

## Aleksandra KŁOS-WITKOWSKA

AKADEMIA TECHNICZNO-HUMANISTYCZNA W BIELSKU BIAŁEJ, WYDZIAŁ BUDOWY MASZYN I INFORMATYKI, KATEDRA ELEKTROTECHNIKI I AUTOMATYKI, ul. Willowa 2, 43-309 Bielsko-Biała

# Biosensory i sensory fluorescencyjne

Dr Aleksandra KŁOS-WITKOWSKA

Absolwentka Instytutu Fizyki Uniwersytetu Śląskiego. Laureatka stypendium Marii Curie. Odyła staże naukowe: Max Planck Institut für Biophysikalische Chemie (Niemcy), University of Ioannina (Grecja), University of Helsinki (Finlandia). Jest adiunktem w Katedrze Elektrotechniki i Automatyki na Wydziale Budowy Maszyn i Informatyki w ATH. Zainteresowania naukowe: Sensory i biosensory.



e-mail: awitkowska@ath.bielsko.pl

### Streszczenie

W pracy opisano podstawy działania biosensorów ze szczególnym uwzględnieniem sensorów fluorescencyjnych. Scharakteryzowano metody fluorescencyjne stosowane w badaniach biosensorów oraz sensorów optycznych. Wyjaśniono różnicę pomiędzy biosensorymi a sensorami optycznymi wykorzystującymi zjawisko fluorescencji. Dokonano zestawienia porfiryn oraz wykrywanych przez nie substancji, a także opisano wykorzystanie sensorów fluorescencyjnych w obrazowaniu nowotworów oraz badaniach nad rozwojem leków.

**Słowa kluczowe:** Biosensor, sensor optyczny, fluorescencja, porfiry.

## Biosensors and fluorescent sensors

### Abstract

The paper describes the basics of biosensors with particular emphasis on fluorescent sensors (Figs. 1 and 2). There are characterized fluorescent methods used in the studies of biosensors and optical sensors: a change in fluorescence intensity, FRET (*Förster resonance energy transfer*) FLIM (*Fluorescence life time imaging*), FCS (*Fluorescence correlation spectroscopy*). There is explained the difference between biosensors and optical sensors employing the phenomenon of fluorescence. There are presented optical sensors using porphyrins, paying particular attention to porphyrins as substances characterized by the presence of intense absorption bands in the visible light range, high absorption coefficient and intense emission in the visible and infrared range. Due to these properties they are increasingly used in medical diagnostics for imaging the cancer (photodynamic method), and the stage of cancer (diagnosis based on the emission spectra of protoporphyrin IX). In Table 1 there is given the list of porphyrins and detected by them, on the basis of changes in the fluorescence emission spectra, substances:  $Fe^{+3}$ ,  $^1O_2$ ,  $O_2$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ , HCl (gas), phospholipids,  $Pb^{+2}$ . There is described the use of fluorescent sensors based on porphyrins for cancer imaging and in cancer drug development studies [15, 16, 17].

**Keywords:** biosensor, optical sensor, fluorescence, porphyrin.

## 1. Wstęp

Wraz z rozwojem nowych technologii, zwiększonym zainteresowaniem technikami wizualizacji, naciskiem na programy odkrywania nowych leków oraz próbą wyjaśnienia mechanizmów funkcjonowania komórek oraz śledzenia ich szlaków metabolicznych obserwuje się wzrost zainteresowania tematyką związaną z biosensorymi. Biosensory powszechnie znajdują zastosowanie w diagnostyce medycznej [15-17], monitorowaniu zmian środowiska [2], identyfikacji żywności genetycznie zmodyfikowanej oraz śledzeniu aktywności komórek [6, 8].

Biosensor jak sama nazwa wskazuje składa się z bioreceptora czyli części biologicznej pełniącą funkcję wykrywającą którą mogą być enzymy, białka, antyciała, kwasy nukleinowe (DNA, RNA), oraz części przetwornikowej, którą może stanowić fizykochemiczny przekaźnik (optyczny, elektrochemiczny, tensome-

tryczny, piezoelektryczny, magnetyczny lub mikromechaniczny), konwertujący rozpoznany analit na mierzalny sygnał.

Biosensory oferują wygodne, szybkie, konkretne, czułe w znaczeniu monitorowania analitu raportowanie obecności konkretnych tarcz substratu lub enzymu przez sygnał, który jest proporcjonalny do stężenia i aktywności tarczy. Zasadę działania biosensora przedstawia poniższy schemat (rys. 1).

