

Streszczenie

Mocznik, jako marker wydaliniczej funkcji nerek oraz chorób metabolicznych u ludzi, jest ważnym analitem w diagnostyce medycznej. Jest on końcowym produktem rozpadu białek w cyklu metabolicznym zachodzącym głównie w wątrobie. Choroby metaboliczne mogą być wrodzone lub nabyte. Te ostatnie wynikające ze stylu życia, mieszczącym w sobie niewłaściwą dietę, infekcje wirusowe, nadużywanie alkoholu, mogą prowadzić do częściowej lub całkowitej dysfunkcji wątroby. Zależnie od stopnia upośledzenia funkcji wątroby prowadzone są różne terapie mające na celu regenerację tego narządu, natomiast w ciężkich przypadkach zwykle konieczny jest przeszczep. Duża część badań prowadzona jest z wykorzystaniem hodowli komórkowych z użyciem komórek pochodzenia wątrobowego, linii komórkowych i komórek izolowanych z pobranych fragmentów narządów ludzkich i zwierzęcych. Jednakże czas hodowli hepatocytów *in vitro* jest bardzo krótki, ponieważ komórki te zmieniają swoje cechy morfologiczne i fizjologiczne. W badaniach związanych z hodowlami komórkowymi szczególne zastosowanie mogą znaleźć mikroukłady analityczne.

Celem rozprawy było opracowanie dwóch metod oznaczania mocznika z wykorzystaniem optycznych układów mikroprzepływowych wykonanych w technologii niskotemperaturowego współwypalania ceramiki (ang. *low-temperature co-fired ceramic*, LTCC), które pozwoliłyby na oznaczenia mocznika w próbkach biologicznych, np. pożywce hodowlanej i lizatach komórkowych. Badania zostały podzielone na kilka etapów. W pierwszym etapie wybrano dwie metody oznaczania mocznika, enzymatyczną i nieenzymatyczną. Pierwsza metoda jest metodą pośrednią, wykorzystującą zmodyfikowaną metodę Berthelota, w której stężenie mocznika jest wyznaczane na podstawie wzrostu stężenia jonów amonowych, powstających w reakcji hydrolizy mocznika i katalizowanej przez ureazę. W drugiej części reakcji jony amonowe w reakcji z salicylanem sodu i podchlorynem sodu w obecności nitroprusydku sodu w środowisku silnie zasadowym tworzą produkt barwny - sól indofenolową. W drugiej metodzie wykorzystywana jest bezpośrednia reakcja mocznika z dimetyloglioksymem w środowisku silnie kwaśnym w temperaturze 100°C. Przeprowadzono szereg badań, w wyniku których zoptymalizowano warunki oznaczania mocznika w układach mikroprzepływowych z wykorzystaniem obu metod.

W przypadku metody enzymatycznej, w pierwszym etapie badań dobierano podłoża oraz opracowywano metody unieruchomienia enzymu na ich powierzchni. Badano podłoża szklane, krzemowe, polimerowe i ceramiczne. Funkcjonalizacje tych podłoży przeprowadzono różnymi metodami, m.in. wykorzystującą adsorpcję fizyczną, wiązanie kowalencyjne za pomocą aminosilanu i aldehydu glutarowego oraz epoksysilanu. Badania właściwości fizyko-chemicznych modyfikowanych powierzchni zostały przeprowadzone przy użyciu mikroskopii sił atomowych (AFM), spektrometrii mas jonów wtórnych z analizatorem czasu przelotu (ToF-SIMS), skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM), spektrometrii podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) i analizy kąta zwilżania. Efektywne unieruchomienie ureazy na powierzchni ceramicznej uzyskano z wykorzystaniem wiązań kowalencyjnych, utworzonych z użyciem aminosilanu i aldehydu glutarowego. Aktywność tak unieruchomionego enzymu, w 30 dniowym cyklu pomiarowym była duża i wynosiła 87% w stosunku do pierwszego dnia pomiarowego. W przypadku enzymatycznego oznaczenia mocznika w układzie mikroprzepływowym z detekcją optyczną, najwyższą czułość (1,43 ABS/mM) uzyskano dla szybkości przepływu 4 $\mu\text{l}/\text{min}$, uzyskując liniową odpowiedź str. 9

