

Uniwersytet w Białymstoku

Wydział Chemii



Mgr Beata Szymańska

***TEST ANALITYCZNY DO OZNACZEŃ WYBRANYCH
BIOMARKERÓW Z WYKORZYSTANIEM BIOSENSORÓW
SPRI.***

ROZPRAWA DOKTORSKA

wykonana w Pracowni Bioanalizy

Katedry Chemii Fizycznej

Wydziału Chemii Uniwersytetu w Białymstoku

Promotor: dr hab. Ewa Gorodkiewicz, prof. uczelni

Białystok, 2021

*Chciałabym serdecznie podziękować mojemu promotorowi **dr hab. Ewie Gorodkiewicz prof. uczelni** za nieocenioną pomoc okazywaną przez cały okres realizacji pracy doktorskiej oraz, za wsparcie wiedzą i doświadczeniem w zakresie badania biosensorów SPRI.*

Dziękuję również mojemu mężowi i rodzinie, za pomoc i cierpliwość – zwłaszcza w końcowym etapie powstawania tej pracy.

Spis treści

I.	<i>Spis stosowanych skrótów w kolejności alfabetycznej</i>	5
II.	<i>Wstęp</i>	7
III.	<i>Przegląd literaturowy</i>	10
1.	Wybrane markery nowotworowe oraz potencjalne markery i ich znaczenie w diagnostyce onkologicznej.	
1.1	CA125 – antygen nowotworowy CA125	11
1.2	HE4- białko epidermalne 4	13
1.3	Test ROMA	14
1.4	CEA - antygen karcinoembrionalny	15
1.5	IL-6 – interleukina 6	16
1.6	Aromataza	17
2.	Przykładowe standardowe metody diagnostyczne wybranych markerów nowotworowych.	
2.1	Testy ELISA	19
2.2	Inne metody immunoenzymatyczne	21
2.2.1	Chemiluminescencyjne	22
2.2.2	Elektrochemiluminestencyjne	23
2.2.3	Metody immunofluorescencyjne	25
3.	Typy biosensorów używane do oznaczeń biomarkerów i ich charakterystyka.	
3.1	Biosensory enzymatyczne	27
3.2	Immunosensory	28
3.3	Biosensory wykorzystujące kwasy nukleinowe	29
3.4	Biosensory translacyjne	30
3.5	Biosensory wykorzystujące wirusy	30
3.6	Nanobiosensory	31
IV.	<i>Badania własne</i>	32
1.	Wstęp	33
2.	Sprzęt i odczynniki	34
2.1	Odczynniki	34
2.2	Sprzęt	36
2.3	Materiał biologiczny	38

3. Technika pomiaru SPRI	39
4. Przygotowanie biosensorów SPRI	40
4.1 Podstawa biosensora.....	40
4.2 Część biologiczna biosensora.....	41
4.2.1. Przeciwciała jako receptory.....	42
4.2.2. Inhibitory jako receptory.....	44
4.2.3. Regeneracja biosensorów.....	45
5. Analityczne opracowanie biosensorów	46
5.1 Dobór optymalnego stężenia receptora.....	46
5.2 Opracowanie krzywej kalibracyjnej.....	48
5.3 Pomiary AFM.....	51
5.4 Określenie precyzji metody.....	52
5.5 Wyznaczenie granicy wykrywalności i oznaczalności.....	53
5.6 Opracowanie selektywności metody.....	55
6. Walidacja metod z użyciem próbek naturalnych	62
6.1 Oznaczanie stężenia markerów CA 125, HE 4, CEA, IL-6 oraz aromatazy w próbkach pacjentów z torbielą endometrialną.....	62
6.2 Oznaczanie stężenia markerów CA 125, HE 4, CEA, IL-6 oraz aromatazy w próbkach pacjentów z rakiem jajnika.	65
6.3 Oznaczanie stężenia markerów CA 125, HE 4, CEA, IL-6 oraz aromatazy w próbkach pacjentów z rakiem jelita grubego.	68
7. Walidacja metod z użyciem diagnostycznych metod standardowych	72
8. Jednoczesne oznaczenia wybranych markerów za pomocą nowo opracowanego testu diagnostycznego	76
V. <i>Dyskusja wyników</i>	86
VI. <i>Wnioski</i>	97
VII. <i>Streszczenie</i>	99
VIII. <i>Literatura</i>	101
IX. <i>Dorobek naukowy</i>	109
X. <i>Wykaz wzorów statystycznych</i>	112

I. Spis stosowanych skrótów w rozprawie doktorskiej.

<i>Skrót</i>	<i>Pełna nazwa</i>
<i>AMPPD</i>	Fosfataza alkaliczna z substratem fosforanu 1, 2-dioksetanu arylu adamantylu
<i>CA 125/MUC 16</i>	Antygen nowotworowy CA 125
<i>CEA</i>	Antygen rakowo-płodowy
<i>CLIA</i>	Chemiluminescencyjny test immunologiczny
<i>CNT</i>	Elektrody na nanorurkach węglowych
<i>CYP19A1</i>	Aromataza
<i>DMSO</i>	Dimetylosulfotlenek
<i>ECLIA</i>	Elektrochemiluminescencja
<i>EDC</i>	Chlorowodorek 1-etylo-3(3-dimetyloaminopropyl)karbodimidu
<i>EIA</i>	Metody immunoenzymatyczne
<i>FIA</i>	Metody immunofluorescencyjne
<i>HE 4</i>	Ludzkie białko z komórek nabłonkowych najądrza 4
<i>IL-6</i>	Interleukina 6
<i>IIFT</i>	Technika immunofluorescencji pośredniej
<i>MMP-2</i>	Metaloproteinaza-2
<i>NHS</i>	1-hydroksy-2,5-pirydynodion
<i>ODM</i>	1-oktadekanotiol
<i>PBS</i>	Buforowana fosforanem sól fizjologiczna o pH=7,4
<i>PI</i>	Wskaźnik predykcyjny
<i>PNA</i>	Kwas peptydonukleinowy
<i>Receptor</i>	Czynnik wychwytyjący analit

<i>RLU</i>	Względne jednostki światła
<i>ROMA</i>	Algorytm ryzyka złośliwości jajników
<i>RT-PCR</i>	Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym
<i>SEA</i>	Moduł białka nasienia jeżowca morskiego enterokinazy i agryny
<i>SPRI</i>	Powierzchniowy Rezonans Plazmonów w wersji obrazowej
<i>Triton X-100</i>	Eter polimeru glikolu polietylowego i p-tert-oktylofenolu
<i>TIMP-1</i>	Inhibitor metalopeptydazy 1

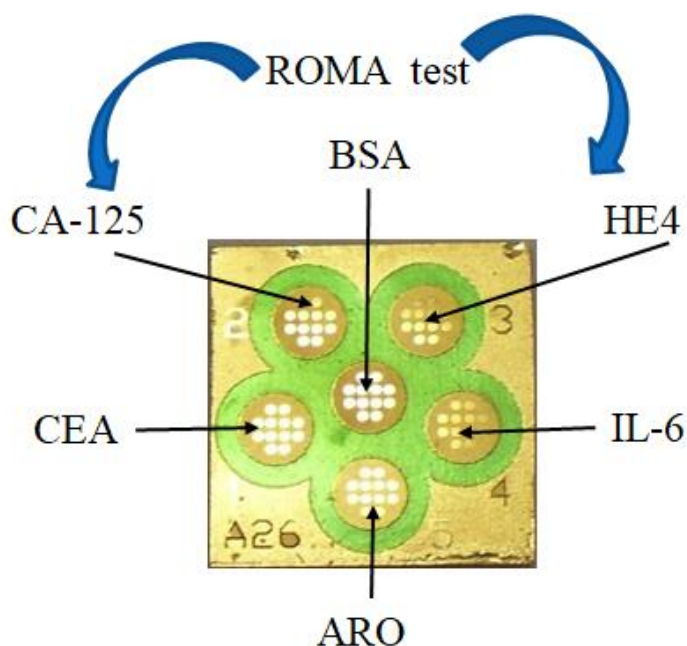
II. Wstęp

Z biegiem lat, mimo rozwoju medycyny, choroby takie jak nowotwory będą nadal stanowiły jedno z największych zagrożeń wiążących się z rozwojem ludzkiej cywilizacji. W XXI w. są one ciągle najrzadziej wyleczalnymi jednostkami chorobowymi co może być związane ze wzrostem liczby czynników kancerogennych. W celu szybszej diagnostyki oraz diagnozowania nowotworu we wczesnym stadium coraz częściej stosowane są markery nowotworowe. Są to substancje wielkocząsteczkowe wytwarzane przez nowotwór lub gospodarza i uwalniane do płynów ustrojowych w odpowiedzi na nowotwór. Markery te są coraz częściej wykorzystywane w tzw. panelach analitycznych (test ROMA) do monitorowania kluczowych parametrów trwającego procesu terapeutycznego (np. chemioterapia, radioterapia).

Na podstawie obecnej wiedzy naukowej można wysnuć wnioski, że wielu naukowców wyraźnie zmierza do opracowywania miniaturowych sensorów, w których warstwa receptorowa składa się z cząstek biologicznych np. kwasów nukleinowych, enzymów, inhibitorów lub przeciwciał, które są specyficzne na dany analit. W świecie nauki urządzenia te, nazywane są biosensorami. Znajdują one zastosowanie w analizie próbek środowiskowych, przemysłowych czy w diagnostyce medycznej. Dzięki nieszablonowym rozwiązaniom konstrukcyjnym bioczujniki charakteryzują się niewielkimi rozmiarami czy znacząco zredukowaną objętością próbki potrzebnej do wykonania analizy w porównaniu do innych metod np. testy ELISA. Z uwagi na niewielkie rozmiary cechuje je także niski koszt produkcji oraz wysoka czułość i selektywność wykorzystywanych receptorów.

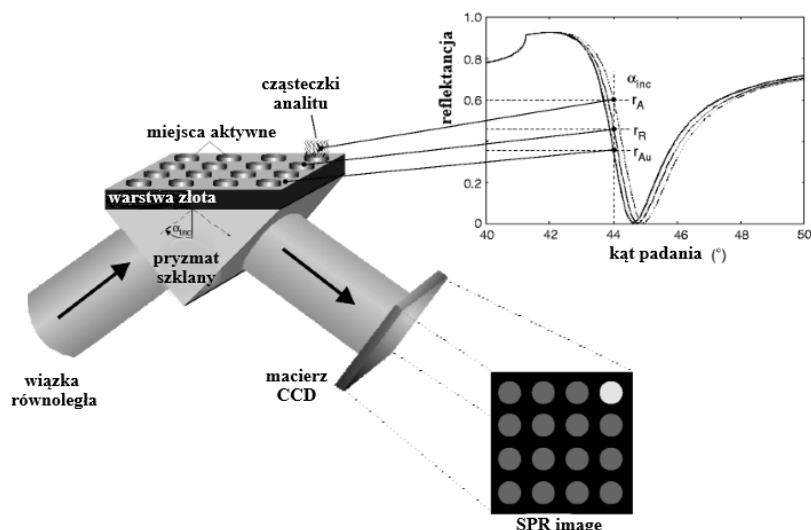
Celem badań przedstawionych w poniższej rozprawie doktorskiej jest stworzenie nowego panelu analitycznego jako instrumentu do oznaczeń wybranych biomarkerów w płynach ustrojowych człowieka, głównie surowicy/osoczu krwi z wykorzystaniem techniki Powierzchniowego Rezonansu Plazmonów w wersji Imaging (SPRI) jako metody detekcji. Konstrukcja i analityczne opracowanie biosensorów do oznaczeń poszczególnych biomarkerów pozwalają na użycie ich w jednym panelu (wraz z kalibracją) do jednoczesnego oznaczania pięciu markerów w próbkach pochodzących od poszczególnych pacjentów – Rys.1. Otrzymane wyniki są wykorzystane do analizy algorytmu ROMA co pozwala na lepszą diagnostykę chorób nowotworowych w różnych stadiach. Umożliwia to

również wprowadzenie nowej metody instrumentalnej (np. SPRI) do zestawu narzędzi do badania markerów raka, które są pionierskimi celami i które mają znaczący wpływ na badania nad nowotworami.



Rysunek 1. Schemat ideowy panelu analitycznego. Opracowanie własne.

Metodą detekcji sygnału analitycznego pochodzącego od konstruowanych biosensorów jaką wykorzystano w badaniach jest Powierzchniowy Rezonans Plazmonów (SPR). Wykorzystuje się tutaj zjawisko fizyczne, które zachodzi w momencie, gdy płasko spolaryzowana fala elektromagnetyczna z zakresu widzialnego lub bliskiego nadfioletu pada na powierzchnię metalu przy spełnionych warunkach całkowitego wewnętrznego odbicia – Rys.2 [1].



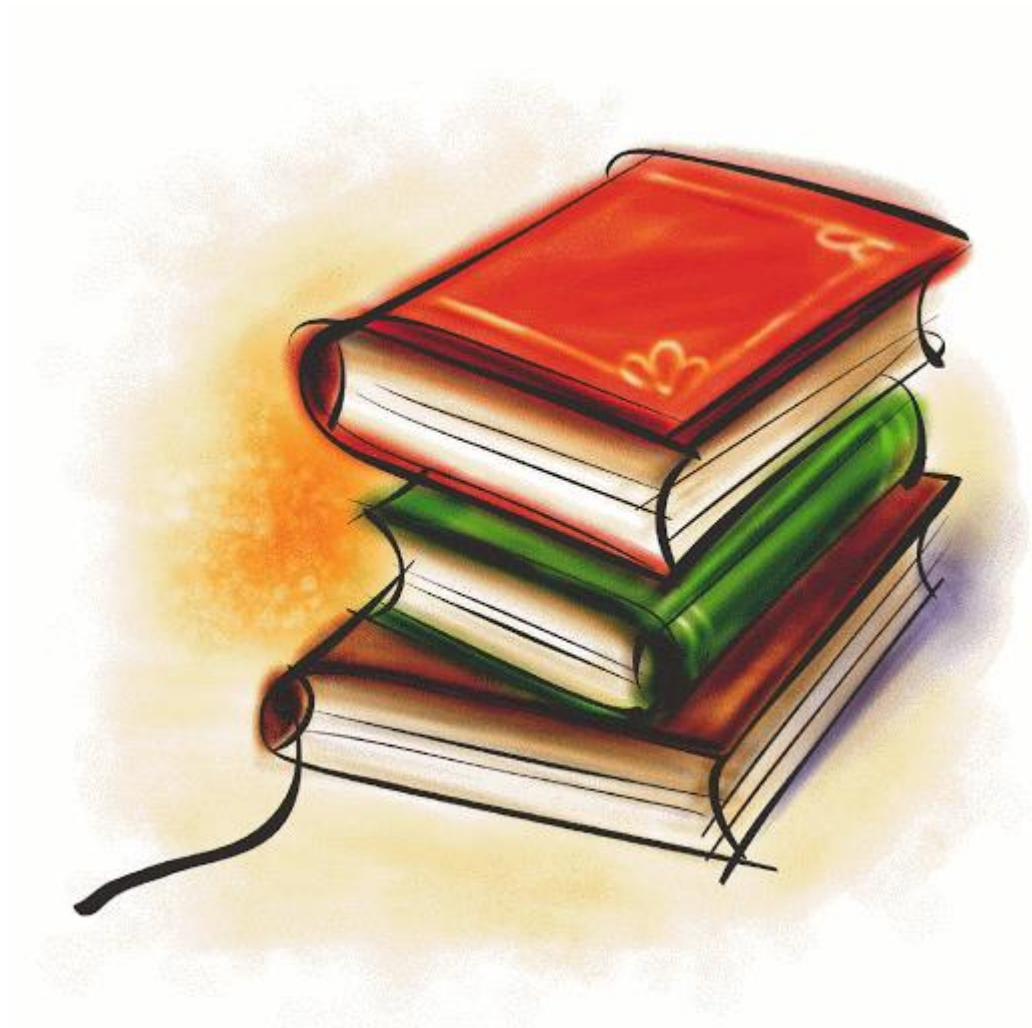
Rysunek 2. Zasada pomiaru techniką SPRI. Opracowanie własne.

Metoda SPR w wersji Imaging, którą wykorzystano w poniższych badaniach eliminuje złożoność skanowania kąta. Pomiarów dokonuje się przy określonym kącie padania i zbiera światło odbite za pomocą kamery CCD, która odczytuje natężenie światła odbitego w postaci obrazu. Kąt, przy którym prowadzi się pomiary, zawiera się w liniowym obszarze spadku reflektancji tak, żeby zmiany natężenia światła były proporcjonalne do zmian współczynnika załamania światła wywołanych związaniem kolejnych biomolekuł na powierzchni bioczuJNIKA [2,3].

CELE I ZAŁOŻENIA PRACY:

1. Konstrukcja i analityczne opracowanie biosensorów SPRI czułych na wybrane substancje aktywne biologicznie tj. CA-125, HE4, IL-6, CEA, które są zawarte w płynach ustrojowych tj. surowicy/osoczu krwi z wykorzystaniem: przeciwciał i inhibitorów jako receptorów w biosensorach; badane płyny ustrojowe pochodziły od pacjentów chorych na raka jajnika, torbiel endometrialną, raka jelita grubego oraz grupy kontrolnej;
2. Wykorzystanie biosensora specyficznego na aromatazę do oznaczania tego białka w próbkach surowicy/osocza pacjentek z rakiem jajnika i torbielą edometrialną.
3. **Utworzenie panelu analitycznego na podstawie nowoskonstruowanych biosensorów do jednoczesnych oznaczeń w próbkach naturalnych.**
4. Wykorzystanie innych metod (np. testy ELISA, metody chemiluminescencyjne, fluorymetryczne itp.) oznaczania stężenia i aktywności biomarkerów w celach porównawczych.

Przegląd literaturowy

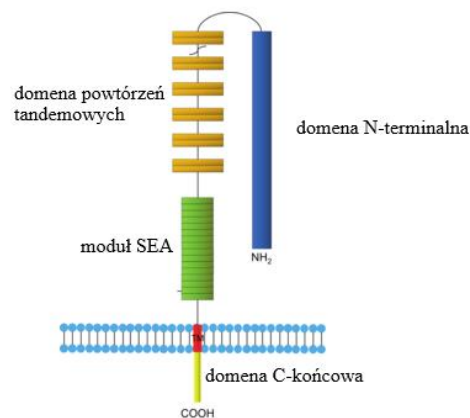


1. Wybrane markery nowotworowe oraz potencjalne markery i ich znaczenie w diagnostyce onkologicznej.

1.1.1 CA-125 – antygen nowotworowy CA-125

Antygen nowotworowy 125 (CA-125), znany również jako mucyna 16 (MUC16), jest markerem charakterystycznym dla komórek nowotworowych jajnika. Obecnie jest szeroko stosowany jako biomarker w nabłonkowym raku jajnika [4]. Po raz pierwszy marker ten został opisany w 1981 roku przez Basta i jego współpracowników. Białko to charakteryzuje się podwyższonym poziomem w surowicy u ponad 80% kobiet ze zdiagnozowanym rakiem jajnika. Pod względem struktury CA-125 zostało sklasyfikowane jako mucyna i jest kodowane przez gen MUC16, który jest umiejscowiony na ramieniu krótkim chromosomu 19 [5]. CA-125 jest silnie O-glikozylowaną glikoproteiną, która nadaje jej właściwości hydrofilowe i smarujące [6,7]. Jest składnikiem nabłonka żeńskiego występującego w układzie rozrodczym, drogach oddechowych i powierzchni oka. W przeciwieństwie do innych markerów stężenie CA-125 jest zwykle wyrażane w jednostkach aktywności (U/ml) [8].

A)



B)



Rysunek. 3. A) Schemat budowy cząsteczki CA-125/MUC16, B) Struktura trzeciorzędowa białka CA-125/MUC16 [9,10]

CA-125/ MUC16 jest mucyną związaną z błoną. Posiada ona charakterystyczną pojedynczą domenę transbłonową. Duży rozmiar MUC16 (powyżej 1000 kDa) jest jego unikalną cechą. Białko to jest ponad dwukrotnie dłuższe niż MUC1 i MUC4, gdyż zawiera ok. 22 000 aminokwasów, dlatego jest ono największą mucyną związaną z błoną. CA125/MUC16 zbudowany jest z trzech różnych domen: domena N-terminalna, domena powtórzeń tandemowych oraz domena C-końcowa. Dwie pierwsze domeny są całkowicie zewnątrzkomórkowe oraz silnie O-glikozylowane [8]. Domena powtórzeń tandemowych charakteryzuje się powtarzającymi się sekwencjami aminokwasów, które są bogate w serynę, treoninę i prolinę. Domena C-końcowa jest obecna w cząsteczkach wszystkich mucyn. Zawiera ona wiele zewnątrzkomórkowych modułów SEA (moduł białka nasienia jeżowca morskiego, enterokinazy i agryny), domenę transbłonową i cytoplazmatyczny ogon. Zewnątrzkomórkowy region MUC16 może zostać uwolniony z powierzchni komórki w wyniku proteolitycznego rozszczepienia. Uważa się, że MUC16 jest rozszczepiany w miejscu gdzie rozmieszczone są moduły SEA [9].

Wartość graniczna aktywności markera CA-125 jest ustalona na poziomie 35 U/ml . Aktywność CA-125 w surowicy krwi lub osoczu pacjentów ze złośliwym guzem jajnika jest średnio kilkakrotnie wyższa niż w próbkach od zdrowych dawców. Udowodniono naukowo, że zmienna specyficzność markera zarówno w stanach fizjologicznych, jak i patologicznych uzależniona jest od typu histopatologicznego zmiany z najwyższymi wartościami dla raka surowiczego, niskozróżnicowanego, endometrioidalnego. Marker CA-125 wraz z białkiem HE 4 [11], jest stosowany do oceny wartości testu ROMA (Risk of Ovarian Malignancy Algorytm), oraz jako biomarker raka endometrium [12].