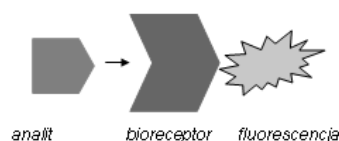


Rys. 1. Schemat działania biosensora  
Fig. 1. Diagram of biosensor activities

## 2. Biosensory fluorescencyjne

Biosensory bazujące na zjawisku fluorescencji są użytecznym i powszechnie wykorzystywanym narzędziem do detekcji biomolekuł [1, 6]. Funkcję układu sygnałowego pełni fluorofor czyli grupa funkcyjna posiadająca zdolność do zaabsorbowania energii o określonej długości fali (długość fali ekscytacji), a później do jej emisji w innej długości fali (długość fali emisji). Fluorofory znajdują się na matrycy biosensora, mogą być naturalne w przypadku niektórych białek (np. albumina) czy porfiryn lub też mogą być naniesione (znakowanie fluorescencyjne), dlatego też w literaturze [3, 4] często mówi się o fluorescencyjnych sensorach białkowych czy biosensorach optycznych wykorzystujących porfiry.

Fluorescencyjna sonda dołączona do bioreceptora (np. proteiny) jest przekaźnikiem sygnałowym, raportującym interakcję proteiny z analitem. W większości przypadków fluorofor powinien nie tylko odzwierciedlać obecność analitu, ale również jego stężenie. Rysunek 2, przedstawia schematycznie powstanie fluorescencji podczas wiązania analitu z bioreceptorem.



Rys. 2. Powstanie zjawiska fluorescencji w biosensory  
Fig. 2. Formation of fluorescence phenomenon in a biosensor

W wyniku wiązania analitu przez bioreceptor pojawia się sygnał fluorescencyjny, który obrazuje zaistniały proces [3].

Dochodzi do zakłócenia stanów energetycznych, co pociąga za sobą powstanie nowych szczególnych własności cząsteczki, co może przejawiać się w zmianie intensywności fluorescencji bądź przesunięciem pasm emisyjnych.

Zmiany widmowe zależne są od wzajemnego dopasowania bioreceptora i stężeń analitu. Miarą powinowactwa biosensora do wybranego analitu jest stała dysocjacji.

Istnieją liczne podziały biosensorów fluorescencyjnych: ze względu na ich chemiczną naturę, użytą matrycę biosensora oraz wykorzystane zjawiska fizyczne służące do obrazowania za pomocą spektrofotometrii.

Fluorescencyjne sensory mogą być wykorzystywane do badań aktywności enzymów [3, 4], do rozpoznawania specyficznych tarcz (analitu) lub rozpoznawania konformacji [3, 5], służą również do monitorowania wewnątrzkomórkowej aktywności [3, 8].

### 3. Metody fluorescencyjne stosowane w badaniach biosensorów

Dobór odpowiedniej techniki fluorescencyjnych do badań biosensorów zależy od natury biosensora oraz od jego widmowych właściwości. Do scharakteryzowania informacji sygnalizowanych przez biosensor lub sensor optyczny bazujący na zjawisku fluorescencji, dostępnych jest kilka technik: zmiana intensywności fluorescencji, FRET (Förster resonance energy transfer) czyli technika wykorzystująca zjawisko fluorescencyjnego przeniesienia energii, FLIM (Fluorescence life time imaging)- mikroskopia obrazowania czasów życia za pomocą fluorescencji, FCS (Fluorescence correlation spectroscopy)- spektroskopia korelacji fluorescencji.

#### *Zmiana intensywności fluorescencji*

Metoda polega na bezpośrednim pomiarze intensywności fluorescencji (emisji fluorescencji) czyli odpowiedzi układu na pobudzenie (ekscytację). Spadek lub wzrost intensywności fluorescencji może być powiązana ze zmianami związanymi z konformacją bioreceptorów, stężeniem bioreceptorowej tarczy czy zmianami potranslacyjnymi.

Technika ta posiada pewnego rodzaju ograniczenia, mianowicie nie jest skuteczna, gdy fluorescencja powstała w wyniku wiązania analitu z tarczą jest słaba tzn. zmiany są ledwo dostrzegalne bądź próbka wrażliwa jest na czynnik środowiskowy inny niż aktywność tarczy bioreceptora. W tej technice ważny jest dobór początkowego stężenia biosensora w celu otrzymania mierzalnego sygnału.

#### *FRET (Förster resonance energy transfer)*

Technika wykorzystująca zjawisko przeniesienia energii pomiędzy donorem i akceptorem.

Transfer energii zachodzi gdy odległość donor akceptor nie jest większa niż 10 nm oraz orientacja dipoli obu molekuł jest odpowiednia. W widmach spektralnych obserwuje się nałożenie widma emisyjnego donora z widmem absorpcyjnym akceptora.

