



**Uniwersytet Jagielloński**  
**Wydział Chemii**

**Powierzchniowo wzmocniona spektroskopia ramanowska  
w diagnostyce śródbłónka: od adsorpcji soli pirydyniowych  
do badania właściwości wewnątrzkomórkowych**

**Surface enhanced Raman spectroscopy in diagnostics  
of endothelium: from adsorption of pyridinium salts  
to physicochemical studies on cells**

Autor: Aleksandra Jaworska

Promotor: Prof. dr hab. Małgorzata Barańska

Promotor pomocniczy: dr Kamilla Małek

*Praca doktorska wykonana w Zespole Obrazowania Ramanowskiego Zakładu Chemii Fizycznej  
Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego*

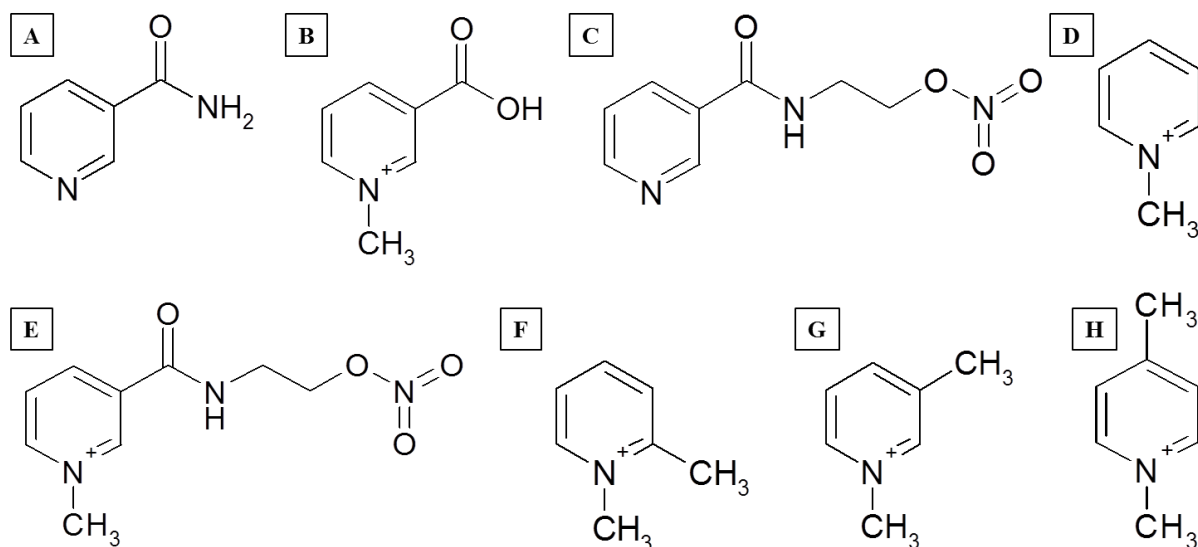
Kraków, 2015

W ciągu ostatnich dziesięcioleci, rosące zapotrzebowanie na nieinwazyjne narzędzia diagnostyczne i analizy struktur molekularnych w celu identyfikacji i badania tkanek oraz komórek doprowadziło do wielkiego postępu w rozwoju spektroskopowych metod ramanowskich. Jedną z nich, zwaną powierzchniowo wzmocnioną spektroskopią ramanowską (z ang. SERS), pozwala na pomiary bardzo rozcieńczonych próbek. Jest to możliwe z powodu efektu wzmocnienia sygnału ramanowskiego, kiedy badana molekula znajduje się w bliskiej odległości od powierzchni metalicznej. Ze względu na wysoką specyficzność i czułość metody, technika SERS znalazła zastosowanie w wielu dziedzinach badań, na przykład w badaniach adsorpcji molekuł na powierzchniach i ich orientacji, w badaniach mechanizmów reakcji, detekcji pojedynczych cząsteczek, jako biosensory (czujniki pH, glukozy etc.) czy w analizach biomedycznych (znakowane sondy do lokalizacji receptorów).

