

Streszczenie.

Głównym celem badań przedstawionych w niniejszej pracy było opracowanie nowych, bezznacznikowych, szybkich metod analitycznych umożliwiających pomiar stężenia wybranych proteaz w próbkach naturalnych, które mogą być wykorzystywane jako metody konkurencyjne do testów ELISA bazujących na wykorzystaniu znaczników.

Skonstruowano trzy nowe biosensory z detekcją metodą SPRI do oznaczeń ilościowych proteaz: MMP-1, MMP-2, katepsyny L. Opracowanie nowych biosensorów czułych na wymienione proteazy składało się z następujących etapów:

- wybór odpowiedniego tiolu,
- wybór odpowiedniego receptora wiążącego badany enzym z próbki oraz wyznaczenie jego optymalnego stężenia na powierzchni biosensora,
- sporządzenie krzywej kalibracyjnej na podstawie, której wyznaczano stężenie tego enzymu w próbkach,
- dla biosensora czułego na katepsynę L wyznaczenie pH roztworu, w którym wykazuje ona optymalną aktywność w stosunku do receptora- inhibitora i najefektywniej się z nim wiąże,
- określenie selektywności,
- określenie precyzji i dokładności metody,
- wyznaczenie limitu detekcji oraz oznaczalności,
- pomiary stężenia każdego z enzymów w różnego rodzaju próbkach naturalnych.

Przy konstrukcji poszczególnych biosensorów monitorowano tworzenie się kolejnych warstw związków na powierzchni poprzez badania z użyciem mikroskopu sił atomowych- AFM (dla MMP-1 i MMP-2) lub skaningowego mikroskopu elektronowego- SEM (dla katepsyny L).

Bardzo ważnym elementem w procesie walidacji nowo opracowanych metod było porównanie stężeń każdego z enzymów oznaczonych, w różnego rodzaju próbkach naturalnych, za pomocą biosensorów SPRI z wynikami otrzymanymi przy użyciu testów ELISA. Porównanie potwierdziło dobrą korelację wyników z obu metod co stwarza możliwość wykorzystania tych biosensorów w diagnostyce laboratoryjnej jako metodę konkurencyjną w stosunku do testów immunoenzymatycznych.

W pracy przedstawiono również pomiary aktywności enzymatycznej katepsyny L, co potwierdziło tendencję zmian ilości tego enzymu w próbkach naturalnych wyznaczoną z użyciem biosensora SPRI..

W celu potwierdzenia użyteczności diagnostycznej biosensorów SPRI czułych na takie proteazy jak: katepsyny B, D i oraz inhibitor katepsyny B - cystatynę C przeprowadzono szereg pomiarów stężenia tych enzymów w różnych próbkach naturalnych (osocze, surowica krwi, mocz).

Otrzymane wyniki tych badań potwierdziły możliwość zastosowania pomiarów stężenia tych enzymów w kontroli przebiegu choroby oraz monitoringu chorego po przebytych procesach zapalnych, zabiegach, urazach.

Wrocław, 12.09.2017r.

Anna Tokanem'er