

mgr inż. Joanna Jankowska-Śliwińska

Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. M. Nałęcz, PAN

Autoreferat

do rozprawy doktorskiej zatytułowanej: „Electrochemical detection of psychoactive substances based on DNA intercalation” (Elektrochemiczna detekcja wybranych substancji psychoaktywnych oparta na interkalacji do DNA)

Nowoczesna diagnostyka medyczna częściowo oparta jest na szybkich testach i miniaturowych układach analitycznych przeznaczonych do pomiarów w miejscu pobrania próbki (ang. *point-of-care systems* – POCS, *point-of-care tests* POCT), które mogą być stosowane poza specjalistycznymi laboratoriami klinicznymi. Główną zaletą takich zaawansowanych rozwiązań jest skrócenie czasu uzyskania wyniku pomiaru, a tym samym skrócenie czasu diagnozy i decyzji lekarza dotyczącej sposobu leczenia oraz zmniejszenie objętości pobranej próbki i odczynników używanych do analizy. Kluczowym elementem takich układów są detektory i czujniki (bio)chemiczne, które w bardzo dużym stopniu wpływają na parametry analityczne, m.in. takie jak: czułość, granica wykrywalności i oznaczalności oraz selektywność.

Zarówno chloropromazyna jak i imipramina są stosunkowo często stosowanymi lekami w terapii chorób i zaburzeń psychicznych. W przypadku obu leków jednym ze skutków ubocznych ich stosowania jest obniżenie zdolności psychomotorycznych. Obecnie występuje duże zapotrzebowanie na szybkie testy na obecność wspomnianych substancji, na przykład we krwi. Zapotrzebowanie to wynika, nie tylko, z potrzeb klinicznych ale również jest ono szczególnie ważne z przyczyn społecznych m.in. w przypadku kontroli osób obsługujących pojazdy i urządzenia mechaniczne.

Celem rozprawy doktorskiej było **opracowanie selektywnej elektrochemicznej metody oznaczeń** wybranych substancji psychoaktywnych: chloropromazyny – leku z grupy fenotiazyn oraz imipraminy - leku z grupy trójcyklicznych leków przeciwdepresyjnych (ang. *tricyclic antidepressants*, TCA) opartej na czujnikach elektrochemicznych.

Ze względu na specyficzną budowę cząsteczek ww. substancji psychoaktywnych - składających się ze skondensowanych pierścieni aromatycznych oraz właściwości redoks tych związków, zdecydowano się na ukierunkowanie badań na opracowanie bioczujnika opartego na DNA. Głównym oddziaływaniem, które zostało wykorzystane w bioczujniku była interkalacja – czyli zjawisko wsuwania cząsteczek związków posiadających w swej

budowie układ trzech skondensowanych pierścieni pomiędzy sparowane zasady azotowe w cząsteczce DNA.

Znane są i szeroko opisane w literaturze metody instrumentalne identyfikacji i oznaczania zarówno imipraminy jak chloropromazyny, takie jak: wysokosprawna chromatografia cieczowa z różnymi układami detekcji, spektrofotometria, elektroforeza kapilarna. Wszystkie wymienione metody wymagają jednak specjalistycznej i nierzadko drogiej aparatury. W metodach elektrochemicznego oznaczania wymienionych substancji psychoaktywnych najczęściej używane są elektrody pracujące wykonane z: węgla, węgla szklanego, z pasty grafitowej bądź węglowej, czy wielościennych nanorurek węglowych. Selektywność oznaczeń anilitów otrzymuje się poprzez modyfikowanie powierzchni elektrod za pomocą polimerów przewodzących, cyklodekstryn lub DNA. Jednak zgodnie z aktualnym stanem wiedzy nie są znane czujniki wykonane z pasty złotej modyfikowane DNA do selektywnych oznaczeń imipraminy i chloropromazyny w złożonych próbkach.

Stan wiedzy w zakresie detekcji wybranych leków psychotropowych oraz ich oddziaływania z podwójną helisą DNA unieruchomioną na powierzchni czujników złotych pozwala na sformułowanie następujących tez rozprawy doktorskiej:

1. Możliwe jest zastosowanie czujników elektrochemicznych wykonanych z wykorzystaniem technologii drukowania bezpośredniego do detekcji hybrydyzacji DNA.
2. Możliwe jest selektywne oznaczanie wybranych substancji psychoaktywnych, np. leków z grupy fenotiazyn i/lub trójcyklicznych antydepresyjnych z wykorzystaniem zjawiska interkalacji cząsteczek wymienionych substancji do DNA.