Komercyjnie do oznaczania markera CA-125 stosuje się trzy metody analityczne: elektrochemiluminescencję (ECLIA) [4,7,13], immunotest chemiluminescencji Abbot Architect (Architect i2000) [13] oraz enzymatyczny test immunosorbcyjny (ELISA) [14]. Wszystkie trzy metody są pośrednie i opierają się na tworzeniu struktur kanapkowych z dwoma przeciwciałami.

1.2 HE 4- białko epidermalne 4

Ostatnie doniesienia literaturowe wskazują, że najlepszym biomarkerem surowiczym oprócz markera CA-125 jest HE 4. Jest to ludzkie białko z komórek nabłonkowych najądrza 4 znane również jako czterosiarczkowe białko domeny rdzeniowej WAP 2 [15]. Białka najądrzy są czynnikami niezbędnymi do dojrzewania plemników. HE 4 jest klasyfikowane jako białko najądrzy, które należy do rodziny czterosiarczkowych rdzeni białek serwatkowych (WFDC). Białko WFDC ma konserwatywną domenę WFDC złożoną z 50 aminokwasów z ośmioma konserwatywnymi resztami cystyny. HE 4 to polipeptyd o długości 124 aminokwasów z dwiema domenami WFDC.

Białko to jest wydzielane w ludzkim płynie nasiennym jako homotrimer z wiązaniami disiarczkowymi i jest inhibitorem proteazy krzyżowej, która hamuje niektóre testowane proteazy serynowe, aspartylowe i cysteinowe przy użyciu hemoglobiny jako substratu. Stosując metodę SPR zaobserwowano, że HE 4 wykazuje znaczące wiązanie ze wszystkimi wymienionymi proteazami. Ponadto marker HE 4 jest N-glikozylowany i bardzo stabilny w szerokim zakresie pH i temperatury [16]. Genem kodującym białko HE 4 jest gen WFDC2. Został on zidentyfikowany w ludzkim najądrzu. Dojrzały HE 4 jest cząsteczką wielkości 25 kDa. Jest wytwarzany nie tylko przez złośliwe, ale także zdrowe tkanki (tchawicę, ślinianki, płuca, tarczycę i prostatę) [17]. Wykazuje ono dużą homologię z innymi inhibitorami proteiny serynowej, takimi jak elafina i wydzielnicze inhibitory proteazy leukocytowej. Badania kliniczne wykazały znaczny wzrost wartości HE 4 u pacjentów z onkologią ginekologiczną [18]. Najwyższe stężenia HE 4 stwierdzono w raku nabłonkowym. Sam HE 4 ma znacznie wyższą czułość w raku jajnika w stadium I niż sam CA-125. W przypadku HE 4 rzadziej obserwujemy nieprawidłowości niż przy CA-125 w łagodnych chorobach jajników. Na podstawie stanu menopauzy czułość HE 4 wynosiła 76% w okresie przedmenopauzalnym i 92% w okresie pomenopauzalnym przy swoistości 75%. HE 4 jest oznaczane za pomocą metody elektrochemicznego testu immunologicznego typu sandwich a także przy użyciu testów elektrochemiluminescencyjnych [19,20,21].

1.3 Test ROMA

Test ROMA (*Risk of Ovarian Malignancy Algorithm*) jest nowoczesnym, niezwykle skutecznym narzędziem diagnostycznym pozwalającym na różnicowanie zmiany wykrytej w jajnikach u kobiet. Test wymaga oznaczenia markera CA-125 oraz markera HE 4, dzięki czemu, na podstawie matematycznych algorytmów, możliwe jest wyliczenie prawdopodobieństwa zezłośliwienia się wykrytej zmiany w przydatkach. Test ROMA klasyfikuje chore do dwóch grup, pierwszej obciążonej dużym lub drugiej obciążonej małym ryzykiem wystąpienia nowotworu nabłonkowego jajnika. Punktacja w skali testu ROMA jest odzwierciedleniem otrzymanego z równań algorytmu matematycznego wskaźnika predykcyjnego. Równania te różnią się między sobą ze względu na stan przed i po menopauzie [4,22,23].

Obliczanie punktacji w skali ROMA:

Kobiety przed menopauzą

$$\text{PI} = -12,0 + 2,38 \times \text{LN}(\text{HE4}) + 0,0626 \times \text{LN}(\text{CA 125})$$

Kobiety po menopauzie

$$\text{PI} = -8,09 + 1,04 \times \text{LN}(\text{HE4}) + 0,732 \times \text{LN}(\text{CA 125})$$

Przewidywane prawdopodobieństwo

$$\frac{\exp(\text{PI})}{1 + \exp(\text{PI})} \times 100$$

exp- funkcja wykładnicza

LN- logarytm naturalny

PI- wskaźnik predykcyjny

Wartość $\geq 12,5\%$ uznawana jest za zwiększone ryzyko u kobiet przed menopauzą.

Wartość $\geq 14,4\%$ uznawana jest za zwiększone ryzyko u kobiet po menopauzą.

1.4 CEA - antygen karcinoembrionalny

Antygen rakowo-łódowy (CEA) jest jednym z najwcześniej opisanych nowotworowych markerów molekularnych. CEA podobnie jak AFP, należy do grupy antygenów rakowo-łódowych, które są wytwarzane w okresie embrionalnym i łódowym. Postuluje się, że CEA odgrywa rolę w wielu procesach biologicznych, w tym w adhezji komórek odporności i apoptozie. Synteza białka CEA jest hamowana po urodzeniu i wykazuje niską ekspresję w normalnych tkankach dorosłych osób zdrowych, dlatego obserwuje się bardzo niskie poziomy CEA w krwi zdrowych osób dorosłych. Wysokie stężenia CEA często stwierdza się w przypadkach gruczolakoraka jelita grubego [25]. W roku 1965 Gold i Freedman jako pierwsi dokonali charakterystyki markera CEA. Udokumentowali obecność tego białka w tkance jelita łódu oraz w gruczolakoraku jelita grubego osoby dorosłej. Jednocześnie wykazali brak występowania tego markera w tkankach zdrowych jelita grubego [24]. Wiele badań wykazało, że CEA jako marker raka można z powodzeniem stosować w diagnozowaniu i ocenie rokowania w raku okrężnicy. CEA jest glikoproteiną o wysokiej masie cząsteczkowej (180-200 kDa). Składa się w 60% z kompozycji złożonej z węglowodanów [24,26]. Jest częścią supergeny immunoglobuliny. Uważa się, że białko CEA jest zaangażowane w mechanizmy rozpoznawania lub adhezji komórek [27]. U zdrowych dawców stężenie biomarkera w surowicy jest niższe niż 5 ng/ml. Stwierdzono natomiast, że poziomy markera CEA mogą być podwyższone u pacjentów z niezłóśliwą chorobą wątroby, gdyż wątroba jest głównym miejscem metabolizmu CEA. Wykazano także, że palenie wpływa na antygen karcinoembrionalny obecny w surowicy [28]. Antygen rakowo-łódowy jest jednym z najczęściej stosowanych biomarkerów do określania aktywności nowotworu.

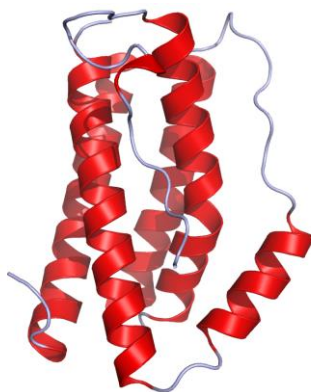


Rysunek 4. Struktura trzeciorzędowa cząsteczki CEA [10].

Antygen rakowo-płodowy jest oznaczany wieloma metodami diagnostycznymi. Podstawowymi technikami wykrywania markera są: kolorymetryczny multipleksowany test immunologiczny [29], ilościowy RT-PCR w czasie rzeczywistym (QRT – PCR) [30], złota elektroda modyfikowana tiomocznikiem [31,32], technika SERS [32,34], test radioimmunologiczny, test immunoenzymatyczny (ELISA), test fluoroimmunologiczny, chemiluminescencyjny test immunologiczny i elektrochemiluminescencyjny test immunologiczny [35,36].

1.5 IL-6 – interleukina 6

Interleukina 6 (IL-6) jest jednym z najważniejszych czynników regulujących mechanizmy obronne organizmu. Zaliczana jest do grupy cytokin plejotropowych. Jest glikoproteiną zbudowaną z 184 aminokwasów (26 kDa) Plejotropowa cytokina IL-6 zaliczana jest do grupy białek z czterema antyrównoległymi alfa-helisami. Gen kodujący białko IL-6 zlokalizowany jest na ramieniu krótkim 7 chromosomu (7p15-p21) [37].



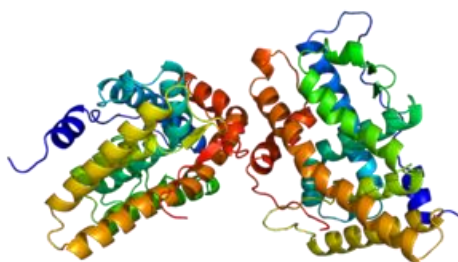
Rysunek 5. Struktura trzeciorzędowa białka IL-6 [10] .

Interleukina 6 produkowana jest przez komórki układu immunologicznego, do którego możemy zaliczyć np. limfocyty typu B i T oraz monocyty, a także przez komórki takie jak fibroblasty, komórki śródbłonna, czy komórki mięśniowe. Wzmoczona synteza IL-6 występuje w trakcie procesu aktywacji wymienionych komórek przez interleukinę 1, interferony (INF), czynniki martwicy guza, lipopolisacharydy oraz wirusy DNA i RNA [38]. Podwyższone stężenie białka interleukiny 6 możemy zaobserwować w wielu jednostkach chorobowych np. w nowotworach sutka, jelita grubego, trzustki, żołądka, ale także w białaczkach, chłoniakach, szpiczaku mnogim, w chorobach zapalnych, chorobie

Castelmana oraz w oparzeniach, zakażeniach bakteryjnych, posocznicy i ostrym zapaleniu trzustki [39]. U zdrowych osób stężenie białka IL-6 waha się na poziomie między 3,13-12,5 pg/ml, natomiast u pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem jajnika na poziomie 2,02-134,25 pg/ml. Podstawowymi metodami oznaczania markera IL-6 jest: analiza spektrometrii mas z elektrorozpylaniem, spektropolarymetria, real-time PCR oraz metodą RFLP (polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych) [38,40].

1.6 Aromataza

Aromataza (znana również jako CYP19A1) jest kluczowym enzymem katalizującym konwersję androgenów w estrogeny [41, 42]. Aromataza jest zlokalizowana w retikulum endoplazmatycznym komórek produkujących estrogen i jest cytochromem P450, który wymaga do katalizy reduktazy NADPH-cytochromu P450 (CPR). Podczas, gdy interakcja między aromatazą i CPR jest niezbędna dla jej aktywności katalitycznej, podstawa strukturalna mechanizmów przenoszenia elektronów między nimi nie jest do końca poznana. U ludzi aromataza ulega ekspresji w wielu komórkach, takich jak komórki ziarniste jajnika, komórki syncytiotrofoblastów łożyskowych, komórki Leydiga, fibroblasty skóry oraz w wielu obszarach mózgu, takich jak podwzgórze, hipokamp czy ciało migdałowate. Zwiększona ekspresja aromatazy ma kluczowe znaczenie w patologii, takich chorób jak rak piersi, endometrioza lub hipogonadyzm [43]. Brak lub zmniejszona aktywność aromatazy jest zazwyczaj przyczyną zaburzeń w funkcjonowaniu neuronów mózgowych najczęściej sprzyjających rozwojowi takich schorzeń, jak choroba Alzheimera lub choroba Parkinsona. Udowodniono naukowo, że inhibitory aromatazy (anastrozol, letrozol lub eksemestan) można stosować jako leki na raka piersi z receptorem hormonalnym. Dowiedziono, że dla wielu pacjentek jest to jedna z kluczowych metod leczenia raka piersi [44]. Inhibitory aromatazy wykorzystywane są w leczeniu kobiet po menopauzie (niektóre kobiety przed menopauzą również otrzymują supresję jajników). W porównaniu z zastosowaniem chemioterapii inhibitory aromatazy mają mniej skutków ubocznych, np. nie powodują nudności [45].



Rysunek 6. Struktura trzeciorzędowa białka aromatazy [10].

Aktywność aromatazy mierzona jest kilkoma metodami. Najczęściej stosowany jest „test wody trytowej” [46]. Test immunoenzymatyczny (ELISA) [47] zastosowano tylko do testowania potencjalnych inhibitorów aromatazy. Warto również wspomnieć o innych metodach np. teście biologicznym na komórkach ssaków [48] czy teście substratu fluorescencji [49]. Często stosuje się także ilościową analizę immunohistochemiczną [50], która pozwala na lokalizację aromatazy w badanej tkance.

2 Przykładowe standardowe metody diagnostyczne wybranych markerów nowotworowych.

2.1 Testy ELISA

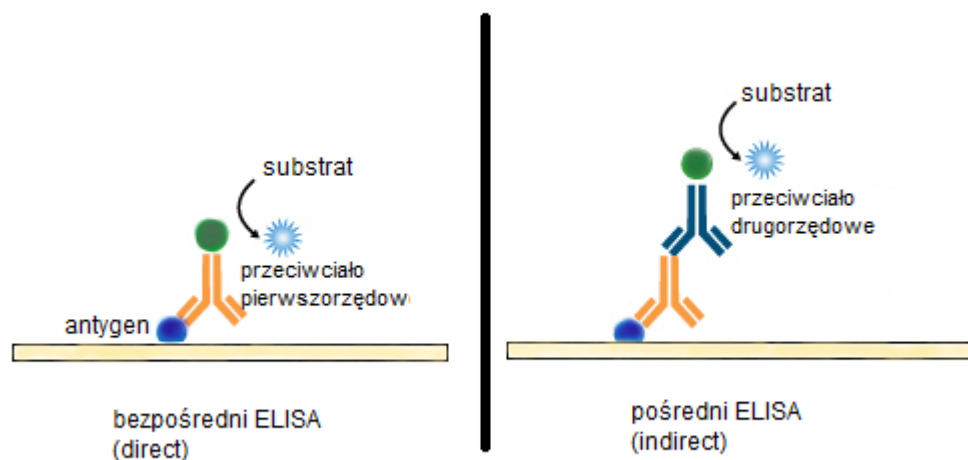
Test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) jest to jeden z najszerzej wykorzystywanych testów diagnostycznych. Stosowany jest on w celu wyznaczenia stężenia danego antygeny w badanej próbce. Test ten charakteryzuje się wysoką czułością, relatywną prostotą oraz możliwością jednoczesnej analizy bardzo dużej liczby próbek. Jest to metoda bardzo łatwa do zautomatyzowania. Możemy wyróżnić kilkadziesiąt odmian testu ELISA. Wszystkie opierają się jednak na dość podobnych zasadach. Do najważniejszych odmian testu ELISA zaliczamy testy bezpośrednie i pośrednie [51].

Reakcja bezpośrednia i pośrednia

Bezpośredni test ELISA jest najczęściej stosowany do wykrycia przeciwciał obecnych w surowicy przeciw określonym antygenom drobnoustroju. Studzienki płytki 96-studzienkowej pokrywa się drobnoustrojami, lizatami lub antygenami. Następnie dodawana jest do studzienek rozcieńczona surowica chorego. Obecne w surowicy przeciwciała przyczepiają się stabilnie do odpowiednich antygenów i trwale opłaszczają studzienkę. Niezwiązane przeciwciała surowicy odpłukiwane są odpowiednimi buforami. W kolejnym etapie do studzienek dodaje się roztwór przeciwciał drugorzędowych. Charakteryzują się one tym, że rozpoznają fragmenty Fc przeciwciał danej klasy. Przeciwciała drugorzędowe są skoniugowane z odpowiednim enzymem. Następnie dodaje się konkretny substrat enzymu, który następnie zostaje przekształcony w barwną postać. Za pomocą spektrofotometru odczytuje się absorbancję światła o danej długości fali w poszczególnych badanych studzienkach. Intensywność otrzymanej doświadczalnie reakcji barwnej jest proporcjonalna do stężenia przeciwciał związanych do antygenów w badanych próbkach [51].

Pośredni test ELISA to metoda służąca do wykrywania obecności antygenów, znajdujących w badanym materiale. Bazując na tym teście dno studzienek opłaszczane jest konkretnymi przeciwciałami monoklonalnymi. Następnie do studzienek dodawana jest surowica. Po etapie opłukania do studzienki dodawane są określone przeciwciała drugorzędowe. Rozpoznają one inny epitop w zakresie tego samego antygeny.

Przeciwciała drugorzędowe mogą być skoniugowane z określonym enzymem lub z danym radioizotopem [52].



Rysunek 7. Schemat reakcji immunoenzymatycznej: a) bezpośrednia, b) pośrednia.
Opracowanie własne.

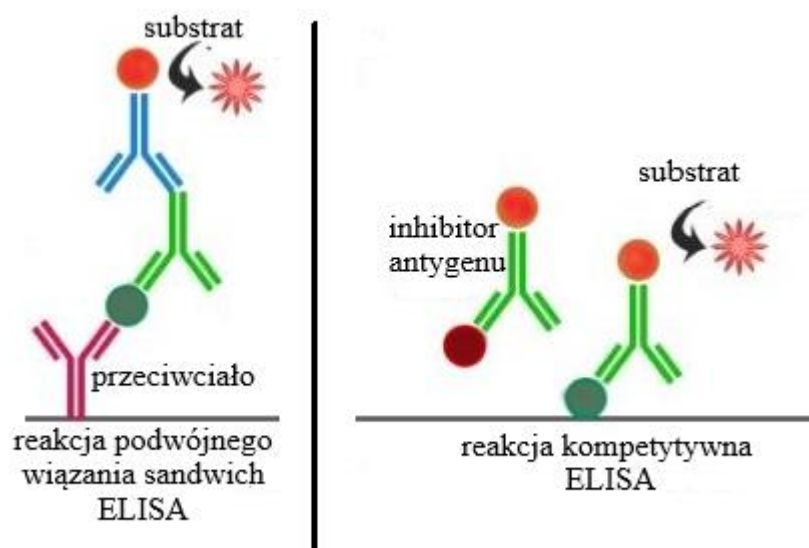
Test podwójnego wiązania – kanapkowy „Sandwich”

Jest to trzeci rodzaj testu ELISA. Schemat pomiaru jest następujący. Do płytki opłaszczonej przeciwciałem na fazie stałej dodaje się antygen, który jest „wyłapywany” przez związany na powierzchni płytki receptor (przeciwciało). Następnie dodawane są przeciwciała pierwszorzędowe. Łączą się one z antygenem. W kolejnym etapie wypłukiwany jest nadmiar antygeny oraz dodawane są przeciwciała drugorzędowe. Przeciwciała drugorzędowe znakowane są odpowiednim enzymem. Roztwór substrat/chromofor dodawany jest na płytkę, natomiast enzym katalizuje reakcję. W efekcie obserwujemy barwny produkt reakcji, który odczytujemy spektrofotometrycznie [52].

Reakcja kompetytywna

Kolejną odmianą testu jest tak zwany kompetytywny test ELISA. Ten rodzaj testu umożliwia wykluczenie jednego z etapów pracy w teście bezpośrednim, czyli płukania. Test kompetytywny polega na jednoczesnym dodawaniu do studzienki surowicy gotowych, skoniugowanych z enzymem przeciwciał monoklonalnych. Rozpoznają one konkretny antygen znajdujący się na dnie studzienki. O miejsce wiązania muszą

rywalizować ze sobą przeciwciała monoklonalne oraz te znajdujące się w badanej surowicy. Niezwiązane przeciwciała są wypłukiwane. Ostatnim etapem analizy jest wywołanie reakcji barwnej. Jeśli w surowicy nie znajdowały się przeciwciała rozpoznające antygen, który jest umieszczony na dnie studzienki, wówczas dochodzi do rozwinięcia się reakcji barwnej. Im większe jest stężenie przeciwciała w surowicy, tym obserwowana reakcja barwna będzie słabiej rozwinięta [51,52].



Rysunek 8. Schemat reakcji immunoenzymatycznej metodą a) podwójnego wiązania (Sandwich ELISA) b) kompetytywną. Opracowanie własne.

Testy ELISA są wykorzystywane do oznaczania markerów nowotworowych m.in. CA-125, HE 4, CEA, IL-6, CA 72-4, AFP, PSA.

2.2 Inne metody immunoenzymatyczne

Metody immunoenzymatyczne (EIA), bazują na zastosowaniu antygeny lub przeciwciała, które sprzęga się z enzymem, którego pomiar produktu otrzymanego w reakcji enzymatycznej rozkładającej określony substrat jest miernikiem ilościowym. Wytworzony produkt reakcji jest barwny, a natężenie barwy zależy pośrednio od zawartości oznaczanego antygeny czy przeciwciała i jest mierzone z użyciem metod spektrofotometrycznych[53].

