

VILNIAUS UNIVERSITETAS
FTMC CHEMIJOS INSTITUTAS

LINA MIKOLIŪNAITĖ

POLIPIROLO TAIKYMAS BIOLOGINIAMS JUTIKLIAMS IR GYVŲ LĄSTELIŲ
MODIFIKAVIMUI

Daktaro disertacijos santrauka
Fiziniai mokslai, chemija (03P)

Vilnius 2015

Disertacija rengta 2010 – 2014 metais Vilniaus universiteto Chemijos fakultete ir Chemitso technikos universitete.

Mokslinis vadovas – prof. habil. dr. Arūnas Ramanavičius (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03 P).

Disertacija ginama jungtinėje Vilniaus universiteto ir VMTI FTMC chemijos mokslo krypties (03P) taryboje:

Pirmininkas - prof. habil. dr. Aivaras Kareiva (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P)

Nariai:

Prof. habil. dr. Rimantas Vaišnoras (Lietuvos edukologijos universitetas, fiziniai mokslai, fizika – 02P)

Prof. habil. dr. Zineb Mekhalif (Namiuro universitetas, Belgija, fiziniai mokslai, chemija – 03P)

Prof. dr. Vida Vičkačkaitė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P)

Doc. dr. Aušra Valiūnienė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P)

Disertacija bus ginama viešame Chemijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2015 m.

birželio mėn. 30 d. 14 val. Chemijos fakulteto Neorganinės chemijos auditorijoje.

Adresas: Naugarduko g. 24, LT-03225, Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2015 m. gegužės mėn. 29 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bei Fizinių ir technologijos mokslų centro bibliotekose ir VU interneto svetainėje adresu: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius.

VILNIUS UNIVERSITY
CPST INSTITUTE OF CHEMISTRY

LINA MIKOLIŪNAITĖ

APPLICATION OF POLYPYRROLE FOR BIOSENSOR DESIGN AND
MODIFICATION OF LIVING CELLS

Summary of doctoral dissertation
Physical sciences, Chemistry (03P)

Vilnius, 2015

Doctoral dissertation was prepared at Vilnius University, Faculty of Chemistry and Technical University of Chemnitz in the period of 2010 – 2014.

Scientific supervisor - Prof. habil. dr. Arūnas Ramanavičius (Vilnius University, Physical Sciences, Chemistry – 03 P).

The doctoral dissertation will be defended at joint Vilnius University and SRI CPST Doctoral Dissertation Committee in Chemistry (03P):

Chairman - Prof. habil. dr. Aivaras Kareiva (Vilnius University, Physical Sciences, Chemistry – 03 P)

Members:

Prof. habil. dr. Rimantas Vaišnoras (Lithuanian University of Educational Sciences, Physical Sciences, Physics – 02P)

Prof. habil. dr. Zineb Mekhalif (Namur University, Belgium, Physical Sciences, Chemistry – 03 P)

Prof. dr. Vida Vičkačkaitė (Vilnius University, Physical Sciences, Chemistry – 03 P)

Doc. dr. Aušra Valiūnienė (Vilnius University, Physical Sciences, Chemistry – 03 P)

The doctoral dissertation will be defended at the public meeting of Council of Scientific Field of Chemistry at 2 p.m. on June 30, 2015 in the Inorganic Chemistry lecture hall, Faculty of Chemistry.

Adress: Naugarduko st. 24, Vilnius, Lithuania.

The summary of doctoral dissertation has been mailed out on the 29th of May, 2015.

The doctoral dissertation is available for review at the libraries of Vilnius University and CPST, and on the Internet: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius.

Įvadas

Pagal pasiūlytą IUPAC terminologiją, biologinis jutiklis – tai analizinis įrenginys, kuriame pritaikyti specifiniai biocheminiai procesai, o juose dalyvauja įmobilizuoti fermentai, imunologinės sistemos, audiniai, organelės ar ląstelės. Biologiniuose jutikliuose dažniausiai naudojami elektrocheminiai, optiniai, mikrogravimetriniai ir mikromechaniniai signalų vertikliai. Šie įrenginiai pasižymi plačiomis taikymo galimybėmis tokiose srityse, kaip aplinkos stebėseną, maisto pramonę, medicina, saugumas bei gynyba. Biologinis jutiklis dažniausiai susideda iš dviejų dalių: biologinio atpažinimo elemento (savo sudėtyje turinčio biologinį komponentą) ir signalo vertiklio, pakeičiančio cheminį signalą į registruojamą elektroniškai. Pagal atpažinimo elementą biologiniai jutikliai gali būti skirstomi į fermentinius, imunologinius, nukleorūgščių ir visos ląstelės jutiklius.

Priklausomai nuo sintezės sąlygų ir legiravimo konjuguotas polimeras, pvz.: polipirolas gali pasižymėti skirtingu elektriniu laidumu (gali būti didelio efektyvumo izoliatorius arba geras laidininkas). Šio polimero dabartinės taikymo sritys apima elektronikos, fotovoltinių elementų, apsauginių sluoksnių, jutiklių ir biologinių jutiklių kryptis. Jutikliams ši medžiaga buvo pasirinkta dėl keleto priežasčių: laidumo (gali būti naudojamas kaip elektrodas ar signalo vertiklis), galimybės jį naudoti kaip pusiau pralaidžią membraną, kuri apsaugo atpažinimo elementą nuo žalingo aplinkos poveikio, tačiau leidžia analizei jį pasiekti. Be to, polipirolas, naudojant skirtingas sintezės procedūras, gali būti gaunamas įvairiausių formų ir struktūrų. Dėl minėtų priežasčių polipirolas šiame darbe buvo panaudotas kaip matrica DNR ir kofeino molekulinų išpaudų gamyboje, kurioje jis veikė ir kaip atpažinimo elementas ir kaip signalo vertiklis. Atlikus tyrimus buvo nustatyta, kaip naudojant tokią sistemą bus registruojamas analizinis signalas.

Mielų ląstelės taip pat gali būti naudojamos biologiniuose jutikliuose ir kuro elementuose, tačiau jos turi keletą trūkumų. Vienas iš jų yra elektros krūvio perdavimas iš ląstelės elektrodui. Ląstelės modifikavimas elektrai laidžiu polimeru galėtų padidinti mielės sienelės elektrinį laidumą ir taip pagerinti registruojamo signalo aptikimo ribą bei kuro elementų efektyvumą, tačiau lieka neaiški tokio modifikavimo įtaka ląstelių gyvybingumui. Dėl šių priežasčių buvo ištirtas ląstelių biologinis suderinamumas su polipirolu tiek jį naudojant kaip padėklą, tiek ir kaip medžiagą ląstelių sienelėje.

Pagrindai, ant kurių įmobilizuojamos ląstelės, yra labai svarbūs daugeliui tyrimų ir taikymų. Jutikliai, kuriuose naudojamos pavienės ląstelės gali būti naudojami labai įvairiose srityse pvz.: aplinkosaugoje bei farmacijoje. Šio jutiklio svarbiausias registruojamas signalas dažniausiai būna pačioje ląstelėje vykstantys pokyčiai, o ne jos generuojami produktai. Vienos ląstelės aptikimui ir tyrimui gali būti naudojami įvairūs metodai, tokie kaip tėkmės citometrija, potenciometrija, atominių jėgų mikroskopija ar Ramano spektroskopija. Pastarosioms dviem metodikoms ląstelių įtvirtinimo technologijos pasirinkimas yra labai svarbus veiksnys. Atominių jėgų mikroskopijai padėklas turi būti pakankamai lygus, o ląstelės pakankamai tvirtai įmobilizuotos. Ramano spektroskopijai labai svarbu, kad kiekvienas Ramano signalo fotonas patektų į detektorius. Kadangi ląstelės yra labai mažos ir lengvai peršviečiamos lazerio šviesa, matavimo metu yra registruojamas ir padėklo signalas, todėl padėklas šiems matavimams turi būti pasirenkamas labai atidžiai. Mūsų eksperimentuose Ramano spektroskopijos matavimams buvo pasirinkti keli padėklai.

Darbo tikslas:

Ištirti polipirolo savybes ir galimybes jį pritaikyti biologiniuose jutikliuose, mielių modifikavimui ir kompozitų su aukso nanodalelėmis ar fermentu kūrimui bei nustatyti skirtingų padėklų įtaką mielių ląstelių Ramano signalo intensyvumui.

Darbo uždaviniai:

1. Ištirti elektrocheminę polipirolo sintezę bei įvertinti ant auksinio elektrodo suformuoto sluoksnio stabilumą ir morfologiją.
2. Elektrochemiškai susintetinti molekuliniiais DNR įspaudais modifikuoto polipirolo sluoksnį ant grafito elektrodo naudojant du skirtingus metodus: potencialų ciklą bei potencialų impulsų sekas ir įvertinti tokių polimerų gebėjimą specifiškai atpažinti tirpale esančias DNR grandines, identišką įspaustosioms.
3. Elektrochemiškai susintetinti kofeino molekulinius įspaudus ant auksinio elektrodo ir įvertinti tokios sistemos atrankumą kofeino ir teofilino molekulėms.
4. Cheminėje polipirolo sintezėje pritaikyti aukso rūgštį bei įvertinti susidariusių Au/Ppy kompozitų dydį ir struktūrą.

5. Panaudojant fermentą gliukozės oksidazę (GOx) chemiškai susintetinti polipirolo ir GOx biokompozitus, ištirti kompozitų dydžio kitimo dinamiką laike bei įvertinti pirolo ir fermento santykį juose.
6. Palyginti pelės kaulų čiulpų kamieninių ląstelių proliferaciją ant aukso ir polipirolo sluoksnių, chemiškai susintetintų esant skirtingai monomero koncentracijai.
7. Įvertinti skirtingų paviršių: stiklo, silicio, silicio oksido, grafito ir struktūrizuoto sidabro įtaką mielių ląstelių Ramano spektroskopijai.
8. Palyginti cheminiais reagentais ar polipirolo modifikuotų mielių ląstelių paviršiaus šiurkštumą atominių jėgų mikroskopu bei įvertinti polipirolo modifikuotų ląstelių gyvybingumą.

Mokslinis naujumas:

1. Parodyta, kad elektrochemiškai, naudojant potencialų ciklą arba potencialų impulsų sekas, susintetintas polipirolas gali būti pritaikytas molekulinį DNR ir kofeino įspaudų kūrimui.
2. Panaudojant izotopų santykio masės spektrometrą nustatytas biokompozito sudedamųjų dalių (gliukozės oksidazės ir pirolo) santykis mėginyje.
3. Nustatyta, kad polipirolo sluoksnis yra biologiškai suderinamas su pelių kaulų čiulpų kamieninėmis ląstelėmis ir žymiai nepakeičia jų adhezinių savybių bei proliferacijos.
4. Parodyta, kaip padėklas, ant kurio adsorbuotos mielių ląstelės, nulemia registruojamą Ramano signalo intensyvumą ir kaip nuo pasirinkto padėklo priklauso lazerio šviesos pasiskirstymas ląstelės viduje ir aplink ją.
5. Parodyta, kad naudojant $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ sistemą mielių ląstelių sienelė ir/arba periplazma gali būti modifikuota polipirolo dariniais.

Ginamieji teiginiai:

1. Elektrocheminė polipirolo sintezė ant auksinio elektrodo vyksta formuojantis polimero „saloms“. Taip susintetintas sluoksnis yra stabilus vandeninėje terpėje, o modifikuotas kofeino arba DNR molekuliniiais įspaudais gali būti panaudojamas kofeino arba įspaustosios DNR molekulių nustatymui.

2. Aukso rūgštis gali būti panaudota pirolo polimerizacijai ir aukso nanodalelių didinimui bei polipirolo/(aukso nanodalelių) kompozitų formavimui.

3. Fermento, gliukozės oksidazės, inicijuotos cheminės polipirolo sintezės metu gautų polimero ir fermento kompozitų sudedamųjų dalių santykį galima tiksliai nustatyti naudojant stabilių izotopų masių spektrometriją.

4. Chemiškai ant auksinio elektrodo suformuotas polipirolo sluoksnis yra biologiškai suderinamas su pelės kaulų čiulpų kamieninėmis ląstelėmis ir neturi žymios įtakos jų adhezijai ant paviršiaus bei proliferacijai. Polipirolas gali būti susintetintas mielių ląstelių sienelėje ir/ar periplazmoje, smarkiai nesumažinant jų gyvybingumo.