Dobór materiału elektrody pracującej

W celu doboru odpowiedniego materiału elektrody pracującej, na powierzchni którego możliwe byłyby oznaczenia wybranych substancji psychoaktywnych oraz unieruchomienie oligonukleotydów, jako bioreceptorów zapewniających selektywność tych oznaczeń, w pierwszym etapie przeprowadzono badania oznaczeń zasad azotowych wchodzących w skład łańcucha DNA: adeniny, guaniny, tyminy i cytozyny. Strukturę trójelektrodowych czujników elektrochemicznych opracowano i wytworzono w IBIB PAN metodą drukowania bezpośredniego [1] i sitodruku na podłożach z folii poliestrowej z wykorzystaniem różnego rodzaju past: węglowej, grafitowej i złotej, z których wykonano elektrody pracujące. Ponieważ elektrody wykonane z wykorzystaniem pasty złotej umożliwiały zastosowanie stosunkowo prostej metody unieruchamiania tiolowanych cząsteczek oligonukleotydów na jej

powierzchni, do dalszych badań wybrano czujniki z elektrodami pracującymi z pasty złotej wykonanymi metodą drukowania bezpośredniego. Ponadto w przypadku elektrod wykonanych z wykorzystaniem pasty złotej były możliwe oznaczenia wszystkich czterech zasad azotowych, uzyskano w ten sposób możliwość oceny sposobu unieruchamiania oligonukleotydów na powierzchni elektrod.

Otrzymano następujące granice wykrywalności oraz czułości dla oznaczeń zasad azotowych z wykorzystaniem czujników złotych:

- dla adeniny otrzymano granicę wykrywalności LOD – $7,4 \cdot 10^{-7}$ M z czułością 26,0 nA/ μ M,
- dla dwóch pików guaniny otrzymano granice wykrywalności: LOD – $1,3 \cdot 10^{-6}$ M i $2,6 \cdot 10^{-6}$ M z odpowiednimi czułościami 3,0 nA/ μ M i 1,6 nA/ μ M,
- dla cytozyny otrzymano granicę wykrywalności LOD – $6,3 \cdot 10^{-7}$ M z czułością 39,8 nA/ μ M,
- dla otrzymanych dwóch pików utleniania tyminy wyznaczono granice wykrywalności LOD - $1,3 \cdot 10^{-6}$ M and $6,4 \cdot 10^{-7}$ M z odpowiednimi czułościami 11,5 nA/ μ M i 34,1 nA/ μ M.

Badania modyfikacji powierzchni elektrod złotych

Kolejny etap badań stanowiły eksperymenty związane z modyfikacją powierzchni elektrod złotych - unieruchamianiem tiolowanych oligonukleotydów oraz ich hybrydyzacją z nimi komplementarnymi. Oceny poprawności przeprowadzonych modyfikacji powierzchni dokonano z wykorzystaniem czterech metod.

(1) Pierwszą była metoda elektrochemiczna przy użyciu aktywnego elektrochemicznie układu 50 mM ($K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$) w 0,1 M KCl. Pomiary zostały wykonane przy użyciu niemodyfikowanych elektrod złotych, elektrod złotych z unieruchomioną jedną nicią DNA oraz z podwójną nicią DNA. Po każdym wymienionym etapie modyfikacji pik utleniania 50 mM ($K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$) w 0,1 M KCl systematycznie się zmniejszał. Otrzymane wyniki pozwoliły na dobranie optymalnych warunków unieruchamiania związków tiolowanych na powierzchni elektrod złotych. Najbardziej odpowiednie okazało się przeprowadzenie unieruchamiania oligonukleotydów przez 18 godzin w temperaturze 25⁰C.

(2) Kolejną metodą badania powierzchni elektrod była także metoda elektrochemiczna, która polegała na bezpośrednim utlenianiu pojedynczych nici oligonukleotydów (ssDNA) oraz nici podwójnych (dsDNA) po przeprowadzeniu hybrydyzacji. W tym

przypadku, elektrochemicznie aktywne niesparowane zasady azotowe mogą być elektrochemicznie utlenione bezpośrednio na elektrodzie [2, 3]. Pozytywne rezultaty hybrydyzacji uzyskano, gdy pik utleniania pochodzący od zasad azotowych, wchodzących w skład podwójnej nici (dsDNA) znacznie się zmniejszył w stosunku do pików otrzymanego dla zasad azotowych pojedynczej nici (ssDNA). Tym samym została dowiedziona pierwsza teza pracy.

