

WYKORZYSTANIE ENZYMÓW W DIAGNOSTYCE MEDYCZNEJ

THE USE OF ENZYMES IN MEDICAL DIAGNOSIS

Natalia Gruba

*Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego,
Ul. Wita Stwosza 63
80-308 Gdańsk
e-mail: natalia.gruba@ug.edu.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Enzymy do diagnostyki cukrzycy

1.1. Oksydaza glukozy

1.2. Heksokinaza

2. Enzymy do diagnostyki zapalenia trzustki

2.1. Amylaza

2.2. Lipaza trzustkowa

2.3. Elastaza trzustkowa

3. Enzymy do diagnostyki nowotworów

3.1. Kallikreina 3

3.2. Kinaza pirogronianowa

3.3. Kallikreina 13

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

Dr Natalia Gruba, studiowała na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, gdzie w 2012 roku uzyskała tytuł zawodowy magistra, a w 2016 roku ukończyła studia III stopnia uzyskując tytuł doktora nauk chemicznych. Obecnie zatrudniona na stanowisku adiunkta w Katedrze Technologii Środowiska UG. Jej zainteresowania już od początków pracy naukowej związane były z enzymami proteolitycznymi, profilowaniem aktywności, określaniem specyficzności substratowej czy inhibitorowej. Badania naukowe koncentrują się wokół tematyki poszukiwania nowych metod diagnostycznych z wykorzystaniem właśnie enzymów proteolitycznych.



<https://orcid.org/0000-0003-3281-9945>

ABSTRACT

Each tissue has its own specific enzyme profile. Therefore, the detection of changes in the level of certain enzymes in disease states allows conclusions about the location and type of pathological changes occurring in the body. Only a few (out of several hundred) tissue enzymes are used in routine diagnostics - diagnostics of diseases of the liver, pancreas, skeletal muscles and heart muscle. In practice, this test consists in measuring the activity or determining the level of enzyme protein in body fluids. In this article, the characteristics of a few selected enzymes applicable in clinical practice will be presented.

Keywords: enzymes, diabetes, pancreas, cancer, diagnostic tests

Słowa kluczowe: enzymy, cukrzyca, trzustka, nowotwór, testy diagnostyczne

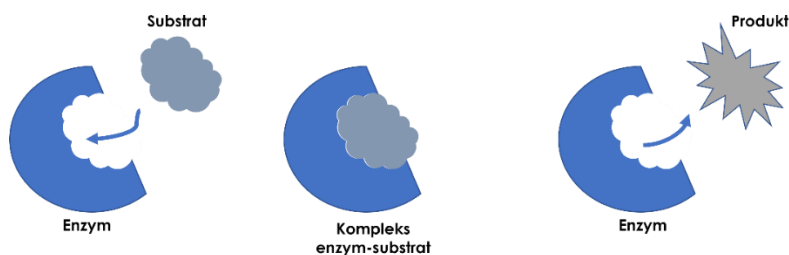
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

A1C	- oznaczenie hemoglobiny glikowanej (ang. <i>glycated hemoglobin determination</i>)
ADP	- difosforan adenozyiny (ang. <i>adenosine diphosphate</i>)
ATP	- trifosforan adenozyiny (ang. <i>adenosine triphosphate</i>)
E1	- elastaza trzustkowa (ang. <i>pancreatic elastase</i>)
EDTA	- kwas wersenowy (ang. <i>edetate acid</i>)
ELISA	- test immunoenzymatyczny (ang. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FDA	- Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (ang. <i>Food and Drug Administration, FDA</i>)
G-6-P	- glukoza-6-fosforan (ang. <i>glucose-6-phosphate</i>)
G-6-PD	- dehydrogenaza glukoza-6-fosforanowa (ang. <i>glucose-6-phosphate dehydrogenase</i>)
GASA	- kwas 4-[(hydroksy-3-metoksyfenyl)azo]-benzenosulfonowy (ang. <i>4-[(hydroxy-3-methoxyphenyl)azo]benzenesulfonic acid</i>)
GOx/ GOD	- oksydaza glukozy (ang. <i>glucose oxidase</i>)
HbA1C	- hemoglobina glikowana (ang. <i>glycated hemoglobin</i>)
KLK13	- kallikreina 13 (ang. <i>kallikrein13</i>)
M2/ M2-PK	- fosfataza pirogronowa typ 2 (ang. <i>pyruvate phosphatase type 2</i>)
NAD	- dinukleotyd nikotynamidoadeninowy (ang. <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
NADH	- zredukowany dinukleotyd nikotynamidoadeninowy (ang. <i>reduced nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
OGTT	- doustny test tolerancji glukozy (ang. <i>oral glucose tolerance test</i>)
PE	- elastaza trzustkowa (ang. <i>pancreatic elastase</i>)
PSA	- kallikreina 3 (ang. <i>Prostate Specific Antigen, PSA</i>)
RNA	- kwas rybonukleinowy (ang. <i>ribonucleic acid</i>)
WHO	- Światowa Organizacja Zdrowia (ang. <i>World Health Organisation</i>)

WPROWADZENIE

Enzymy to substancje pełniące rolę katalizatorów w żywych organizmach. Większość z nich to białka, a niektóre to cząsteczki kwasu rybonukleinowego (RNA). Enzymy przyspieszają / regulują przebieg określonej reakcji chemicznej w komórce. Mówiąc dokładniej, obniżają próg energetyczny niezbędny do rozpoczęcia przemiany poprzez związanie się z inną substancją zwaną substratem (Rysunek 1). Substancje te same nie ulegają zniszczeniu czy przemianie tak, że mogą być używane wielokrotnie. Każda komórka ludzkiego ciała zawiera tysiące enzymów, które są zaangażowane w procesy oddychania, trawienia pokarmu, funkcje mięśni i nerwów oraz wielu innych. Biorąc udział w określonych funkcjach organizmu są niezbędne do zachowania homeostazy i ogólnego dobrego stanu zdrowia [1-4].

Mechanizm działania enzymu



Rysunek 1 Mechanizm działania enzymu
Figure 1. Mechanism of enzyme activity

Enzymy wspomagają wiele ważnych procesów zachodzących w organizmie. W Tabeli 1 zestawiono ich funkcje z przykładami.

Tabela 1 Przykłady funkcji pełnionych przez enzymy w ludzkim organizmie
Table 1 Examples of the functions of enzymes in the human body

Funkcja w organizmie	Przykład enzymu	Lit.
Regulacja homeostazy komórki	Kinazy	[5]
Generowanie ruchu przez wywołanie skurczu mięśni	Miozyna	[6]
Transport ładunku wokół komórki jako część cytoszkieletu	Kinezyzna	[7]
Trawienie	Amylaza, Lipaza	[8-9]
Metabolizm	Dehydrogenaza alkoholowa	[10]
Oddychanie	Dehydrogenazy, oksydazy	[11]
Funkcje ochronne	Lizozym	[12]
Budowa kości	Fosfataza alkaliczna	[13]
Wchłanianie i transport składników odżywczych	Chymotrypsyna	[14]
Podział komórkowy	Transferazy	[15]
Detoksykacja	Peroksydaza glutationowa	[16]

Synteza i rozkład enzymów to procesy, które zachodzą w sposób ciągły i jednocześnie. Zapewnia to im określoną koncentrację i aktywność, a co za tym idzie spełnianie swoich funkcji w organizmie [1,17]. Enzymy są zlokalizowane w różnych przedziałach komórkowych (cytoplazmie, lizosomach, błonie komórkowej, mitochondriach), a ich zwiększona aktywność może wskazywać na stopień nasilenia uszkodzeń komórkowych [18].

Diagnostyka enzymatyczna to jedna z gałęzi enzymologii, a określenie enzymy diagnostyczne odnosi się do tych enzymów, które są stosowane bezpośrednio lub jako składniki systemu testowego do oznaczania liczby substancji. Zmiany w stężeniach różnych biomolekuł wskazywać mogą na nieprawidłową aktywność metaboliczną, infekcje, choroby zakaźne i niezakaźne oraz stany zapalne [19,20]. Enzymy diagnostyczne wykorzystuje się na dwa sposoby [21,22]:

1) jako odczynniki do oznaczania prawidłowych i patologicznych składników w surowicy, moczu, soku żołądkowym itp.;

2) do oznaczania aktywności enzymatycznej w materiale biologicznym.