5. Mielų ląstelių Ramano signalo intensyvumas ir lazerio šviesos intensyvumo pasiskirstymas ląstelėje priklauso nuo pasirinkto padėklo, o atominių jėgų mikroskopas suteikia galimybę išvelgti smulkius ląstelės darinius, tokius kaip dalijimosi randas ar polipirolo sankaupos.

Naudotos santrumpos

AJM – atominių jėgų mikroskopas;

AuND – aukso nanodalelės;

Au/Ppy – aukso nanodalelių ir polipirolo kompozitas;

CV – ciklinė voltamperometrija;

DNR – deoksiribonukleorūgštis;

ISMS – izotopų santykio masių spektrometrija;

IUPAC – Tarptautinė grynosios ir taikomosios chemijos sąjunga (*angl. International Union of Pure and Applied Chemistry*);

KKMS – kvarco kristalo mikrosvarstyklės;

MIPpy – polipirolo sluoksnis su molekuliniais įspaudais;

MIPpy-CV – polipirolo sluoksnis su molekuliniais įspaudais, gautas ciklinės voltamperometrijos metodu;

MIPpy-PPS – polipirolo sluoksnis su molekuliniais įspaudais, gautas potencialų impulsų sekos metodu;

NAD(P)⁺ – nikotinamido adenino dinukleotido fosfato jonas;

NAD(P)H – nikotinamido adenino dinukleotido fosfatas;

NIPpy – polipirolo sluoksnis be molekulinį įspaudų;

NIPpy-CV – polipirolo sluoksnis be molekulinį įspaudų, gautas ciklinės voltamperometrijos metodu;

NIPpy-PPS – polipirolo sluoksnis be molekulinį įspaudų, gautas potencialų impulsų sekos metodu;

PBS – fosfatinis buferis;

Py – pirolas;

PMOR – plazminės membranos oksido-reduktazės;

Ppy – polipirolas;

PPS – potencialų impulsų sekos metodas;
RMS – vidutinis paviršiaus šiurkštumas (*angl. root mean square*);
SEM – skenuojantis elektroninis mikroskopas;
SERS – paviršiaus sustiprinta Ramano mikroskopija;
Trp – triptofanas.

Disertacijos sandara

Disertacija parašyta anglų kalba ir turi šias sudedamąsias dalis: įvadas, literatūros apžvalga, medžiagos, metodika ir prietaisai, rezultatai ir jų aptarimas, išvados, su disertacija susijusių mokslinių darbų sąrašas, disertantės gyvenimo aprašymas, naudotos literatūros sąrašas.

Įvadas

Įvade aprašytas disertacinio darbo aktualumas šiuolaikiniame moksliniame kontekste, pabrėžiant biologinius jutiklius ir polipirolą. Pažymimas polipirolo įvairiapusiškumas ir išskirtinės savybės, dėl kurių jis buvo pasirinktas molekulių įspaudų gamyboje bei mielių modifikavimui. Taip pat paminėta padėklo įtaka Ramano spektroskopijai bei atominių jėgų mikroskopijai.

1. Literatūros apžvalga

Literatūros apžvalgoje pateikiama biologinių jutiklių apžvalga, išsamus polipirolo savybių bei sintezės aprašymas, jo taikymai jutiklių technologijose. Literatūros apžvalgą sudaro 6 skyriai: biologinių jutiklių apžvalga, polipirolo sintezė ir savybės, molekuliniai įspaudai, mielių ir pelių kamieninių ląstelių aprašymai bei Ramano spektroskopijos panaudojimas ląstelių tyrimams. Polipirolą aprašantis skyrius dar skiriamas į istorinę apžvalgą, optines bei elektrochemines polimero savybes, polimerizacijos mechanizmo aprašymą bei šio polimero taikymus.

2. Metodika

Šį skyrių sudaro keturios dalys: naudotų reagentų sąrašas (2.1. skyrius), bandinių ruošimo metodikos (2.2. skyrius), naudota mokslinė įranga (2.3. skyrius) ir kompiuterinių simuliacijų aprašymas (2.4. skyrius). Bandinių ruošimo metodikos yra suskirstytos į kelis poskyrius: 2.2.1. ir 2.2.2. poskyriai skirti cheminei polipirolo sintezei, atitinkamai naudojant aukso rūgštį su aukso nanodalelėmis bei fermentą gliukozės oksidazę. 2.2.3. poskyryje aprašoma cheminė ir elektrocheminė polipirolo sintezė ant

auksinio elektrodo, kurio metu buvo stebima elektrocheminė polipirolo susidarymo eiga bei tiriamas jo biologinis suderinamumas. 2.2.4. aprašo, kaip buvo pagaminti polipirolo molekuliniai įspaudai, skirti kofeino ir DNR molekulių nustatymui. 2.2.5. poskyryje pateikiamos metodikos kamieninių ir mielių ląstelių auginimui, paruošimui matavimams bei modifikavimui polipirolo. 2.3. skyrius skirtas naudotos mokslinės įrangos aprašymui.

Paviršiaus analizės metodai: atominių jėgų mikroskopai (Bioscope Catalyst (Bruker, JAV) ir 5420 (Agilent Technologies, JAV)), skenuojantys elektroniniai mikroskopai (SU-70 (Hitachi, Japonija), ZEISS (Oberkochen, Vokietija), NovaNanoSEM 200 (FEI, JAV)).

Optiniai metodai: UV-Vis spektrofotometras (Lambda 25 (PerkinElmer, JAV)), dinaminės sklaidos matuoklis (Zetasizer Nano ZS (Malvern, Vokietija)), optinis mikroskopas (TE2000U (Nikon, Japonija)), Ramano mikroskopas (LabRam HR800 (HORIBA, Prancūzija)).

Elektrocheminiai metodai: potenciostatas-galvanostatas (PGSTAT 30 (Echochemie, Olandija)), kvarco kristalo mikrosvarsyklės (RQCM (Maxtek, JAV) su potenciostatu (Reference 600TM (Gamry, JAV)).

Izotopų santykio masių spektrometras (Thermo delta plus advantage (Thermo scientific, JAV)) sujungtas su elementų analizatoriumi (Flash EA1112 (Thermo scientific, JAV)).

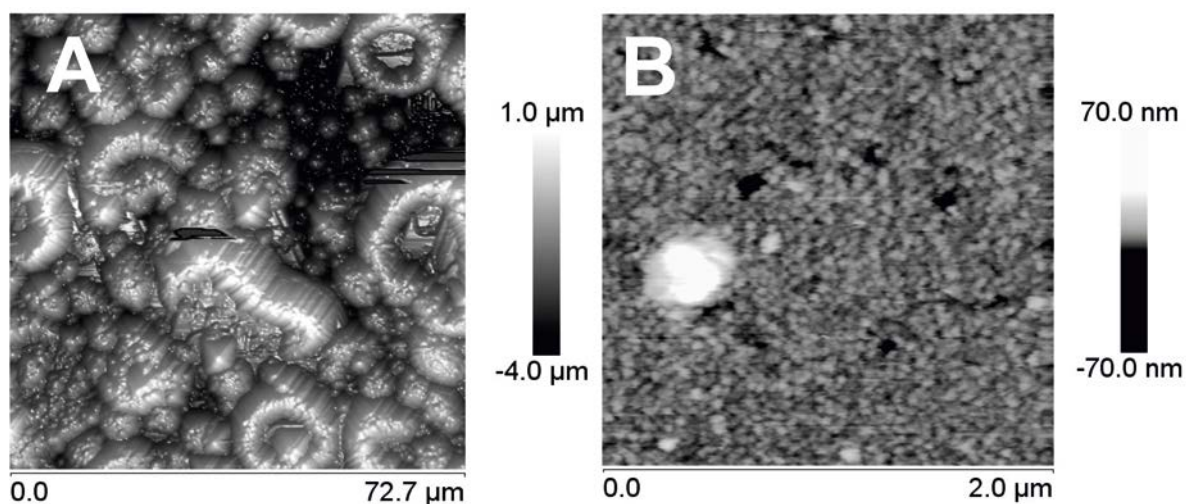
2.4. skyriuje aprašomi lazerio šviesos skaitmeninėms simuliacijoms taikyti parametrai.

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

Ši dalis sudaryta iš penkių skyrių. Pirmame skyriuje aprašoma elektrocheminė pirolo polimerizacija, nustatomas susintetinto sluoksnio stabilumas ant elektrodo paviršiaus. Antrame skyriuje susintetinti sluoksniai pritaikomi DNR ir kofeino molekulinių įspaudų jutiklių gamybai. Trečiame skyriuje pateikiama cheminė polipirolo sintezė, kurios metu gaunami kompozitai su aukso nanodalelėmis arba fermentu gliukozės oksidaze. Ketvirtame skyriuje patikrintas chemiškai susintetinto polipirolo biologinis suderinamumas su pelės kaulų čiulpų kamieninėmis ląstelėmis, o penktame skyriuje aprašoma mielių ląstelių tyrimai atominių jėgų mikroskopu bei Ramano spektroskopu ir ląstelių modifikavimas polipirolo dariniais.

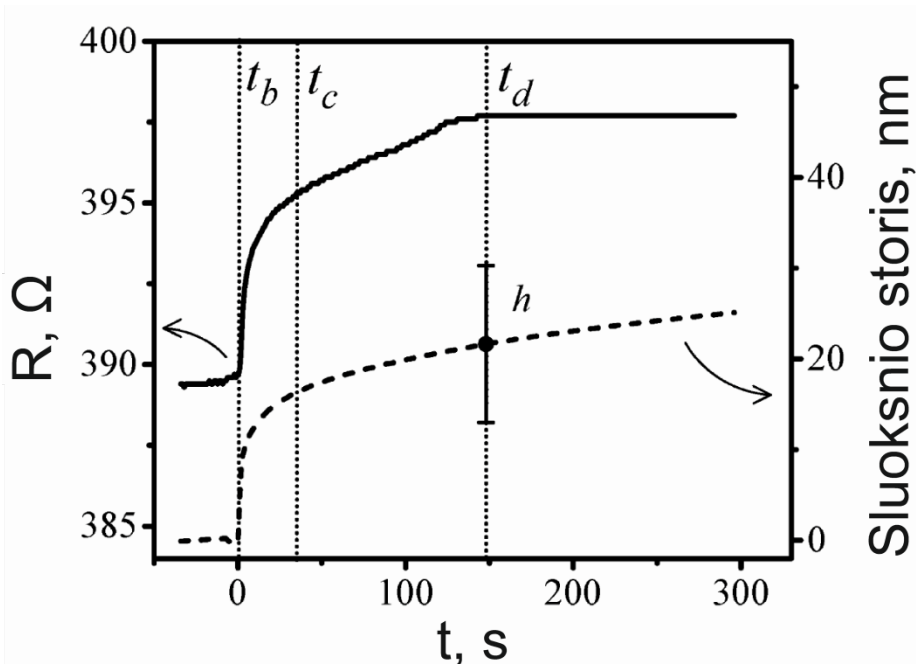
3.1 Elektrocheminė polipirolo sintezė ir sluoksnio stabilumo tyrimas

Peroksiduotas polipirolo sluoksnis buvo susintetintas ant auksinio elektrodo naudojant dvi skirtingas monomero koncentracijas 50 ir 500 mM. Gautų sluoksnių morfologija ištirta atominių jėgų mikroskopu ir nustatyta, kad naudojant 10 kartų didesnę koncentraciją gaunamas šiurkštesnis paviršius su toroido formos struktūromis (Pav. 1 A). Nustatytas sluoksnio storis buvo intervale nuo 1 iki 3 μm . Tuo tarpu naudojant mažesnę (50 mM) pirolo koncentraciją buvo gautas žymiai lygesnis sluoksnis (Pav. 1 B). Suskaičiuotas paviršiaus šiurkštumas $\text{RMS} = 790 \text{ nm}$, naudojant 500mM, ir $\text{RMS} = 2,61 \text{ nm}$ naudojant 50 mM koncentraciją.



Pav. 1 Polipirolo sluoksnis, susintetintas naudojant dvi skirtingas monomero koncentracijas: A) 500 mM, aukščio skalė 5 μm , nuskenuoto lauko plotas 72,7x72,7 μm^2 , B) 50 mM, aukščio skalė 140 nm, nuskenuoto lauko plotas 2,0x2,0 μm^2 .

