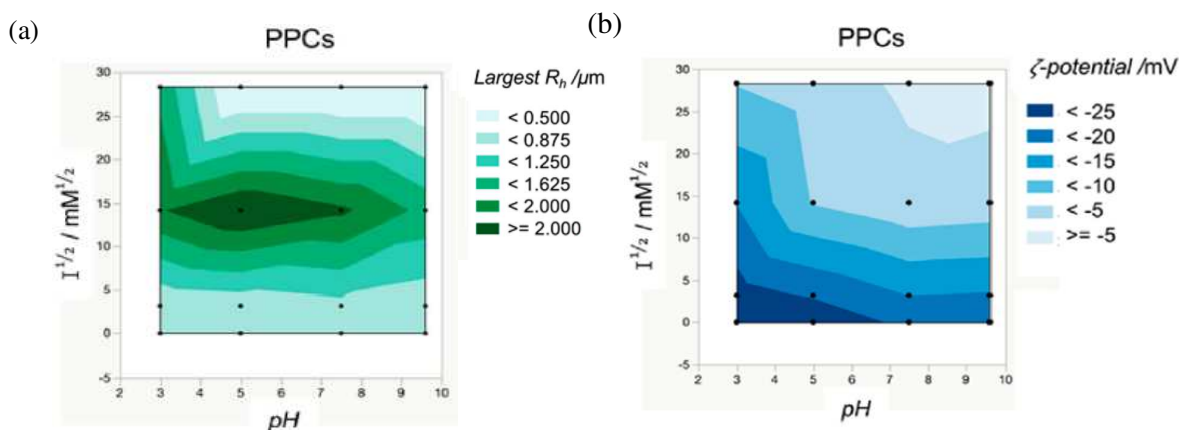
Aktywność enzymatyczną lizozymu w kompleksach wbudowanych w struktury wielowarstwowe badano przy użyciu 4 metyloumbelliferylu β -D-N, N', N' '- triacetylochitotriozydu ((GlcNAc) 3-MeU). Aktywność enzymatyczna lizozymu była badana po każdym etapie osadzania zarówno dla lizozymu obecnego w kompleksach [Lys-PSSh]₅ i [PAHPPCs_2]₅, jak również lizozymu w roztworze. Po zaadsorbowaniu jednej warstwy lizozymu, aktywność warstwy polielektrolitu z białkiem była taka sama jak dla monowarstwy lizozymu. Z kolei, gdy ilość lizozymu była niższa dla [PAH-PPCs_2]₅ w porównaniu z [Lys-PSSh]_{4,5}, ich aktywność enzymatyczna była wyższa niż dla tych ostatnich. Ta różnica może wynikać z większej ilości polielektrolitu w wielowarstwowej strukturze, która sprzyja dyfuzji substratu i/lub produktu oraz zwiększonego poziomu hydratacji w [PAH-PPCs_2]₅ [65].

Przedstawiono, że wzrost tworzenia multiwarstw zawierających kompleksy białkowo-polielektrolitowe jest proporcjonalny do ilości tworzonych warstw, co nie było możliwe w przypadku zastąpienia dodatniego polielektrolitu swobodnym lizozymem. Ponadto, wykazano,

że specyficzna aktywność lizozymu była większa w kompleksach białkowo-polielktrolitowych w porównaniu z wolnym lizozymem w roztworze.

W publikacji 8 [H8] szczegółowo analizowano wielkość, właściwości oraz mechanizm tworzenia kompleksów Lyz/PSS₁ tworzonych w różnych warunkach pH i siły jonowej. Lizozym był kompleksowany z PSS₁ w pH 3,0, 5,0, 7,5 oraz 9,6 oraz sile jonowej równej $I = 0, 10, 200$ lub 800 mM w stosunku $(-)\text{PSS}/(+)\text{Lys} = 2$. Ładunek teoretyczny lizozymu w pH 9,6, 7,5, 5,0, 3,0 wynosił odpowiednio $+6.0, +8.0, +9.5, \text{ i } +17$. Dla wszystkich sił jonowych powyżej $I > 0$ mM otrzymano niezerowe wartości absorbancji. Pomiar turbidymetryczny wykazały, że najwyższe zmętnienie było w pH 7,5 i $I = 200$ mM, oraz, że PPCs powstały w siłach jonowych powyżej $I > 0$. W pH 3,0, 5,0 i 9,6 i $I \approx 0$ mM, nie zaobserwowano zmętnienia co sugeruje, że i) PPCs nie powstały, ii) PPCs pozostały rozpuszczone w roztworze lub iii) PPCs nie rozpraszają wystarczającej ilości światła niezbędnej do detekcji.

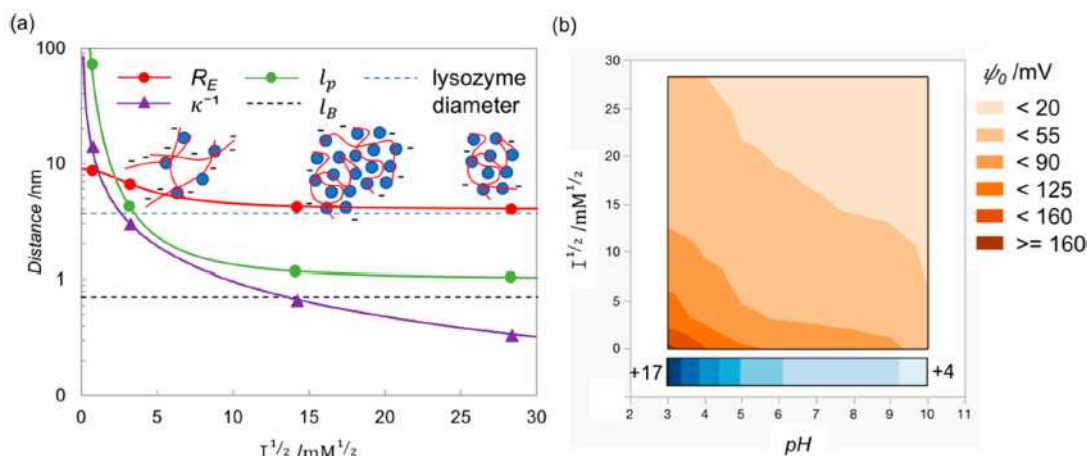
Wielkość PPCs (promień hydrodynamiczny- R_h) kompleksów powstałych w różnych wartościach pH i siły jonowej została przedstawiona na **Rys.19a**. Jak można zauważyć, pH nie ma znaczącego wpływu na wielkość kompleksów. W wysokich pH, R_h nieco zmniejsza się natomiast przy średnich wartościach (pH = 5,0 - 7,0) osiąga maksymalną wartość nieco powyżej $2.0 \mu\text{m}$.



Rys. 19. (a) Zależność promienia hydrodynamicznego (R_h) kompleksów lizozym/PSS₁ mierzonego metodą dynamicznego rozpraszania światła od pH i $I^{1/2}$, (b) zależność potencjału dzeta od pH i $I^{1/2}$. Czarne punkty pokazują średnie wartości eksperymentalne ($n = 3$) [66].

Pomiary potencjału dzeta kompleksów zostały wykonane w funkcji pH i I są przedstawione na **Rys. 19b**. Wszystkie kompleksy utworzone w wyżej wymienionych warunkach pH i siły jonowej były naładowane ujemnie, niemniej jednak potencjał dzeta był najniższy, gdy kompleksy były tworzone w niskim pH i niskiej sile jonowej. Na przykład

potencjał dzeta mierzony dla PPCs w pH 9,6 i $I = 800$ mM był równy $-3,4 \pm 0,4$ mV, natomiast w pH 3,0 i $I \approx 0$ mM wynosił $-29,1 \pm 0,9$ mV. Pomiary potencjału dzeta zostały powtórzone po tygodniu od momentu ich utworzenia, a uzyskane wyniki nie różniły się znacząco od wartości uzyskanych tuż po ich utworzeniu. Oznacza to, że PPCs są stabilne przez okres przynajmniej tygodnia. Wszystkie PPCs są ujemnie naładowane i mogą one być na przemian adsorbowane na dodatnio naładowanej warstwie PAH-u.



Rys. 20 (a) Teoretyczne wartości parametru (R_E) i l_p dla cząsteczki PSS-u, długość Bjerruma l_B oraz grubości elektrycznej warstwy podwójnej κ^{-1} w funkcji $I^{1/2}$ (pH 7.5). Punkty niebieskie przedstawiają cząsteczki lizozymu, natomiast linia czerwona dotyczy cząsteczki PSS₁. Linia fioletowa przedstawia wartości κ^{-1} , linia czerwona ? wartości R_E PSS₁, linia zielona wartości l_p PSS₁, natomiast linia niebieska przerywana przedstawia średnicę hydrodynamiczną lizozymu. (b) Mapa przedstawiająca zależność potencjału powierzchniowego lizozymu (ψ_0) w funkcji pH i $I^{1/2}$. Całkowity ładunek lizozymu w zakresie pH 3,0-10,0 jest przedstawiony na niebiesko (skala gradientu) [66].

W celu właściwego tworzenia kompleksów białkowo-polimerowych posiadających określone właściwości niezbędne jest zrozumienie siły napędowej odpowiedzialnej za ich tworzenie. W związku z powyższym konieczna jest dogłębna znajomość właściwości reagujących substratów, ich struktury, konformacji, ładunku, stopnia hydratacji w badanych warunkach. W tym celu obliczono i analizowano parametry określające elastyczność łańcuchów polimerowych takie jak „root-mean-square distance” (R_E) w oparciu o teorię Odijk-Skolnick-Fixman’a (OSF) i „effective persistence length” (l_p), długość Bjerrusa l_B lizozymu oraz długość Debye’a, κ^{-1} (**Rys. 20a**).

W związku z tym, że PSS₁ jest silnym, ujemnie naładowanym polianionem, pH nie ma znacznego wpływu na konformację jego łańcuchów. W niskiej sile jonowej, tj. $I \approx 0$ mM i 10 mM, PSS₁ ma konformację wydłużoną, a otrzymane wartości R_E wynoszą odpowiednio 8,8 i 6,7 nm i nieznacznie różnią się od długości rozwiniętego PSS₁ wynoszącego 9,0 nm. Przy

wyższych siłach jonowych, łańcuchy przybierają strukturę bardziej zwartą odpowiadającą R_E około 4,3 i 4,1 nm. Wyższe wartości l_p występują w niskiej sile jonowej ($l_p = 70$ nm przy $I \approx 0$ mM), i są bliskie l_B dla $I \geq 200$ mM. Długości Debye'a κ^{-1} dla pH 7,5 osiągnęły wartości niższe niż średnica lizozymu i wynosiły odpowiednio, dla $I = 25$ mM (tj. $5 \text{ mM}^{1/2}$) i $I = 200$ mM (tj. $14,1 \text{ mM}^{1/2}$).

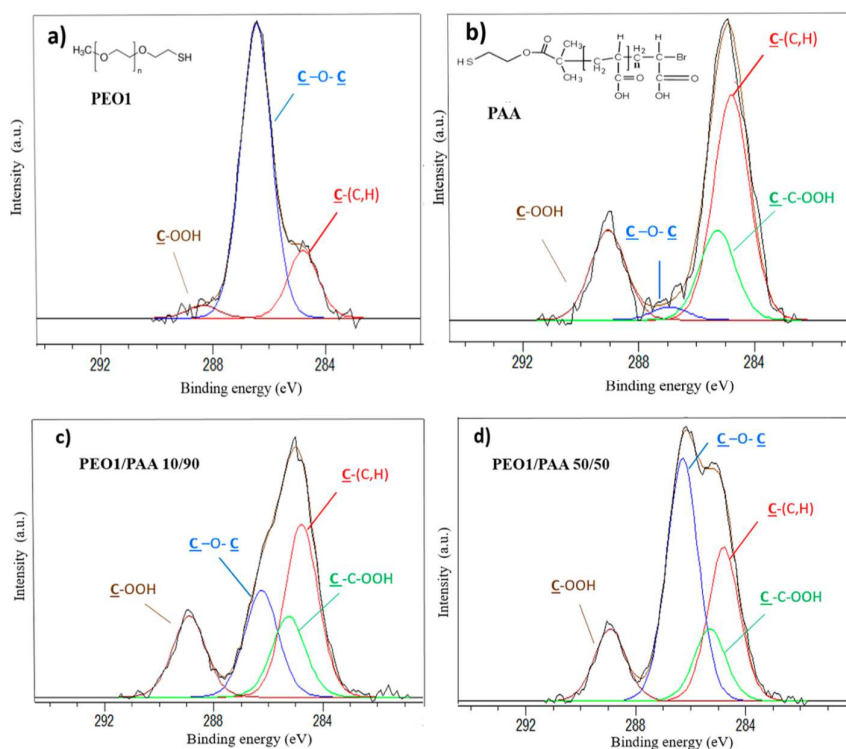
W celu lepszego zrozumienia mechanizmu tworzenia kompleksów PSS/lizozym obliczono i analizowano również potencjał powierzchniowy lizozymu (ψ_0) [67], który został obliczony dla badanych wartości I przy założeniu, że lizozym ma kształt sferyczny o promieniu 1,85 nm (R_s) (**Rys. 20b**). Różne wartości R_h powstałych kompleksów tworzonych w różnych pH można wyjaśnić poprzez zwiększający się dodatni ładunek lizozymu w miarę zmniejszania pH. W niskim pH, mamy do czynienia z silnym przyciąganiem kulombowskim między dodatnio naładowanymi cząsteczkami lizozymu i ujemnie naładowanymi łańcuchami PSS₁ które sprzyjają tworzeniu PPCs. Z kolei w pH bliskim punktu izoelektrycznego lizozymu (pH 11,35), ładunek białka jest mniejszy przez co tworzenie PPCs jest mniej efektywne. Potwierdzają to symulacje, które pokazują, że przy ustalonej I , stałej wartości l_p , adsorpcja lizozymu z monomerami PSS₁ wzrasta gdy zwiększa się ładunek białka [67].

Wyniki adsorpcji wolnego lizozymu i lizozymu w formie kompleksów w warstwach typu [Lys-PSSh]_{4.5} i [PAH-PPCs]₅ wykazały, że mamy do czynienia z różnymi mechanizmami tworzenia powyższych pokryć. Gdy wielowarstwę tworzone w $I = 10$ mM, pozwalało to na budowę struktury, która była niezależna od ładunku białka. Z kolei, gdy wielowarstwę tworzone w $I \approx 0$ mM, uzyskano dwa różne typy pokryć zależne od stopnia jonizacji polikationu: (1) wielowarstwowe pokrycia PE o wysokiej zawartości wody były uzyskiwane wtedy gdy polikation był w pełni zjonizowany (nawet jeśli był tworzony w $I \approx 0$ mM) i (2) wielowarstwowe pokrycia z dużą ilością białka niezależnie od jego ładunku były tworzone, gdy polikation był naładowany $< 70\%$.

Metody opisane w pracach [H7] i [H8] pozwalają zaprojektować wielowarstwowe pokrycia polielektrolitowe z dużą ilością białka, którego aktywność nie tylko pozostaje niezmienną, ale jest wyższa w porównaniu z aktywnością białka w roztworze. Jest to bardzo pożądane w zastosowaniach w których wymagana jest wysoka aktywność biologiczna, np. do dostarczania leków, czy w biokatalizie itp. Polielektrolity znalazły również zastosowanie w tworzeniu struktur wrażliwych na zmiany parametrów zewnętrznych takich jak pH czy siła jonowa. W połączeniu z innymi polimerami stanowią bazę do projektowania nowych funkcjonalnych struktur polimerowych takich jak szczotki polimerowe, które mają

zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu. Z tego względu w pracach [H9-H11] skupiono się na zaprojektowaniu szczotek, na których adsorpcja białek może być kontrolowana poprzez zmiany parametrów roztworu.