układu w zakresie stężeń mocznika do 0,8 mM z dolną granicą detekcji (ang. *low limit of detection*, LOD) - 0,004 mM i granicą oznaczalności (ang. *low limit of quantification*, LOQ) - 0,009 mM. Tak skonstruowany układ z mikroreaktorem enzymatycznym umożliwił oznaczenie stężeń mocznika w płynach biologicznych, takich jak lizaty komórkowe i pożywka pochodzlana. Próbkki biologiczne, w których oznaczano mocznik, pochodziły z hodowli niemodyfikowanych i modyfikowanych genetycznie komórek linii wątrobiaka C3A. Komórkki modyfikowane genetycznie miały wprowadzone do swojego plazmidu, za pomocą lentivirusa, geny dwóch białek arginazy i karbamoiltransferazy ornitynowej. Różnice oznaczeń mocznika w lizatach komórkowych linii C3A w opracowanym mikroukładzie typu LTCC i z wykorzystaniem testów komercyjnych *BioMaxima* i *QuantiChrom™* wynoszą odpowiednio 9% i 2%. Stężenie mocznika w lizatach komórek modyfikowanych genetycznie z dwoma wprowadzonymi genami (C3A_ARGI_OTCIII) było o około 5% wyższe niż w komórkach niemodyfikowanych C3A. Natomiast stężenie mocznika w pożywce pochodzlanej komórek C3A_OTCIII i C3A_ARGI_OTCIII jest o około 50% wyższe niż w komórkach linii C3A. Wyniki te potwierdziły I tezę rozprawy dotyczącą możliwości wykorzystania podłoża ceramicznego typu LTTC do kowalencyjnego związania z nim ureazy dla potrzeb opracowania analitycznego układu mikroprzepływowego do oznaczeń mocznika w płynach biologicznych. Oznaczenia mocznika w płynach biologicznych, takich jak lizaty komórkowe i pożywka pochodzlana z wykorzystaniem metody enzymatycznej wykonano w próbkach o objętości 1 μ l. Uzyskano w ten sposób potwierdzenie drugiej tezy niniejszej rozprawy doktorskiej, mówiącej o możliwości wykonania badań z wykorzystaniem mikroprzepływowego układu analitycznego z detekcją optyczną w próbkach biologicznych o małej objętości.

W przypadku metody nieenzymatycznej, głównym problemem w opracowaniu mikroukładu analitycznego jest konieczność prowadzenia reakcji kondensacji mocznika z dimetyloglioksymem w stosunkowo wysokiej temperaturze 100°C. W wyniku optymalizacji uzyskano obniżenie temperatury reakcji do 72°C, spowodowało to spadek czułości metody do wartości 0,029 ABS/mM dla szybkości przepływu 4 μ l/min. W przypadku badań próbek biologicznych w postaci pożywki pochodzlanej, w których oznaczenia mocznika były prowadzone metodą nieenzymatyczną, najlepsze wyniki uzyskano dla próbek o większej objętości - 30 μ l.

Według najlepszej wiedzy autora, wynikającej z analizy literatury przedmiotowej, opisany w rozprawie układ jest pierwszym mikroukładem z detekcją optyczną do oznaczeń mocznika metodą enzymatyczną, który może być wykorzystywany do badań próbek o małej objętości pochodzących z hodowli komórkowych. Zazwyczaj oznaczenia tego typu są przeprowadzane w warunkach stacjonarnych z wykorzystaniem testów komercyjnych. Wyniki uzyskane z wykorzystaniem opracowanych mikroukładów z detekcją optyczną są porównywalne z wynikami testów komercyjnych, są one miarodajne i powtarzalne. Należy dodać, iż opracowane metody i mikroukłady analityczne z detekcją optyczną pozwoliły na ocenę i porównanie produkcji mocznika przez komórki linii C3A niemodyfikowane oraz modyfikowane genetycznie z przywróconym cyklem mocznikowym.

Dalsze badania będą poświęcone wykorzystaniu opracowanego mikrosystemu analitycznego do monitorowania stężenia mocznika wytwarzanego przez komórki pochodzenia wątrobowego *in vitro*, co pozwoli na ocenę funkcji komórek *on-line*, a ponadto obniży koszty badań ze względu na zmniejszoną objętość testowane próbki.