

Warszawa, 26.07.2013 r.

mgr Adriana Palińska-Saadi

Uniwersytet Warszawski

Wydział Chemii

Pracownia Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.

„Konstrukcja i zastosowanie sitodrukowanych czujników elektrochemicznych w badaniach oddziaływań DNA z błękitem metylenowym, antracyklinami i ich formamidynowymi pochodnymi”

Promotor rozprawy: prof. dr hab. Magdalena Maj-Żurawska

Dokonana w drugiej połowie XIX wieku przez Lelanda C. Clarka modyfikacja powierzchni gazowej elektrody tlenowej poprzez osadzenie na niej oksydazy glukozowej otworzyła drogę do konstrukcji zupełnie nowych, umożliwiających wykonywanie badań z pogranicza chemii i biologii, narzędzi analitycznych, jakimi były wówczas bioczujniki elektrochemiczne. Obecnie cieszą się one dużą popularnością i są wciąż udoskonalane zarówno przez stosowanie różnorodnych rodzajów biologicznego materiału receptorowego, jak i przez liczne modyfikacje w konstrukcji urządzenia oraz w procedurze pomiarowej. Na szczególną uwagę zasługują biosensory, w których biologiczny element receptorowy stanowi warstwa kwasu deoksyrybonukleinowego, który jako nośnik informacji genetycznej odgrywa ważną rolę w procesach biologicznych. Bioczujniki DNA mogą dostarczać wielu istotnych informacji na temat oddziaływań molekuł kwasu deoksyrybonukleinowego z różnymi indywiduami chemicznymi (farmaceutykami, substancjami toksycznymi, białkami), mutacji występujących w łańcuchach DNA oraz chorób genetycznych. Wprowadzając różne modyfikacje w ich konstrukcji, dąży się do uzyskania tanich, skutecznych i prostych w obsłudze narzędzi, które w przyszłości mogłyby być dostępne komercyjnie i stosowane nawet przez niewykwalifikowane osoby w oznaczeniach medycznych, farmakologicznych oraz środowiskowych.

Badania eksperymentalne opisane w mojej rozprawie doktorskiej dotyczyły zastosowania trójelektrodowych układów sitodrukowanych do konstrukcji elektrochemicznych bioczujników DNA. Przeprowadziłam szereg eksperymentów, mających na celu optymalizację procedury przygotowywania powierzchni sitodrukowanej elektrody pracującej oraz polepszenie parametrów pomiarowych układów na drodze modyfikacji nanorurkami węglowymi. Zoptymalizowane czujniki wykorzystałam do analizy oddziaływań różnych rodzajów DNA z błękitem metylenowym oraz daunorubicyną, doksorubicyną i ich formamidynowymi pochodnymi, wykazującymi podobnie jak związki macierzyste właściwości antynowotworowe.

W mojej pracy prezentacja wyników badań własnych poprzedzona została dość obszerną częścią literaturową, która przybliży zagadnienia istotne z punktu widzenia podjętej tematyki. Objęła ona omówienie budowy i właściwości kwasu deoksyrybonukleinowego oraz substancji z nim oddziałujących, konstrukcji i zasady działania elektrochemicznych bioczujników DNA, techniki sitodruku, budowy i właściwości nanorurek węglowych oraz metod analitycznych, stosowanych w mojej pracy, takich jak voltamperometria i spektrofotometria UV-Vis.

W części mojej rozprawy dotyczącej badań własnych, jako pierwsze zaprezentowane zostały wyniki testowania czterech metod przygotowania powierzchni sitodrukowanej

elektrody pracującej: oczyszczania elektrochemicznego, oczyszczania elektrochemicznego poprzedzonego działaniem NaOH, oczyszczania elektrochemicznego poprzedzonego działaniem H_2O_2 oraz oczyszczania elektrochemicznego poprzedzonego mechanicznym szlifowaniem. Na elektrodach przygotowanych według poszczególnych procedur osadzałam DNA i monitorowałam woltamperometrycznie sygnały elektrotlenienia zawartej w nim guaniny i adeniny. Uzyskane wyniki oraz charakteryzujące je parametry pokazały, iż najwłaściwszym sposobem przygotowania elektrod sitodrukowanych do konstrukcji bioczuJNIKÓW DNA jest czyszczenie elektrochemiczne, obejmujące kondycjonowanie elektrody przy stałym dodatnim potencjale oraz cykliczne utlenianie i redukcja jej powierzchni w szerokim zakresie potencjałów.