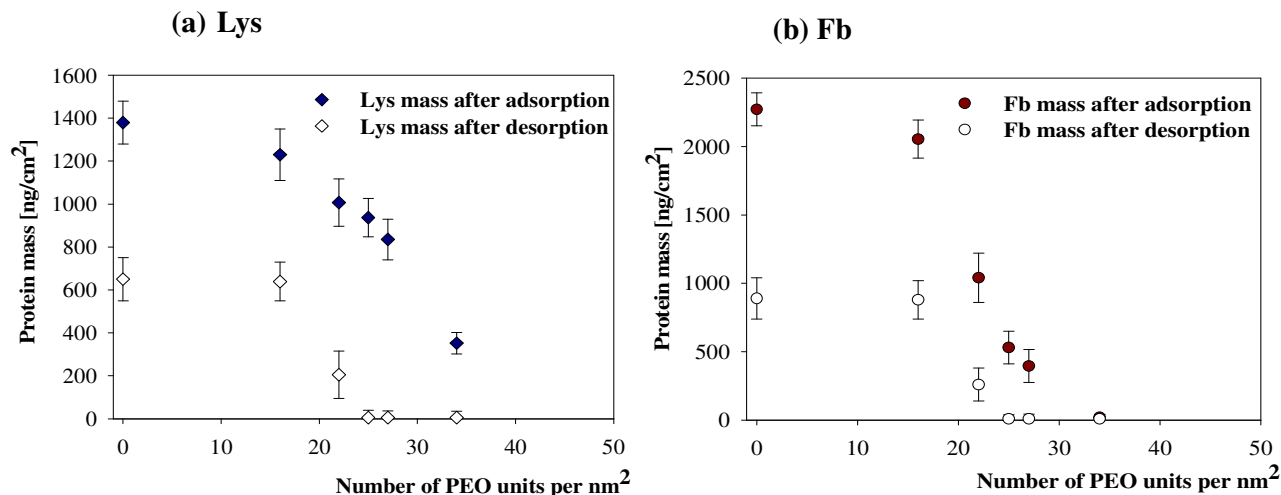
W publikacji 9 [H9] skupiono się na utworzeniu i dogłębnej charakterystyce mieszanych szczotek polimerowych PEO/PAA utworzonych na płaskiej powierzchni złota w celu określenia warunków sprzyjających efektywnej adsorpcji i desorpcji białek. Utworzone szczotki polimerowe charakteryzowano kilkoma metodami m.in. przy użyciu spektroskopii fotoelektronów w zakresie promieniowania X. Pomiary XPS wykazały obecność obu substratów na powierzchni złota, gdyż zarejestrowano dwa charakterystyczne piki odpowiadające odpowiednio PEO przy 286,3 eV (C-O-C) oraz PAA przy 288,8 eV (C-OOH) (**Rys. 21**).



Rys. 21. Piki C1s zarejestrowane przy pomocy metody XPS na powierzchni złota z polimerami PEO, PAA i PEO/PAA: (a) PEO1, (b) PAA, (c) PEO1 / PAA 10/90 oraz (d) PEO1 / PAA 50/50 [68].

Dane uzyskane z pomiarów XPS posłużyły również do obliczenia grubości suchych szczotek d^* oraz liczby jednostek PEO i PAA na nm^2 (**Tabela 1**). Grubość szczotek polimerowych oszacowano również na podstawie pomiarów QCM-D (**Tabela 1**, d^{**}). Masę zaadsorbowanej warstwy na jednostkę powierzchni (pokrycie powierzchniowe, Δm) obliczono stosując zależność Sauerbrey'a a następnie, biorąc pod uwagę gęstość obu polimerów, obliczono grubości uwodnionych szczotek d^{**} . Obserwowane różnice między grubościami obliczonymi

z pomiarów QCM-D i XPS są przypisywane różnicom w hydratacji warstw. Na szczotkach utworzonych z PEO oraz szczotkach utworzonych z PAA badano adsorpcję trzech białek, albuminy, lizozymu oraz fibrynogenu. Adsorpcję przeprowadzono w pH 9,0 oraz dla dwóch sił jonowych $I = 10^{-3}$ M, $I = 10^{-2}$ M natomiast desorpcję przeprowadzono w tym samym pH oraz sile jonowej równej 0,15 M. W pracy tej wykazano, że szczotki utworzone z PEO zapobiegają adsorpcji trzech badanych białek natomiast znikoma adsorpcja HSA została zaobserwowana na szczotkach PAA. Dla szczotek mieszanych PEO/PAA zaobserwowano znaczącą adsorpcję lizozymu i fibrynogenu charakteryzującą się dużymi wartościami pokrycia powierzchniowego (Rys. 22), co związane jest z tworzeniem pokryw wielowarstwowych. Częściową desorpcję lizozymu i fibrynogenu zaobserwowano na mieszanych szczotkach PEO/PAA 10/90, natomiast całkowita desorpcja miała miejsce na szczotkach PEO/PAA 50/50. W pracy tej wykazano, że



Rys. 22. Zależność pokrycia białka wyznaczonego przy użyciu metody QCM-D modelu (model Sauerbrey) wyznaczona po etapie adsorpcji (symbole zamknięte, $I = 10^{-2}$ M, pH 9,0) i po desorpcji (symbole otwarte - $I = 0,15$ M, pH 9,0), od stężenia powierzchniowego PEO na nm² wyznaczonego na podstawie pomiarów XPS: a) Lys, b) Fb [68].

W pracy tej zaprojektowano szczotki polimerowe, które pozwalają na całkowite zahamowanie procesu adsorpcji białek (szczotki zbudowane z PEO) oraz szczotki pozwalające na adsorpcję dużych ilości białek (PEO/PAA) a po zmianie siły jonowej roztworu na ich całkowitą desorpcję. Bazując na tych osiągnięciach, w kolejnej pracy badano możliwość selektywnej adsorpcji danego białka z mieszaniny kilku białek stosując układ zbudowany ze szczotek mieszanych (PEO/PAA).

Tabela 1. Charakterystyka szczotek polimerowych utworzonych na powierzchni sensorów złotych przedstawiająca ich grubość wyznaczoną na podstawie pomiarów XPS i QCM-D oraz wartości potencjału dzeta otrzymane z pomiarów potencjału przepływu.: d^* - średnia grubość szczotek polimerowych obliczona na podstawie pomiarów XPS, liczba jednostek PEO na nm^2 , liczba jednostek PAA na nm^2 , Δm - masa zaadsorbowanej warstwy na jednostkę powierzchni (pokrycie powierzchniowe) obliczona z pomiarów QCM-D przy użyciu wzoru Sauerbrya, d^{**} - średnia grubość szczotek polimerowych obliczona na podstawie danych z pomiarów QCM-D przy uwzględnieniu gęstości PEO ($1,13 \text{ g/cm}^3$) i PAA ($1,074 \text{ g/cm}^3$), ζ - potencjał dzeta mierzony dla $I = 10^{-2} \text{ M}$, pH 9,0 [68].

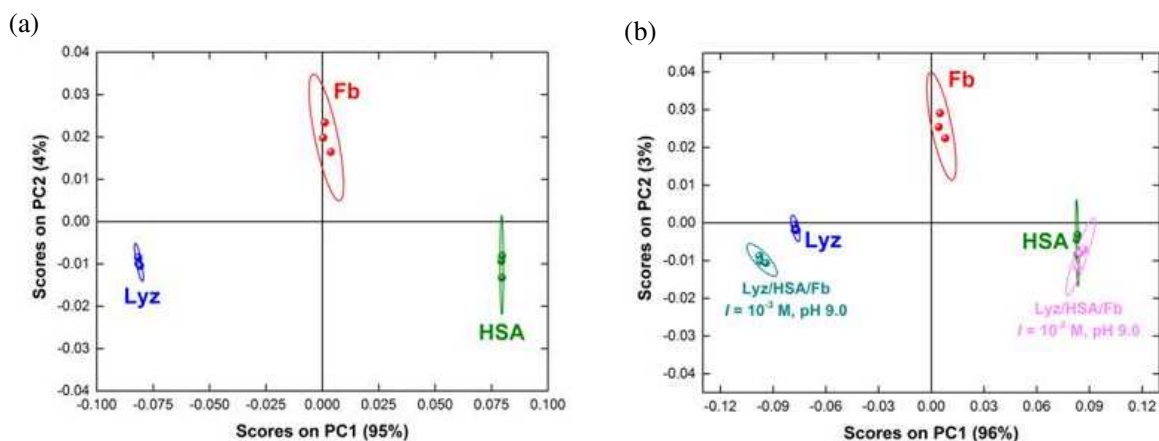
Sample name	d^* (nm)	PEO units (nm^2)	PAA units (nm^2)	Δm (ng/cm^2)	d^{**} (nm)	ζ (mV)
Au	-	-	-	-	-	-56 ± 6
Au-PAA	2.6 ± 0.2	-	35	475.0 ± 76	4.4	-39 ± 5
Au-PEO1	1.6 ± 0.3	12	-	547.0 ± 56	4.8	-35 ± 4
Au-PEO2	1.9 ± 0.3	28	-	675.0 ± 63	6.0	-36 ± 4
Au-PEO5	2.9 ± 0.2	45	-	1195.0 ± 50	10.2	-32 ± 4
Au-PEO1/PAA 10/90	3.5 ± 0.3	16	17	497.0 ± 84	4.5	-43 ± 5
Au-PEO2/PAA 10/90	4.1 ± 0.3	22	20	580.0 ± 65	5.3	-41 ± 5
Au-PEO5/PAA 10/90	4.7 ± 0.2	22	23	1275.0 ± 45	11.6	-40 ± 5
Au-PEO1/PAA 50/50	3.0 ± 0.3	25	9	520.0 ± 78	4.7	-40 ± 4
Au-PEO2/PAA 50/50	3.2 ± 0.3	27	9	560.0 ± 60	5.1	-42 ± 4
Au-PEO5/PAA 50/50	3.9 ± 0.3	34	14	1196.0 ± 55	10.9	-35 ± 4

W publikacji 10 [H10] badano zdolność mieszanych szczotek polimerowych do selektywnej adsorpcji jednego białka z mieszaniny trzech białek: albuminy, lizozymu i fibrynogenu. Do identyfikacji danego białka zaadsorbowanego na powierzchni szczotek polimerowych wykorzystano metodę ToF-SIMS połączoną z analizą PCA. Wyniki pomiarów zostały przedstawione w Tabeli 2. Następnie przeprowadzono adsorpcję z mieszaniny Lys/HSA/Fb białek na szczotkach PEO/PAA, a badane próbki zmierzono metodą ToF-SIMS z analizą PCA. Uzyskane wyniki sugerują, że selektywna adsorpcja Lys miała miejsce na szczotkach polimerowych PEO/PAA, gdy była przeprowadzona w sile jonowej $I = 10^{-3} \text{ M}$, natomiast gdy adsorpcja miała miejsce w sile jonowej $I = 10^{-2} \text{ M}$, analiza PCA wykazała obecność pików charakterystycznych dla albuminy (**Rys. 23**). Kierując się ograniczeniami tej metody polegającymi głównie na możliwości analizy badanych próbek, których grubość nie przekracza 2 nm, badane białka identyfikowano za pomocą elektroforezy żelowej połączonej z odbarwianiem jonów srebra. Zaletą tej metody jest jej wysoka czułość umożliwiającą detekcję białek na poziomie nanogramów. Wyniki tych pomiarów zostały przedstawione na **Rys. 24**.

Tabela 2. Charakterystyczne fragmenty HSA, Lyz i Fb uzyskane z pomiarów ToF-SIMS połączonych z analizą PCA uzyskane po adsorpcji pojedynczych białek na szczotkach PEO1/PAA[69].

Lyz fragments			HSA fragments			Fb fragments		
	m/z			m/z			m/z	
CH ₃ N ₂ ⁺	43	Arg (8.53%)	C ₄ H ₁₀ N ⁺	72	Val (7.06%)	C ₄ H ₆ N ⁺	68	Pro (4.36%), Lys (6.24%)
CH ₅ N ₃ ⁺	59							
C ₂ H ₇ N ₃ ⁺	73							
C ₃ H ₄ NO ⁺	70	Asn (10.85%)	C ₅ H ₁₀ N ⁺	84	Leu (10.51%), Lys (9.85%)	C ₃ H ₈ NO ⁺	74	Thr (6.19%)
C ₉ H ₈ N ⁺	130	Trp (4.65%)	C ₅ H ₈ N ₃ ⁺	110	His (2.63%), Arg (4.43%)	C ₄ H ₆ NO ⁺	84	Gln (4.42%), Glu (6.63%)
			C ₈ H ₁₀ N ⁺	120	Phe (5.75%)			

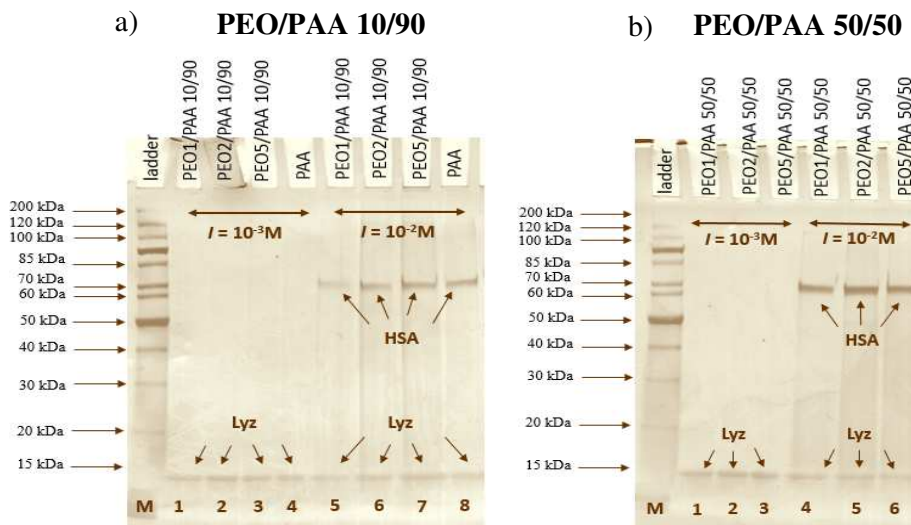
Wykazano, że gdy białka były adsorbowane w sile jonowej 10⁻³M wykryto tylko jeden prążek odpowiadający masie około 15 kDa, który można zidentyfikować jako lizozym, natomiast gdy adsorpcja zachodziła w sile jonowej 10⁻²M zaobserwowano dwa prążki, pierwszy ~ 70 kDa i drugi ~ 15 kDa, które mogą być przypisane albuminie i lizozymowi. Podobne wyniki otrzymano dla szczotek polimerowych PEO/PAA 10/90 oraz PEO/PAA 50/50 (**Rys.24**).



Rys. 23. Wyniki analizy widm ToF-SIMS metodą PCA dla kationowych form HSA, Lyz, Fb adsorbowanych na szczotkach PEO1/PAA 10/90 z roztworów pojedynczych białek (a) ($c = 0,2 \text{ mg/ml}$, $I = 10^{-3}\text{M}$, pH 9,0, z wyjątkiem HSA, pH 3,5) i (b) Mieszaniny Lyz /HSA /Fb ($c = 0,2 \text{ mg / ml}$, $I = 10^{-3}\text{M}$, $I = 10^{-2}\text{M}$ pH 9,0)[69].

W pracy tej wykazano możliwość selektywnej adsorpcji dodatnio naładowanego białka na mieszanych szczotkach w których jeden z polimerów był ujemnie naładowanym słabym polianionem. Dodatkowo, obecność politlenku etylenu umożliwiła całkowite usunięcie zaadsorbowanego wcześniej białka. W kolejnej pracy, zastosowano podobne podejście, ale z

wykorzystaniem dodatnio naładowanego polikationu, który umożliwiłby adsorpcję ujemnie naładowanego białka (białek).



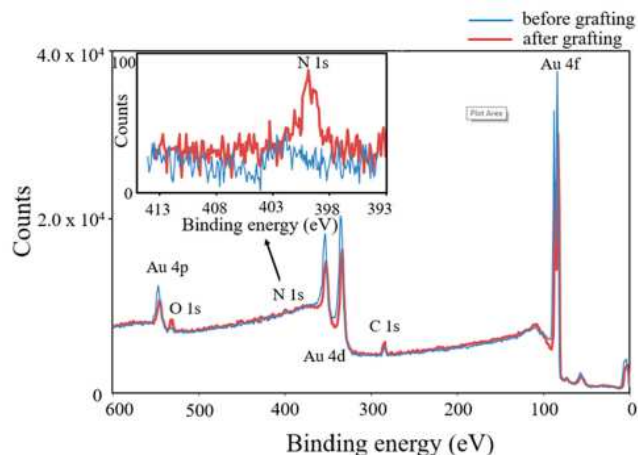
Rys. 24. SDS-PAGE białek zaadsorbowanych na szczotkach PAA i PEO/PAA. Przedstawione siły jonowe odpowiadają warunkom adsorpcji: a) białka na szczotkach PAA i PEO/PAA 10/90 po adsorpcji z mieszaniny Lyz/HSA/Fb, b) białka na szczotkach PEO/PAA 50/50 po adsorpcji z mieszaniny Lyz/HSA/Fb [69].

