

MULTIKOMUTACYJNY SYSTEM PRZEPŁYWOWY DO FLUORYMETRYCZNEGO OZNACZANIA KREATYNY W SUROWICY KRWI ZE ZINTEGROWANYM UKŁADEM ODBIAŁCZAJĄCYM

Iga Malicka

Promotor: dr hab. Łukasz Tymecki

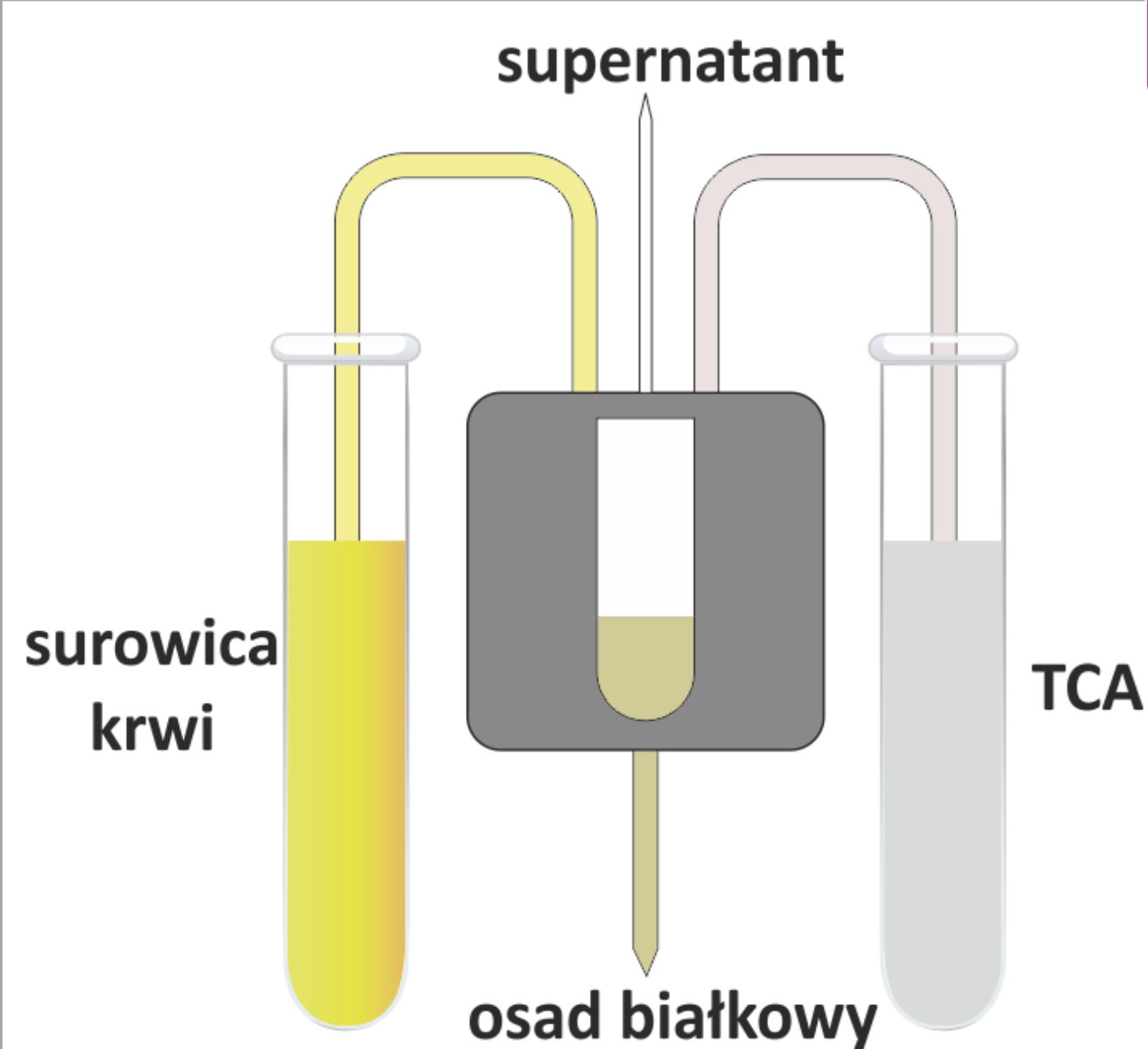
Opiekun: mgr Izabela Lewińska

Cel eksperymentu - skonstruowanie układu przepływowego umożliwiającego oznaczenie kreatyny w próbkach surowicy krwi

Dlaczego oznaczenie kreatyny jest ważne?