Podjęłam również próbę poprawy parametrów pomiarowych, zwiększenia czułości i powtarzalności, stosowanych układów sitodrukowanych poprzez ich modyfikację wielościennymi nanorurkami węglowymi. Na wstępie przeprowadziłam serie prób, mających na celu dobór rozpuszczalnika właściwego do sporządzenia zawiesiny nanorurek węglowych i następnie użycia jej do modyfikacji elektrod sitodrukowanych. Stabilne, jednorodne zawiesiny nanorurek węglowych uzyskałam jedynie w DMF, jego mieszaninie z wodą w stosunku 1:1 oraz cellosolwie butylowym. Jednak ostatecznie do modyfikacji elektrod sitodrukowanych użyłam jedynie zawiesin sporządzonych w dwóch ostatnich rozpuszczalnikach, gdyż DMF powodował zniekształcenia woltamperogramów, uniemożliwiające monitorowanie sygnałów utlenienia zasad azotowych DNA. Modyfikację nanorurkami prowadziłam dwoma sposobami: poprzez nakroplenie ich zawiesiny na powierzchnię elektrody pracującej oraz poprzez wzbogacenie nimi grafitowej pasty sitodrukowej używanej do nadruku układów elektrodowych. Pierwsza metoda okazała się skuteczna jedynie w przypadku zastosowania zawiesiny wielościennych nanorurek węglowych w mieszaninie DMF- H_2O do modyfikacji sitodrukowanych elektrod produkcji włoskiej, powodując podwyższenie rejestrowanych na nich sygnałów utlenienia DNA, podczas gdy na elektrodach polskich modyfikowanych w analogiczny sposób ulegały one obniżeniu. Jednak mimo wzrostu wysokości pików rejestrowanych na elektrodach włoskich w obecności nanorurek, pozostawały one niższe i mniej powtarzalne niż rejestrowane na niemodyfikowanych elektrodach polskich. Alternatywna metoda modyfikacji elektrod sitodrukowanych nanorurkami węglowymi stosowana była tylko dla układów polskich i polegała na dodatku 1% wielościennych nanorurek węglowych do grafitowej pasty sitodrukowej. W tym przypadku wpływ nanorurek węglowych na sygnały utlenienia zasad azotowych był zależny od sposobu osadzania DNA – gdy było ono nakraplane, ich obecność nie powodowała wzrostu pików, gdy zaś było ono adsorbowane z roztworu przy stałym potencjale, ulegały one niewielkiemu podwyższeniu z jednoczesną poprawą powtarzalności. Takie efekty świadczą o pozytywnym wpływie nanorurek węglowych na przepływ elektronów, towarzyszących procesom elektrolitycznym zachodzącym podczas adsorpcji DNA, a nie o ich katalitycznym działaniu na samą reakcję redoks. Do dalszych eksperymentów wybrałam ostatecznie elektrody produkcji polskiej bez modyfikacji ze względu na dość duży koszt zakupu nanorurek węglowych, nieprzekładający się na znaczącą poprawę parametrów pomiarowych elektrod modyfikowanych.

W dalszej części mojej rozprawy przedstawiłam wyniki badań własnych nad wykorzystaniem zoptymalizowanych bioczuJNIKÓW DNA do analizy oddziaływań kwasu deoksyrybonukleinowego z różnymi substancjami chemicznymi. Pierwszym przebadanym przeze mnie związkem był popularny interkalator – błękit metylenowy. Analiza przeprowadzona w mieszaninie MB i poszczególnych rodzajów DNA ujawniła, że wchodzi on w silniejsze interakcje z DNA plazmidowym niż chromosomalnym, a jako miejsce oddziaływania z helisą preferuje sekwencje zawierające guaninę i cytozynę. Niestety blokowanie powierzchni