W publikacji 11 [H11] skupiono się na utworzeniu i charakterystyce mieszanych szczotek polimerowych PEO/PDMAEMA utworzonych na płaskiej powierzchni złota w celu określenia warunków sprzyjających efektywnej adsorpcji i desorpcji białek. Utworzone szczotki polimerowe charakteryzowano kilkoma metodami m.in. przy użyciu spektroskopii fotoelektronów w zakresie promieniowania X. Na Rys. 25 przedstawione jest widmo XPS zarejestrowane dla powierzchni złota z zaadsorbowaną warstwą PDMAEMA. Obecność pików przy ok. 399 eV charakterystycznego dla N 1s potwierdza efektywne zakotwiczenie PDMAEMA na powierzchni złota. Ponadto, korzystając z danych XPS określono udział PEO i PDMAEMA w utworzonych warstwach polimerowych. Ponadto z pomiarów QCM-D wyznaczono pokrycie powierzchniowe oraz oszacowano grubość utworzonych szczotek polimerowych (Tabela 3).

Następnie procesy adsorpcji czterech białek, lizozymu, avidyny, albuminy oraz fibrynogenu przeprowadzono na szczotkach polimerowych wymienionych w Tabeli 3 w sile jonowej $10^{-3}M$ i pH 7.4 i były one monitorowane za pomocą QCM-D.

Wykazano, że adsorpcja Lyz i Av, które są dodatnio naładowane w badanych warunkach nie zachodzi na żadnej z badanych szczotek polimerowych. Jest to spowodowane obecnością dodatnio naładowanego polikationu oraz dużą ilością PEO w badanych szczotkach. Dodatkowo potwierdza to utworzenie jednorodnych monowarstw PEO, PDMAEMA lub

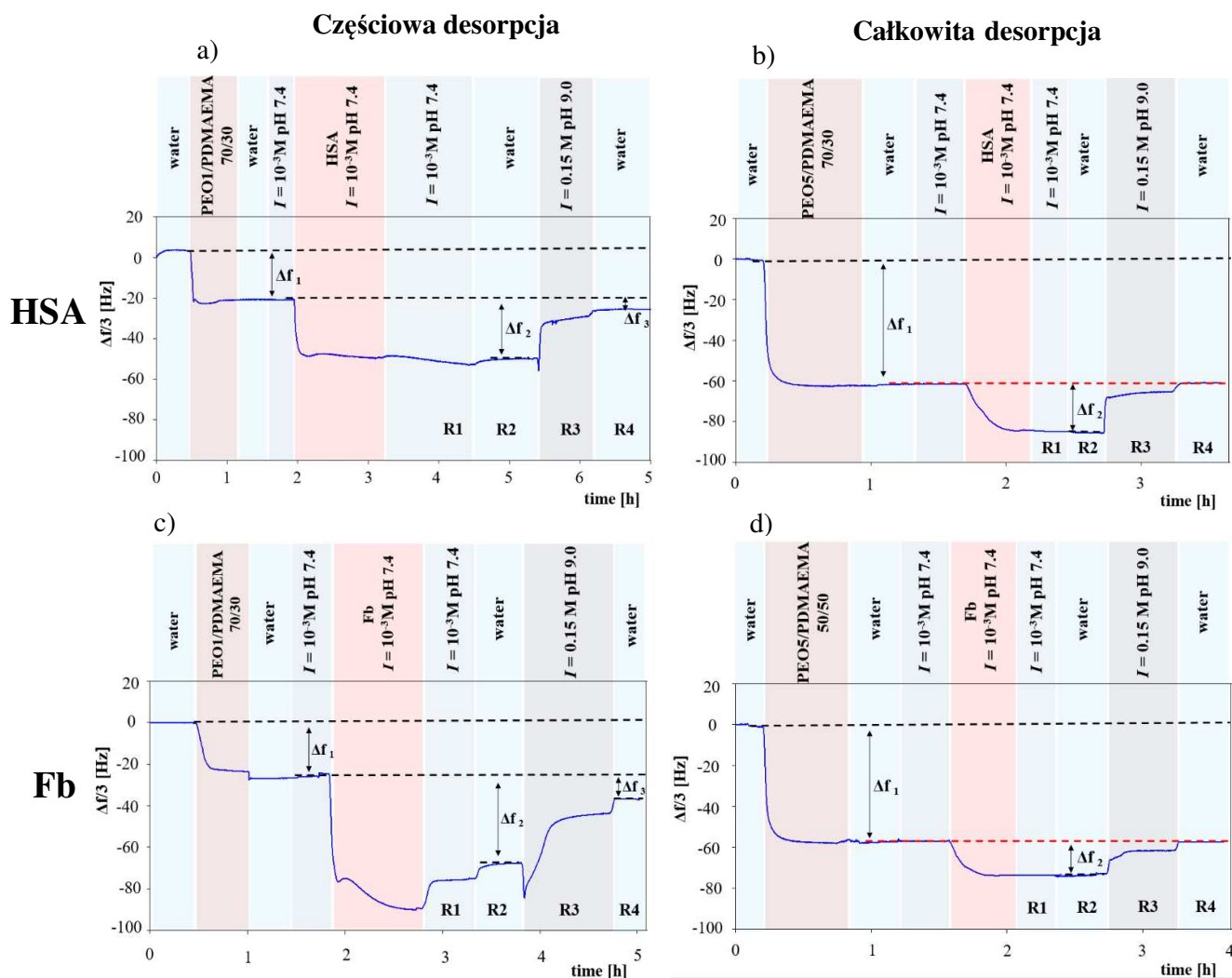
PEO/PDMAEMA, które zapobiegają adsorpcji dodanie naładowanych białek na ujemnie naładowanej powierzchni złota.



Rys. 25. Widmo XPS uzyskane dla powierzchni sensorów złotych pokrytych warstwą PDMAEMA. Powiększenie zakresu widma między 413 a 393 eV wskazuje na obecność charakterystycznego pikę pochodzącego od N1s, którego wykrycie potwierdza obecność polimeru na powierzchni złota [70].

Tabela 3 Charkterytyka szczotek polimerowych PEO/PDMAEMA utworzonych na powierzchni złota obejmująca udział objętościowy PEO oraz PDMAEMA (V_{PEO} , $V_{PDMAEMA}$) w utworzonych szczotkach, Δm - masę zaadsorbowanej warstwy na jednostkę powierzchni, d - średnia grubość szczotek polimerowych obliczona na podstawie danych z pomiarów QCM-D.[70].

Nazwa próbki	V_{PEO}	$V_{PDMAEMA}$	Δm (ng/cm ²)	d (nm)
Au-PDMAEMA	-	1.0	505 +/-96	3.8
Au-PEO1	1.0	-	547 +/-56*	4.8*
Au-PEO2	1.0	-	675 +/-63*	6.0*
Au-PEO5	1.0	-	1195 +/-50*	10.2*
Au-PEO1/PDMAEMA 50/50	0.61	0.39	480 +/-104	3.9
Au-PEO2/ PDMAEMA 50/50	0.61	0.39	609 +/-85	5.0
Au-PEO5/ PDMAEMA 50/50	0.83	0.17	910 +/-94	7.4
Au-PEO1/PDMAEMA 60/40	0.52	0.48	508 +/-63	4.1
Au-PEO2/ PDMAEMA 60/40	0.68	0.32	711 +/-85	5.8
Au-PEO5/ PDMAEMA 60/40	0.83	0.17	922 +/-63	7.5
Au-PEO1/ PDMAEMA 70/30	0.62	0.38	511 +/-102	4.2
Au-PEO2/ PDMAEMA 70/30	0.57	0.43	762 +/-93	6.2
Au-PEO5/ PDMAEMA 70/30	0.88	0.12	1055 +/-65	8.6



Rys. 26. Wykresy QCM uzyskane dla szczotek mieszanych PEO/PDMAEMA utworzonych na powierzchni sensorów złotych z następującymi po sobie etapami adsorpcji/desorpcji białek: a) adsorpcja HSA na PEO1/PDMAEMA 70/30, b) adsorpcja HSA na szczotkach PEO5/PDMAEMA 70/30, c) Adsorpcja Fb na PEO1/PDMAEMA 70/30, d) Adsorpcja Fb na szczotkach PEO5/PDMAEMA 50/50 (adsorpcja w pH 7,4 i $I = 10^{-3}$ M, desorpcja w $I = 0,15$ M, pH 9,0), R1- płukanie układu roztworem soli o takim samym pH i sile jonowej jaki został zastosowany do adsorpcji białek, R2 – płukanie wodą, R3 - wprowadzenie roztworu soli 0,15 M i pH 9,0, R4 - płukanie wodą [70].

Efektywna adsorpcja pozostałych dwóch białek albuminy i fibrynogenu została wykazana na powierzchni szczotek utworzonych z PDMAEMA oraz PEO/PDMAEMA. Ilość zaadsorbowanego białka malała wraz ze wzrostem ilości PEO w szczotkach polimerowych lub ze wzrostem masy molowej PEO.

Następnie badano możliwość całkowitej desorpcji albuminy i fibrynogenu z badanych szczotek. Wykazano, że całkowita desorpcja albuminy zachodziła na szczotkach polimerowych

PEO5/PDMAEMA 70/30 (**Rys. 26b**) natomiast całkowita desorpcja fibrynogenu miała miejsce na szczotkach PEO5/PDMAEMA 50/50 (**Rys. 26 d**) [70].

W pracach [H9-H11] wykazano możliwość tworzenia funkcjonalnych szczotek polimerowych zbudowanych z dodatnio lub ujemnie naładowanego polielektrolitu oraz politlenku etylenu, które umożliwiają adsorpcję dużych ilości białek oraz całkowitą desorpcję w przypadku kiedy szczotki zawierają odpowiednią ilość PEO w połączeniu ze zmianami pH i/lub siły jonowej roztworu.

4.3.5. Podsumowanie

Zastosowanie szeregu komplementarnych technik badawczych umożliwiło przeprowadzenie unikatowych pomiarów i uzyskanie wyników mających znaczenie poznawcze, stanowiących oryginalny wkład do fizykochemii białek i makrojonów. Głównymi osiągnięciami będącymi efektem przeprowadzonych badań jest opracowanie trzech efektywnych metod immobilizacji białek. Pierwszą z nich jest metoda oparta na immobilizacji białek na mikrosferach polimerowych, a do najważniejszych dokonań należy zaliczyć:

- Rozwinięcie nowej metody określenia w warunkach *in situ* pokrycia cząsteczek białek na powierzchniach nośników koloidalnych opartej na wyznaczeniu zmian ich potencjału dzeta w zależności od stężenia roztworu białka. Istotną zaletą tej metody jest jej wysoka czułość, co umożliwia precyzyjne wyznaczenie stężenia białka na poziomie 10^{-9}M , w znacznie krótszym czasie, niż tradycyjne metody immunochemiczne (ELISA).
- Opracowanie nowej metody wyznaczania punktu izoelektrycznego cząsteczek białek opartej na ilościowej interpretacji wyników pomiarów zmian ruchliwości elektroforetycznej mikrosfer polimerowych z osadzoną monowarstwą białka przy użyciu modelu elektrokinetycznego 3D. Zaletą tej metody, oprócz dużej precyzji, jest minimalne zużycie badanego białka, znacznie mniejsze niż w tradycyjnych metodach instrumentalnych.
- Określenie zmian konformacji cząsteczek fibrynogenu w zależności od pH oraz siły jonowej, co wpływa decydująco na ich orientację w monowarstwach tworzonych na powierzchni nośników koloidalnych.
- Wyznaczenie pokrycia maksymalnego cząsteczek fibrynogenu na mikrosferach polimerowych zależnego od siły jonowej i pH, interpretowanych przy użyciu modelu sekwencyjnej adsorpcji losowej. Wykazano, że znaczący wzrost pokrycia fibrynogenu,

związany jest ze zmianą orientacji z płaskiej na prostopadłą, co prowadzi do tworzenia tzw. szczotek białkowych.

- Wyjaśnienie zjawiska anomalnej adsorpcji fibrynogenu dla pH 7,4, przy którym cząsteczki białka i mikrosfery polimerowe wykazują uśredniony ujemny ładunek jako skutku jego niejednorodnego rozkładu charakteryzującego się równoczesną obecnością dodatnio i ujemnie naładowanych domen.
- Jednoznaczne potwierdzenie elektrostatycznego mechanizmu nieodwracalnej adsorpcji cząsteczek fibrynogenu na powierzchniach nośników polimerowych dla szerokiego zakresu pH.

Drugą metodą jest immobilizacja białek w multiwarstwowych pokryciach polimerowych przez zastosowanie kompleksów białkowo-polielektrolitowych, a do najważniejszych osiągnięć w tym obszarze badań można zaliczyć:

- Wykazanie, że grubość warstw polielektrolitowych z wbudowanymi kompleksami rośnie proporcjonalnie do ilości tworzonych warstw co nie było możliwe w klasycznej metodzie „warstwa po warstwie,” w której dodatnio naładowany polielektrolit został zastąpiony dodatnio naładowanym białkiem.
- Określenie mechanizmów tworzenia wielowarstwowych pokryć z wbudowanymi kompleksami w zależności od siły jonowej. Dla większych sił jonowych tworzyły się struktury niezależne od ładunku białka, natomiast dla niskich sił jonowych uzyskiwano dwa różne typy pokryć zależne od stopnia jonizacji polikationu.
- Potwierdzenie większej aktywności enzymatycznej białka będącego składnikiem kompleksów w porównaniu z wolnym białkiem w roztworze, co otwiera nowe możliwości tworzenia funkcyjnych wielowarstwowych materiałów polimerowych, które mogą znaleźć zastosowanie w biokatalizie, medycynie, układach dostarczających leki, itp.

Trzecia metoda oparta jest na wykorzystaniu szczotek polimerowych do efektywnej adsorpcji białek a do najważniejszych rezultatów należy zaliczyć:

- Wykazanie użyteczności heterogenicznych szczotek polimerowych utworzonych z polikwasu akrylowego oraz politlenku etylenu jako substratów umożliwiających odwracalną adsorpcję białek wskutek zmiany siły jonowej.
- Opracowanie metody wytwarzania szczotek polimerowych z politlenku etylenu oraz poli(2-(dimetyloamino) metakrylanu etylu umożliwiającą kontrolę procesów adsorpcji albuminy i fibrynogenu dla różnych wartości pH i siły jonowej.

- Wykazanie, że procesy adsorpcji i desorpcji cząsteczek białek mogą być wykonywane wielokrotnie nie zmieniając właściwości utworzonych szczotek polimerowych co może mieć duże znaczenie w opracowaniu nowych technologii separacji, czy detekcji danej substancji.

Bibliografia

- [1] Rusmini, F., Zhong, Z., Feijen, J., Protein immobilization strategies for protein biochips , *Biomacromolecules*, **2007**, 8, 1775.
- [2] Kane, R.S., Takayama, E. Ostuni, E., Ingber, D.E., Whitesides, G.M., Patterning Proteins and Cells using Soft Lithography, *Biomaterials*, **1999**, 20, 2363.
- [3] Senaratne, W., Andruzzi, L., Ober, C. K., Self-assembled monolayers and polymer brushes in biotechnology: current applications and future perspectives, *Biomacromolecules*, **2005**, 6, 2427.
- [4] Kannan, B., Castelino, K., Chen, F.F., Majumdar, A., Lithographic techniques and surface chemistries for the fabrication of PEG-passivated protein microarrays, *Biosens. Bioelectron.*, **2006**, 21, 1960.
- [5] Zhang, Y., Wang, C., Micropatterning of proteins on 3D porous polymer film fabricated by using the breath figure method, *Adv. Mater.*, **2007**, 19, 913.
- [6] Wong, L.S., Khan, F., Micklefield, J., Selective covalent protein immobilization: strategies and applications, *Chem., Rev.*, **2009**, 109, 4025.
- [7] Taylor, Z.R., Patel, K., Spain, T.G., Keay, J.C., Jernigen, J.D., Sanchez, E.S., Grady, B.P., Johnson, M.B., Schmidtke, D.W., Fabrication of protein dot arrays via particle lithography, *Langmuir*, **2009**, 25, 10932.
- [8] Xue, C., Yonet-Tanyeri, N., Brouette, N., Sferrazza, M., Braun, P. V., Leckband, D. E. Protein adsorption on poly(N-isopropylacrylamide) brushes: dependence on grafting density and chain collapse, *Langmuir*, **2011**, 27, 8810.
- [9] Uhlmann, P., Houbenov, N., Brenner, N., Grundke, K., Burkert, S., Stamm, M., In-situ investigation of the adsorption of globular model proteins on stimuli-responsive binary polyelectrolyte brushes, *Langmuir*, **2007**, 23 (11), 57.
- [10] Andrade, J.D., Hlady, V., Vroman effects, techniques, and philosophies, *Polymer Edition*, 2:3, **1991**, 161.
- [11] Hoy, O., Zdyrko, B., Lupitskyy, R., Sheparovych, R., Aulich, D., Wang, J. F., Bittrich, E., Eichhorn, K. J., Uhlmann, P., Hinrichs, K., Muller, M., Stamm, M., Minko, S., Luzinov, I., Synthetic hydrophilic materials with tunable strength and a range of hydrophobic interactions, *Adv. Funct. Mater.*, **2010**, 22 (14), 2240.
- [12] Toscano, A., Santore, M.M., Fibrinogen adsorption on three silica based surfaces: Conformations and kinetics, *Langmuir*, **2004**, 22, 6, 2588.
- [13] Herriot, S. Y., Jones, R. A. L., An interfacial instability in a transient wetting layer leads to lateral phase separation in thin spin-cast polymer-blend films, *Nat. Mater.*, **2005**, 4, 782.
- [14] Cui, L., Ding, Y., Li, X., Wang, Z., Han, Y.C., Solvent and polymer concentration effects on the surface morphology evolution of immiscible polystyrene/poly (methyl methacrylate) blends, *Thin Solid Films*, **2006**, 515, 2038.
- [15] Berggren, M., Inganäs, O., Gustafsson, G., Rasmusson, J., Andersson, M. R. Hjertberg, T Wennerström, O., Light-emitting diodes with variable colours from polymer blends, *Nature*, **1994**, 372, 444.
- [16] Khopade, A. J., Caruso, F., Surface-modification of polyelectrolyte multilayer-coated particles for biological applications, *Langmuir*, **2003**, 19 (15), 6219.