Metoda ta jest doskonałym narzędziem umożliwiającym określenie interakcji: białko-białko białko-DNA lub zmiany konformacyjne [1, 6]

Technika FRET umożliwia wyznaczenie aktywności tarczy biosensora zmieniającej się pod wpływem działania bodźców zewnętrznych. Czynniki te mogą wpływać na zmianę odległości pomiędzy donorem a akceptorem [1, 8].

#### *FLIM (Fluorescence life time imaging)*

*FLIM (Fluorescence life time imaging)* czyli mikroskopia obrazowania czasów życia za pomocą fluorescencji.

Metoda powszechnie wykorzystywana w obrazowaniu biologicznych tkanek oraz reakcji zachodzących w żywych komórkach. Zmiany w czasie życia fluorescencji są mierzone a następnie odwzorowywane za pomocą mikroskopu wyposażonego w detektor. Za pomocą FLIM możliwe jest określenie średniego czasu życia jaki molekula spędza w czasie ekscytacji po zaabsorbowaniu fotonu. Pomiar czasu życia możliwe są w domenie czasu lub w domenie częstotliwości [6].

Dzięki zastosowaniu metody FLIM możemy śledzić zmiany w lokalnym środowisku takie jak wzajemne oddziaływanie z partnerami [1].

#### *FCS (Fluorescence correlation spectroscopy)*

W metodzie tej dokonuje się pomiaru fluktuacji intensywności fluorescencji, które związane są ze zmianą dynamiki protein w roztworach.

Technika ta stosowana jest zazwyczaj z mikroskopią konfokalną lub mikroskopią fotonową. Analizowane są małe, spontaniczne odchylenia od średniej fluorescencji próbki w celu uzyskania informacji na temat kinetycznych, termodynamicznych procesów związanych z odwracalnymi zmianami fluorescencyjnymi takimi jak: współczynnik dyfuzji, przepływ, stężenie cząsteczkowe [1].

### 4. Sensory optyczne wykorzystujące porfiryny

Systemy analityczne oparte na biosensorach i sensorach optycznych wykorzystujących zjawisko fluorescencji, wykorzystują reakcję chemiczną pomiędzy cząsteczką oznaczoną (analitykiem) a substancją aktywną znajdującą się w matrycy sensora [9]. Różnica pomiędzy biosensorami a sensorami optycznymi wykorzystującymi zjawisko fluorescencji polega na zastosowaniu substancji wykrywającej w matrycy sensora. W przypadku biosensora jest to substancja biologiczna w przypadku sensorów optycznych wykorzystujących zjawisko fluorescencji może to być substancja chemiczna posiadająca własności fluorescencyjne np: porfiryne.

Porfiryny charakteryzują się obecnością intensywnych pasm absorpcji w zakresie światła widzialnego, wysokim współczynnikiem absorpcji i intensywną emisją w zakresie światła widzialnego i podczerwieni [10]. Z tego powodu nadają się bardzo dobrze do badań spektrofluorymetrycznych oraz UV-Vis (absorpcyjnych), gdzie obserwuje się zmiany intensywności w widmach podczas obecności wykrywanej substancji. Warto również wspomnieć, że porfiryny wykorzystywane są powszechnie w walce z rakiem w terapii fotodynamicznej, gdzie pełnią rolę fotouczulacza - substancji, która selektywnie absorbowana przez komórki nowotworu, pozwala na dokładne określenie rozmiarów guza, a także wykrycie tkanek chorobowo zmienionych w jego obszarze. Dzięki wprowadzeniu porfiryny do organizmu, komórki nowotworowe wrażliwe stają się na światło i dzięki naświetlaniu ich długością fali 632 nm możliwa jest ich destrukcja (pod wpływem promieniowania zgromadzony w komórkach nowotworowych barwnik produkuje w tkance czynniki toksyczne, które ją niszczą; chodzi tu o tzw. tlen singletowy i wolne rodniki, które rozpoczynają procesy chemiczne prowadzące do niszczenia organelli komórki i w efekcie do jej planowanej śmierci).

W konstrukcji biosensora bardzo ważnym elementem jest nośnik czyli matryca, w której umieszczona jest porfiryne. Materiał, z którego wykonana jest matryca musi łatwo tworzyć monolityczne kształtki oraz cienkie warstwy nakładane na różnego rodzaju podłoża. Aby spełniał swoją funkcję musi mieć nie całkowite zamknięte pory, aby substancja aktywna (analit) mogła mieć kontakt z substancją aktywną (np. porfiryne). Warunki te spełnione są przez polimery, naturalne i syntetyczne zeolity oraz cienkie warstwy i monolity otrzymane metodą zol-żel [9].