Szybka i dokładna diagnoza tzw. chorób cywilizacyjnych oraz ich odpowiednie leczenie to główne czynniki sprzyjające wzrostowi jakości życia i korzystnie wpływające na ogólne zdrowie publiczne i system opieki zdrowotnej. Enzymy posiadają niezwykle właściwości biokatalityczne, dzięki czemu są szeroko stosowane w diagnostyce wielu chorób. Część z nich znalazła zastosowanie jako markery do wykrywania m.in., żółtaczkę, zawału mięśnia sercowego, zaburzeń neurodegeneracyjnych czy chorób nowotworowych. Enzymy mogą być wykorzystane na różnych etapach choroby poprzez diagnozę, prognozę oraz monitorowanie reakcji organizmu na zastosowaną terapię [1,23].

W niniejszej pracy przedstawiono informacje o wybranych enzymach, które są stosowane w praktyce klinicznej różnych patologii. Przedstawiono przykłady dotyczące chorób cywilizacyjnych - skupiono się na diagnostyce cukrzycy, która ściśle związana jest z trzustką. Dodatkowo zwrócono uwagę na choroby nowotworowe, dla których poszukiwane są alternatywne metody wczesnego wykrywania zmian patologicznych, stanowiących jeden z tematów badań prowadzonych w Pracowni Analityki i Nanodiagnostyki Biochemicznej Uniwersytetu Gdańskiego.

1. ENZYMY DO DIAGNOSTYKI CUKRZYCY

Cukrzyca, z łacińskiego *diabetes mellitus*, to zespół przewlekłych chorób metabolicznych, spowodowanych zaburzoną wydzielaniem lub działaniem insuliny - hormonu produkowanego przez trzustkę [24]. Nazwa łacińska choroby może być przetłumaczona jako "cedzenie wody przez ciało" czy "słodki jak miód" [25]. Określenia te odnoszą się doskonale do głównych objawów cukrzycy, takich

jak wzmożone pragnienie, częste oddawanie moczu czy hiperglikemia, czyli podwyższone stężenie glukozy we krwi [26].

Do rozwoju choroby może przyczynić się zły styl życia, nieodpowiednie nawyki żywieniowe, prowadzące do rozregulowania organizmu, co z kolei zwiększa szanse zaburzenia homeostazy gospodarki glukozowo-insulinowej. Taki stan może spowodować podwyższenie poziomu cukru we krwi. Co ważne, ryzyko zachorowania wzrasta w przypadku występowania obciążeń genetycznych [27].

Zgodnie z raportem Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organisation*, WHO), w 2019 roku na świecie żyło 463 miliony osób dorosłych z cukrzycą [26]. Według szacunków International Diabetes Federation liczba ta w 2030 roku ma wzrosnąć do 578 mln, a w 2045 roku do 700 mln osób chorych [28]. W Polsce liczbę cierpiących na cukrzycę szacuje się na ponad 2,3 mln zdiagnozowanych przypadków. Należy jednak pamiętać o osobach niezdiagnozowanych, których może być aż 232 mln na całym świecie [29].

Jak wspomniano wcześniej, cukrzyca to zespół chorób metabolicznych związanych ze stanem przewlekłego podwyższonego poziomu glukozy we krwi. Powikłania prowadzić mogą przede wszystkim do upośledzenia ukrwienia narządów wewnętrznych, a co za tym idzie do ich niewydolności [31]. Do najczęstszych powikłań zalicza się [32,33]:

- ✓ retinopatię cukrzycową (uszkodzenie naczyń krwionośnych znajdujących się w siatkówce oka);
- ✓ chorobę niedokrwinną serca i zawał;
- ✓ niewydolność nerek;
- ✓ udar mózgu;
- ✓ neuropatię (uszkodzenie nerwów);
- ✓ stopę cukrzycową;
- ✓ zaburzenia krzepnięcia krwi.

Badanie poziomu cukru we krwi to najszybszy i najprostszy sposób na wykrycie cukrzycy. Opracowano szereg enzymów zaangażowanych w metabolizm glukozy, które poprzez odpowiednie reakcje wskazują zawartość cukru w próbce krwi. W dalszej części przedstawiono przykłady tego typu substancji.

1.1. OKSYDAZA GLUKOZOWA

Oksydaza glukozowa (GOx lub GOD), czy też nonatyna (EC 1.1.3.4), to oksydoreduktaza, katalizująca utlenianie glukozy do nadtlenu wodoru i D-glukono-1,5-laktonu [34,35]. Enzym wykorzystuje się w procesach produkcyjnych, zwłaszcza w przemyśle spożywczym, chemicznym, farmaceutycznym czy podczas otrzymywania soków i napojów [36]. W 2013 roku opublikowano wyniki badań dotyczących wykorzystania oksydazy glukozowej w przemyśle tekstylnym [37]. Porównano wydajność bielenia enzymatycznego z konwencjonalnym procesem. Okazało się, że zaproponowana technika jest lepsza pod względem białości, przy porównywalnych właściwościach mechanicznych, takich jak wytrzymałość na rozciąganie i rozdzieranie. Wykazano także, że nadtlenek wodoru wytwarzany przez

oksydazę glukozową to dobra alternatywa dla tego dostępnego komercyjnie, obecnie najszerzej stosowanego jako środek bielący w przemyśle włókienniczym.

Prototyp biosensora glukozy oparty na immobilizowanej oksydazie glukozowej zaproponowano w 1962 roku [38]. Opracowano platynową elektrodę chronoamperometryczną do monitorowania glikemii poprzez pomiar zużycia tlenu na podstawie katalitycznego utleniania glukozy. Problemy spowodowane zmienną ilością tlenu w tle, doprowadziły do dalszego rozwoju czujników. Pierwsze urządzenie umożliwiające pomiar glukozy we krwi pełnej skonstruowano w 1975 roku. Opierało się ono na elektrodach platynowych z unieruchomioną oksydazą glukozową oraz przetwornikiem elektrochemicznym [39]. Czujniki pierwszej generacji zależały od obecności tlenu w próbce, co ograniczało dość znacząco ich zastosowanie oraz precyzję otrzymywanych wyników. Regeneracja centrum katalitycznego, czy skuteczne utlenianie glukozy to procesy wymagające tlenu, którego deficyt w próbce mógł znacząco wpływać na określenie poziomu glukozy. Niedoskonałość urządzeń spowodowała dalszy rozwój prac.

W 2020 roku opublikowano wyniki grupy Mohammadnejada i współpracowników [40] dotyczące bardziej precyzyjnej, dokładnej i szybszej metody pomiaru stężenia glukozy we krwi z wykorzystaniem GOx i peroksydazy chrzanowej (EC 1.11.1.7). Podstawa oznaczenia to utlenienie substratu: kwasu 4-[(hydroksy-3-metoksyfenylo)azo]-benzenosulfonowego (GASA). Stabilność GASA i jego utlenionych produktów oraz jego bezpośrednie i szybkie zużycie przez peroksydazę chrzanową umożliwiają oznaczenie stężenia glukozy we krwi z dużą powtarzalnością, a także pozwalają na zastosowanie metody do próbek śliny [40].

W 2016 roku Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration, FDA*) zatwierdziła używanie glukometru iPro2 Recorder® (Medtronic Diabetes, Northridge, CA), wykorzystującego oksydazę glukozową, do ciągłego pomiaru stężenia glukozy we krwi [41]. 2021 roku zakończono badanie kliniczne mające na celu określenie użyteczności urządzenia do kontroli glikemii w warunkach szpitalnych i intensywnej terapii [42]. Urządzenie nie wymaga ciągłego nakłuwania palców w celu pobrania próbki krwi. Pacjentowi zakłada się sensor, który dokonuje 288 pomiarów na dobę. Pozwala to na retrospektywną ocenę glikemii oraz dokonanie właściwych modyfikacji w leczeniu.

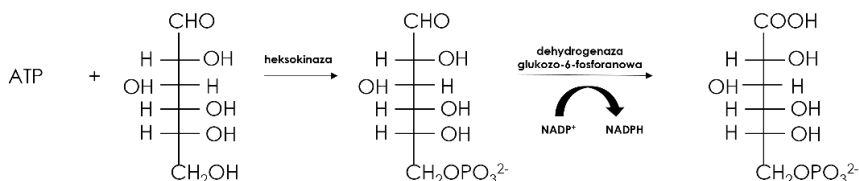
Perspektywy wykorzystania oksydazy glukozowej odnoszą się nie tylko do diagnostyki cukrzycy, ale także do monitorowania choroby, jak również regulowania poziomu glukozy we krwi. W 2016 roku przedstawiono pracę Yanga i współpracowników dotyczącą badań nad systemem mikropełcherzyków zamkniętych w nanocząstkach magnetycznych, reagujących na glukozę i pole magnetyczne [43]. Kapsułkowany enzym – oksydaza glukozowa, katalizuje przemianę glukozy do kwasu glukonowego i H_2O_2 . Następnie zmienne pole magnetyczne zwiększa porowatość otoczki polimerowej, prowadząc do reakcji między H_2O_2 i L-argininą, co skutkuje powstaniem tlenków azotu. Wskazano, że takie nadające się do wstrzykiwania mikropełcherzyki naładowane enzymami i nanocząstkami magnetycznymi mogą przede wszystkim skutecznie obniżyć poziom

glukozy i przyspieszyć efekt terapeutyczny w przypadku hiperglikemii, w oparciu o reakcje enzymatyczne między oksydazą glukozową a glukozą [43].

