

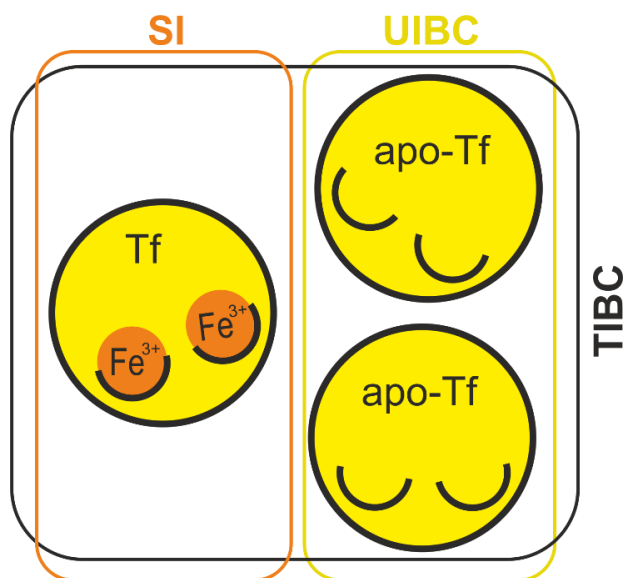
Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.

„Optoelektroniczne detektory fotometryczne do oznaczania jonów żelaza w przepływowych systemach analitycznych”

Promotor: prof. dr hab. Robert Koncki
Promotor pomocniczy: dr Kamil Strzelak

Żelazo jest pierwiastkiem obecnym w każdej dziedzinie życia człowieka. Pełni niezwykle ważną rolę zarówno w przemyśle (metalurgia), w środowisku, jak i w organizmach żywych. Praca ta skupia się przede wszystkim na oznaczeniach żelaza związanych z metabolizmem tego pierwiastka w organizmie człowieka, i to tej dziedzinie została poświęcona największa jej część.

Zawartość żelaza we krwi jest niezwykle ważnym parametrem w diagnostyce medycznej, pomaga w szybkim diagnozowaniu wielu chorób, w tym niedokrwistości, hemochromatozy i atransferynemii. Żelazo w surowicy można znaleźć w kompleksach z transferyną, białkiem regulującym jego poziom i odpowiedzialnym za jego transport. Żelazo w surowicy (SI – *ang. Serum Iron*), utajona zdolność wiązania żelaza (UIBC – *ang. Unsaturated Iron Binding Capacity*), całkowita zdolność wiązania żelaza (TIBC – *ang. Total Iron Binding Capacity*) to podstawowe parametry biomedyczne opisujące metabolizm/homeostazę żelaza. Zależność pomiędzy nimi przedstawiono na rysunku 1.



Rys.1. Zależność pomiędzy parametrami diagnostycznymi związanymi z kompleksami żelazo-transferyna – żelazo całkowite (SI), całkowita (TIBC) i utajona (UIBC) zdolność wiązania żelaza.

Celem badań przedstawionych w niniejszej pracy jest skonstruowanie optoelektronicznych detektorów jonów żelaza typu PEDD (ang. *Paired Emitter Detector Diode*- sparowane detektory diodowe) i przystosowania ich do pomiarów w warunkach analizy przepływowej w systemach typu MCFA (ang. *MultiCommutated Flow Analysis*), charakterystyka i optymalizacja tych systemów analitycznych, finalne sprawdzenie i zademonstrowanie ich praktycznej użyteczności do analizy rzeczywistych próbek farmaceutycznych (suplementy) i klinicznych (surowice), a także do wyznaczania parametrów klinicznych związanych z metabolizmem żelaza. Wszystkie pomiary opierają się na pH-zależnym powinowactwie transferryny do żelaza. W pH fizjologicznym transferryna wykazuje najwyższe powinowactwo do jonów żelaza (III) – wychwytuje „wolne” żelazo, natomiast przy pH ok. 4,5, w którym powinowactwo jest najniższe żelazo uwalniane jest z kompleksów z transferryną.