- Kreatynina powstaje w ludzkim organizmie podczas przemian metabolicznych fosfokreatyny – związku występującego w mięśniach, pełniącego rolę magazynu energii. Większość zsyntezowanej kreatyny usuwana jest z organizmu wraz z moczem.
- Zbyt wysokie stężenie kreatyny w surowicy ($>150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) świadczy o nieprawidłowym przebiegu filtracji kłębuszkowej w nerkach. Patologiczna praca nerek może występować nie tylko jako osobny stan chorobowy, ale także towarzyszyć chorobom cywilizacyjnym, takim jak cukrzyca czy nadciśnienie.
- Zbyt niskie stężenie kreatyny w surowicy ($<40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) może być oznaką dystrofii mięśniowej.

Deproteinizacja próbek



Zgłoszenie patentowe nr P.437753

- Analiza surowiczej kreatyny obarczona jest interferencjami z powodu białek.
- Chcąc uniknąć konieczności manualnego odbiałczania próbek przed analizą, za pomocą druku 3D wytworzono odbiałczający reaktor przepływowy. Za pomocą pomp dodawano do komory próbkę i TCA - odczynnik strącający.
- Reaktor zintegrowano z tradycyjną wytrząsarką.
- Po wytrząśnięciu zawartości reaktora, wypompowywano odbiałczony supernatant wprost do pętli wstrzykowej i poddawano analizie. Osad białkowy usuwano roztworami czyszczącymi.

Multikomutacyjna
analiza
przepływowa

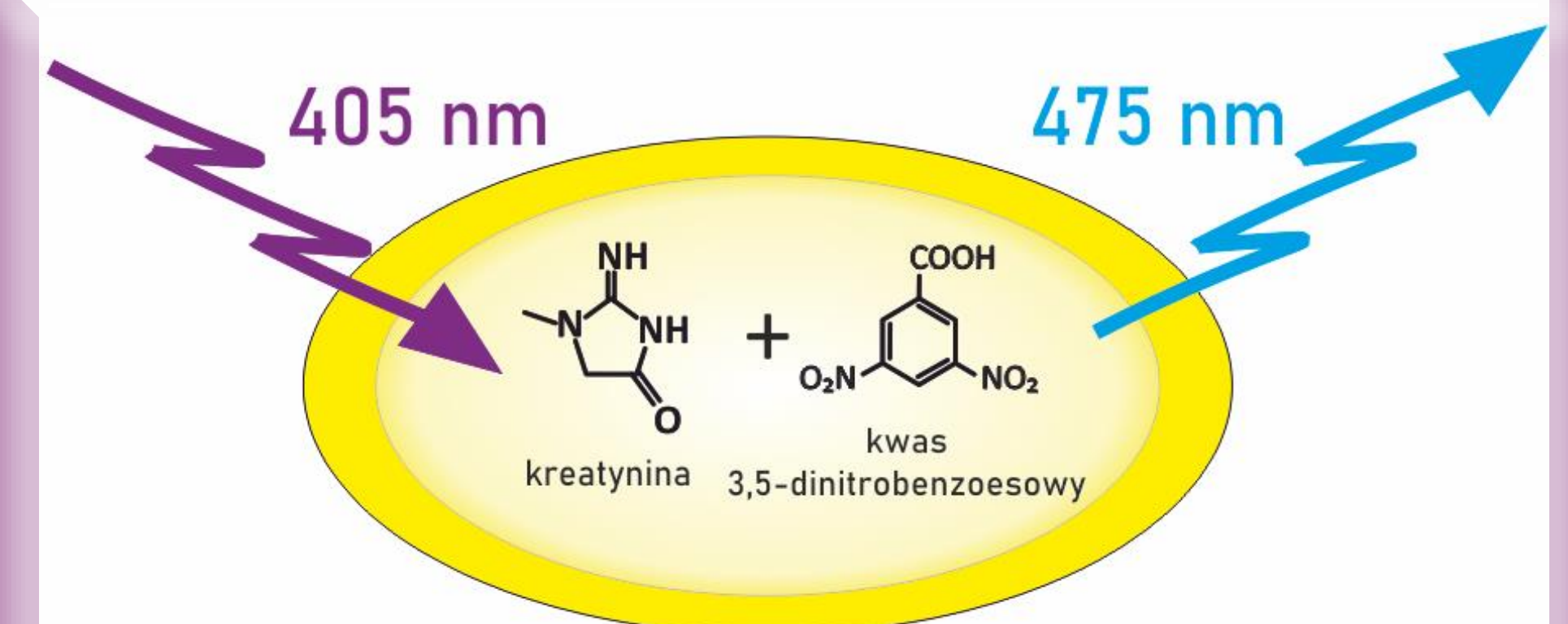
Użycie mikrosolenoidowych pomp i zaworów pozwoliło na zminimalizowanie rozmiarów układu przepływowego i zapewnić prostotę działania. Mechanizacja procesów analitycznych jest szczególnie ważna w diagnostyce klinicznej, gdzie wymagana jest wysoka dokładność i precyzja oznaczeń.

