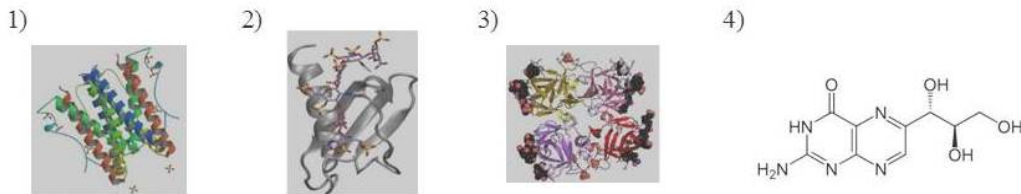


Układ immunologiczny składa się z wielu różnych typów komórek i białek. Każdy element wykonuje określone zadanie, którego celem jest rozpoznanie i/lub reakcja wobec "obcego materiału". Zaburzenia układu odpornościowego mogą doprowadzić do chorób autoimmunologicznych, chorób zapalnych i nowotworów. Istnieje ponad 250 podstawowych chorób niedoboru (zaburzeń) odporności uznanych przez Światową Organizację Zdrowia. Zatem opracowanie nowej metody do pogłębienia wiedzy na temat funkcjonowania układu odpornościowego człowieka przyczyni się do lepszego zrozumienia chorób układu immunologicznego i otworzy możliwości dla nowych metod terapeutycznych. W proponowanym projekcie do analizy i oznaczania wybranych markerów chorób immunologicznych, tj., neopterinu i trzech wybranych cytokin IL6, IL8 i IL18 budujemy używając hybrydowe nanostruktury metaliczne wzmacniające sygnał Ramana. Struktury trzyczłonowe trzech proponowanych cytokin i wzór strukturalny neopterinu pokazane są na Schemacie 1.



Schemat 1. Schematyczne struktury wybranych immuno-markerów: (1) cytokina IL6, (2) cytokina IL8, (3) cytokina IL18 i (4) wzór strukturalny neopterinu.

Spektroskopia Ramana jest techniką bazującą na badaniu oscylacji molekuł i charakteryzuje się dużą selektywnością. Otrzymane w wyniku pomiaru pasma oscylacyjne dają możliwość uzyskania informacji o strukturze badanego związku. W spektroskopii Ramana każdy związek daje charakterystyczne dla siebie widmo spektroskopowe (ang. fingerprint). Poza identyfikację różnych rodzajów substancji, technika ramanowska umożliwia ponadto uzyskanie informacji o strukturze badanego związku. Jednak posiada ona jedno istotne wada. Otóż zjawisko Ramana jest efektem bardzo słabym (jeden na milion fotonów jest rozpraszany w sposób nieelastyczny). Problem ten rozwiązuje zastosowanie powierzchniowo wzmocnionej spektroskopii Ramana (SERS). Technika SERS w chwili obecnej jest dynamicznie rozwijającą się metodą coraz szerzej stosowaną w badaniach biomedycznych i analitycznych. Metoda ta wymaga obecności badanych molekuł na powierzchniach wybranych metali (głównie Ag, Au i Cu) o nanometrowych chropowatościach. W efekcie złożonych mechanizmów elektromagnetycznego i/lub chemicznego dochodzi do wzmocnienia sygnału ramanowskiego rzędu  $10^3 - 10^{14}$ , co daje możliwość obserwacji pojedynczych molekuł. Zatem poza wysoką selektywnością, technika SERS posiada również wysoką czułość. Należy podkreślić, że w płynach ustrojowych, stężenie przeciwciał i antygenów jest zazwyczaj w stężeniach pikomolowych lub mniejszych. Jest to limit detekcji możliwości do osiągnięcia w przypadku, między innymi, techniki SERS i znacznie ograniczony, lub teniemożliwy w przypadku stosowania konwencjonalnych metod detekcji. Jak wspomniano, warunkiem uzyskania wzmoczonego sygnału Ramana jest uzyskanie podłoża o odpowiedniej morfologii. Opisano wiele metod produkcji podłoża do pomiarów SERS, jednak otrzymane podłoża, w większości nie spełniają jednocześnie nie wszystkich wymogów stawianym podłożom do zastosowania biomedycznych, jak: czułość, powtarzalność i stabilność rejestrowanych sygnałów. W naszym zespole już od kilku lat trwają intensywne prace nad wytwarzaniem podłoża „sersowskich”. W proponowanym projekcie wykorzystane będą podłoża SERS, które po raz pierwszy zostały otrzymane przez nasz zespół badawczy i są przedmiotem jednych z ostatnich zgłoszeń patentowych [Patent application: P-406026 (2013)]. Są to podłoża konkurencyjne w stosunku do podłoża komercyjnego (Klarite) i mogą przyczynić się do poszerzenia diagnostyki medycznej, a szczególnie chorób immunologicznych.