Celem pracy doktorskiej było zastosowanie techniki SERS w badaniach cząsteczek biologicznych, stosując dwa podejścia eksperymentalne. Pierwszym były podstawowe badania orientacji molekuł na powierzchni metalicznej w celu określenia oddziaływań cząsteczki z powierzchnią [1-3]. Jest to najprostszy i najbardziej popularny sposób wykorzystywania tej techniki badawczej. W drugiej części pracy zastosowano SERS, wraz z fluorescencją oraz testami komórkowymi, do badań środowiska wewnątrzkomórkowego, co jest w dniu dzisiejszym rozwojowym kierunkiem w zastosowaniach tej techniki [4-7].

Badanie adsorpcji molekuly na powierzchni metalicznej może być pierwszym etapem badań takich właściwości cząsteczki jak np. oddziaływanie z receptorami [8]. To podejście wymaga weryfikacji innymi metodami, ponieważ powierzchnia metaliczna posiada właściwości fizykochemiczne inne niż np. białka w organizmie i molekula może się w tych warunkach inaczej zachowywać. Jednak SERS jest dobrą metodą badań miejsc aktywnych w cząsteczce, które preferencyjnie oddziałują z innymi cząsteczkami. Dodatkowo, na podstawie widm SERS i UV-Vis można określić typ adsorpcji (fizyczna, chemiczna) oraz oszacować ilość zaadsorbowanych cząsteczek. Wadą tego podejścia jest to, że w przypadku wysokich stężeń analitu następuje wysycenie miejsc aktywnych na powierzchni i cząsteczki mogą ulegać desorpcji. W pierwszej części pracy zbadano adsorpcję ośmiu modelowych związków (nikotynamid, trygonelina, nikorandyl, metylonikorandyl, chlorek 1-metylopirydyny, 1-MP, chlorek 1,2-dimetylopirydyny, 1,2-DMP, chlorek 1,3-dimetylopirydyny, 1,3-DMP, chlorek 1,4-dimetylopirydyny, 1,4-DMP; Fig.1). Wybrano nikotynamid ze względu na jego protekcyjne działanie na śródbłonek, mające istotny wpływ na wygaszanie zapalenia w ścianie naczynia w przebiegu miażdżycy [9]. Do tej pory, ze względu na funkcję przeciwzapalną, głównie był stosowany w leczeniu chorób skóry oraz niedoboru witamin,

jednak ze względu na potencjalne działanie rozkurczowe podejmowane są próby jego zastosowania w leczeniu cukrzycy. Po analizie właściwości nikotynamidu uwagę skierowano na związki o podobnej strukturze mające również przeciwzapalne, cytoprotekcyjne oraz potencjalnie śródbłonkowe działanie, a równocześnie wyższą aktywność biologiczną.

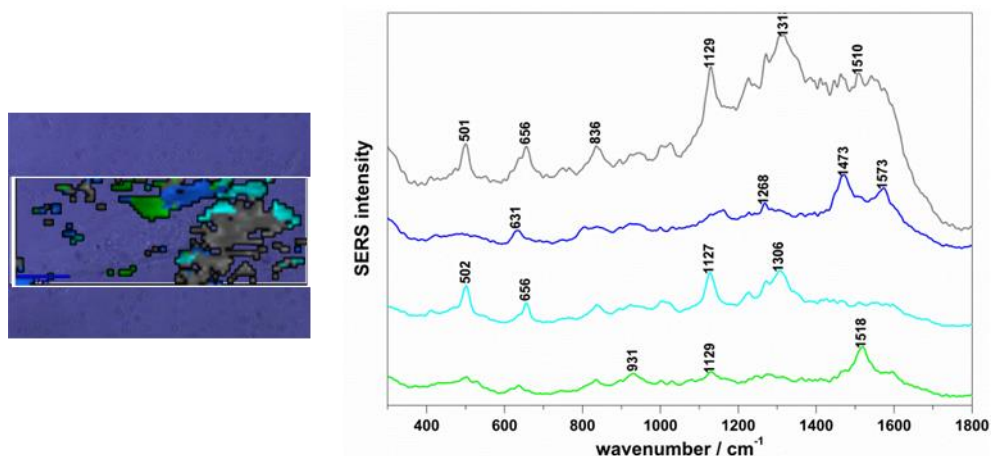


Rys.1. Struktury związków modelowych z pierwszej części pracy: A – nikotynamid, B – trygonelina, C – nikorandyl, D – chlorek 1-metylopirydyny, E – 1-metylnikorandyl, F – chlorek 1,2-dimetylopirydyny, G – chlorek 1,3-dimetylopirydyny, H – chlorek 1,4-dimetylopirydyny.