- [17] Caruso, F., Mohwald, H., Protein multilayer formation on colloids through a stepwise self-assembly technique, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121 (25), 6039.
- [18] Santos, J.P., Welsh, E.R., Gaber, B.P., Singh, A., Polyelectrolyte-assisted immobilization of active enzymes on glass beads, *Langmuir* **2001**, 17 (17), 5361–5367.
- [19] Schwinte, P., Ball, V., Szalontai, B., Haikel, Y., Voegel, J.-C., Schaaf, P., Secondary structure of proteins adsorbed onto or embedded in polyelectrolyte multilayers, *Biomacromolecules*, **2002**, 3 (6), 1135.
- [20] Gergely, C., Bahi, S., Szalontai, B., Flores, H., Schaaf, P., Voegel, J.-C., Cuisinier, F.J.G., Human serum albumin self-assembly on weak polyelectrolyte multilayer films structurally modified by pH changes, *Langmuir*, **2004**, 20 (13), 5575.
- [21] Ngankam, A. P., Mao, G., Van Tassel, P.R., Fibronectin adsorption onto polyelectrolyte multilayer films, *Langmuir*, **2004**, 20 (8), 3362.
- [22] Lyklema, J., Fundamentals of interface and colloid science, San Diego: Academic Press; **2005**.
- [23] Kleiman, J., Gehin-Delval, C., Auweter, H., Borcovec, M., Super-stoichiometric charge neutralization in particle-polyelectrolyte systems, *Langmuir*, **2005**, 21, 8, 3688.
- [24] Adamczyk, Z., Zembala, M., Michna, A., Polyelectrolyte adsorption layers studied by streaming potential and particle deposition, *Journal of Colloid and Interface Science*, **2006**, 303, 2, 353.
- [25] Hesselink, F., On the adsorption of polyelectrolyte macromolecules on a flat interface. An approximate theory for low potentials, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, **1972**, 37,1, 317.
- [26] Stoll, S., Chodanowski, P., Polyelectrolyte Adsorption on an oppositely charged spherical particle. Chain rigidity effects, *Macromolecules*, **2002**, 35, 25, 9556.
- [27] Maurer, S. A., Bedbrook, C. N., Radke, C. J., Cellulase adsorption and reactivity on a cellulose surface from flow ellipsometry, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **2012**, 51, 35, 11389.
- [28] Hammond, P.T., Recent explorations in electrostatic multilayer thin film assembly, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **1999**, 4, 6, 430.
- [29] Decher, G. H. J. D., Hong, J. D., Schmitt, J., Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly Process, *Thin solid films*, **1992**, 210, 831.
- [30] Kayitmazer, A. B., Seeman, D., Minsky, B. B., Dubin, P. L., Xu, Y., Protein–polyelectrolyte interactions, *Soft Matter*, **2013**, 9, 2553.
- [31] Izumrudov, V. A., Kharlampieva, E., Sukhishvili, S. A., Multilayers of a globular protein and a weak polyacid: Role of polyacid ionization in growth and decomposition in salt solutions, *Biomacromolecules*, **2005**, 6, 1782.
- [32] Wang, B., Wang, Y.-J., Gao, X.-F., Li, Y.-S., Utilization of parameters developed in layer-by-layer fabrication of protein-containing films for enzyme immobilization, *J. Biomater. Sci., Polym.*, Ed., **2015**, 26, 1312.
- [33] Pietrasik, J., Szczotki polimerowe jako materiały funkcjonalne, *Zeszyty Naukowe nr. 1171*, **2013**, 12-13.
- [34] a) Ishizu, K., Architecture of multi-component copolymer brushes: synthesis, solution properties and application for nanodevices, *Polym. J.* **2004**, 36, 775; b) Zhang, M., Mueller, A.H.E., Cylindrical polymer brushes, *J. Polym. Sci., Part A Polym. Chem.*, **2005**, 43, 3461.
- [35] a) Halperin, A., Tirrell, M., Lodge, T.P., Tethered chains in polymer microstructures, *Adv. Polym. Sci.*, **1992**, 100, 31, b) Tsujii Y., Ejaz, M., Yamamoto, S. , Ohno, K., Urayama, K. , Fukuda, T., Structure and properties of high-density polymer brushes, *Polym. Brushes*, **2004**, 273, c) Tsujii, Y., Ohno, K., Yamamoto, S., Goto, A., Fukuda, T., Structure and properties of high-density polymer brushes prepared by surface-initiated living radical polymerization, *Adv. Polym. Sci.*, **2006**, 197, 1; d) Barbey, R., Lavanant, L., Paripovic, D., Schuwer, N., Sugnaux,

- C., Tugulu, S., Klok, H.-A., Polymer brushes via surface-initiated controlled radical polymerization: synthesis, characterization, properties, and applications, *Chem Rev.*, **2009**, 109, 5437.
- [36] Sumerlin, B. S.; Matyjaszewski, K., "Molecular brushes-densely grafted copolymers" *In Macromolecular Engineering*, Matyjaszewski, K.; Gnanou, Y.; Leibler, L., Eds. Wiley-VCH: Weinheim, **2007**; Vol. 2, pp 1103.
- [37] Lee, H.-I., Pietrasik, J., Sheiko, S.S., Matyjaszewski, K., Stimuli-responsive molecular brushes, *Prog. Polym. Sci.*, **2010**, 35, 24.
- [38] Alarcon, C. H., Pennadam, S., Alexander, C., Stimuli responsive polymers for biomedical applications, *Chem. Soc. Rev.*, **2005**, 34, 276.
- [39] Cohen Stuart, M. A., Huck, W. T. S., Genzer, J., Müller, M., Ober, C., Stamm, M., Sukhorukov, G.B., Szleifer, I., Tsukruk, V.V., Urban, M., Winnik, F., Zauscher, S., Luzinov, I., Minko, S., Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials, *Nature Materials*, **2010**, 9, 101.
- [40] Uhlmann, P.; Houbenov, N.; Brenner, N.; Grundke, K.; Burkert, S.; Stamm, M. In-Situ Investigation of the Adsorption of Globular Model Proteins on Stimuli-Responsive Binary Polyelectrolyte Brushes, *Langmuir*, **2007**, 23 (11), 57.
- [41] Hoy, O.; Zdyrko, B.; Lupitsky, R.; Sheparovych, R.; Aulich, D.; Wang, J. F.; Bittrich, E.; Eichhorn, K. J.; Uhlmann, P.; Hinrichs, K.; Muller, M.; Stamm, M.; Minko, S.; Luzinov, I. Synthetic hydrophilic materials with tunable strength and a range of hydrophobic interactions. *Adv. Funct. Mater.* 2010, 20 (14), 2240–2247.
- [42] Goodwin, J., Hearn, J., Ho, C.C., Otewill, R. H., Studies on the preparation and characterisation of monodisperse polystyrene latices, *Colloid Polym. Sci.*, **1974**, 252, 464.
- [43] Dolinsky, T. J.; Nielsen, J. E.; McCammon, J. A.; Baker, N. A. PDB2PQR: An automated pipeline for the setup of poisson – boltzmann electrostatics calculations, *Nucleic Acids Res.*, **2004**, 32, W665–W667.
- [44] vander Straeten, A., Bratek-Skicki, A., Jonas, A. M., Fustin, C.-A., Dupont-Gillain, C., Integrating proteins in layer-by-layer assemblies independently of their electrical charge, *ACS Nano*, **2018**, 12 (8), 8372.
- [45] A. Bratek-Skicki, P. Eloy, M. Morga, C. Dupont-Gillain, Reversible protein adsorption on mixed PEO/PAA polymer brushes: Role of ionic strength and PEO content, *Langmuir*, **2018**, 34 (9), 3037.
- [46] Figueira, V.C., Jones, J.P., J. Viscoelastic study of the adsorption of bovine serum albumin on gold and its dependence on pH, *Colloid Interface Sci.*, **2008**, 325, 107.
- [47] Galisteo F, Norde W., Adsorption of lysozyme and α -lactalbumin on poly(styrenesulphonate) latices 2. Proton titrations, *Colloids Surf. B*, **1995**, 4, 389.
- [48] Wasilewska, M., Adamczyk, Z., Jachimska B., Structure of fibrinogen in electrolyte solutions derived from dynamic light scattering (DLS) and viscosity measurements, *Langmuir*, **2009**, 25, 3698.
- [49] (a) Adamczyk, Z., Bratek-Skicki, A., Dąbrowska, P., Nattich-Rak, M., Mechanisms of fibrinogen adsorption on latex particles determined by zeta potential and AFM measurements, *Langmuir*, **2012**, 28, 474. (b) Bratek-Skicki, A., Żeliszewska, P., Adamczyk, Z., Cieśla, M., Human fibrinogen monolayers on latex particles: role of ionic strength, *Langmuir*, **2013**, 29, 3700, (c) Adamczyk, Z., Cichocki, B., Ekiel – Jeżewska, M. L., Słowicka, A., Wajnryb, E., Wasilewska, M., Fibrinogen conformations and charge in electrolyte solutions derived from DLS and dynamic viscosity measurements, *J. Colloid Interface Sci.*, **2012**, 385, 244.
- [50] Wasilewska, M., Adamczyk, Z., Fibrinogen adsorption on mica studied by AFM and in situ streaming potential measurements, *Langmuir*, **2011**, 27, 2, 686.

- [51] Bratek-Skicki, A., Żeliszewska, P., Adamczyk, Z., Tuning conformations of fibrinogen monolayers on latex particles by pH of adsorption, *Colloids and Surfaces B; Biointerfaces*, **2013**, 103, 482.
- [52] Bratek-Skicki, A., Żeliszewska, P., Adamczyk, Z., Human fibrinogen adsorption on latex particles at pH 7.4 studied by electrophoretic mobility and AFM measurements, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2014**, 14, 640.
- [53] Adamczyk, Z., Bratek-Skicki, A., P. Żeliszewska, M. Wasilewska, Mechanisms of fibrinogen adsorption at solid substrates, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2014**, 14, 702.
- [54] Bratek-Skicki, A., Żeliszewska, P., Ruso, J.M., Fibrinogen: a journey into biotechnology, *Soft Matter*, **2016**, 12, 8639.
- [55] Štajner, L., Požar J., Kovačević, D., Complexation between lysozyme and sodium poly(styrenesulfonate): The effect of pH, reactant concentration and titration direction, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.*, **2015**, 483, 171.
- [56] Wu, F.-G., Jiang, Y.-W., Sun, H.-Y., Luo, J.-J., Yu, Z.-W., J., Complexation of lysozyme with sodium poly(styrenesulfonate) via the two-state and non-two-state unfoldings of lysozyme, *Phys. Chem. B*, **2015**, 119, 14382.
- [57] Cousin, F., Gummel, J., Combet, S., Boue, F., The model lysozyme-PSS for electrostatic complexation: Similarities and differences with complex coacervation, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2011**, 167, 71.
- [58] Gummel, J., Cousin, F., Boue, F., Structure transition in PSS/lysozyme complexes: A chain-conformation-driven process, as directly seen by small angle neutron scattering, *Macromolecules*, **2008**, 41, 2898.
- [59] Cousin, F., Gummel, J., Ung, D. Boue, F., Polyelectrolyte–protein complexes: structure and conformation of each specie revealed by SANS, *Langmuir*, **2005**, 21, 9675.
- [60] Gummel, J., Boue, F., Clemens, D., Cousin, F., Finite size and inner structure controlled by electrostatic screening in globular complexes of proteins and polyelectrolytes, *Soft Matter*, **2008**, 4, 1653.
- [61] Sedlak, E., Fedunova, D., Vesela, V., Sedlakova, D., Antalík, M., Polyanion hydrophobicity and protein basicity affect protein stability in protein-polyanion complexes, *Biomacromolecules*, **2009**, 10, 2533.
- [62] Schmidt, I., Cousin, F., Huchon, C., Boue, F., Axelos, M. A. V., Spatial structure and composition of polysaccharide–protein complexes from small angle neutron scattering, *Biomacromolecules*, **2009**, 10, 1346.
- [63] Carlsson, F., Malmsten, M., Linse, P., Protein-polyelectrolyte cluster formation and redissolution: A Monte Carlo study, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 3140.
- [64] Cooper, C. L., Dubin, P. L., Kayitmazer, A. B., Turksen, S., Polyelectrolyte–protein complexes, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **2005**, 10, 52.
- [65] vander Straeten, A. Bratek-Skicki, A., Germain, L., d’Haese, C. Eloy, P., Fustin, C.A. Dupont-Gillain, C. Protein-polyelectrolyte complexes to improve the biological activity of proteins in layer-by-layer assemblies, *Nanoscale*, **2017**, 9, 17186.
- [66] vander Straeten, A., Bratek-Skicki, A., Jonas, A.M., Fustin, C.-A., Dupont-Gillain, C., Integrating proteins in layer-by-layer assemblies independently of their electrical charge, *ACS Nano*, **2018**, 12 (8), 8372.
- [67] Carlsson, F.; Linse, P.; Malmsten, M., Monte Carlo simulations of polyelectrolyte-protein complexation, *J. Phys. Chem. B*, **2001**, 105, 9040.
- [68] Bratek-Skicki, A., Eloy, P., Morga, M., Dupont-Gillain, C., Reversible protein adsorption on mixed PEO/PAA polymer brushes: Role of ionic strength and PEO content, *Langmuir*, **2018**, 34 (9), pp 3037.

[69] Bratek-Skicki, A., Castaudo, V., Savocco, J., Nootens, S., Morsomme, P., Delcorte, A., Dupont-Gillain, C., Mixed polymer brushes for the selective capture and release of proteins, *Biomacromolecules*, **2019**, 20, 2, 778.

[70] Bratek-Skicki, A., Design of ultra-thin PEO/PDMAEMA polymer coatings for tunable protein adsorption, *Polymers* **2020**, 12(3), 660.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

5.1. Omówienie osiągnięć niewchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej

Studia magisterskie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego (specjalność: chemia polimerów) ukończyłam obroną pracy magisterskiej w 2002 roku, której celem była synteza glicydoamidu i jego stopniowa poliaddycja do amin alifatycznych. W tym okresie opracowałam nowy produkt polimerowy, który był testowany do produkcji farb, lakierów, produktów gipsowych przez firmę Dwory (obecnie "Synthos" S.A.) w Oświęcimiu.

Po obronie pracy magisterskiej rozpocząłam studia doktoranckie w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni Polskiej Akademii Nauk zmieniając jednocześnie profil moich badań. Głównym celem mojej pracy doktorskiej stało się określenie wpływu zaadsorbowanych polielektrolitów na powierzchni miki na adsorpcję cząstek lateksowych. Powierzchnię zmodyfikowaną za pomocą zaadsorbowanych polielektrolitów scharakteryzowałam metodą potencjału przepływu. Proces osadzania cząstek lateksu na zmodyfikowanych powierzchniach był monitorowany przez bezpośrednią obserwację pod mikroskopem optycznym lub przy użyciu mikroskopii sił atomowych (AFM). Metoda potencjału przepływu umożliwia obserwowanie zmian potencjału dzeta powierzchni w funkcji pokrycia polielektrolitem/białkiem. Metoda ta pozwala wykrywać stężenia zaadsorbowanych obiektów w zakresie 0,1 ppm, co nie jest możliwe przy użyciu innych metod. Eksperymenty te przeprowadziłam w warunkach transportu dyfuzyjnego i konwekcyjnego przy użyciu odpowiednich celek. Podczas studiów doktoranckich:

- Opracowałam nową metodologię wykrywania śladowych ilości makromolekuł i białek na powierzchniach ciała stałe/ciecz, w oparciu o kinetykę osadzania cząstek koloidalnych, które są znacznie bardziej precyzyjne niż inne obecnie stosowane metody (np. elipsometria).