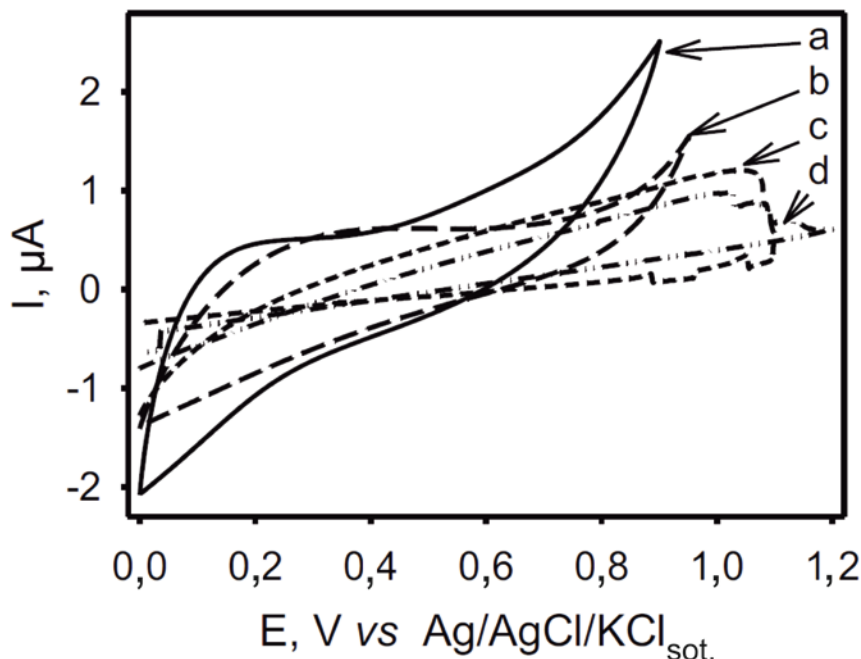
Naudojant kvarco kristalo mikrosvarstyklės (KKMS) buvo suformuotas polimero sluoksnis ant auksinio elektrodo, visu formavimo metu stebint dviejų parametru: rezonansinio dažnio (Δf) ir varžos (R) kitimą. Buvo pastebėta, kad polimero formavimasis vyksta dviem etapais (Pav. 2). Pirmiausia pastebimas greitas varžos kitimas (8.5Ω per 150 s nuo sluoksnio formavimo pradžios, arba per laiką nuo 1 iki 15 impulso), kuris vėliau sulėtėja (0.2Ω per tolimesnes 150 s). Stebimas reiškinys gali būti paaiškinamas polipirolo formavimosi proceso lėtėjimu. Kol visas elektrodas yra laisvas, pirolas micelių pavidalu (pagal dinaminės šviesos sklaidos duomenis micelių dydis yra 80 nm) adsorbuojasi netolygiai ant elektrodo formuodamas polimero „salas“ (Pav. 2 nuo t_b iki t_c) ir stipriai keičia svarstyklių matuojamus parametrus, vėliau „salos“ susijungia į monosluoksnį (Pav. 2 nuo t_c iki t_d) ir galiausiai formuojama daugiasluoksnė struktūra, kuri jau mažai keičia KKMS matuojamus parametrus (Pav. 2 nuo t_d ir toliau).



Pav. 2 KKMS elektrodo varžos ir polipirolo sluoksnio storio kitimo priklausomybė nuo polimerizacijos laiko. Varža buvo tiesiogiai matuojama KKMS, o sluoksnio storis buvo gautas skaičiuojant iš Sauerbray lygties ir užregistruoto Δf . Polipirolo tankis buvo rastas literatūroje ir lygus $1,25 \text{ g cm}^{-3}$.

Polipirolo sluoksnio ant auksinio elektrodo stabilumo tyrimas buvo atliekamas naudojant ciklines poliarizacijos kreives keturiuose skirtinguose intervaluose (0,0-1,2 V; 0,0-1,1 V; 0,0-0,95 V ir 0,0-0,9 V prieš $\text{Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ elektrodą) (Pav. 3). Srovės nestabilumas buvo registruojamas tuomet, kai potencialo vertė viršijo 1,0 V, o polipirolo

sluoksnis nuo auksinio elektrodo buvo pašalinamas po 10 ciklų. Po polipirolo pašalinimo buvo stebimas ir auksinio elektrodo elektrochemiškai aktyvaus ploto sumažėjimas.



Pav. 3 Auksinio elektrodo, padengto polipirolo sluoksniu ciklinė voltamperograma 4-riuose skirtinguose intervaluose: a) 0,0-0,9 V, b) 0,0-0,95 V, c) 0,0-1,1 V, d) 0,0-1,2 V prieš Ag/AgCl/KCl_{sot.} elektrodą. Potencialo skleidimo greitis 20 mV/s, tyrimas atliktas PBS buferyje.

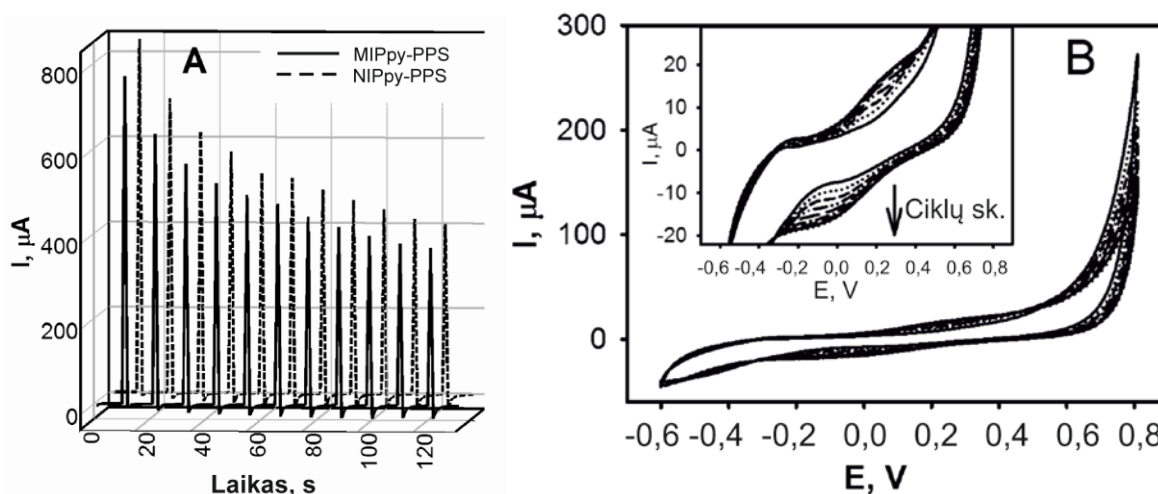
3.2 Polipirolo sluoksnio modifikavimas molekuliniais įspaudais

Šiame skyriuje aprašyta kaip polipirolas buvo modifikuojamas molekuliniais įspaudais. Pirmiausia Ppy modifikuotas DNR molekuliniais įspaudais buvo dviem skirtingais metodais (potencialų impulsų sekos ir ciklinės voltamperometrijos) suformuotas ant grafito elektrodo. Tuomet palyginta specifinė ir nespecifinė DNR molekulės kaip analitės sąveika su modifikuotu ir nmodifikuotu molekuliniais įspaudais polipirolu. Vėliau, pasirinkus potencialų impulsų sekos metodą, buvo suformuoti kofeino molekuliniai įspaudai ir ištirta jų sąveika su kofeinu bei jo homologo teofilinu.

3.2.1 Molekuliniai įspaudai DNR nustatymui

DNR molekuliniai įspaudai buvo suformuoti taikant dvi metodikas. Naudojant potencialų impulsų seką buvo pastebėta, kad su kiekvienu impulsu registruojamas pratekančios srovės sumažėjimas (Pav. 4 A). Šis reiškinys gali būti paaiškinamas laidumo kitimu ant elektrodo dėl vis storėjančio polimero sluoksnio. Srovės mažėjimas buvo vienodai stebimas tiek formuojant elektrodą su molekuliniais įspaudais, tiek ir be jų. Ciklinės voltamperometrijos būdu formuotų molekulinį įspaudų ir polipirolo

sluoksniu be įspaudų ciklinės kreivės irgi nesiskyrė tarpusavyje (Pav. 4 B). Jose buvo galima išvelgti dvi oksidacijos ir redukcijos kreives (ties 0,2 V ir – 1,15 V). Suformuotų sluoksnių šiurkštumas buvo vertinamas atominių jėgų mikroskopu. Žymaus skirtumo nebuvo užfiksuota. MIPpy-PPS vidutinės struktūros buvo 0,55 μm dydžio, o MIPpy-CV – 0,75 μm .

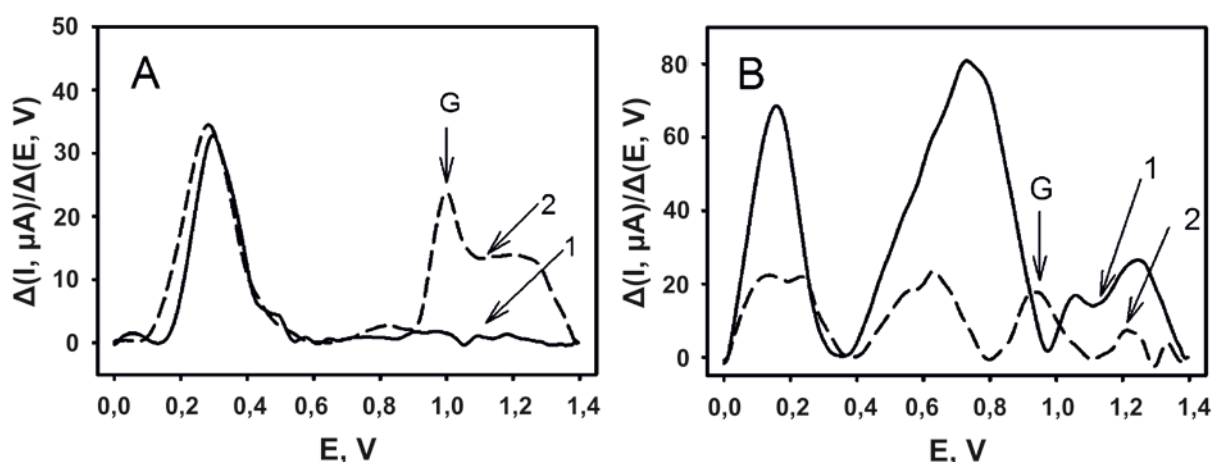


Pav. 4 Amperometriniai signalai, registruoti A) elektrochemiškai formuojant polimero sluoksnį su molekuliniiais įspaudais (MIPpy-PPS) ir be (NIPpy-PPS) potencialų impulsų sekos metodu; B) elektrochemiškai ciklinės voltamperometrijos būdu formuojant polipirololo sluoksnį be molekulinių įspaudų.

Skirtingais metodais gautų elektrodų su molekuliniiais įspaudais sąveika su tiksline DNR buvo registruojama naudojant diferencinę impulsinę voltamperometriją. Jos metu registruota guanino oksidacijos smailė, iš kurios intensyvumo buvo sprendžiama apie vykusią sąveiką. Buvo pastebėti žymūs skirtumai tarp MIPpy ir NIPpy modifikuotų elektrodų. Ant NIPpy struktūrų dvigrandė DNR galėjo adsorbuotis tik nespecifiškai. Iš gautų rezultatų buvo nustatyta, kad ties 1,0 V esančios smailės intensyvumas MIPpy ir NIPpy skyrėsi daugiau nei 20 kartų, kas leidžia teigti, jog nespecifinė sąveika tarp Ppy ir DNR yra pakankamai maža, kad būtų galima patikimai užregistruoti specifinę sąveiką (Pav. 5 A).

Ciklinės voltamperometrijos būdu modifikuotų elektrodų su molekuliniiais įspaudais ir be jų tyrimai parodė, kad aiški guanino oksidacijos kreivė yra būdinga tik elektrodams, turintiems molekulinius įspaudus, tačiau naudojant NIPpy-CV elektrodą gauta kreivė (Pav. 5 B) pasižymėjo keletu kitų smailių, kurios gali daryti įtaką analiziniam signalui ir apsunkina rezultatų vertinimą. Be to, sintezės metu molekulinius įspaudus kuriant ciklinės voltamperometrijos metodu, nebuvo pakankami laiko

intervalai, leidžiantys atsinaujinti monomero koncentracijai ties elektrodo paviršiumi. Dėl šių priežasčių PPS metodas yra labiau tinkamas molekulinų įspaudų formavimui nei ciklinės voltamperometrijos metodas.

