

mgr inż. Joanna Zajda

Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny

Zakład Mikrobioanalitki

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

“Elektrochemiczne i optyczne układy do oznaczania analitów istotnych klinicznie”

promotorzy: prof. dr hab. inż. Elżbieta Malinowska, prof. dr hab. Agata Michalska-Maksymiuk

W pracy zatytułowanej “Elektrochemiczne i optyczne układy do oznaczania analitów istotnych klinicznie” (“Electrochemical and optical sensing systems for clinically relevant analytes”) przedstawiono wyniki badań dotyczących opracowania nowych lub ulepszenia istniejących metod do oznaczania wybranych analitów.

W pierwszej części pracy opisano podstawy elektrochemicznych i optycznych metod detekcji wykorzystywanych w badaniach. W podrozdziale dotyczącym potencjometrii głównie skupiono się na membranowych elektrodach jonoselektywnych pracujących zarówno w trybie równowagowym, jak i nierównowagowym. W dalszej części rozdziału przedstawiono charakterystykę badanych analitów i metody ich oznaczania. Na zakończenie opisano zasady analizy przepływowo-wstrzykowej, będącej jedną z najefektywniej stosowanych metod mechanizacji poszczególnych etapów postępowania analitycznego.

W drugim rozdziale rozprawy doktorskiej zaprezentowano nową metodę oznaczania szybkości uwalniania tlenku azotu(II) z materiałów polimerowych domieszkowanych donorami NO, a także NO powstającego w wyniku elektrochemicznej redukcji anionów azotynowych. NO oznaczany był pośrednio na podstawie stężenia jonów azotanowych powstających w wyniku szybkiej i wydajnej reakcji NO z oksyhemoglobina. Jony azotanowe oznaczane były przy pomocy elektrod jonoselektywnych z polimerową membraną zawierającą TDMAC jako składnik elektroaktywny. Skład membrany polimerowej został zoptymalizowany w celu eliminacji odpowiedzi elektrod na oksyhemoglobina znajdującą się w oznaczanych próbkach. W opracowanym układzie po raz pierwszy do oznaczania NO zastosowana została detekcja potencjometryczna. Ponadto zaproponowano przepływowy

układ do zbierania próbek usuwający nietłone związki anionowe, które przeszkadzały w oznaczeniach potencjometrycznych. Uzyskane wyniki szybkości uwalniania NO zostały skorelowane z wynikami uzyskanymi w oparciu o referencyjną metodę chemiluminescencyjną i potwierdziły, że opracowana metoda z powodzeniem może być zastosowana do tego typu oznaczeń.

W kolejnym rozdziale po raz pierwszy zademonstrowano możliwość zastosowania czulej i selektywnej na poliony pulstrody jako detektora w układzie przepływowo-wstrzykowym. Pokazano, że zarówno polianiony, jak i polikationy mogą być oznaczane stosując membranę polimerową o tym samym składzie, zawierającą lipofilową sól jonowymienną ($\text{DNNS}^-\text{TDMA}^+$). Ponadto, omówiona została stabilność pulstrody w warunkach przepływowych. W dalszej części rozdziału zoptymalizowano całkowity czas trwania sekwencji impulsów, co umożliwiło oznaczenie aż do 20 próbek na godzinę. Otrzymana częstotliwość oznaczania jest dużym krokiem na przód w analizach z wykorzystaniem pulstrody jako detektora. Mnogość potencjalnych zastosowań opracowanego układu przepływowo-wstrzykowego z pulstrodą w roli detektora została zademonstrowana poprzez oznaczenie polianionów o różnej gęstości ładunku, a także oznaczenie heparyny w próbkach o wysokim stężeniu jonów chlorkowych przez miareczkowanie protaminy. Pokazano, iż w prosty i szybki sposób heparynę można oznaczyć w zakresie stężeń od 10–35 mg/L (2–6 U/mL). Przeprowadzona została także krótka dyskusja dotycząca kationowej odpowiedzi pulstrody (pracującej w trybie wykrywania polikationów) na serum. Dodatkowo, w zaproponowanym układzie monitorowano kinetykę reakcji enzymatycznej stosując protaminę i trypsynę jako modelowy układ. Aktywność enzymu oznaczono również w zmodyfikowanym układzie przepływowym w zakresie od 0,5 U/mL do 15,0 U/mL. Substrat enzymatyczny znajdował się w strumieniu do którego wstrzykiwano roztwór o różnej aktywności enzymu, a czas reakcji enzymatycznej kontrolowany był za pomocą szybkości przepływu roztworu nośnego i długości przewodów.