W rozprawie opisano opracowane podczas badań detektory PEDD przeznaczone do fotometrycznego oznaczania jonów żelaza. Zaproponowano budowę detektorów do analizy zawartości jonów żelaza trzema metodami fotometrycznymi - z użyciem 1,10-fenantroliny, ferrozyny i ferenu s. W celu mechanizacji procedury pomiarowej detektory te zostały przystosowane do użycia w warunkach analizy przepływowej. W tym celu zaprojektowano, skonstruowano i zoptymalizowano różnorodne systemy MCFA. Mechanizacja układu pomiarowego wpływa na poprawę wielu parametrów, w tym koszty, czas, odtwarzalność i powtarzalność otrzymanych wyników. Wszystkie przedstawione detektory zintegrowane z układami przepływowymi wykorzystano do analizy próbek rzeczywistych, takich jak farmaceutyki oraz surowice krwi.

Pierwsze badania dotyczyły analizy próbek o nieskomplikowanej i znanej matrycy oraz dużej zawartości analitu – produktów farmaceutycznych zawierających żelazo. Opracowany system umożliwia nie tylko wyznaczenie ich zawartości, ale także monitorowanie oraz badanie kinetyki uwalniania tego suplementu z preparatów farmaceutycznych. Układ ten posłużył do oznaczenia zawartości jonów żelaza w komercyjnie dostępnych preparatach farmaceutycznych. Uzyskano wyniki zgodne z metodą referencyjną.

Drugi etap badań polegał na przystosowaniu metod analitycznych do pomiarów zawartości żelaza w próbkach surowicy krwi. W zaprezentowanych badaniach przedstawiono analityczne porównanie trzech metod oznaczania żelaza w surowicy krwi. W celu mechanizacji procedury pomiaru opracowano rozbudowany system PEDD-MCFA. Sprawdzone także wpływ interferentów (tj. białko, cynk, miedź) na oznaczenia zaprezentowanych metod. Następnie przeprowadzono analizę surowic syntetycznych, aby potwierdzić przydatność kliniczną badanych metod w oznaczaniu żelaza próbkach rzeczywistych. Jedynie zastosowanie 1,10-fenantroliny nie spełniło oczekiwań ze względu na niską czułość oraz liczne interferencje. W pozostałych przypadkach parametry analityczne i statystyczne były wystarczające do analizy klinicznej surowic pobranych od pacjentów. Prezentowany system MCFA jest pierwszą próbą zastosowania takiego typu układu do oznaczania żelaza w surowicy. Uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę bardziej zaawansowanych badań metabolizmu żelaza.

Trzeci etap badań polegał na skonstruowaniu układu przepływowego, w którym możliwe będzie nieimmunochemiczne oznaczenie wszystkich trzech parametrów związanych

z metabolizmem żelaza – SI, UIBC oraz TIBC. Opracowany system analityczny opiera się na prostym fotometrycznym wykrywaniu wolnych jonów żelaza (uwolnionych z kompleksu lub nadmiarowych po wysyceniu transferryny). Bazując na pH-zależnych równowagach żelazo-transferryna opracowany system bioanalityczny umożliwia pośrednie oszacowanie poziomu całkowitej transferryny w surowicy (poprzez parametr TIBC), a także wolnych (*apo*) i związanych z żelazem (*holo*) form tej metaloproteiny. Zaprezentowana metoda może stanowić atrakcyjną alternatywę dla kosztownych i pracochłonnych metod immunochemicznych. Przydatność analityczna zaproponowanej metody została potwierdzona eksperymentalnie z użyciem certyfikowanych wzorców surowicy krwi ludzkiej.

Badania zostały wykonane w ramach realizacji projektów NCN:

- ✓ „Systemy bioanalityczne do badań klinicznie istotnych form transferryny w surowicy” Preludium 2014/15/N/ST4/02220
- ✓ „Immunochemiczne strategie monitorowania homeostazy żelaza w warunkach analizy przepływowej” Sonata 2016/21/D/ST4/00924