- Określiłam ograniczenia powszechnie stosowanej teorii DLVO przez precyzyjne pomiary kinetyki osadzania cząstek koloidalnych na powierzchniach modyfikowanych kontrolowanymi ilościami polielektrolitów/białek.
- Zademonstrowałam znaczenie hydratacji i efektów jonizacji kondensacyjnej w procesach adsorpcji. Wyniki te zakwestionowały zastosowanie ogólnej teorii de Gennesa.

Pracę doktorską zatytułowaną „Określenie wpływu zaadsorbowanych polielektrolitów na kinetykę oraz topologię zaadsorbowanych monowarstw cząstek koloidalnych” której promotorem był prof. dr hab. inż. Zbigniew Adamczyk, obroniłam w roku 2009.

Prace [1-5] obejmujące artykuły w recenzowanych czasopismach międzynarodowych i krajowych zostały opublikowane przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora i przedstawiają główne osiągnięcia opisane w mojej rozprawie doktorskiej.

Opublikowane przed doktoratem:

1. Z. Adamczyk, **A. Bratek**, E. Szelaż, A. Bastrzyk, A. Michna, J. Barbasz, „Colloid Particle Deposition on Heterogeneous Surfaces Produced by Polyelectrolyte Adsorption,” *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **2009**, 343, 111–117, **IF₂₀₀₉ = 1,988**.
2. **A. Bratek**, Z. Adamczyk, A. Michna, M. Zembala, „Particles Deposition on Surfaces of Controlled Heterogeneity,” *Colloids for nano- and biotechnology*, ISBN 978-963-9319-70-7, **2009**.
3. **A. Bratek**, Z. Adamczyk, A. Michna, M. Zembala, M. Szaraniec, 2007, „Characterization of polyelectrolytes in the bulk and at solid/liquid interfaces,” *Surfactants and Dispersed Systems in Theory and Practice*, SURUZ, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, red. K. A. Wilk, ISBN 83-7076-125-9, 57-60, **(materiały konferencyjne)**.
4. Z. Adamczyk A. Michna, M. Szaraniec, **A. Bratek**, J. Barbasz. „Characterization of Poly(ethylene imine) Layers on Mica by Streaming Potential and Particle Deposition Methods,” *Journal of Colloid and Interface Science*, **2007**, 303, 353-364, **IF₂₀₀₇ = 2,309**.
5. Z. Adamczyk, **A. Bratek**, B. Jachimska, T. Jasiński, P. Warszyński „Structure of Poly(acrylic) acid in Electrolyte Solutions Determined from Simulations and Viscosity Measurements,” *J. Chem. Phys. B*. **2006**, 110, 22426-22435 **IF₂₀₀₆ = 4,115**.

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora, odbyłam roczny staż podoktorski w ramach indywidualnego stypendium Irish Research Council for Science, Engineering and Technology (IRCSET) zatytułowanego „Design and Synthesis of Nanoparticles with Novel Cell Targeting Functionalities” w Centre for Bio-Nano Interactions, University College Dublin w Irlandii.

Zajmowałam się badaniem wpływu nanocząstek krzemionki na metabolizm komórek fibroblastu (WI-38), a w szczególności związku toksyczności z właściwościami fizykochemicznymi nanocząstek. Badałam również proces tworzenia, jak i skład otoczki białkowej na powierzchni nanocząstek po kontakcie z osoczem [B]. Ponadto brałam udział w opracowaniu nowych strategii skutecznej immobilizacji białek na nanocząstkach a w szczególności:

- Opracowałam metody kowalencyjnego unieruchomiania białek (albumina surowicy wołowej, albumina surowicy ludzkiej, transferyna) na nanocząsteczkach polistyrenowych znakowanych fluorescencyjnie.
- Przeprowadziłam pierwsze badania dotyczące analizy składu otoczki białkowej utworzonej po kontakcie z białkami osocza w zależności od rodzaju nanocząstek.
- Brałam aktywny udział w opracowaniu procedury immobilizacji Apolipoproteiny E znakowanej fluorescencyjnie, która była później wykorzystana w eksperymentach badających transport przez barierę krew-mózg (BBB).

Uzyskane wyniki zaprezentowałam również na następujących konferencjach: i) European Colloid Interface Society (2009), ii) 8th International Conference on Advanced Polymers via Macromolecular Engineering (2009), iii) BioNano Inspiring Responsible Development for Society and the Environment (2009), iv) US- Poland Workshop & Summer School (2010).

W sierpniu 2010 roku zostałam zatrudniona na stanowisku chemika w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, w grupie Koloidy kierowanej przez prof. dr hab. inż. Zbigniewa Adamczyka. Głównym przedmiotem moich badań było określenie mechanizmów adsorpcji fibrynogenu na mikrosferach polimerowych, wyznaczenie pokrycia maksymalnego oraz określenie stabilności monowarstw białkowych. Moje badania obejmowały zarówno syntezę mikrosfer polimerowych z różnymi grupami funkcyjnymi, jak również opracowanie efektywnej metody tworzenia monowarstw białkowych na sferycznych makrocząstkach o określonym pokryciu i orientacji biomolekuł [H1-H5, C,D]. W tym okresie współpracowałam z dwiema polskimi firmami IBSS BIOMED S.A., Polska będącej producentem szczepionek i probiotyków oraz P.W. BIOMEX, Polska, będącej producentem szybkich testów lateksowych dla mikrobiologicznej diagnostyki laboratoryjnej. Współpraca opierała się na wykonywaniu syntez określonych sferycznych nośników polimerowych, wykorzystywanych później do produkcji testów diagnostycznych.

W latach 2006-2016 współpracowałam z teoretykami, tj. Prof. P. Warszynskim, dr hab. Jakubem Barbaszem z IKiFP oraz dr hab. Jakubem Cieślą z Instytutu Fizyki im. M. Smoluchowskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego co zaowocowało opublikowaniem kilku prac [H2,5,C,D].

W październiku 2015 rozpoczęłam kolejny staż naukowy w ramach indywidualnego stypendium Marii Skłodowskiej-Curie poświęcony badaniom adsorpcji białek na szczotkach polimerowych. Projekt ten, zatytułowany „Mixed brushes of stimuli-responsive polymers for the selective adsorption of proteins,” był realizowany na uniwersytecie UCLouvain w Belgii. Głównym celem moich badań było opracowanie szczotek polimerowych zakotwiczonych na powierzchni złota umożliwiających efektywną adsorpcję i desorpcję białek połączoną z selektywną immobilizacją danego białka z mieszaniny białek [H9-H11]. W trakcie realizacji tego projektu nawiązałam współpracę z kilkoma grupami badawczymi na tamtejszym uniwersytecie (Prof. P. Morsomme, Prof. A. Delcorte, Prof. A.M. Jonas, Prof. C.-A. Fustin), która umożliwiła mi pogłębienie znajomości technik badawczych takich jak XPS i ToF-SIMS oraz umożliwiła mi udział w innym projekcie badawczym zatytułowanym „Exploiting protein-polyelectrolyte interactions to control and tune protein immobilization at interfaces.” Głównym celem badań było określenie mechanizmu powstawania kompleksów białkowo-polielektrolitowych wykorzystywanych do wprowadzania dużych ilości białka w warstwy polielektrolitowe wytwarzane metodą LbL przy zachowaniu całkowitej aktywności biologicznej [H7-H8]. W tym okresie nawiązałam również współpracę z Prof. J.M.Ruso z uniwersytetu w Santiago De Compostella z Hiszpanii czego owocem jest wspólna praca przeglądowa opisująca oddziaływania fibrynogenu z ligandami funkcyjnymi za pomocą różnych technik eksperymentalnych oraz modeli teoretycznych, jego znaczenia jako głównego inhibitora surfaktantów płucnych oraz jego adsorpcji na powierzchniach granicznych ciało stałe/ciecz [H6].

W lipcu 2018 roku rozpoczęłam pracę na uniwersytecie VUB w Brukseli w ramach projektu badawczego zatytułowanego „Optical and microfluidic tools to unravel the dynamics of bio-condensates.” Głównym celem tego projektu jest opracowanie nowatorskiego chipu umożliwiającego manipulowanie, detekcję oraz śledzenie zmian strukturalnych ciekłych kondensatów utworzonych z białek związanych z chorobami neurodegeneracyjnymi takimi jak stwardnienie zanikowe boczne (ALS), demencja czołowo-skroniowa (FTD) [E,F].

Prace opublikowane po uzyskaniu stopnia naukowego doktora, niewchodzące w skład cyklu publikacji zostały przedstawione poniżej.

Prace opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora

- A. Z. Adamczyk, M. Nattich, **A. Bratek**, „Adsorption and Deposition of Particles, Polyelectrolytes and Biopolymers, Nanoscience: Colloidal and Interfacial Aspects; Eds Victor Starov; Boca Raton, Fla.: CRC; London: Taylor & Francis; vol. 147; ISBN 978-1-4200-6500-8; **2010 (rozdział w książce)**.
- B. M. Stępnik, J. Arkusz, A. Smok, **A. Bratek-Skicki**, A. Salvati, J. Hanrahan, I. Lynch, K.A. Dawson, H. De Jong Wim, K. Rydzynski, „Diverse Cytotoxic Effects of Silica Nanoparticles with Different Physico-Chemical Characteristics on 3T3-L1 Mouse and WI-38 Human Fibroblast,” *Toxicology and Applied Pharmacology*, **2012**, 263, 89-101, **IF₂₀₁₂ = 3,975**.
- C. P. Żeliszewska, **A. Bratek-Skicki**, Z. Adamczyk, M. Cieśla, „Modelling and Measurements of Fibrinogen Adsorption on Positively Charged Microspheres,” *Condens. Matter Phys.*, 19, **2016**, 13801-13014, **IF₂₀₁₆ = 0.882**.
- D. P. Żeliszewska, **A. Bratek-Skicki**, Z. Adamczyk, M. Cieśla “Human Fibrinogen Adsorption on Positively Charged Latex Particles,” *Langmuir*, **2014**, 30 (37), pp 11165–11174 **IF₂₀₁₄ = 4,457**.
- E. P. Gelin, J. Van Lindt, **A. Bratek-Skicki**, S. Stroobants, M. Krzek, I. Ziemecka, P. Tompa, W. De Malsche, D. Maes, „Focusing of Microcrystals and Liquid Condensates in Acoustofluidics,” *Crystals*, **2019**, 9(3), 120, **IF₂₀₁₉ = 2,404**.
- F. **A. Bratek-Skicki**, R. Pancsa, B. Mészáros, J. Van Lindt, “A Guide to Regulation of the Formation of Biomolecular Condensates,” *The FEBS Journal*, **2020**, 287, 10, 1924-1935 **IF₂₀₁₉ = 4,392**.

5.2. Wykłady

1. **A. Bratek-Skicki**, „Protein Adsorption on Polymeric Carriers for Biomedical Applications,” seminarium instytutowe Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. J. Habera PAN, 15 kwietnia, 2020 Kraków.

5.3. Projekty badawcze

Kierownik projektu:

2012-2013 – project KNOW dla młodych pracowników naukowych, MNiSW, „Determining mechanisms and conformational changes of protein adsorption on colloidal particles.”

Wykonawca:

1. 2018 – obecnie - Strategic Research Programme (SRP) Spearhead, Growth funding „Optical and microfluidic tools to unravel the dynamics of bio-condensates,” VUB, Bruksela, Belgia.
2. 2016-2017 – Projekt FNRS, „Exploiting protein-polyelectrolyte interactions to control and tune protein immobilization at interfaces,” UCLouvain, Belgia.
3. 2015-2017 – Projekt europejski, indywidualne stypendium Marii-Skłodowskiej-Curie 659391, „Mixed brushes of stimuli-responsive polymers for the selective adsorption of proteins,” UCLouvain, Belgia.
4. 2013-2015 – Grant Narodowego Centrum Nauki, Opus UMO-2012/07/B/ST4/00559, „Określenie mechanizmów adsorpcji wybranych białek anizotropowych w kontrolowanych warunkach transportu”, IKiFP im. J. Habera PAN, Kraków, Polska.

5. 2011-2014 – Grant Narodowego Centrum Nauki, NN 204 4390 40, „Nowe układy multiwarstwowe o kontrolowanej architekturze i funkcjonalności”, IKiFP im. J. Habera PAN, Kraków, Polska.
6. 2010-2015 – Grant POIG, POIG.01.01.02-12-028/09, „Funkcjonalne nano i mikrocząstki – synteza oraz zastosowania w innowacyjnych materiałach i technologiach (*FUNANO*)”, IKiFP im. J. Habera PAN, Kraków, Polska.
7. 2010-2013 – Grant Narodowego Centrum Nauki, NN 204 0264 38, „Nowa metoda ilościowego opisu oddziaływań cząstek koloidalnych oraz białek z granicami faz oparta na pomiarach elektrokinetycznych”, IKiFP PAN, Kraków, Polska.
8. 2009-2010 – indywidualne stypendium IRCSET, Centre for Bio-Nano Interaction UCD, „Design and synthesis of nanoparticles with novel cell targeting functionalities,” Dublin, Irlandia.
9. 2007-2010 – Projekt badawczy specjalny, COST D43, 1193/COST/2007/03, „Nowe nanomateriały powierzchniowe o kontrolowanej architekturze i funkcjonalności dla zastosowań biomedycznych”, IKiFP PAN, Kraków, Polska.
10. 2007-2010 – Grant Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, N205 022 31/1112, „Nowa metoda wytwarzania nośników nano- oraz mikrokapsularnych o określonej funkcjonalności do selektywnego dostarczania reagentów”, IKiFP PAN, Kraków, Polska.
11. 2007-2009 – Grant Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego – project promotorski, N204 150 32/3822, „Określenie wpływu zaadsorbowanych polielektrolitów na kinetykę oraz topologię zaadsorbowanych monowarstw cząstek koloidalnych, IKFP, PAN, Kraków.

5.4 Działalność ewaluacyjna

1. Journal of Colloid and Interface Science, 2019-1.
 2. Langmuir, 2015-1, 2016-1, 2017-1.
 3. Biomaterials, 2015-1.
 4. The Open Medicinal Chemistry, 2019-1, 2020-1.
 5. International Journal of Biomacromolecules, 2019-1.
 6. Molecular Pharmaceutics, 2019-1, 2020-1.
 7. Colloid and Polymer Science, 2019-1, 2020-1.
 8. Colloids and Interface Science Communications, 2019-1.
 9. Current Analytical Chemistry 2018-1, 2019-1.
 10. Polymers, 2020-2.
 11. Antioxidants, 2020-1.
 12. Materials, 2020-1.
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

6.1. Osiągnięcia dydaktyczne

Opiekun studentów odbywających staż badawczy w IKiFP

1. Opieka dydaktyczna nad studentką Akademii Górniczo-Hutniczej odbywającej staż letni w IKFP (marzec 2011- wrzesień 2011).
2. Opieka nad studentką z Berlińskiego Uniwersytetu Technicznego odbywającą staż badawczy w IKiFP, (czerwiec 2007- lipiec 2007).
3. Opieka naukowa nad studentką Uniwersytetu Jagiellońskiego, odbywającą staż badawczy w IKiFP (styczeń 2011 – czerwiec 2011).

Opieka naukowa nad pracami magisterskimi

1. Opieka naukowa nad pracą magisterską realizowaną na Université catolique de Louvain, Belgia. Amanda Brzeska, „Study of selective protein adsorption on stimuli-responsive polymer brushes,” 2016/2017.
2. Opieka naukowa (*ang. Supervisor*) pracy magisterskiej realizowanej w Vrije Universiteit Brussel, Katholieke Universiteit Leuven, Universiteit Antwerpen Belgia: Luis Fernando Durán Armenta, „Measuring Early Kinetics of Liquid-Liquid Phase Separation of the Low-Complexity Domain of hnRNP A2,” 2019/2020.

Opieka naukowa nad doktorantem w charakterze promotora pomocniczego.

1. Paulina Żeliszewska „Mechanizmy adsorpcji fibrynogenu na powierzchniach nośników koloidalnych, IKFP im J. Habera PAN, 2012-2016.

