UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Projektowanie nanoczujników SERS do detekcji markerów chorobowych

mgr Ewelina Zofia Wiercigroch

Selektywna detekcja biomarkerów w złożonych próbkach biologicznych ma zasadnicze znaczenie w wykrywaniu chorób, wdrażaniu skutecznego leczenia oraz monitorowania skuteczności wprowadzanych terapii. Rozwój narzędzi diagnostycznych, które umożliwiają ich rozpoznanie, a także ilościową ocenę z wysoką czułością i niezawodnością, przyczyniają się do lepszej i szybszej diagnostyki, co ma ogromny wpływ na rokowania pacjenta i jego szanse przeżycia. W ostatnich latach nastąpił gwałtowny rozwój sensorów służących do wykrywania markerów chorobowych, szczególnie dużym zainteresowaniem cieszą się metody oparte na reakcjach immunologicznych, które obecnie stosowane są właściwie w każdym laboratorium badawczym. Jednakże obecnie dostępne testy diagnostyczne często nadal nie są wystarczające w wykrywaniu szukanych targetów, stąd poszukiwanie nowych rozwiązań. W ostatnim czasie wiele uwagi skupia się wokół powierzchniowo wzmocnionej spektroskopii ramanowskiej (SERS). Silne wzmocnienie sygnału wynikające z wykorzystania nanostruktur metalicznych sprawia, że jest to niezwykle czuła technika, umożliwiająca wykrywanie biomarkerów nawet na niskim poziomie stężeń. W połączeniu z reakcjami immunologicznymi możliwe jest zatem skonstruowanie czujników do selektywnego wykrywania interesujących badacza składników próbki.

Głównym założeniem pracy doktorskiej było prowadzenie badań w kierunku konstrukcji czujników do detekcji stanu zapalnego w tkance oraz płynach biologicznych. Cel ten realizowany był poprzez dwie główne ścieżki badawcze. Pierwsza z nich poświęcona była rozwojowi immunosond SERS pod kątem selektywnego wykrywania markerów obecnych w tkance aorty z rozwiniętą miażdżycą. Podstawy działania tej techniki są zbliżone do klasycznie stosowanej immunofluorescencji. Przeciwciała nakierowane na szukany antygen są skoniugowane ze znacznikiem, którego detekcja możliwa jest za pomocą odpowiedniej aparatury pomiarowej. W przypadku immunoSERS lokalizacja antygenu możliwa jest za pomocą charakterystycznych pasm na widmie reportera ramanowskiego, który jest składnikiem immunosondy. Znaczniki SERS posiadają szereg zalet w stosunku do fluoroforów, dla których z kolei wyróżnić można kilka istotnych ograniczeń. W badaniach związanych z rozwojem immunoSERS przeprowadzono serie eksperymentów w celu opracowania i zoptymalizowania protokołu barwienia prowadzonych w kierunku lokalizacji jednego z ważniejszych markerów występujących w blaszce miażdżycowej – komórek mięśniówki gładkiej. Aby zrealizować to zadanie wykonano szereg barwnień wykorzystaniem różnych nanocząstek metalicznych opartych na złocie (nanosfer, nanogwiazdek oraz supernanostruktur). Jakość otrzymanych wyników zawsze porównywana była z obrazami immunofluorescencyjnymi, aby potwierdzić poprawną lokalizację szukanego markera. Badano również wpływ rodzaju nanocząstek oraz sposobu barwienia poprzez metodę bezpośrednią ze znakowanym przeciwciałem pierwotnym oraz pośrednią, gdzie znacznik połączony był z przeciwciałem wtórnym. Udowodniono, że oba podejścia prawidłowo ilustrują dystrybucję antygenu, a sygnał pochodzący od znacznika SERS położony jest dokładnie w tych samych miejscach, co dla sąsiedniego skrawka aorty barwionej przy użyciu immunofluorescencji. Co więcej potwierdzona została również wysoka fotostabilność immunosensorów SERS jak i możliwość prowadzenia ilościowej analizy określającej udział komórek mięśniówki gładkiej w blaszce miażdżycowej. Należy dodatkowo zaznaczyć, że taka analiza ilościowa wykonana została po raz pierwszy w literaturze, a jej wyniki bardzo dobrze korelują z rezultatami otrzymanymi na podstawie obrazów immunofluorescencyjnych. Ważnym aspektem badań związanych z techniką barwienia immunoSERS było opracowanie protokołu detekcji dwóch biomarkerów w tkance, jako pierwszy krok do rozwoju detekcji multipleksowej. Prace te zostały podjęte ze względy na fakt, że jednoczesna lokalizacja różnych składników w próbkach biologicznych stanowi jedno z głównych ograniczeń powszechnie stosowanej immunofluorescencji. W przeciwieństwie do znaczników fluorescencyjnych, znaczniki SESR oparte na reporterach ramanowskich posiadają wąskie i