Obecnie jednak badania w dużej mierze [11-21] koncentruje się jednak na doborze odpowiedniej porfiryny w celu detekcji określonej substancji.

I tak przykładowe zestawienie porfiryn oraz analizowanych za ich pomocą substancji na bazie widm emisji fluorescencyjnej przedstawia tabela 1.

Zmiana intensywności (spadek intensywności) w widmach fluorescencyjnych porfiryn posłużyła między innymi do oznaczania zawartości tlenu [12, 13], do oznaczania aktywności metali  $Hg^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$  [18, 21], czy detekcji  $Ca^{+2}$  [19]. Zauważono również wzrost intensywności emisji fluorescencyjnej kompleksu porfiryny i tlenku grafenu TAPP/GO podczas reakcji z jonami  $Fe^{+3}$  [11].

Natomiast z przesunięć pasm wzbudzenia porfiryny TMPyP wnioskowaniu na temat detekcji gazów: HCl [20]. Porfiryna mTHPP posłużyła również do detekcji fosfolipidów [14]. Powszechnie zauważalny jest również trend wykorzystania widm emisji fluorescencji w diagnostyce nowotworu [15, 16].

Tab. 1. Zestawienie porfiryn oraz analizowanych za ich pomocą substancji na bazie widm emisji fluorescencyjnej

Tab. 1. List of porphyrins and analyzed by them substances based on fluorescence emission spectra

Lp.	Substancja analizowana	Porfiryna	Literatura
1	Fe <sup>+3</sup>	TAPP, TMPyP, TPPS <sub>4</sub>	11
2	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	TPP	12
3	O <sub>2</sub>	PtF <sub>20</sub> TPP	13
4	fosfolipidy	m-THPP	14
5	nowotwór prostaty	PpIX	15, 16
6	pH (miarą reakcji na leki przeciwnowotworowe)	HplIX, TPPS <sub>2a</sub> , mTHPP, mTHPC	17
7	Hg <sup>+2</sup>	TDMAPP	18
8	Ca <sup>+2</sup>	o-OCH <sub>3</sub> TPP	19
9	HCl	TMPyP	20
10	Pb <sup>+2</sup>	TBHP	21

## 5. Sensory fluorescencyjne w obrazowaniu nowotworów: pomiar, diagnoza i rozwój leków

Wzrost zainteresowania i rosnąca liczba badań nad sensorami fluorescencyjnymi przyczyniła się do postępów: w obrazowaniu nowotworów [15, 16], śledzeniu procesów biologicznych związanych z rakiem [15, 16, 17].

Sensory fluorescencyjne są bardzo użytecznym narzędziem w pracach związanych z odkrywaniem i rozwojem nowych leków [17]. Dzięki ich zastosowaniu możliwy jest właściwy wybór próbki (analitu), oddziałującej z matrycą sensora. Na bazie widm fluorescencyjnych, możliwe jest również określenie aktywności tarczy receptora lub analitu. Za pomocą fluorescencji możliwa jest wizualizacja farmakodynamiki i farmakokinetyki w czasie rzeczywistym oraz śledzenie reakcji tkanek nowotworowych na leczenie [17].

## 6. Podsumowanie

Na podstawie przeanalizowanych materiałów, śledząc bieżące trendy w tematyce sensorów optycznych i biosensorów można powiedzieć, że tego rodzaju czujniki będą coraz częściej wykorzystywane w diagnostyce medycznej, a inżynieria medyczna jest kierunkiem rozwojowym, dzięki któremu będzie możliwe zastosowanie konkretnych rozwiązań technicznych w celu poprawy komfortu leczenia pacjentów.

## 7. Literatura

[1] Morris M. C: Fluorescent biosensors of intracellular targets from genetically encoded reporters to modular polypeptide probes, *Cell Biochem Biophys* 56, 19-37, 2010.  
 [2] Bartoszcze M.: Przegląd Epidemiologiczny 57, 369-376, 2003.  
 [3] Tolosa L.: On the design of low-cost fluorescent protein biosensor, *Ad Biochem Engin/Biotechnol* 116, 143-157, 2009.  
 [4] D'Auria S., Lakowicz J.: Enzyme fluorescence as a sensing tool: new perspectives in biotechnology, *Curent Opinion in biotechnology*, 12: 99-104, 2001.  
 [5] VanEngelenburg S., Palmer E.: Fluorescence biosensors of protein function, *Curent Opinion in Chemical Biology* 12, 60-65, 2008.