1.2. HEKSOKINAZA

Heksokinaza (E.C. 2.7.1.1) to enzym, który fosforyluje heksozy (cukry sześciowęglowe), tworząc fosforan heksozy. W większości organizmów, glukoza to najważniejszy substrat dla heksokinaz, a główny produkt reakcji to glukozo-6-fosforan [44]. Heksokinaza może również przenosić grupę fosforanową z ATP na substrat [45]. To właśnie tą właściwość enzymu wykorzystuje się w metodzie oznaczania poziomu glukozy w osoczu bądź surowicy.

Heksokinaza to katalizator reakcji między glukozą a trifosforanem adenozy (ATP), której produktami są glukozo-6-fosforan (G-6-P) i difosforan adenozy (ADP). W obecności dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NAD), G-6-P ulega utlenieniu przez dehydrogenazę glukozo-6-fosforanową (G-6-PD) do 6-fosfoglukonianu i zredukowanego dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADH). Ilość wytworzonego NADH oznacza się poprzez pomiar absorbancji przy 340 nm, proporcjonalnej do stężenia glukozy w próbce [46]. Schemat zachodzącej reakcji przedstawiono na rysunku 2.



Rysunek 2. Przebieg reakcji przemiany glukozy

Figure 2. The glucose metabolism reaction

Powyższą reakcję wykorzystuje się do pomiaru glukozy w surowicy lub osoczu i określa jako „metodę heksokinazy”. Surowicę lub osocze przed badaniem odbiła się wodoroctlenkiem baru, a do reakcji stosuje się siarczan cynku i klarowny supernatant. Metodę opracowało Amerykańskie Stowarzyszenie Chemii Klinicznej (ang. *American Association of Clinical Chemistry*) i przyjęło jako metodę referencyjną do oznaczania glukozy [47].

W porównaniu z metodą wykorzystującą GOx, metoda heksokinazy charakteryzuje się większą specyficznością, precyzją i dokładnością. Enzymy wykorzystywane w tej metodzie, heksokinaza i dehydrogenaza glukozo-6-fosforanowa, są bardzo specyficzne i nie odnotowuje się prawie żadnych interferencji ze strony innych składników krwi [46]. Natomiast w metodzie GOx, zdarzają się zafałszowania wyników, zwłaszcza jeśli pacjent przyjął jakąkolwiek substancję redukującą, np. witaminę C, kilka godzin przed badaniem [48].

Cukrzyca, zwana epidemią XXI wieku, dotyka coraz większą liczbę osób w każdym wieku. Kontrolowanie poziomu glukozy wiąże się z codziennym nakłuwaniem palców, czy okresowym pobieraniem krwi w punktach diagnostycznych, co może wiązać się z dyskomfortem dla pacjentów. Metody enzymatyczne wykorzystywane są zarówno w glukometrach (oksydaza glukozowa), jak i laboratoriach (heksokinaza). Perspektywą do tradycyjnego monitorowania stężenia cukru we krwi może być rozwiązanie zaproponowane przez polskich naukowców z Politechniki Wrocławskiej oraz Polskiej Akademii Nauk. Przedstawiono metodę optycznego oznaczania poziomu glukozy poprzez precyzyjny pomiar światła pochłoniętego i rozproszonego przez skórę. Urządzenie oświetla skórę światłem o ściśle określonej długości fali i bada zmiany spowodowane obecnością glukozy w krwi wewnątrz naczyń krwionośnych [49]. Optyczna, bezinwazyjna technika pomiaru glikemii, dostępna w formie inteligentnego zegarka, to atrakcyjna alternatywa w stosunku do popularnych glukometrów paskowych oraz coraz popularniejszych również w rozwiązaniach pół inwazyjnych (iPro2 Recorder®). Ten kierunek rozwoju metod kontrolowania cukrzycy z pewnością przyniesie korzyści dla pacjentów.

2. ENZYMY DO DIAGNOSTYKI ZAPALENIA TRZUSKI

Trzustka to długi, płaski gruczoł, znajdujący się za żołądkiem w górnej części brzucha. Tutaj wytwarzane są enzymy, biorące udział w trawieniu tłuszczu, białek i węglowodanów, co nazwane jest tzw. zewnątrzwydzielniczą funkcją organu. Można wyróżnić także funkcje wewnątrzwydzielnicze, obejmujące produkcję hormonów regulujących sposób, w jaki organizm przetwarza cukier (glukozę). Choroby trzustki mogą być bardzo niebezpieczne dla zdrowia, a nawet zagrażać życiu pacjenta. Do najczęściej występujących zalicza się zapalenie i nowotwór [50].

Procesy zapalne trzustki mogą pojawić się nagle i minąć po kilku dniach. Taki stan nazwano ostrym zapaleniem. Może również zdarzyć się, że sytuacja taka trwa wiele lat i rozwija się w postać przewlekłą. Już w 1925 roku zaproponowano oznaczenie stężenia amylazy i lipazy w surowicy w celu rozpoznania zapalenia trzustki, a w 1939 przedstawiono teorię tzw. „wykolejenia enzymatycznego” w celu wyjaśnienia patogenezy tej choroby [51]. W 1957 roku przedstawiono wyniki Saxona, dotyczące wartości porównawczej amylazy w surowicy i w moczu do diagnozowania ostrego zapalenia trzustki [52]. Przeprowadzono także szereg badań dotyczących wykorzystania lipazy w ostrym zapaleniu trzustki. Również w 1957 roku Gomori opublikował wyniki oznaczania lipazy w surowicy [53]. Z kolei rok później, stosując substrat benzoilo-L-argininę, stwierdzono wzrost aktywności proteolitycznej amylazy i lipazy surowicy u pacjentów z ostrym zapaleniem trzustki, a także z rakiem trzustki [54].

Czynniki przyczyniające się do wystąpienia zapalenia trzustki mogą być różne, mniej lub bardziej zależne od pacjenta. Wśród najczęstszych przyczyn prowadzących do dysfunkcji trzustki można zaliczyć [55,56]:

- ✓ nadużywanie alkoholu,

- ✓ kamicę żółciową,
- ✓ urazy jamy brzusznej,
- ✓ infekcje,
- ✓ stosowanie niektórych leków.

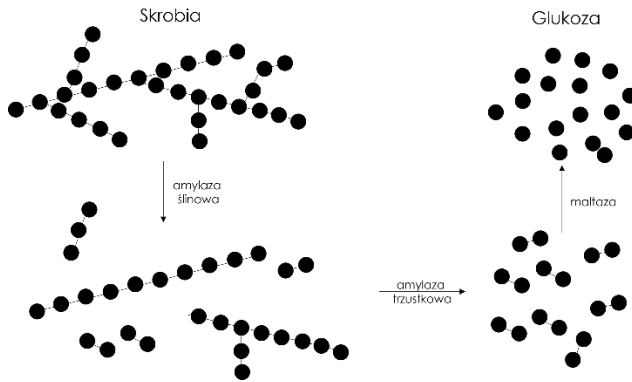
Silny, przeszywający ból w górnej części brzucha, utrzymujący się nawet do kilku dni, to jeden z głównych i najczęstszych objawów zapalenia trzustki, którego nie należy lekceważyć. Na wczesnych etapach choroby często nie da się określić, czy jest to postać ostra, czy przewlekła [57]. Podstawowe badanie zlecane przy podejrzeniu zapalenia trzustki to oznaczenie poziomu enzymów: amylazy, lipazy i elastazy. Poniżej przedstawiono charakterystykę enzymów najczęściej stosowanych w diagnostyce zapalenia trzustki.

2.1. AMYLAZA

Amylaza (EC 3.2.1.1) to enzym trawienny wydzielany głównie przez trzustkę i gruczoły ślinowe oraz występujący w innych tkankach w bardzo małych ilościach. Aktywność enzymatyczną amylazy po raz pierwszy odkryto na początku XIX wieku. W 1831 roku opisano hydrolizę skrobi przez ślinę, a dokładnie znajdujący się w niej enzym „ptyalinę” [58]. Dwa lata później francuscy chemicy Anselme Payen i Jean-François Persoz wyizolowali kompleks amylazy z kiełkującego jęczmienia i nazwali go „diastazą”, który następnie przemianowano na amylazę [59].