- (3) Badania powierzchni zmodyfikowanych elektrod z pasty złotej wykonano także z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR). Na widmach absorpcyjnych widoczne są wyraźnie trzy grupy pasm charakterystycznych dla drgań wiązań cukrów, w tym przypadku deoksyrybozy, grup fosforanowych oraz zasad azotowych (puryn i pirymidyn).
- (4) Natomiast jako metodę dodatkową, potwierdzającą poprawne przeprowadzenie wszystkich etapów modyfikacji powierzchni, wykorzystano spektroskopię UV-Vis z sondą odbiciową, za pomocą której badano powierzchnie elektrod z unieruchomionymi oligonukleotydami poddanymi oddziaływaniu z błękitem metylenowym, który jest związkiem fluorescencyjnym, należącym również do interkalatorów DNA. Dla zinterkalowanego błękitu metylenowego otrzymano wyraźny pik absorpcji przy długości fali 660 nm.

Zarówno spektroskopia FTIR jak i UV-Vis potwierdziły obecność oligonukleotydów na powierzchni elektrod złotych podobnie jak potwierdziły także interkalację błękitu metylenowego do podwójnej nici DNA unieruchomionej na powierzchni elektrody złotej.

Selektywna detekcja wybranych substancji psychoaktywnych

Badania elektrochemiczne wytworzonych biocujników z DNA o różnej sekwencji nukleotydów: mono-(AT)₂₁, mono-(CG)₂₁ i mieszanej-(ATGC)₂₁ oraz czujników z elektrodami złotymi niemodyfikowanymi wykonano z wykorzystaniem dwóch metod: różnicowej woltamperometrii impulsowej (DPV) i woltamperometrii liniowej (LSV). Badania selektywności opracowanych czujników wykonano po inkubacji czujników w roztworach zawierających oprócz chlorpromazyny i imipraminy także substancje interferujące – kwas askorbinowy i paracetamol. W zaproponowanej metodzie **kluczowym etapem jest inkubacja biocujnika w badanej próbce, po której następuje odmywanie** roztworu próbki i wykonanie pomiarów elektrochemicznych w roztworze pomiarowym - buforze fosforanowym o pH 7,5. Dzięki temu uzyskany sygnał analityczny pochodzi wyłącznie od

substancji oddziałujących z niemi DNA, unieruchomionymi na powierzchni elektrody. W ten sposób uzyskuje się również zateżanie substancji oznaczanej (analitu) na powierzchni elektrody. Selekttywne oznaczenia wybranych substancji psychoaktywnych (chloropromazyny i imipraminy) otrzymano tylko w przypadku bioczuJNIKÓW z elektrodami z pasty złotej z poprawnie uformowanymi warstwami samoorganizującymi (SAM ang. *self-assembling monolayer*), zawierającymi cząsteczki o mono-sekwencji (CG)₂₁ i sekwencji mieszanej (ATGC)₂₁. W przypadku mono-sekwencji (CG)₂₁ otrzymany sygnał jest 3,6 razy mniejszy niż dla mieszanej sekwencji (ATGC)₂₁, podczas gdy dla mono-sekwencji (AT)₂₁ w ogóle nie uzyskano pików utleniania zarówno imipraminy jak i chloropromazyny. Czujniki z elektrodami niemodyfikowanymi były mało selektywne w stosunku do wspomnianych substancji interferujących. Za pomocą opracowanych bioczuJNIKÓW z unieruchomioną sekwencją mieszaną (ATCG)₂₁ przy zastosowaniu DPV jako metody pomiarowej można oznaczać **imipraminę z bardzo wysoką czułością 3,44 μA/μM oraz chloropromazynę z czułością 0,06 μA/μM**. Stosując impulsową woltamperometrię różnicową otrzymano wyraźne i dobrze rozdzielone piki utleniania chloropromazyny i imipraminy przy potencjałach odpowiednio +0,55 V i +0,74 V, podczas gdy przy zastosowaniu woltamperometrii liniowej widoczny jest jedynie pik utleniania chloropromazyny (*c.a.* +0,66 V). W przypadku pacjentów niehospitalizowanych, przyjmujących chloropromazynę lub imipraminę średnie stężenie chloropromazyny we krwi wynosi $(7,2 \div 14,4) \cdot 10^{-5}$ M, natomiast imipraminy – $(1,9 \div 4,7) \cdot 10^{-5}$ M. Należy zatem podkreślić, że **granice wykrywalności dla chloropromazyny i imipraminy** wyznaczone dla pomiarów DPV, są wartościami **poniżej wartości stężeń użytecznych diagnostycznie** i wynoszą odpowiednio **0,06 μM dla imipraminy** (współczynnik korelacji liniowej – 0,999) [4] oraz **0,42 μM dla chloropromazyny** (współczynnik korelacji liniowej – 0,99) [5]. Uzyskane granice wykrywalności dla obu substancji są niższe niż ich stężenia we krwi lub plazmie krwi wynikające z minimalnych dziennych, dawek terapeutycznych przyjmowanych przez pacjentów.

