

## Strzeszczenie

Ze względu na brak wystarczającej ilości informacji na temat utraty witamin oraz pierwiastków śladowych w trakcie stosowania ciągłych terapii nerkozastępczych, celem niniejszej pracy doktorskiej było określenie szlaków utraty tych związków w wyniku zastosowanego leczenia. Wśród specjalistów zajmujących się ciągłymi terapiami nerkozastępczymi opinie na temat przyczyn niedoboru witamin i zaburzenia poziomu pierwiastków śladowych u chorych są podzielone. Główne hipotezy sugerują usuwanie tych związków wraz z ultrafiltratem, adsorpcję na błonach hemofiltrów, bądź niewystarczającą podaż witamin w diecie.

Biorąc pod uwagę wyżej wymienione wyzwania celem niniejszej pracy doktorskiej było opracowanie procedury zateżania, wyodrębniania i ilościowego oznaczania witamin rozpuszczalnych w wodzie (witamina C oraz witaminy z grupy B) i pierwiastków śladowych (Zn, Cu, Cr, Cd, Pb, Ni) z ultrafiltratów pacjentów poddawanych ciągłej terapii nerkozastępczej oraz jej praktyczne wdrożenie do praktyki klinicznej. Założono, iż opracowana procedura zostanie wdrożona do praktyki klinicznej na Oddziale Intensywnej Terapii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

W pierwszej kolejności sprawdzono czy usuwanie witamin rozpuszczalnych w wodzie jest wynikiem ich sekwestrowania się na powierzchni hemofiltrów. Wykazano brak sekwestrowania się witamin na hemofiltrach stosowanych w aparatach ciągłych terapii nerkozastępczych, co wskazuje na możliwość ich usuwania wraz z ultrafiltratem. Z tego też względu, w kolejnym etapie badań opracowano metodyki izolacji i oznaczania witamin oraz wybranych pierwiastków śladowych w próbkach biologicznych.

W wyniku przeprowadzonych badań opracowano i poddano walidacji kompleksową procedurę oznaczania witamin rozpuszczalnych w wodzie i wybranych pierwiastków śladowych. Ponadto przeprowadzono serię badań próbek klinicznych, w wyniku których w ultrafiltratach oznaczono witaminy rozpuszczalne w wodzie i pierwiastki śladowe, m.in. takie jak: kadm, ołów, nikiel, chrom, miedź, cynk.

W toku prowadzonych badań dokonano optymalizacji analizy 12 witamin rozpuszczalnych w wodzie w jednym przebiegu chromatograficznym, z zastosowaniem HPLC-UV/Vis oraz LC-MS/MS. Do oczyszczania próbek ultrafiltratów przetestowano przydatność żywic jonowymiennych Amberlite XAD 2, DEAE Sephadex oraz mieszaniny tych żywic w stosunku wagowym 2:1, technikę SPE oraz odwróconą osmozę. Przeprowadzone badania wykazały wysoką zdolność oczyszczania żywicy DEAE Sephadex. Metodykę izolacji i oznaczania 12 witamin w ultrafiltratach z zastosowaniem żywicy

jonowymiennej do oczyszczania próbek oraz LC-MS/MS jako techniki oznaczeń końcowych poddano walidacji. Powyższą metodykę zastosowano do analizy próbek ultrafiltratów pochodzących od pacjentów poddawanych ciągłej hemodiafiltracji, a w analizowanych ultrafiltratach wykazano obecność większości witamin: B1, B2, B3 w formie amidu kwasu nikotynowego, B5, B7 i dwie formy witaminy B6 (pirydoksal i pirydoksamina). Nie wykryto natomiast witaminy B12, a stężenie wykrytych witamin: B9, B6 w postaci pirydoksyny i B3 w postaci kwasu nikotynowego oscylowało na poziomie LOQ lub było poniżej granicy oznaczalności.

Przetestowano kilka metod przygotowania próbek ultrafiltratów do oznaczania pierwiastków śladowych. Do roztworzenia próbek biologicznych zastosowano ostatecznie mineralizację stężonym  $\text{HNO}_3$  wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym, jako metodę oznaczeń końcowych zastosowano ASA. Opracowaną metodykę MAE/ASA poddano walidacji - może być ona z powodzeniem stosowana do oznaczania wybranych pierwiastków śladowych w próbkach ultrafiltratów. Wyniki badań uzyskanych w ramach niniejszej pracy wskazują na usuwanie wraz z ultrafiltratem powstałym na skutek zastosowanej terapii takich pierwiastków jak: kadm, ołów, chrom, cynk oraz nikiel. W większości badanych ultrafiltratów stężenie miedzi nie przekroczyło stężenia  $0,1 \mu\text{g/l}$ .

Wyniki badań uzyskanych w ramach niniejszej pracy jednoznacznie potwierdzają usuwanie niektórych witamin rozpuszczalnych w wodzie oraz pierwiastków śladowych wraz z ultrafiltratem, co pozwala wnioskować o konieczności monitorowania pacjentów poddawanych terapii nerkozastępczej.