Radosław Kwapiszewski – Streszczenie rozprawy doktorskiej

Badania nad opracowaniem mikrosystemów diagnostycznych z detekcją fluorescencyjną

Wczesna i trafna diagnoza rzadkich schorzeń jest poważnym problemem i ogromnym wyzwaniem. Szacuje się, że około 350 milionów ludzi na świecie cierpli na rzadkie schorzenia. Do rzadkich schorzeń zalicza się między innymi lizosomalne choroby spichrzeniowe – grupę około 50 schorzeń uwarunkowanych genetycznie, u podstaw których leżą zaburzenia funkcji lizosomów polegające między innymi na deficycie aktywności wybranych enzymów. Na podstawie uzyskanej aktywności pacjent może być sklasyfikowany do jednej z trzech grup terapeutycznych: zdrowych, chorych lub nosicieli schorzenia.

W chwili obecnej diagnostyka lizosomalnych chorób spichrzeniowych nastręcza ogromnych problemów. Zrozumiałym jest, że dla osób z wczesnym rozpoznaniem schorzenia, skuteczność dostępnych terapii jest zdecydowanie większa. Zdarza się, że od wystąpienia objawów do postawienia diagnozy mija nawet kilkanaście lat, co spowodowane jest niską częstością występowania tych schorzeń, a także ciągle zbyt małą wiedzą na ich temat. Ponadto same dostępne metody diagnostyki nie są doskonałe – uzyskuje się wiele wyników fałszywie-pozytywnych i fałszywie-negatywnych. Najskuteczniej choroby spichrzeniowe można zdiagnozować przeprowadzając badania genetyczne, jednak duża liczba odkrywanych mutacji w genach kodujących dany enzym sprawia, że poszukiwane są alternatywne metody diagnostyczne. Ze względu na oszczędność czasu, przestrzeni oraz redukcję kosztów analizy obiecujące wydaje się wykorzystanie mikrosystemów analitycznych. Dodatkowymi atutami wynikającymi z użycia miniaturowych systemów do diagnostyki chorób spichrzeniowych jest możliwość przeprowadzenia wielu etapów analizy w jednym urządzeniu oraz szansa na prowadzenie wysokoprzepustowych badań przesiewowych.

W ramach doktoratu opracowano warstwowy, polimerowy mikrosystem składający się z modułu do ogniskowania wprowadzonej zawiesiny komórek, mikromieszalnika oraz światłowodowego modułu do detekcji fluorescencji. Mikrosystem jest prosty w swojej budowie, wytworzony jest z taniego i powszechnie dostępnego materiału techniką mikrofrezowania oraz może być wytwarzany masowo. Ważną jego zaletą jest to, że warstwowa geometria kanałów może umożliwić oznaczenie aktywności wielu enzymów równolegle na jednej próbce od pacjenta.

Zaproponowana metoda pomiaru aktywności danego enzymu polega na spektrofluorymetrycznym pomiarze ilości przekształconego substratu, pochodnej 4-metyloumbeliferonu. Czas reakcji enzymatycznej sterowany jest przepływami wprowadzanych do systemu reagentów. Odpowiednia geometria światłowodowej celki pomiarowej umożliwiła uzyskanie limitu detekcji 4-metyloumbeliferonu na poziomie 200 nM, co pozwoliło na oznaczenie ilości uwolnionego produktu już po pierwszej minucie trwania reakcji. W efekcie opracowany system pozwala na skrócenie całkowitego czasu analizy do 20 minut, podczas gdy sam etap inkubacji enzymu z substratem w skali makro wynosi nawet 2 godziny.

Badania potwierdzające użyteczność opracowanego systemu zostały przeprowadzone zarówno na ludzkich liniach komórkowych jak i leukocytach wyizolowanych z krwi dorosłych. Uzyskane wyniki aktywności enzymów zostały skorelowane z wynikami uzyskanymi w oparciu o obecnie stosowane procedury i potwierdziły, że opracowany system może być z powodzeniem wykorzystywany do określania aktywności enzymów wewnątrzkomórkowych i pełnić rolę narzędzia diagnostycznego.

Dodatkowo, podczas prowadzenia badań nad systemem diagnostycznym, zaobserwowano dwa efekty: zależny od temperatury efekt inhibicji substratowej dla β-glukocerebrozydazy, α-galaktozydazy oraz β-galaktozydazy, a także wpływ stosunku powierzchni do objętości celki pomiarowej na intensywność mierzonego sygnału fluorescencji.

R. Kwapiszewski