6.2. Działalność popularyzatorska

1. Organizacja zajęć oraz prezentacji popularyzujących naukę w ramach akcji cyklicznie organizowanych lub współorganizowanych przez IKiFP im J. Habera PAN:
 - Dzień Otwarty IKiFP im. J. Habera PAN organizowany raz w roku (w latach: 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014).
 - Festiwal Nauki w Krakowie organizowany na Rynku Głównym (maj 2008).
2. Oprowadzanie grup studentów, gości krajowych i zagranicznych odwiedzających IKiFP po laboratoriach, (2004-2015) – prezentacja sprzętu laboratoryjnego oraz możliwości badawczych.
3. Otwarte Forum Euro Science, Marie-Skłodowska-Curie Action, prezentacja tematu: „Smart Polymeric Materials for Biomedical Applications,” 2016, Manchester, Wielka Brytania.
4. Przygotowanie prezentacji promujących naukę w ramach PhD Student's Day (2016, 2017), Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgia.
5. Przygotowanie krótkiego filmu na kanale Youtube promującego moją tematykę badawczą (2017): <https://www.youtube.com/watch?v=ao-C6Jj49LI>.

7.1 Granty, staże naukowe, wyróżnienia

2007 – Główna nagroda za najlepszy poster podczas 9th Conference on colloid chemistry, colloid for nano - and biotechnology, Siofok, Węgry.

2007 – Osiągnięcie naukowe IKiFP PAN przyznane przez Radę Naukową IKiFP PAN za „Określenie kinetyki tworzenia oraz struktury monowarstw cząstek koloidalnych oddziaływujących potencjałem krótkozasięgowym (prof. Z. Adameczyk, **mgr A. Bratek**, mgr A. Michna, dr J. Barbasz), Kraków.

2009 – Rozprawa Doktorska wyróżniona nagrodą Rady Naukowej Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN, Kraków.

2009 – Laureat indywidualnego stypendium realizowanego w Centre for Bio-Nano Interactions in Dublin, Ireland „Design and Synthesis of Nanoparticles with Novel Cell Targeting Functionalities, Dublin, Irlandia.”

2013 – Laureat stypendium dla wybitnych młodych naukowców finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach programu KNOW.

2015 – Laureat indywidualnego stypendium Marii Skłodowskiej-Curie „Mixed Brushes of stimuli Responsive Polymers for the selective adsorption of Proteins” realizowanego na Université catholique de Louvain w Belgii.

7.2. Działalność ewaluacyjna projektów

2019 r. – powołanie na stanowisko eksperta w Komisji Europejskiej (European Commission, Research Executive Agency).

7.3 Podsumowanie dorobku naukowego

Mój dotychczasowy dorobek naukowy składa się z **20** oryginalnych publikacji, z czego **19** prac opublikowano w recenzowanych czasopismach z bazy Journal Citation Reports oraz z **3** materiałów konferencyjnych rejestrowanych w bazie Journal Citation Reports. Ich łączna miara oddziaływania IF zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **94,786**. Warto nadmienić, że jestem współautorką rozdziału w książce, trzech prac przeglądowych oraz autorką jednej pracy w której występuję jako jedyny autor. Zgodnie z załącznikami komunikatu MNiSW dotyczącego ujednoliconego wykazu czasopism punktowanych ogłoszonego na lata 2007-2019, łączna punktacja mojego dorobku naukowego wynosi 709 pkt. Według bazy Web of Science h-indeks prac z mojego dorobku naukowego wynosi obecnie **12**. Sumaryczna liczba cytowań według Web of Science wynosi 358 (bez autocytowań liczba wynosi 315 – dn. 15.10.2020). Moje wyniki zostały zaprezentowane podczas 18 wystąpień ustnych (12 wygłoszonych) oraz na 39 plakatach naukowych podczas konferencji krajowych i zagranicznych.

26.10.2020 Anna Bratek-Skicki

Wykaz osiągnięć naukowych albo artystycznych, stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny

I. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH NAUKOWYCH ALBO ARTYSTYCZNYCH, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1. PKT 2 USTAWY

2. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe o którym mowa w art. 219 ust. 1. pkt 2b ustawy:

A) Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Adsorpcja białek na nośnikach polimerowych do zastosowań biomedycznych

Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:

[H1] Z. Adamczyk, **A. Bratek-Skicki**, P. Dąbrowska, M. Nattich-Rak, „Mechanisms of Fibrinogen Adsorption on Latex Particles Determined by Zeta Potential and AFM Measurements,” *Langmuir*, **2012**, 28, 1, 474–485. **IF¹ 2012 = 4,187, 5-letni IF₂₀₁₂ = 4,416.**

Jestem współautorką pomysłu i koncepcji badań. Zaplanowałam i wykonałam pełną charakterystykę fibrynogenu i mikrosfer polimerowych w funkcji pH i siły jonowej. Przeprowadziłam obliczenia ładunków mikrosfer polimerowych oraz cząsteczek fibrynogenu w badanych warunkach, zbadałam stabilność otrzymanych mikrosfer z zaadsorbowaną warstwą białka a następnie opracowałam wyniki doświadczeń i skorelowałam je z obliczeniami teoretycznymi, przygotowałam część materiału graficznego, współredagowałam manuskrypt, a po recenzji brałam udział w przygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów oraz w przygotowaniu korekty manuskryptu zgodnie z ich zaleceniami.

Swój wkład w powstanie publikacji szacuję na 50 %.

[H2] **A. Bratek-Skicki**, P. Żeliszewska, Z. Adamczyk, M. Cieśla, „Human Fibrinogen Monolayers on Latex Particles: Role of Ionic Strength,” *Langmuir*, **2013**, 29, 3700-3710. **IF₂₀₁₃ = 4.384, 5-letni IF₂₀₁₃ = 4.489.**

Mój wkład polegał na uczestnictwie w sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji, wykonaniu prac eksperymentalnych dotyczących sprawdzenia stabilności monowarstwy fibrynogenu w różnych siłach jonowych, wykonaniu części pomiarów ruchliwości elektroforetycznej od stężenia fibrynogenu w roztworze z mikrosferami polimerowymi, przygotowaniu próbek lateksu z zaadsorbowanym fibrynogenem i ich pomiary przy pomocy mikroskopu SEM, analizie danych eksperymentalnych i teoretycznych oraz ich

¹ IF i 5-letni IF wg *Journal Citations Reports* (zgodnie z rokiem opublikowania).

dyskusji, przygotowaniu części wykresów oraz większej części manuskryptu. Po recenzji brałam udział w przygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów oraz w przygotowaniu korekty manuskryptu zgodnie z ich zaleceniami.

Swój wkład w powstanie publikacji szacuję na 55 %.

[H3] A. Bratek-Skicki, P. Żeliszewska, Z. Adamczyk, „Tuning Conformations of Fibrinogen Monolayer on Latex Particles by pH of Adsorption,” *Colloids and Surfaces B; Biointerfaces*, 2013, 103, 482–488. IF₂₀₁₃ = 4,287, 5-letni IF₂₀₁₃ = 4,226.

Mój wkład polegał na uczestnictwie w sformułowaniu celów badawczych oraz zaplanowaniu ich realizacji, sprawdzeniu stabilności monowarstw fibrynogenu o różnym stopniu pokrycia w założonym przedziale czasu, analizie danych eksperymentalnych i teoretycznych oraz ich dyskusji. Po recenzji brałam udział w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz w przygotowaniu korekty manuskryptu według ich zaleceń.

Swój wkład w powstanie publikacji szacuję na 55 %.

[H4] A. Bratek-Skicki, P. Żeliszewska, Z. Adamczyk, „Human Fibrinogen Adsorption on Latex Particles at pH 7,4 Studied by Electrophoretic Mobility and AFM Measurements,” *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2014, 14, 640-648. IF₂₀₁₄ = 3,402, 5-letni IF₂₀₁₄ = 3,632. Artykuł napisany na imienne zaproszenie wystosowane do Habilitantki.

Mój wkład polegał na uczestnictwie w sformułowaniu celów badawczych oraz zaplanowaniu ich realizacji, wykonaniu części pomiarów obejmujących zależność ruchliwości elektroforetycznej od stężenia fibrynogenu w roztworze z mikrosferami polimerowymi, analizie danych eksperymentalnych i teoretycznych oraz ich dyskusji, przygotowaniu części wykresów, większości tekstu manuskryptu, korespondencji z edytorem. Brałam udział w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz w przygotowaniu korekty manuskryptu po recenzji.

Swój wkład w powstanie publikacji szacuję na 55 %.

[H5] Z. Adamczyk, A. Bratek-Skicki, P. Żeliszewska, M. Wasilewska, „Mechanisms of Fibrinogen Adsorption at Solid Substrates,” *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2014, 14, 702-729. IF₂₀₁₄ = 3,402, 5-letni IF₂₀₁₄ = 3,632. Artykuł napisany na imienne zaproszenie wystosowane do Habilitantki.

Jestem współautorką koncepcji tej pracy, opisu i analizy danych literaturowych poświęconych mechanizmom adsorpcji fibrynogenu na mikrosferach polimerowych. W pracy skupiono się głównie na osiągnięciach dotyczących ilościowej interpretacji adsorpcji

fibrynogenu na mikrosferach polimerowych za pomocą badań ruchliwości elektroforetycznej, pomiarów AFM oraz modeli teoretycznych (Gouy-Chapman, 3D). Przeprowadziłam szczegółowy przegląd literaturowy, przygotowałam większą część manuskryptu, wysłałam pracę do czasopisma. Przygotowałam odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz brałam udział w przygotowaniu korekty manuskryptu zgodnie z ich zaleceniami.

Swój wkład w powstanie publikacji szacuję na 65 %.

[H6] A. Bratek-Skicki, P. Żeliszewska, J.M. Ruso, „Fibrinogen: A Journey into Biotechnology,” *Soft Matter*, 2016, 12, 8639-8653. IF₂₀₁₆ = 3,889, 5-letni IF = 3,632

Jestem współautorką koncepcji tej pracy przeglądowej opisującej oddziaływanie fibrynogenu z ligandami funkcyjnymi oraz opisującej znaczenie fibrynogenu jako głównego inhibitora surfaktantów płucnych oraz jego adsorpcji na powierzchniach granicznych ciało stałe/ciecz. Przeprowadziłam szczegółowy przegląd literaturowy, przygotowałam większą część manuskryptu, przygotowałam materiał graficzny oraz odpowiedzi na uwagi recenzentów a po recenzji przeprowadziłam korektę manuskryptu zgodnie z ich zaleceniami.

Swój wkład w powstanie publikacji szacuję na 70 %.

[H7] A. vander Straeten, A. Bratek-Skicki, L. Germain, C. d'Haese, P. Eloy, C.A. Fustin, C. Dupont-Gillain, „Protein-Polyelectrolyte Complexes to Improve the Biological Activity of Proteins in Layer-by-Layer Assemblies,” *Nanoscale*, 2017, 9, 17186-17192. IF₂₀₁₇ = 7,233, 5-letni IF₂₀₁₇ = 7,713.

Mój wkład polegał na uczestnictwie w sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji, wykonaniu części prac eksperymentalnych dotyczących charakterystyki kompleksów białko/polielektrolit obejmujących pomiary ruchliwości elektroforetycznej oraz współczynników dyfuzji. Przeprowadziłam analizę danych eksperymentalnych, brałam udział w przygotowaniu tekstu manuskryptu, korekcie manuskryptu według zaleceń recenzentów oraz opracowaniu odpowiedzi na ich pytania.

Swój wkład w powstanie publikacji szacuję na 40 %.

[H8] A. vander Straeten, A. Bratek-Skicki, A.M. Jonas, C.-A. Fustin, C. Dupont-Gillain, „Integrating Proteins in Layer-by-Layer Assemblies Independently of their Electrical Charge,” *ACS Nano*, 2018, 12 (8), pp 8372–8381. IF₂₀₁₈ = 13.942, 5-letni IF₂₀₁₈ = 13.951.

Mój wkład polegał na uczestnictwie w sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji, wykonaniu części prac eksperymentalnych dotyczących pomiarów ruchliwości

elektroforetycznej, współczynników dyfuzji utworzonych kompleksów w badanych warunkach pH i siły jonowej oraz stabilności utworzonych kompleksów białko/polielektrolit. Przeprowadziłam analizę danych eksperymentalnych i teoretycznych, brałam udział w przygotowaniu tekstu manuskryptu, korekcie manuskryptu według zaleceń recenzentów oraz opracowaniu odpowiedzi na ich pytania.

Swój wkład w powstanie publikacji szacuję na 40 %.

[H9] A. Bratek-Skicki, P. Eloy, M. Morga, C. Dupont-Gillain, „Reversible Protein Adsorption on Mixed PEO/PAA Polymer Brushes: Role of Ionic Strength and PEO Content,” *Langmuir*, 2018, 34 (9), pp 3037–3048. IF₂₀₁₈ = 3,683, 5-Letni IF₂₀₁₈ = 4,147.

Mój wkład polegał na sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji, wykonaniu większości prac eksperymentalnych obejmujących pomiary kinetyki adsorpcji i desorpcji białek na homo i -heterogenicznych szczotkach polimerowych utworzonych z PAA i PEO. Wykonałam pełną charakterystykę szczotek polimerowych za pomocą spektroskopii fotoelektronów (X- Ray Photoelectron Spectroscopy) i mikroskopii sił atomowych (AFM), przeprowadziłam analizę danych eksperymentalnych. Przygotowałam cały manuskrypt wraz z obliczeniami i materiałem graficznym z wyjątkiem wykresów przedstawiających wyniki pochodzące z pomiarów potencjału przepływu. Po recenzji, przygotowałam odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz korektę manuskryptu według ich zaleceń.

Swój wkład w powstanie publikacji szacuję na 80 %.

[H10] A. Bratek-Skicki, V. Cristaudo, J. Savocco, S. Nootens, P. Morsomme, A. Delcorte, C. Dupont-Gillain, „Mixed Polymer Brushes for the Selective Capture and Release of Proteins,” *Biomacromolecules*, 2019, 20, 2, 778-789. IF₂₀₁₉ = 6.092, 5-Letni IF₂₀₁₉ = 5.775.

Mój wkład polegał na sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji, wykonaniu wszystkich prac eksperymentalnych dotyczących kinetyk tworzenia szczotek polimerowych (kwas poli(akrylowy) – PAA, tlenek poli(etyleny)-PEO) oraz monitorowaniu procesu adsorpcji białek (z mieszaniny fibrynogen/lizozym/albumina) za pomocą mikrowagi kwarcowej. Przeprowadziłam pomiary służące identyfikacji zaadsorbowanych białek na powierzchni złota za pomocą spektrometrii mas (Time of Flight Ion Mass Spectrometry) połączonej z analizą głównych składowych (Principal Component Analysis) oraz elektroforezy żelowej. Przygotowałam cały manuskrypt wraz z materiałem graficznym z wyjątkiem wykresów przedstawiających wyniki uzyskane metodą ToF-SIMS. Po recenzji, przygotowałam odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz korektę manuskryptu według ich zaleceń.

Swój wkład w powstanie publikacji szacuję na 80 %.

[H11] **A. Bratek-Skicki**, „Design of Ultra-Thin PEO/PDMAEMA Polymer Coatings for Tunable Protein Adsorption,” *Polymers*, **2020**, 12(3), 660. **IF₂₀₁₉ = 3,426, 5-letni IF = 3,636.**

Jestem autorem pomysłu i koncepcji badań. Sformułowałam cele badawcze, zaplanowałam i wykonałam wszystkie prace eksperymentalne oraz napisałam manuskrypt. Po recenzji przygotowałam odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz przeprowadziłam korektę manuskryptu według ich zaleceń.

Swój wkład w powstanie publikacji szacuję na 100 %.

Sumaryczny impact factor powyższych publikacji zgodnie z datą opublikowania wynosi **57,888.**

II. INFORMACJA O AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ ALBO ARTYSTYCZNEJ

1. Wykaz opublikowanych monografii naukowych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.1).

Brak.

2. Wykaz opublikowanych rozdziałów w monografiach naukowych.

Opublikowane po doktoracie:

1. Z.Adamczyk, M. Nattich, **A. Bratek**, „Adsorption and Deposition of Particles, Polyelectrolytes and Biopolymers,” *Nanoscience: Colloidal and Interfacial Aspects*; Eds Victor Starov; Boca Raton, Fla.: CRC; London: Taylor & Francis; vol. 147; ISBN 978-1-4200-6500-8; **2010 (rozdział w książce).**

Jestem współautorką koncepcji tej pracy, brałam udział w opracowaniu przeglądu literaturowego, w dyskusji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu.

3. Informacja o członkostwie w redakcjach naukowych monografii.

Brak.