Główna funkcja amylaz to hydroliza wiązań glikozydowych w cząsteczkach skrobi, przekształcająca złożone węglowodany w cukry proste (Rysunek 3). Istnieją trzy główne klasy enzymów należących do amylaz: alfa-, beta- i gamma-. Każda z nich działa na różne części cząsteczek węglowodanów. Alfa-amylaza występuje u ludzi, zwierząt, roślin i drobnoustrojów. Beta-amylaza znajduje się w drobnoustrojach i roślinach. Gamma-amylaza obecna jest u zwierząt i roślin [60].

Badanie przeprowadzone przez Wohlgemutha w 1908 roku, wykazało obecność amylazy w moczu [61]. W 1929 roku zależność podwyższonego poziomu amylazy z ostrym zapaleniem trzustki opisana przez Elmana, doprowadziła do większego zainteresowania pomiarem i kliniczną użytecznością enzymu [62]. Dziewięć lat później, Somogyi opracował dwa testy - sacharogenny i amyloklastyczny, do oznaczania amylazy. Odkrycie to wywarło głęboki wpływ na biochemię kliniczną na kilka kolejnych dziesięcioleci. Metoda amyloklastyczna i jej późniejsze modyfikacje stały się najczęściej stosowanym testem na obecność amylazy w chemii klinicznej [63]. Poziom amylazy można oznaczyć zarówno we krwi, jak i w moczu. Uzyskane wyniki powinny być interpretowane na podstawie wartości referencyjnych, zależnych od zastosowanej metody, podanych przez laboratorium wykonujące badanie [60].



Rysunek 3. Przebieg reakcji przemiany skrobi

Figure 3. The starch metabolism reaction

Określenie poziomu amylazy wykonuje się przede wszystkim w diagnostyce chorób trzustki. Powszechność testu wynika między innymi z dostępności niedrogich odczynników oraz automatyzacji stosowanych metod. Chociaż amylaza to czuły wskaźnik ostrego zapalenia trzustki, nie jest specyficzna, ponieważ może być podwyższona w innych stanach chorobowych niezwiązanych z narządem. Zapalenie trzustki można zdefiniować na podstawie dwóch z trzech następujących kryteriów: ból brzucha, poziom amylazy i/lub lipazy w surowicy ponad trzykrotnie przekraczający górną granicę normy oraz obrazowanie jamy brzusznej potwierdzające charakterystyczne cechy zapalenia trzustki [60, 61].

Zastosowanie kliniczne amylazy nie ogranicza się tylko do diagnostyki. Badania opublikowane w 2017 roku przez grupę McInnes wskazują na użyteczność inhibitorów amylazy w leczeniu cukrzycy 2, gdzie mogą w umiarkowanym stopniu zmniejszać szczytowy poziom glukozy i hemoglobiny A1C po posiłku. Zwykle są one stosowane jako leki drugiego rzutu, często w połączeniu z metforminą [64]. Z kolei doniesienia zespołu Cadigiani wskazały, że akarboza - inhibitor amylazy, może zmniejszyć objawy zespołu poresekcyjnego, występujące po operacji bariatrycznej [65].

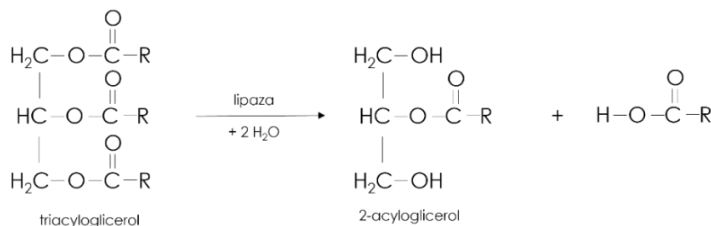
2.2. LIPAZA TRZUSTKOWA

Lipazy to rozpuszczalne w wodzie enzymy, hydrolizujące nierozpuszczalne w wodzie cząsteczki lipidów, takie jak trójglicerydy, fosfolipidy i galaktolipidy. Są wszechobecne w przyrodzie, występują u ludzi, zwierząt, owadów, roślin, grzybów i mikroorganizmów [66].

Odkrycie Claude'a Bernarda z 1848 roku wykazało, że wydzielina trzustkowa może emulgować i zmydlać substancje tłuszczowe. Okazało się, że za obserwowane reakcje odpowiada enzym, nazwany później „lipazą trzustkową” [67].

Lipaza trzustkowa (EC 3.1.1.3) to enzym o kluczowym znaczeniu dla trawienia i wchłaniania tłuszczów z pożywienia. Odpowiada za hydrolizę wiązań estrowych w triglicerydach do glicerolu oraz wolnych kwasów tłuszczowych (Rysunek 4). Synteza enzymu zachodzi głównie w trzustce, a w niewielkich ilościach także w gruczołach ślinowych i w żołądku [68].

Lipaza jest produkowana przez trzustkę w formie aktywnej. W trzustce powstaje także kolipaza, zdolna do wiązania się z lipazą, co prowadzi do zmiany konformacji tej drugiej i zwiększenia jej aktywności. Lipaza nie przechodzi do moczu, dlatego jej aktywność można ocenić tylko za pomocą badania krwi [69].



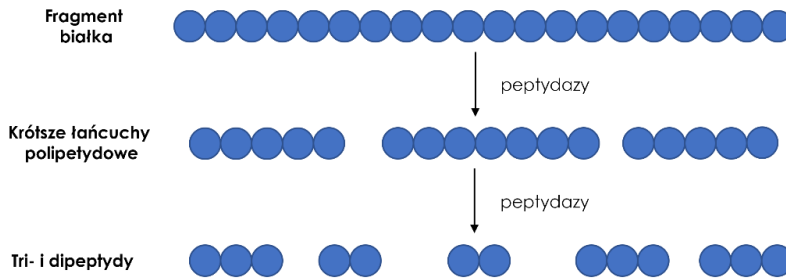
Rysunek 4. Przebieg hydrolizy trójglicerydów
Figure 4. The triglyceride hydrolysis reaction

Stężenie lipazy w surowicy zwykle wzrasta 3–6 godzin po wystąpieniu ostrego zapalenia trzustki i w większości przypadków osiąga szczyt po 24 godzinach. W przeciwieństwie do amylazy, w kanalikach nerkowych dochodzi do znacznej reabsorpcji lipazy, więc jej stężenie w surowicy pozostaje podwyższone przez 8–14 dni. Oznacza to, że lipaza jest znacznie bardziej użyteczna niż amylaza. Bardzo często wykonuje się badanie obu enzymów, a dodatkowo oznacza stosunek amylazy do lipazy [70].

Lipaza trzustkowa wykorzystywana jest się nie tylko w celach diagnostycznych. Badania przeprowadzone w 2000 roku wskazały na użyteczność inhibitora enzymu – orlistatu, w długoterminowym leczeniu otyłości [71]. Jedna trzecia pacjentów leczonych orlistatem osiągnęła klinicznie istotną utratę masy ciała (> lub = 5% początkowej masy ciała). Obserwowano również poprawę odpowiednich parametrów lipidowych w surowicy. Orlistat był dobrze tolerowany przez pacjentów oraz został zatwierdzony przez FDA do leczenia otyłości.

2.3. ELASTAZA TRZUSTKOWA

Elastaza trzustkowa (EC 3.4.21.36), zwana również jako elastaza kałowa-1, to proteaza wytwarzana w komórkach groniastych trzustki. Początkowo produkowana jest w postaci nieaktywnego zymogenu, a następnie aktywowana w dwunastnicy przez tripsynę. U ludzi enzym odpowiada za trawienie białek z pożywienia do mniejszych fragmentów, zwanych peptydami (Rysunek 5) [72,73].



Rysunek 5. Przebieg hydrolizy białka

Figure 5. The protein hydrolysis reaction

Pierwsze badania nad ludzką elastazą trzustkową prowadzono w 1950 roku [74]. Późniejsze doniesienia wykazały stabilność enzymu podczas pasażu jelitowego. Elastaza przechodzi z sokiem trzustkowym do jelit, a następnie trafia do kału. W związku z tym, że enzym sam nie ulega strawieniu w przewodzie pokarmowym, jego stężenie w kale odzwierciedla zewnątrzwydzielniczą funkcję trzustki. Oznaczenie elastazy w kale to proste, nieinwazyjne i niedrogié badanie [75].

Obniżone stężenie elastazy zwykle świadczy o stanach zapalnych lub niewydolności trzustki, która może prowadzić do zaburzeń wchłaniania. W związku z tym określenie poziomu elastazy to bardzo ważne badanie profilaktyczne u osób podwyższonego ryzyka zachorowań np. na cukrzycę [76].