Najczęściej stosowanymi enzymami są:

- Fosfataza alkaliczna AP (substrat p-nirofenylofosforan [p-NPP])

- Peroksydaza chrzanowa HRP (substrat o-fenylendiamina [OPD])

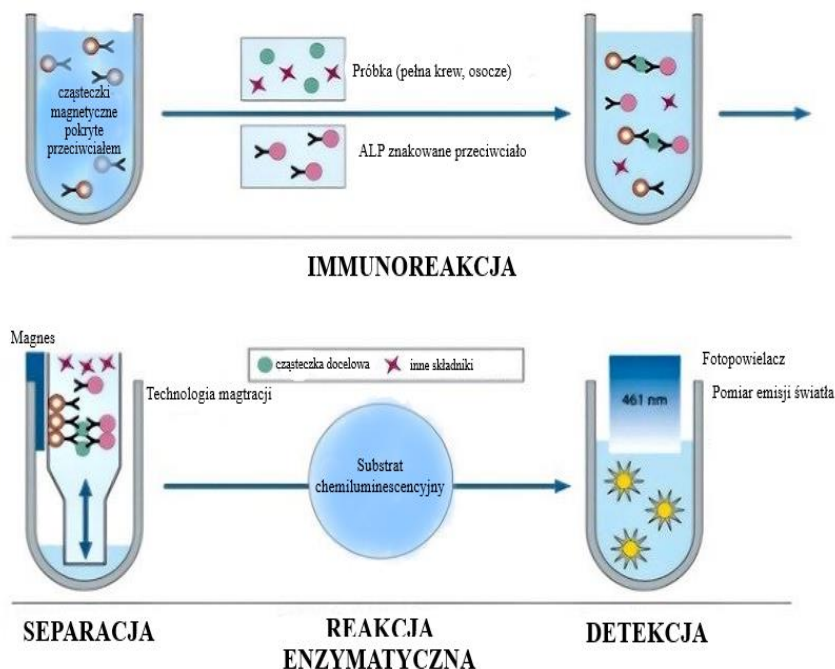
Rozwój tych metod doprowadził do ich udoskonalenia i rozbudowania. M.in. zastosowano drugie przeciwciało przeciw temu pierwszemu, które było znakowane odpowiednim enzymem. Zaobserwowano, że wykorzystanie układów biotyna-awidyna lub biotyna-streptawidyna do tej metody znacznie zwiększa czułość detekcji. Awidyna charakteryzuje się tym, że może być kowalencyjnie znakowana np.: enzymami. Streptawidyna natomiast w swojej budowie nie posiada reszt cukrowych przez co zwiększa się specyficzność metody.

2.2.1 Chemiluminescencyjne (CLIA)

Chemiluminescencyjny test immunologiczny (CLIA) – Rys.9 to technika immunologiczna, w której znacznikiem jest cząsteczka luminescencyjna. Luminescencją nazywamy emisję promieniowania widzialnego lub prawie widzialnego ($\lambda = 300\text{--}800\text{ nm}$). Jest ono generowane, gdy elektron przechodzi ze stanu wzbudzonego do stanu podstawowego. Energia potencjalna w atomie jest uwolniona w postaci światła. W spektrofotometrii luminescencja ma przewagę nad absorbancją, ponieważ pierwsza jest miarą bezwzględną, podczas gdy druga jest względna. Metody chemiluminescencyjne możemy podzielić na te bezpośrednie z użyciem markerów luminoforowych lub pośrednie z użyciem markerów enzymatycznych.

W bezpośrednich metodach chemiluminescencyjnych jako markery luminoforowe stosuje się estry akrydyny i rutenu. W metodach pośrednich markery enzymatyczne to fosfataza alkaliczna z substratem fosforanu 1, 2-dioksetanu aryłu adamantylu (AMPPD) oraz peroksydaza chrzanowa z luminolem lub jego pochodnymi jako substratem. Cząsteczki, takie jak AMPPD i pochodne cząsteczek zasad izoluminolu, są bardziej stabilne w porównaniu z innymi markerami luminescencyjnymi. Powodują one emisję światła z charakterystycznie podwyższoną wydajnością kwantową. Aktywacja tych substratów wymaga reakcji chemicznych lub enzymatycznych związanych z reakcją immunologiczną. W celu ulepszenia i podwyższenia czułości metody stosuje się dodatek wzmacniacza (np. żelazocyjanek, jony metali), który wzmacnia aktywację elektronową, prowadząc do wyjątkowo podwyższonej czułości analitycznej ($\text{mol}^{-16}/\text{l}$).

Technikę chemiluminescencyjną wykorzystuje się do pomiaru stężeń hormonów, leków, witamin, markerów nowotworowych w surowicy, markerów chorób zakaźnych, markerów uszkodzenia mięśnia sercowego i wreszcie autoprzeciwciał [54,55].



Rysunek 9. Schemat reakcji chemiluminescencyjnego testu immunologicznego (CLIA) [54].

Metodą tą oznaczane są takie markery nowotworowe jak: CEA, cytokeratyna 19, SCC [55]

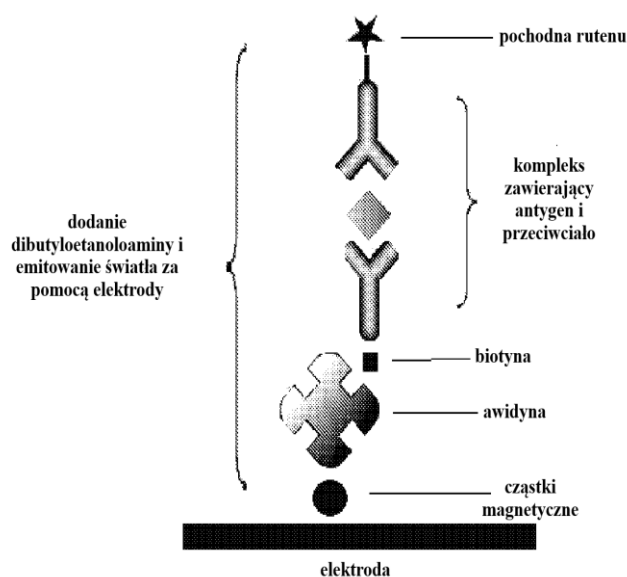
2.2.2 Elektrochemiluminescencyjne (ECLIA)

W metodzie elektrochemiluminescencyjnej (ECLIA) sygnałem analitycznym jest impuls światła wyzwalany przez impuls elektryczny. Impuls światła powstaje w wyniku mechanizmu chemiluminescencyjnego. Do oznaczania biomarkerów jest najczęściej stosowany układ pary red-oks: tripropyloamina – kompleks rutenu(II) z trzema ligandami bipyridyłu [56,57]. Przykładowy schemat stosowany w ECLIA jest pokazany na Rys.10. Wzbudzona impulsem elektrycznym tripropyloamina redukuje jon rutenu (III) skompleksowany z pirydylem do wzbudzonego rutenu(II) nadal skompleksowanego z bipyridylem. Ten wzbudzony ruten(II) emituje impuls świetlny. Kompleks po wyemitowaniu światła jest utleniany na elektrodzie do kompleksu rutenu (III) i jest gotowy do następnego cyklu. Ten układ jest stosowany jako znacznik w metodzie ECLIA stosowanej do oznaczania biomarkerów. W tym celu kompleks jest sprzężony wiązaniem kowalencyjnym z przeciwciałem aktywnym względem oznaczanego biomarkera

(przeciwciało 2). Jednak opisany wyżej układ służy tylko jako znacznik a oznaczany biomarker jest wychwytywany z roztworu przez inne przeciwciało (przeciwciało 1) aktywne względem oznaczanego biomarkera. Tworzy się agregat typu sandwich, który tworzy impuls świetlny wyzwolony przez impuls elektryczny [58].

W najczęściej stosowanym rozwiązaniu biomarker jest wstępnie zatężony za pomocą koralików magnetycznych. Koraliki są pokryte zimmobilizowaną streptawidyną a przeciwciało 1 jest sprzężone z biotyną. Takie koraliki wychwytyują biomarker z mieszanego roztworu. Magnes umieszczony pod elektrodą platynową ściąga koraliki powodując ich zagęszczenie. Teraz następuje oddziaływanie zimmobilizowanego biomarkera ze znacznikiem opisany wyżej za pośrednictwem przeciwciała 2. Po przyłożeniu napięcia zostaje wyzwolony impuls światła, proporcjonalny do ilości zatężonego biomarkera [59].

Opisana metoda jest znacznikowa, pośrednia i wymaga wstępnego zatężania.



Rysunek 10. Schemat ideowy reakcji elektrochemiluminescencyjnej (ECLIA) [58].

Za pomocą tego testu w standardowych laboratoriach diagnostycznych oznaczany jest m.in. marker CA-125, CEA, IL-6.

2.2.3 Metody immunofluorescencyjne

Metody immunofluorescencyjne (FIA) są technikami nieizotopowymi. Stosuje się w nich substancje zwane fluoroforami np.: fluoresceina lub rodamina. W przypadku tych metod stosuje się dwa rodzaje znaczników: fluorofory, które są bezpośrednio przyłączone do antygeny i enzymy, których aktywność oznacza się za pomocą produktu końcowego reakcji powodującego fluorescencję [60,61]. Możemy wyróżnić dwie odmiany testu immunofluorescencyjnego pośrednią i bezpośrednią.

Immunofluorescencja pośrednia (indirect immunofluorescence technique-IIFT) jest najszerszej stosowaną metodą przesiewową pozwalającą na diagnozowanie chorób autoimmunologicznych. Analiza materiału biologicznego przy wykorzystaniu tej techniki polega na umieszczeniu substratu (antygeny) na szkiełku mikroskopowym, które służy do wykrywania swoistych przeciwciał krążących w surowicy pacjenta.

Najczęściej wykorzystywanymi substratami do analizy IIFT mogą być: rozmazy komórkowe, skrawki tkanek lub wysoko oczyszczone antygeny monospecyficzne. Wyżej opisana metoda analityczna charakteryzuje się bardzo wysoką czułością. W diagnostyce klinicznej jest bardzo często metodą pierwszego wyboru.

Zasada działania testu

Pomiar przy użyciu immunofluorescencji pośredniej bazuje na kilku kluczowych etapach.

W pierwszym etapie diagnosta nanosi na substrat odpowiednio rozcieńczoną surowicę pacjenta. Jeżeli w analizowanej próbce znajdują się specyficzne przeciwciała, dochodzi do reakcji przeciwciało-antygen. W następnym etapie dodawany jest roztwór przeciwciał antyludzkich, które znakowane są barwnikiem fluorescencyjnym (izotiocyjanianem fluoresceiny – FITC), zwanym powszechnie koniugatem. Ostatecznie pod mikroskopem fluorescencyjnym możemy obserwować charakterystyczne wzory fluorescencji. Wybór typu świecenia zależy od morfologicznej lokalizacji docelowego antygeny.



Rysunek 11. Schemat ideowy działania testu z wykorzystaniem immunofluorescencji pośredniej, FITC– izotiocyanian fluoresceiny [61].

Reakcja bezpośrednia jest dużo rzadziej wykorzystywana w diagnostyce klinicznej. Zasada działania testu opiera się na reakcji antygenu ze znakowanym przeciwciałem dając znakowany kompleks antygen-przeciwciało [60,61].

Techniką tą możemy oznaczyć takie markery nowotworowe jak CD20 [62] oraz HER2 [63].

3 Typy biosensorów używane do oznaczeń biomarkerów i ich charakterystyka.

Biosensor to urządzenie wykorzystujące specyficzne reakcje biochemiczne do oznaczania określonych związków chemicznych, za pomocą sygnałów optycznych, elektrycznych lub termicznych [64,65]. Działanie biosensora opiera się na specyficznym rozpoznawaniu badanego analitu będącego w styczności z sensorem fizycznym lub chemicznym. Rolą czujnika jest selektywna reakcja z badaną substancją, dając za pomocą transduktora sygnał mierzalny w czasie rzeczywistym [66,67]. Ze względu na bardzo różnorodne zastosowanie biosensorów, ich budowa oraz zasady działania są bardzo różne.

Dobór części czulej bioreceptora warunkowany jest rodzajem identyfikowanego analitu. Ze względu na typ użytego materiału biologicznego wyróżnia się np.:

- biosensory enzymatyczne;
- immunosensory;
- biosensory wykorzystujące kwasy nukleinowe;
- translacyjne biosensory;
- biosensory wykorzystujące wirusy;
- nanobiosensory

3.1 Biosensory enzymatyczne

Biosensory enzymatyczne bazują na wykorzystaniu jednego lub kilku różnych rodzajów enzymów. Są one używane jako makrocząsteczkowe czynniki wiążące i wykorzystujące kształt wybranego enzymu i badanego analitu. Enzymy są białkami. Ich rolą jest katalizowanie wielu reakcji zachodzących w układach biologicznych. Charakteryzują się wysoką selektywnością [68]. Zasada działania biosensorów enzymatycznych opiera się na rejestrowaniu zmian chemicznych związanych z interakcją analitu oraz enzymu znajdującego się na warstwie receptorowej biosensora. Produktami takich reakcji enzymatycznych z analitem mogą być elektrony, barwne chromofory lub może dochodzić do zmiany pH roztworu (przez uwalnianie protonów). Możemy również zaobserwować proces fluorescencji lub może powstawać sygnał chemiluminescencyjny [69]. Każdy z tych produktów jest następnie rejestrowany przez przetwornik sygnału. Biosensor służący do oznaczania glukozy jest najbardziej rozpowszechnionym i najlepiej skomercjalizowanym urządzeniem wśród tego rodzaju biosensorów. Bazując na danych

literaturowych za pierwszy biosensor enzymatyczny służący do oznaczania glukozy uznaje się bioczuJNIK zWIĄZANY z elektrodą Clarka [68]. Biosensory glukozy pracują w oparciu o reakcję utleniania glukozy do kwasu glukonowego. Reakcja ta katalizowana jest przez enzym – oksydazę glukozową. Innym przykładem tego typu bioczuJNIKÓW sĄ biosensory zaprojektowane do detekcji ciał ketonowych, mocznika czy kreatyniny [70,71,72].

Pierwszy amperometryczny czuJNIK do wykrywania markerów nowotworowych opisano w 1979 r. Był on używany do oznaczania hCG w oparciu o kompetycyjny test immunologiczny. Monoklonalne anty-hCG unieruchomiono na amperometrycznej elektrodzie tlenowej. hCG znakowane było enzymem katalazą [73].

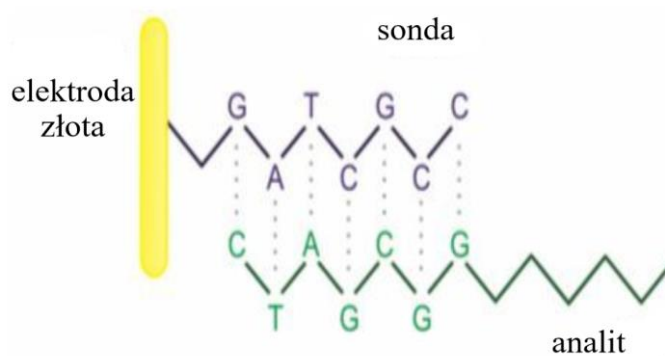
Innym przykładem może być biosensor wykrywający poziom markera AFP oznaczonego metodą amperometryczną przy użyciu przeciwciała znakowanego peroksydazą chrzanową lub dehydrogenazą glukozową, która została użyta jako enzym znakujący do monitorowania trombiny przy użyciu aptameru antytrombiny, gdzie drugi aptamer jest unieruchomiony na powierzchni elektrody [74].

3.2 *Immunosensory*

Immunosensory to urządzenia analityczne opierające się na reakcji immunochemicznej składającej się z antygenu lub przeciwciała jako elementu bioczuJNIKA, który jest unieruchomiony na powierzchni przetwornika. ImmunoczuJNIKI mogą odgrywać ważną rolę w wykrywaniu cząsteczek nowotworowych, białek, patogenów żywności, bakterii i wirusów. Immunosensory charakteryzują się wysoką specyficznością [75]. SĄ one bardzo czułe i mogą wykrywać biomolekuły na poziomie stężenia nmoli a nawet pmoli. Urządzenia oparte na immunoczuJNIKACH mogą wykrywać zmiany w oporności, prądu czy pojemności. SĄ także szeroko wykorzystywane przy oznaczeniach biomarkerów w diagnostyce klinicznej [80]. Konwencjonalny test immunologiczny wykorzystuje przeciwciało składające się ze struktury w kształcie litery "Y", posiadające dwa miejsca wiązania antygenów. Cząsteczka antygenu może wiązać się z przeciwciałem poprzez specyficzną interakcję, czyniąc je wysoce powtarzalnymi i specyficznymi [75,76]. W literaturze jednym z najszerszej rozpowszechnionych immunosensorów jest sensor czuły na antygen specyficzny dla nowotworu prostaty (PSA) [77].

3.3 Biosensory wykorzystujące kwasy nukleinowe

Biosensory wykorzystujące kwasy nukleinowe jest to stosunkowo nowa grupa, która znalazła zastosowanie do wykrywania mutacji w sekwencjach genetycznych, zanieczyszczeń w przemyśle farmaceutycznym oraz w badaniach nad uwolnieniem genetycznie zmodyfikowanych mikroorganizmów do środowiska. Ten typ biosensorów może zawierać pojedyncze lub dwuniciowe łańcuchy DNA lub RNA. Hybrydują one ze specyficznymi dla danego łańcucha sekwencjami komplementarnymi, niskocząsteczkowymi związkami chemicznymi (toksyny, leki) oraz białkami wykazującymi powinowactwo do kwasów nukleinowych [78].



Rysunek 12. Hybrydyzacja cząsteczki analitu z komplementarną sondą biosensora [79].

Do wyżej wymienionej grupy biosensorów możemy zaliczyć także te, w których elementem czułym jest **kwasy peptydonukleinowy** (PNA). Jest on unieruchamiany na nośniku za pomocą wiązań peptydowych lub cząsteczek łącznikowych. PNA nie zawiera pentoz ani grup fosforanowych. Jest jednak w stanie naśladować DNA i łączyć się z komplementarnymi sekwencjami. Może się on również łączyć z odpowiednimi cząsteczkami RNA [79].

W badaniach diagnostycznych najczęściej wykorzystywane są kilkunastonukleotydowe sekwencje DNA i RNA. Charakteryzują się one wysoką specyficznością i powinowactwem względem badanego analitu. Wyżej wymienione sekwencje nazywamy **aptamerami**. Aptamery nie wymagają stosowania kultur

komórkowych i organizmów zwierzęcych i dlatego można je syntezować w dużych ilościach oraz stosunkowo małym kosztem.

Biorąc pod uwagę niewielkie rozmiary aptamery mogą być gęsto upakowane na powierzchni biosensora. Cechują się dużą stabilnością. Można dodatkowo zwiększyć stabilność aptamerów stosując chemicznie modyfikowane nukleotydy. Dzięki temu, przez wiele cykli, łańcuchy nie tracą swoich właściwości [80].

Biosensory DNA wykorzystuje się do analizy genów, szybkiego wykrywania biologicznych środków bojowych, specyficznego wykrywania patogennych bakterii oraz w badaniach kryminalistycznych [78,79]. Obecnie biosensory RNA wykorzystywane są m.in. do oznaczeń wirusa opryszczki HPV [79].

3.4 *Biosensory translacyjne*

Biosensory translacyjne powstają z połączenia aptameru RNA z domeną regulacyjną RNA poprzez wykorzystanie odpowiedniego ligandu. Takie połączenie wywołują zmiany konformacyjne czujnika RNA dzięki czemu możemy regulować ekspresję danego genu. W efekcie dochodzi do uwolnienia domeny antysensowej (uaktywnienie sekwencji). Do produkcji tego typu sensorów stosuje się aptamery specyficzne dla różnego typu ligandów oraz sekwencje antysensowne dla różnych genów [81].

3.5 *Biosensory wykorzystujące wirusy*

Do konstruowania biosensorów bakteriofagowych najczęściej stosuje się wirusy infekujące bakterie czyli **bakteriofagi**. Charakteryzują się one wysoką selektywnością i czułością, oraz posiadają zadowalającą chemiczną i termiczną stabilność. Biosensory wykorzystujące wirusy mogą być łączone z innymi biomolekułami i nanomateriałami a także immobilizowane na powierzchni przetwornika urządzenia analitycznego [82].

Wirusy, które charakteryzują się powinowactwem do konkretnego rodzaju ligandu odnajduje się dzięki tzw. fagowej ekspresji peptydów (ang. *phage display*). Dzięki odpowiednim modyfikacjom można również uzyskać specyficzność względem badanego analitu. Do produkcji biosensorów wykorzystuje się fagi nielityczne, stosowane jako substytuty przeciwciał, ale również fagi lityczne. Ich zastosowanie umożliwia wykrywanie specyficznych szczepów bakterii np. E. Coli, Salmonelli [83].

3.6 *Nanobiosensory*

W ostatnich latach zaobserwowano nowatorski rozwój nanotechnologii. Na podstawie obecnej wiedzy naukowej można zauważyć coraz szersze zastosowanie biosensorów w skali nano. Biosensory takie cechuje wyjątkowa wszechstronność, gdyż można je łączyć z wieloma rodzajami detekcji oraz oznaczać nimi szeroką grupę analitów. Zadaniem nanobiosensorów jest wykrywanie biochemicznych oraz biofizycznych sygnałów pochodzących od określonych jednostek chorobowych już na poziomie pojedynczej komórki czy cząsteczki [84]. Nanobiosensory cechują także zmniejszone rozmiary urządzenia idealnie nadające się do czujników przenośnych oraz wszczepialnych. W przyszłości umożliwią wczesną diagnostykę chorób wyniszczających ale także szybkie wykrywanie patogenów. Mogą zostać również użyte do długoterminowego monitorowania pacjentów po leczeniu chemio- lub radio- terapią. Obecnie największą uwagę naukowców przykuły nanorurki dzięki swoim specyficznym właściwościom oraz dużym potencjale do stosowania w najmniejszych przyrządach. Nanobiosensory na bazie kompozytu elektrody na nanorurkach węglowych (CNT) i nafionie wykorzystano m.in. selektywnego i szybkiego oznaczania glukozy. Grupa naukowców w 2001 roku przedstawiła biosensor do monitorowania pH. Jego odpowiednio zmodyfikowana powierzchnia pozwoliła na stworzenie „receptorów wodoru”, które ulegały reakcjom protonowania lub deprotonowania, zmieniając przy tym ładunek powierzchniowy nanowarstwy. Nanobiosensory wykorzystano także do analizy białek [85].