Badania nad sposobem adsorpcji były prowadzone analogicznie dla wszystkich wybranych związków. Najpierw na podstawie widm UV-Vis mieszaniny koloidu oraz roztworu badanego związku określono rodzaj adsorpcji – w przypadku wszystkich związków była to adsorpcja fizyczna. Następnie wykonano obliczenia DFT widma ramanowskiego danej molekuly w stanie gazowym. Zarejestrowano widma ramanowskie ciał stałych oraz roztworów wodnych i przypisano pasma na podstawie obliczeń DFT. Na końcu zarejestrowano widma SERS, porównano względną intensywność pasm w widmach ramanowskich i SERS oraz przypisano pasma. Oddziaływanie cząsteczki z powierzchnią metalu i jej orientacja względem linii sił pola elektromagnetycznego mogą prowadzić, między innymi poprzez zaburzenie jej symetrii, do zmiany względnych intensywności pasm [10]. Pasma odpowiadające drganiom normalnym, których kierunki są zgodne z kierunkiem linii sił pola elektromagnetycznego (najczęściej prostopadle do powierzchni metalu) mogą ulegać większym wzmocnieniom niż pasma drgań o kierunkach do nich ortogonalnych. Na tej podstawie określono sposób adsorpcji molekuł na powierzchniach metalu. W przypadku nikotynamidu, trygoneliny oraz nikorandylu okazało się, że zmiana pH ma wpływ na sposób

adsorpcji cząsteczki [1,2]. Na przykład trygonelina oddziałuje z powierzchnią głównie poprzez zdeprotonowaną grupę karboksylową, dlatego rejestracja widma SERS była możliwa tylko w warunkach pH powyżej 2.1 (pK cząsteczki). Do zarejestrowania widm SERS soli pirydyniowych (1-MP, 1,2-DMP, 1,3-DMP, 1,4-DMP) konieczne okazało się dodanie aktywatora do mieszaniny koloidu oraz roztworów soli ( $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{KI}$ ) [3]. Okazało się, że np. w przypadku 1-MP cząsteczka tworzy addukt z anionami azotanowymi i poprzez te jony oddziałuje z powierzchnią metaliczną.

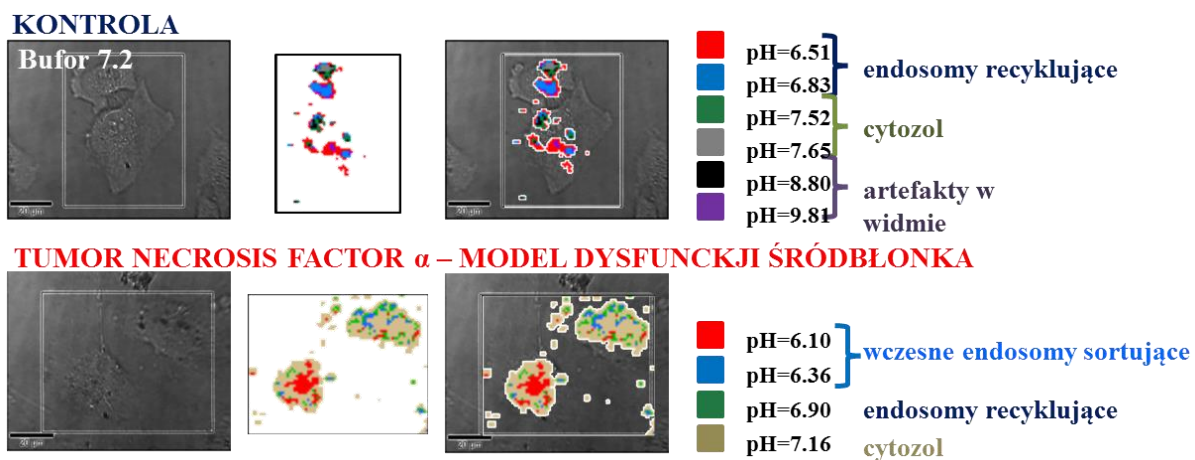
W drugiej części pracy zastosowano technikę SERS do charakterystyki środowiska wewnątrzkomórkowego śródbłonka [4-7]. Śródbłonek został wybrany jako przedmiot tej pracy ze względu na jego duże znaczenie w kontekście badań rozwoju zmian chorobowych. Komórki śródbłonka wyściełają powierzchnię naczyń krwionośnych, stanowiąc barierę między krwią oraz mięśniami gładkimi [11]. Ze względu na lokalizację, komórki te biorą udział w transporcie biomolekuł pomiędzy krwią oraz tkankami, odgrywają również ważną rolę w procesach wazomotoryki, hemostazy i angiogenezy, a także regulują procesy zapalne oraz immunologiczne. Uszkodzenie śródbłonka prowadzić może do wielu istotnych zmian patologicznych, takich jak nadciśnienie tętnicze, zmiany miażdżycowe, powstawanie zakrzepów oraz zaburzenia perfuzji tkanek i narządów czy też choroba niedokrwienności serca