Analiza biomolekuł z wykorzystaniem techniki SERS może być realizowana według dwóch schematów: bezpośrednio po detekcji. W badaniach bezpośrednio w widmie SERS analizowanych molekuł uzyskuje się bezpośrednio po umieszczeniu analitu na podłożu do pomiarów SERS. Tak strategię bezpośrednio detekcji stosujemy, w proponowanym projekcie, do badania i oznaczania jednego z immuno-markerów a mianowicie neopterinu. Podwyższony poziom neopterinu wskazuje na zmieniony stan aktywacji komórek układu odpornościowego i wiadczy o różnych chorobach, takich jak choroby autoimmunologiczne i infekcje wirusowe (wirus zapalenia włośnicy typu A, B i C, cytomegalia, odra, różyczka, grypa), zakażenia bakteryjne, choroby układu sercowo-naczyniowego, może wskazywać na odrzucenie przeszczepu i niektóre nowotwory. W naszym projekcie opracujemy nową metodę do detekcji i analizy neopterinu bazującą na spektroskopii SERS jako szybszą i bardziej czułą technikę badania poziomu tego immuno-markeru w wybranych infekcjach bakteryjnych, takich jak bakteryjne zapalenie płuc. Dodatkowo, monitorowanie stężenia neopterinu podczas oddawania krwi pozwoliłoby na wczesne wykrycie ostrej zakażenia i poprawę bezpieczeństwa transfuzji krwi.

Dla trzech wybranych cytokin (IL-6, IL-8, IL-18) ich analiza jakościowa i ilościowa będzie realizowana według bezpośrednio detekcji SERS z wykorzystaniem tzw. „Raman reporterów”, tj. molekuł, głównie barwników, dających bardzo silne sygnały ramanowskie. Obraz spektralny danego „Ramana reportera” będzie wskazywał na obecność danej cytokiny w badanym analizie. Cytokiny są jednymi z głównymi markerami diagnostycznymi w zaburzeniach układu odpornościowego. Te małe białka stanowią swoisty hormonalny układ odpornościowy w organizmie i odgrywają ważną rolę w sygnalizacji komórkowej. Podwyższone stężenia wszystkich trzech analizowanych w projekcie cytokin (interleukina IL-6, IL-8, IL-18) są obserwowane, w surowicy krwi, u pacjentek chorych na raka piersi i mogą być skorelowane z klinicznym stadium tej choroby.

Oprócz zaprezentowanych wyżej praktycznych aspektów realizowanego projektu, główny nacisk będzie jednak położony na badania podstawowe. W ramach projektu zbadamy oddziaływanie wybranych markerów immunologicznych i ich przeciwciał, zarówno w roztworach buforowych jak i płynach ustrojowych, do ustalenia optymalnych warunków tworzenia się określonych immuno kompleksów w utworych roztworach, tj. temperatury, pH i siły jonowej oraz orientacji przestrzennej immobilizowanych przeciwciał. Opracujemy nanostruktury metaliczne do badania powyższych reakcji i zoptymalizujemy je pod kątem czułości, stabilności i powtarzalności rejestrowanych sygnałów. Ponadto, opracujemy (1) metodę modyfikacji wytworzonych nanostruktur warstwami wiciowymi (2) metodę immobilizacji odpowiednich monoklonalnych przeciwciał na warstwach tiolowych i (3) metodę

syntezy nanocząstek złota modyfikowanych wybranymi znacznikami ramanowskimi i/lub przeciwciałami badanych immunomarkerów, (4) układ mikrofluidyczny zintegrowany z nanostrukturami „sersowskimi” co umożliwi jednocześnie badania i analizę ilościową i jakościową poziomu neopteryny i cytokin w badanych próbkach. Dodatkowo zbadamy poziom neopteryny w odniesieniu do zakażenia bakteryjnego płuc co pozwoli na ocenę klinicznej skuteczności proponowanej metody. Szereg technik pomiarowych dostępnych w naszym Instytucie będzie wykorzystywanych do realizacji zamierzonych planów badawczych, między innymi takie jak: mikroskopia sił atomowych (AFM), skaningowy mikroskop elektronowy (SEM), powierzchniowy rezonans plazmonowy (ang. SPR) czy dynamiczne rozpraszanie światła (DLS). Do analizy złożonych danych spektralnych (z pomiarów multipleksowych) wykorzystamy metody chemometryczne bazujące między innymi na analizie głównych składowych (ang. Principal Component Analysis).

Podsumowując, proponowany projekt zalicza się do intensywnie rozwijanej na świecie dziedziny nauki i technologii obejmującej nową platformę ("inteligentny" materiał) szczególnie do stosowania w medycynie. Rozwój technologii, w których stosowane są nanomateriały i zaawansowane materiały funkcjonalne został uznany przez Komisję Europejską za kierunek strategiczny. Nasz projekt jest ściśle związany z przedstawionym powyżej obszarem, w ramach którego opracujemy nowe materiały i metody do selektywnego rozpoznawania markerów chorób immunologicznych, mające znaczenie nie tylko czysto poznawcze ale również praktyczne. Badania prowadzone w ramach projektu pozwolą na zrozumienie procesów związanych z oddziaływaniami antygen-przeciwciało i zrozumienia złożonych interakcji między tymi cząsteczkami i strukturami plazmonicznymi. Uzyskana wiedza i wnioski mogą przyczynić się do tworzenia praktycznych prototypów. Ponadto, ze względu na możliwość zastosowania taniego, przenośnego spektrometru Ramana, który może być łatwo stosowany w warunkach klinicznych, wykazuje ogromny potencjał spektroskopii SERS w badaniach biomedycznych, również z ekonomicznego punktu widzenia.