

Praca dyplomowa inżynierska

Mikroelektrody do pomiaru dopaminy, serotoniny i glutaminianu w hodowlach komórkowych i in vivo

Autor: Wojciech Mazurkiewicz

Nr albumu: 283186

Promotorzy: prof. dr hab. inż. Tomasz Ciach
dr inż. Emilia Witkowska-Nery

Rok akademicki: 2019/2020

Wprowadzenie

Dopamina, serotonina oraz glutaminian stanowią jedne z kluczowych neuroprzekaźników odpowiedzialnych za prawidłowe funkcjonowanie układu nerwowego. W wyniku zaburzeń ich poziomu miliony ludzi traci rocznie życie. Mimo znacznego postępu technologicznego na przestrzeni ostatnich dekad w zakresie neurobiologii, nadal brakuje urządzeń do wiarygodnych i powtarzalnych pomiarów wskazanych neuroprzekaźników w środowisku ich naturalnego występowania. Obecnie duże nadzieje pokładane są w elektrochemicznych metodach ich detekcji z wykorzystaniem mikroelektrod.

Cel i zakres pracy

Celem pracy jest opracowanie metod wytwarzania i modyfikacji mikroelektrod z włókna węglowego, które w środowisku macierzy zewnątrzkomórkowej będą zdolne do jednoczesnego pomiaru dopaminy oraz serotoniny w przypadku czujnika chemicznego, a także do detekcji glutaminianu, w przypadku biosensora. Zakres pracy obejmuje:

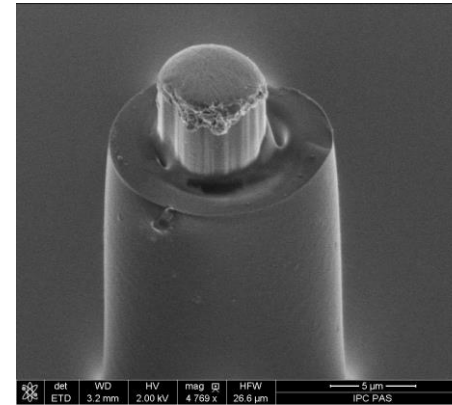
- wytworzenie mikroelektrod z włókna węglowego z uwzględnieniem optymalizacji etapu wyciągnięcia kapilar oraz polerowania powierzchni mikroelektrod, wraz ze sprawdzeniem ich działania;
- pomiary dla dopaminy i serotoniny w roztworze PBS o pH 7,4 oraz pożywce na mikroelektrodach niezmodyfikowanych wraz z analizą otrzymanych wyników;
- osadzanie nanocząstek węgla na powierzchni mikroelektrod z włókna węglowego przeznaczonych do pomiaru dopaminy i serotoniny;
- pomiary dla dopaminy i serotoniny w roztworze PBS o pH 7,4 oraz pożywce na mikroelektrodach zmodyfikowanych wraz z analizą otrzymanych wyników;
- osadzanie błękitu pruskiego wraz z warstwą substancji ochronnej na powierzchni mikro- i makroelektrod przeznaczonych do pomiaru nadtlenu wodoru;
- pomiary nadtlenu wodoru w roztworze PBS o pH 7,4 na mikro- i makroelektrodach wraz z analizą otrzymanych wyników.

Część teoretyczna

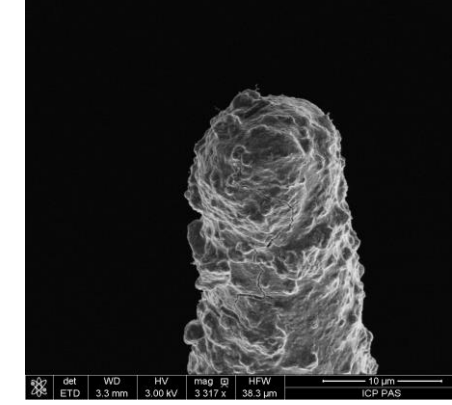
Część teoretyczna dostarcza informacji na temat badanych neuroprzekaźników. Elektrochemia zostaje wskazana jako nauka umożliwiająca badanie ich uwalniania do macierzy zewnątrzkomórkowej. Przedstawiono zagadnienia związane z kinetyką reakcji na powierzchni elektrody, wymiany masy w jej otoczeniu, a także metod przykładania potencjału. Wyszczególniono zalety mikroelektrod i wskazano włókno węglowe jako użyteczny materiał elektrod przeznaczonych do pomiarów katecholamin. Wskazano potrzebę ich modyfikacji w celu umożliwienia jednoczesnego pomiaru dopaminy i serotoniny, a także obniżenia potencjału potrzebnego do przeprowadzenia reakcji utleniania glutaminianu. Zaprezentowano reakcje elektrochemiczne, jakim podlegają badane neuroprzekaźniki w trakcie doświadczeń.