Pomiary przeprowadzone w rozcieńczonym osoczu bydlęcym potwierdziły możliwość oznaczania zarówno chloropromazyny jak i imipraminy w materiale biologicznym jakim jest osocze.

Podsumowanie

Podsumowując, **opracowano bioczuJNIKI DNA do selektywnego oznaczania dwóch substancji psychoaktywnych – chloropromazyny i imipraminy** odpowiednio z grupy

fenotiazyn i trójcyklicznych leków przeciwdepresyjnych, zarówno w roztworach wodnych jak i materiale biologicznym. Zaprojektowane i wykonane bioczujniki są jednorazowego użytku, stosunkowo tanie i dzięki zastosowanej prostej procedurze pomiarowej – łatwe w obsłudze. Tym samym została dowiedziona druga teza pracy. Bioczujniki z unieruchomioną sekwencją mieszaną (ATCG)₂₁ przy zastosowaniu DPV charakteryzują się **wysoką czułością zarówno w przypadku oznaczeń imipraminy - 3,44 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$ jak i chloropromazyny - 0,06 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$** . Uzyskane granice wykrywalności dla obu substancji są **poniżej wartości stężeń użytecznych diagnostycznie** i niższe niż ich stężenia we krwi lub plazmie krwi wynikające z minimalnych dziennych dawek terapeutycznych przyjmowanych przez pacjentów. W przyszłości mogą one posłużyć do opracowania szybkiego testu na obecność substancji psychoaktywnych – chloropromazyny i/lub imipraminy w płynach ustrojowych, szczególnie we krwi.

Lista publikacji własnych związanych z rozprawą

1. Dawgul, M.; Rozum, B.; Jankowska-Śliwińska, J.; Kruk, J.; Torbicz, W.; Pijanowska, D. G., An innovative method for complete microsensors fabrication. *Procedia Engineering* **2012**, *47*, 1430-1433.
2. Jankowska-Śliwińska, J.; Dawgul, M.; Pijanowska, D. G., Electrochemical detection of hybridization of oligonucleotides with use of graphite electrodes (Elektrochemiczna detekcja hybrydyzacji oligonukleotydów z wykorzystaniem elektrod grafitowych). *Electrical Review* **2012**, *88*, 71-73.
3. Jankowska-Śliwińska, J.; Dawgul, M.; Pijanowska, D. G.; Torbicz, W., Zastosowanie różnych materiałów elektrod pracujących w amperometrycznych bioczujnikach DNA. *Electrical Review* **2010**, *10*, 30-32.
4. Jankowska-Śliwińska, J.; Dawgul, M.; Pijanowska, D. G., DNA-based electrochemical biosensor for imipramine detection. *Procedia Engineering* **2015**, *120*, 574 – 577.
5. Jankowska-Śliwińska, J.; Dawgul, M.; Pijanowska, D. G., DNA intercalation-based amperometric biosensor for chlorpromazine detection. *Procedia Engineering* **2014**, *87*, 747-750.

Publikacje będące w przygotowaniu:

J. Jankowska-Śliwińska, M. Dawgul, J. Kruk, D.G. Pijanowska, Comparison of electrochemical determination of purine and pyrimidine bases on carbon, graphite and gold electrodes, *Electroanalysis*.

J. Jankowska-Śliwińska, E. Remiszewska, M. Dawgul, D.G. Pijanowska, Surface modification for immobilization of DNA, *Sensors*.

J. Jankowska-Śliwińska, M. Dawgul, D.G. Pijanowska, Optimization of measurement procedure for DNA-based biosensors for psychotropic substances determination, *Int. J. Electrochem. Sci.*

Warszawa, dnia 25 kwietnia 2016

Joanna Jankowska-Śliwińska