

Autoreferat rozprawy doktorskiej:

„Mikrosolenoidowe przepływowe systemy bioanalityczne do oznaczania wybranych analitów istotnych w diagnostyce medycznej”

Promotorzy pracy: Prof. dr hab. med. Dagna Bobilewicz (WUM)
Prof. dr hab. Robert Koncki (UW)

Diagnostyka medyczna jest procesem rozpoznania chorób na podstawie stwierdzonych objawów przy pomocy wielu rodzajów badań. Jednym z obszarów diagnostyki medycznej jest analiza kliniczna. Wynika to ze znaczenia i wkładu wyników otrzymanych podczas badań laboratoryjnych w toku identyfikacji zespołów chorobowych. Znaczna większość podejmowanych decyzji medycznych jest oparta właśnie o jakościowe lub/i ilościowe dane analityczne.

Od technik pomiarowych wprowadzanych na potrzeby analityki klinicznej wymagany jest szereg parametrów, które przyczynią się do coraz efektywniejszego oznaczania wielu, różnorodnych analitów w złożonych matrycach materiałów biologicznych. Dlatego też wysoka precyzja, powtarzalność i odtwarzalność oraz zmniejszenie kosztów i czasu przeprowadzanych analiz to główne parametry charakteryzujące nowoczesne układy pomiarowe. W dużym stopniu zostało to osiągnięte poprzez wprowadzenie zmechanizowania lub zautomatyzowania procedur analitycznych i zaimplementowania ich w systemach klinicznych. Jednym z trzech głównych typów analizatorów dostępnych w laboratoriach klinicznych, poza analizatorami wirówkowymi i dyskretnymi, są analizatory przepływowe. Koncepcja analiza przepływowej powstała w późnych latach pięćdziesiątych jako odpowiedź na problemy analizy klinicznej (do których głównie należy zaliczyć niewielką ilość przeprowadzanych oznaczeń oraz niską precyzję pomiarów) i od samego początku była prężnie rozwijana. Dowodem tego są powstałe na jej podstawie liczne techniki z wykorzystaniem coraz to wydajniejszych urządzeń do sterowania przepływem. Zalicza się do nich między innymi technika z zastosowaniem urządzeń mikrosolenoidowych (określana w literaturze angielskiej jako MCFA – *MultiCommutated Flow Analysis*).

Celem prezentowanych badań była konstrukcja zmechanizowanych układów analitycznych typu MCFA z detekcją optoelektroniczną typu PEDD (*Paired Emitter Detector Diode*) do oznaczania wybranych biomarkerów w płynach ustrojowych, istotnych z punktu widzenia diagnostyki medycznej, w tym: enzymów (fosfataza kwaśna i zasadowa), metabolitów (kreatynina), białka całkowitego oraz frakcji albuminowej. Dodatkowo, elastyczność i uniwersalność mikrosolenoidowych układów multikomutacyjnych pozwoliła na sprawne i efektywne analizowanie próbek o bardzo złożonej matrycy (mocz, surowica, płyn mózgowo-rdzeniowy). W pracy została przedstawiona budowa, zasada działania oraz charakterystyka opisywanych systemów wraz z potwierdzeniem eksperymentalnym ich przydatności analitycznej do zastosowania w analizie klinicznej.

Badania opisane w rozprawie dotyczą różnych mikrosolenoidowych systemów bioanalitycznych m.in.:

- Układ przepływowy do oznaczania aktywności fosfatazy zasadowej w surowicy krwi. Składał się z zaworów mikrosolenoidowych oraz pompy perystaltycznej. Jego koncepcja była oparta na inkubacji enzymu z substratem poza detektorem w otwartej objętości układu. Ze względu na żółte zabarwienie produktu reakcji (*p*-nitrofenol) wymagane było prowadzenie pomiaru różnicowego. Układ umożliwiał wykonanie analizy ośmiu próbek surowicy krwi w ciągu godziny.
- Układ przepływowy do jednoczesnego oznaczania aktywności fosfatazy zasadowej i kwaśnej w surowicy krwi (w którym zastosowano wyłącznie pompy i zawory mikrosolenoidowe). Ze względu na niższą aktywność fosfatazy kwaśnej względem formy zasadowej, system ten wymagał poprawy precyzji oraz czułości względem pierwszego, wspomnianego wyżej rozwiązania. W rezultacie układ charakteryzował się konstrukcją modułową, podzieloną na: moduł do przygotowywania roztworów substratu reakcji online, moduł do wprowadzania małych objętości próbki z uwzględnieniem różnic w gęstościach, moduł do jednoczesnej inkubacji dwóch enzymów i moduł detekcyjny. Równoczesne oznaczenie obu form fosfataz trwało 12 minut.
- Układ przepływowy do oznaczania kreatyniny w surowicy krwi ludzkiej oraz moczu. Opierał się na wcześniej zaprezentowanych modułach, jednak w tym przypadku rejestrowano sygnał przez cały czas trwania reakcji pomiędzy kreatyniną i pikrynianami. Dodatkowo, ze względu na liczne interferencje w reakcji Jaffe, zaproponowano przeprowadzenie pomiarów dyskryminacyjnych, poprawiających selektywność oznaczenia. Kreatynina została oznaczona w zakresie 1 - 20 mmol L⁻¹ dla próbek moczu oraz w zakresie 40 - 500 μmol L⁻¹ dla próbek surowicy krwi.
- Prosty układ przepływowy do opracowania detektorów typu PEDD do pomiarów rozproszenia światła na potrzeby diagnostyki białkomoczu (metoda Extona). Był to pierwszy przypadek zastosowania koncepcji PEDD do pomiarów turbidymetrycznych oraz nefelometrycznych. Detektory umożliwiały oznaczanie białka turbidymetrycznie w zakresie stężeń 25 - 400 mg L⁻¹ oraz nefelometrycznie w zakresie 15 - 500 mg L⁻¹.
- Układ przepływowy do oznaczania białka całkowitego w próbkach płynu mózgowo-rdzeniowego. Układy detekcyjne zaproponowane poprzednio, zostały zaadaptowane do zmechanizowanego układu multikomutacyjnego. W oparciu o moduł do wprowadzania niewielkich objętości próbki, rozwiązano problem niewielkiej dostępności próbki. Układ umożliwiał oznaczenie białka całkowitego w zakresie 72 - 900 mg L⁻¹ (turbidymetria) oraz 18 - 500 mg L⁻¹ (nefelometria).
- Układ przepływowy do diagnostyki mikrobiałkomoczu. Zaproponowano oznaczenie białka całkowitego względem stężenia kreatyniny jako biomarkera chorób nerek. Układ pozwalał na detekcje dwóch analitów za pomocą wcześniej zaproponowanych detektorów PEDD dla metody Jaffe (fotometria) oraz dla metody Extona (turbidymetria). Oferowany zakres liniowości wynosił 36 - 300 mg L⁻¹ dla oznaczania białka całkowitego oraz 0,045 - 2,500 mmol L⁻¹ dla oznaczania kreatyniny.

- Układ przepływowy do bioanalitycznych metod immunoprecypitacyjnych. W tym przypadku, ze względu na specyfikę reakcji antygen-przeciwciała i kształt krzywej kalibracyjnej (krzywa precypitacji Heildelberga) zaproponowano wprowadzenie modułu do rozcieńczenia próbki podczas analizy. Modelowym analitem, użytym do sprawdzenia przydatności takiego układu, była albumina ludzka oznaczana w moczu. Oznaczenie albuminy dokonywane było w zakresie 8 - 196 mg L⁻¹.

Warto podkreślić innowacyjność proponowanych rozwiązań. Zarówno detektory typu PEDD do pomiarów turbidymetrycznych i nefelometrycznych, jak również system MCFA do pomiarów immunoprecypitacyjnych nie były dotychczas opisywane w literaturze naukowej.

Rezultaty badań przedstawione w rozprawie doktorskiej zostały opublikowane w postaci ośmiu publikacji oryginalnych:

1. Tymecki Ł., Strzelak K., Koncki R., *A single standard calibration module for flow analysis systems based on solenoid microdevices*, *Talanta*, 79 (2009) 205-210.
2. Strzelak K., Koncki R., Tymecki Ł., *Serum alkaline phosphatase assay with paired emitter detector diode*, *Talanta*, 96 (2012) 127-131.
3. Tymecki Ł., Korszun J., Strzelak K., Koncki R., *Multicommutated flow analysis system for determination of creatinine in physiological fluids by Jaffe method*, *Analytica Chimica Acta*, 787 (2013) 118-125.
4. Strzelak K., Koncki R., *Nephelometry and turbidimetry with paired emitter detector diodes and their application for determination of total urinary protein*, *Analytica Chimica Acta*, 788 (2013) 68-73.
5. Tymecki Ł., Strzelak K., Koncki R., *Biparametric multicommutated flow analysis system for determination of human serum phosphoesterase activity*, *Analytica Chimica Acta*, 797 (2013) 57-63.
6. Strzelak K., Wiśniewska A., Bobilewicz D., Koncki R., *Multicommutated flow analysis system for determination of total protein in cerebrospinal fluid*, *Talanta* 128 (2014) 38-43.
7. Strzelak K., Koncki R., *An immunoprecipitation assay in the multicommutated flow analysis format*, *Analyst*, 140 (2015) 7271-7277.
8. Strzelak K., Misztal J., Tymecki Ł., Koncki R., *Bianalyte multicommutated flow analysis system for microproteinuria diagnostics*, *Talanta*, 148 (2016) 707-711.

Badania opisane w pracy doktorskiej były wykonane m.in. w toku realizacji projektów badawczych sponsorowanych przez Narodowe Centrum Nauki (grant NCN PRELUDIUM – 2012/07/N/ST4/01848 oraz grant NCN OPUS 2011/01/B/NZ5/00934).