Technologia druku
3D

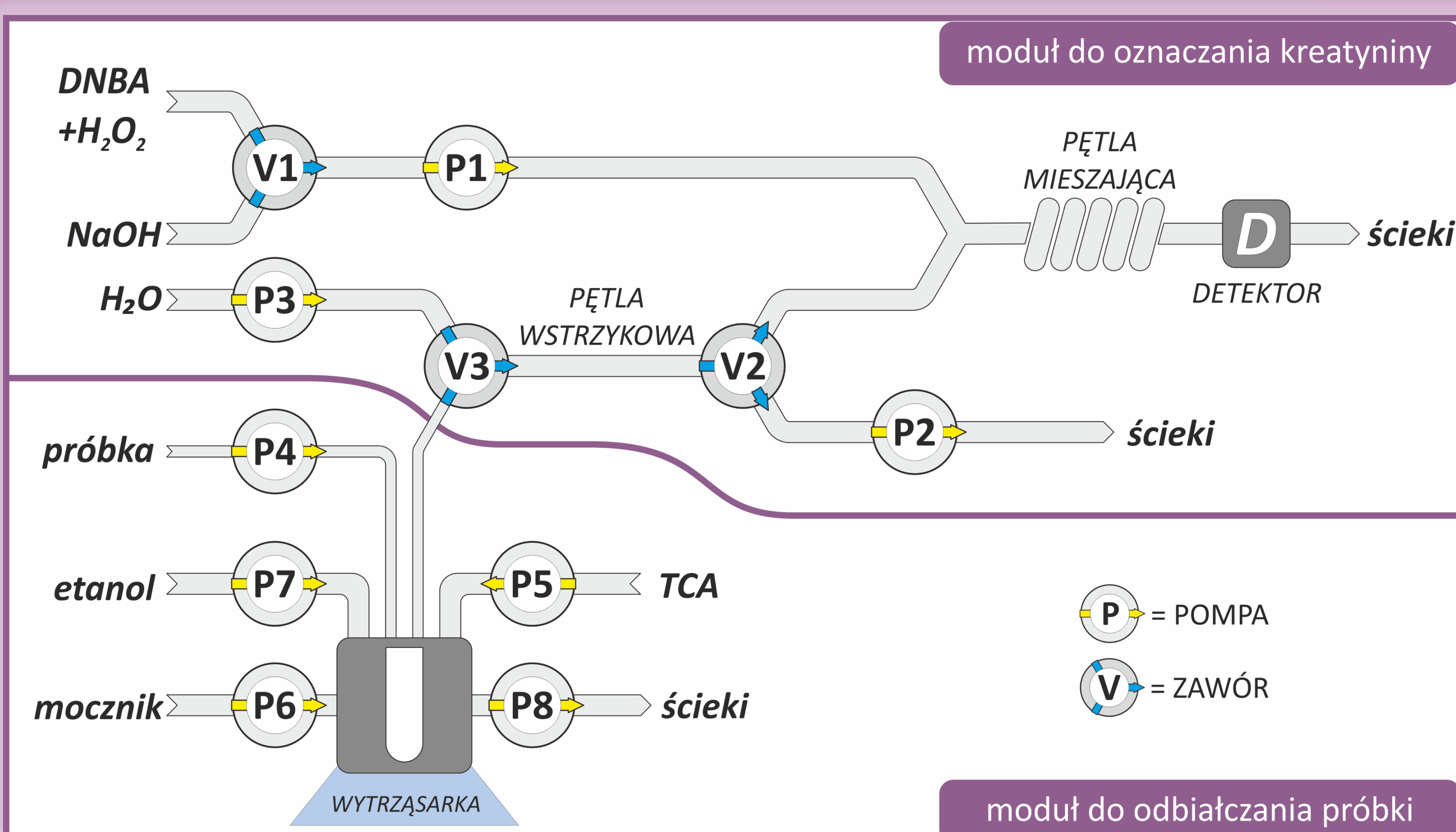
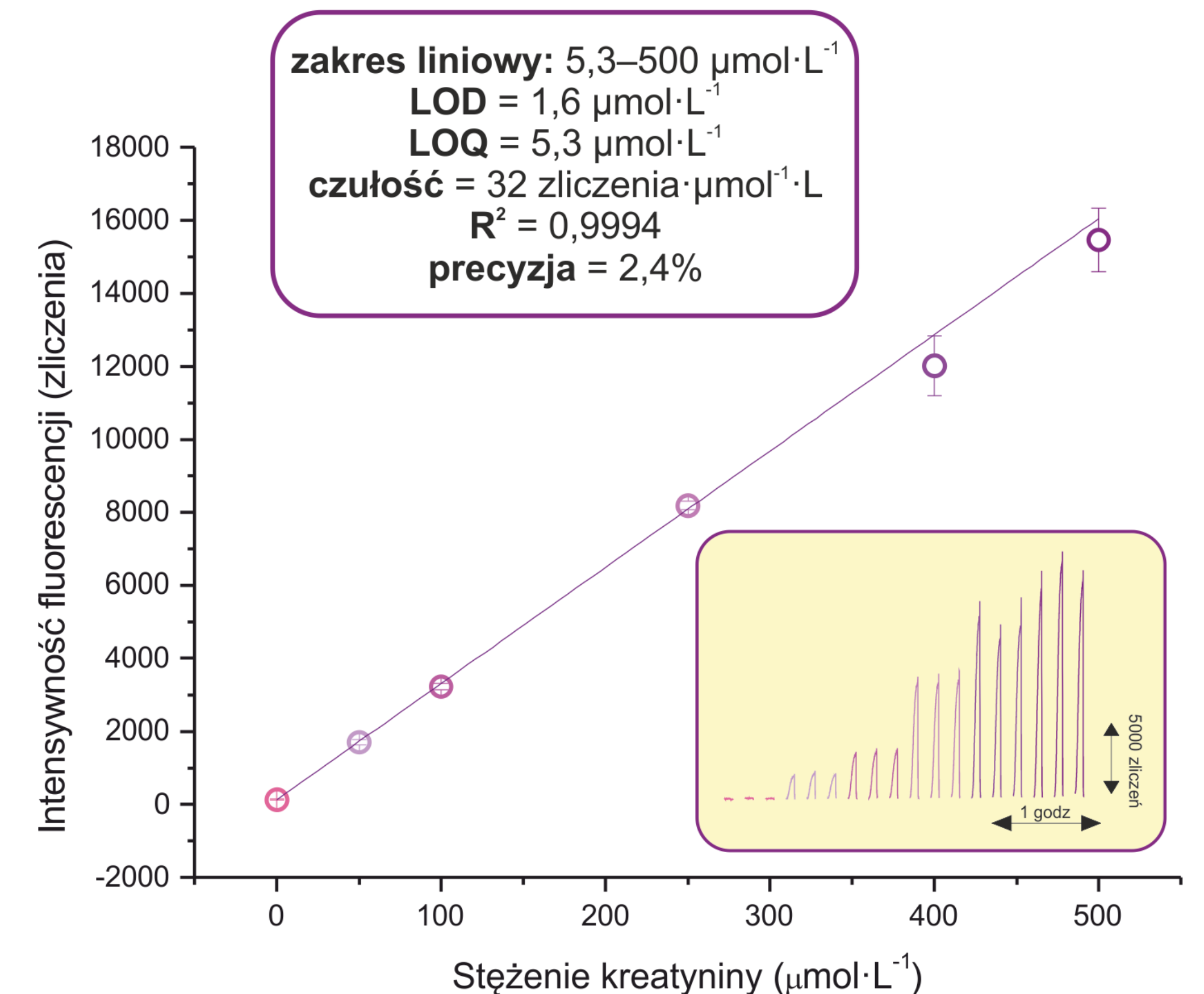
Wydrukowanie części elementów układu pozwoliło na obniżenie kosztów wytworzenia całego systemu. Co więcej, możliwe było szybkie otrzymanie obiektów o ściśle określonych, pożądanych cechach – zarówno pod względem fizycznym (wymiary), jak i chemicznym (materiał konstrukcyjny).

