

OZNACZANIE POTENCJALNIE CHARAKTERYSTYCZNYCH BIAŁEK PROZAPALNYCH I PROANGIOGENNYCH JAKO NOWY OBSZAR ROZWOJU MATRYCOWYCH BIOCZUJNIKÓW SPRi

DETERMINATION OF POTENTIALLY CHARACTERISTIC
PRO-INFLAMMATORY AND PRO-ANGIOGENIC PROTEINS
AS A NEW AREA OF DEVELOPMENT OF SPRi MATRIX
BIOSENSORS

Łukasz Oldak^{1,*}, Ewa Gorodkiewicz¹

¹ *Pracownia Bioanalizy, Wydział Chemii, Uniwersytet w Białymstoku, ul.
Ciołkowskiego 1K, 15-245 Białystok
e-mail: oldak.lukas@gmail.com

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Potencjalne biomarkery nowotworowe a glejak
 - 1.1. Znaczenie MMP-1, UCH-L1 i proteasomu 20S w glejaku
 - 1.2. Znaczenie katepsyn B, D i S w glejaku
 - 1.3. Znaczenie lamininy-5, fibronektyny i kolagenu IV w glejaku
 2. Diagnostyka glejaka
 - 2.1. Neuroobrazowanie
 - 2.2. Diagnostyka molekularna
 - 2.3. Biopsja i badanie histopatologiczne
 3. Bioczujniki SPRi
 4. Oznaczenia wybranych potencjalnych biomarkerów glejaka
 - 4.1. Materiał badawczy
 - 4.2. Przygotowanie bioczujników
 5. Wyniki oznaczeń
 - 5.1. Analiza statystyczna
 - 5.2. Oznaczenia katepsyny B, D i S
 - 5.3. Oznaczenia lamininy-5, fibronektyny, kolagenu IV
 - 5.4. Oznaczenia UCH-L1, proteasomu 20S, MMP-1
 6. Podsumowanie i dyskusja
- Piśmiennictwo cytowane
-

Dr Łukasz Oldak jest pracownikiem naukowo-dydaktycznym Pracowni Bioanalizy Wydziału Chemii Uniwersytetu w Białymstoku. W 2023 roku obronił pracę doktorską związaną z oznaczeniami potencjalnych biomarkerów glejaka, za którą został nagrodzony przez Komitet Chemii Analitycznej PAN. Poza tym prowadzi badania z zakresu opracowywania i rozwoju nowych metod bioanalitycznych ze szczególnym uwzględnieniem rozwoju biosensorów, bierze czynny udział w popularyzacji nauki oraz macierzystego Wydziału.



 <https://orcid.org/0000-0003-1829-7466>

Prof. dr hab. Ewa Gorodkiewicz jest kierownikiem Pracowni Bioanalizy Wydziału Chemii Uniwersytetu w Białymstoku. Członkini IUPAC, w latach 2002 – 2004 odbyła staż naukowy w TU Dresden w Niemczech. Swoje zainteresowania naukowe skupia przede wszystkim wokół powierzchniowego rezonansu plazmonowego oraz konstrukcji i komercjalizacji biosensorów.



 <https://orcid.org/0000-0002-3680-054X>

ABSTRACT

This paper presents new methods for determining potential glioma biomarkers that can support the diagnosis of this tumor. The presented methods of determination have demonstrated the ability to distinguish advanced glioma grades (G3 and G4) from the control group (K) and mild grades (G1 and G2) based on the concentration values of the determined analytes. The blood-brain barrier probably makes it difficult to quantitatively detect biomarkers in milder grades of the disease, which limits their use in early diagnosis. However, studies indicate that the concentrations of the determined potential biomarkers are independent of the IDH 1/2 mutation and show positive correlations with each other, which suggests their potential synergistic effect. Due to the high sensitivity and specificity of the proposed methods, confirmed by ROC analysis, they can support imaging techniques in distinguishing between the grades of glioma advancement, especially in differentiating between grades G2 and G3.

Keywords: glioma, biomarker, SPRI, clinical chemistry, diagnostic

Słowa kluczowe: glejak, biomarker, SPRI, chemia kliniczna, diagnostyka

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ATRX	– remodeler chromatyny ATRX
CCD	– urządzenie ze sprzężeniem ładunkowym
DTI	– obrazowanie tensora dyfuzji
ECM	– macierz zewnątrzkomórkowa
EDC	– 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimid
FDG	– fluorodeoksyglukoza
GBM	– glejak wielopostaciowy
IDH 1/2	– dehydrogenaza izocytrynianu 1 i 2
MGMT	– metylacja promotora genu MGMT
MMP-1	– metaloproteinaza 1 macierzy zewnątrzkomórkowej
MRI	– obrazowanie rezonansu magnetycznego
MRS	– spektroskopia rezonansu magnetycznego
NGS	– sekwencjonowanie następnej generacji
NHS	– N-hydroksysukcynimid
PET	– pozytonowa tomografia emisyjna
ROC	– ocena jakości klasyfikatora
SPECT	– tomografia emisyjna pojedynczych fotonów
SPRi	– powierzchniowy rezonans plazmonów imaging
TP53	– gen TP53
UCH-L1	– C-końcowa hydroksylaza 1 ubikwityny
WHO	– Światowa Organizacja Zdrowia

WPROWADZENIE

Glejak mózgu to grupa nowotworów, które rozwijają się w obrębie tkanki glejowej układu nerwowego, która pełni funkcję wspomagającą i ochronną dla neuronów. Należą do grupy jednych z najczęściej występujących pierwotnych guzów mózgu u dorosłych, a ich patogenezę, objawy oraz leczenie stanowią przedmiot intensywnych badań. Glejaki wykazują wysoki stopień zróżnicowania pod względem złośliwości, od mniej agresywnych guzów (stopień G1 i G2), przez stopień G3, aż po najbardziej złośliwy glejak IV stopnia (G4), nazywany glelakiem wielopostaciowym ze względu na jego wysokie zróżnicowanie (glioblastoma multiforme, GBM) [1]. Etiologia glejaków nie jest do końca poznana. Czynniki ryzyka są przede wszystkim wiek, predyspozycje genetyczne i narażenie na promieniowanie jonizujące. Badania sugerują także rolę zaburzeń genetycznych, takich jak mutacje w genach IDH1 i IDH2, szczególnie w przypadku glejaków o niższym stopniu złośliwości [2]. Ponadto, część badań wykazuje, że mikrośrodowisko mózgu, w tym aktywność komórek układu odpornościowego i układu naczyń krwionośnych, może mieć znaczący wpływ na rozwój i progresję glejaków [3].