Badania własne



1. Wstęp

Przedmiotem badań przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej było stworzenie nowego testu analitycznego jako instrumentu do oznaczeń wybranych biomarkerów w płynach ustrojowych człowieka, głównie osocza i surowicy krwi z wykorzystaniem techniki Powierzchniowego Rezonansu Plazmonów w wersji Imaging (SPRI) jako metody detekcji.

Skonstruowano i analitycznie opracowano 4 biosensory w oparciu o interakcje określonych białek (CA-125, HE4, IL-6 i CEA) z odpowiednimi przeciwciałami jako receptorami. Dla interleukiny 6 opracowano także biosensor wykorzystując interakcje inhibitora z badanym białkiem. W celu szerszej diagnostyki badanych próbek w składzie testu analitycznego uwzględniono również aromatazę, której biosensor został już wcześniej skonstruowany. Dla markera CA-125 wykonano równoległe konstrukcję i analityczne opracowanie biosensora na aparacie SPRI i jego nowym prototypie. Oznaczono także badany analit w próbkach biologicznych (rak jajnika, torbiel endometrialna) z wykorzystaniem nowego prototypu aparatu SPRI.

Biosensory zostały wykorzystane do przeprowadzenia analiz ilościowych badanych białek w próbkach biologicznych. Ostatecznym rezultatem badań było użycie wyżej wymienionych biomarkerów w jednym panelu (wraz z kalibracją) do jednoczesnego oznaczania pięciu markerów w próbkach pochodzących od poszczególnych pacjentów. Ze względu na znaczącą rolę opisywanych markerów nowotworowych w diagnostyce klinicznej oraz ocenie rokowania po zabiegu lub leczeniu farmakologicznym pacjentów podjęto próbę opracowania testu analitycznego pozwalającego na szybszą diagnostykę oraz będącego skuteczną realną metodą porównawczą dla szeregu metod standardowych używanych w laboratoriach komercyjnie. Zawartości określanych białek zostały oznaczone w różnych jednostkach chorobowych takich jak: rak jajnika i torbiel endometrialna oraz rak jelita grubego.

2. Sprzęt i odczynniki

2.1 Odczynniki

W trakcie trwania badań opisywanych w rozprawie doktorskiej zostały wykorzystane odczynniki, które zebrano w Tabeli 1:

Tabela 1. Odczynniki wykorzystywane przy konstrukcji i opracowywaniu biosensorów SPRI.

Nazwa odczynnika	Producent
<i>Antygen karcinoembrionalny (CEA)</i>	Abcam plc, Cambridge, USA
<i>Białko aromataza</i>	Lucerna-Chem AG
<i>Białko interleukina 6 (IL-6)</i>	Abcam plc, Cambridge, USA
<i>Ludzkie białko epidermalne 4 (HE 4)</i>	Abcam plc, Cambridge, USA
<i>Glikoproteina antygenowa, marker (CA 125/MUC 16)</i>	SIGMA, Steinheim, Niemcy
<i>Albumina ludzka (z osocza)</i>	Calbiochem
<i>Białko leptyna</i>	Abcam plc, Cambridge, USA
<i>Timp-1</i> <i>Inhibitor metalopeptydazy 1</i>	Abcam plc, Cambridge, USA
<i>MMP-2</i> <i>Metaloproteinaza-2</i>	SIGMA, Steinheim, Niemcy
<i>Mysie monoklonalne przeciwciało</i> <i>specyficzne na marker CEA</i>	Abcam plc, Cambridge, USA
<i>Królicze poliklonalne przeciwciało na</i> <i>aromatazę</i>	Lucerna-Chem AG
<i>Mysie monoklonalne przeciwciało</i> <i>specyficzne na marker IL-6</i>	Abcam plc, Cambridge, USA
<i>Królicze poliklonalne przeciwciało</i> <i>specyficzne na marker HE 4</i>	Abcam plc, Cambridge, USA
<i>Królicze poliklonalne przeciwciało</i> <i>specyficzne na marker CA 125</i>	SIGMA, Steinheim, Niemcy

<i>Inhibitor galiellalaktonu</i>	Santa Cruz Biotechnology
<i>1-hydroksy-2,5-pirydynodion (NHS)</i>	ALDRICH, Munich, Niemcy
<i>1-oktadekanotiol (ODM)</i>	ALDRICH, Munich, Niemcy
<i>2-aminoetanotiol (cysteamina)</i>	SIGMA, Steinheim, Niemcy
<i>Chlorowodorek 1-etylo-3(3- dimetyloaminopropylo)karbodimid (EDC)</i>	SIGMA, Steinheim, Niemcy
<i>Dimetylosulfotlenek (DMSO)</i>	SIGMA, Steinheim, Niemcy
<i>Etanol bezwodny</i>	POCh Gliwice
<i>Eter polimeru glikolu polietylowego i p- toktylofenolu (Triton X-100)</i>	SIGMA, Steinheim, Niemcy
<i>Buforowana fosforanem sól fizjologiczna (PBS)</i>	POCh Gliwice
<i>Wodorotlenek sodu (NaOH)</i>	POCh Gliwice

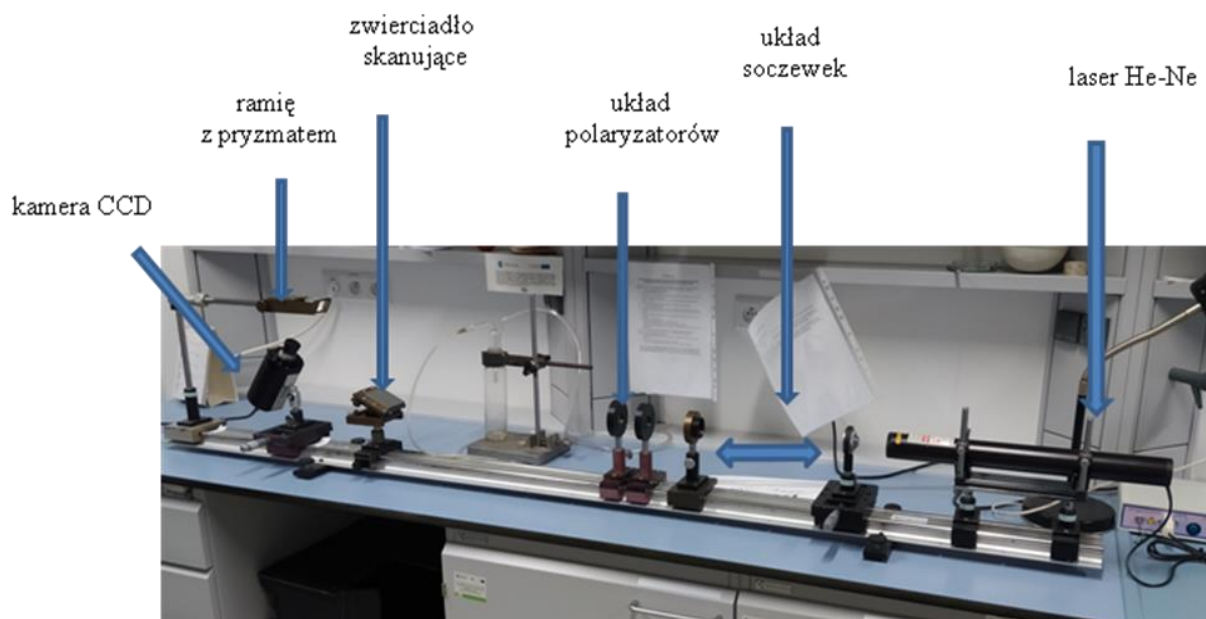
2.2 Sprzęt

W czasie prowadzenia pomiarów korzystano z następującej aparatury pomiarowej:

- Zestaw aparatury SPR Imaging, (Pracownia Bioanalizy, Wydziału Chemii Uniwersytetu w Białymstoku) widoczny na *Rysunku 13-standardowy aparat SPRI*.

W jego skład wchodzi:

- * laser helowo-neonowy $\lambda = 632,5 \text{ nm}$;
- * układ dwóch soczewek o ogniskowej odpowiednio: 3 i 300 mm;
- * dwa polaryzatory;
- * regulowane zwierciadło skanujące;
- * ramię z pryzmatem;
- * kamera CCD;
- * rejestrator.

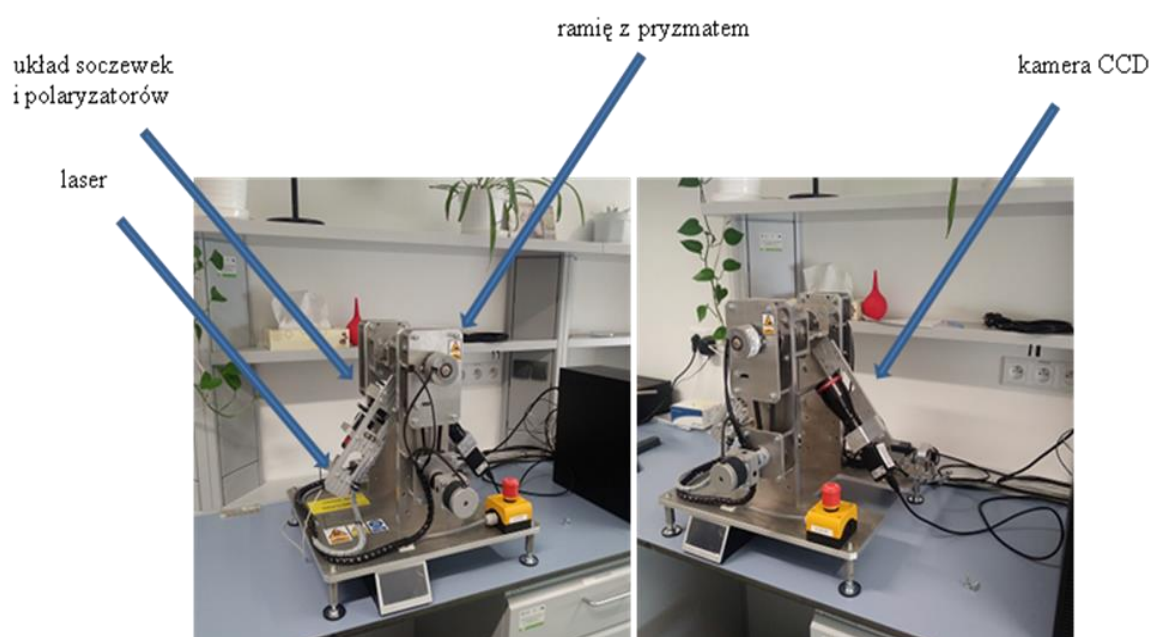


Rysunek 13. Zestaw aparatury SPR Imaging – standardowy aparat SPRI .

- Prototyp aparatu SPR Imaging (Pracownia Bioanalizy, Wydziału Chemii Uniwersytetu w Białymstoku) widoczny na *Rysunku 14*:

W jego skład wchodzi:

- * laser
- * układ soczewek i polaryzatorów;
- * ramię z pryzmatem;
- * kamera CCD;
- * rejestrator.



Rysunek 14. Prototyp aparatu SPR Imaging skonstruowany w Pracowni Bioanalizy UwB.

2.3 *Materiał biologiczny*

Pomiarów stężenia markerów CA 125, HE 4, CEA, IL-6 i aromatazy dokonano w następujących próbkach biologicznych:

- osocze zdrowych dawców-kobiety (***Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Białymstoku***)

Ok. 2 ml krwi wirowano przez 15 min w wirówce z prędkością 2500 obrotów/min. Trzykrotnie sączono przez sączek bibułowy o średniej gęstości. Rozcieńczono 2-krotnie wodą redestylowaną i poddano pomiarom.

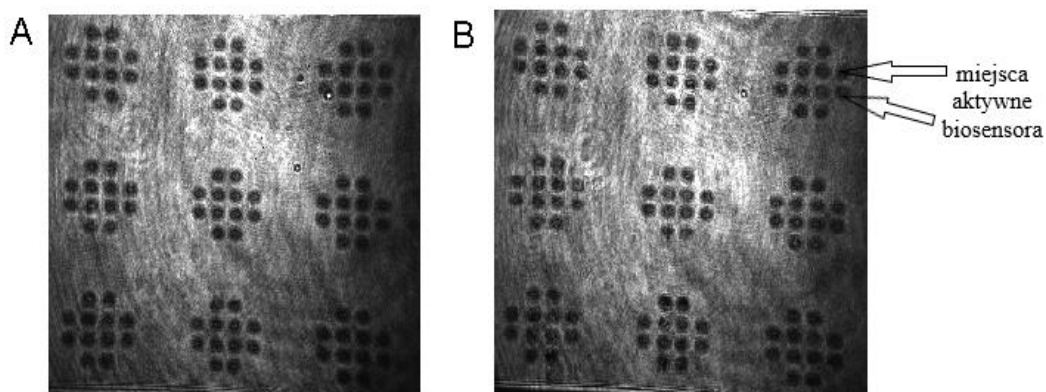
- surowica pacjentek z rakiem jajnika i torbielą endometrialną (***Białostockie Centrum Onkologii***),

- osocze pacjentów z rakiem jelita grubego (***Białostockie Centrum Onkologii***),

Osocze i surowica pochodząca od pacjentów z rakiem jajnika, torbielą endometrialną i nowotworem jelita grubego były odpowiednio rozcieńczone 2, 5 lub 10-krotnie roztworem PBS utrzymując pH=7,4 w zależności od rodzaju oznaczanego markera nowotworowego.

3. Technika pomiaru SPRI

Pomiar z detekcją SPRI składa się z kilku kroków. Na pryzmacie umieszcza się czip z monowarstwą receptora (przeciwciała, inhibitora) oraz ustawia odpowiedni kąt przy którym następuje efekt SPR. Za pomocą kamery CCD wykonywane jest zdjęcie tak przygotowanego czipa. Następnie na miejsca aktywne biosensora nanoszone są analizowane próbki np. pochodzące od pacjentów z różnymi jednostkami chorobowymi lub roztwory standardowe analitu i pozostawia się je na powierzchni biosensora na ok. 10 min. Po interakcji receptora z badanym analitem (białkiem) nadmiar roztworu usuwa się z czipa oraz przepłukuje się go wodą 5-6 razy. W ostatnim etapie pomiaru jest wykonywane zdjęcie po interakcji nie zmieniając kąta padania światła. (Rysunek 15). Analityczny sygnał SPRI obliczono z różnicy sygnałów dla każdego miejsca aktywnego przed i po interakcji.



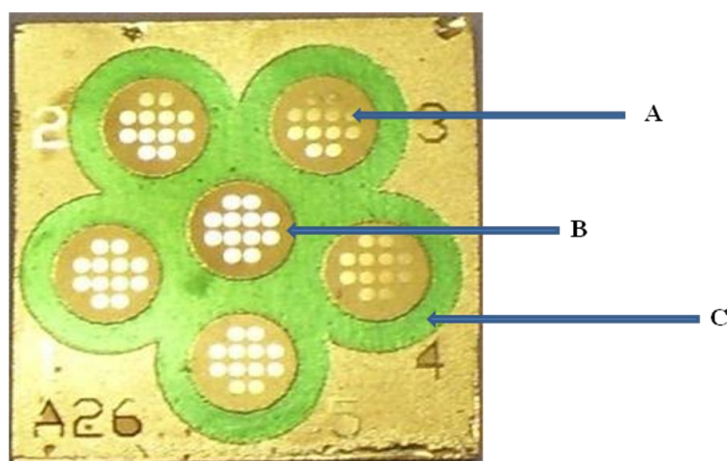
Rysunek 15. Zdjęcia czipa wykonane kamerą CCD a) zdjęcie przed interakcją z badanym analitem, b) zdjęcie po interakcji z badanym analitem. Opracowanie własne.

4. Przygotowanie biosensorów SPRI.

4.1 Podstawa biosensora

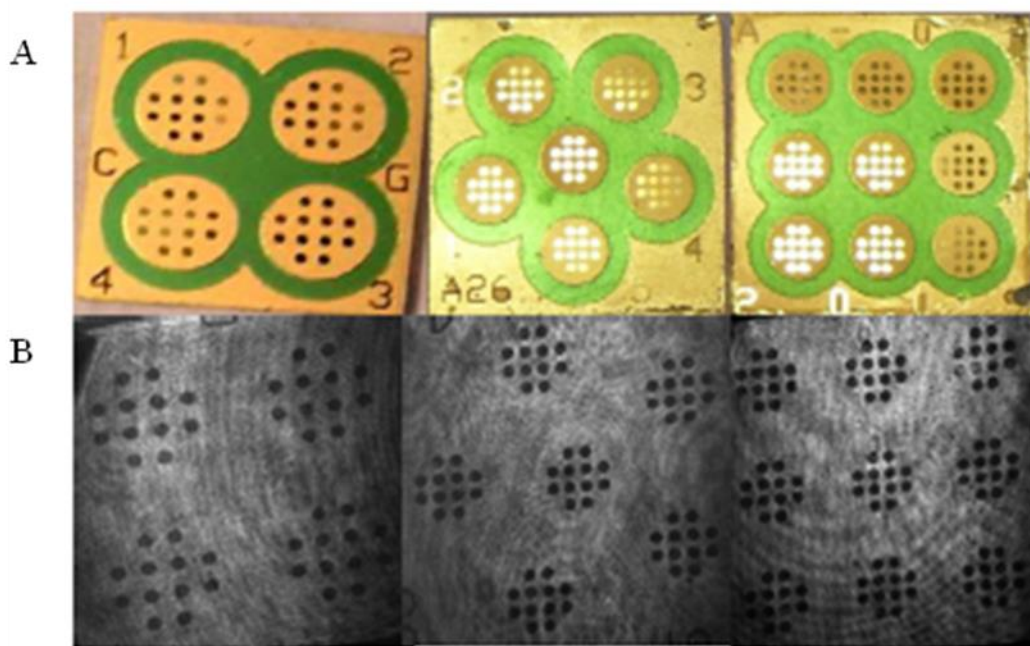
Konstrukcja biosensorów SPRI opiera się na odpowiednim przygotowaniu podstawy chipa. Podstawę stanowi płytka ze szkła BK7 o wymiarach 16x16x1 mm pokryta warstwą 1 nm tytanu oraz 50 nm złota. Użycie warstewki tytanu zwiększa adhezję złota do szkła. Wykorzystywane do pomiarów płytki produkowane są przez firmę Seens (Niderlandy).

Aby efektywniej wyizolować miejsca aktywne na powierzchni biosensora nanosi się na płytkę techniką sitodruku warstwę fotopolimeru ELPEMER SD 2054 o grubości 15 μm . Następnie suszy się czip przez ok. 30 minut w temperaturze 70°C oraz naświetla przez dwie minuty promieniowaniem UV o mocy 800W. Końcowym etapem jest wywołanie fotopolimeru poprzez umieszczenie płytki szklanej w 1%-owym roztworze węgla sodu. W miejscach, w których fotopolimer był zamaskowany po opłukaniu odsłania się czyste złoto, które później wykorzystywane jest jako miejsce aktywne biosensora. Następnie nanoszony jest nadruk rozdzielający, który po naświetleniu promieniowaniem UV o mocy 800W staje się twardy, odporny chemicznie i hydrofobowy. Każdy czip jest odpowiednio znakowany. Nałożenie fotopolimeru na chipy wykonywane jest w Pracowni Bioanalizy.



Rysunek 16. Zdjęcie podstawy biosensora. A-złoto, B-bezbarwny fotopolimer, C-barwna maska hydrofobowa (nadruk rozdzielający). Opracowanie własne.

Podczas wykonywanych pomiarów do pracy wykorzystano chipy o konstrukcji umożliwiającej jednoczesne oznaczanie 4, 6 lub 9 próbek z 12 miejscami aktywnymi dla każdej próbki. Na Rysunku 17 przedstawiono zdjęcia czipów wykonane aparatem cyfrowym oraz te uzyskane z kamery CCD.