4. Wykaz opublikowanych artykułów w czasopismach naukowych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.2).

Opublikowane przed doktoratem:

1. Z. Adamczyk, **A. Bratek**, E. Szelaąg, A. Bastrzyk, A. Michna, J. Barbasz, „Colloid Particle Deposition on Heterogeneous Surfaces Produced by Polyelectrolyte Adsorption,” *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **2009**, 343, 111–117, **IF₂₀₀₉ = 1,988.**

Wykonałam pomiary potencjału przepływu powierzchni miki pokrytej PEI w funkcji pokrycia polikwasem akrylowym (PAA). Wyznaczyłam kinetyki osadzania lateksów na biwarstwach PEI/PAA przy zastosowaniu naczynka z osiowo-symetrycznym napływem suspensji, określiłam zależności początkowej zredukowanej szybkości osadzania cząstek w funkcji pokrycia PAA oraz początkowej zredukowanej szybkości osadzania cząstek od potencjału dzeta miki pokrytej PEI/PAA i maksymalnego pokrycia cząstek od stopnia pokrycia PAA. Analizowałam otrzymane wyniki, napisałam wstępną wersję manuskryptu, przygotowałam odpowiedzi na pytania recenzentów oraz przeprowadziłam korektę manuskryptu według ich zaleceń.

2. **A. Bratek**, Z. Adamczyk, A. Michna, M. Zembala – „Particles Deposition on Surfaces of Controlled Heterogeneity, Colloids for Nano- and Biotechnology,” ISBN 978-963-9319-70-7, **2009**.

Mój wkład polegał na uczestnictwie w sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji, wykonaniu wszystkich prac eksperymentalnych, analizie wyników oraz przygotowaniu całego manuskryptu wraz z materiałem graficznym.

3. **A. Bratek**, Z. Adamczyk, A. Michna, M. Zembala, M. Szaraniec, **2007**, „Characterization of polyelectrolytes in the bulk and at solid/liquid interfaces,” *Surfactants and Dispersed Systems in Theory and Practice*, SURUZ, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, red. K. A. Wilk, ISBN 83-7076-125-9, 57-60, **(materiały konferencyjne)**.

Wykonałam pomiary objętościowe badanych polielektrolitów oraz cząstek polimerowych obejmujące pomiary ruchliwości elektroforetycznej oraz współczynników dyfuzji. Wyznaczyłam zależności potencjału dzeta miki od pokrycia polietylenoiminy, maksymalne pokrycie lateksem na utworzonych monowarstwach przy zastosowaniu naczynka z osiowo-symetrycznym napływem suspensji.

4. Z. Adamczyk A. Michna, M. Szaraniec, A. Bratek, J. Barbasz, „Characterization of Poly(ethylene imine) Layers on Mica by Streaming Potential and Particle Deposition Methods,” *Journal of Colloid and Interface Science*, **2007**, 303, 353-364, **IF₂₀₀₇= 2,309**.

Wyznaczyłam kinetyki osadzania lateksów na warstwach PEI przy zastosowaniu naczynka z osiowo-symetrycznym napływem suspensji, określiłam zależności początkowej zredukowanej szybkości osadzania cząstek w funkcji pokrycia PEI oraz początkowej

zredukowanej szybkości osadzania cząstek od potencjału dzeta miki pokrytej PEI i maksymalnego pokrycia cząstek od stopnia pokrycia PEI. Przeprowadziłam analizę wyników, współredagowałam tekst publikacji oraz udzieliłam odpowiedzi na pytania recenzentów dotyczące wykonanych przeze mnie pomiarów.

5. Z. Adamczyk, **A.Bratek**, B. Jachimska, T.Jasiński, P.Warszyński „Structure of Poly(acrylic) acid in Electrolyte Solutions Determined from Simulations and Viscosity Measurements,” *J. Chem. Phys. B.*, **2006**, 110, 22426-22435, **IF₂₀₀₆ = 4,115**.

Mój wkład polegał na uczestnictwie w sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji, wykonaniu wszystkich prac eksperymentalnych oraz przygotowaniu części manuskryptu wraz z materiałem graficznym. Przeprowadziłam analizę wyników, współredagowałam tekst publikacji a po recenzji przygotowałam odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz przeprowadziłam korektę manuskryptu według ich zaleceń.

Opublikowane po doktoracie:

1. M. Stępnik, J. Arkusz, A. Smok. **A. Bratek-Skicki** A. Salvati, J. Hanrahan, I. Lynch, K.A. Dawson, H. De Jong Wim, K. Rydzynski, „Diverse Cytotoxic Effects of Silica Nanoparticles with Different Physico-Chemical Characteristics on 3T3-L1 Mouse and WI-38 Human Fibroblast,” *Toxicology and Applied Pharmacology*, **2012**, 263, 89-101, **IF₂₀₁₂ =3,975**.

Mój wkład polegał na uczestnictwie w sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji, analizie danych i ich dyskusji. Wykonałam pełną charakterystykę obejmującą pomiary wielkości nanocząstek krzemu w funkcji stężenia, pomiary potencjału dzeta oraz pomiary stabilności badanych układów. Współredagowałam tekst publikacji oraz udzieliłam odpowiedzi na pytania recenzentów dotyczące wykonanych przeze mnie pomiarów.

2. P. Żeliszewska, **A. Bratek-Skicki**, Z. Adamczyk, M. Cieśla, „Modelling and Measurements of Fibrinogen Adsorption on Positively Charged Microspheres,” *Condens. Matter Phys.*, 19, **2016**, 13801-13014, **IF₂₀₁₆ = 0.882**.

Mój wkład polegał na uczestnictwie w sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji, analizie danych i ich dyskusji. Przygotowałam część manuskryptu, odpowiedzi na recenzje oraz przeprowadziłam korektę manuskryptu według zaleceń recenzentów.

3. P. Żeliszewska, **A. Bratek-Skicki**, Z. Adamczyk, M. Cieśla, „Human Fibrinogen Adsorption on Positively Charged Latex Particles,” *Langmuir*, **2014**, 30 (37), 11165–11174 **IF₂₀₁₄ = 4,457**.

Mój wkład polegał na uczestnictwie w sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji, analizie danych i ich dyskusji. Przygotowałam część manuskryptu, odpowiedzi na recenzje oraz przeprowadziłam korektę manuskryptu według zaleceń recenzentów.

4. P. Gelin, J. Van Lindt, **A. Bratek-Skicki**, S. Stroobants, M. Krzek, I. Ziemecka, P. Tompa, W. De Malsche, D. Maes, „Focusing of Microcrystals and Liquid Condensates in Acoustofluidics,” *Crystals*, **2019**, 9(3), 120, **IF₂₀₁₉ = 2,404**.

Mój wkład polegał na uczestnictwie w sformułowaniu celów badawczych i zaplanowaniu ich realizacji, analizie danych i ich dyskusji. Brałam udział w przygotowaniu tekstu manuskryptu, korektcie manuskryptu według zaleceń recenzentów oraz opracowaniu odpowiedzi na ich pytania.

5. **A. Bratek-Skicki**, R. Pancsa, B. Mészáros, J. Van Lindt, „A Guide to Regulation of the Formation of Biomolecular Condensates,” *The FEBS Journal*, **2020**, 287, 10, 1924-1935 **IF₂₀₁₉ = 4,392**.

Jestem współautorką koncepcji tej pracy przeglądowej opisującej podstawowe mechanizmy powstawania bezmembranowych organelli komórkowych, uwzględniających działanie wewnętrznych elementów regulacyjnych, modyfikacje postranslacyjne oraz szeroką gamę związków chemicznych biorących udział w tworzeniu omawianych struktur. Dokonałam przeglądu literaturowego, przygotowałam większą część manuskryptu, przygotowałam część materiału graficznego, przygotowałam odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz przeprowadziłam korektę manuskryptu zgodnie z ich zaleceniami.

Abstrakty konferencyjne publikowane w międzynarodowych czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JRC).

1. **A. Bratek-Skicki**, C. Dupont-Gillain, „Protein adsorption on stimuli-responsive mixed PDMAEMA/PEO polymer brushes,” *The FEBS Journal*, **2016**, 283, 316 (**materiały konferencyjne**), **IF₂₀₁₆ = 3,902**.
2. P. Żeliszewska, **A. Bratek-Skicki**, Z. Adamczyk, „Revealing adsorption mechanism of human fibrinogen on positively charged latex,” *The FEBS Journal*, **2015**, 282, 330 (**materiały konferencyjne**), **IF₂₀₁₅ = 4,237**.
3. **A. Bratek-Skicki**, P. Żeliszewska, Z. Adamczyk, „Human fibrinogen monolayers under aqueous conditions,” *The FEBS Journal*, 282, (2015), 335-336 (**materiały konferencyjne**), **IF₂₀₁₅ = 4,237**.

5. Wykaz osiągnięć projektowych, konstrukcyjnych, technologicznych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt 1.3).

Brak.

6. Wykaz publicznych realizacji dzieł artystycznych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt 1.3).

Brak.

7. Informacja o wystąpieniach na krajowych lub międzynarodowych konferencjach naukowych lub artystycznych, z wyszczególnieniem przedstawionych wykładów na zaproszenie i wykładów plenarnych.

Referaty na zaproszenie:

1. **A. Bratek-Skicki**², Z. Adamczyk, P. Dąbrowska, M. Nattich-Rak, „Determining mechanisms of fibrinogen adsorption at solid/liquid interfaces,” 3rd International Symposium on Surface Imaging/Spectroscopy at the Solid/Liquid Interface, **2012**, Kraków, Polska.
2. **A. Bratek-Skicki**, P. Żeliszewska, Z. Adamczyk, M. Cieśla „Determination of the mechanism of fibrinogen adsorption on colloidal carriers,” At the interface between surface and light: Adsorption and spectroscopy SERS, **2015**, Kraków, Polska.

Komunikaty ustne:

1. **A. Bratek-Skicki**, A. Brzeska, C.C. Dupont-Gillain, „Selective protein adsorption on mixed PEO/PAA polymer brushes studied by time-of-flight ion mass spectrometry and gel electrophoresis,” SIMS21 conference, **2017**, Kraków, Polska.
2. A. vander Sraeten, **A. Bratek-Skicki**, Dupont-Gillain, „Polyelectrolyte interactions to control and tune protein immobilization at interfaces,” Applications in Biocatalysis and Separation Technology, AVS 64th International Symposium and Exhibition, **2017**, Tampa, Floryda, USA.
3. **A. Bratek-Skicki**, C. Dupont-Gillain, „Selective protein adsorption on stimuli-responsive brushes,” European Colloid & Interface Society, **2016**, Rzym, Włochy.
4. P. Żeliszewska, M. Wasilewska, Z. Adamczyk, **A. Bratek-Skicki**, M. Cieśla, „Mechanisms of fibrinogen adsorption on colloidal microparticles,” European Colloid & Interface Society, **2016**, Rzym, Włochy.
5. P. Żeliszewska, **A. Bratek-Skicki**, Z. Adamczyk, „Mechanism of human fibrinogen adsorption on latex particles,” VIIth Interfacial Phenomena in Theory and Practice, **2013**, Sudomie, Polska.
6. P. Żeliszewska, **A. Bratek-Skicki**, Z. Adamczyk, „Electrokinetic and AFM studies of fibrinogen adsorption on colloid particles,” 27th Conference of the European Colloid and Interface Society, **2013**, Sofia, Bułgaria.

² Nazwisko osoby prezentującej zostało podkreślone.

7. **A. Bratek-Skicki**, Z. Adamczyk, P. Dąbrowska, „Mechanisms of fibrinogen adsorption on colloid particles,” 26th Conference of the European Colloid and Interface Society, **2012**, Malmö, Szwecja.
8. P. Dąbrowska, Z. Adamczyk, **A. Bratek-Skicki**, „Fibrinogen monolayers on latex particles - electrophoretic studies,” Interfacial phenomena in theory and practice Young Scientists Workshop, **2012**, Sudomie, Polska.
9. Z. Adamczyk, **A. Bratek-Skicki**, A. Michna, M. Nattich, „Streaming potential characterization of particle and polyelectrolyte adsorption layers at mica,” Workshop of Cost Action D43 “Functionalized Materials and Interfaces,” **2008**, Berlin, Niemcy.
10. Z. Adamczyk, **A. Bratek – Skicki**, A. Michna, M. Nattich; „Mono-and bilayers of macroions on mica studied by the streaming potential method,” 22nd Conference of the European Colloid and Interface Society – ECIS, **2008**, Kraków, Polska.
11. **A. Bratek**, Z. Adamczyk, A. Michna, M. Zembala „Particle deposition on surfaces of controlled heterogeneity,” Colloid for nano- and biotechnology, 9th Conference on colloid chemistry, **2007**, Siofok, Węgry.
12. **A. Bratek**, Z. Adamczyk, T. Jasiński, P. Warszyński, „Deposition of particles on polyelectrolyte covered surfaces,” SURUZ, **2007**, Książ/Wrocław, Polska.
13. **A. Bratek**, Z. Adamczyk, T. Jasiński, Piotr Warszyński „Deposition of particles on polyelectrolyte covered surfaces,” COST D43 Workshop, **2007**, Kraków, Polska.
14. **A. Bratek**, Z. Adamczyk, B. Jachimska, T. Jasiński, P. Warszyński, „The influence of pH and ionic strength on the structure of polyelectrolytes in aqueous solutions,” Surfactants and Dispersed Systems in Theory and Practice, SURUZ, Young Scientists Workshop, **2006**, Sudomie/Kościerzyna, Polska.
15. **A. Bratek**, Z. Adamczyk, B. Jachimska, T. Jasiński, P. Warszyński, „Determining the structure of polyacrylic acid in aqueous solutions,” Young Scientists Workshop, Surfactants and Dispersed Systems in Theory and Practice, SURUZ, **2006**, Lublin, Polska.
16. **A. Bratek**, Z. Adamczyk, B. Jachimska, „Determining the structure of polyelectrolytes by viscosity measurements,” Surfactants and Dispersed Systems in Theory and Practice, SURUZ, **2005**, Kraków, Polska.
17. **A. Bratek**, Z. Adamczyk, B. Jachimska, „The influence of pH and ionic strength on the viscosity of polyelectrolytes solutions,” Surfactants and Dispersed Systems in Theory and Practice XLVIII PTChem i SITPChem, SURUZ, **2005**, Poznań, Polska.
18. **A. Bratek**, Z. Adamczyk, B. Jachimska, „The influence of ionic strength on the viscosity of polyelectrolyte solutions,” Biomedical Applications of Surfactants and Dispersed Systems, SURUZ, **2005**, Pawłowice /Wrocław, Polska.

Plakaty naukowe:

1. **A. Bratek-Skicki**, J. Van Lindt, P. Batys, D. Maes, P. Tompa, „A generic approach for studying the kinetics of liquid-liquid phase separation of ALS-linked protein,” FEBS Congress, **2019**, Kraków, Polska.
2. **A. Bratek-Skicki**, A. Brzeska, C. Dupont-Gillain, „Selective, protein adsorption on mixed PDMAEMA-PEO polymer brushes,” **2017**, Louvain la Neuve, Belgia.
3. **A. Bratek-Skicki**, C. Dupont-Gillain, „Protein adsorption on stimuli-responsive mixed PDMAEMA/PEO polymer brushes,” FEBS Congress, **2016**, Kuşadası, Turcja.
4. **A. Bratek-Skicki**, C. Dupont-Gillain, „Ionic and pH-dependent protein adsorption on stimuli-responsive polymer brushes,” The 1st UCL Interplatform Workshop on Nanotechnology: From Materials to Devices, 2016, Louvain-la-Neuve, Belgia.
5. **A. Bratek-Skicki**, C. Dupont-Gillain, „Protein adsorption on mixed PEO/PAA polymer brushes- role of pH and ionic strength,” Ph.D. Student’s Day, **2016**, Louvain-la-Neuve, Belgia.
6. **A. Bratek-Skicki**, C. Dupont-Gillain, „Smart Polymeric Materials for Biomedical Applications,” Euro Science Open Forum (ESOF), Marie Skłodowska-Curie Actions ESOF Satellite Event, **2016**, Manchester, Wielka Brytania.
7. **A. Bratek-Skicki**, P. Żeliszewska, Z. Adamczyk, „Systematic study of human fibrinogen adsorption on negatively charged colloidal particles,” 29th ECIS, **2015**, Bordeaux, Francja.
8. P. Żeliszewska, **A. Bratek-Skicki**, Z. Adamczyk, „Human fibrinogen monolayers on colloidal carrier particles of various charge,” 15th International Conference on nanotechnology, **2015**, Rzym, Włochy.
9. P. Żeliszewska, **A. Bratek-Skicki**, Z. Adamczyk, „Revealing adsorption mechanism of human fibrinogen on positively charged latex,” FEBS Congress, **2015**, Berlin, Niemcy.
10. **A. Bratek-Skicki**, P. Żeliszewska, Z. Adamczyk, „Human fibrinogen monolayers under aqueous conditions,” FEBS Congress, **2015**, Berlin, Niemcy.
11. P. Żeliszewska, **A. Bratek-Skicki**, Z. Adamczyk, „Conformations of Fibrinogen Monolayers on Latex Particles; Role of pH of Adsorption,” 4th International Colloids Conference Surface Design and Engineering, **2014**, Madryt, Hiszpania.
12. P. Żeliszewska, **A. Bratek-Skicki**, Z. Adamczyk, „Human Fibrinogen Adsorption on Latex particles at pH 7.7 Studied by Electrophoretic Mobility and AFM Measurements,” Frontiers of Polymer Colloids: From Synthesis to Micro-Scale Applications, **2014**, Praga, Czechy.
13. P. Żeliszewska, **A. Bratek-Skicki**, Z. Adamczyk, „Mechanisms of human fibrynogen adsorption on colloid particles determined by electrokinetic and AFM measurements,” 38th Federation of European Biochemical Societies Congress, **2013**, St. Petersburg, Rosja.
14. P. Żeliszewska, **A. Bratek-Skicki**, Z. Adamczyk, „Tuning conformations and stability of fibrinogen monolayers on latex particles,” 27th Conference of the European Colloid and Interface Society, **2013**, Sofia, Bułgaria.