Celem artykułu jest przedstawienie nowych metod oznaczania potencjalnych biomarkerów glejaka, wykorzystujących biosensory oraz SPRi jako metodę detekcji. Ponad to w pracy zaprezentowano wyniki badań własnych dotyczących oznaczeń wybranych biomarkerów w osoczu, które przedstawiają charakter aplikacyjny opracowanych biocujników i możliwości wykorzystania oznaczanych białek w rutynowej diagnostyce medycznej.

1. Potencjalne biomarkery nowotworowe a glejak

1.1. Znaczenie MMP-1, UCH-L1 i proteasomu 20S w glejaku

Metaloproteinazy macierzy (MMPs) to enzymy proteolityczne, które odgrywają kluczową rolę w przebudowie tkanek, co ma znaczenie dla procesu wzrostu inwazyjność komórek nowotworowych. Metaloproteinaza 1 macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP-1) odgrywa szczególną rolę w degradacji kolagenu, co umożliwia komórkom glejaka przenikanie przez przyległe tkanki i prowadzi do migracji komórek nowotworowych do sąsiednich struktur mózgu. W agresywnych stopniach zaawansowania glejaka dowiedziono znacząco podwyższoną ekspresję MMP-1, co czyni ten biomarker potencjalnym wskaźnikiem złośliwości nowotworu i przewidywania przebiegu klinicznego choroby [4,5]. Ponadto badania wykazują, że MMP-1 może wpływać na mikro środowisko nowotworowe, indukując procesy odżywcze komórek nowotworowych i dzięki temu przyspieszać wzrost guza nowotworowego [4].

C-końcowa hydrolaza 1 ubikwityny (UCH-L1) to enzym z rodziny hydrolaz ubikwitynowych, który istotny jest w cyklu ubikwityna-proteasom, regulującym degradację białek wewnątrzkomórkowych. Nadekspresję UCH-L1 zauważono przede wszystkim w tkankach nerwowych, jak i również w komórkach ludzkiego glejaka mózgu. Znacząco podwyższone stężenia UCH-L1, w odniesieniu do grupy kontrolnej, wskazują głównie na zaawansowaną transformację nowotworową, przy czym enzym ten może mieć wpływ na adaptację komórek glejaka do stresu oksydacyjnego, jak również na ich odporność na czynniki uszkodzające DNA. Zatem, UCH-L1 może pełnić funkcję zarówno diagnostyczną, jak i prognostyczną wskazując na agresywność nowotworu i stopień jego zawaśnienia [6].

Proteasom 20S, będący częścią kompleksu proteasomowego, jest odpowiedzialny za usuwanie zdegradowanych i nieprawidłowo funkcjonujących białek. Wykazano, że w glejaku nadekspresja proteasomu 20S koreluje z nasilonymi procesami inwazyjnymi i zwiększoną przeżywalnością komórek nowotworowych, dzięki czemu komórki nowotworowe unikają apoptozy. Proteasom 20S odgrywa zatem istotną rolę w modulacji białek zaangażowanych w cykl komórkowy oraz w odpowiedzi na stres komórkowy, co czyni go potencjalnym biomarkerem wspierającym zarówno diagnostykę, jak i monitorowanie odpowiedzi na leczenie w glejakach [7].

1.2. Znaczenie katepsyn B, D i S w glejaku

Katepsyny są enzymami lizosomalnymi odpowiedzialnymi za rozkład białek wewnątrzkomórkowych oraz składników macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), co umożliwia nowotworom przenikanie przez tkanki i naciekanie sąsiednich obszarów. Wykazano, że w glejaku katepsyny B, D i S pełnią kluczową rolę w modulacji mikrośrodowiska nowotworowego, wspierając procesy związane z migracją i inwazją komórek nowotworowych. Katepsyna B bierze udział w degradacji kolagenu i innych składników ECM, co sprzyja wzrostowi inwazyjności komórek glejaka. Badania sugerują, że katepsyna B nie tylko wspiera procesy związane z rozprzestrzenianiem się nowotworu, ale może również wpływać na przeżywalność komórek glejaka w warunkach stresu oksydacyjnego i niedotlenienia. Wysoka ekspresja katepsyny B została powiązana z bardziej agresywnym fenotypem glejaków, co czyni ją obiecującym biomarkerem do oceny stopnia złośliwości [8]. Kolejna z katepsyn - katepsyna D, będąca proteazą aspartylową, uczestniczy w procesach degradacji białek wewnątrzkomórkowych oraz może wpływać na zdolność komórek do adaptacji w niekorzystnych warunkach, takich jak niedobór substancji odżywczych. W glejakach katepsyna D odgrywa ważną rolę w modulacji sygnałów wzrostu i przeżycia, a jej ekspresja wzrasta w zaawansowanych stopniach glejaka [9]. Katepsyna S wykazuje natomiast unikalne właściwości w degradacji białek ECM i jest zaangażowana w procesy immunomodulacyjne, które mogą wpływać na zdolność nowotworu do unikania odpowiedzi immunologicznej organizmu gospodarza. Wysoki poziom katepsyny S może ułatwiać migrację komórek glejaka oraz ich zdolność do naciekania

sąsiednich tkanek, co sugeruje jej znaczenie jako biomarkera oceny złośliwości glejaka oraz wspomagania wyboru optymalnych terapii celowanych choroby [10].

1.3. Znaczenie lamininy-5, fibronektyny i kolagenu IV w glejaku

Białka macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), takie jak laminina-5, fibronektyna i kolagen IV, odgrywają ważną rolę w interakcjach między komórkami nowotworowymi a ich mikrośrodowiskiem. W glejakach, białka ECM wspierają procesy związane z adhezją, migracją oraz inwazyjnością komórek nowotworowych, umożliwiając im przenikanie do sąsiednich struktur mózgu. Laminina-5 jest glikoproteiną, która ułatwia adhezję komórek do błon podstawnych, co ma kluczowe znaczenie dla ich zdolności do przenikania przez bariery tkankowe. Wysoka ekspresja lamininy-5 w glejaku została powiązana ze zwiększoną inwazyjnością i złośliwością nowotworu, co czyni ją przydatnym wskaźnikiem dla oceny stopnia zaawansowania choroby. Ponad to, laminina-5 wspiera także procesy angiogenezy, które dostarczają tlen i składniki odżywcze do szybko rosnących guzów [11]. Fibronektyna, będąca białkiem wiążącym integryny, również uczestniczy w procesach adhezji i migracji komórek nowotworowych. Jej obecność w ECM wspiera tworzenie połączeń między komórkami nowotworowymi a macierzą zewnątrzkomórkową, co zwiększa zdolność komórek glejaka do rozprzestrzeniania się. Dowiedziono, że fibronektyna jest wysoce ekspresjonowana w zaawansowanych stopniach glejaka, co sugeruje jej znaczenie jako biomarkera oceny stopnia zaawansowania nowotworu oraz jako potencjalny cel terapeutyczny [12]. Ostatnie z omawianych białek - kolagen IV jest głównym składnikiem błon podstawnych i odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu integralności strukturalnej ECM. W glejaku nadekspresja kolagenu IV jest związana z większą inwazyjnością nowotworu, umożliwiając komórkom nowotworowym degradację i penetrację błon podstawnych otaczających tkanki. Kolagen IV może być zatem markerem złośliwości oraz prognostycznym wskaźnikiem wskazującym na skłonność nowotworu do przerzutowania [13].