Badania prowadzone przez niezależne grupy wykazały, że test obecności elastazy w kale to wysoce czuły biomarker umiarkowanej do ciężkiej niewydolności trzustki, z czułością 73–100% i swoistością 80–100% [77-79].

Zapalenie trzustki może prowadzić do jej uszkodzenia, zajęcia sąsiadujących tkanek czy też innych oddalonych narządów. Stąd też bardzo ważna jest wczesna diagnostyka w celu wprowadzenia odpowiedniego leczenia. W przypadku zapalenia trzustki dochodzi do niekontrolowanej aktywacji proenzymów trzustkowych. Wyżej przedstawiona charakterystyka wskazuje jednoznacznie, że pojedyncze enzymy są mało specyficzne, a ich podwyższone poziomy mogą być spowodowane przez choroby niezwiązane z trzustką. Jednak we wczesnych stadiach choroby zmiany strukturalne narządu są trudne do wychwycenia za pomocą badań radiologicznych czy endoskopowych, stąd najczęściej polega się na badaniach funkcji trzustki, czyli oznaczeniu profilu enzymatycznego.

Alternatywna metoda diagnostyki ostrego zapalenia trzustki to zaproponowany przez firmę Medix Biochemica, test Actim Pancreatitis [80]. Badanie polega na oznaczeniu poziomu trypsynogenu-2 (enzymu trzustkowego) w moczu pacjenta. Co prawda test nie został jeszcze zatwierdzony przez FDA, lecz prowadzone badania prospektywne wykazały obiecujące wartości czułości 89,6% i 80,0% oraz swoistości 85,7% i 92,0% [81,82]. Dodatkowo prowadzone jest badanie kliniczne z wykorzystaniem Actim Pancreatitis do wczesnego wykrywania zapalenia

trzustki po endoskopowej cholangiopankreatografii wstecznej, jednej z najskuteczniejszych metod oceniających drogi żółciowe i przewody trzustkowe [83].

3. ENZYMY DO DIAGNOSTYKI CHORÓB NOWOTWOROWYCH

Zgodnie z definicją zaproponowaną przez WHO, nowotwór to ogólny termin określający dużą grupę chorób, które mogą wpływać na dowolną część ciała. Jedną z charakterystycznych cech jest szybkie tworzenie się nieprawidłowych komórek, które rozrastają się poza swoje normalne granice, aby następnie zaatakować sąsiednie części ciała i rozprzestrzenić się na inne narządy, czyli spowodować przerzuty. To właśnie te ostatnie są główną przyczyną śmierci z powodu choroby [84].

Choroby nowotworowe pojawiają się z wielu powodów. Mogą być spowodowane nieprawidłową ewolucją komórek, która wymknęła się spod kontroli. Inną przyczyną mogą być niewłaściwie działające systemy obronne organizmu, czy też codzienna ekspozycja na czynniki tzw. kancerogenne czy mutagenne [84].

Wiele osób zadaje sobie pytanie czy rak to choroba cywilizacyjna? Odpowiedź w tym przypadku nie jest taka jednoznaczna. Z jednej strony można powiedzieć że tak, ponieważ ryzyko zachorowania na raka jest kształtowane przez wiele wyraźnie współczesnych ekspozycji, takich jak palenie. Z drugiej zaś strony nie, ponieważ predyspozycja do zachorowania na raka wynika z faktu, że ciało człowieka jest organizmem wielokomórkowym, a komórki mogą ewoluować. Tak więc rak to częściowo choroba współczesności, ale to także choroba, której korzenie sięgają głęboko w historię ewolucji. Niemniej jednak można wiele zrobić, aby zmniejszyć ryzyko zachorowania na niektóre nowotwory, zmieniając styl życia i ekspozycję na czynniki sprzyjające rozwojowi choroby [85,86].

Aby cieszyć się dobrym zdrowiem przez długie lata potrzebna jest też profilaktyka. Odpowiednie badania, wykonywane regularnie pozwalają na wykrycie choroby na wczesnym etapie, kiedy leczenie a nawet całkowite wyleczenie jest możliwe. Taki schemat sprawdza się nie tylko w przypadku chorób nowotworowych, ale także w innych dolegliwościach. W tym miejscu przedstawiono przykłady enzymów potencjalnie użytecznych do diagnostyki nowotworów.

3.1. KALLIKREINA 3

Kallikreina 3 (EC 3.4.21.77), znana również pod nazwą antygeny specyficznego dla prostaty (*ang.* Prostate Specific Anigen, PSA), to proteinaza serynowa wydzielana prawie wyłącznie przez komórki nabłonkowe gruczołu prostaty. PSA znajduje się także w ejakulacie, gdzie upłynnia nasienie i umożliwia plemnikom swobodne pływanie. Uważa się również, że odgrywa zasadniczą rolę w rozpuszczaniu śluzu szyjkowego, umożliwiając przedostanie się plemników do macicy [87].

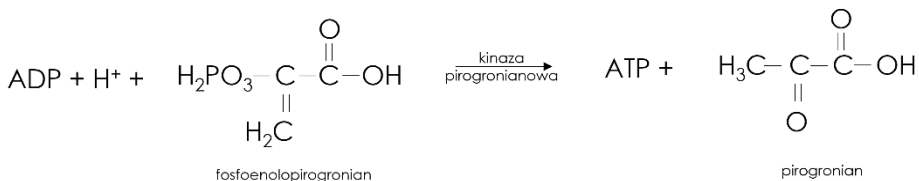
PSA pierwszy raz zidentyfikowano w płynie nasiennym, podczas badań nad substancjami pomocnymi w identyfikacji przestępców dopuszczających się gwałtu. Enzym ten znalazł zastosowanie w serologii kryminalistycznej do wskazania obecności nasienia, gdyż u dorosłych mężczyzn poziomy kallikreiny 3 są znacznie podwyższone w porównaniu z innymi tkankami. Co więcej obecność PSA jest niezależna od obecności plemników, co pozwala na identyfikację mężczyzn po wazektomi czy cierpiących na azoospermie [88].

PSA najbardziej rozpowszechniony jest jako narzędzie do diagnostyki raka prostaty. Poziom enzymu w surowicy to parametr ciągły: im wyższa wartość, tym bardziej prawdopodobna obecność nowotworu gruczołu krokowego. Oznacza to, że nie ma powszechnie akceptowanego poziomu odcięcia lub górnej granicy normy [89]. Wytyczne praktyki klinicznej dotyczące badań przesiewowych raka prostaty są różne i wzbudzają kontrowersje. Częściowo ze względu na niepewność co do tego, czy korzyści ostatecznie przewyższają ryzyko fałszywie dodatniej diagnozy. W Stanach Zjednoczonych Agencja ds. Żywności i Leków zatwierdziła test PSA do corocznego badania raka prostaty u mężczyzn w wieku 50 lat i starszych. Pacjent musi zostać jednak poinformowany o potencjalnym ryzyku i korzyściach związanych z badaniem przed przeprowadzeniem testu [90].

Nowo opracowywane metody do diagnostyki nowotworu prostaty w dalszym ciągu wykorzystują oznaczanie PSA. Dostępny komercyjnie test 4Kscore® (BioReference Laboratories, Inc., OPKO Health Company) polega na pomiarze stężeń czterech białek - PSA całkowitego, wolnego PSA, niezmienionego PSA i kallikreiny 2, w próbce krwi pacjenta. Wykorzystywany jest do oceny ryzyka wystąpienia agresywnego nowotworu prostaty, a w 2021 roku został zatwierdzony przez FDA [91]. Dodatkowo w 2019 roku rozpoczęto badanie kliniczne dotyczące oceny skuteczności oznaczania kallikreiny 2 i [-2]-pro PSA we krwi oraz moczu do diagnostyki i prognozowania raka prostaty w populacji chińskiej [92].

3.2. KINAZA PIROGRONIANOWA

Kinaza pirogronianowa (EC 2.7.1.40) to enzym z grupy transferaz, który katalizuje ostatni etap glikolizy. Jest ważny dla wytworzenia trifosforanu adenozy (ATP), jako że przenosi grupę fosforanową z fosfoenolpirogronianu na ADP (Rysunek 6). Ssaki wykazują ekspresję czterech głównych izoenzymów kinazy pirogronianowej (PK): mięśni i mózgu (M1), wątroby i nerek (L), erytrocytów (R) i wszechobecnych typów M2 [93].