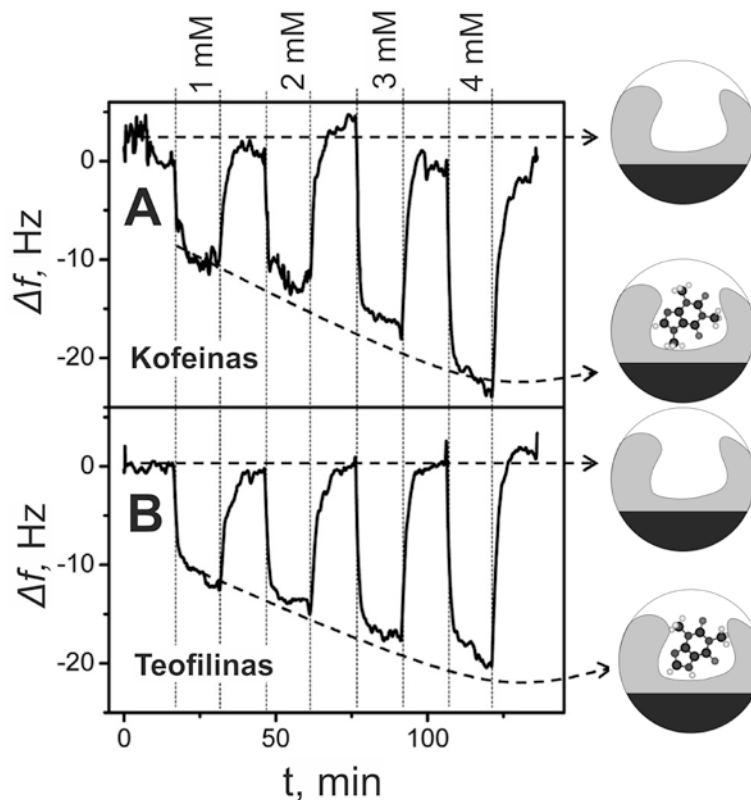


Pav. 5 MIPpy ir NIPpy modifikuotų elektrodo diferencinės impulsinės voltamperogramos (pavaizduotos kreivės gautos atėmus analizinį signalą prieš inkubaciją iš po elektrodo inkubacijos užregistruoto signalo). A) NIPpy-PPS (1) ir MIPpy-PPS (2); B) NIPpy-CV (1) ir MIPpy-CV (2). G – guanino oksidacijos smailė esant 1,0 V potencialui.

3.2.2 Molekuliniai įspaudai kofeino nustatymui

Du ksantino dariniai buvo pasirinkti tolimesniems molekulinų įspaudų formavimo polipirole tyrimams. Kofeinas ir teofilinas yra labai panašios molekulės, besiskiriančios tik vienu $-CH_3$ radikalų, todėl labai svarbu išsiaiškinti, ar molekuliniai įspaudai yra jautrūs tokiems mažiems analitės struktūriniais pokyčiams. Polipirole modifikuoto molekuliniais įspaudais sluoksnis buvo suformuotas naudojant potencialų impulsų sekos metodiką ant auksinio elektrodo, naudojant kvarco kristalo mikrosvarstyklės.

Pridedant skirtingą kofeino ir teofilino kiekį buvo registruojamas KKMS elektrodo rezonansinio dažnio pokytis (Pav. 6). Iš registruotų gradacijos kreivių buvo pastebėta, kad ant elektrodo suformuotas Ppy modifikuoto molekuliniais įspaudais sluoksnis yra jautresnis kofeinui nei teofilinui. Iš gautų duomenų buvo apskaičiuotos asociacijos ir disociacijos konstantos: kofeinui $k_{a_kof} = 30,6 \cdot 10^{-2} M^{-1}s^{-1}$, $k_{d_kof} = 3,6 \cdot 10^{-3} s^{-1}$ ir teofilinui $k_{a_teof} = 3,18 \cdot 10^{-2} M^{-1}s^{-1}$, $k_{d_teof} = 2,1 \cdot 10^{-3} s^{-1}$. Atitinkamai buvo suskaičiuotos ir disociacijos pusiausvyros konstantos $K_{D_kof} = 1,17 \cdot 10^{-2} M$, $K_{D_teof} = 6,6 \cdot 10^{-2} M$. Palyginus šiuos duomenis buvo gauta, kad teofilino sąveika su MIPpy yra 5,6 karto mažesnė nei kofeino. Tai reiškia, kad kofeino molekulės pasižymi didesniu afiniškumu molekuliniams įspaudams nei teofilino molekulės.



Pav. 6 Kvarco kristalo mikrosvarstyklių aukso elektrodo su molekuliniais įspaudais rezonansinio dažnio pokytis (Δf , Hz) keičiant kofeino (viršutinis grafikas) ir teofilino (apatinis grafikas) koncentracijas. Tyrimų sąlygos: 50 mM PBS, pH 7,0, analitės koncentracija kito nuo 1 mM iki 4 mM.

3.3 Cheminė polipirolų sintezė

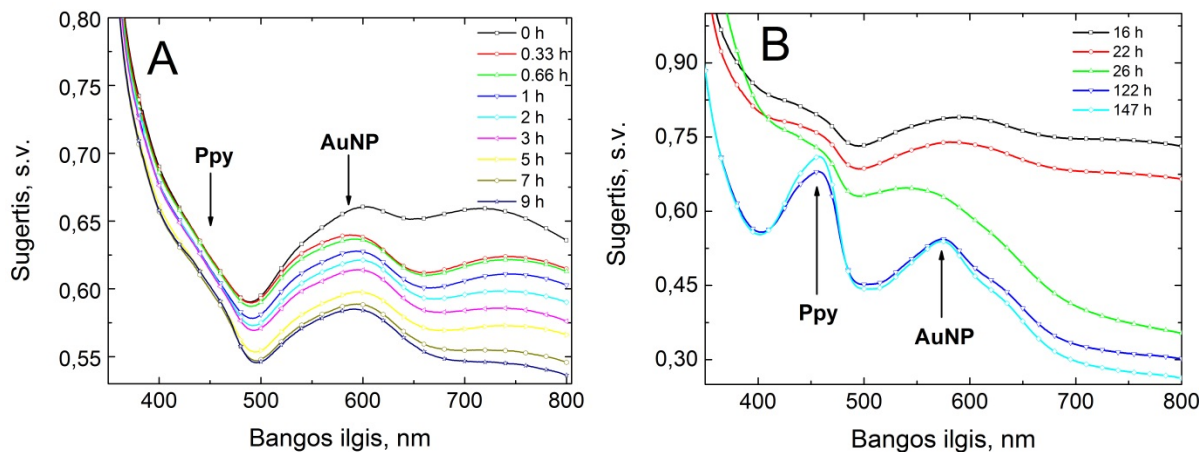
Šiame skyriuje aprašoma polipirolų kompozitų su aukso nanodalelėmis ir fermentu, gliukozės oksidaze, sintezės eiga. Taip pat buvo nustatytas fermento ir polipirolų monomero santykis susidariusiame kompozite.

3.3.1 Polipirolų ir aukso nanodalelių kompozitų sintezė

Šių tyrimų metu buvo gautas polimero ir aukso nanodalelių kompozitas. Jo susidarymas buvo stebimas spektrofotometriškai, registruojant tiek polipirolų (460 nm), tiek ir aukso nanodalelių (~530 – 570 nm) sugerties smailes (Pav. 7).

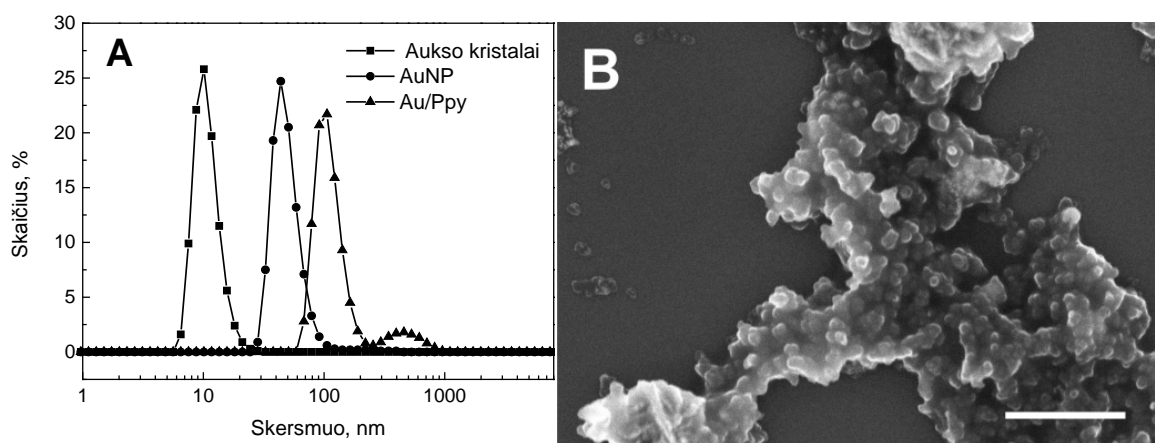
Buvo nustatyta, kad polimero formavimosi metu aukso nanodalelių sugerties smailė pasislenka į ilgesnių bangų pusę, kas rodo nanodalelių augimą greičiausiai dėl aukso rūgšties redukcijos iš Au^{+3} į Au^0 . Tuo tarpu polipirolų sugerties smailė pradeda kilti po 7 val. nuo tyrimo pradžios, o aiškiai matoma tampa nuo 26 val. Tuo pačiu metu ženkliai sumažėja tirpalo sklaida dėl sumažėjusio pirolų micelių kiekio, kurios neturi

charakteringos sugerties juostos regimajame spektre, tačiau dėl susidariusių lūžio rodiklių skirtumų sklaido šviesą. Šie tyrimai buvo atlikti su 4 skirtingomis monomero koncentracijomis (50, 100, 200 ir 400 mM), tačiau žymaus rezultatų skirtumo nebuvo pastebėta.



Pav. 7 Aukso nanodalelių ir polipirola kompozito UV-Vis sugerties spektras, polimerizacijai vykstant: A) nuo 0 iki 9 val., B) nuo 16 iki 147 val. Pradinė monomero koncentracija buvo 200 mM.

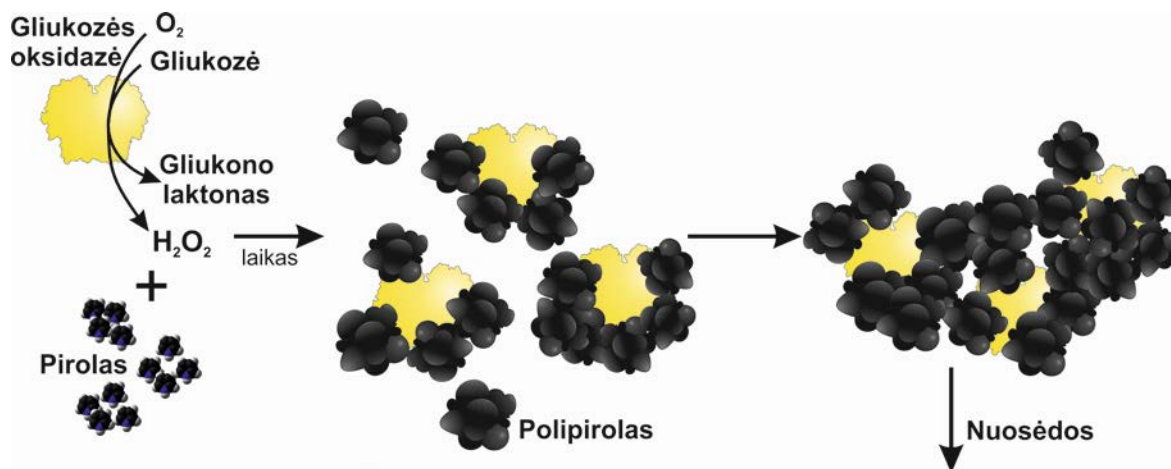
Susidariusių kompozitų dydis buvo ištirtas dinaminės šviesos sklaidos metodu bei skenuojančiu elektroniniu mikroskopu. Buvo nustatyta, kad susidarę kompozitai yra nehomogeniški, intervale nuo 111 – 479 nm. Iš gautų SEM vaizdų kompozitų dydį įvertinti buvo sudėtinga dėl jų aglomeracijos mėginio paruošimo matavimams metu.