2. Diagnostyka glejaka

Diagnostyka glejaka mózgu stanowi wyzwanie ze względu na zróżnicowany obraz kliniczny oraz podobieństwo objawów do innych chorób neurologicznych. Współczesna diagnostyka opiera się na zaawansowanych technikach neuroobrazowania oraz badaniach molekularnych i histopatologicznych. Podejście to pozwala na precyzyjne rozpoznanie rodzaju i stopnia złośliwości guza, co jest kluczowe dla doboru odpowiedniej terapii oraz prognozy dla pacjenta.

2.1. Neuroobrazowanie

Podstawową metodą diagnostyczną w rozpoznawaniu glejaków mózgu jest rezonans magnetyczny (MRI), który pozwala na uzyskanie szczegółowych obrazów struktur mózgu. W szczególności stosuje się rezonans z kontrastem gadolinowym, który

umożliwia lepsze uwidocznienie obszarów o wzmożonej przepuszczalności bariery krew-mózg, charakterystycznych dla glejaka w złośliwych stopniach (G3, G4) [14]. Zaawansowane techniki MRI, takie jak obrazowanie tensora dyfuzji (DTI) oraz spektroskopia rezonansu magnetycznego (MRS), dostarczają informacji na temat struktury, metabolizmu i funkcji komórek glejowych, co jest pomocne w różnicowaniu glejaków od innych zmian nienowotworowych [15]. Tomografia emisyjna pojedynczych fotonów (SPECT) oraz pozytonowa tomografia emisyjna (PET) są technikami pomocniczymi, które pozwalają na ocenę metaboliczną i czynnościową guzów mózgu. PET z użyciem znakowanych izotopów, takich jak fluorodeoksyglukoza (FDG), pozwala ocenić aktywność metaboliczną guza oraz rozróżnić guz od obrzęku lub zmian zapalnych. PET-CT z izotopami specyficznymi dla komórek nowotworowych, takimi jak aminokwasy znakowane izotopem węgla 11 (np. [11C]-MET), ma zastosowanie w ocenie stopnia złośliwości glejaka oraz monitorowaniu odpowiedzi na leczenie [16].

2.2. Diagnostyka molekularna

W ostatnich latach na znaczeniu w klasyfikacji glejaków zyskała diagnostyka molekularna. Analiza mutacji genów, takich jak IDH1, IDH2, ATRX i TP53, pozwala na precyzyjne określenie rodzaju glejaka. Mutacje w genach IDH są związane z lepszym rokowaniem i częściej występują w glejakach o niższym stopniu złośliwości [2]. W diagnostyce molekularnej stosuje się także techniki immunohistochemiczne oraz analizy metylacji DNA, np. analiza metylacji promotora genu MGMT, która ma istotne znaczenie w prognozowaniu odpowiedzi na chemioterapię temozolomidem [17]. Wprowadzenie sekwencjonowania następnej generacji (NGS) oraz metod opartych na mikro macierzach umożliwia analizę ekspresji genów oraz profilowanie mutacji na poziomie genomowym, co pozwala na bardziej precyzyjną diagnostykę oraz personalizację terapii [18].

2.3. Biopsja i badanie histopatologiczne

Biopsja stereotaktyczna, polegająca na pobraniu próbki guza w celu badania mikroskopowego, jest standardową metodą diagnostyczną stosowaną do potwierdzenia obecności glejaka oraz jego klasyfikacji histologicznej. Badanie histopatologiczne pozwala na ocenę stopnia złośliwości glejaka, określanego według kryteriów Światowej Organizacji Zdrowia (WHO). Histopatologicznie glejaki są klasyfikowane od I do IV stopnia, gdzie IV stopień odpowiada glejakom wielopostaciowym o najwyższej złośliwości i agresywności [18].

3. BioczuJNIKI SPRI

BioczuJNIKI oparte na powierzchniowym rezonansie plazmonów (Surface Plasmon Resonance Imaging, SPRI) stanowią nowoczesne narzędzie analityczne, które znajduje

szerokie zastosowanie w badaniach biomolekularnych i diagnostyce medycznej. Technika SPRi umożliwia monitorowanie interakcji biomolekularnych w czasie rzeczywistym bez potrzeby znakowania cząsteczek, co czyni ją bardzo czułą i specyficzną metodą analizy. Dzięki zdolności do równoczesnego wykrywania wielu analitów na tej samej powierzchni, SPRi stało się niezwykle przydatne w badaniach wymagających szybkiej i wysokoprzepustowej analizy [19]. BioczuJNIki SPRi opierają się na zjawisku rezonansu plazmonów powierzchniowych, które zachodzi na granicy między metalem (najczęściej złotem) a dielektrykiem (szklana powierzchnia biosensora). Gdy monochromatyczne światło p-spolaryzowane pada pod odpowiednim kątem, elektrony w powierzchni metalowej zaczynają oscylować, co powoduje spadek intensywności światła odbitego. Zatem, SPRi mierzy zmiany odbicia światła w odpowiedzi na zmiany masy molekularnej na powierzchni bioczuJNIka, co jest związane z interakcjami biomolekularnymi. Dzięki zastosowaniu kamer CCD, SPRi umożliwia wizualizację tych zmian w postaci obrazu, co pozwala na jednoczesną analizę wielu interakcji biomolekularnych [20]. Technika SPRi znajduje zastosowanie w diagnostyce różnych chorób, takich jak nowotwory, choroby autoimmunologiczne i zakaźne. Przykładowo, SPRi jest wykorzystywane do wykrywania markerów nowotworowych we krwi, co może wspierać wczesne rozpoznanie raka i monitorowanie terapii [21]. Dzięki możliwości monitorowania interakcji antygen-przeciwciała, SPRi stało się również narzędziem do badań nad infekcjami wirusowymi, w tym w diagnostyce wirusów takich jak HIV, wirus zapalenia wątroby typu B i wirus SARS-CoV-2 [22].

