

STRESZCZENIE

Zasadniczym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie oryginalnych układów analitycznych, bazujących na technice wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oraz spektroskopii emisyjnej (fluorescencja, chemiluminescencja) do oznaczania i badania właściwości wybranych witamin wodno-rozpuszczalnych w krwi pełnej, w dializacie z otrzewnej oraz w stanie chemicznie czystym.

Zaproponowane układy analityczne zestawiono w badaniach klinicznych względem istniejących rozwiązań pod kątem możliwości ich zastosowania w nowoczesnej analityce biomedycznej i określono ich przydatność, stosując zarówno klasyczne metody analizy statystycznej, jak i nowoczesne narzędzia chemometryczne. Opracowane metody zastosowano w analizie próbek pełnej krwi 50 regularnie hemodializowanych pacjentów oraz 41 leczonych metodą dializy otrzewnej. Prócz tego praktycznego aspektu określono również właściwości fizykochemiczne badanych układów, m.in. kinetykę formowania fluoryzujących pochodnych, jak również czasy życia fluorescencji docelowych analitów – tiochromów.

W ramach badań określono stężenia aktywnej formy witaminy B₁, to jest difosforanu tiaminy (ThDP) w pełnej krwi na średnim poziomie $50,6 \pm 47,3$ ng/ml przed zabiegiem hemodializy oraz $24,1 \pm 23,5$ ng/ml w próbkach pobranych bezpośrednio po zabiegu. Zaobserwowano wśród pacjentów mocno zróżnicowany ubytek stężenia ThDP, który wahał się od kilku procent do wartości bliskich 100% w niektórych przypadkach. Zestawienie wyników uzyskanych z udziałem opracowanego testu z walidowanym testem dostępnym na rynku potwierdziło jego wysoką jakość, powtarzalność uzyskanych rezultatów i tym samym – przydatność w badaniach klinicznych.

Zastosowanie analizy głównych składowych (PCA) ujawniło zależność stopnia wypłukiwania tej witaminy od rodzaju zastosowanego typu dializera i błony dializacyjnej, diurezy, stężenia kreatyniny i hemoglobiny oraz ilości czerwonych krwinek.

Określenia poziomów witamin B₁ i B₆ wykonano w matrycy wcześniej nie badanej pod tym kątem – mianowicie w dializacie z otrzewnej. Próbkę dializatu z otrzewnej pobierano podczas wykonywania tzw. testu równoważenia otrzewnej (PET) – odpowiednio w 2 i 4-tej godzinie testu oraz po całodobowej wymianie. Okazało się, że

zabiegi dializy otrzewnowej, podobnie jak zabiegi hemodializy, również predysponują do wypłukiwania witaminy B₁ i B₆ z organizmu pacjentów, lecz ubytek w tym wypadku jest znacząco niższy, aniżeli w przypadku ostatniego podejścia. Mimo bardzo niskich stężeń matrycowych analitów, w badanej grupie pacjentów udało się określić stężenia w dializatach z otrzewnej, które wahały się w granicach 0,43 – 6,88 ng/ml dla monofosforanu tiaminy, 0,45 – 50,24 ng/ml dla difosforanu tiaminy, 0,08 – 2,61 ng/ml, dla pirydoksyny, 0,09 – 17,26 ng/ml dla pirydoksalu oraz 0,08 – 3,64 ng/ml dla pirydoksaminy. Oznaczone zawartości witamin były niższe, aniżeli zalecane dobowe spożycie, jak również nie przekraczały ilości wydalanych z moczem przez zdrowe osoby. Poziom wypłukiwania wzrastał wraz z czasem wykonywania wspomnianego testu PET i w wielu przypadkach był blisko dwukrotnie wyższy dla próbek pobranych po 24-godzinnej wymianie, w stosunku do próbek gromadzonych w 2-giej godzinie tego testu. Zastosowane metody statystyczne nie ujawniły istotnych zależności pomiędzy stężeniami kolejnych analitów z innymi parametrami klinicznymi, opisującymi badaną grupę pacjentów.

Dodatkowym celem niniejszej rozprawy było określenie możliwości zastosowania procesu chemicznie indukowanej luminescencji do badania właściwości przeciwutleniających wybranych związków biologicznie czynnych i suplementów diety, między innymi wodnorozpuszczalnej witaminy C (kwasu askorbinowego). W tym oryginalnym podejściu jako indykatory luminescencji zastosowano specjalnie syntezowane chemiluminogenne sole akrydynowe, w tym triflat 10-metylo-9-(fenoksykarbonylo)-akrydynowy. Proponowana metoda opiera na się na pomiarze zmian parametrów emisji wspomnianego związku (kinetyka zaniku promieniowania) z alkalicznego roztworu nadtlenu wodoru w obecności substancji przeciwutleniających w stosunku do emisji rejestrowanej bez tego typu dodatków. Z uwagą na bardzo dobrą kinetykę emisji indykatora, zaobserwowano jedynie znikomy wpływ barwy czy zmętnienia próbki na możliwości analityczne omawianej metody, co czyni ją bardziej uniwersalną i czułą, aniżeli klasyczne rozwiązania, oparte na pomiarze efektywności chemiluminescencji luminolu.