

mgr Edyta Matysiak-Brynda
Wydział Chemii
Uniwersytet Warszawski
Pracownia Teorii i Zastosowań Elektrod

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

**„ELEKTROGRAWIMETRYCZNA DETEKcja WYBRANYCH METALOPROTEIN
W ROZTWORACH I PŁYNACH USTROJOWYCH”**

**(„ELECTROGRAVIMMETRIC DETECTION OF SELECTED METALOPROTEINS IN SOLUTIONS
AND BODY LIQUIDS”)**

Promotor: dr hab. Anna M. Nowicka

Białka, często nazywane prawdziwymi „cząsteczkami życia”, są podstawowym elementem budulcowym każdej komórki ludzkiego ciała. Większość białek występujących w organizmie ludzkim to białka wewnątrzkomórkowe, których poziom ekspresji jest zróżnicowany i zależy od typu komórek lub tkanek, w których one powstają. Zsyntezowane w odpowiednich komórkach białka wydzielane są do osocza oraz płynu śródmiąższowego, gdzie zaczynają pełnić swoje funkcje. Osocze zawiera zdecydowanie więcej białek niż płyn śródmiąższowy. Dodatkowo, białka osocza, jako jedyne z jego składników, nie przedostają się do płynu śródmiąższowego. Poziom białek w płynach ustrojowych może ulegać zmianie wraz z wiekiem, a także w różnych stanach fizjologicznych i patologicznych. Zatem są one doskonałym wskaźnikiem stanu zdrowia organizmu. Wykorzystanie elektrochemii do oznaczania zawartości białek we krwi wydaje się być konkurencyjne w stosunku do metod stosowanych w analizie klinicznej, ze względu na brak konieczności stosowania toksycznych substancji, łatwość przygotowania próbek do pomiarów, jak również relatywnie krótki czas wykonywania analizy.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zaproponowanie rozwiązań analitycznych do bezpośredniej voltamperometrycznej detekcji wybranych metaloprotein: hemoglobiny (Hb), ceruloplazminy (Cp), transferyny (Tf) i ferrytyny (Ft) we krwi. Kluczowym etapem badań była odpowiednia funkcjonalizacja powierzchni elektrody pozwalająca na wzmocnienie sygnału prądowego procesu redoks wybranych metaloprotein, z jednoczesnym zachowaniem ich właściwości elektrokatalitycznych. W tym celu wykorzystano zewnętrzne źródło pola magnetycznego i ferromagnetyczny modyfikator powierzchni elektrody (nanokapsuły węglowe zawierające żelazo: Fe@C Nps). Dzięki czemu możliwa była kontrola orientacji docierającej lub unieruchamianej na powierzchni przewodnika metaloproteiny.

Ważnym etapem konstrukcji czujników do detekcji wybranych metaloprotein było opracowanie procedury tworzenia jednorodnej i stabilnej warstwy nanocząstek magnetycznych na powierzchni elektrody. Przeprowadzone badania pokazały, że utworzeniu warstwy o takich parametrach sprzyja zastosowanie homogenizatora ultradźwiękowego podczas przygotowywania zawiesiny nanocząstek. Skuteczność współdziałania nanocząstek Fe@C i zewnętrznego źródła pola magnetycznego w pierwszej kolejności sprawdzono wobec hemoglobiny, białka o największej zawartości we krwi. Nanocząstki magnetyczne obecne na powierzchni elektrody pełniły rolę nanomagnesów, które z jednej strony wzmacniały transport paramagnetycznej Hb do powierzchni elektrody, z drugiej zaś zapewniały korzystną dla bezpośredniej wymiany elektronów jej orientację. Dzięki czemu możliwa była rejestracja dobrze wykształconych sygnałów elektroredukcji Hb. Dużą zaletą zaproponowanej metody oznaczania hemoglobiny we krwi był brak konieczności specjalnego przygotowania próbek. Hemoglobina obecna jest w czerwonych krwinkach, dlatego też przed procesem jej oznaczania przeprowadzono hemolizę krwi poprzez odpowiednie jej rozcieńczenie.

Skonstruowany czujnik pozwolił na oznaczenie hemoglobiny w próbce krwi ludzkiej oraz szczurzej z dużą dokładnością, dobrą powtarzalnością oraz niską granicą wykrywalności, rzędu pM.