Rys.2. Po lewej – mikrografia komórki śródbłonka z nałożoną na nią mapą dystrybucji wykonaną podczas analizy skupień, po prawej – przykładowe widma SERS.

lub jego niewydolność [9]. Dlatego tak ważna jest charakterystyka śródbłonka oraz zmian dysfunkcyjnych tych komórek. W tej części pracy badano właściwości fizykochemiczne zdrowych komórek śródbłonka za pomocą techniki SERS (Rys.2 – przykładowe widma SERS z komórki śródbłonka), fluorescencji oraz oznaczania aktywności mitochondriów i wyniki te porównano z danymi dla komórek w stanie zapalnym wyindukowanym za pomocą  $\text{TNF}\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ). Schemat eksperymentów w tej części pracy był podobny:

wysiewano komórki, do medium dodawano nanocząstki z przyłączonym reporterem, następnie je wyplukiwano i wykonywano pomiar SERS. Pierwsze eksperymenty wykonano na makrofagach w celu wybrania najodpowiedniejszego reportera ramanowskiego oraz dobrania stężenia nanocząstek w medium [4]. Rodamina 6G okazała się najlepszym reporterem, ponieważ posiada wysoki przekrój czynny na rozpraszanie Ramana oraz właściwości fluorescencyjne. Następnie przeprowadzono szereg badań na komórkach śródbłonna [5,6]. Komórki inkubowano z rodaminą sprzężoną ze złotem oraz samą rodaminą przez okres 1-16 godzin. Następnie wykonywano pomiar SERS żywych komórek oraz pomiary fluorescencyjne (w przypadku fluorescencyjnej analizy ilościowej przedmiotem badań były żywe komórki, natomiast trójwymiarowe pomiary fluorescencyjne wymagają uprzedniego utrwalenia komórek). Okazało się, że rodamina częściowo odczepia się od nanocząstek, co umożliwia zarejestrowanie widm od biomolekuł obecnych w komórkach (białka, lipidy, DNA etc.). Dodatkowo zbadano cytotoksyczność nanocząstek złota i okazało się, że wbrew powszechnej opinii złoto również ma właściwości toksyczne. W następnym eksperymencie użyto kwasu 4-merkaptobenzoesowego (MBA) jako reportera ramanowskiego do badania zmian pH [7]. Widmo SERS MBA wykazuje różnice w zależności od pH, dlatego nanocząstki złota z przyłączonym kwasem mogą służyć jako sensory wewnątrzkomórkowego pH. Zmierzono pH komórek zdrowych oraz komórek inkubowanych w buforach o pH ok. 4 i 11, w celu sprawdzenia wpływu silnie kwasowego lub zasadowego środowiska na zachowanie nanosensorów. Na koniec zmierzono pH komórek, w których wywołano stan zapalny poprzez inkubację z TNF $\alpha$ . Okazało się, że błona komórek w stanie zapalnym jest bardziej przepuszczalna dla nanocząstek i w ich wnętrzu gromadzi się ich stosunkowo więcej niż w komórkach zdrowych (Rys.3).