4. Oznaczenia wybranych potencjalnych biomarkerów glejaka

4.1. Materiał biologiczny

Badania przeprowadzono w osoczu osób ze zdiagnozowanymi glejakami mózgu w czterech stopniach zaawansowania: G1 (3 próbki), G2 (10 próbek), G3 (7 próbek) oraz G4 (37 próbek), a także w osoczu palaczy jako grupy kontrolnej K (48 próbek). Łącznie przebadano 105 próbek osocza, w tym 48 z grupy kontrolnej. Materiał biologiczny uzyskano z Biobanku Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, a na przeprowadzenie wszystkich badań uzyskano stosowną zgodę komisji bioetycznej (licencja APK.002.171.2021).

4.2. Przygotowanie bioczuJNIków oraz materiału biologicznego do oznaczeń

BioczuJNIki przygotowywano zgodnie z wcześniej opracowaną metodyką funkcjonalizacji powierzchni każdego z nich. Procedurę rozpoczynano od zanurzenia czystych płytek złotych w 20 mM roztworze chlorowodoru cysteaminy i pozostawienia ich w nim na co najmniej 12 godzin w temperaturze pokojowej. Następnie, płytki płukano bezwodnym etanolem oraz wodą destylowaną i suszono w strumieniu argonu. Utworzona na powierzchni złotej płytki samoorganizująca się monowarstwa cysteaminy, umożliwia związaną się przeciwciała z powierzchnią bio-

czujnika za pomocą wiązania amidowego na drodze reakcji grup $-NH_2$ cysteaminy oraz grup $-COOH$ obecnych na końcach łańcuchów ciężkich przeciwciał, w obecności EDC/NHS i buforu węglanowego ($pH = 8.50$). Bioczułnik, po związaniu przeciwciała z powierzchnią złotą jest zdolny do wychwytywania analitu z próbki. Analizę ilościową przeprowadzano poprzez nałożenie kropli o objętości $3 \mu L$ na miejsce aktywne bioczułnika i inkubację w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Następnie nadmiar próbki odsysano za pomocą aspiratora próżniowego, a miejsce reakcji opłukiwano buforem PBS i dokonywano akwizycji danych. Informacje dotyczące metod oznaczeń poszczególnych potencjalnych biomarkerów zestawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Zestawienie warunków funkcjonalizacji powierzchni bioczułników.

Table 1. Summary of conditions for functionalization of biosensor surfaces.

Analit	Metal stanowiący podstawę bioczułnika	Linker	Ligand (element wychwytyjący analit z roztworu)	Opis reakcji linker-ligand	Opis reakcji ligand-analit	Ref.
Katepsyna B	złoto	cysteamina	Cystatyna C	Utworzenie wiązania amidowego w wyniku reakcji między grupami $-NH_2$ cysteaminy, a grupami $-COOH$ przeciwciał w obecności buforu węglanowego i mieszaniny EDC/NHS	Dopasowanie enzym-inhibitor zgodnie z zasadą „dopasowanie klucza do zamka”	[23]
Katepsyna D			Pepstatyna A			[24]
Katepsyna S			Przeciwciało monoklonalne		Reakcja immunologiczna między epitopem a paratopem	[25]
Laminina-5			Przeciwciało poliklonalne			[26]
Fibronektyna			Przeciwciało monoklonalne			[27]
Kolagen IV			Przeciwciało monoklonalne			[28]
UCH-L1			Przeciwciało monoklonalne			[29]
MMP-1			Przeciwciało monoklonalne			[30]
Proteasom 20S			PSI (Z-Ile-Glu(OBut)-Ala-Leu-H)	Modyfikacja grupy $-R1-CH_2-COO-CH_3$ za pomocą mieszaniny EDC/NHS w obecności buforu węglanowego, a następnie reakcja między grupami $-NH_2$ cysteaminy i powstałymi po wcześniejszej modyfikacji grupami $-COOH$ i utworzenie wiązania amidowego	Utworzenie hemiketalu na drodze reakcji grupy $-OH$ pochodzącej od kinazy homoserynowej (Thr1), a grupą $-C=O$ pochodzącej od PSI [31]	[32]

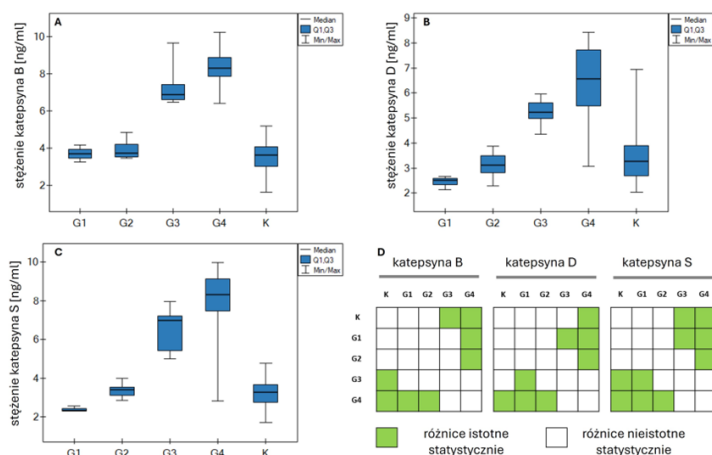
5. Wyniki oznaczeń

5.1. Analiza statystyczna

Wszystkie analizy statystyczne cytowane w niniejszej pracy, przeprowadzono przy użyciu oprogramowania PQStat (2022), PQStat v.1.8.4, Poznań, Polska. [33–35].

5.2. Oznaczenia Katepsyny B, D i S

W związku z brakiem normalności rozkładu danych (test Shapiro-Wilka), przeprowadzono nieparametryczny test Kruskala-Wallisa oraz test Dunna-Bonferroni, których reprezentację graficzną przedstawiono na Rysunku 1.



Rysunek 1. Wykresy pudełkowe stężeń (A) katepsyny B; (B) katepsyny D; (C) katepsyny S; (D) test post-hoc Dunna-Bonferroni.

Figure 1. Box plots of concentrations of (A) cathepsin B; (B) cathepsin D; (C) cathepsin S; (D) Dunn-Bonferroni post-hoc test.

Zaobserwowano istotnie statystyczne różnice stężeń między grupą kontrolną (K) a najwyższym stopniem zaawansowania glejaka (G4) dla wszystkich oznaczanych katepsyn. Poza tym, oznaczane białka wykazywały zbliżone poziomy stężeń dla stopni G1 i G2 oraz w grupie kontrolnej, które zawierały się w przedziale 1.62 – 6.95 ng/ml. Podobną zależność zauważono w przypadku stopni G3 i G4, gdzie stężenia mieściły się w granicach 2.81 – 10.23 ng/ml. W Tabeli 2 podsumowano pozostałe parametry kliniczne w odniesieniu do wzrostu stężeń oznaczanych katepsyn i wzrostu ryzyka zachorowania na glejaka.