Pav. 8 A) Dalelių dydžių, išmatuotų dinaminės šviesos sklaidos metodu, tirpale pasiskirstymas: aukso kristalų užuomazgos (pradinis tirpalas) – kvadratėliai; aukso sėklos po laikymo aukso rūgšties tirpale – apskritimai, aukso nanodalelių ir polipirola kompozitai – trikampiai. B) Aukso nanodalelių su polipirolu kompozito ant silicio padėklo skenuojančios elektroninės mikroskopijos vaizdas. Balta juostelė atitinka 500 nm.

3.3.2 Fermento/polipirola biokompozitų sintezė ir tyrimas

Šiame skyriuje aprašomi susintetinti biokompozitai, sudaryti iš fermento gliukozės oksidazės bei polipirola. Izotopų santykio masių spektrometrijos metodu (ISMS) buvo ištirtas šių kompozitų sudedamųjų dalių santykis. Biokompozitų sintezė vyksta fermento dėka. Tirpale esantis fermentas savo aktyviajame centre verčia gliukozę ir deguonį į gliukono laktoną bei vandenilio peroksidą. Gliukono laktonas vandenyje virsta į gliukono rūgštį, taip sukurdamas rūgštinę aplinką, o susidaręs vandenilio peroksidas veikia kaip oksidatorius. Abu šie veiksniai lemia polimero sintezę netoli fermento (Pav. 9). Biokompozitų augimas buvo stebimas naudojant dinaminės šviesos sklaidos bei spektrofotometrinių metodus. Iš gautų duomenų nustatyta, kad fermento kiekis tirpale sąlyginai mažėja, o susidariusių biokompozitų daugėja, tačiau jų dydis yra labai nepastovus ir kinta intervale nuo 300 iki 700 nm. Iš spektrofotometrinių duomenų taip pat buvo nustatyta, kad šiam kompozitui susidaryti optimali monomero koncentracija yra 100 mM. Susiformavusių biokompozitų dydis buvo įvertintas AJM ir SEM metodikomis. Nors biokompozitai buvo sulipę džiovinimo proceso metu, tačiau buvo matyti, kad jie sudaryti iš smulkių struktūrų.



Pav. 9 Pirola polimerizacijos schema: fermentas gliukozės oksidazė esant deguonies ir gliukozės išskiria vandenilio peroksidą ir gliukono laktoną. Dėl rūgštinės terpės ir esančio H₂O₂ šalia fermento vyksta polimerizacijos reakcija ir fermentas yra įterpiamas į polimero sluoksnį. Pasiiekus tam tikrą kompozito dydį pradeda sėsti nuosėdos.

Izotopų santykio masių spektrometrijos tyrimams pirmiausia anglies ir azoto izotopų santykiai buvo nustatyti pradinėms medžiagoms. Pagal gautus rezultatus iš dviejų galimų fermentų buvo pasirinktas vienas – Applichem gamintojo, kadangi jo izotopų santykis žymiai skyrėsi nuo kitų tirpale naudojamų medžiagų – pirola ir gliukozės. Ištyrus biokompozitus buvo nustatyta, kad centrifugate yra daug likusios

gliukozės, nepolimerinto pirola ir gliukono laktono, tačiau dalelėse, ypač po plovimo distiliuotu vandeniu, izotopų santykis žymiai skyrėsi. Iš gautų duomenų buvo suskaičiuotas pirola ir fermento molekulių santykis biokompozite. Pagal anglies izotopus buvo nustatyta, kad 150 molekulių pirola tenka vienai fermento molekulei, tačiau skaičiuojant pagal azoto izotopų santykį buvo nustatyta 710 – 1970 pirola molekulių tenka vienai fermento molekulei. Šis rezultatų neatitikimas gali būti aiškinamas tuo, jog išplautose dalelėse vis dar buvo likę šiek tiek gliukozės ar gliukono laktono, kas iškreipė gautus rezultatus. Be to, skaičiavimams įtakos galėjo turėti ir tai, kad fermente yra labai daug anglies molekulių palyginti su jų skaičiumi pirola molekulėje. Šie skirtumai galėjo iškreipti matavimų duomenis, dėl to dalies matavimų net nebuvo galima apskaičiuoti.

Lentelė 1 Biokompozito ir centrifugato, gauto nucentrifugavus sintezės tirpalą, lengvųjų izotopų $\delta^{13}\text{C}$ ir $\delta^{15}\text{N}$ vertės, nustatytos ISMS. Simboliai „p“ reiškia, kad biokompozitas buvo plautas distiliuotu vandeniu, f_1 – pirola dalis; f_2 – fermento dalis; Py skaičius – apskaičiuotas biokompozitą sudarančių pirola molekulių skaičius, tenkantis vienai fermento molekulei, n/d – reiškia, kad pagal anglies izotopus nustatyti pirola molekulių skaičių buvo neįmanoma dėl mažesnės išmatuotos $\delta^{13}\text{C}$ izotopo vertės lyginant su pradine fermento išmatuota verte.

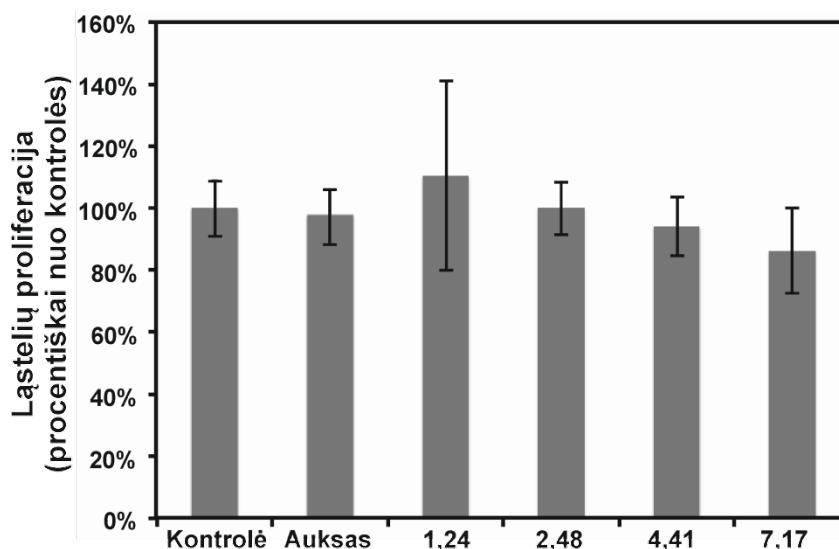
		$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	C/N santykis	Pagal anglies izotopus			Pagal azoto izotopus		
					f_1	f_2	Py skaičius	f_1	f_2	Py skaičius
Biokompozitas	1p	-21,9	-5,7	---	0,17	0,83	150	0,47	0,53	710
	2p	-24,6	-5,2	3,7	n/d	n/d	n/d	0,51	0,49	830
	3p	-24,4	-2,3	3,96	n/d	n/d	n/d	0,29	0,71	1970
	4	-19,3	-5,0	18,1	0,39	0,61	460	0,52	0,48	850
Centrifugatas	1	-14,0	2,1	9,7						
	2	-18,5	2,6	10,2						

3.4 Polipirola biologinio suderinamumo su pelės kaulų čiulpų kamieninėmis

ląstelėmis tyrimas

Šiame skyriuje chemiškai susintetintas pirolas buvo nusodintas ant auksinio lusto ir palyginta, ar jo sluoksnis turi įtakos kamieninių ląstelių įsitvirtinimui ant paviršiaus bei jų proliferacijai. Kadangi kamieninės ląstelės yra labai jautrios įvairiems aplinkos pokyčiams jos ir buvo pasirinktos polipirola biologinio suderinamumo vertinimui. Trijų skirtingų paviršinių koncentracijų polipirola sluoksniai buvo suformuoti ant aukso

paviršių. Iš SEM ir optinio mikroskopo vaizdų pastebėta, kad polipirolas pasidengia ne tolygiai, o sudarydamas įvairias struktūras. AJM metodas buvo naudojamas įvertinti susidariusios plėvelės storį. Buvo nustatyta, kad $7,17 \text{ mg/cm}^2$ polipirola sudaro maždaug 600 nm storio sluoksnį. Ant tokių paviršių nusodintos ląstelės išlaikė sau būdingą struktūrą ir fibroblastams būdingą morfologiją.



Pav. 10 Pelės kaulų čiulpų kamieninių ląstelių proliferacija ant įprastos auginimo lėkštelės (kontrolė), švaraus auksinio paviršiaus (Auksas) ir ant 1,24, 2,48, 4,41 bei 7,17 mg/cm^2 polipirola sluoksnių, per 48 val. chemiškai nusodintų ant auksinių paviršių.

Ląstelių proliferacija buvo vertinama po 48 val. ir lyginama su kontroliniais mėginiais (jie buvo laikomi 100 %). Kaip pastebėta iš gautų duomenų, maža polipirola paviršinė koncentracija ($1,24 \text{ mg/cm}^2$) pagerino ląstelių proliferaciją 10 %, kai tuo tarpu didžiausia polipirola paviršinė koncentracija ($7,17 \text{ mg/cm}^2$) proliferaciją sumažino 14 %. Iš gautų duomenų buvo nustatyta, kad polipirola sluoksnis nepasižymi toksiniu poveikiu ir smarkiai nepakeičia ląstelių prisitvirtinimo prie paviršiaus bei jų proliferacijos.

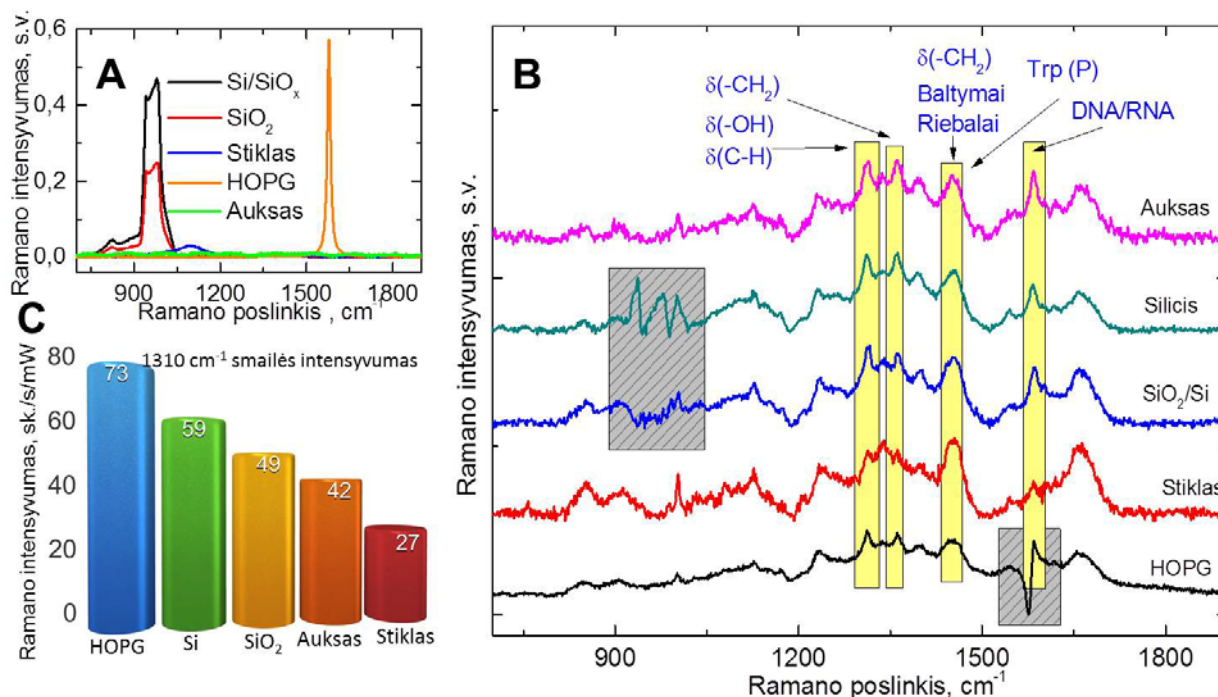
3.5 Padėklų, skirtų modifikuotų ir nemonifikuotų mielių ląstelių tyrimams, parinkimas

3.5.1 Padėklo įtaka mielių ląstelių Ramano spektrui

Mielių ląstelių tyrimams Ramano mikroskopijos metodu buvo pasirinkti keli skirtingi padėklai: aukso, silicio, silicio oksido, grafito, stiklo ir struktūrizuoto sidabro. Mielių ląstelių charakteringas spektras buvo stebėtas intervale nuo 800 iki 1800 cm^{-1} . Buvo nustatyta, kad keli padėklai (silicio, silicio oksido, grafito) turi savo charakteringus

spektrus tame intervale, todėl gali trukdyti tam tikrų mielių būdingų smailių registravimui (Pav. 11 A).