Część doświadczalna

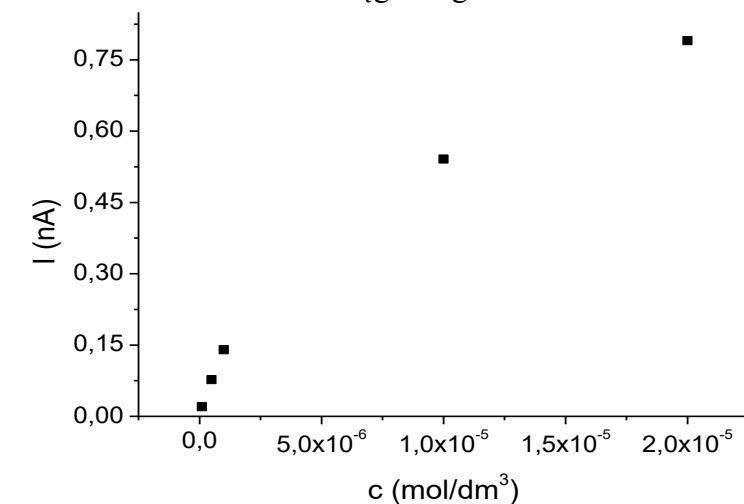
Przygotowano mikroelektrody z włókna węglowego o średnicy około 7 μm wraz z optymalizacją procesu ich wyciągnięcia oraz polerowania (Rysunek 1.). Porównano metody ich modyfikacji nanocząstkami węgla, w tym osadzania chemicznego i elektrochemicznego (Rysunek 2.). Wykonano pomiary dla dopaminy oraz serotoniny w roztworze PBS o pH 7,4 oraz pożywce na elektrodach pokrytych oraz niepokrytych nanocząstkami (Wykres 1.).



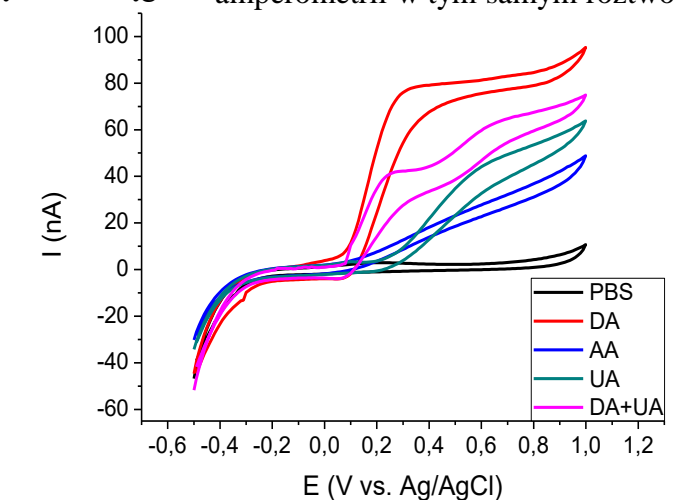
Rysunek 1. Prawidłowo wykonana mikroelektroda z włókna węglowego



Rysunek 2. Mikroelektroda pokryta chemicznie nanocząstkami węgla



Wykres 1. Krzywa kalibracji dla dopaminy w pożywce wykonana na mikroelektrodach pokrytych nanocząstkami węgla



Wykres 2. Voltamogramy cyklicznej voltamperometrii wskazujące na możliwość pomiaru dopaminy w obecności substancji przeszkadzających

Wnioski

Wytworzono około 80 prawidłowo działających mikroelektrod. Dla dopaminy otrzymano krzywe kalibracji wykazujące odchylenie od liniowości dla wysokich stężeń wskutek m.in. jej polimeryzacji. Dla serotoniny wykazano jej nieodwracalne utlenianie do hydrochinonu, który w kolejnym kroku podlega odwracalnej reakcji utleniania i redukcji. Sygnał serotoniny pokrywa się z sygnałem dopaminy. W wyniku niecałkowitego pokrycia powierzchni elektrody nanocząstkami węgla uzyskano sygnał złożony z reakcji katalizowanej na powierzchni nanocząstek, jak i niezmodyfikowanego włókna węglowego. Jednoczesny pomiar dopaminy i serotoniny nadal nie był możliwy. Dla badań glutaminianu metody chemiczne i elektrochemiczne osadzania błękitu pruskiego wykazały się niską stabilnością uzyskanego materiału, wyższą stabilność wykazał zaś błękit pruski otrzymany na drodze fotokatalizy. Dla makroelektrod z węgla szklanego krzywa kalibracji przyjęła charakterystykę liniową w szerokim zakresie stężeń, z kolei na mikroelektrodach sygnał okazał się być zbyt oporowy, by umożliwić konstrukcję krzywej kalibracji. Badania będą kontynuowane poprzez optymalizację elektrodepozycji w celu jednoczesnej detekcji dopaminy i serotoniny, a także metod adsorpcyjnych w przypadku błękitu pruskiego i detekcji glutaminianu. Badania zostały sfinansowane w ramach grantu NCBiR LIDER/38/0138/L-9/17/NCBR/2018, prowadzonego przez dr inż. Emilię Witkowską Nery.