czujników sitodrukowanych przez utlenione molekuly kwasu nukleinowego uniemożliwiło użycie ich do badania procesów akumulacji i elektroaktywności różnych rodzajów DNA plazmidowego, a następnie ich oddziaływania z błękitem metylenowym. Dlatego w tych badaniach zastosowałam klasyczny układ elektrod, z elektrodą z węgla szklanego jako pracującą. Jak pokazują otrzymane wyniki, adsorpcja plazmidów na niej jest dużo silniejsza niż DNA chromosomalnego, a procesy elektrodowe, którym ulegają, zależą od trójwymiarowej struktury tych molekuł, determinującej sposób ich ułożenia na powierzchni przetwornika. Rozróżnienie form plazmidów na podstawie ich sygnałów utlenienia nie jest zadaniem łatwym, dlatego też wiedząc na podstawie eksperymentów wykonanych za pomocą układów sitodrukowanych, że oddziaływanie MB z DNA zależy od struktury trzeciorzędowej kwasu, z powodzeniem użyłam tego ligandu jako narzędzia do odróżnienia form plazmidów o różnej wielkości i strukturze przestrzennej.

Ważną częścią prowadzonych przeze mnie badań była analiza oddziaływań występujących pomiędzy DNA a daunorubicyną, doksorubicyną i ich pochodnymi, w których grupa aminowa w części daunozaminowej zastąpiona została ugrupowaniem formamidynowym zawierającym resztę aminy cyklicznej. W tym celu przeprowadziłam eksperymenty spektrofotometryczne oraz voltamperometryczne przy użyciu sitodrukowanych biocujników DNA. Wyniki jednych i drugich wskazują na powinowactwo wszystkich antracyklin do kwasu nukleinowego, które zależy od struktury i stężenia antracyklin oraz sekwencji i stężenia łańcuchów DNA. Pomiar elektrochemiczny dostarczył jednak pełniejszych informacji na temat interakcji występujących pomiędzy tymi substancjami, ujawniając różnorodność ich mechanizmów. Na podstawie wywołanych obecnością poszczególnych antracyklin zmian sygnałów utlenienia guaniny i adeniny różnych rodzajów DNA (chromosomalnych i oligonukleotydowych) stwierdzono, iż wśród sposobów ich oddziaływania wymienić można: interkalację, połączoną z tworzeniem wiązań wodorowych i kowalencyjnych, elektrostatyczne przyciąganie molekuł antracyklin przez szkielet cukrowo-fosforanowy helisy oraz jej rozplatanie połączone ze zrywaniem wiązań wodorowych pomiędzy komplementarnymi zasadami. Bez względu na mechanizm interakcji w porównaniu ze związkami macierzystymi formamidynowe pochodne wykazywały zwykle silniejsze powinowactwo do DNA oraz większy wpływ na zmianę sygnałów utlenienia zasad azotowych w zakresie niższych stężeń. W odniesieniu do zastosowania chemioterapeutycznego pokazuje to, że obrana droga poszukiwania nowych antracyklin o podwyższonej aktywności antynowotworowej i obniżonej toksyczności jest właściwa.

W ramach pracy doktorskiej wykazałam, że elektrochemiczne biocujniki DNA skonstruowane na elektrodach sitodrukowanych stanowią użyteczne narzędzie analityczne do badania oddziaływań kwasu deoksyrybonukleinowego z różnymi substancjami chemicznymi. Mogą pozwolić one na prowadzenie przy ich użyciu badań przesiewowych, pozwalających z grupy wielu substancji (np. analogów leków antynowotworowych) wyłonić tylko te, które charakteryzują się najsilniejszym powinowactwem do DNA, i w przypadku związków o właściwościach terapeutycznych zakwalifikować je następnie do kosztownych i czasochłonnych testów biologicznych.

Wyniki badań eksperymentalnych wykonanych w ramach mojej pracy doktorskiej zostały dotychczas przedstawione w 3 publikacjach naukowych o zasięgu międzynarodowym (w tym 2 w czasopiśmie z tzw. listy filadelfijskiej, IF = 2,82 oraz IF = 3,95) oraz zaprezentowane podczas 14 wystąpień na międzynarodowych konferencjach naukowych organizowanych w kraju i zagranicą.