Tabela 2. Charakterystyka czynników potencjalnie wpływających na ryzyko zachorowania na glejaka mózgu.
Table 2. Characterization of factors potentially influencing the risk of developing glioma.

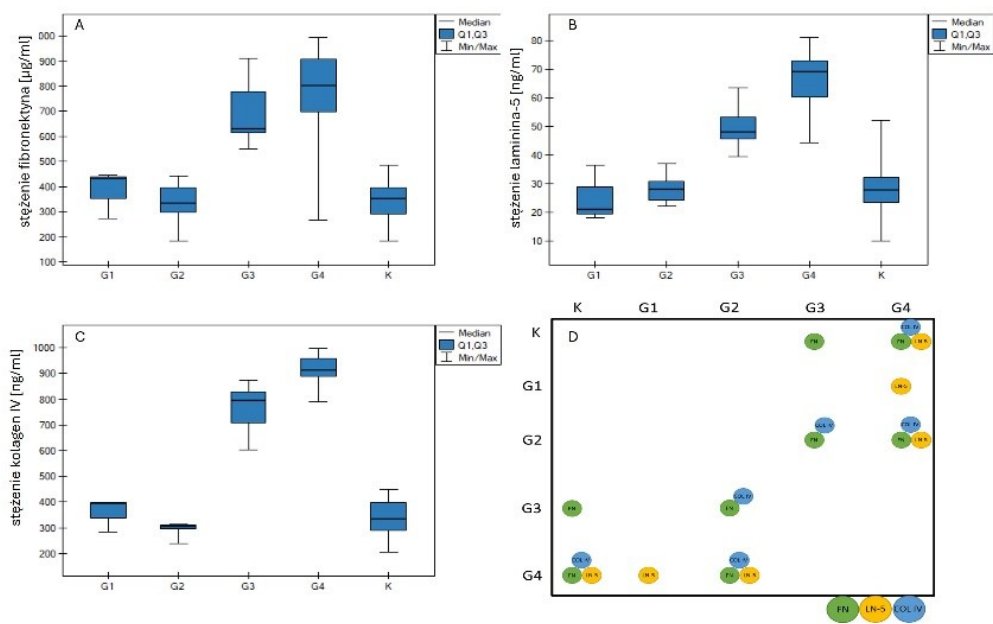
Analit	Obecność nowotworów u członków najbliższej rodziny	Nienowotworowe choroby współistniejące pacjenta	Status IDH 1/2	Korelacja wiek pacjenta – stężenie analitu ^a	Korelacja między analizami ^a	ROC	Ref.
Katepsyny na B	Brak zależności wzrostu stężenia oznaczanych katepsyn	Brak tendencji wzrostu stężeń oznaczanych katepsyn i ryzyka zachorowania na glejaka	Brak oddziaływania na stężenia oznaczanych katepsyn w stopniach G3 i G4 choroby	$0.3 < R_s \leq 0.5$ Dodatnia korelacja umiarkowana	$0.5 < R_s \leq 0.7$ Dodatnia korelacja wysoka	Możliwe jest jedynie odróżnienie łagodnych stopni choroby (G1, G2) oraz grupy kontrolnej (K) od stopni zaawansowanych (G3, G4)	[25]
Katepsyny na D							
Katepsyny na S							

^awg. Skali zaproponowanej przez J.Guilforda

Nie zaobserwowano, aby obecność nowotworów w najbliższej rodzinie chorego, lub występowanie chorób współistniejących miało istotny wpływ na wzrost ryzyka zachorowania na glejaka. Podobnie, nie odnotowano wpływu mutacji IDH 1/2 na stężenia oznaczanych katepsyn w zaawansowanych stopniach choroby, co sugeruje, że katepsyny B, D oraz S mogą być niezależnymi, potencjalnymi biomarkerami nowotworu mózgu. Poza tym, stwierdzono umiarkowaną dodatnią korelację stężenia oznaczanych katepsyn w odniesieniu do wieku pacjenta, jak również wysoką dodatnią korelację między stężeniami poszczególnych katepsyn. Analiza ROC potwierdza natomiast, że możliwe jest odróżnienie łagodnych stopni choroby i grupy kontrolnej od stopni zaawansowanych na podstawie jedynie stężeń oznaczanych katepsyn B, D i S z dobrą specyficznością i czułością.

5.3. Oznaczenia lamininy-5, fibronektyny, kolagenu IV

Podobnie, jak w przypadku poprzednich oznaczeń, przeprowadzony test Shapiro-Wilka wykonany w kierunku sprawdzenia normalności rozkładu uzyskanych danych potwierdził, iż rozkład stężeń oznaczanych białek błony podstawnej odbiega od rozkładu normalnego. Zatem kolejne analizy prowadzono z wykorzystaniem testów nieparametrycznych, takich jak test Kruskala-Wallisa i analiza post-hoc Dunna-Bonferroni, których wyniki przedstawiono na Rysunku 2.



Rysunek 2. Wykresy pudełkowe stężeń (A) fibronektyny; (B) lamininy-5; (C) kolagenu IV; (D) test post-hoc Dunna-Bonferroni.

Figure 2. Box plots of concentrations of (A) fibronectin; (B) laminin-5; (C) collagen IV; (D) Dunn-Bonferroni post-hoc test.

Z powyższych danych wynika, iż istnieją statystycznie istotne różnice między stężeniami lamininy-5, fibronektyny i kolagenu IV między grupą kontrolną (K), a najwyższym stopniem choroby (G4), a także między stopniami G2 i G4. Istotnie statystycznie różnią się również stężenia lamininy-5, fibronektyny oraz kolagenu IV między stopniami G1 i G2 a stopniami G3 i G4. Tabela 3 zawiera podsumowanie pozostałych parametrów klinicznych, mogących mieć wpływ na wzrost ryzyka wystąpienia glejaka mózgu.

Tabela 3. Charakterystyka czynników potencjalnie wpływających na ryzyko zachorowania na glejaka mózgu.
Table 3. Characterization of factors potentially influencing the risk of developing glioma.