Fluorymetria w
analizie
kreatyny

Oznaczeń kreatyny dokonywano metodą fluorymetryczną z użyciem kwasu 3,5-dinitrobenzoesowego w środowisku zasadowym. Metoda ta jest selektywną i mało kosztowną alternatywą do dwóch metod powszechnie stosowanych w diagnostyce klinicznej: metody Jaffé oraz metody enzymatycznej.



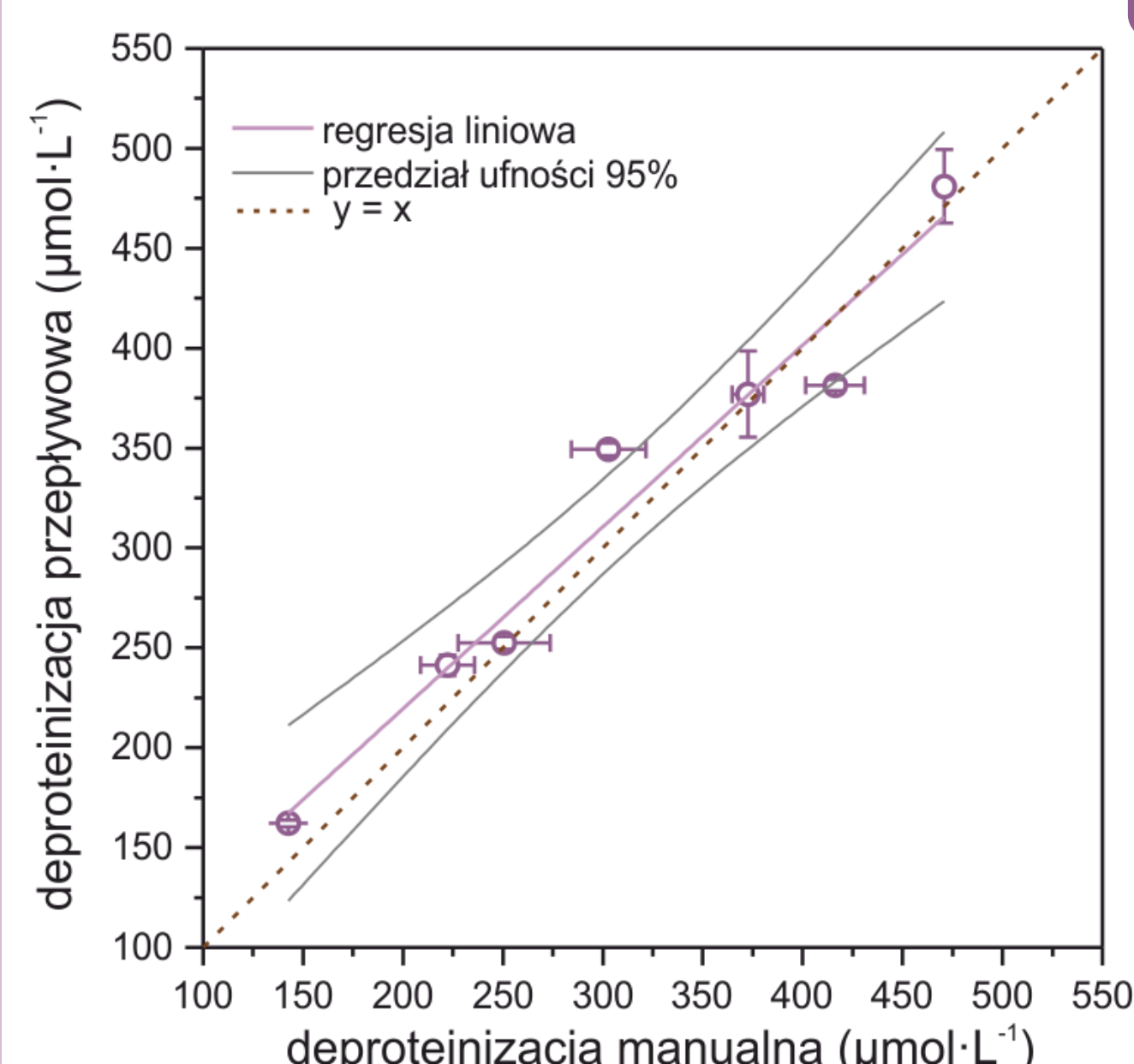
Kalibracja i parametry analityczne



Objaśnienia:

- DNBA – kwas 3,5-dinitrobenzoesowy, odczynnik tworzący kompleks z kreatyną w obecności H_2O_2
 - NaOH – wodorotlenek sodu tworzący środowisko reakcji
 - H_2O – roztwór nośny
- TCA – kwas trichlorooctowy, odczynnik strącający białko surowicze
 - etanol, mocznik – roztwory czyszczące komorę reaktora

Próbki rzeczywiste



Układ zwalidowano za pomocą surowic kontrolnych o siedmiu różnych zawartościach kreatyny. Wyniki porównano z wynikami oznaczeń uzyskanych dla próbek odbiałczonych według tradycyjnej procedury manualnej. Uzyskano satysfakcjonującą korelację metod. Współczynnik Pearsona wyniósł 0,979.

Podsumowanie i wnioski

- Skonstruowano układ przepływowy umożliwiający oznaczenie kreatyny w próbkach surowicy krwi. Uzyskane parametry analityczne pozwalają na oznaczenie kreatyny w stężeniach fizjologicznych i patologicznych.
- Wytworzono w technologii druku 3D reaktor umożliwiający odbiałczanie próbek surowicy. Zintegrowanie reaktora z układem przepływowym pozwoliło na uniknięcie manualnych procedur przygotowania próbki, a także obniżyło koszt wytworzenia i eksploatacji układu w porównaniu do przepływowego odbiałczania z użyciem membran.
- Wyniki analiz próbek rzeczywistych za pomocą układu przepływowego porównano z wynikami analizy, w której odbiałczono próbki tradycyjną procedurą manualną. Uzyskano dobrą korelację.
- Minusem proponowanego rozwiązania jest długi czas analizy, ze względu na czas potrzebny do sedymentacji osadu białkowego. Problem ten można rozwiązać poprzez zwiększenie liczby reaktorów w układzie, co pozwoli na jednoczesne odbiałczanie kilku próbek.