Rysunek 6. Przebieg reakcji katalizowanej przez kinazę pirogronianową

Figure 6. The reaction catalyzed by pyruvate kinase

Charakterystyka enzymatyczna szerokiego zakresu różnych typów nowotworów ujawniła, że powstawaniu choroby towarzyszy wzrost całkowitej aktywności kinazy pirogronianowej. Następuje również przesunięcie w kierunku ekspresji izoenzymu kinazy pirogronianowej typu M2 (M2-PK) i odejście od izoenzymów tkankowo specyficznych (L, M1 oraz R). Typ M2-PK jest uwalniany z tkanek zmienionych nowotworowo do krwi, a w przypadku gruczolaków i guzów w dolnym odcinku przewodu pokarmowego również do kału pacjentów. Wzrost M2-PK występuje w nowotworach przewodu pokarmowego, a także w wielu innych, takich jak rak płuc, nerki, piersi i szyjki macicy [94,95].

Obecność M2-PK w kale została wykorzystana do opracowania komercyjnie dostępnego testu na raka jelita grubego. Użycie kału do badania obecności M2-PK zostało po raz pierwszy opisane przez Hardta i współpracowników w 2003 roku. Autorzy ilościowo oznaczyli poziom M2-PK w materiale biologicznym i zasugerowali, że badanie może być przydatne w testach przesiewowych raka jelita grubego [96]. W 2006 roku opublikowano wyniki badań niemieckiej grupy Tonusa i współpracowników [97]. Test M2-PK wykonano na grupie 96 osób (33 pacjentów z rakiem jelita grubego, 21 pacjentów z rakiem odbytnicy i 42 zdrowych ochotników). Ogólna czułość wyniosła 78% dla raka jelita grubego i wzrastała z 60% dla stadium T1 do 100% dla stadium T4. W 2015 roku grupa Sithambarama zweryfikowała użyteczność testu M2-PK określając czułość, swoistość, dodatnią wartość predykcijną i ujemną wartość predykcijną, które wyniosły odpowiednio: 93%, 97,5%, 94,9% i 96,5% [98]. Pięć lat później, irański zespół badaczy [99] uzyskał 100% czułości oraz 68% specyficzności w prospektywnym badaniu testu M2-PK przeprowadzonym na 226 próbkach kału i 178 próbkach osocza. Pomimo zadowalających parametrów test M2-PK nie został zatwierdzony przez FDA.

Test M2-PK to nieinwazyjna metoda przesiewowa służąca do wczesnego wykrywania raka jelita grubego i polipów, o których wiadomo, że są prekursorami rozwoju choroby nowotworowej. Test używany do analizy kału, jest dostępny jako w pełni ilościowy test ELISA lub jako szybki test, do wykonania przez każdego lekarza pierwszego kontaktu bez potrzeby posiadania laboratorium lub dodatkowego sprzętu. Złotym standardem wczesnego wykrywania choroby jest kolonoskopia – badanie inwazyjne, jak również kosztowne oraz często budzące strach wśród pacjentów. Stąd też stosunkowo tani, nieinwazyjny test M2-PK to dobry wybór do wczesnej diagnostyki [98].

Alternatywą do enzymatycznego testu wykrywającego nowotwór jelita grubego może być test genetyczny Cologuard® (Exact Sciences Corporation). Materiałem biologicznym do badania również jest kał, gdzie ocenie poddaje się 11 biomarkerów, nieprawidłowych odcinków DNA pochodzących z komórek rakowych lub polipów, a także sprawdza obecność utajonej krwi. To jedyny nieinwazyjny test diagnostyczny z kału do diagnostyki raka jelita grubego zatwierdzony przez FDA [100].

3.2. KALLIKREINA 13

Ludzka kallikreina 13 (KLK13) to proteinaza serynowa, głównie wytwarzana w jądrach, prostaty, piersiach, gruczołach ślinowych, przełyku i szyjce macicy. Enzym powiązany też z niektórymi patologiami skóry, w tym łuszczycą zwykłą i atopowym zapaleniem skóry. Ponadto KLK13 opisano jako niezależny, korzystny marker prognostyczny w raku piersi i jajnika oraz potencjalny użyteczny klinicznie marker prognostyczny odpowiedzi komórek raka żołądka na chemioterapię [101].

W 2017 roku przedstawiono badania Tokasa i współpracowników, dotyczące znaczenia KLK13 dla rokowania i wyników leczenia raka pęcherza moczowego. Odkryto zwiększoną ekspresję enzymu w guzach pęcherza moczowego w porównaniu z normalnymi sąsiednimi tkankami. Co więcej, wskazano że obniżone poziomy ekspresji KLK13 mogą być skorelowane z agresywnym fenotypem choroby [102]. W 2021 roku przeprowadzono badania z wykorzystaniem próbek moczu pobranych od pacjentów cierpiących na nowotwór pęcherza moczowego, na różnym stadium zaawansowania choroby (G1 – G3). Wykorzystano specyficzny względem KLK13 substrat ABZ-Val-Arg-Phe-Arg-Ser-Thr-Gln-Tyr(3-NO₂)-NH₂, celem sprawdzenia obecności enzymu w ludzkim moczu. Dodatkowo wyniki uzyskano dla próbek pobranych od pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem pęcherza moczowego stadium G2 i G3. Wykazano tym samym użyteczność kallikreiny 13 do diagnostyki raka pęcherza w bardziej zaawansowanych stadiach [103].

W 2019 roku wykazano użyteczność kallikreiny 13 jako jednego z czynników prognostycznych w raku jelita grubego [104]. Przeanalizowano przedoperacyjne próbki surowicy pobrane od 148 pacjentów z rakiem okrężnicy leczonych chirurgicznie w Szpitalu Uniwersyteckim w Helsinkach w latach 1998-2002. U pacjentów z wysokimi poziomami mucyny 16 i niskimi poziomami KLK13 rokowanie było złe, co obserwowano również w podgrupach pacjentów z chorobą prawokomorową i tych z gruczolakorakiem.

Badania dotyczące KLK13 są niezwykle obiecujące. Enzym wykazuje użyteczność na etapie diagnozy, monitorowania, jak również prognozowania choroby nowotworowej.

Nowotwory to główny problemem zdrowia publicznego na całym świecie. Dostępne badania profilaktyczne, jak cytologia czy mammografia, pozwalają na wykrycie pojawiających się nieprawidłowości oraz podjęcie odpowiedniej interwencji. Niestety wiele typów nowotworów na wczesnych etapach rozwija się bezobjawowo, bądź pojawiające się symptomy są niespecyficzne. W przypadku tego typu chorób niezwykle istotna jest wczesna diagnoza, gdy możliwe jest zastosowanie terapii pozwalającej często na całkowite wyleczenie. Perspektywą do drogich, często inwazyjnych metod diagnostycznych jest wykorzystanie enzymów. W wielu przypadkach ich nieprawidłowe poziomy mogą wskazywać na rozwijające się stany

patologiczne. Niejednokrotnie wykorzystywana jest również kombinacja kilku markerów, wykazująca większą czułość i specyficzność.

UWAGI KOŃCOWE

Enzymy są powszechnie wykorzystywane w przemysłowych przemianach chemicznych, różnych formach katalizy, a ostatnio także w produkcji farmaceutycznej. W medycynie cząsteczki te znalazły zastosowanie w badaniach analitycznych, diagnostyce chorób, leczeniu niedoborów enzymatycznych, czy leczeniu ran. W patologii klinicznej enzymy to nieocenione narzędzie w diagnostyce uszkodzeń tkanek i zaburzeń komórkowych.