W czwartym rozdziale niniejszej pracy opisano nowy, elektrochemiczny biosensor do oznaczania aktywności enzymów restrykcyjnych. Dwuniciowe DNA unieruchomione na powierzchni elektrody złotej wykorzystano jako substrat reakcji enzymatycznej. Spadek ilości DNA na powierzchni elektrody, będący wynikiem cięcia enzymatycznego, monitorowano stosując błękit metylenowy jako znacznik redoks. Aktywność enzymu oznaczana była na podstawie zmiany sygnału prądowego pochodzącego od redukcji błękitu metylenowego, oddziaływującego z nicią DNA, obecnego w roztworze. Zastosowanie znacznika redoks w

roztworze, a nie jego dowiązanie do nici DNA, w znaczący sposób obniża koszty analizy. Jako modelowy system zastosowano enzym restrykcyjny *PvuII* oraz oligonukleotydy o długości 20 par zasad, zawierające sekwencję rozpoznawaną przez wybrany enzym. Tiolowane oligonukleotydy unieruchomiono na powierzchni złotej elektrody techniką chemisorpcji monowarstw samoorganizujących się, a następnie, w celu uzyskania substratu, hybrydowano z komplementarnym krótkoniciowym DNA. Przeprowadzono badania mające na celu określenie gęstości powierzchniowej ssDNA oraz wydajności hybrydyzacji. Uzyskane wyniki były zgodne z danymi literaturowymi. W dalszym etapie pracy zbadano i omówiono wpływ składników roztworu buforowego na stabilność i integralność dsDNA-SAM, ze szczególnym uwzględnieniem roli niejonowego środka powierzchniowo czynnego Triton X-100. Sprawdzono i przedyskutowano także wpływ położenia miejsca restrykcyjnego na przebieg reakcji enzymatycznej i czułość oznaczenia. Pokazano, iż ze względu na ograniczenia steryczne, miejsce restrykcyjne położone bliżej powierzchni elektrody jest mniej dostępne dla enzymu. Ponadto, opracowany biosensor z powodzeniem został wykorzystany do oznaczenia próbek o różnej aktywności *PvuII*.

Pracę zamyka rozdział, w którym przedstawiono opracowanie dedykowanego materiału w formie mikrosfer z przeznaczeniem do fluorescencyjnego oznaczania aktywności enzymów. Substraty ulegające reakcji enzymatycznej z wytworzeniem fluorescencyjnego produktu są bardzo wrażliwe na zmianę warunków (głównie pH środowiska), co ogranicza ich stosowanie, ponieważ może prowadzić do poważnych błędów w oznaczaniu aktywności enzymu i wzrostu kosztu analizy. W pracy pokazano, że zamknięcie tego substratu w mikrosferze polimerowej zapobiega jego niepożądanym, spontanicznym hydrolizom. Co najważniejsze, substrat zamknięty w polimerowej mikrosferze nadal jest dostępny dla enzymu. Jako modelowy system badano spontaniczną i enzymatyczną hydrolizę oleinianu 4-metylumbelliferylu zamkniętego w mikrosferach z poli(n-butylo akrylanu). Stwierdzono, że czułość oznaczenia można w prosty sposób regulować poprzez ilość 4-MUO zamkniętego w polimerowych mikrosferach, a także przez dodatek Ca^{2+} i BSA do roztworów badanych próbek. Dodatkowo, podjęta została próba wyjaśnienia pozytywnego wpływu BSA na reakcję enzymatyczną z wykorzystaniem substratu zamkniętego w polimerowych mikrosferach. Na podstawie otrzymanych wyników można postulować, że ze względu na liofilowość mikrosfer, cząsteczki BSA ulegają adsorpcji na powierzchni mikrosfer, tworząc bardziej korzystne dla lipazy mikrośrodowisko, co w rezultacie prowadzi do poprawy czułości oznaczenia.

Warszawa, 09.06.2015v

Joanna Łajda