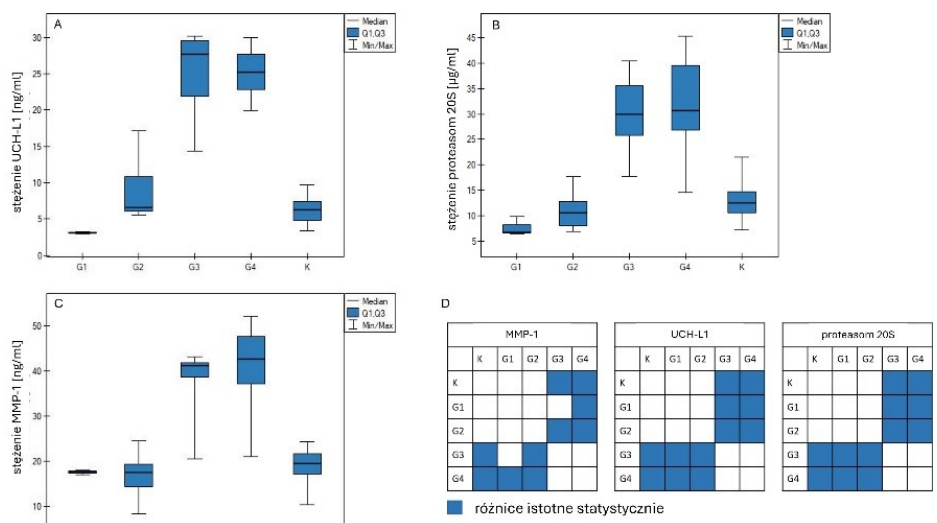
Analit	Obecność nowotworu w u członków najbliższej rodziny	Nienowotworowe choroby współistniejące pacjenta	Status IDH 1/2	Korelacja wiek pacjenta – stężenie analitu ^a	Korelacja między analizami ^a	ROC	Ref.
Laminina-5	Brak zależności wzrostu stężenia oznaczanych białek	Brak tendencji wzrostu stężenia oznaczanych białek i ryzyka zachorowania na glejaka	Brak oddziaływania na stężenia oznaczanych białek w stopniach G3 i G4 choroby	0.3 <R _s ≤ 0.5 Dodatnia korelacja umiarkowana	0.5 <R _s ≤ 0.7 Dodatnia korelacja wysoka	Możliwe jest odróżnienie stopnia G1 oraz grupy kontrolnej (K) od stopni G2, G3 i G4	[33]
Fibronektyna							
Kolagen IV							

^awg. Skali zaproponowanej przez J.Guilforda

Obecność nowotworów w rodzinie pacjenta, jak i jego choroby współistniejące nie zwiększają ryzyka zachorowania na glejaka mózgu. Również mutacja IDH 1/2 nie ma wpływu na zmiany stężeń lamininy-5, fibronektyny i kolagenu IV, zatem podobnie jak poprzednio opisywane katepsyny, białka te, pretendują do potencjalnych i niezależnych biomarkerów glejaka. Poza tym, zaobserwowano dodatnią umiarkowaną korelację stężeń oznaczanych białek w odniesieniu do wieku pacjenta oraz wysoką dodatnią korelację między stężeniami lamininy-5, fibronektyny i kolagenu IV. Przeprowadzona analiza ROC wskazuje, że na podstawie wartości stężeń lamininy-5, fibronektyny oraz kolagenu IV możliwe jest rozróżnienie grupy kontrolnej i stopnia G1 od stopni G2, G3 i G4 z bardzo wysoką skutecznością diagnostyczną.

5.4. Oznaczenia UCH-L1, proteasomu 20S, MMP-1

Analogicznie, jak w przypadku poprzednich oznaczeń, pierwszym etapem analizy statystycznej było określenie normalności rozkładu uzyskanych danych testem Shapiro-Wilka. Ponieważ test ten zaprzeczył normalności rozkładu danych, przystąpiono do dalszych analiz wykorzystując test Kruskala-Wallisa oraz test post-hoc Dunna-Bonferroni, których interpretację graficzną przedstawiono na Rysunku 3.



Rysunek 3. Wykresy pudełkowe stężeń (A) UCH-L1; (B) proteasomu 20S; (C) MMP-1; (D) test post-hoc Dunna-Bonferroniego.

Figure 3. Box plots of concentrations of (A) UCH-L1; (B) 20S proteasome; (C) MMP-1; (D) Dunn-Bonferroni post-hoc test.

Przeprowadzona analiza statystyczna dowodzi istotnych statystycznie różnic stężeń UCH-L1, proteasomu 20S i MMP-1 między grupą kontrolną (K) a stopniami G3 i G4 oraz między stopniem G1 a stopniami G3 i G4. Jedynie stężenie MMP-1 nie zmienia się istotnie statystycznie między stopniem G1 a G3. W Tabeli 4 podsumowano wpływ pozostałych parametrów klinicznych na zmiany stężeń UCH-L1, proteasomu 20S i MMP-1 i wzrost ryzyka zachorowania na glejaka.

Tabela 4. Charakterystyka czynników potencjalnie wpływających na ryzyko zachorowania na glejaka mózgu.
Table 4. Characterization of factors potentially influencing the risk of developing glioma.

Analit	Obecność nowotworów u członków najbliższej rodziny	Nienowotworowe choroby współistniejące pacjenta	Status IDH 1/2	Korelacja wiek pacjenta – stężenie analitu ^a	Korelacja między analitami ^a	ROC	Ref.
UCH-L1	Brak zależności wzrostu stężenia oznaczanych białek	Brak tendencji wzrostu stężeń oznaczanych białek i ryzyka zachorowania na glejaka	Brak oddziaływania na stężenia oznaczanych białek w stopniach G3 i G4 choroby	0.3 <R _s ≤ 0.5 Dodatnia korelacja umiarkowana	0.5 <R _s ≤ 0.7 Dodatnia korelacja wysoka	Możliwe jest jedynie odróżnienie łagodnych stopni choroby (G1, G2) oraz grupy kontrolnej (K) od stopni zaawansowanych (G3, G4)	[34]
Proteasom 20S							
MMP-1							

^awg. Skali zaproponowanej przez J.Guilforda

W wyniku przeprowadzonych badań zaprzeczono, aby występowanie chorób nowotworowych u członków najbliższej rodziny pacjenta miało realny wpływ na wzrost ryzyka zachorowania na glejaka. Podobnie, nie odnotowano wpływu występowania chorób współistniejących u badanego pacjenta. Analogicznie jak w poprzednich przytoczonych badaniach, mutacja IDH 1/2 nie wpływa w żaden sposób na zmiany stężeń oznaczanych białek. Zaobserwowano dodatnią umiarkowaną korelację stężenia UCH-L1, proteasomu 20S i MMP-1 w odniesieniu do wieku pacjenta, natomiast siła korelacji między oznaczanymi białkami została określona jako dodatnia korelacja wysoka. Przeprowadzona analiza ROC wskazuje, że bazując tylko na stężeniach UCH-L1, proteasomu 20S oraz MMP-1 możliwe jest jedynie odróżnienie grupy kontrolnej (K) i stopni G1, G2 od zaawansowanych stopni choroby G3 i G4.