[6] Zadran S., Stanley S., Wong K., Otiniano E., Amighi A., Baudry M.: Fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based biosensors: visualizing cellular dynamics and bioenergetics, *Applied Microbiology and biotechnology* vol 96, issue 4, 895-902, 2012.  
 [7] Duncan R.: Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) to quantify protein-protein interaction inside cell, *Biochem Soc Trans* 34, 679-682, 2006.  
 [8] Li I., Pham E., Truong K.: Protein biosensors based on the principle of fluorescence resonance energy transfer for monitoring cellular dynamics, *Biotechnol Lett* 28, 1971-1982, 2006.  
 [9] Dargiewicz-Nowicka J., Radzki S., Chemi I.: Biosensory wykorzystujące porfiryny, *Acta Bio-optica et Informatica Medica*, vol 8, 119-131, 2002.  
 [10] Legendziewicz J., Gierasymczuk Y., Koll A., Jasiński J.: Fotofizyka układów z ftalocyjaninami i porfirynami oraz perspektywy ich zastosowania, *Postepy kosmetologii*, 2013.  
 [11] Zhong De Liu, Heng Xin Zhao, Cheng Zhi Huang: Obstruction of Photoinduced electron transfer from excited porphyrin to graphene oxide: A fluorescence turn-on sensing platform for Iron (III) ions, *Plos One* 7 (12): e50367.doi:10.1371/journal.pone.0050367, 2012.  
 [12] You M., Wang Y., Wang H., Yang R.: Fluorescent detection of singlet oxygen amplifying signal transduction and improving sensitivity based on intramolecular FRET of anthryl appended porphyrins, vol 556, No 31, 3253-3259, Nov 2011.  
 [13] Yung Z., Tingxiu Y., Haixu Ch., Dapeng H., Tingyao Z., Chunyan He., Xi Ch.: A dissolved oxygen sensor based on composite fluorinated xerogel sensor based on composite fluorinated xerogel doped with platinum porphyrin dye, *Luminescence* 26, 29-34, 2011.  
 [14] Ibrahim H., Kasselouri A., Raynal B., Pansu R., Prognon P.: Investigating the possible use of a tetra (hydroxyphenyl)porphyrin as a fluorescence probe for the supramolecular detection of phospholipids, *Journal of luminescence*, vol 131, issue 12, 2528-2537, 2011.  
 [15] Silva F.R.D., Bellini M.H., Tristao V.R., Schor N., Vieira N.D., Courrd L.C.: Intrinsic fluorescence of protoporphyrin IX from blood samples can yield information on the growth of prostate tumours, *Journal of fluorescence* vol 20, issue 6, page 1159-1165, 2010.  
 [16] Silva F.R.D., Nabeshima C.T., Bellini M.H., Schor N., Vieira N.D., Courral L.C.: Study of protoporphyrin IX elimination by Body excreta: A new noninvasive cancer diagnostic method?, *Journal of fluorescence* vol 23, issue 1, p: 131-135, 2013.  
 [17] Friberg E., Cunderlikova B., Pettersen E., Moan J.: pH effects on the cellular uptake of four photosensitizing drugs evaluated for use in photodynamic therapy of cancer, *Cancer Letter*, vol 195, issue 1, p: 73-80, 2003.  
 [18] Yu Yang, Jianhui J, Guoli S, Rugin Yu: An optical sensor for mercury ion based on the fluorescence quenching of tetra (p-dimethylaminophenyl) porphyrin, *Analytica Chimica Acta*, vol 636, issue 1, 83-88, 2009.  
 [19] Zhou, Li-Jing; Cao, Zhong; Hu, Jing-Lin; Peng, Zhen; Zeng, Pu-Ni; Su, Gang; He, De-Liang: Fluorescent determination of trace calcium in water from high-parameter power plant based on a porphyrin derivative, *Advanced Science Letters*, vol 4, p: 1541-1545, 2011.  
 [20] Cano M., Castillero P., Roales J., Petrosa J., Britte S., Richardson T., Gonzalez-Elipse A., Barranco A.: A transparent TMPyP/TiO<sub>2</sub> composite thin film as an HCl sensitive optochemical gas sensor, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol 150, issue 2, p: 764-769, 2010.  
 [21] Bozkurt S, Ayata S, Kaynak I: Fluorescence-based sensor for Pb(II) using tetra-(3-bromo-4-hydroxyphenyl)porphyrin in liquid and immobilized medium, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol 72, issue 4, p.880-883, 2009.

otrzymano / received: 20.06.2013

przyjęto do druku / accepted: 02.12.2013

artykuł recenzowany / revised paper