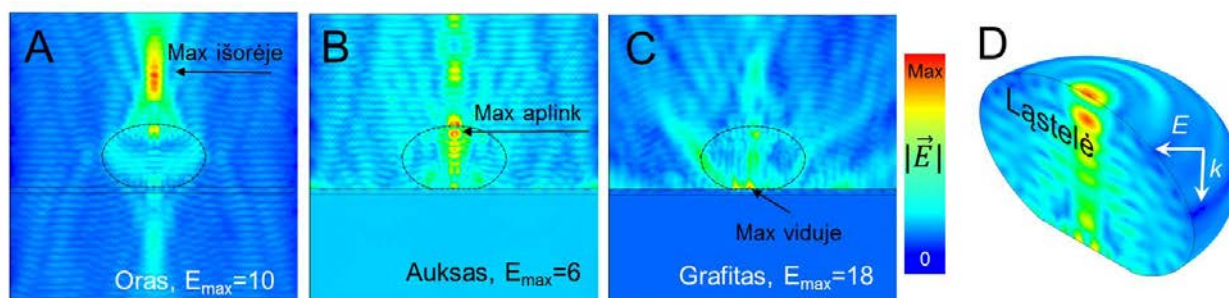
Jei dominančios smailės nėra uždengiamos padėklų generuojamais spektrais, tuomet intensyviausias mielių spektras yra stebimas, kai jos būna užneštos ant grafito. Kiti padėklai pagal signalo intensyvumo mažėjimą išsidėsto tokia tvarka: silicis, silicio oksidas, auksas ir galiausiai stiklas (Pav. 11 C). Stebėtas rezultatas gali būti siejamas su padėklų savybėmis, pavyzdžiui gebėjimu atspindėti šviesą. Stiklas – vienintelis peršviečiamas padėklas, taigi dalis šviesos, o tuo pačiu ir Ramano fotonų yra prarandama. Kad įsitikinti šios prielaidos teisingumą, buvo išmatuota padėklų elastinė Relėjaus sklaida ir nustatytas jų eiliškumas atspindžio intensyvumo mažėjimo tvarka: $Au > HOPG > Si > SiO_2 >$ stiklas, tačiau gauti rezultatai ne visiškai atitiko Ramano signalo intensyvumo rezultatus.



Pav. 11 A) Penkių mielių ląstelių tyrimams naudotų padėklų Ramano spektrai: Si/SiO_x – silicis su savaiminiu 2 – 3 nm oksido sluoksniu, SiO₂ – ant silicio suformuotas 100 nm storio oksido sluoksnis, stiklas, HOPG – grafitas ir auksas. Matavimams naudotas 514,5 nm, 2 mW galios lazerinis šviesos šaltinis. B) Mielų ląstelių spektras ant skirtingų padėklų. Pilkos vietos žymi padėklo spektro padėtis (pats spektras yra atimtas). Trp – triptofano sugertiems zona. C) smailės, esančios 1310 cm^{-1} , intensyvumo priklausomybė nuo pasirinkto padėklo.

Taip pat buvo pastebėta, kad kelios smailės ant skirtingų padėklų yra santykinai skirtingo intensyvumo (pvz.: 1584 ir 1450 cm^{-1}). Ant vieno padėklo, pvz.: stiklo, jos yra visai neintensyvios, palyginti su kitomis smailėmis, o ant kito padėklo, pvz.: aukso, jos

yra labai intensyvos (Pav. 11 B). Taip gali būti dėl to, kad ant atspindinčių padėklų dalis šviesos yra nukreipiama atgal per ląstelę ir taip sužadinama daugiau Ramano fotonų, nei šviesai einant vieną kartą, tačiau tai nėra pakankamas paaiškinimas. Dėl šios priežasties buvo atlikta kompiuterinė simuliacija ir nustatyta, kaip elgiasi šviesa, patekusi į mielės ląstelę ant skirtingų padėklų (Pav. 12). Simuliacijai buvo naudotas toks pats šviesos bangos ilgis, kaip ir Ramano signalui gauti (515 nm).

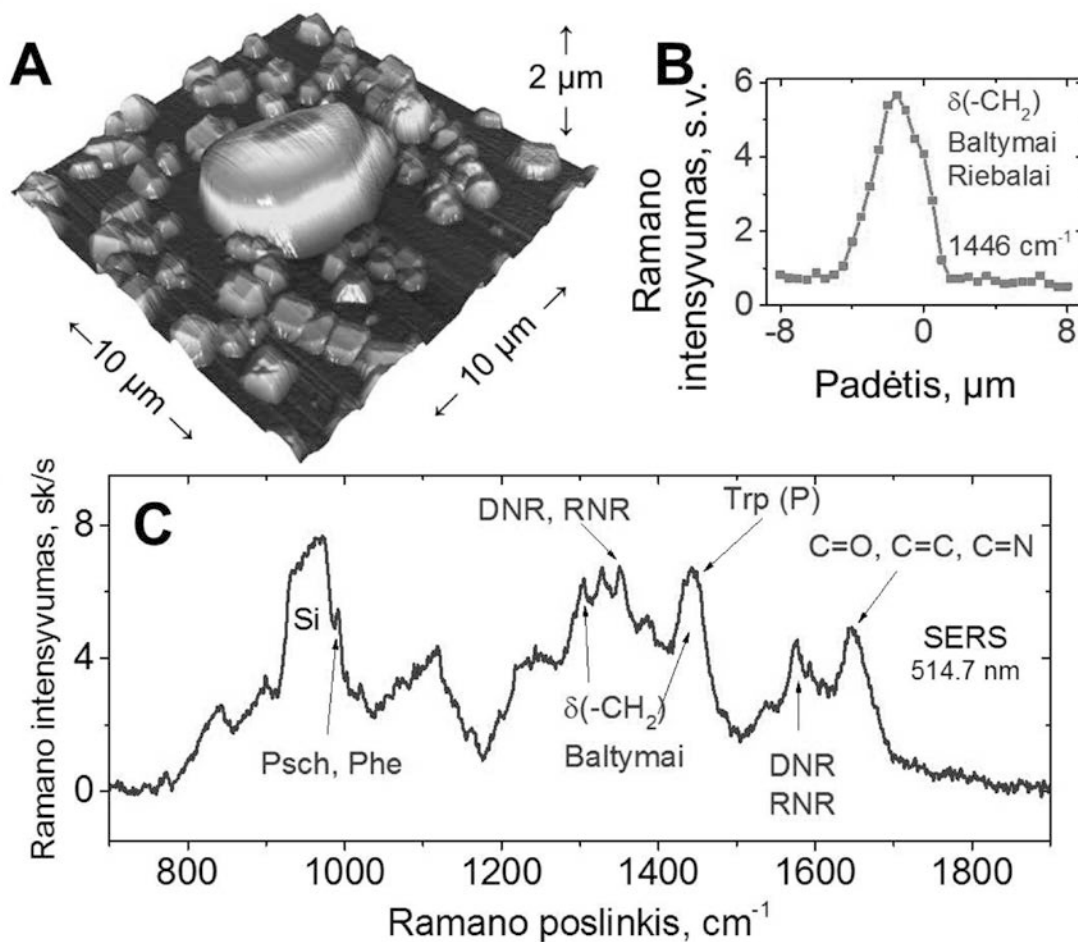


Pav. 12 Lazerinio šaltinio šviesos pasiskirstymo ląstelėje ir aplink ją priklausomai nuo naudoto padėklo kompiuterinė simuliacija, panaudojant baigtinių elementų metodą: A) ore, B) ant aukso paviršiaus, C) ant grafito paviršiaus, D) lazerio šviesos pasiskirstymo ląstelėje ant auksinio padėklo 3D vaizdas. Simuliacijos buvo atliekamos imituojant 515 nm bangos ilgio šviesos spindulio poveikį.

Gauti rezultatai parodė, kad šviesos intensyvumo pasiskirstymas priklausomai nuo padėklo skiriasi. Ore esanti mielių ląstelė veikia kaip fokusuojantis lęšis, o didžiausias šviesos intensyvumas yra pasiekiamas išorėje (Pav. 12 A). Kai mielių ląstelė yra ant auksinio padėklo, šviesos pasiskirstymas pasikeičia ir didžiausias intensyvumas yra stebimas ties viršutine ląstelės sienele, tiek ląstelės viduje, tiek ir išorėje (Pav. 12 B). Grafito padėklo atveju didžiausias šviesos intensyvumas yra stebimas ties ląstelės sienele, besiliečiančia su padėklu (Pav. 12 C). Dėl šios priežasties Ramano signalai yra gaunami iš skirtingų ląstelės vietų ir dėl to atskirų smailių intensyvumai skiriasi tarpusavyje.

Norint gauti sustiprintą Ramano efektą, buvo pagamintas paviršius su sidabro struktūromis ir ant jo užneštos bei išdžiovintos mielių ląstelės (Pav. 13 A). Iš gautų duomenų buvo pastebėta, kad spektro linijų intensyvumas yra žymiai didesnis, palyginus su kitais, tirtais paviršiais (Pav. 13 C), o tai leido ženkliai sumažinti lazerio galią ir poveikio laiką (įprastiems padėklams buvo naudojama 20 kartų po 20 s, lazerio galia 2 mW, struktūrizuotam sidabro paviršiui: 10 kartų po 10 s, lazerio galia 100 μ W), tuo pačiu išsaugant nepažeistą ląstelę ir sudarant galimybę suformuoti Ramano signalo „žemėlapi“ (Pav. 13 B). Kad įsitikinti, jog gauti rezultatai tikrai yra sąlygoti sustiprinto

Ramano signalo, ant lygaus sidabro paviršiaus taip pat buvo užnešta mielių ir pamatuotas jų spektras, tačiau gautas intensyvumas buvo panašus į prieš tai matuotus signalus ant kitų padėklų. Taip pat buvo pastebėta, kad džiūvimo proceso metu ant struktūrizuoto paviršiaus mielės yra linkusios nudžiūti kaip pavienės ląstelės, o ne kaip klasteriai ant labai lygių prieš tai naudotų paviršių. Tai lemia paviršiaus šiurkštumas, kuris dėl užsilikusio vandens prie struktūrų ir drėkinimo efekto neleidžia mielėms sulipti. Tokiu atveju atsiranda galimybė stebėti vieną ląstelę.