6. Podsumowanie i dyskusja

Rozwój nowych metod i technik oznaczeń biomarkerów jest ważnym kierunkiem rozwoju chemii analitycznej, zwłaszcza w przypadku chorób takich jak glejak, dla których diagnostyka nie jest jeszcze wystarczająco rozwinięta. Przedstawione w artykule metody oznaczeń potencjalnych biomarkerów glejaka są pretendentami do wykorzystania w przyszłości w nieinwazyjnej i skutecznej diagnostyce tego nowotworu. Każda z przedstawionych metod oznaczeń służy do ilościowej analizy białka, które jest istotne w nowotworze mózgu, pod względem zmian ekspresji, mutacji lub zmian stężeń.

Mediany stężeń oznaczanych białek nie wykazują istotnych statystycznie różnic między grupą kontrolną (K) a stopniami choroby G1 i G2, co więcej, w większości przypadków stężenia badanych analitów utrzymują się na podobnym poziomie. Zatem, przytoczone metody oznaczeń umożliwiają diagnostykę tylko złośliwych stopni glejaka (G3, G4). Być może, główną przeszkodą jest bariera krew-mózg, która zapobiega swobodnemu przedostawianiu się białek z mózgu do krwioobiegu oraz odwrotnie. Jednak, w strukturze tej bariery zachodzą różne zmiany, w tym zmiany ekspresji białek, które w następstwie prowadzą nawet do utraty ciągłości bariery krew-mózg. Udowodniono, że owa utrata spójności następuje głównie w zaawansowanych stopniach glejaka, dlatego też, prawdopodobnie następuje znaczny wzrost stężeń oznaczanych białek w stopniach G3 i G4 [36]. Stąd też zapewne istotny statystycznie wzrost stężeń oznaczanych białek w agresywnych stopniach glejaka w odniesieniu do stopni łagodnych i grupy kontrolnej. Zmiany w mutacji IDH 1/2 nie wpływały w żaden sposób na stężenia analizowanych potencjalnych biomarkerów glejaka, zatem każdy z nich może kandydować na niezależny biomarker prognostyczny. Ponad to, wysokie dodatnie korelacje między stężeniami oznaczanych białek sugerują ich silne działanie synergistyczne. Relacje te więc można uznać za charakterystyczne i przydatne do określania stopnia zaawansowania glejaka. Odnotowano umiarkowane dodatnie korelacje stężeń analizowanych białek do wieku pacjenta biorącego udział w projekcie, natomiast fakt ten wynika prawdopodobnie z najwyższej liczebności grupy stopnia G4, która wnosi najwięcej danych oraz charakteryzuje się najwyższą medianą zarówno

stężen oznaczanych analitów, jak i wieku pacjentów. Dlatego też, zależność *stężenie biomarkera – wiek pacjenta* nie jest wiążąca dla jednoznacznego określenia wpływu wieku pacjenta na stężenie oznaczanego białka. Pozostałe parametry, takie jak obecność nowotworów (innych niż glejak) w najbliższej rodzinie pacjenta, czy występowanie chorób współistniejących u badanego, nie mają realnego wpływu na ryzyko zachorowania na glejaka. Ostatecznie, do zbadania skuteczności diagnostycznej omawianych metod oznaczania białek przeprowadzono analizę ROC. Potwierdzono, że bazując jedynie na wartościach stężeń analizowanych potencjalnych biomarkerów istnieje możliwość oddzielenia grupy kontrolnej oraz łagodnych stopni G1 i G2 od złośliwych form choroby G3 i G4 z wysoką specyficznością i czułością. Przedstawione metody oznaczeń nie umożliwiają natomiast wczesnej diagnostyki glejaka, ze względu na brak istotnych różnic stężeń między grupą kontrolną a stopniami G1 i G2.

Podsumowując, korzystając z przedstawionych metod oznaczeń wybranych białek nie jest możliwa wczesna diagnostyka glejaka, jeżeli materiałem badawczym jest osocze. Być może największą przeszkodą jest obecność bariery krew-mózg, która w łagodnych stopniach choroby jest jeszcze na tyle funkcjonalna, że uniemożliwia przejście oznaczanych analitów do krwi obwodowej. Przytoczone metody mogą być jednak przydatne do wspomagania aktualnie wykorzystywanych metod diagnostyki glejaka, która opiera się głównie na badaniach obrazowych. Badania te także charakteryzują się pewnymi ograniczeniami, do których należy zaliczyć przede wszystkim trudności w rozróżnianiu stopni G2 i G3. Proponowane metody oznaczeń mogą być na tym polu niezwykle pomocne, ze względu na udowodnioną możliwość rozróżniania stopni G2 i G3, G4. Poza tym, opisywane nowe metody bazują na bioczułnikach, które zapewniają analizę w krótkim czasie, nie wymagają dużych ilości materiału badawczego – wystarczą zaledwie 3 µl próbki, dają niemal nieskończone możliwości rozwoju i udoskonalania oraz miniaturyzacji i automatyzacji.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] Q.T. Ostrom, H. Gittleman, J. Fulop, M. Liu, R. Blanda, C. Kromer, Y. Wolinsky, C. Kruchko, J.S. Barnholtz-Sloan, *Neuro. Oncol.*, 2015, **17**, 1.
- [2] A. Aibaidula, A.K.Y. Chan, Z. Shi, Y. Li, R. Zhang, R. Yang, K.K.W. Li, N.Y.F. Chung, Y. Yao, L. Zhou, J. Wu, H. Chen, H.K. Ng, *Neuro. Oncol.*, 2017, **19**, 1327.
- [3] D.F. Quail, J.A. Joyce, *Canc. Cell.*, 2017, **31**, 326.
- [4] C.M. Overall, C. López-Otín, *Nat. Rev. Canc.*, 2002, **2**, 657.
- [5] V. V. Artym, K. Matsumoto, *Curr. Protoc. Cell. Biol.*, 2010, **10**, 1.
- [6] P.C. Sanchez-Diaz, J.C. Chang, E.S. Moses, T. Dao, Y. Chen, J.Y. Hung, *PLoS One.*, 2017, **12**, 1.
- [7] D.J. McConkey, K. Zhu, *Drug. Resist. Updat.*, 2008, **11**, 164.
- [8] J.A. Joyce, A. Baruch, K. Chehade, N. Meyer-Morse, E. Giraudo, F.Y. Tsai, D.C. Greenbaum, J.H. Hager, M. Bogoyo, D. Hanahan, *Canc. Cell.*, 2004, **5**, 443.
- [9] M.E. Fukuda, Y. Iwadata, T. Machida, T. Hiwasa, Y. Nimura, Y. Nagai, M. Takiguchi, H. Tanzawa, A. Yamaura, N. Seki, *Canc. Res.*, 2005, **65**, 5190.