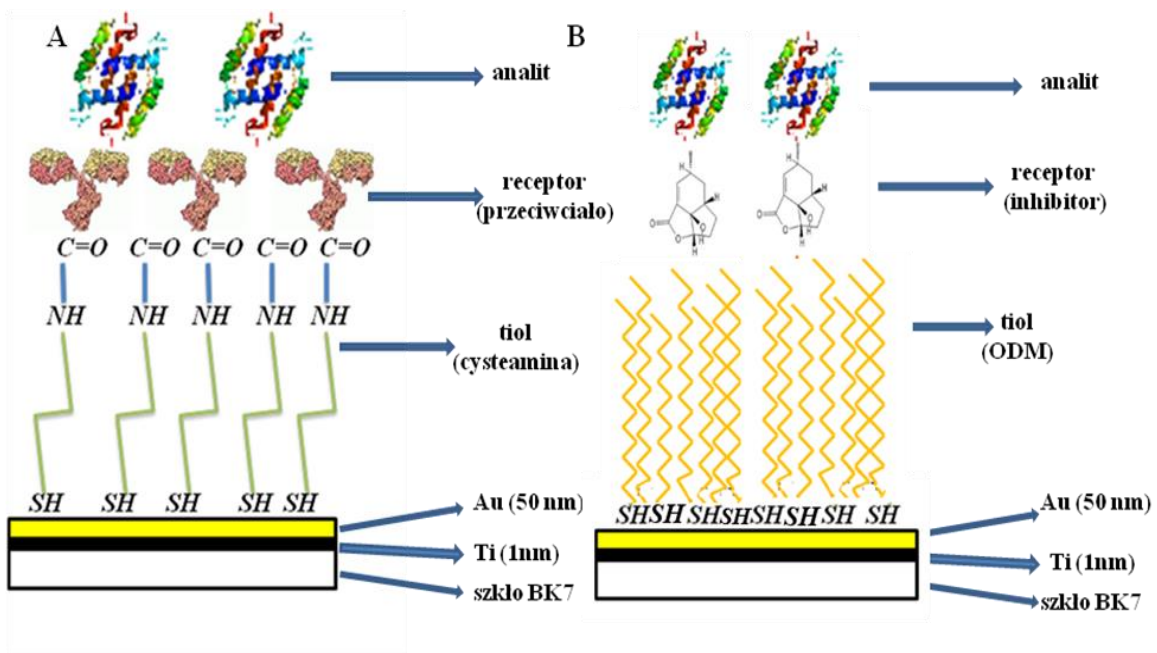
Rysunek 17. Zdjęcia biosensorów wykonane aparatem cyfrowym (A), obraz pochodzący z kamery CCD (B) pozwalających na jednoczesne badanie 4, 6, 9 różnych roztworów lub próbek. Opracowanie własne.

4.2 Część biologiczna biosensora

Immobilizacja to proces unieruchomienia odpowiedniego czynnika wychwytyjącego analit (receptora biologicznego) na powierzchni tiolu. Obecnie stosuje się wiele rodzajów tego typu związków takich jak: przeciwciała, inhibitory czy aptamery. W poniższej rozprawie doktorskiej wykorzystano dwa rodzaje specyficznych receptorów przeciwciała i inhibitor.

W zależności od budowy biosensora wykorzystano dwa różne typy tiolu cysteaminę lub ODM, które ulegają procesowi dwóch różnych immobilizacji:

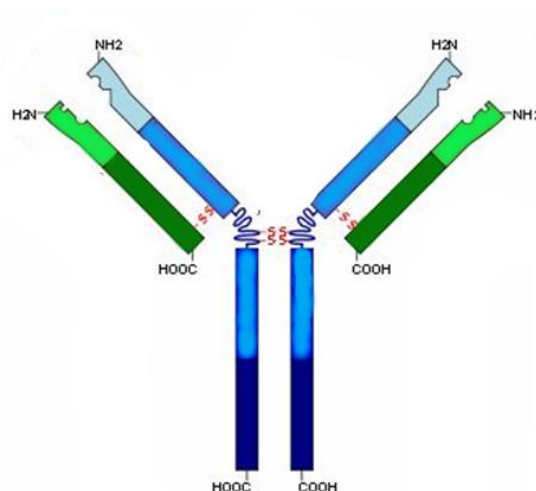
- a) immobilizacja kowalencyjna, która polega na utworzeniu wiązań amidowych (kowalencyjnych) pomiędzy grupą aminową cysteaminy a karboksylową przeciwciała.
- b) immobilizacja hydrofobowa, która bazuje na oddziaływaniach hydrofobowych pomiędzy łańcuchami 1-oktadekanotiolu (ODM) a inhibitorem.



Rysunek 18. Schemat biologicznej części biosensora: A) dla przeciwciała jako receptora, B) dla inhibitora jako receptora. Opracowanie własne.

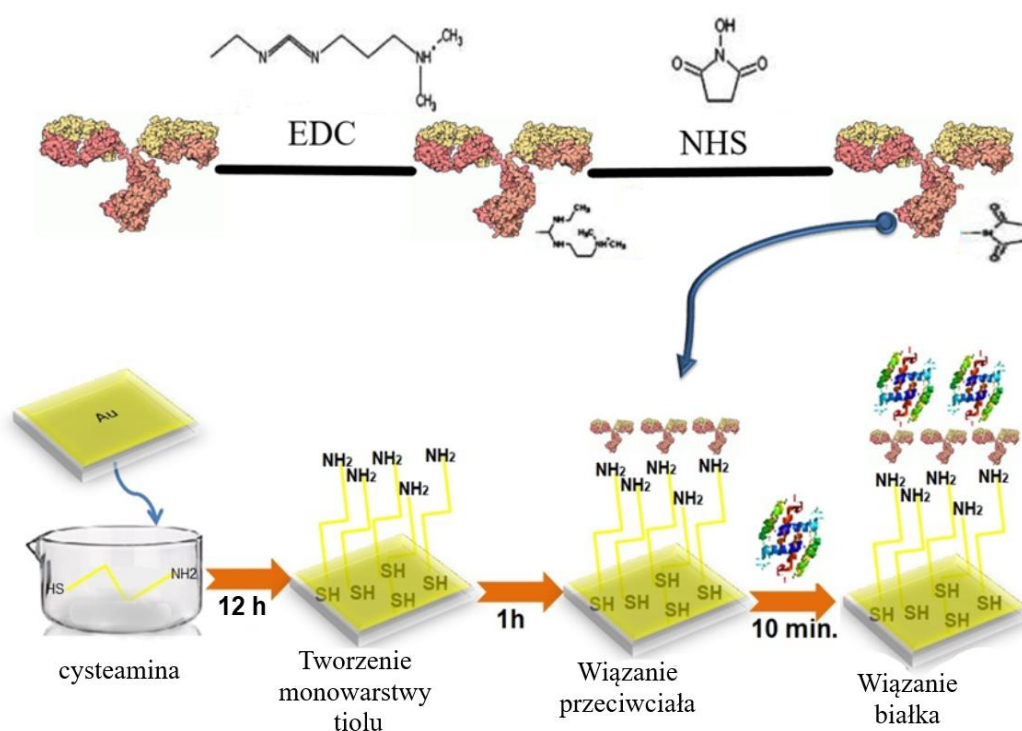
4.2.1. Przeciwciało jako receptor

Przeciwciała to rodzaj białek wydzielanych przez komórki plazmatyczne w przebiegu odpowiedzi odpornościowej typu humoralnego. Charakteryzują się one zdolnością do swoistego rozpoznawania antygenów. Budowa przeciwciał (Rys.19) pozwala na wykorzystanie jako linkera do warstwy złota tiosirolu-cysteaminy z końcowymi grupami NH_2 .



Rysunek 19. Schemat budowy przeciwciała z zaznaczonymi grupami funkcyjnymi na ramionach i na końcach. Opracowanie własne.

Schemat immobilizacji kowalencyjnej przedstawia Rys.20. Aby połączenie grupy karboksylowej z przeciwciała i grupy aminowej z tiolu było efektywne, należy uprzednio aktywować grupę karboksylową w przeciwciele. Zastosowanie EDC pozwala na przekształcenie grupy karboksylowej w grupę estrową. Następnie użycie NHS, modyfikuje powstały ester w aktywny, krótkożyjący tzw. NHS-ester. W reakcji NHS-estru z grupami aminowymi tiolu tworzy się kowalencyjne wiązanie amidowe. Podczas tego procesu stosuje się bufor węglanowy, o pH=8.5, zapewniający odpowiednie środowisko tej reakcji.

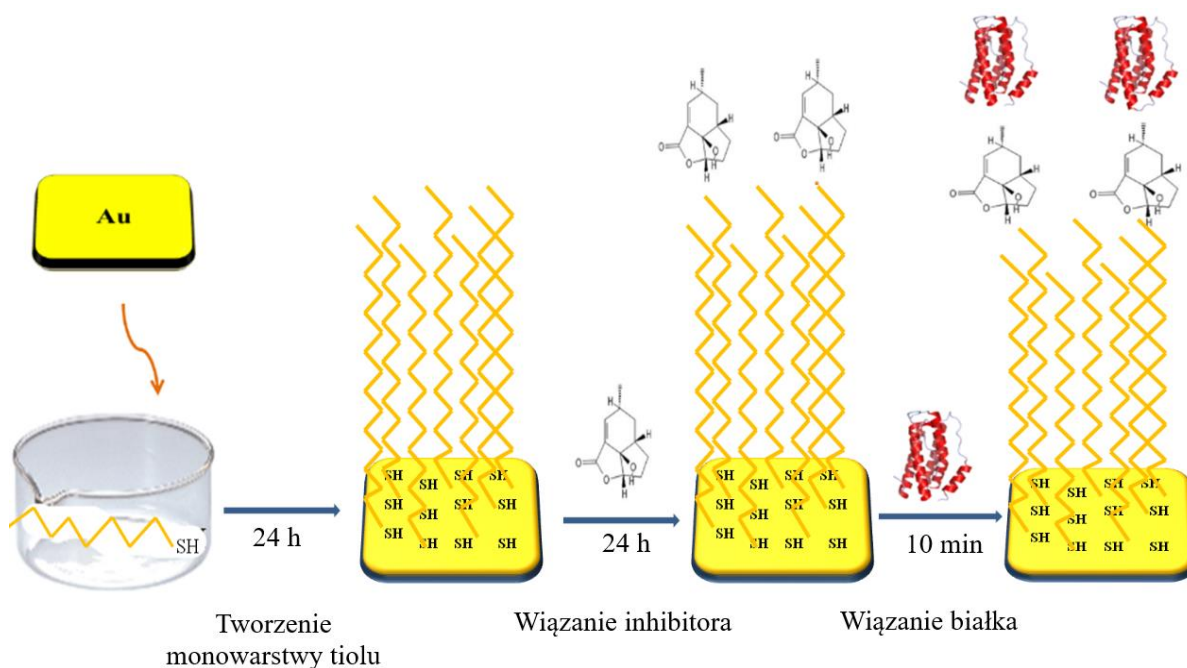


Rysunek 20. Immobilizacja przeciwciała na monowarstwie cysteaminy z wykorzystaniem wiązania kowalencyjnego. Opracowanie własne.

4.2.2. Inhibitory jako receptory

Inhibitory to związki chemiczne, które powodują zmniejszenie szybkości reakcji chemicznej. Inhibitorem można nazwać zarówno substancję powodującą spowolnienie jak i związek powodujący zatrzymanie reakcji niekatalizowanej, lub obniżającej aktywność katalizatora w reakcji katalizowanej. W powyższej rozprawie doktorskiej wykorzystano inhibitor specyficzny na białko interleukinę 6.

Procedura przygotowania powierzchni biologicznej z użyciem inhibitora (Rys.21) polega na zanurzeniu płytki złotej w etanolewym roztworze ODM (20 nM) na 24 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie takie chipy wielokrotnie płucze się w etanolu i wodzie oraz suszy w strumieniu argonu. Tak przygotowany czip może być przechowywany i wykorzystywany do kolejnych pomiarów. Inhibitor specyficzny na IL-6 nałożono na miejsca aktywne bioczuownika i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. W tym czasie następuje proces unieruchomienia inhibitora i utworzenie monowarstwy z udziałem oddziaływań hydrofobowych.



Rysunek 21. Immobilizacja inhibitora na monowarstwie 1-oktadekanotolu (ODM) z wykorzystaniem oddziaływań hydrofobowych. Opracowanie własne.

4.2.3. Regeneracja biosensorów

W celu obniżenia kosztów generowanych podczas pomiarów metodą SPRI zużyte biosensory poddawano procesowi regeneracji. W procesie czyszczenia wykorzystywano mieszaninę 1% Tritonu X-100 oraz NaOH (100 mM) rozpuszczonych w 500 ml wody destylowanej. Proces ten bazuje na reakcji hydrolizy zasadowej wiązania amidowego pomiędzy receptorem a tiolem. Dochodzi do usunięcia z powierzchni warstewki receptora (przeciwciała lub inhibitora) związanego z badanym analitem (markerem nowotworowym). Proces oczyszczania powierzchni biosensora składa się z kilku etapów. W pierwszej kolejności płytkę umieszczano w naczyniu z mieszaniną czyszczącą i energicznie mieszano. Po usunięciu warstwy receptora i analitu biosensor opłukiwano kilkakrotnie wodą. W celu jak najefektywniejszego usunięcia resztki mieszaniny czyszczącej czip płukano pod strumieniem wody destylowanej a następnie umieszczono na co najmniej 3 dni w naczyniu z wodą destylowaną zmieniając ją co 24 h. Ostatnim etapem tego procesu było suszenie powierzchni czipa w strumieniu argonu. W rezultacie po wykonaniu takiego czyszczenia na czipie pozostaje tylko warstwa tiolowa (cysteamina, ODM). Tak oczyszczony i osuszony biosensor był ponownie wykorzystywany do pomiarów.

5. *Analityczne opracowanie biosensorów*

5.1 *Dobór optymalnego stężenia receptora.*

Dobór optymalnego stężenia receptora jest jednym z kluczowych elementów analitycznego opracowania biosensora. Prawidłowe wysycenie powierzchni decyduje o prawidłowym działaniu biosensora. Opracowano pięć krzywych opisujących optymalne stężenie przeciwciał oraz inhibitora. W tym celu sporządzono szereg roztworów przeciwciał oraz inhibitora o następujących stężeniach:

A) królicze poliklonalne przeciwciało specyficzne na marker CA-125

$C_{\text{przeciwciała}} = 10; 30; 50; 100; 150; 200; 250; 350; 350 \mu\text{g/mL}$

B) królicze poliklonalne przeciwciało specyficzne na marker HE 4

$C_{\text{przeciwciała}} = 0,1; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 40 \text{ ng/mL}$

C) mysie monoklonalne przeciwciało specyficzne na marker CEA

$C_{\text{przeciwciała}} = 5; 10; 30; 50; 70; 90; 100; 120; 150 \text{ ng/mL}$

D) mysie monoklonalne przeciwciało i inhibitor specyficzny na interleukine 6

$C_{\text{przeciwciała/inhibitora}} = 1; 5; 10; 20; 30; 50; 100 \text{ pg/mL}$

Roztwory receptorów immobilizowano na powierzchni biosensorów pokrytych odpowiednimi tiolami (cysteaminą lub ODM).

Dla każdego z biosensorów użyto odpowiedniego stężenia analitu – roztworu standardowego białka:

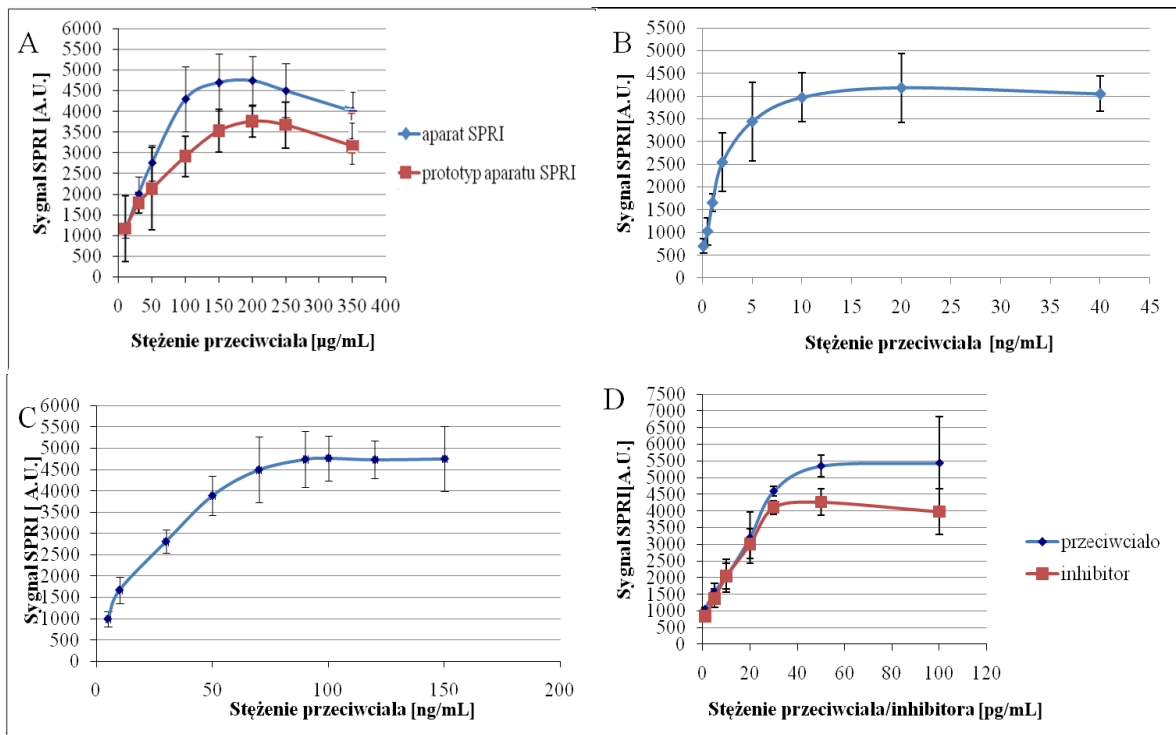
A) $5 \mu\text{g/mL}$

B) 5 ng/mL

C) 5 ng/mL

D) 5 pg/mL

Zależności sygnałów SPRI od stężenia przeciwciał oraz inhibitora ilustruje **Rys. 22**.



Rysunek 22. Zależność sygnału SPRI (Arbitrary Units) od stężeń receptorów: A) królicze poliklonalne przeciwciała specyficzne na marker CA-125, B) królicze poliklonalne przeciwciała specyficzne na marker HE4, C) mysie monoklonalne przeciwciała przeciw ludzkiemu CEA, D) mysie monoklonalne przeciwciała i inhibitor specyficzny na marker IL-6. Słupki błędów obliczono dla 12 niezależnych pomiarów dla każdego stężenia na poziomie ufności 95%.

Otrzymane krzywe mają kształt zbliżony do izotermi Langmuira z wyraźnie widoczną częścią wysycenia.

Analiza otrzymanych krzywych pozwala na wybór do dalszych badań następujących stężeń przeciwciał oraz inhibitora:

- A) C przeciwciała CA-125=200 µg/mL
- B) C przeciwciała HE 4=20 ng/mL
- C) C przeciwciała CEA=80 ng/mL
- D) C przeciwciała IL-6=60 pg/mL, C inhibitora IL-6=50 pg/mL

5.2. Opracowanie krzywej kalibracyjnej.

Zakresy analitycznie użyteczne dla każdego z biosensorów wykorzystywanych do badań określono poprzez sporządzenie krzywych kalibracyjnych tzn. zależności sygnału SPRI od stężenia analitu, dla pięciu badanych białek CA-125, HE 4, CEA, IL-6 oraz dla aromatazy. W pomiarach wykorzystano następujące zakresy stężeń:

A) marker CA-125

$C_{\text{białka}} = 1-200 \mu\text{g/mL}$

B) marker HE 4

$C_{\text{białka}} = 0,1-50 \text{ ng/mL}$

C) marker CEA

$C_{\text{białka}} = 0,5-50 \text{ ng/mL}$

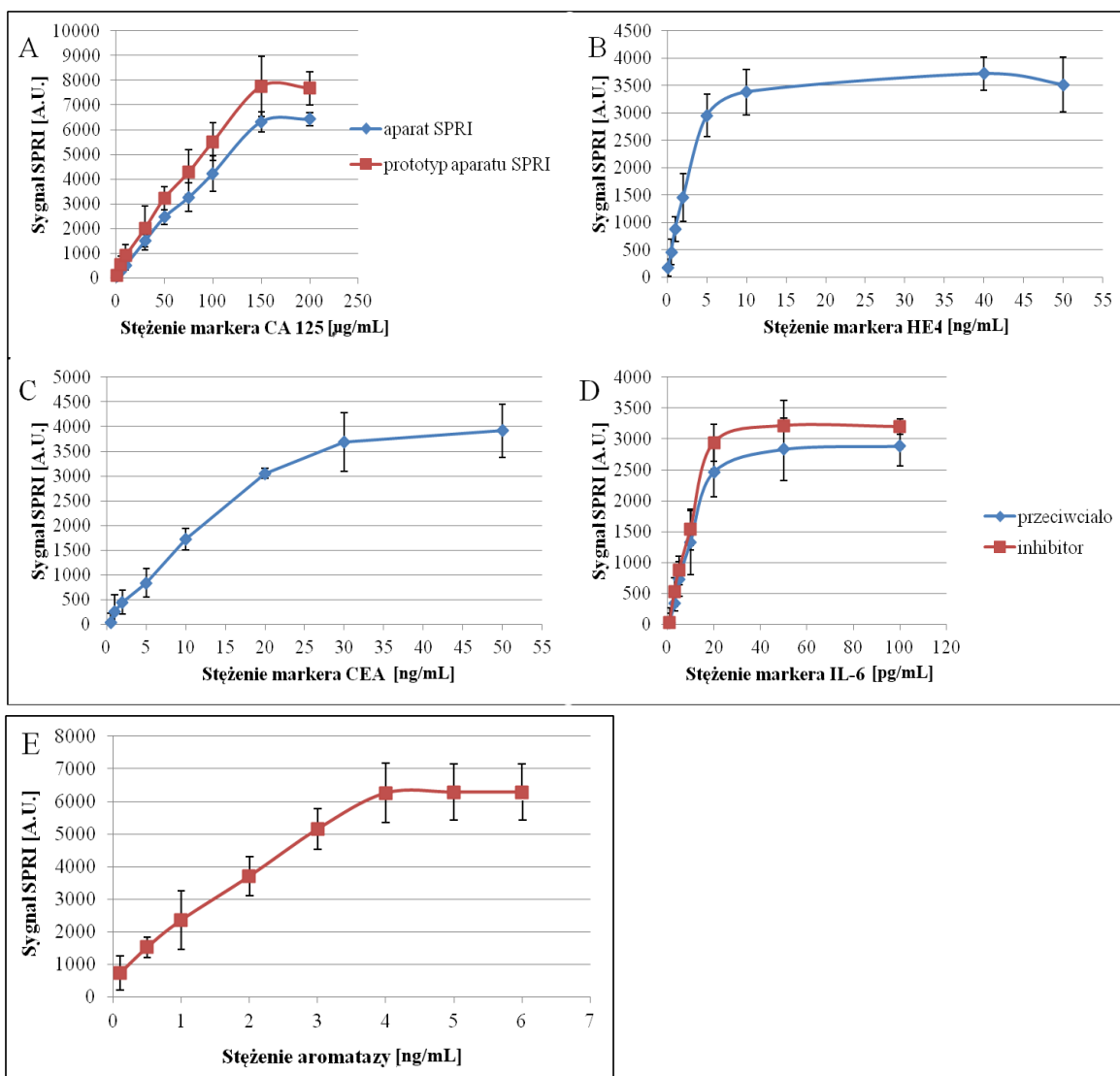
D) białko interleukina 6

$C_{\text{białka}} = 1-100 \text{ pg/mL}$

E) białko aromataza

$C_{\text{białka}} = 0,1-6 \text{ ng/mL}$

Uzyskane wykresy zależności sygnału SPRI od stężenia badanych analitów przedstawiono na **Rys.23**.



