

Mgr inż. Kamila Spychalska

Konstruowanie układów biosensorowych modyfikowanych strukturami półprzewodnikowymi

Zaburzenia homeostazy organizmu ludzkiego i zwierzęcego, wynikające z obecności związków endokrynnie czynnych (EDC, ang. *endocrine disrupting compounds*) w roztworach wodnych, mogą być przyczyną pojawiania się wielu poważnych, długotrwałych schorzeń. Stąd też bardzo ważne jest opracowywanie coraz czulszych i szybszych metod analitycznych, umożliwiających kontrolę jakościową oraz ilościową tych związków. Klasyczne testy biochemiczne coraz częściej okazują się zbyt czasochłonne i niewystarczająco dokładne, przez co coraz większą uwagę zaczęto przywiązywać do rozwoju nowoczesnych technik diagnostycznych, m.in. biosensorów.

Biosensory to urządzenia należące do grupy sensorów chemicznych. Układy te zbudowane są z dwóch podstawowych elementów: warstwy bioreceptorowej, zwanej również warstwą biologicznie aktywną (odpowiedzialnej za specyficzne rozpoznanie badanej substancji) oraz części przetwornikowej (konwertującej otrzymany sygnał chemiczny lub biochemiczny w wartość mierzalną np. natężenie prądu). Wyjątkowa czułość i selektywność biosensorów wynika z obecności biologicznie aktywnego materiału (np. enzymu, przeciwciała lub komórki), który jest nieodłącznym elementem w warstwie receptorowej. Konstruowanie biosensorów zostało w 2012 roku zakwalifikowane przez Ministerstwo Gospodarki Rzeczypospolitej Polskiej jako jedna z technologii priorytetowych, wskazanych w projekcie *Foresight technologiczny przemysł – InSight 2030*, związanym z rozpoznawaniem strategicznych technologii.

Ze względu na ogólnoświatowe zapotrzebowanie na szybkie oraz tanie metody analityczne, badania przeprowadzone w ramach mojej pracy doktorskiej mają na celu zintensyfikowanie badań nad projektowaniem nowej generacji miniaturowych urządzeń diagnostycznych o szerokich możliwościach aplikacyjnych. W pracy badawczej skupiam się na projektowaniu oraz konstruowaniu elektrochemicznych immunosensorów oraz biosensorów enzymatycznych, służących do oznaczania stężenia hormonów steroidowych w roztworach wodnych, które w przyszłości mogłyby znaleźć zastosowanie jako narzędzia służące do ochrony środowiska.

Projektowanie poszczególnych biosystemów rozpoczynałam od wyboru odpowiedniego związku półprzewodzącego, wykorzystywanego podczas wytwarzania warstwy chemoczułej. Głównym argumentem przemawiającym za wytworzeniem cienkiej warstwy filmu pokrywającego powierzchnię elektrody było ustanowienie wysoce wydajnego kontaktu pomiędzy immobilizowanym elementem biologicznie aktywnym (białkiem enzymatycznym, przeciwciałem) a przetwornikiem. W trakcie realizacji badań, elektrody platynowe modyfikowano heterocyklicznymi pochodnymi pirydyny, ditienosilolu oraz benzotiadiazolu.

Wybrane związki heterocykliczne zbadałam pod kątem ich możliwości elektropolimeryzacji bądź samoorganizacji na powierzchni elektrody. W prowadzonych badaniach wykorzystywałam techniki elektrochemiczne, takie jak woltamperometria pulsowo – różnicowa, woltamperometria cykliczna, chronoamperometria oraz adsorpcja fizyczna. Zmodyfikowane powierzchnie charakteryzowałam za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej.

Tak przygotowane elektrody wykorzystywałam w dalszej części badań do konstrukcji warstw bioreceptorowych. W bioukładach stosujących enzymy kluczowe jest zachowanie aktywności katalitycznej zimmobilizowanych białek. Materiał pokrywający elektrodę powinien nie tylko stabilnie utrzymać na swojej powierzchni enzym, ale również zapobiegać ewentualnej utracie jego aktywności katalitycznej. W przypadku przeciwciał istotne jest wytworzenie silnego i stabilnego oddziaływania pomiędzy przeciwciałem a materiałem pokrywającym elektrodę – w trakcie pomiarów konieczne jest wmywanie antygeny związane z przeciwciałem przy jednoczesnym zachowaniu stabilnego pokrycia warstwy półprzewodzącej przez białka.

W kolejnych etapach badawczych białka należące do klasy oksydoreduktaz (peroksydaza chrzanowa, lakaza oraz tyrozynaza) jak również przeciwciała monoklonalne anty-17 β -estradiol unieruchamiałam na uprzednio modyfikowanych podłożach, z zastosowaniem metod adsorpcji fizycznej oraz sieciowania kowalencyjnego. Skuteczność osadzania enzymów na powierzchni elektrody oraz pomiar ich aktywności katalitycznej przeprowadziłam stosując techniki kolorymetryczne z wykorzystaniem spektrofotometru.

Ostatni etap moich badań obejmował połączenie wytworzonej warstwy chemoczułej z przetwornikiem elektrochemicznym, a następnie przeprowadzenie pomiarów amperometrycznych w obecności wybranych analitów w celu zdefiniowania parametrów analitycznych skonstruowanych układów.

Wyżej wymienione prace badawcze pozwoliły na skonstruowanie **10** stabilnych biosystemów, umożliwiających monitorowanie stężenia hormonów steroidowych, należących do grupy związków endokrynnie czynnych w próbkach laboratoryjnych oraz farmaceutycznych. Tego typu urządzenia mają olbrzymi potencjał stać się komercyjnie dostępnymi sensorami, będącymi doskonałą alternatywą do tradycyjnych metod analitycznych umożliwiającymi szybkie i czułe pomiary *in situ*.