Rys.3. Mikrofotografie oraz mapy powstałe z analizy skupień komórek śródbłonna badanych techniką SERS – warunki kontrolne oraz stymulacja komórek przy użyciu TNF $\alpha$ .

Charakterystyka stanów patologicznych komórek śródbłónka wraz ze staranną analizą struktury i właściwości potencjalnych leków przeciwzapalnych to obiecujący kierunek badań w celu zrozumienia mechanizmów funkcjonalnych śródbłónka oraz możliwych sposobów jego leczenia [12].

Bibliografia:

1. **A. Jaworska**, K. Malek, K.M. Marzec, M. Baranska, Nicotinamide and trigonelline studied with surface-enhanced FT-Raman spectroscopy, *Vibrational Spectroscopy* 63 (2013) 469-476
2. **A. Jaworska**, K. Malek, K.M. Marzec, M. Baranska, SERS of nicorandil and N-methylnicorandil: the substituent effect on adsorption and surface activity, *Spectrochimica Acta – Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 129 (2014) 624-631.
3. K.M. Marzec, **A. Jaworska**, K. Malek, A. Kaczor, M. Baranska, Substituent effect on structure and surface activity of N-methylpyridinium salts studied by FT-IR, FT-RS, SERS and DFT calculations, *Journal of Raman Spectroscopy* 44 (2013) 1, 155-165.
4. K. Malek, **A. Jaworska**, P. Krala, N. Kachamakova-Trojanowska, M. Baranska, Imaging of macrophages by Surface Enhanced Raman Spectroscopy, *Biomedical Spectroscopy and Imaging* 2 (2013) 349-357.
5. **A. Jaworska**, K. Malek, N. Kachamakova-Trojanowska, S. Chlopicki, M. Baranska, The uptake of gold nanoparticles by endothelial cells studied by surface-enhanced Raman spectroscopy, *Biomedical Spectroscopy and Imaging* 2 (2013) 183-189.
6. **A. Jaworska**, T. Wojcik, K. Malek, U. Kwolek, M. Kepczynski, A.A. Ansary, S. Chlopicki, M. Baranska, Rhodamine 6G conjugated to gold nanoparticles as labels for both SERS and fluorescence studies on live endothelial cells, *Microchimica Acta* (2014) doi: 10.1007/s00604-014-1307-5.
7. **A. Jaworska**, L.E. Jamieson, K. Malek, C.J. Campbell, J. Choo, S. Chlopicki, M. Baranska, SERS-based monitoring of the intracellular pH in endothelial cells: the influence of the extracellular environment and tumour necrosis factor- $\alpha$ , *Analyst*, DOI: 10.1039/C4AN01988A.
8. **A. Jaworska**, K. Malek, A comparison between adsorption mechanism of tricyclic antidepressants on silver nanoparticles and binding modes on receptors. Surface-enhanced Raman spectroscopy studies, *Journal of Colloid and Interface Science* 431 (2014) 117-124.
9. A.Mogielnicki, K.Kramkowski, W.Buczko, Nikotynamid i jego metabolit – N-metylonikotynamid – tylko witamina czy może nowy lek do walki z chorobami układu krążenia i hemostazy?, *Kardiologia Polska*, 66 (2008) 10 (supl. 3), 341-346.
10. M. Moskovits, J.S. Suh, Surface selection rules for surface-enhanced Raman spectroscopy: calculations and application to the surface-enhanced Raman spectrum of phthalazine on silver, *The Journal of Physical Chemistry* 88 (1984) 5526–5530.
11. K. Wnuczko, M. Szczepański, Śródbłonek – charakterystyka i funkcje, *Polski Mercuriusz Lekarski* XXIII (2007) 133, 60-65.
12. M. Baranska, A. Kaczor, K. Malek, **A. Jaworska**, K. Majzner, E. Staniszewska-Slezak, M. Pacia, G. Zajac, J. Dybas, E. Wiercigroch, Raman microscopy as a novel tool to detect endothelial dysfunction, accepted in: *Pharmacological Reports*