łatwo rozróżnialne pasma. W ramach niniejszej pracy doktorskiej wykonano z powodzeniem podwójne barwienie, w którym obok komórek mięśniówki gładkiej zlokalizowano cząsteczki adhezji płytkowo-śródbłonkowej w obrębie tej samej tkanki. Wyniki skorelowane z obrazami immunofluorescencyjnymi potwierdziły prawidłową identyfikację obu badanych markerów.

W ramach drugiej ścieżki badawczej realizowano założenia konstrukcji czujnika do ilościowej oceny mediatorów zapalnych w osoczu, których poziom zmienia się na długo przed wystąpieniem objawów choroby. Jako modelowy marker wybrano interleukinę 6, która odgrywa znaczącą rolę zarówno w procesach prozapalnych jak i przeciwzapalnych. Projektowany sensor zakładał zasadę działania jak w popularnie stosowanych testach typu ELISA, w jej odmianie „kanapkowej". Podobnie jak w teście immunoenzymatycznym, projektowany sensor kanapkowy składał się z dwóch części. Pierwsza z nich obejmowała metaliczne podłoże zmodyfikowane w taki sposób, aby wychwycić badany analit z roztworu, z kolei drugą z nich stanowiła immunosonda SERS, rozpoznająca analit unieruchomiony na podłożu i generujący sygnał SERS. Szczególnym podejściem jest wykorzystanie dwóch podłoży metalicznych, co zapewnia podwójny potencjał wzmocnienia. Dzięki temu można uzyskać sensor o bardzo wysokiej czułości, jednakże jego zaprojektowanie nie jest zadaniem prostym i wymaga wielu eksperymentów optymalizacyjnych. W ramach tej ścieżki, pierwsze eksperymenty opierały się na ocenie nanostrukturalnych podłoży metalicznych (zarówno Au jak i Ag) pod kątem wzmocnienia, jednorodności sygnału, powtarzalności oraz stabilności. Na tej podstawie wybrane zostały nanoplatformy, które wykazywały najlepszy potencjał pod względem możliwości wykorzystania w celach analitycznych. Kolejnym etapem było opracowanie i zoptymalizowanie protokołu funkcjonalizacji powierzchni zarówno stałego podłoża jak i nanocząstek mających tworzyć immunosondę. Istotnym zagadnienie był wykorzystanie dwóch systemów w tworzonych czujnikach – z użyciem jednego reportera ramanowskiego umiejscowionego w immunosondzie oraz z zastosowaniem dwóch reporterów – jednego związanego z immunosodną, a drugiego z podłożem stałym. Z prowadzonych analiz wynika, że w przypadku drugiego podejścia skonstruowano czujnik o większej czułości. W ramach poszukiwania najlepszych rozwiązań w konstrukcji czujnika typu kanapkowego, prócz dwóch sposobów funkcjonalizacji stałych podłoży, przetestowano również różne kombinacje połączenia podłoże (Ag lub Au) – immunosonda (Ag lub Au) za pomocą antygenu. Zarówno dla przypadku, gdy podłoże sfunkcjonalizowano za pomocą długiego linkera z grupami karboksylowymi jak i w przypadku takiej modyfikacji przy użyciu reportera ramanowskiego, funkcjonalne czujniki utworzone zostały dla układów, w których

immunosonda zbudowana była z nanocząstek złota, bez względu na to jaki metal użyty został w podłożu stałym.

Ostatnim etapem prowadzonych badań było wyznaczenie parametrów analitycznych skonstruowanych sensorów kanapkowych dla oznaczenia ilościowego IL-6 w zakresie stężeń od 0 do 1000 pg/ml. Stwierdzono, że układ z dwoma reporterami ramanowskimi, których sygnał jest wzmocniony przez sprzężenie plazmonowe dwóch substratów SERS charakteryzuje się większą czułością w detekcji badanej interleukiny w stosunku do sensora opartego na jednym reporterze ramanowskim.

Podsumowując, prowadzone w ramach pracy doktorskiej badania umożliwiły wybranie najlepszych warunków modyfikacji znacznika SERS w celu stworzenia immunosondy do detekcji interesujących struktur w tkankach. Równocześnie zaprojektowano czuły sensor kanapkowy do ilościowego oznaczania interleukiny w płynach z limitem detekcji ok. 20 pg/ml.