Wiele spośród enzymów wykorzystywanych jest od lat w standardowej diagnostyce klinicznej, a odchylenia poziomów od normy wskazują na możliwe dysfunkcje danego narządu. Enzymy są również odpowiednimi kandydatami do wykorzystania jako biomarkery. W toku prowadzonych badań w Pracowni Analityki i Nanodiagnostyki Biochemicznej Uniwersytetu Gdańskiego, udało się wykazać powiązanie enzymów z nowotworem pęcherza moczowego oraz wskazać na potencjalne wykorzystanie w diagnostyce choroby [103, 105-107]. We współpracy z Pracownią Nefrologii Molekularnej i Komórkowej Polskiej Akademii Nauk, wykazaliśmy, że ekspresja i aktywność CatC są zwiększone w moczu szczurów z cukrzycą [108]. Okazuje się, oznaczenie aktywności enzymatycznej może być podstawą bezinwazyjnego, szybkiego testu w danej jednostce chorobowej. Szybki rozwój dziedziny enzymologii, jak również wysiłki naukowców zmierzające do powiązania enzymów z chorobami zapewne doprowadzą do pojawienia się nowych, alternatywnych metod diagnostycznych.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] P.K. Robinson. *Essays Biochem.* 2015, **59**, 1.
- [2] G.M. Cooper. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.
- [3] R.M. Daniel, J.L. Finney, V. Réat, R. Dunn, M. Ferrand, J.C. Smith. *Biophys J.* 1999, **77**, 2184.
- [4] T.R. Cec, N.K. Tanner, I. Jr Tinoco, B.R. Weir, M. Zuker, P.S. Perlman. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983, **80**, 3903.
- [5] Y. Xiao, Q. Zou, X. Xie, T. Liu, H.S. Li, Z. Jie, J. Jin, H. Hu, G. Manyam, L. Zhang, X. Cheng, H. Wang, I. Marie, D.E. Levy, S.S. Watowich, S.C. Sun. *J Exp Med.* 2017, **214**, 1493-1507.
- [6] H.H. Weber. *Pflügers Arch.* 1935, **235**, 205.
- [7] C. Kural, H. Kim, S. Syed, G. Goshima, V.I. Gelfand, P.R. Selvin. *Science.* 2005, **308**, 1469.
- [8] W.M. Steinberg, N.A. Nauck, B. Zinman, G.H. Daniels, R.M. Bergenstal, J.F. Mann, L. Steen Ravn, A.C. Moses, M. Stockner, F.M. Baeres, S.P. Marso, J.B. Buse, LEADER Trial investigators. *Pancreas.* 2014, **43**, 1223-1231.
- [9] W.M. Steinberg, J. Rosenstock, T.A. Wadden, M. Donsmark, C.B. Jensen, J.H. DeVries. *Diabetes Care.* 2017, **40**, 839.
- [10] F. Batelli, L. Stern, *Biochem. Z.* 1910, **28**, 145.
- [11] C.N. Hancock, W. Liu, W.G. Alvord, J.M. Phang. *Amino Acids.* 2016, **48**, 859.
- [12] A. Fleming. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 1922, **93**, 6.

- [13] R. Robison, K.H. Soames. *Biochem J.* 1924, **18**, 740.
- [14] M. Kunitz, J.H. Northrop. *J Gen Physiol.* 1935, **18**, 433.
- [15] B. Qi, J. Doughty, R. Hooley. *New Phytol.* 2013, **200**, 444.
- [16] G.C. Mills. *J Biol Chem.* 1957, **229**, 189.
- [17] A.M. Egorov, M.M. Ulyashova, M.Y. Rubtsova. *Acta Naturae.* 2018, **10**, 33.
- [18] P.C. Trivedi, J.J. Bartlett, T. Pulinilkunnil. *Cells.* 2020, **9**, 1131.
- [19] H.B. Bosmann, T.C. Hall. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974, **71**, 1833.
- [20] A.P. Soleimany, S.N. Bhatia. *Trends Mol Med.* 2020, **26**, 450.
- [21] O.E. Tsitsilonis, A. Thrasyvoulide, A. Balafas, J.F. Voutsas, M. Papamichail, P. Lymberi. *J Pharm Biomed Anal.* 2004, **34**, 811.
- [22] H. Drozd, A. Jedrychowski. *Pol Arch Med Wewn.* 1970, **4**, 529.
- [23] N. Gruba, L. Stachurski, A. Lesner. *J Biochem.* 2021, **170**, 547.
- [24] A.E. Butler, J. Janson, S. Bonner-Weir, R. Ritzel, R.A. Rizza, P.C. Butler. *Diabetes.* 2003, **52**, 102.
- [25] M.Z. Banday, A.S. Sameer, S. Nissar. *Avicenna J Med.* 2020, **10**, 174.
- [26] American Diabetes Association. *Diabetes Care.* 2009, 32 Suppl 1, S62.
- [27] Y.H. Yau, M.N. Potenza. *Minerva Endocrinol.* 2013, **38**, 255.
- [28] P. Saeedi, I. Petersohn, P. Salpea, B. Malanda, S. Karuranga, N. Unwin, S. Colagiuri, L. Guariguata, A.A. Motala, K. Ogurtsova, J.E. Shaw, D. Bright, R. Williams, IDF Diabetes Atlas Committee. *Diabetes Res Clin Pract.* 2019, **157**, 107843.
- [29] R. Topor-Madry, B. Wojtyniak, K. Strojek, D. Rutkowski, S. Bogusławski, A. Ignaszewska-Wyrzykowska, P. Jarosz-Chobot, M. Czech, A. Kozierekiewicz, K. Chlebus, T. Jędrzejczyk, M. Mysliwiec, J. Polanska, M.J. Wysocki, T. Zdrojewski. *Diabet Med.* 2019, **36**, 1209.
- [30] Y.H. Yau, M.N. Potenza. *Minerva Endocrinol.* 2013, **38**, 255.
- [31] U. Galicia-Garcia, A. Benito-Vicente, S. Jebari S, A. Larrea-Sebal, H. Siddiqi, K.B. Uribe, H. Ostolaza, C. Martín. *Int J Mol Sci.* 2020, **21**, 6275.
- [32] A.D. Kaze, B.G. Jaar, G.C. Fonarow, J.B. Echouffo-Tcheugui. *BMC Med.* 2022, **20**, 127.
- [33] J. Hong, A. Surapaneni, N. Daya N, E. Selvin, J. Coresh, M.E. Grams, S.H. Ballew. *Kidney Med.* 2021, **3**, 808.
- [34] C.E. Coulthard, R. Michaelis, W.F. Short, G. Sykes. *Biochem J.* 1945, **39**, 24.
- [35] K. Kleppe. *Biochemistry.* 1966, **5**, 139.
- [36] D. Petrović, D. Frank, S.C.L. Kamerlin, K. Hoffmann, B. Strodel. *ACS Catal.* 2017, **7**, 6188.
- [37] A. Farooq, S. Ali, N. Abbas, G.A. Fatima, M.A. Ashraf. *J Clean Prod.* 2013, **42**, 167.
- [38] L.C. Jr. Clark, C. Lyons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1962, **102**, 29.
- [39] S.A. Pullano, M. Greco, M.G. Bianco, D. Foti, A. Brunetti, A.S. Fiorillo. *Theranostics.* 2022, **12**, 493.
- [40] P. Mohammadnejad, S.S. Asl, S. Aminzadeh, K. Haghbeen. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2020, **229**, 117897.
- [41] <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfpma/pma.cfm?id=P150029> (dostęp on-line 19.01.2023)
- [42] <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04015388?term=glucose+oxidase&cond=Diabetes+Mellitus&draw=2&rank=9> (dostęp on-line 19.01.2023)
- [43] F. Yang, M. Li, Y. Liu, T. Wang, Z. Feng, H. Cui, N. Gu. *J. Control. Release.* 2016, **228**, 87.
- [44] Cárdenas ML, Cornish-Bowden A, Ureta T. *Biochim Biophys Acta.* 1998, **1401**, 242.
- [45] R.B. Robey, N. Hay. *Oncogene.* 2006, **25**, 4683.
- [46] A. Zhu, R. Romero, H.R. Petty. *Anal Biochem.* 2011, **419**, 266.
- [47] D.B. Sacks, D.E. Bruns, D.E. Goldstein, N.K. Maclaire, J.M. McDonal, M. Parrott. *Clin Chem.* 2002, **48**, 436.
- [48] H.W. Moon, J.Y. Kim, E.S. Kang, W.S. Chung. *Korean J Lab Med.* 2005, **25**, 294.
- [49] <https://www.dlazdrowia.pl/pomiar-glukozy-z-uzyciem-glukometru-glucoactive/> [dostęp on-line 03.01.2023]
- [50] M. Karpińska, M. Czauderna. *Front Physiol.* 2022, **13**, 807632.
- [51] G. Katsch. *Klin Wochenschr.* 1925, **4**, 289.
- [52] E.I. Saxon, W.C. Hinkley, W.C. Vogel, L. Zieve. *Arch Inter Med.* 1957, **99**, 607.
- [53] G. Gomori. *Am J Clin Pathol.* 1957, **27**, 170D.