Rysunek 23. Zależność sygnału SPRI (Arbitrary Units) od stężeń badanych biomarkerów A) CA-125, B) HE 4, C) CEA, D) IL-6, E) aromatazy. Słupki błędów obliczono dla 12 niezależnych pomiarów dla każdego stężenia na poziomie ufności 95%.

Uzyskane krzywe kalibracyjne posiadają część prostoliniową oraz część wysycenia wynikającą z zajęcia przez analit wszystkich miejsc aktywnych receptora. Do analizy ilościowej poszczególnych biomarkerów analitycznie użyteczną częścią krzywych jest część prostoliniowa.

Na podstawie wyżej opisywanych krzywych wyselekcjonowano ich zakresy prostoliniowe – **Rys. 24** :

a) **marker CA-125**

$C_{białka} = 1-150 \mu\text{g/mL}$

b) **marker HE 4**

$C_{białka} = 0,1-5 \text{ ng/mL}$

c) **marker CEA**

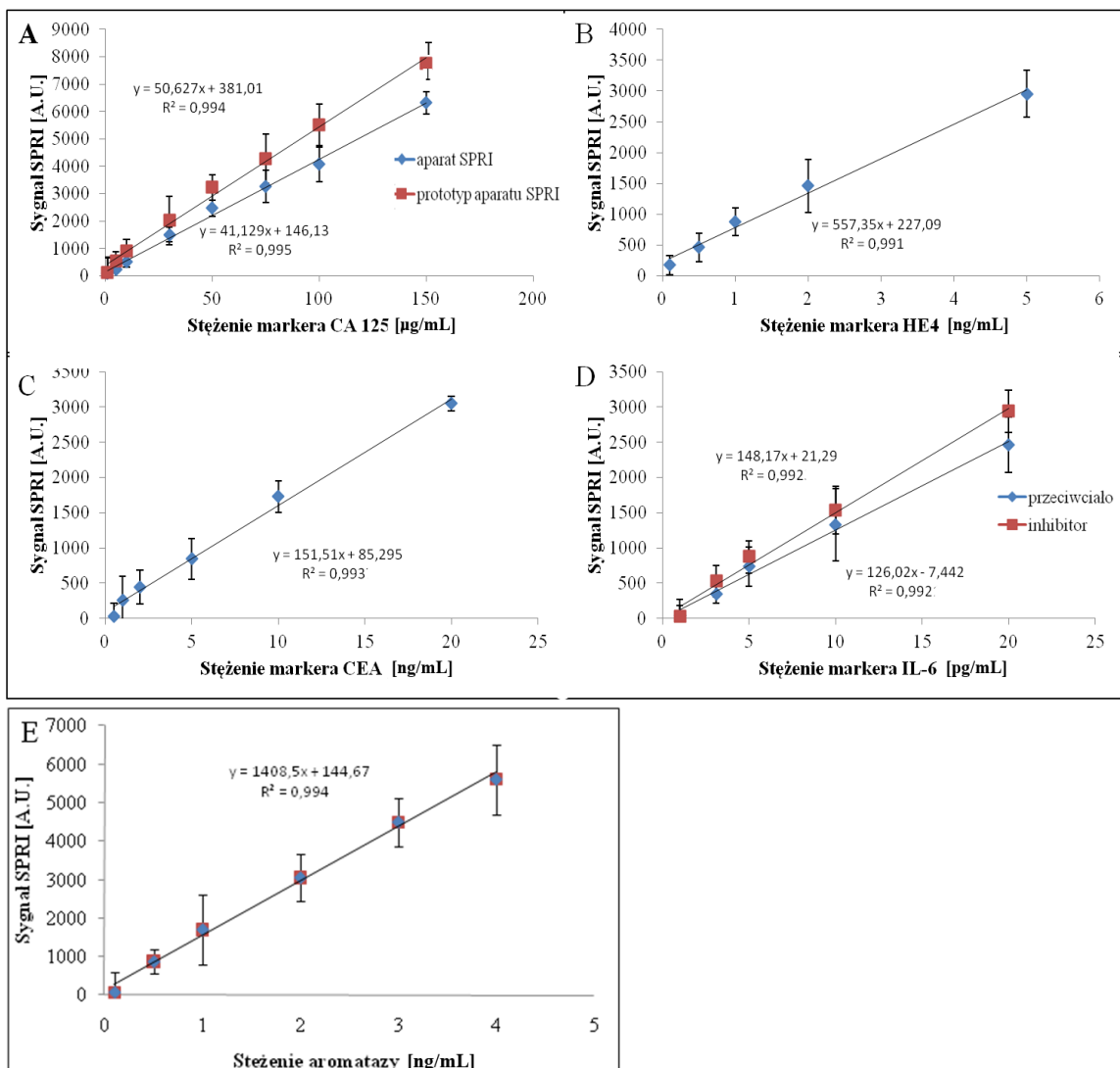
$C_{białka} = 0,5-20 \text{ ng/ml}$

d) **białko interleukina 6**

$C_{białka} = 1-20 \text{ pg/mL}$

e) **białko aromataza**

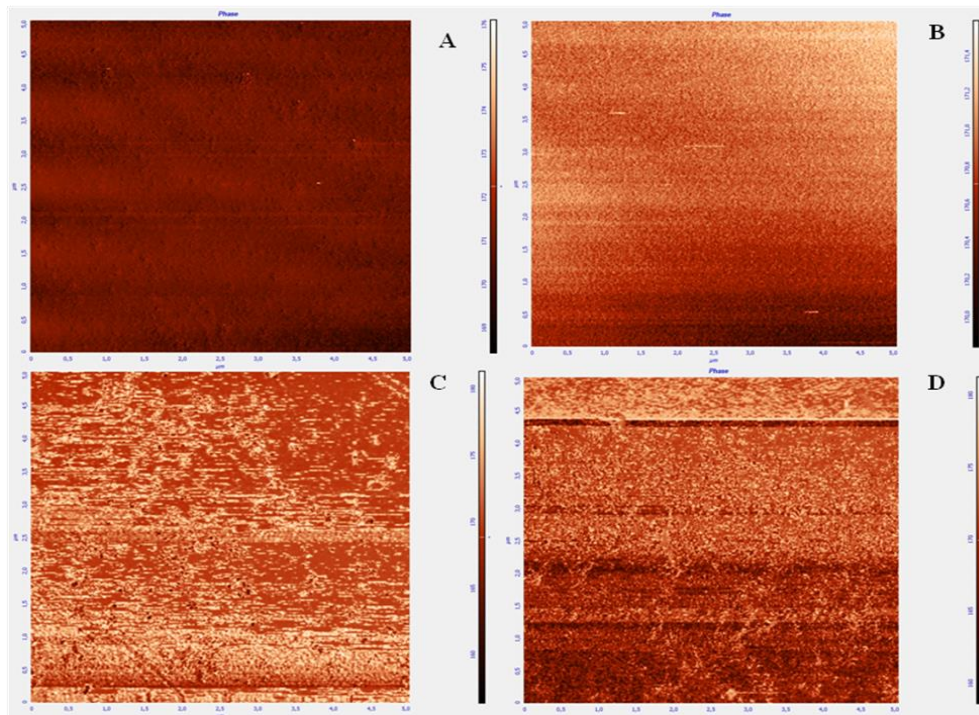
$C_{białka} = 0,1-4 \text{ ng/mL}$



Rysunek 24. Zakresy prostoliniowe krzywych kalibracyjnych zależność sygnału SPRI (Arbitrary Units) od stężeń biomarkerów A) CA-125, B) HE 4, C) CEA, D) IL-6, E) aromataza. Słupki błędów obliczono dla 12 niezależnych pomiarów dla każdego stężenia na poziomie ufności 95%.

5.3 Pomiary AFM

Jako przykład kontroli ułożenia kolejnych warstw na powierzchni biosensora wykonano analizę powierzchni za pomocą mikroskopu sił atomowych (AFM) dla antygenu karcinoembrionalnego (CEA). Mikroskopia sił atomowych (AMF) umożliwia obserwację powierzchni badanego bioczuwnika. Metodę zastosowano do potwierdzenia utworzenia każdej warstwy: tiolu (cysteamininy), przeciwciała (mysiego monoklonalnego przeciwciała anti-CEA) i białka (CEA)- Rys.25. Zdjęcia zostały wykonane dla czystego złota (A), cysteaminy (B), przeciwciała (C) i CEA (D). Prezentowane zdjęcia AFM potwierdzają, że opisane etapy tworzenia każdej warstwy na powierzchni bioczuwnika rzeczywiście miały miejsce. Można to stwierdzić na podstawie tworzenia różnych struktur oraz wysokości warstw po każdym etapie.



Rysunek 25. Zdjęcia AFM dla czystego złota (A), cysteaminy (B), przeciwciała (C) i CEA (D).

5.4 Określenie precyzji metody.

Kolejnym etapem analitycznego opracowania biosensorów SPRI było wyznaczenie precyzji metody. Pomiary wykonano w optymalnych warunkach pH=7.4 (bufor PBS) oraz wybranych we wcześniejszych badaniach stężeniach przeciwciał i inhibitora (rozdz 5, podrozdz 5.1). W celu określenia tego parametru sporządzono roztwory badanych białek o odpowiednich stężeniach wymienionych w **Tabeli 2**. Następnie wykonano pomiary sygnału SPRI. Na podstawie otrzymanych sygnałów z krzywych kalibracyjnych odczytano stężenia analitów. Otrzymane wyniki zestawiono w **Tabeli 2**

Tabela 2. Odzysk i precyzja metody wyznaczone dla badanych biomarkerów z wykorzystaniem 24 miejsc aktywnych na powierzchni biosensora dla każdego analitu.

	<i>Stężenie białka dodane</i>	<i>Stężenie białka oznaczone</i>	<i>SD</i>	<i>RSD [%]</i>	<i>Odzysk[%]</i>
CA-125 [μg/mL] aparat SPRI	1,00	1,15	0,08	8,00	115
	50,0	50,1	3,28	6,50	100
	100	99,9	5,87	5,90	99,9
CA-125 [μg/mL] prototyp aparatu SPRI	1,00	1,27	0,10	10,0	127
	50,0	51,0	4,66	9,30	102
	100	98,9	3,34	3,30	99,0
HE 4 [ng/mL]	0,50	0,51	0,03	6,00	102
	2,00	2,04	0,20	10,0	102
	5,00	5,19	0,49	9,80	103
CEA [ng/mL]	0,50	0,41	0,03	6,00	82,0
	5,00	5,46	0,55	11,0	109

	20,0	20,5	0,40	2,00	102
<i>IL-6</i> <i>(przeciwciało)</i> [pg/mL]	3,10	3,02	0,30	9,70	97,4
	10,0	10,7	0,98	9,80	107
	20,0	19,6	1,60	8,00	97,9
<i>IL-6</i> <i>(inhibitor)</i> [pg/mL]	3,10	3,24	0,11	3,50	104
	10,0	10,5	0,93	9,30	105
	20,0	20,2	1,77	8,90	101

Precyzję dla pojedynczego stężenia określono na podstawie dwóch miejsc pomiarowych, z których każde posiada 12 miejsc aktywnych, (czyli n=24).

5.5 Wyznaczenie granicy wykrywalności i oznaczalności.

Granice wykrywalności i oznaczalności oznaczanych biomarkerów wyznaczono na podstawie 24 miejsc pomiarowych z wykorzystaniem ślepej próby, jakim był roztwór buforowy (PBS).

Granica wykrywalności została wyznaczona na podstawie zależności:

$$\text{LOD} = 3 \times \text{S.D.}$$

S.D.- odchylenie standardowe dla ślepej próby

Granica oznaczalności została wyznaczona na podstawie zależności:

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{S.D.}$$

S.D.- odchylenie standardowe dla ślepej próby

Otrzymane wyniki dla analizowanych białek zebrano i zestawiono w **Tabeli 3:**

Tabela 3. Zestawienie wyznaczonych granic wykrywalności i oznaczalności dla opracowywanych metod.

<i>Rodzaj badanego markera</i>	<i>Granica wykrywalności LOD</i>	<i>Granica oznaczalności LOQ</i>
<i>CA-125 (standardowy aparat SPRI)</i>	0,24 µg/mL	0,80 µg/m
<i>CA-125 (prototyp aparatu SPRI)</i>	0,30 µg/ml	1,00 µg/mL
<i>HE 4</i>	0,09 ng/mL	0,30 ng/mL
<i>CEA</i>	0,09 ng/mL	0,30 ng/mL
<i>IL-6 (przeciwciało)</i>	0,90 pg/mL	3,00 pg/mL
<i>IL-6 (inhibitor)</i>	0,33 pg/mL	1,10 pg/mL

5.6 Opracowanie selektywności metody.

Selektywność metody to parametr pozwalający ocenić możliwości oznaczeń wybranej substancji w obecności innych substancji tzw interferentów. Sam pomiar polega na oznaczeniu danego analitu w obecności innych substancji mogących wchodzić w skład matrycy danej próbki. W swoich badaniach do wyznaczenia selektywności opracowanych metod wykorzystano następujące białka: leptyna, metaloproteinaza-2 i metaloproteinaza-1, albumina, TIMP-1 oraz badane markery nowotworowe. Podczas wyboru odpowiednich białek bazowano na kartach charakterystyki testów ELISA oraz doniesieniach literaturowych dostępnych w bazach czasopism naukowych. Stężenie albumin we krwi jest na bardzo wysokim poziomie dlatego zbadano jej ewentualny wpływ na stężenia markerów oznaczane poszczególnymi biosensorami. Jak wynika z literatury oznaczenie poziomu leptyny jest wskazane przy diagnozowaniu pacjentek z rakiem jajnika [86]. Metaloproteinaza-2 i TIMP-1 są oznaczane obok markera IL-6 i CEA u pacjentów z rakiem okrężnicy [87]. Przy wyznaczaniu selektywności dla poszczególnych markerów wzięto pod uwagę również inne białka wchodzące w skład panelu w celu sprawdzenia czy ich nadmiar nie wpływa na oznaczanie poszczególnych związków. W tym celu sporządzono szereg roztworów badanych markerów z różnymi substancjami biologicznymi w różnych stosunkach ilościowych. Uzyskane wyniki przedstawiono w **Tabelach 4-9**.

Tabela 4. Wpływ albuminy ludzkiej, leptyny, interleukiny 6, metaloproteinazy-2 na oznaczenie stężenia markera CA 125 przy wykorzystaniu standardowego aparatu SPRI.

<i>Białko</i>	<i>Stosunek masowy</i> <i>CCA125/Cbiałka</i>	<i>CCA-125</i> <i>dodane</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>CCA-125</i> <i>otrzymane</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Odzysk</i> %
<i>Leptyna</i>	1:1	10,0	10,2±1,07	102
	1:10		10,1±2,36	101
<i>Metaloproteinaza-2</i>	1:1	10,0	10,5±0,69	105
	1:10		9,3±0,45	93,3
<i>Interleukina-6</i>	1:1	10,0	10,9±1,99	109
<i>Albumina</i>	1:1	10,0	11,0±0,98	111
	1:100		10,0±4,12	100
	1:1000		10,7±0,56	107

Tabela 5. Wpływ albuminy ludzkiej, leptyny, interleukiny 6, metaloproteinazy-2 na oznaczenie stężenia markera CA 125 przy wykorzystaniu prototypu aparatu SPRI.

<i>Białko</i>	<i>Stosunek masowy CCA125/Cbiałka</i>	<i>CCA-125 dodane ($\mu\text{g/mL}$)</i>	<i>CCA-125 otrzymane ($\mu\text{g/mL}$)</i>	<i>Odzysk %</i>
<i>Leptyna</i>	1:1	10,0	9,90±0,87	99,0
	1:10		9,37±1,22	93,7
<i>Metaloproteinaza-2</i>	1:1	10,0	11,1±0,36	111
	1:10		9,71±3,05	97,1
<i>Interleukina-6</i>	1:1	10,0	10,2±2,55	102
<i>Albumina</i>	1:1	10,0	10,7±1,74	107
	1:100		10,7±0,58	107
	1:1000		10,5±1,77	105

Tabela 6. Wpływ albuminy ludzkiej, aromatazy, interleukiny 6, CEA, CA-125, metaloproteinazy-2 na oznaczanie stężenia markera HE 4 przy wykorzystaniu standardowego aparatu SPRI.

<i>Białko</i>	<i>Stosunek masowy CHE 4/Cbiałka</i>	<i>CHE 4 dodane (ng/mL)</i>	<i>CHE 4 otrzymane (ng/mL)</i>	<i>Odzysk %</i>
CA-125	1:1000	5,00	5,05±1,49	101
CEA	1:10	5,00	5,14±1,86	102
	1:100		5,19±1,86	103
Interleukina-6	1:10	5,00	5,21±1,37	104
Metaloproteinaza-2	1:1	5,00	5,09±1,88	101
Aromataza	1:10	5,00	5,01±0,93	100
Albumina	1:100	5,00	5,33±0,68	106
	1:1000		5,26±1,26	105

Tabela 7. Wpływ albuminy ludzkiej, leptyny, interleukiny 6, metaloproteinazy-2, TIMP-1, CA 125 na oznaczanie stężenia markera CEA przy wykorzystaniu standardowego aparatu SPRI.

<i>Białko</i>	<i>Stosunek masowy C_{CEA}/C_{białka}</i>	<i>C_{CEA} dodane (ng/mL)</i>	<i>C_{CEA} otrzymane (ng/mL)</i>	<i>Odzysk %</i>
<i>Leptyna</i>	1:1	10,0	10,8±4,71	108
	1:10		10,6±0,22	106
<i>CA-125</i>	1:1	10,0	10,6±4,09	106
	1:10		10,2±0,47	102
<i>Metaloproteinaza-2</i>	1:1	10,0	10,4±1,03	104
	1:10		10,7±2,33	107
<i>Interleukina-6</i>	1:1	10,0	10,8±1,31	108
<i>TIMP-1</i>	1:1	10,0	11,4±3,34	114
<i>Albumina</i>	1:1	10,0	10,9±2,02	109
	1:100		10,9±1,59	109
	1:1000		10,3±3,51	103

Tabela 8. Wpływ albuminy ludzkiej, leptyny, CEA, metaloproteinazy-2, CA 125 na oznaczenie stężenia markera IL-6 przy wykorzystaniu przeciwciała jako receptora i standardowego aparatu SPRI.

<i>Białko</i>	<i>Stosunek masowy C_{IL-6}/C_{białka}</i>	<i>C_{IL-6} dodane (pg/mL)</i>	<i>C_{IL-6} otrzymane (pg/mL)</i>	<i>Odzysk %</i>
CEA	1:1000	20,0	19,4±2,68	97,0
CA-125	1:1000	20,0	19,7±1,31	98,5
Leptyna	1:100	20,0	20,4±1,36	102
	1:1000		20,6±3,05	103
Metaloproteinaza-2	1:1000	20,0	20,5±3,94	102
Albumina	1:100	20,0	19,8±5,47	99,2
	1:1000		19,6±5,88	97,9

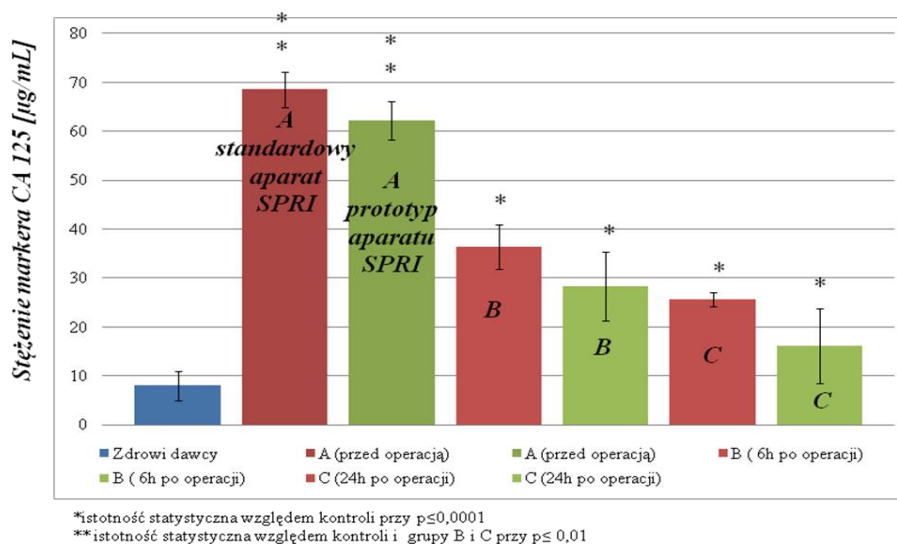
Tabela 9. Wpływ albuminy ludzkiej, leptyny, CEA, metaloproteinazy-2, CA 125 na oznaczenie stężenia markera IL-6 przy wykorzystaniu inhibitora jako receptora i standardowego aparatu SPRI.

