

Wewnątrzkomórkowe pH ( $pH_i$ ) jest ważnym wskaźnikiem kondycji komórek, ponieważ prawie wszystkie substancje przechodzące przez błonę komórkową wpływają na tę wartość. Dlatego monitorując zmiany  $pH_i$  możemy określić ewentualne problemy w równowadze komórkowej. W komórkach nowotworowych  $pH_i$  jest wyższe w porównaniu do normalnych komórek ( $\sim 7,3-7,6$  w porównaniu do  $\sim 7,2$ ), podczas gdy zewnątrzkomórkowe pH (extracellular pH,  $pH_e$ ) jest niższe ( $\sim 6,8-7,0$  w porównaniu do  $\sim 7,4$ ). Zmiany  $pH_i$  mogą być ponadto różne w różnych organellach, a także wewnątrz jednego organellum w różnych obszarach komórki. Dlatego pomiary  $pH_i$  oddzielnie w każdym organellum komórkowym mogą dostarczyć więcej informacji na temat dobrostanu komórkowego w porównaniu do średniego  $pH_i$  całej komórki.

Istnieje tylko kilka technik, które można zastosować do oznaczania  $pH_i$ : mikroelektrody, jądrowy rezonans magnetyczny i fluorescencja. Do tej pory spektroskopia fluorescencyjna była najbardziej czułą i najczęściej stosowaną techniką pomiaru  $pH_i$ . Jednak sygnał z sondy fluorescencyjnej jest stosunkowo szeroki, więc podczas pomiarów sygnały z różnych sond jednocześnie mogą się nakładać, co prowadzi do wysokiego błędów pomiarowego i niewiarygodnych oszacowań pH. Dodatkowo zmiany  $pH_i$  w wyniku inkubacji komórek z czujnikami fluorescencyjnymi ograniczają stosowanie mikroskopii fluorescencyjnej.

Powierzchniowo wzmocniona spektroskopia Ramana (SERS) może być dobrą alternatywą do pomiarów  $pH_i$  ze względu na stabilność sond, możliwość pomiaru kilku sond jednocześnie ze względu na charakterystyczny sygnał dla każdej z nich oraz bardzo niską granicę wykrywalności.

Celem projektu jest optymalizacja procedury pomiaru  $pH_i$  w kilku organellach komórkowych (w cytoplazmie, lizosomach, mitochondriach oraz jądrze komórkowym) w komórkach z wykorzystaniem powierzchniowej spektroskopii ramanowskiej (SERS).

Nanocząstki złota zostaną zmodyfikowane molekułami, których sygnał SERS jest zależny od pH (np. kwas 4-merkaptobenzoowy) oraz sfunkcjonalizowane za pomocą peptydów ukierunkowanych na organelle. Nanocząstki zostaną wprowadzone do komórek, następnie zostanie przeprowadzone mapowanie ramanowskie i wskazane zostanie  $pH_i$  w lizosomach, mitochondriach, jądrze i cytoplazmie poprzez obliczenie stosunku wybranych pasm pojawiających się w widmach SERS. Fluorescencja będzie stosowana jako metoda referencyjna, ponieważ metodologia pomiaru pH w organellach komórkowych jest zoptymalizowana, a wskaźniki są dostępne komercyjnie. Mikroskopia elektronowa (TEM) zostanie wykorzystana do potwierdzenia lokalizacji nanocząstek w komórkach. Elektroniczna spektroskopia absorpcyjna (UV-Vis) zostanie użyta do przeprowadzenia testów żywotności komórek i kontrolowania syntezy nanocząstek. TEM, UV-Vis i DLS (dynamiczne rozpraszanie światła) zostaną wykorzystane do kontroli jakości nanocząstek. Metodologia zostanie ustalona na zdrowych i nowotworowych keratynocytach, które stanowią 95% komórek naskórka, pełniąc funkcję strukturalną i barierową naskórka. Następnie metodologia zostanie przetestowana na dobrze znanych modelach (różne zdrowe i rakowe linie komórkowe).

Zgodnie z naszą wiedzą, po raz pierwszy spektroskopia SERS zostanie zoptymalizowana pod kątem wykrywania  $pH_i$  w 4 różnych organellach komórkowych i przetestowana na różnych komórkach. Ponadto sondy SERS są bardziej stabilne w porównaniu do sondami fluorescencyjnymi, więc niezawodność sygnału będzie lepsza, a informacje o stanie komórki będą dostarczane na dużą skalę.

Wyniki projektu mogą dać lepszy wgląd w kondycję i zmiany w organellach komórkowych, poprawić stan wiedzy na temat nowotworów, a także zainspirować naukowców do opracowania wysoce skutecznych strategii leczenia raka związanych z działaniem leków na konkretne organelle.