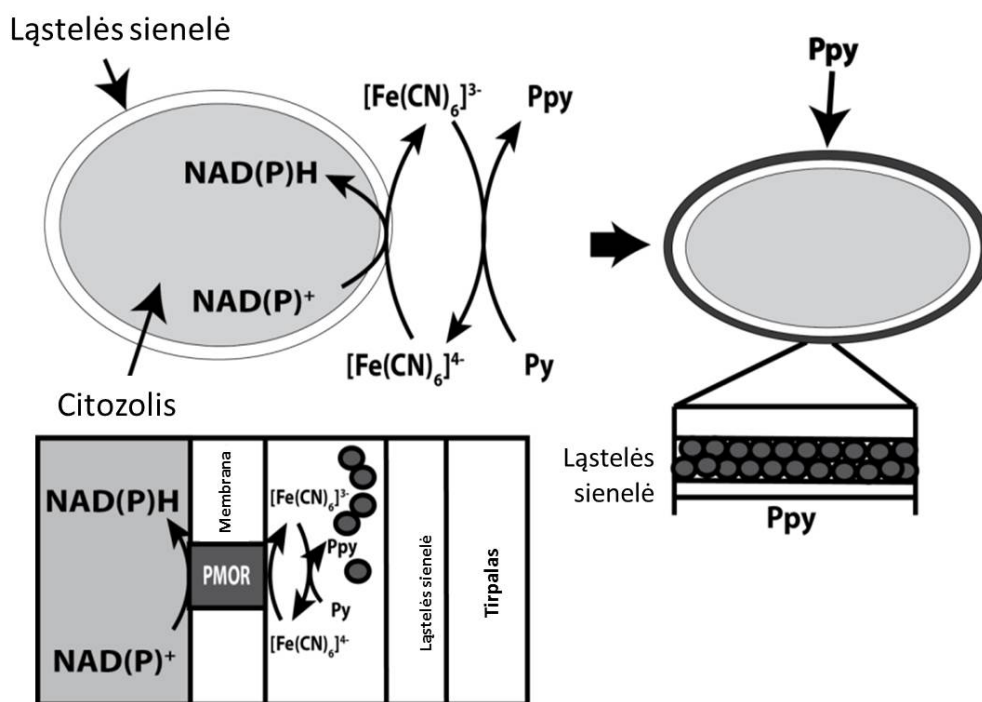


Pav. 13 A) Mielių ląstelės ant struktūrizuoto sidabro paviršiaus AJM vaizdas, B) Ramano intensyvumo linijinis skenavimas, pavaizduota kreivė atitinka Ramano smailės intensyvumą ties 1446 cm^{-1} , C) Mielių ląstelių ant struktūrizuoto sidabro paviršiaus Ramano spektras. Gaunamas intensyvus SERS signalas leidžia pastebėti prieš tai padėklo spektro „uždengtas“ smailes.

3.5.2 Mielių ląstelių modifikavimas polipirolu

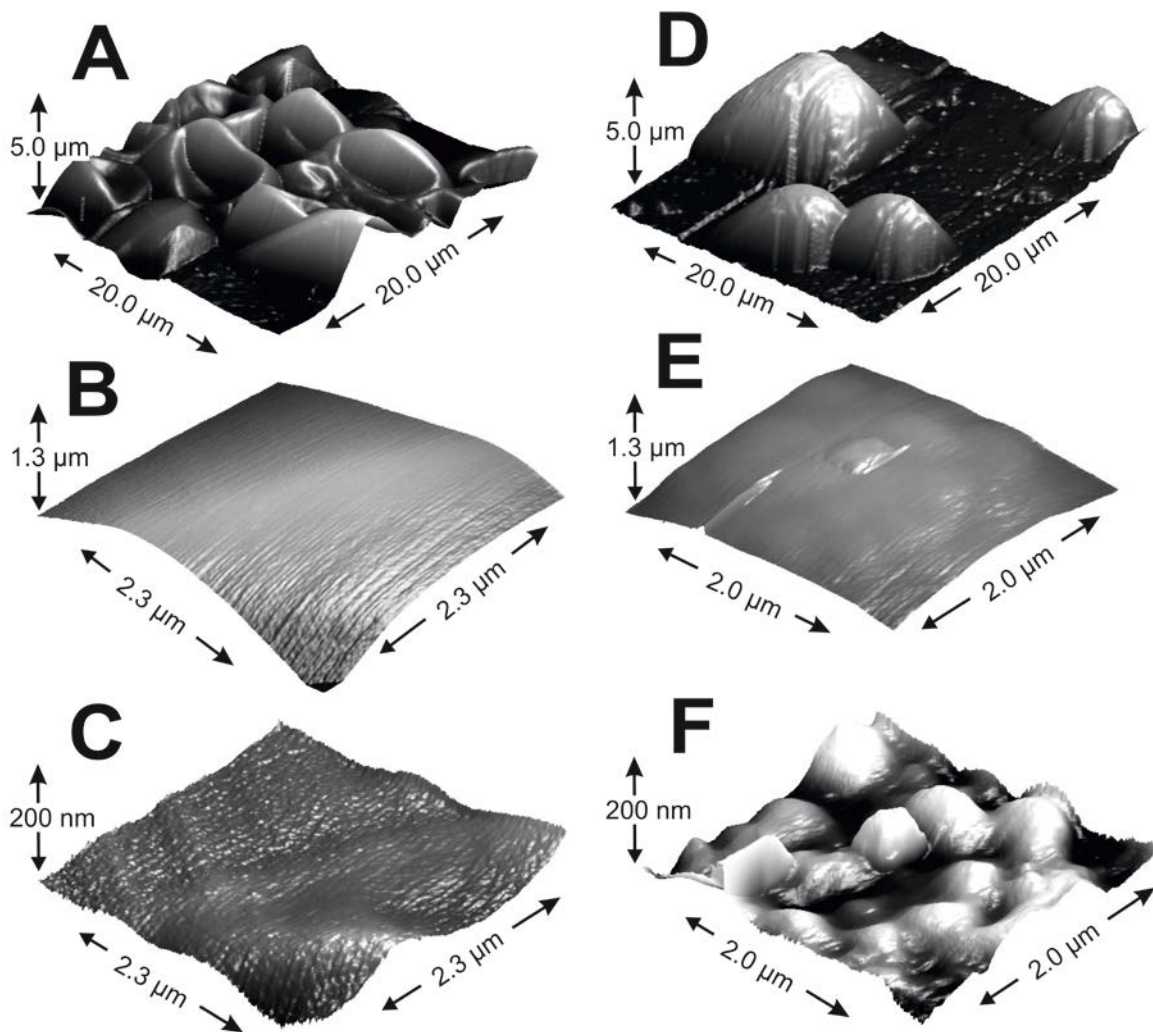
Eksperimento metu mielių ląstelių sienelėje, panaudojant $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ sistemą, buvo sintetinamas polimeras polipirolas. Polimero formavimosi procesas vyksta pagal cheminės sintezės schemą: tirpale esantis $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ yra verčiamas į $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ mielių ląstelėse esančių oksido-reduktazių dėka. Prie ląstelės sienelės arba joje esantis

$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ inicijuoja polimerizacijos reakciją, todėl polimeras susiformuoja ne tirpale, bet ląstelės sienelėje ir/ar periplazmoje (Pav. 14). Modifikuotų ląstelių tyrimams buvo panaudotas atominių jėgų mikroskopas. Buvo tirtos sveikos, išdžiūvusios, cheminiais reagentais (gliukoze ar natrio chloridu) ir polimeru paveiktos mielių ląstelės. Iš gautų duomenų buvo pastebėta, kad bet koks modifikavimas yra užregistruojamas atominių jėgų mikroskopo adatėle.



Pav. 14 Polipirolu formavimosi schema: mielių ląstelėse esančios oksido-reduktazės vykdo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ oksidaciją iki $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, šis savo ruožtu oksiduoja pirolą ir vyksta polipirolu sintezė, o tuo pat metu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ grįžta į $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. PMOR – plazminėje membranoje esančios oksido-reduktazės.

Išorinio modifikavimo cheminiais reagentais metu, didžiausius skirtumus buvo galima registruoti fiksuojant fazinio kontrasto ir amplitudės nuokrypio vaizdus. Polipirolu modifikuotos ląstelės panašių skirtumų neparodė. Tai gali būti dėl dviejų priežasčių: arba polipirolas yra įsiterpęs į ląstelės sienelę ir po ja, arba polipirolu ir mielių fizikinės savybės yra žymiai panašesnės, nei mielių ir gliukozės bei NaCl, todėl AJM nesugebėjo jų atskirti. Tačiau pačios mielės sienelės struktūriniai pokyčiai buvo pastebėti atlikus antros eilės lyginimo procedūrą. Papildomai buvo atlikti jėgos matavimai, tačiau rezultatai buvo labai neatsikartojantys. Buvo pastebėta, kad po modifikacijos mielės tampa minkštesnės, tačiau priklausomybė nuo modifikavimo metu naudotos koncentracijos ar kito parametro nebuvo nustatyta.



Pav. 15 Kontaktiniu metodu gauti mielių atominių jėgų mikroskopo vaizdai: A, B, C nemodifikuotų ir D, E, F modifikuotų mielių ląstelių. Modifikacijai naudota 0,5 M pirolo ir 0,04 M $[Fe(CN)_6]^{4-}$. A ir D vaizduoja mielių ląsteles ant Si paviršiaus, B ir E – mielių sienelės $2 \times 2 \mu m^2$ dydžio vaizdas, C ir F – mielių sienelės vaizdas po vaizdo apdorojimo procedūros.

Mielių ląstelių gyvybingumo tyrimai parodė, kad pirolo koncentracija turi įtakos jų dauginimuisi. Buvo nustatyta, kad naudojant 0,1, 0,3 ir 0,5 mM pirolo kiekį, mielių gyvybingumas atitinkamai sumažėjo 26 %, 42 % ir 40 %. Kadangi tarp dviejų paskutinių mėginių nebuvo reikšmingo gyvybingumo sumažėjimo skirtumo, buvo suformuluota išvada, kad polipirolo citotoksiškumas mielėms priklauso tik iki tam tikros koncentracijos, o vėliau jo nebekeičia. Tikėtina, kad susidaręs polimero sluoksnis apsunkina ląstelės metabolizmą, maistinių medžiagų ir vandens patekimą į ląstelės vidų, dėl to sumažėja ir jos gyvybingumas.

Išvados

1. Elektrocheminės polimerizacijos metu priklausomai nuo naudojamos monomero koncentracijos galima gauti skirtingos struktūros polipirolo paviršius. Naudojant 50 mM pradinę pirolo monomero koncentraciją suformuota polipirolo plėvelė yra sąlyginai lygi, sudaryta iš mažų sferinių struktūrų. Esant 500 mM monomero koncentracijai, polimero sluoksnis tampa labai šiurkštus ir jo paviršiuje stebimos maždaug 14 μm skersmens toroidinės struktūros. Pirolo polimerizacija vyksta ne tolygiai, o atsitiktinėse vietose, kol visas elektrodo paviršius yra užpildomas polimeru.
2. DNR molekuliniai įspaudai buvo suformuoti naudojant dvi skirtingas polipirolo sluoksnio formavimo metodikas: potencialų ciklą ir potencialų impulsų sekas. Tolimesni tyrimai parodė, kad molekuliniai įspaudai yra gaunami abiem atvejais, tačiau potencialų impulsų sekos metodas buvo žymiai efektyvesnis.
3. Ištyrus kofeino ir teofilino sąveikas su polipirolo modifikuoto molekuliniais įspaudais sluoksniu nustatyta, kad kofeino molekuliniais įspaudais modifikuotas polipirolas žymiai efektyviau sąveikauja su kofeinu negu su teofilinu, todėl kofeino molekuliniais įspaudais modifikuotas polipirolas pasižymi didesniu atrankumu kofeinui nei teofilinui.
4. Polipirolo cheminės polimerizacijos iniciatoriumi naudojant aukso rūgštį susidaro polimero/aukso nanodalelių kompozitai. Šio proceso metu 10 nm diametro pradiniai aukso kristalitai padidėja iki 40 nm diametro ar didesnių matmenų dalelių.
5. Stabilių izotopų masių spektrometrija buvo sėkmingai pritaikyta fermento – gliukozės oksidazės ir polipirolo biokompozito stochiometrijai nustatyti. Naudojant azoto izotopų santykio skaičiavimus buvo nustatyta, kad vienai fermento molekulei tenka 710 – 1970 pirolo monomero molekulių. Anglies izotopų santykio metodas šiems tyrimams buvo netinkamas.
6. Chemiškai susintetintas polimero sluoksnis nėra toksiškas ir neturi įtakos pelių kaulų čiulpų kamieninių ląstelių adsorbicijai ant paviršiaus, jų morfologijai bei gyvybingumui.
7. Ištyrus padėklus, skirtus mielių ląstelių Ramano spektroskopijai nustatyta, kad ant silicio, silicio oksido ir grafito padėklų gaunamas Ramano signalas yra intensyviausias, tačiau šie padėklai pasižymi charakteringomis smailėmis,

užgožiančiomis dalį mielių spektro. Aukso ir struktūrizuoto sidabro padėklai tokių charakteringų smailių neturi. Kompiuterinis modeliavimas parodė, kad skirtingi padėklai nulemia nevienodą didžiausio šviesos intensyvumo pasiskirstymą ląstelėje ir aplink ją.