<i>Białko</i>	<i>Stosunek masowy C_{IL-6}/C_{białka}</i>	<i>C_{IL-6} dodane (pg/mL)</i>	<i>C_{IL-6} otrzymane (pg/mL)</i>	<i>Odzysk %</i>
CEA	1:1000	20,0	20,8±1,34	104
CA-125	1:1000	20,0	19,7±9,20	98,6
Leptyna	1:100	20,0	20,1±1,78	100,5
	1:1000		19,9±1,07	99,4
Metaloproteinaza-2	1:1000	20,0	20,5±8,75	102
Albumina	1:100	20,0	21,4±3,03	107
	1:1000		20,5±1,64	102

6. Walidacja metod z użyciem próbek naturalnych.

6.1 Oznaczanie stężenia markerów CA-125, HE 4, CEA, IL-6 oraz aromatazy w próbkach pacjentów z torbielą endometrialną.

Analizie poddano surowicę pacjentek (n=25) ze zdiagnozowaną torbielą endometrialną. Próbki podzielono na 3 grupy w zależności od czasu przed i po wykonaniu zabiegu operacyjnego (*A-przed operacją; B-6h po operacji wycięcia torbieli; C-24h po operacji wycięcia torbieli*).Oznaczono w nich stężenie markerów CA-125, HE 4, CEA, IL-6 oraz aromatazy przy zastosowaniu skonstruowanych i analitycznie opracowanych biosensorów SPRI. Otrzymane wyniki porównano z wartościami stężeń wybranych markerów w próbkach kontrolnych (zdrowych dawców n=18). Otrzymane wyniki zobrazowano na **Rys. 26-30**.



Rysunek 26. Zestawienie stężeń markera CA-125 dla próbek kontrolnych oraz dla materiału biologicznego pacjentek z torbielą endometrialną o różnym czasie po resekcji torbieli. (*A-przed operacją; B-6h po operacji wycięcia torbieli; C-24h po operacji wycięcia torbieli*). Pomiar wykonano na dwóch aparatach standardowym aparacie SPRI oraz na prototypie aparatu SPRI. Stężenie króliczego przeciwciała poliklonalnego jako receptora- 200 µg/mL.

W dostępnej literaturze naukowej poziom markera nowotworowego CA-125 w płynach ustrojowych (osocze, surowica) oznaczane jest w jednostkach aktywności (U/mL). Istnieje możliwość przeliczenia aktywności na standardowe stężenie np. (µg/ml) oznaczane za pomocą biosensorów SPRI [88].

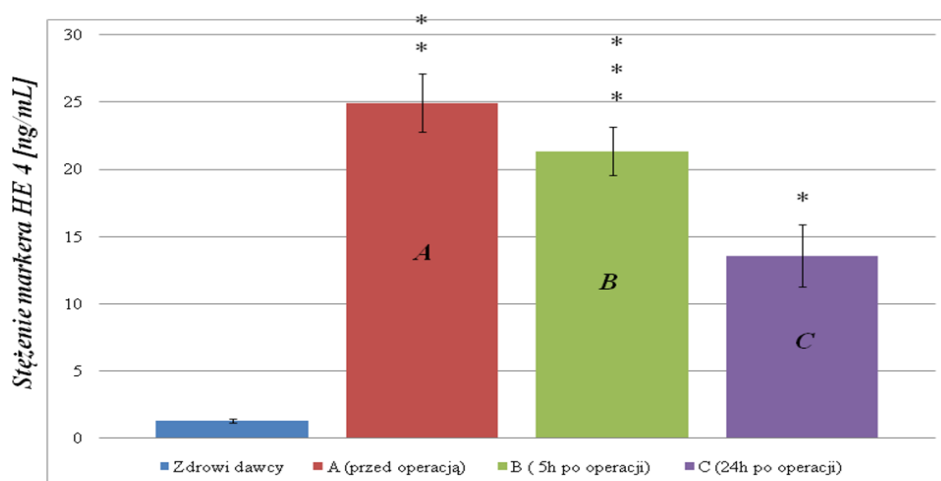
$$C = A * \frac{m}{v}$$

C- aktywność [U/mL]

A – specyficzna aktywność dla CA-125 (1040 U/mg= 1,04 U/µg) [89]

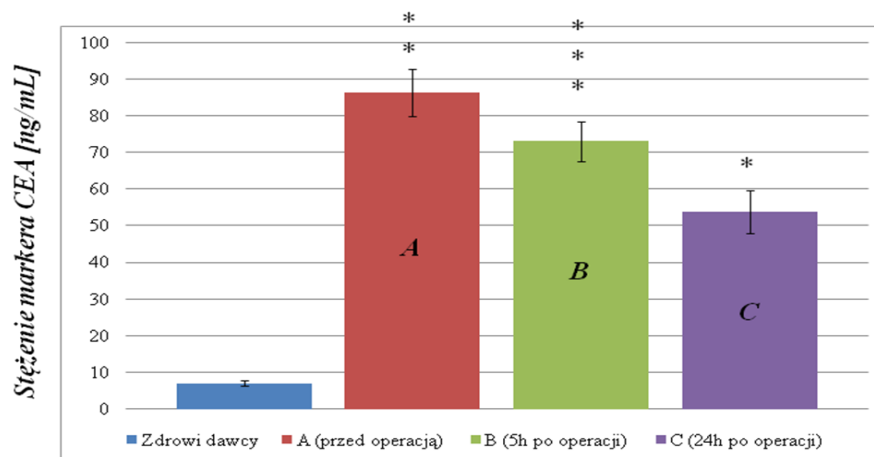
m- masa [µg]

v- objętość [mL]



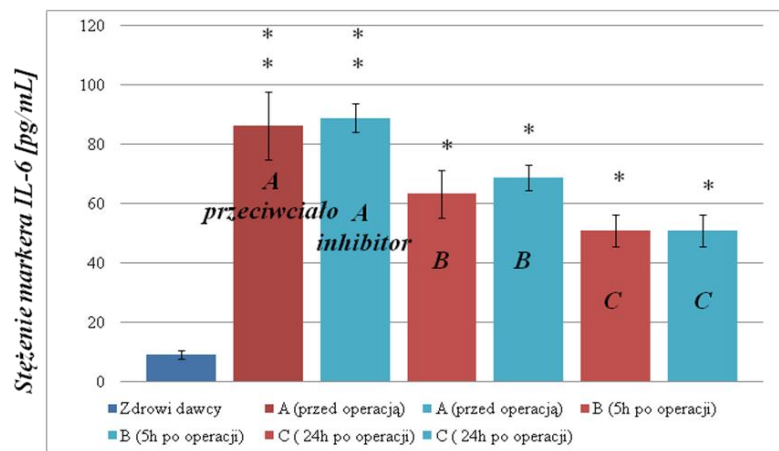
*istotność statystyczna względem kontroli przy p≤0,0001
 **istotność statystyczna względem kontroli i grupy B i C przy p≤0,05
 *** istotność statystyczna względem kontroli i grupy C przy p≤0,05

Rysunek 27. Zestawienie stężeń markera HE 4 dla próbek kontrolnych oraz dla materiału biologicznego pacjentek z torbielą endometrialną o różnym czasie po resekcji torbieli. (*A-przed operacją; B-6h po operacji wycięcia torbieli; C-24h po operacji wycięcia torbieli*). Stężenie króliczego przeciwciała poliklonalnego jako receptora- 20 ng/mL.



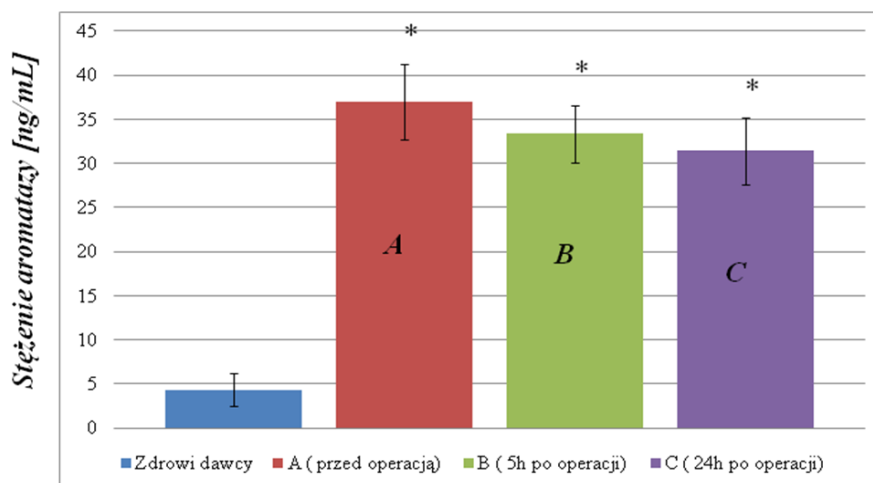
*istotność statystyczna względem kontroli przy $p \leq 0,0001$
 **istotność statystyczna względem kontroli i grupy B i C przy $p \leq 0,01$
 ***istotność statystyczna względem kontroli i grupy C przy $p \leq 0,01$

Rysunek 28. Zestawienie stężeń markera CEA dla próbek kontrolnych oraz dla materiału biologicznego pacjentek z torbielą endometrialną po różnym czasie od resekcji torbieli. (*A-przed operacją; B-6h po operacji wycięcia torbieli; C-24h po operacji wycięcia torbieli*). Stężenie mysiego przeciwciała monoklonalnego jako receptora- 80 ng/mL.



*istotność statystyczna względem kontroli przy $p \leq 0,0001$
 **istotność statystyczna względem kontroli i grupy B i C przy $p \leq 0,01$

Rysunek 29. Zestawienie stężeń markera IL-6 dla próbek kontrolnych oraz dla materiału biologicznego pacjentek z torbielą endometrialną o różnym czasie po resekcji torbieli. (*A-przed operacją; B-6h po operacji wycięcia torbieli; C-24h po operacji wycięcia torbieli*). Stężenie mysiego przeciwciała monoklonalnego jako receptora-60 pg/mL, stężenie inhibitora specyficznego na białko IL-6 jako receptora-50 pg/mL.

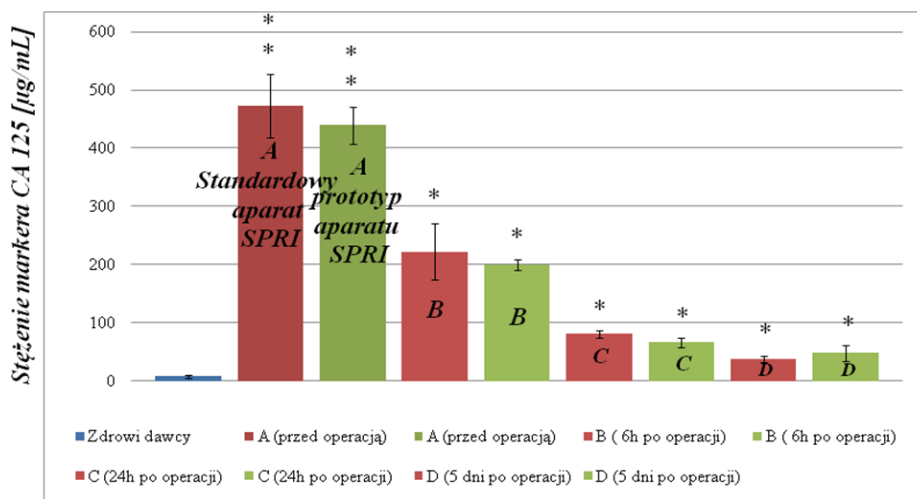


*istotność statystyczna względem kontroli przy $p \leq 0,0001$

Rysunek 30. Zestawienie stężeń białka aromatazy dla próbek kontrolnych oraz dla materiału biologicznego pacjentek z torbielą endometrialną o różnym czasie po resekcji torbieli. (*A-przed operacją; B- 6h po operacji wycięcia torbieli; C- 24h po operacji wycięcia torbieli*). Stężenie króliczego poliklonalnego przeciwciała na białko aromatazę jako receptora-20 ng/mL.

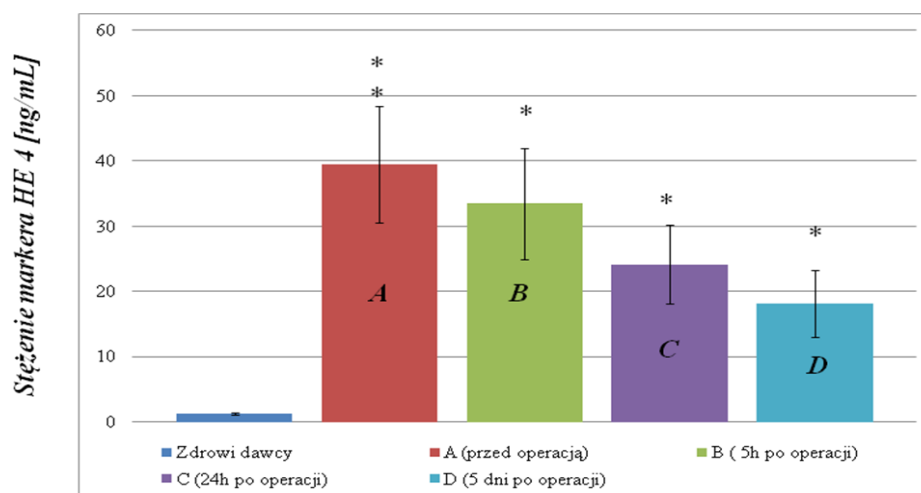
6.2. Oznaczanie stężenia markerów CA-125, HE 4, CEA, IL-6 oraz aromatazy w próbkach pacjentów z rakiem jajnika.

Badaniu poddano surowicę pochodzącą od pacjentek (n=7) z Białostockiego Centrum Onkologii. Otrzymany materiał biologiczny podzielony był na 4 grupy ze względu na czas przed i po wykonaniu zabiegu operacyjnego (*A-przed operacją; B-6h po operacji wycięcia torbieli; C-24h po operacji wycięcia torbieli; D-5 dni po operacji*). W surowicy oznaczono stężenie markerów CA-125, HE 4, CEA, IL-6 oraz aromatazy. Analizę wykonano przy zastosowaniu skonstruowanych i analitycznie opracowanych biosensorów SPRI. Otrzymane wyniki porównano z wartościami stężeń wybranych markerów w próbkach kontrolnych (zdrowych dawców n=18). Otrzymane wyniki zobrazowano na **Rys. 31-35**.



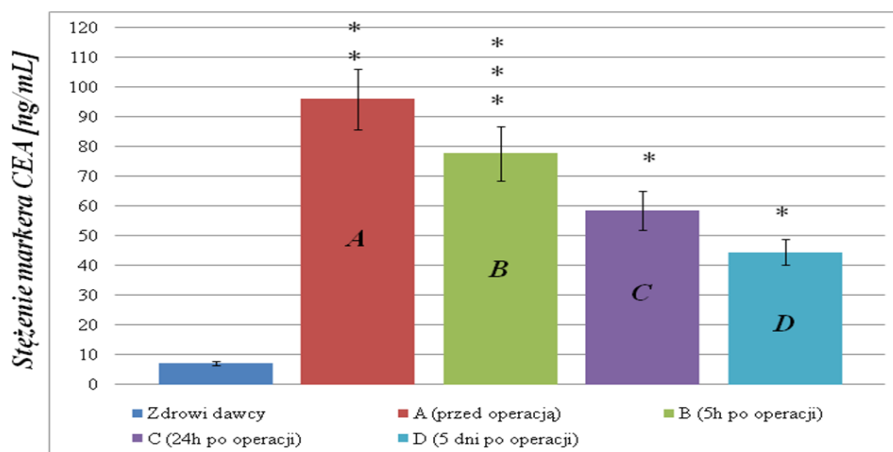
*istotność statystyczna względem kontroli przy $p \leq 0,0001$
 **istotność statystyczna względem kontroli i grupy B, C i D przy $p \leq 0,01$

Rysunek 31. Zestawienie stężeń markera CA-125 dla próbek kontrolnych oraz dla materiału biologicznego pacjentek z rakiem jajnika o różnym czasie po resekcji guza. (*A-przed operacją; B-6h po operacji wycięcia torbieli; C-24h po operacji wycięcia torbieli; D-5 dni po operacji*). Stężenie króliczego przeciwciała poliklonalnego jako receptora-200 µg/mL.



*istotność statystyczna względem kontroli przy $p \leq 0,0001$
 **istotność statystyczna względem kontroli i grupy D przy $p \leq 0,05$

Rysunek 32. Zestawienie stężeń markera HE 4 dla próbek kontrolnych oraz dla materiału biologicznego pacjentek z rakiem jajnika o różnym czasie po resekcji torbieli. (*A-przed operacją; B-6h po operacji wycięcia torbieli; C-24h po operacji wycięcia torbieli; D-5 dni po operacji*). Stężenie króliczego przeciwciała poliklonalnego jako receptora-20 ng/mL.

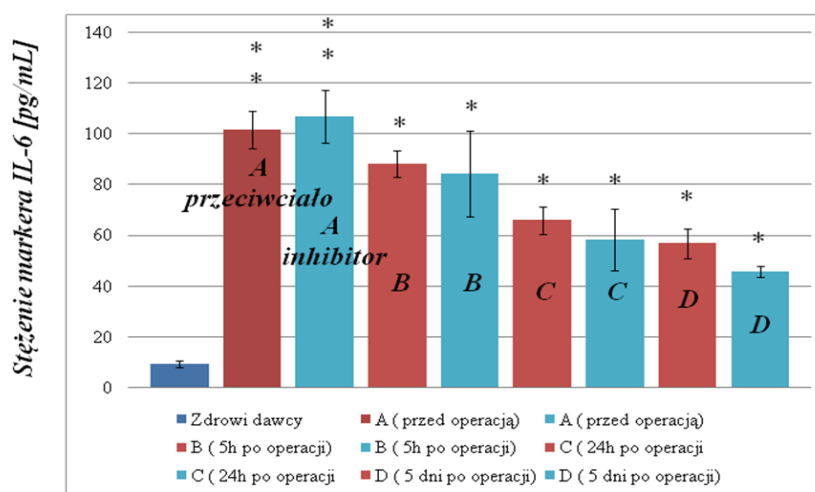


*istotność statystyczna względem kontroli przy $p \leq 0,0001$

**istotność statystyczna względem kontroli i grupy C i D przy $p \leq 0,01$

***istotność statystyczna względem kontroli i grupy D przy $p \leq 0,01$

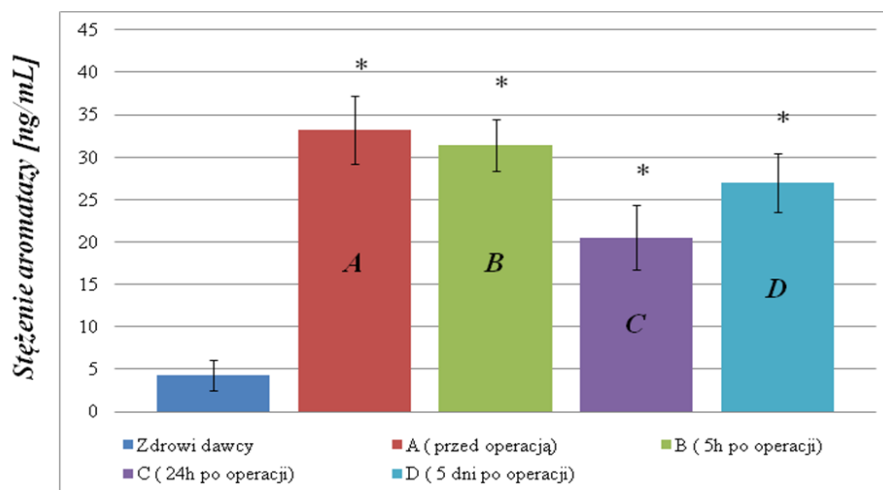
Rysunek 33. Zestawienie stężeń markera CEA dla próbek kontrolnych oraz dla materiału biologicznego pacjentek z rakiem jajnika po różnym czasie od resekcji guza. (*A-przed operacją; B-6h po operacji wycięcia torbieli; C-24h po operacji wycięcia torbieli; D-5 dni po operacji*). Stężenie mysiego przeciwciała monoklonalnego jako receptora-80 ng/mL.



*istotność statystyczna względem kontroli przy $p \leq 0,0001$

**istotność statystyczna względem kontroli i grupy C i D przy $p \leq 0,01$

Rysunek 34. Zestawienie stężeń markera IL-6 dla próbek kontrolnych oraz dla materiału biologicznego pacjentek z rakiem jajnika o różnym czasie po resekcji guza. (*A-przed operacją; B-6h po operacji wycięcia torbieli; C-24h po operacji wycięcia torbieli; D- 5 dni po operacji*). Stężenie mysiego przeciwciała monoklonalnego jako receptora-60 pg/mL, stężenie inhibitora specyficznego na marker IL-6 jako receptora-50 pg/mL.