Jednym ze sposobów ograniczenia kosztów analizy ilościowej białek jest oznaczanie kilku białek podczas jednego pomiaru. Jednoczesna elektrochemiczna detekcja kilku białek obecnych we krwi jest trudna do przeprowadzenia, gdyż produkty zachodzących procesów elektrodowych mogą adsorbować się na powierzchni elektrody, uniemożliwiając dalszą detekcję. W niniejszej rozprawie doktorskiej wykazano, że jednoczesne oznaczanie białek jest możliwe przy użyciu tego samego czujnika, wówczas gdy sygnały prądowe badanych białek pojawiają się w innym zakresie na skali potencjałowej. Przeprowadzone badania udowodniły, że możliwa jest bezpośrednia elektrochemiczna detekcja ceruloplazminy i hemoglobiny w trakcie pojedynczego pomiaru, bez konieczności specjalnego przygotowania analizowanej próbki krwi. Nanocząstki ferromagnetyka na powierzchni elektrody pełniły rolę specyficznego i selektywnego filtru, który przyspieszał oraz wzmacniał transport tylko paramagnetycznych cząsteczek do powierzchni elektrody. Dodatkowo, bezpośredni kontakt metaloproteiny z powierzchnią zastosowanego ferromagnetyka nie prowadził do jej deaktywacji. Ceruloplazmina jest niezwykle ważnym białkiem w osoczu krwi, transportującym miedź, ale również katalizującym utlenianie żelaza Fe(II) do Fe(III), co umożliwia wiązanie tego pierwiastka z transferyną i transport w osoczu krwi. Właściwości katalityczne Cp są związane z jej unikalnym centrum aktywnym, zwanym grupą prostetyczną, która złożona jest z 3 typów centrów miedziowych. Właściwe unieruchomienie cząsteczek ceruloplazminy na powierzchni elektrody ma niezwykle istotny wpływ na jej aktywność katalityczną. Przeprowadzone badania z wykorzystaniem skaningowego mikroskopu elektrochemicznego udowodniły, że zarówno obecność ferromagnetycznego modyfikatora elektrody, czyli nanokapsuł węglowych zawierających żelazo, jak również zewnętrznego źródła pola magnetycznego gwarantowały maksymalną aktywność katalityczną ceruloplazminy względem jonów Fe(II). Dodatkowo, wyniki uzyskane za pomocą metody LA-ICP-MS pokazały, że adsorpcja ceruloplazminy zachodziła przede wszystkim na ferromagnetycznym modyfikatorze powierzchni elektrody.

Kolejną ważną paramagnetyczną metaloproteiną obecną we krwi jest transferyna. Z uwagi na fakt, że białko to zawiera w swojej strukturze, podobnie jak Hb i Ft, jony żelaza oznaczanie tej metaloproteiny przy użyciu elektrody zmodyfikowanej wyłącznie nanocząstkami magnetycznymi było niemożliwe. O ile hemoglobinę można łatwo usunąć z oznaczanego roztworu poprzez odwirowanie elementów morfotycznych krwi, o tyle ferrytyna wciąż pozostaje w roztworze i jest głównym białkiem przeszkadzającym w analizie transferyny w osoczu krwi. Zatem w celu dokonania oznaczenia transferyny niezbędne jest zmodyfikowanie powierzchni elektrody przeciwciałem, które selektywnie wiąże oznaczane białko (antygen). Głównym elementem budującym warstwę receptorową immunosensora było przeciwciało monoklonalne typu IgG. Wykonane badania udowodniły, że skonstruowany immunosensor można zastosować do wykrywania dyskretnych zmian ilości tego białka we krwi, co jest niezwykle istotne w diagnostyce wielu schorzeń. Dużą zaletą zaproponowanego immunosensora jest prostota jego wykonania, duża selektywność, jak również możliwość kilkukrotnego jego wykorzystania, co znacznie obniża koszty przeprowadzenia analizy.