8. $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ redoks sistema gali būti taikoma polipirolo sintezei mielių ląstelių sienelėje ir/ar periplazmoje smarkiai nesumažinant ląstelių gyvybingumo. Šios sintezės bei kitų cheminių poveikių metu atsirandantys ląstelės sienelės struktūriniai pokyčiai gali būti sėkmingai vaizdinami atominių jėgų mikroskopijos metodu.

Tyrimų rezultatai paskelbti 9-niuose recenzuojamų žurnalų straipsniuose ir 13-koje tarptautinių konferencijų tezių.

Paskelbtos mokslinės publikacijos:

1. **L. Mikoliunaite**, A. Makaraviciute, A. Suchodolskis, A. Ramanaviciene, Y. Oztekin, A. Stirke, G. Jurkaite, M. Ukanis, G. Carac, P. Cojocar, A. Ramanavicius, Atomic Force Microscopy Study of Living Baker's Yeast Cells, *Adv. Sci. Lett* (2011) 4, 2, 368-376.
2. V. Ratautaite, A. Ramanaviciene, Y. Oztekin, J. Voronovic, Z. Balevicius, **L. Mikoliunaite**, A. Ramanavicius, Electrochemical Stability and Repulsion of Polypyrrole Film, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* (2013) 16-21.
3. V. Ratautaite, S. N. Topkaya, **L. Mikoliunaite**, M. Ozsoz, Y. Oztekin, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, Molecularly Imprinted Polypyrrole for DNA Determination, *Electroanalysis* (2013) 25(5), 1169-1177.
4. A. Vaitkuvienė, V. Ratautaite, **L. Mikoliunaite**, V. Kaseta, G. Ramanauskaite, G. Biziuleviciene, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, Some Biocompatibility Aspects of Conducting Polymer Polypyrrole Evaluated with Bone Marrow-Derived Stem Cells, *Colloids and Surfaces A* (2014) 442, 152 – 156.
5. **L. Mikoliunaite**, R. Kubiliute, A. Popov, J. Voronovic, S. Sakirzanovas, A. Ramanavičienė, A. Ramanavičius, Development of gold nanoparticle-polypyrrole nanocomposites, *Chemija* (2014) 25(2), 63-69.
6. A. Garbaras, **L. Mikoliunaite**, A. Popov, A. Ramanaviciene, V. Remeikis, A. Ramanavicius, The isotope method for the determination of stoichiometry between compounds forming the polypyrrole and glucose oxidase composite, *Physical Chemistry Chemical Physics* (2015) 17(3), 2252-2258.

7. D. Plausinaitis, V. Ratautaite, **L. Mikoliunaite**, L. Sinkevicius, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, Quartz Crystal Microbalance-Based Evaluation of the Electrochemical Formation of an Aggregated Polypyrrole Particle-Based Layer, *Langmuir* (2015), 31, 3186-3193.
8. V. Ratautaite, D. Plausinaitis, I. Baleviciute, **L. Mikoliunaite**, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, Characterization of caffeine-imprinted polypyrrole by a quartz crystal microbalance and electrochemical impedance spectroscopy, *Sensors and Actuators B* (2015) 212 63–71.
9. **L. Mikoliunaite**, R. D. Rodriguez, E. Sheremet, V. Kolchuzhin, J. Mehner, A. Ramanavicius, D. R.T. Zahn, The substrate matters in the Raman spectroscopy analysis of cells, *Scientific Reports* (priimtas).

Pateikta patentinė paraiška

E. Andriukonis, A. Stirkė, **L. Mikoliūnaitė**, Z. Balevičius, A. Ramanavičienė ir A. Ramanavičius, Pirolo bio-polimerizacija naudojant redokso tarpininką, Lietuvos Respublikos valstybinis patentų biuras (2015).

Pranešimų mokslinėse konferencijose tezės

Autorius:

1. **L. Mikoliunaite**, E. Sheremet, R. D. Rodriguez, A. Ramanavičius, D. R. T. Zahn, Importance of the surface and laser energy to the Raman spectroscopy of living yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*), *Nanochemistry and nanomaterials: International conference of young chemists*, Palanga, Lithuania, 2012 12 7 – 9.
2. **L. Mikoliunaite**, A. Popov, J. Voronovic, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, Chemical and Enzymatic Synthesis of Polypyrrole and Polianiline Nanoparticles, *Advanced Materials and Technologies*, Palanga, Lithuania, 2013 08 27 – 31;
3. **L. Mikoliunaite**, R. Kubiliute, J. Svirelis, J. Voronovic, A. Popov, U. Samukaite-Bubniene, B. Bugelyte, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, Synthesis of Gold – Polypyrrole Nanocomposites, *Ecobalt 2013*, Vilnius, Lithuania, 2013 10 25 – 27;

Bendraautorius:

4. V. Ratautaitė, J. Voronovič, **L. Mikoliūnaitė**, A. Ramanavičienė, A. Ramanavičius, Molecularly imprinted polypyrrole for analysis of bioactive compounds, *Advanced materials and technologies*, Palanga, Lithuania, 2011 08 27 – 31.
5. A. Vaitkuvienė, A. Stirkė, **L. Mikoliūnaitė**, A. Suchodolskis, A. Ramanavičienė, A. Ramanavičius, Investigation of Transformed Cells by Atomic Force Microscopy, *Pittcon 2012*, Orlando, USA, 2012 05 12.

6. V. Ratautaitė, A. Alubeckas, **L. Mikoliūnaitė**, A. Ramanavičienė, A. Ramanavičius, Electrochemical Polymerization of Conducting Polymer Polypyrrole, The Vital Nature Sign 2012, Kaunas, Lithuania, 2012 06 1 – 4.
7. R. Kubiliūtė, J. Svirelis, **L. Mikoliūnaitė**, J. Voronovič, A. Popov, A. Ramanavičienė, A. Ramanavičius, Self-Growth of Gold-Polypyrrole Nanocomposites, The Vital Nature Sign, Kaunas, Lithuania, 2013 05 16 – 19.
8. A. Ramanavicius, I. Baleviciute, **L. Mikoliūnaite**, J. Voronovic, A. Ramanaviciene, Conducting Polymers in Nanotechnological Devices, Advanced Materials and Technologies, Palanga, Lithuania, 2013 08 27 – 31;
9. Popov, **L. Mikoliūnaite**, J. Voronovic, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, Comparison of Chemical and Enzymatic Synthesized Polypyrrole Nanoparticles, EcoBalt 2013, Vilnius, Lithuania, 2013 10 25 – 27.
10. A. Garbaras, A. Ramanavicius, **L. Mikoliūnaite**, A. Popov, Application of isotope method for the determination of stoichiometry of complex nanocomposites, Isotopes in Biological & Chemical Sciences, Galveston, TX, USA, 2014 02 2-7.
11. A. Ramanavičius, A. Ramanavičienė, A. Popov, A. Kaušaitė-Minkštimienė, **L. Mikoliūnaitė**, V. Mažeiko, Y. Oztekin, Investigation of enzymatically synthesized conducting polymer nanoparticles. PITTCON conference and EXPO 2014, Chicago, USA, 2014 03 2-6.
12. Garbaras, **L. Mikoliūnaite**, A. Popov, A. Ramanaviciene, V. Remeikis, A. Ramanavicius, Application of stable isotope method for the nanocomposites investigation, IMSC 2014, Geneva, Switzerland, 2014 08 24-29.
13. A. Ramanavicius, I. Baleviciute, D. Plausinaitis, V. Ratautaite, Z. Balevicius, L. Sinkevicius, **L. Mikoliūnaite**, A. Ramanaviciene, Evaluation of molecularly imprinted polypyrrole. Bio-sensing technology, Lisbon, Portugal 2015 05 10-13.

Summary

Application of polypyrrole for biosensor design and modification of living cells

Polypyrrole as suitable material for biosensor design and modification of living cells was investigated. Polypyrrole films were electrochemically synthesized and repulsion possibility of the Ppy film by potential cycling was considered. It was found that the concentration of monomer has a high impact on the roughness of the layer. From the EQCM data it was determined that polymerization of pyrrole is not a homogeneous process, but is executed in different places depending on the adsorbed monolayer. Comparison of MIPpy, which was formed using two different electrochemical methods ((i) by potential pulse sequence and (ii) by potential cycling electrochemical synthesis), showed that MIPpy was formed by both methods, however potential pulse sequence based electrochemical polymerization was more suitable due to the recovery of monomer concentration near the electrode surface. Caffeine molecularly-imprinted polypyrrole was electrochemically synthesized on the EQCM sensor and it was applied for the determination of caffeine. Continuous association/dissociation process of caffeine as well as theophylline was performed. Analysis of the obtained experimental data proved that the equilibrium of the interaction of MIPpy and dissolved caffeine at standard conditions is shifted towards the formation of MIPpy/caffeine complex while the equilibrium for the interaction of MIPpy and theophylline is shifted towards dissociation of MIPpy/theophylline complex.

Two types of composites were obtained: Ppy embedded with gold nanoparticles or enzyme glucose oxidase. After AuNP/Ppy composite synthesis no separate core shell nanoparticles were observed by SEM, but the composites of 100 – 200 nm were obtained. Ppy/enzyme biocomposites were evaluated using Isotope ratio mass spectrometry. The stable nitrogen isotope ratio method for the evaluation of the complex GOx/Ppy biocomposite stoichiometry was more appropriate in comparison to carbon. Using nitrogen isotope ratio mass spectrometry measurements approximately 710 – 1970 pyrrole monomers were estimated to surround glucose oxidase during enzymatic polymerization.

The conducting polymer polypyrrole is not toxic to mouse bone marrow-derived stem cells. Polypyrrole deposited on the gold-plated glass slide did not impair cell attachment and proliferation. These cells adhered well on polypyrrole-modified surfaces and exposed normal fibroblastic like morphology.

The suitability and the effect of different substrates were investigated for Raman spectroscopy analysis of yeast cells. The two main differences among six substrates used were observed – the Raman intensity and the intensity ratios, are both a consequence of the substrate reflectivity and signal amplification due to the optical properties of the substrate. Therefore, the absence of certain Raman bands and appearance of others observed in cell research might not be only attributed to a given molecular process or influence of external perturbations, but it could also be a consequence of the substrate employed.

Polypyrrole synthesis in the yeast cell wall and/or periplasm induced by redox-cycling of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ was reported. Ppy was formed by oxidative polymerization initiated by $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, during which the $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ was reduced to $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. The applicability of atomic force microscopy for the evaluation of intact and modified yeast cell walls was shown. The atomic force microscopy could be used for the visualization of the yeast cell wall surface at high resolution, allowing to detect small structures, such as a bud scar or the formed polymer.

Gyvenimo aprašymas

Vardas, pavardė Lina Mikoliūnaitė
El. paštas lina.mikoliunaite@chf.vu.lt
Gimimo data 1985 08 14

Išsilavinimas

2010 – 2015 doktorantūros studijos Vilniaus universiteto Chemijos fakultete, Fizikinės chemijos katedroje.

2008 – 2010 magistro studijos Vilniaus universiteto Fizikos fakultete, fizikos magistro kvalifikacijos laipsnis, biofizikos studijų programa.

2004 – 2008 bakalauro studijos Vilniaus universiteto Fizikos fakultete, fizikos bakalauro kvalifikacijos laipsnis, modernių technologijų vadybos studijų programa.

Darbinė veikla

2015 02 01 – dabar Vilniaus universiteto Chemijos fakultetas, Projektų rengimo ir administravimo skyriaus vedėja;

2012 10 15 – dabar Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Fizinių ir technologijos mokslų centras, Puslaidininkų fizikos institutas, NanoBioTechnologijų laboratorija, jaunesnioji mokslo darbuotoja;

2012 10 01 – dabar Vilniaus universiteto Fizikos fakulteto, Bendrosios fizikos ir spektroskopijos katedra, jaunesnioji mokslo darbuotoja.

Stažotės užsienio mokslo ir studijų institucijose

1. Intensity vasaros mokykla „EUCHEME 2013“, 2013 07 30 – 08 12, Kamerino universitetas (Italija);

2. Erasmus studentų praktika, 2012 07 02 – 09 30, Chemnitso technologinis universitetas (Vokietija);

3. Erasmus studijos, 2007 02 – 07, Gento universitetas (Belgija);

4. Studentų mokslinė praktika, finansuojama Lietuvos Mokslų Tarybos, 2006 07 01 – 08 31, Vilniaus universiteto Imunologijos institutas (Lietuva).