

Użycie nowych metod analitycznych opartych na biosensorach SPRi w panelu diagnostycznym w chorobach neurodegeneracyjnych oraz onkologicznych

Poszukiwanie alternatywnych dróg w analizie diagnostycznej jest dziedziną, która chce opierać swoje nowe trendy na prostocie metod, wysokiej czułości oznaczeń i możliwości zastosowania nie tylko w wysoce wykwalifikowanych jednostkach badawczych. W dzisiejszych czasach stanowi to poniekąd wyzwanie, ze względu na postęp technologiczny, a także ogólną wiedzę na temat jednostek chorobowych. Wiemy już, że poszukiwanie biomarkerów charakterystycznych dla danej choroby, nawet w skali pikogramów może informować o stanie patologicznym pojawiającym się w organizmie człowieka.

Podczas badań wchodzących w rozprawę doktorskiej skonstruowano 10 nowych biosensorów SPRi (czułych na HIF-1 α , angiopoetynę-2 (ANG-2), interleukinę-1 β (IL-1 β), 2,3-dioksygenazę indoloaminy (IDO-1), interferon- γ (IFN- γ), dwa biosensory o różnych podstawach na fosfo-tau-181 (ptau-181), białko całkowite tau (total tau), erytropoetynę (EPO) i YKL-40, które stanowiły podstawę nowych metod analitycznych, a następnie paneli diagnostycznych trzech jednostek chorobowych:

- Glejaka mózgu;
- Choroby Alzheimerera;
- Raka pęcherza.

W badaniach wykorzystano również trzy czujniki (czułe na VEGF-A, FGF-2, VEGFR-2), skonstruowane wcześniej w Pracowni Bioanalizy. W budowie stosowanych biosensorów zastosowano różne modyfikacje powierzchni, które wymagały użycia trzech różnych tioli. Pozwoliło to na ocenę otrzymanych parametrów analitycznych, aby otrzymać jak najbardziej precyzyjną i dokładną matrycę do oznaczeń. Konstrukcje zawierały od bardzo prostych, po skomplikowane protokoły przygotowania warstw receptorowych biosensora. Wykorzystano m.in. klasyczną konstrukcję na tiolu – cysteaminie, a także nowe konstrukcje z użyciem kwasu 11-merkaptoundekanowego, a także 3-merkaptopropanolu. Konstrukcja z użyciem 11-MUA okazuje się być najbardziej efektywna, ze względu na krótki czas przygotowania, a także bardziej stabilną strukturę SAM. Najbardziej

czasochłonna i skomplikowana okazała się konstrukcja z 3-merkapto-1-propanolem, w której nie obserwuje się znaczących różnic dotyczących parametrów LOD i LOQ. Dla każdej z metod opartych na biosensorze SPRi wyznaczono parametry analityczne, a więc poddano ją walidacji i ocenie przydatności użycia. Najważniejsze wyznaczone parametry to granica wykrywalności i oznaczalności, a także precyzja, dokładność i selektywność, gdzie wyznaczano odpowiednie współczynniki zmienności, odchylenia standardowe i odzyski dla badania selektywności nowych metod. Po akceptacji pierwszego etapu procesu walidacji przystąpiono do sprawdzenia przydatności czujników, czyli oznaczenia w materiale biologicznym. Wyniki porównywano z literaturowymi wartościami otrzymywanymi przez inne zespoły badawcze z użyciem testu ELISA, a także przez dodatkowe oznaczenia w tych samych próbkach z wykorzystaniem tej certyfikowanej metody. Biosensory SPRi połączono w odpowiednie kombinacje w panelach analitycznych do diagnostyki wyżej wymienionych chorób. Wszystkie wyniki poddano analizie statystycznej, by stwierdzić istotne różnice pomiędzy grupą pacjentów z danym schorzeniem a grupą kontrolną. Analizowano również wpływ różnych parametrów dostępnych w opisie klinicznym na poziomy badanych biomarkerów i relacje między nimi.

Uzyskane zależności pozwoliły na sformułowanie odpowiednich wniosków, związanych z funkcją biologiczną i występowaniem danego potencjalnego biomarkera. W przypadku diagnostyki glejaka mózgu zbadano również czynniki środowiskowe, które mogą wpłynąć na poziomy badanych biomarkerów, a co za tym idzie, na zachorowanie na glejaka mózgu. Pozwala to na nowe podejście do diagnostyki badanych chorób i zaproponowanie nowej analizy wieloparametrowej. Dodatkowo sporządzone krzywe ROC potwierdzają, że wykonane testy diagnostyczne rozróżniają grupy chorych od grup kontrolnych, a także charakteryzują się odpowiednią czułością i swoistością dla danego biomarkera.