- [54] G.L. Nardi, C.W. Lees. *N Eng J Med.* 1958, **258**, p. 797.
- [55] G. Goodchild, M. Chouhan, G.J. Johnson. *Frontline Gastroenterol.* 2019, **10**, 292.
- [56] T.B. Gardner, A.T. Kennedy, A. Gelrud, P.A. Banks, S.S. Vege, S.R. Gordon, B.E. Lacy. *Pancreas.* 2010;39(4):498-501.
- [57] P. Kongkam, D.L. Wagner, S. Sherman, E.L. Fogel, S.C. Whittaker, J.L. Watkins, L. McHenry, G.A. Lehman. *Am J Gastroenterol.* 2009;**104**, 1249.
- [58] E.F. Leuchs. *EF (1831). Ann. Phys. Chem. Pog.* 1831, **22**, 623.
- [59] A. Payen, J.F. Persoz. *Ann Chim Phys.* 1833. **53**, 73.
- [60] C. Roth, O.V. Moroz, J.P. Turkenburg, E. Blagova, J. Waterman, A. Ariza, L. Ming, S. Tianqi, C. Andersen, G.J. Davies, K.S. Wilson. *Int J Mol Sci.* 2019, **20**, 4902.
- [61] J. Wohlgemuth. *Biochem. Ztschr.* 1908, **ix**, 1.
- [62] R. Elman, N. Ameson, E.A. Graham. *Arch Surg.* 1929, 19, 943.
- [63] M. Somogyi. *J Biol Chem.* 1938, **125**, 399.
- [64] N. McInnes, A. Smith, R. Otto, J. Vandermeij, Z. Punthakee, D. Sherifali, K. Balasubramanian, S. Hall, H.C. Gerstein. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017, **102**, 1596.
- [65] F.A. Cadejian, O.S. Silva. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2016, **9**, 443.
- [66] S.Y. Lim, J.M. Steine, H. Cridge. *Am J Vet Res.* 2022, **83**, ajvr.22.03.0048.
- [67] *Surgery and Physiological Discoveries in Paris.* *Buffalo Med J Mon Rev Med Surg Sci.* 1848, **4**, 176.
- [68] E. Bauer, S. Jakob, R. Mosenthin, R. Asian-australas *J Anim Sci.* 2005, **18**, 282.
- [69] P. Hopson, Y. Smadi, V. Mehta, S. Patel, D. Mehta, K. Horvath. *Front Pediatr.* 2022, **10**, 908542.
- [70] S. Meher, T.S. Mishra, P.K. Sasmal, S. Rath, S., R. Sharma, B. Rout, M.K. Sahu. *J Biomark.* 2015, **2015**, 519534.
- [71] N. Finer, W.P. James, P.G. Kopelman, M.E. Lean, G. Williams. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000, **24**, 306.
- [72] L. Marinaccio, A. Stefanucci, G. Scioli, A. Della Valle, G. Zengin, A. Cichelli, A. Mollica. *Int J Mol Sci.* 2022, **23**, 2924.
- [73] S.J. Pandol. *San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010. Digestive Enzymes.* Dostęp: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54127/>
- [74] J. Balo, I. Banga. *Biochem J.* 1950, **46**, 384.
- [75] C. Löser, A. Möllgaard, U.R. Fölsch *UR. Gut.* 1996, **39**, 580.
- [76] J.U. Hahn, W. Kerner, P. Maisonneuve, A.B. Lowenfels, P.G. Lankisch. *Pancreas.* 2008, **36**, 274.
- [77] S. Beharry, L. Ellis, M. Corey, M. Marcon, P. Durie. *J Pediatr.* 2002, **141**, 84-90.
- [78] C. Löser, A. Möllgaard, U.R. Fölsch. *Gut.* 1996, **39**, 580.
- [79] A. Carroccio, F. Verghi, B. Santini, N. Ansaldo, M. Castro, G. Montalto. *Dig Dis Sci.* 2001, **46**, 1335.
- [80] J. Hedström, A. Korvuo, P. Kenkimäki, S. Tikanoja, R. Haapiainen, E. Kivilaakso, U.H. Stenman. *Lancet.* 1996, **347**, 729.
- [81] Y.T. Chen, C.C. Chen, S.S. Wang, F.Y. Chang, S.D. Lee *SD. Pancreas.* 2005, **30**, 243.
- [82] T. Jin, W. Huang, K. Jiang K, J.J. Xiong, P. Xue, M.A. Javed, X.N. Yang, Q. Xia. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2013, **12**, 355.
- [83] https://clinicaltrials.gov/ct2/history/NCT03098082?V_1=View [dostęp on-line 19.01.2023]
- [84] [Cancer \(who.int\)](#) [dostęp on-line 09.12.2022]
- [85] M. Casás-Selves, J. Degregori. *Evolution (N Y).* 2011, **4**, 624.
- [86] P. Anand, A.B. Kunnumakkar, C. Sundaram, K.B. Harikumar, S.T. Tharakan, O.S. Lai, B. Sung, B. Aggarwal. *Pharm Res.* 2008, **25**, 2097.
- [87] J.M. Mattsson, S. Ravela, C. Hekim C, M. Jonsson, J. Malm, A. Närvänen, U.H. Stenman, H. Koistinen. *PLoS One.* 2014, **9**, e107819.
- [88] H.C. Graves, G.F. Sensabaugh, E.T. Blake. *N Engl J Med.* 1985, **312**, 338.
- [89] A. Atan, Ö. Güzel. *Turk J Urol.* 2013, **39**, 188.
- [90] K.A.O. Tikkinen, P. Dahm, L. Lytvyn, A.F. Heen, R.W.M. Vernooij, R.A.C. Siemieniuk, R. Wheeler, B. Vaughan, A.C. Fobuzi, M.H. Blanker, N. Junod, J. Sommer, J. Stirnemann, M. Yoshimura, R. Auer, H. MacDonald, G. Guyatt, P.O. Vandvik, T. Agoritsas. *BMJ.* 2018, **362**, k3581.
- [91] <https://www.fda.gov/medical-devices/recently-approved-devices/4kscore-test-p190022> [dostęp on-line 19.01.2023]

- [92] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03893929?term=diagnosis&cond=Prostate+Cancer&draw=2&rank=1> [dostęp on-line 19.01.2023]
- [93] H. Kalantari, M. Khodadoostan, M. Yaran, A. Tavakoli. *Adv Biomed Res.* 2020, **9**,76.
- [94] W.J. Israelsen, M.G. Vander Heiden. *Semin Cell Dev Biol.* 2015, **43**, 43.
- [95] P.D. Hardt, S. Mazurek, M. Toepler, P. Schlierbach, R.G. Bretzel, E. Eigenbrodt, H.U. Kloer. *Br J Cancer.* 2004, **91**, 980.
- [96] P.D. Hardt, M. Toepler, B. Ngoumou, J. Rupp, H.U. Kloer. *Anticancer Res.* 2003, **23(2A)**, 851.
- [97] C. Tonus, G. Neupert, M. Sellinger. *World J Gastroenterol.* 2006, **12**, 7007.
- [98] S. Sithambaram, I. Hilmi, K.L. Goh. *PLoS One.* 2015, **10**, e0131616.
- [99] S. Che Alhadi, W.Z. Wan Zain, Z. Zahari Z, M.N. Md Hashim, S.G. Syed Abd Aziz, Z. Zakaria, M.P. Wong, A.D. Zakaria. *Ann Coloproctol.* 2020, **36**, 409.
- [100] G.P. Lidgar, M.J. Domanico, J.J. Bruinsma JJ, J. Light, Z.D. Gagrat, R.L. Oldham-Haltom, K.D. Fourrier, H. Allawi, T.C. Yab, W.R. Taylor, J.A. Simonson, M. Devens, R.I. Heigh, D.A. Ahlquist, B.M. Berger. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013, **11**, 1313.
- [101] N. Gruba, E. Bielecka, M. Wysocka M, A. Wojtysiak, M. Brzezińska-Bodał, K. Sychowska, M. Kalińska, M. Magoch, A. Pęczak, K. Falkowski, M. Wiśniewska, L. Sęsiadek, K. Płaza, E. Kroll, A. Pejkovska, M. Rehders, K. Brix, G. Dubin, T. Kantyka, J. Potempa, A. Lesner. *Int J Mol Sci.* 2019, **20**, 1557.
- [102] T. Tokas T, M. Avgeris, C. Alamanis, A. Scorilas, K.G.Stravodimos, C.A.Constantinides. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2017, **143**, 521.
- [103] N. Gruba, P. Rachubik, A. Piwkowska, A. Lesner. *Biomarkers.* 2021, **26**, 770-779.
- [104] K. Björkman, H. Mustonen, T. Kaprio, C. Haglund, C. Böckelman. *Tumour Biol.* 2019, **41**, 1010428319860728.
- [105] N. Gruba, L. Stachurski, A. Lesner. *Chem Biodivers.* 2021, **18**, e2000981.
- [106] N. Gruba, L. Stachurski, A. Lesner. *Biomarkers.* 2022, **27**, 568.
- [107] N. Gruba, M. Musielak, W. Rejmak, A. Lesner. *Anal Biochem.* 2022, **654**, 114805.
- [108] I. Audzeyenka, P. Rachubik, D. Rogacka, M. Typiak, T. Kulesza, S. Angielski, M. Rychłowski, M. Wysocka, N. Gruba, A. Lesner, M.A. Saleem, A. Piwkowska. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2020, **1867**, 118723.

Praca wpłynęła do Redakcji 12 grudnia 2022 r.