15. P. Dabrowska, Z.Adamczyk, **A. Bratek-Skicki**, M. Nattich-Rak, „Electrokinetic studies of protein adsorption on latex particles,” 3rd International Symposium on Surface Imaging/Spectroscopy at the Solid/ Liquid Interface, 2012, Kraków, Polska.
16. P. Dąbrowska, Z. Adamczyk, **A. Bratek-Skicki**, „Fibrinogen adsorption on latex particles – Electrokinetic studies,” 4th US-Poland Workshop on Interfacial Phenomena at the Nanoscale: Fluids and Soft Matter, 2012, Poznań, Polska.
17. **A. Bratek-Skicki**, Z. Adamczyk, P. Dąbrowska, M. Nattich-Rak, „Determining mechanisms of protein adsorption via AFM, electrokinetic measurements and colloid enhancement,” Colloids and Nanomedicine, **2012**, Amsterdam, Holandia.
18. **A. Bratek-Skicki**, Z. Adamczyk, P. Dąbrowska, „Physicochemical background of the colloid enhancement method for protein monolayer detection at solid/liquid interfaces,” Colloids and Nanomedicine, **2012**, Amsterdam, Holandia.
19. P. Dąbrowska, Z. Adamczyk, **A. Bratek-Skicki**, „Determining mechanisms of fibrinogen adsorption on latex particles,” Colloids and Nanomedicine, **2012**, Amsterdam, Holandia.
20. **A. Bratek-Skicki**, Z. Adamczyk, P. Dąbrowska, „Electrokinetic studies of protein adsorption on latex particles,” 26th Conference of the European Colloid and Interface Society, **2012**, Malmö, Szwecja.
21. M. Nattich-Rak, **A. Bratek-Skicki**, P. Dąbrowska, Z. Adamczyk, „Mechanisms of Fibrinogen Adsorption on Latex Particles Determined by Zeta Potential and AFM Measurements,” 55th Zjazd PTChem i SITPChem, **2012**, Białystok, Polska.
22. **A. Bratek-Skicki**, Z. Adamczyk, P. Dabrowska, „Electrokinetic studies of fibrynogen adsorption on latex particles, „Polymers for Advanced Technologies,” **2011**, Łódź, Polska.
23. **A. Bratek-Skicki**, N. Häntzschel, D. Walczyk, A. S. Pitek, F. B. Bombelli, M. Monopoli, I. Lynch, K. A. Dawson, „Study of nanoparticles under physiological conditions - characterization and protein corona determination,” US-Poland Workshop & Summer School, **2010**, Kraków, Polska.
24. Z. Adamczyk, A. Michna, **A. Bratek-Skicki**, B. Siwek, „Nanoparticles deposition on heterogeneous surfaces produced by polyelectrolyte adsorption,” ISSIS, **2009**, Kraków, Polska.
25. A. Michna, Z. Adamczyk, B. Siwek, **A. Bratek-Skicki**, „Silver nanoparticles deposition on heterogeneous surfaces produced by polyelectrolyte adsorption,” ECIS **2009**, Antalya, Turcja.
26. S. Ramirez-Garcia, **A. Bratek-Skicki**, M. Morris, L. Chen and K. A. Dawson, „Dispersion of TiO₂ nanoparticles in biocompatible fluids, ECIS, **2009**, Antalya, Turcja.
27. N. Häntzschel, **A. Bratek-Skicki**, F. Baldelli Bombelli, A. Salvati, I. Lynch, K.A. Dawson, „Behaviour of nanoparticles under physiological conditions – dispersion, corona evolution and cellular uptake,” 8th International Conference on Advanced Polymers via Macromolecular Engineering, **2009**, Dresden, Niemcy.
28. S. Ramirez-Garcia, **A. Bratek**, S. Coll, M. Morris, Lan Cen, I. Lynch, K. A. Dawson, „Surface modification of TiO₂ nanoparticles assists its dispersion in biocompatible

- fluids, BioNano Inspiring Responsible Development for Society and the Environment,” **2009**, Dublin, Irlandia.
29. Z. Adamczyk, M. Nattich, **A. Bratek-Skicki**, P. Warszyński; „Structure of poly (acrylic) acid in electrolyte solutions and on surfaces determined from simulations and viscosity measurements,” The Polymer Processing Society 24th Annual Meeting, **2008**, Salerno, Włochy.
30. **A. Bratek-Skicki**, Z. Adamczyk, P. Warszyński, M. Nattich; „Polyelectrolyte Structures Determined from Simulations, PCS and Viscosity Measurements,” Polyelectrolytes 2008 International Conference, **2008**, Coimbra, Portugalia.
31. Z. Adamczyk, **A. Bratek-Skicki**, M. Nattich, J. Barbasz; „Characterization of polyelectrolyte mono- and bilayers on mica by the streaming potential and particle deposition methods,” Polymer Network Group – Polymer Networks: Chemistry, Physics, Biology and Applications – PNG 2008, **2008**, Larnaca, Cypr.
32. Z. Adamczyk, **A. Bratek-Skicki**, M. Nattich, J. Barbasz, B. Jachimska, P. Warszyński; „Characterization of polyelectrolyte mono- and multilayers on mica by the streaming potential and particle deposition methods,” 22nd Conference of the European Colloid and Interference Society – ECIS, **2008**, Kraków, Polska.
33. Z. Adamczyk, **A. Bratek-Skicki**, E. Szeląg, A. Bastryk, J. Barbasz; „Colloid Particle Deposition on Heterogeneous Surfaces Poroduced by Mono- and Bilayers of Polelectrolytes,” 22nd Conference of the European Colloid and Interference Society – ECIS, **2008**, Kraków, Polska.
34. **A. Bratek**, Z. Adamczyk, A. Michna, M. Zembala, „Deposition of particles on surfaces covered by polyelectrolytes,” ECIS, **2007**, Geneva, Szwajcaria.
35. **A. Bratek**, Z. Adamczyk, T. Jasiński, P. Warszyński, „Polyelectrolyte structure in solution-simulation and measurements,” COST D43 workshop, **2007**, Kraków, Polska.
36. **A. Bratek**, Z. Adamczyk, A. Michna, M. Zembala, „Characterization of polyelectrolytes in the bulk and at solid/liquid interfaces,” 9th Conference on colloid chemistry, Colloid for nano- and biotechnology, **2007**, Siofok, Węgry.
37. **A. Bratek**, Z. Adamczyk, B. Jachimska, T. Jasiński, P. Warszyński, „Deposition of nanoparticles on surfaces of controlled heterogeneity - creating media of desired architecture,” ECIS, **2006**, Budapeszt, Węgry.
38. B. Jachimska, Z. Adamczyk, **A. Bratek**, A. Galińska – Rakoczy, „Characterization of polyelectrolytes by dynamic light scattering and viscosity measurements,” XVIII International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergies, 3rd Spring Meeting Bioelectrochemistry, **2005**, Coimbra , Portugalia.
39. **A. Bratek**, Z. Adamczyk, B. Jachimska, „Influence of pH and ionic strength on the structure of polyacrylic acid in aqueous solutions,” XLVIII PTChem i SITPChem, **2005**, Poznań, Polska.
8. Informacja o udziale w komitetach organizacyjnych i naukowych konferencji krajowych lub międzynarodowych, z podaniem pełnionej funkcji.
1. 15th European Student Colloid Conference in Kraków, Polska, **2015** – uczestnictwo w organizacji konferencji.
2. 22nd Conference of the European Colloid and Interference Society – ECIS, **2008**, Kraków, Polska, uczestnictwo w organizacji konferencji.

9. Informacja o uczestnictwie w pracach zespołów badawczych realizujących projekty finansowane w drodze konkursów krajowych lub zagranicznych, z podziałem na projekty zrealizowane i będące w toku realizacji, oraz z uwzględnieniem informacji o pełnionej funkcji w ramach prac zespołów.

Kierownik projektu:

2012 – 2013 – project KNOW dla młodych pracowników naukowych, MNiSW, „Determining mechanisms and conformational changes of protein adsorption on colloidal particles.”

Wykonawca:

1. 2018 – obecnie – Strategic Research Programme (SRP) Spearhead, Growth funding „Optical and microfluidic tools to unravel the dynamics of bio-condensates,” VUB, Bruksela, Belgia.
2. 2016 – 2017 – Projekt FNRS, „Exploiting Protein-Polyelectrolyte Interactions to Control and Tune Protein Immobilization at Interfaces,” UCLouvain, Belgia.
3. 2015 – 2017 – Projekt europejski, indywidualne stypendium Marii-Skłodowskiej-Curie 659391, „Mixed brushes of stimuli-responsive polymers for the selective adsorption of proteins,” UCLouvain, Belgia.
4. 2013 – 2015 – Grant Narodowego Centrum Nauki, Opus UMO-2012/07/B/ST4/00559, „Określenie mechanizmów adsorpcji wybranych białek anizotropowych w kontrolowanych warunkach transportu,” IKiFP im. J. Habera PAN, Kraków, Polska.
5. 2011 – 2014 – Grant Narodowego Centrum Nauki, NN 204 4390 40, „Nowe układy multiwarstwowe o kontrolowanej architekturze i funkcjonalności,” IKiFP im. J. Habera PAN, Kraków, Polska.
6. 2010 – 2015 – Grant POIG, POIG.01.01.02-12-028/09, „Funkcjonalne Nano i mikrocząstki- synteza oraz zastosowania w innowacyjnych materiałach i technologiach (FUNANO),” IKiFP im. J. Habera PAN, Kraków, Polska.
7. 2010 – 2013 – Grant Narodowego Centrum Nauki, NN 204 0264 38, „Nowa metoda ilościowego opisu oddziaływań cząstek koloidalnych oraz białek z granicami faz oparta na pomiarach elektrokinetycznych,” IKiFP PAN, Kraków, Polska.
8. 2009 – 2010 – indywidualne stypendium IRCSET, Centre for Bio-Nano Interaction UCD, „Design and Synthesis of Nanoparticles with Novel Cell Targeting Functionalities,” Dublin, Irlandia.
9. 2007 – 2010 – Projekt badawczy specjalny, COST D43, 1193/COST/2007/03, „Nowe nanomateriały powierzchniowe o kontrolowanej architekturze i funkcjonalności dla zastosowań biomedycznych,” IKiFP PAN, Kraków, Polska.
10. 2007 – 2010 – Grant Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, N205 022 31/1112, „Nowa metoda wytwarzania nośników nano- oraz mikrokapsularnych o określonej funkcjonalności do selektywnego dostarczania reagentów,” IKiFP PAN, Kraków, Polska.
11. 2007 – 2009 – Grant Ministerstwa Nauki I Szkolnictwa Wyższego - project promotorski N204 150 32/3822, „Określenie wpływu zaadsorbowanych polielektrolitów na kinetykę oraz topologię zaadsorbowanych monowarstw cząstek koloidalnych,” IKFP, PAN, Kraków, Polska.

10. Członkostwo w międzynarodowych lub krajowych organizacjach i towarzystwach naukowych wraz z informacją o pełnionych funkcjach.

- American Chemical Society od 2015.
- Marie Curie Alumni Association od 2015.
- European Colloid & Interface Society od 2005.
- Euro-Science od 2015.
- The Polish Biochemical Society od 2016.

11. Informacja o odbytych stażach w instytucjach naukowych lub artystycznych, w tym zagranicznych, z podaniem miejsca, terminu, czasu trwania stażu i jego charakteru.

2018 – obecnie – Senior Postdoctoral Researcher – Vrije Universiteit Brussel, Bruksela, Belgia.

2015 – 2017 – stypendium Marii Skłodowskiej-Curie, Université catholique de Louvain, Belgia.

2009 – 2010 – stypendium IRCSET Centre for Bio-Nano Interactions, University College Dublin, Irlandia.

12. Członkostwo w komitetach redakcyjnych i radach naukowych czasopism wraz z informacją o pełnionych funkcjach (np. redaktora naczelnego, przewodniczącego rady naukowej, itp.).

Brak.

13. Informacja o recenzowanych pracach naukowych lub artystycznych, w szczególności publikowanych w czasopismach międzynarodowych.

1. Journal of Colloid and Interface Science, 2019 – 1.
2. Langmuir, 2015 – 1, 2016 – 1, 2017 – 1.
3. Biomaterials, 2015 – 1.
4. The Open Medicinal Chemistry, 2019 – 1, 2020 – 1.
5. International Journal of Biomacromolecules, 2019 – 1.
6. Molecular Pharmaceutics, 2019 – 1, 2020 – 1.
7. Colloid and Polymer Science, 2019 – 1, 2020 – 1.
8. Colloids and Interface Science Communications, 2019 – 1.
9. Current Analytical Chemistry 2018 – 1, 2019 – 1.
10. Polymers, 2020 – 2.
11. Antioxidants, 2020 – 1.
12. Materials, 2020 – 1.

14. Informacja o uczestnictwie w programach europejskich lub innych programach międzynarodowych.

1. Member of COST Action CM1101 “Colloidal Aspects of Nanoscience for Innovative

Processes and Materials.”

15. Informacja o udziale w zespołach badawczych, realizujących projekty inne niż określone w pkt. II.9.

Brak.

16. Informacja o uczestnictwie w zespołach oceniających wnioski o finansowanie badań, wnioski o przyznanie nagród naukowych, wnioski w innych konkursach mających charakter naukowy lub dydaktyczny.

Od 2019 roku pełnię funkcję eksperta w Komisji Europejskiej (ang. *Research Executive Agency*) i jestem zaangażowana w ocenę indywidualnych wniosków Marii-Skłodowskiej-Curie.

Pełniłam rolę eksperta i brałam udział w ocenie wniosków ogłoszonych przez Narodowe Centrum Nauki.

III. INFORMACJA O WSPÓŁPRACY Z OTOCZENIEM SPOŁECZNYM I GOSPODARCZYM

1. Wykaz dorobku technologicznego.

Brak.

2. Informacja o współpracy z sektorem gospodarczym.

W latach 2010-2015 współpracowałam z dwiema polskimi firmami IBSS BIOMED S.A., Polska, będącej producentem szczepionek i probiotyków oraz P.W. BIOMEX, Polska, będącej producentem szybkich testów lateksowych dla mikrobiologicznej diagnostyki laboratoryjnej. Współpraca opierała się na wykonywaniu syntez określonych sferycznych nośników polimerowych wykorzystywanych później do produkcji testów diagnostycznych. Pismo potwierdzające w/w współpracę z firmą Biomex zostało dołączone jako dodatkowy załącznik.

3. Uzyskane prawa własności przemysłowej, w tym uzyskane patenty, krajowe lub międzynarodowe.

Brak.

4. Informacja o wdrożonych technologiach.

Brak.

5. Informacja o wykonanych ekspertyzach lub innych opracowaniach wykonanych na zamówienie instytucji publicznych lub przedsiębiorców.

Brak.

6. Informacja o udziale w zespołach eksperckich lub konkursowych.

Brak.

7. Informacja o projektach artystycznych realizowanych ze środowiskami pozaartystycznymi.

Brak.

IV. INFORMACJE NAUKOMETRYCZNE

1. Informacja o punktacji Impact Factor (w dziedzinach i dyscyplinach, w których parametr ten jest powszechnie używany jako wskaźnik naukometryczny).

Sumaryczny *impact factor* według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania:

94,786

2. Informacja o liczbie cytowań publikacji wnioskodawcy, z oddzielnym uwzględnieniem autocytowań (stan z 15.10.2020).

Web of Science (WoS): 358 (bez autocytowań 315)

Scopus: 359, (bez autocytowań 314)

3. Informacja o posiadanym indeksie Hirscha (stan z 15.10.2020).

Indeks Hirscha wg Web of Science (WoS): 12

Indeks Hirscha wg Scopus: 12

4. Informacja o liczbie punktów MNiSW.

Całkowita liczba punktów MNiSW: 709

.....*Anna Bratek-Skicki*.....
(podpis wnioskodawcy)