Transferyna, zaliczana jest do białek „miękkich” według klasyfikacji Norde, zatem jest ona podatna na zmiany konformacyjne w wyniku kontaktu z wybraną powierzchnią. W organizmie ulega ona cyklicznym zmianom konformacyjnym podczas procesu wiązania i uwalniania jonów Fe(III), umożliwiając tym samym rozpoznanie tego białka przez receptory zlokalizowane na powierzchni błon plazmatycznych komórek. Dodatkowo, ilość receptorów Tf na powierzchni komórek nowotworowych jest zdecydowanie większa w porównaniu do komórek zdrowych. Z tego względu transferyna może pełnić funkcję wspomagającą w celowanej terapii przeciwnowotworowej. Wykonane badania pokazały, że zastosowanie nanocząstek magnetycznych (potencjalne nośniki leków przeciwnowotworowych)

zawierających na powierzchni grupy karboksylowe (Fe@C-COOH Nps) w obecności pola magnetycznego prowadzi do kowalencyjnego unieruchomienia Tf w jego elektroaktywnej formie. Wprowadzenie zewnętrznego źródła pola magnetycznego podczas procesu unieruchamiania Tf na powierzchni Fe@C-COOH Nps wpływało na strukturę tworzonej warstwy transferyny. Paramagnetyczne centra Tf (jony Fe(III)) były wciągane przez pole magnetyczne i w konsekwencji zmieniały swoje położenie, natomiast diamagnetyczne składniki otoczki białkowej Tf (głównie wodorowęglany) były wypychane przez pole na zewnątrz. W związku z tym, w wyniku oddziaływań elektrostatycznych, tworzyła się kolejna warstwa Tf na powierzchni nanocząstek, co potwierdziły badania z wykorzystaniem mikrowagi kwarcowej z dyssypacją energii. Jest to bardzo rzadkie zjawisko w przypadku białek w warunkach stałego pH. Ponadto pomiary z użyciem techniki UV-vis i CD udowodniły, że zmiany konformacyjne cząsteczki transferyny zachodzące pod wpływem pola magnetycznego nie uszkadzały jej struktury. Transferyna związana z powierzchnią nanocząstki magnetycznej wciąż wykazywała wysoką aktywność elektrochemiczną.

Ostatnią metaloproteiną poddaną analizie elektrochemicznej była ferrytyna obecna, podobnie jak Cp i Tf, w osoczu krwi. Białko to, podobnie jak hemoglobina i transferyna, zawiera jony żelaza, co uniemożliwia jego elektrochemiczne oznaczanie we krwi w obecności tych białek. W celu zapewnienia wysokiej skuteczności działania zaproponowanego czujnika jego warstwę receptorową wzbogacono o cząsteczki przeciwciała selektywnie oddziałującego tylko z Ft. Konstrukcja immunosensora opierała się na wykorzystaniu warstwy nanocząstek magnetycznych pokrytych filmem karboksyfenylowym lub aminoetylofenylowym otrzymanym w wyniku elektroredukcji odpowiedniej soli diazoniowej. Modyfikacja powierzchni elektrody filmem fenylowym pozwoliła na kontrolę ułożenia unieruchamianych cząsteczek przeciwciała, a w konsekwencji na efektywność ich oddziaływania z ferrytyną (antygenem). Zastosowanie nanocząstek magnetycznych i zewnętrznego źródła pola magnetycznego podczas reakcji antygen–przeciwciało pozwoliło na osiągnięcie właściwej dla wymiany elektronu orientacji ferrytyny, umożliwiającej jej bezpośrednią woltamperometryczną detekcję. Przeprowadzone badania pokazały, że film karboksyfenylowy jest zdecydowanie korzystniejszy w elektrochemicznej detekcji Ft w porównaniu do warstwy aminoetylofenylowej, z uwagi na jakość uzyskiwanych sygnałów prądowych. Zaproponowany immunosensor pozwala na selektywne oznaczanie ferrytyny w próbce krwi. Wyniki uzyskane podczas tego etapu badań będą stanowiły podstawę publikacji naukowej.

Wyniki przedstawione w pracy doktorskiej i uzyskane w trakcie studiów doktoranckich opublikowane zostały w pięciu pracach naukowych w czasopismach o charakterze międzynarodowym (*Acta Biomaterialia* 1x, *Biosensors and Bioelectronics* 1x, *Langmuir* 1x, *Sensors and Actuators B: Chemical* 2x) oraz dwóch monografiach („*Postępy Elektroanalizy*” – rozdział 21 oraz „*Nowe Strategie w Analizie Elektrochemicznej*” – rozdział 1). Kolejna publikacja opisująca wyniki będące częścią niniejszej pracy badawczej znajduje się w ostatniej fazie przygotowań.