- [10] B. Wang, J. Sun, S. Kitamoto, M. Yang, A. Grubb, H.A. Chapman, R. Kalluri, G.P. Shi, *J. Biol. Chem.*, 2006, **281**, 6020.
- [11] T. Kawataki, T. Yamane, H. Naganuma, P. Rousselle, I. Andurén, K. Tryggvason, M. Patarroyo, *Exp. Cell. Res.*, 2017, **313**, 3819.
- [12] E.E. Torr, C.R. Ngam, K. Bernau, B. Tomasini-Johansson, B. Acton, N. Sandbo, *J. Biol. Chem.*, 2015, **290**, 6951.
- [13] A. Naba, K.R. Clauser, H. Ding, C.A. Whittaker, S.A. Carr, R.O. Hynes, *Mat. Biol.*, 2016, **49**, 10.
- [14] M. Weller, M. van den Bent, M. Preusser, E. Le Rhun, J.C. Tonn, G. Minniti, M. Bendszus, C. Balana, O. Chinot, L. Dirven, P. French, M.E. Hegi, A.S. Jakola, M. Platten, P. Roth, R. Rudà, S. Short, M. Smits, M.J.B. Taphoorn, A. von Deimling, M. Westphal, R. Soffietti, G. Reifenberger, W. Wick, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2021, **18**, 170.
- [15] L.B. Nabors, J. Portnow, M. Ahluwalia, J. Baehring, H. Brem, S. Brem, N. Butowski, J.L. Campian, S.W. Clark, A.J. Fabiano, P. Forsyth, J. Hattangadi-Gluth, M. Holdhoff, C. Horbinski, L. Junck, T. Kaley, P. Kumthekar, J.S. Loeffler, M.M. Mrugala, S. Nagpal, M. Pandey, I. Parney, K. Peters, V.K. Puduvalli, I. Robins, J. Rockhill, C. Rusthoven, N. Shonka, D.C. Shrieve, L.J. Swinnen, S. Weiss, P.Y. Wen, N.E. Willmarth, M.A. Bergman, S.D. Darlow, *J. Natl. Compr. Canc. Netw.*, 2020, **18**, 1537.
- [16] N.L. Albert, M. Weller, B. Suchorska, N. Galldiks, R. Soffietti, M.M. Kim, C. La Fougère, W. Pope, I. Law, J. Arbizu, M.C. Chamberlain, M. Vogelbaum, B.M. Ellingson, J.C. Tonn, *Neuro. Oncol.*, 2016, **18**, 1199.
- [17] M.E. Hegi, A.-C. Diserens, T. Gorlia, M.-F. Hamou, N. de Tribolet, M. Weller, J.M. Kros, J.A. Hainfellner, W. Mason, L. Mariani, J.E.C. Bromberg, P. Hau, R.O. Mirimanoff, J.G. Cairncross, R.C. Janzer, R. Stupp, *N. Engl. J. Med.*, 2005, **352**, 997.
- [18] D.N. Louis, A. Perry, G. Reifenberger, A. von Deimling, D. Figarella-Branger, W.K. Cavenee, H. Ohgaki, O.D. Wiestler, P. Kleihues, D.W. Ellison, *Acta. Neuropathol.*, 2016, **131**, 803.
- [19] J. Homola, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 462.
- [20] M.A. Cooper, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 2002, **1**, 515.
- [21] J.F. Masson, *ACS Sens.*, 2017, **2**, 16.
- [22] Y. Zeng, R. Hu, L. Wang, D. Gu, J. He, S.Y. Wu, H.P. Ho, X. Li, J. Qu, B.Z. Gao, Y. Shao, *Nanophotonics*, 2017, **6**, 1017.
- [23] E. Gorodkiewicz, *Prot. Pept. Lett.*, 2009, **18**, 23.
- [24] E. Gorodkiewicz, E. Regulska, *Prot. Pept. Lett.*, 2010, **17**, 1148.
- [25] L. Oldak, A. Sankiewicz, B. Żelazowska-Rutkowska, B. Cylwik, Z. Lukaszewski, M. Skoczylas, E. Gorodkiewicz, *Talanta*, 2021, **225**, 1.
- [26] A. Sankiewicz, L. Romanowicz, P. Laudanski, B. Żelazowska-Rutkowska, B. Puzan, B. Cylwik, E. Gorodkiewicz, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 5269.
- [27] A. Sankiewicz, L. Romanowicz, M. Pyc, A. Hermanowicz, E. Gorodkiewicz, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2018, **150**, 1.
- [28] A. Sankiewicz, Z. Lukaszewski, K. Trojanowska, E. Gorodkiewicz, *Anal. Biochem.*, 2016, **515**, 40.
- [29] A. Sankiewicz, P. Laudanski, L. Romanowicz, A. Hermanowicz, W. Roszkowska-Jakimiec, W. Debek, E. Gorodkiewicz, *Anal. Biochem.*, 2015, **469**, 4.
- [30] A. Tokarzewicz, L. Romanowicz, I. Sveklo, E. Gorodkiewicz, *Anal. Methods*, 2016, **8**, 6428.
- [31] C. Leonardo-Sousa, A.N. Carvalho, R.A. Guedes, P.M.P. Fernandes, N. Aniceto, J.A.R. Salvador, M.J. Gama, R.C. Guedes, *Molecules*, 2022, **27**, 1.
- [32] E. Gorodkiewicz, H. Ostrowska, A. Sankiewicz, *Microchim. Acta*, 2011, **175**, 177.
- [33] L. Oldak, S. Chludzinska-Kasperuk, P. Milewska, K. Grubczak, J. Reszec, E. Gorodkiewicz, *Biomedicines*, 2022, **10**, 2290.

- [34] L. Oldak, S. Chludzinska-Kasperuk, P. Milewska, K. Grubczak, J. Reszec, E. Gorodkiewicz, *Biomolecules.*, 2022, **12**, 1477.
- [35] L. Oldak, P. Milewska, S. Chludzinska-Kasperuk, K. Grubczak, J. Reszec, E. Gorodkiewicz, J. *Clin. Med.*, 2022, **11**, 1.
- [36] A.S. Silantyev, L. Falzone, M. Libra, O.I. Gurina, K.S. Kardashova, T.K. Nikolouzakis, A.E. Nosyrev, C.W. Sutton, M. Panayioti, A. Tsatsakis, *Cells.*, 2019, **8**, 863.

Praca wpłynęła do Redakcji 15 listopada 2024 r.