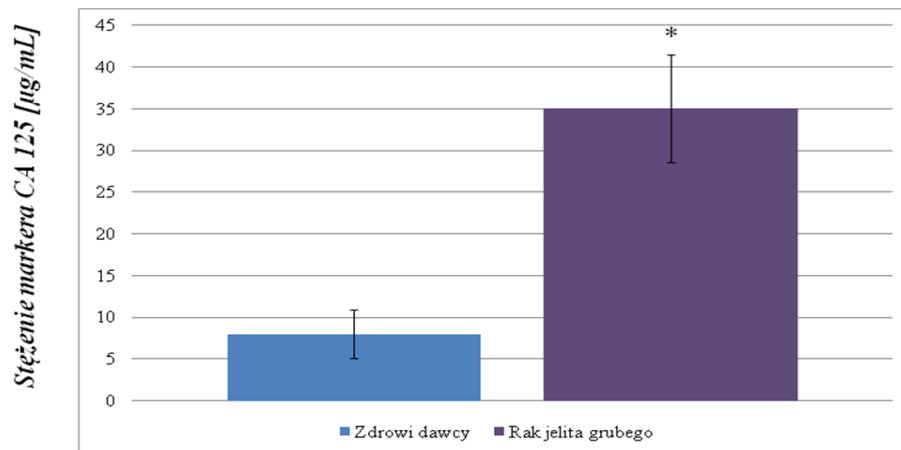


*istotność statystyczna względem kontroli przy $p \leq 0,0001$

Rysunek 35. Zestawienie stężeń białka aromatazy dla próbek kontrolnych oraz dla materiału biologicznego pacjentek z rakiem jajnika o różnym czasie po resekcji guza. (*A-przed operacją; B-6h po operacji wycięcia torbieli; C-24h po operacji wycięcia torbieli; D-5dni po operacji*). Stężenie króliczego poliklonalnego przeciwciała na białko aromatazę jako receptora-20 ng/mL.

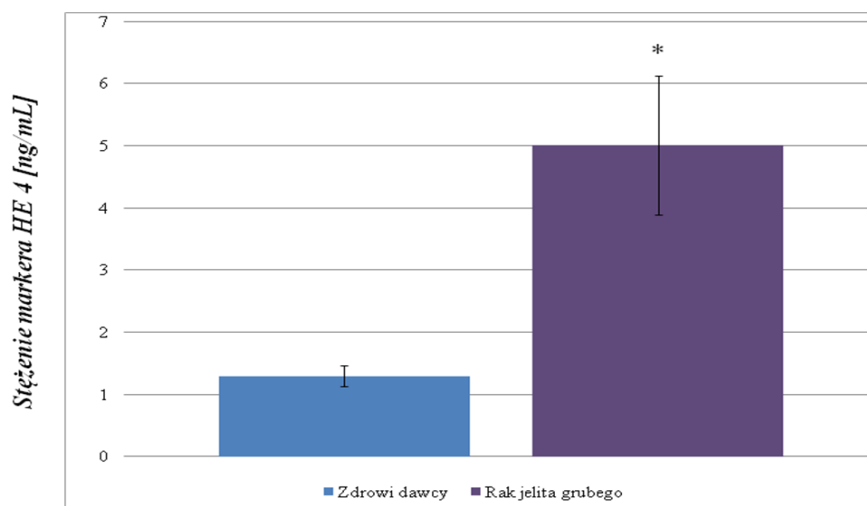
6.3. Oznaczanie stężenia markerów CA-125, HE 4, CEA, IL-6 oraz aromatazy w próbkach pacjentów z rakiem jelita grubego.

Oznaczono stężenie markerów CA-125, HE 4, CEA, IL-6 oraz aromatazy w próbkach osocza pacjentów (n=14) ze zdiagnozowanym rakiem jelita grubego. Analizę wykonano przy zastosowaniu skonstruowanych i analitycznie opracowanych biosensorów SPRI. Otrzymane wyniki porównano z wartościami stężeń wybranych markerów w próbkach kontrolnych (zdrowych dawców n=18). Otrzymane wyniki zobrazowano na **Rys. 36-40**.



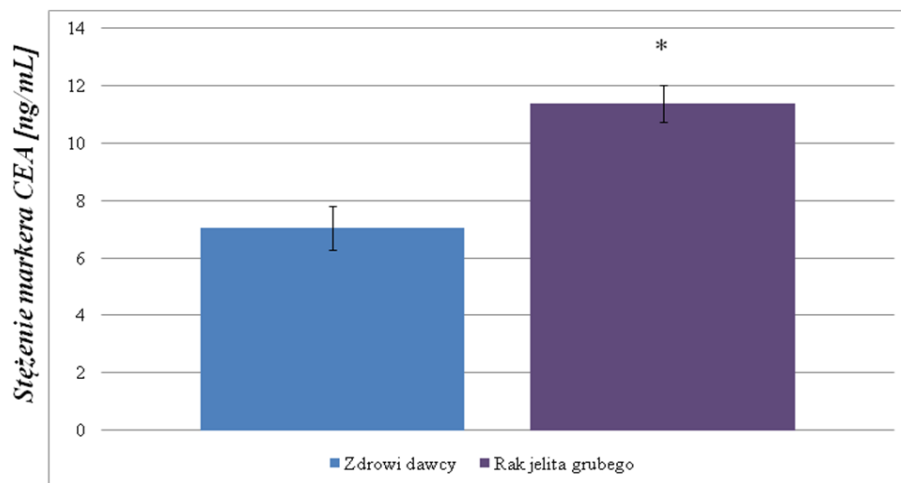
*istotność statystyczna względem kontroli przy $p \leq 0,0001$

Rysunek 36. Zestawienie stężeń markera CA-125 dla próbek kontrolnych oraz dla materiału biologicznego pacjentów z rakiem jelita grubego. Stężenie króliczego przeciwciała poliklonalnego jako receptora-200 µg/mL.



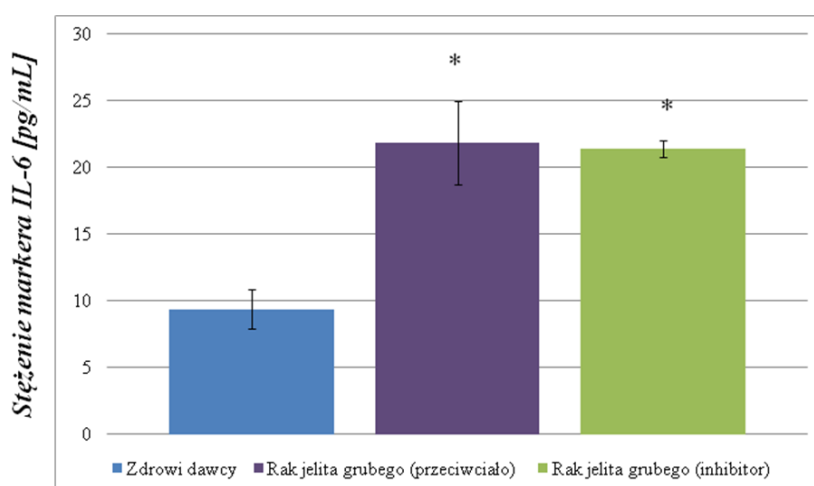
*istotność statystyczna względem kontroli przy $p \leq 0,0001$

Rysunek 37. Zestawienie stężeń markera HE 4 dla próbek kontrolnych oraz dla materiału biologicznego pacjentów z rakiem jelita grubego. Stężenie króliczego przeciwciała poliklonalnego jako receptora-20 ng/mL.



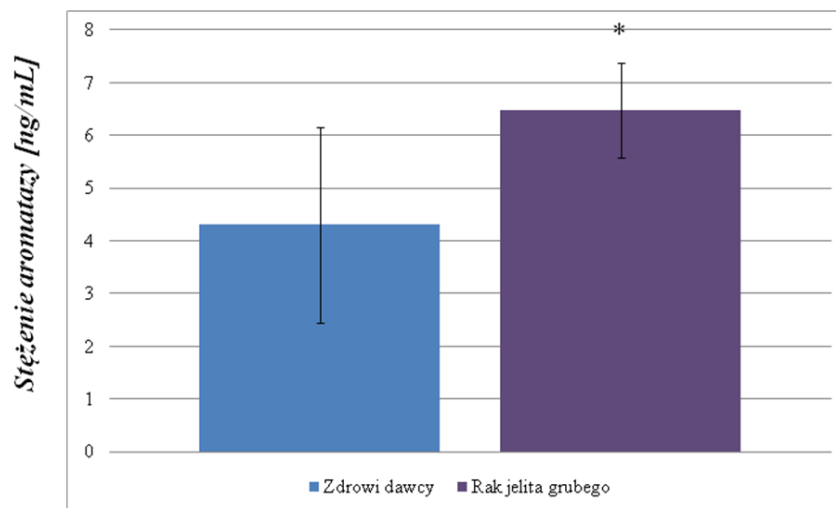
*istotność statystyczna względem kontroli przy $p \leq 0,0001$

Rysunek 38. Zestawienie stężeń markera CEA dla próbek kontrolnych oraz dla materiału biologicznego pacjentów z rakiem jelita grubego. Stężenie mysiego przeciwciała monoklonalnego jako receptora-80 ng/mL.



*istotność statystyczna względem kontroli przy $p \leq 0,0001$

Rysunek 39. Zestawienie stężeń markera IL-6 dla próbek kontrolnych oraz dla materiału biologicznego pacjentów z rakiem jelita grubego. Stężenie mysiego przeciwciała monoklonalnego jako receptora-60 pg/mL oraz inhibitora specyficznego na białko IL-6 jako receptora-50 pg/mL



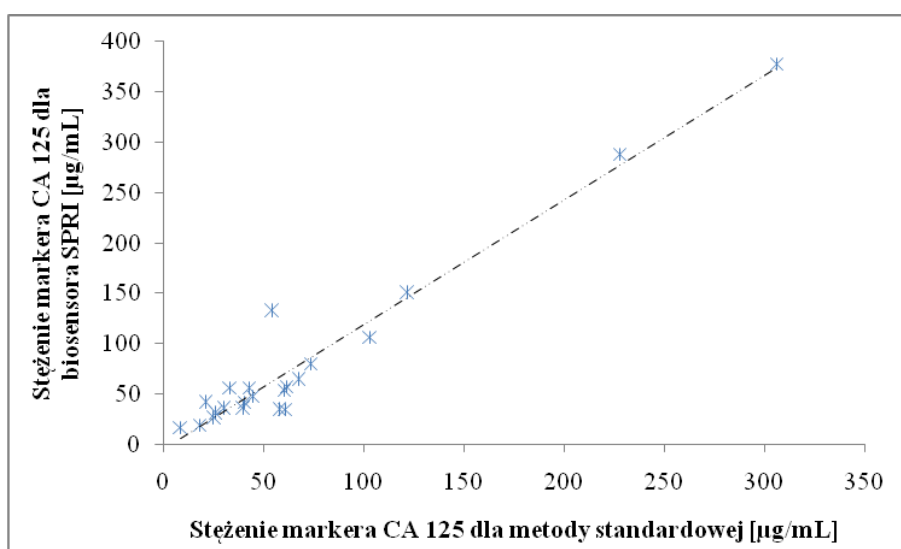
*istotność statystyczna względem kontroli przy $p \leq 0,01$

Rysunek 40. Zestawienie stężenia białka aromatazy dla próbek kontrolnych oraz dla materiału biologicznego pacjentów z rakiem jelita grubego. Stężenie króliczego przeciwciała poliklonalnego jako receptora-20 ng/mL.

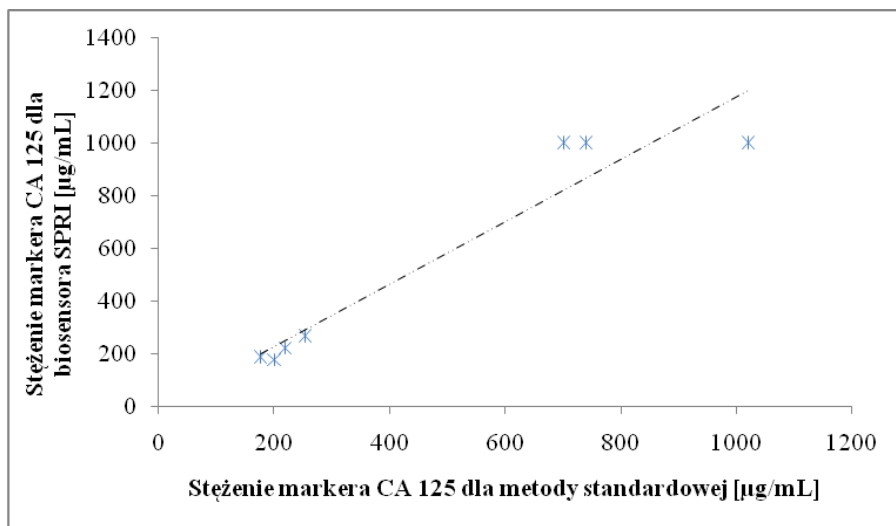
7. *Walidacja metod z użyciem diagnostycznych metod standardowych.*

W celu poprawnej analizy wyników otrzymanych przy wykorzystaniu walidowanych metod z wykorzystaniem skonstruowanych biosensorów SPRI przeprowadzono szereg oznaczeń badanych markerów z wykorzystaniem diagnostycznych technik standardowych wykorzystywanych w medycznych laboratoriach klinicznych.

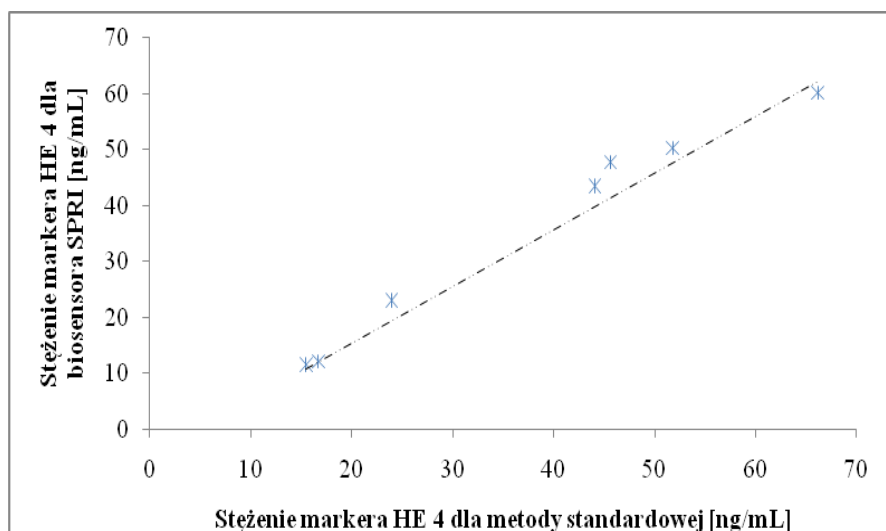
Marker CA-125 był oznaczany standardowym testem Architect CA 125, marker HE4, CEA oraz IL-6 testem standardowym Elecsys na analizatorze COBAS E-411. Otrzymane w obu metodach dane poddano korelacji Pearsona. Otrzymane wyniki przedstawiono na **Rysunkach 41-46.**



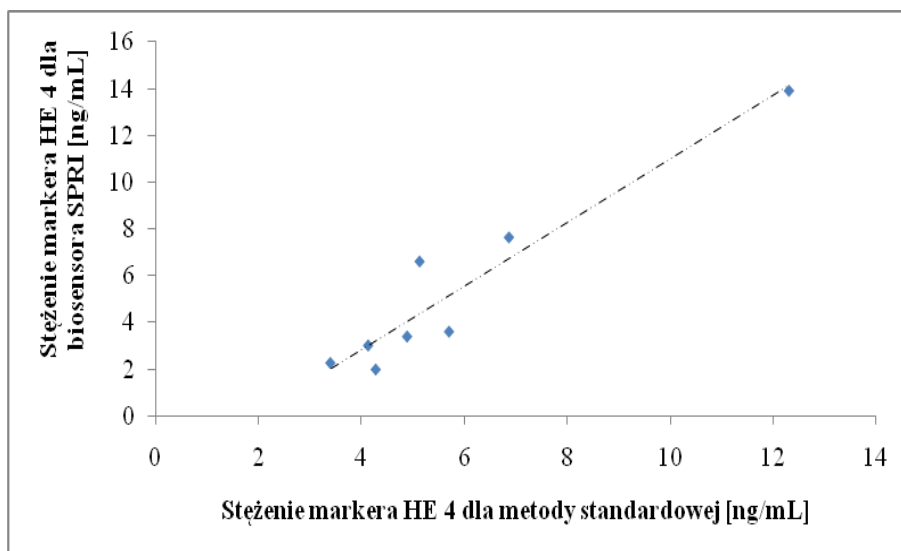
Rysunek 41. Korelacja Pearsona między wynikami stężenia markera CA-125 w surowicy krwi pacjentek z torbielą endometrialną uzyskanych metodą SPRI i testem standardowym (Architect CA 125 test). Współczynnik Pearsona wyniósł $r = 0,970$ ($p < 0,0001$, $n = 25$)



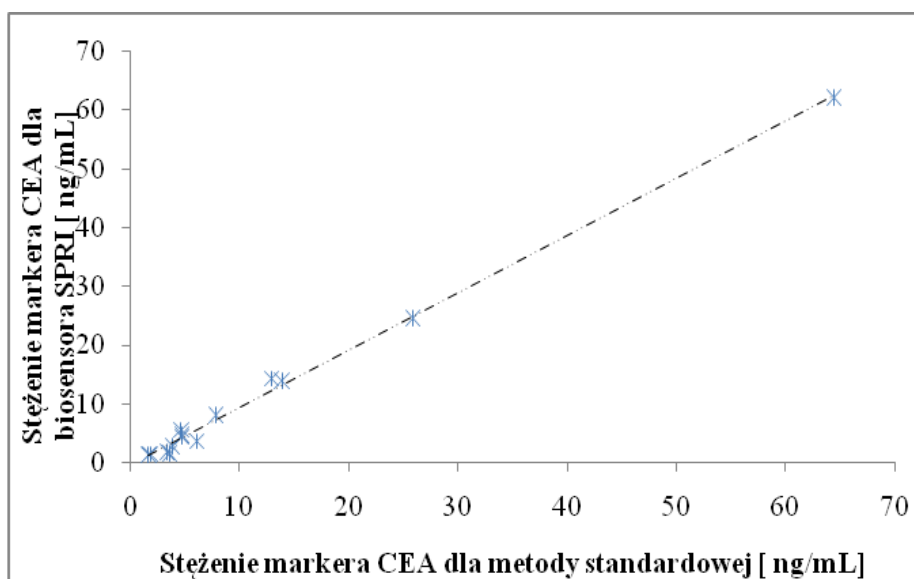
Rysunek 42. Korelacja Pearsona między wynikami stężenia markera CA-125 w surowicy krwi pacjentek z rakiem jajnika uzyskanych metodą SPRI i testem standardowym (Architect CA 125 test). Współczynnik Pearsona wyniósł $r = 0,955$ ($p < 0,0001$, $n = 7$)



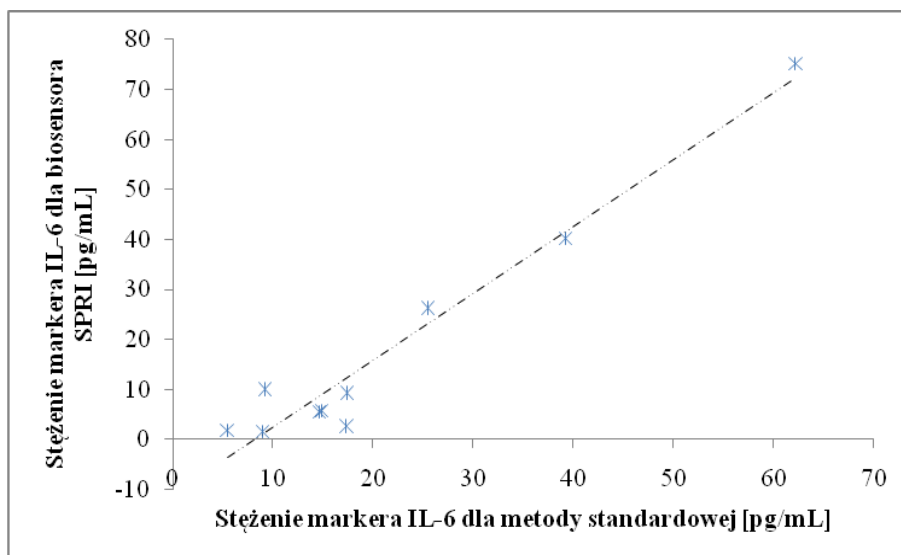
Rysunek 43. Korelacja Pearsona między wynikami stężenia markera HE 4 w surowicy krwi pacjentek z rakiem jajnika uzyskanych metodą SPRI i testem standardowym (Elecsys HE 4 test na analizatorze COBAS E-411). Współczynnik Pearsona wyniósł $r = 0,989$ ($p < 0,0001$, $n = 7$)



Rysunek 44. Korelacja Pearsona między wynikami stężenia markera HE 4 w osoczu krwi pacjentek z rakiem jelita grubego uzyskanych metodą SPRI i testem standardowym (Elecsys HE 4 test na analizatorze COBAS E-411). Współczynnik Pearsona wyniósł $r = 0,953$ ($p < 0,0001$, $n = 14$)



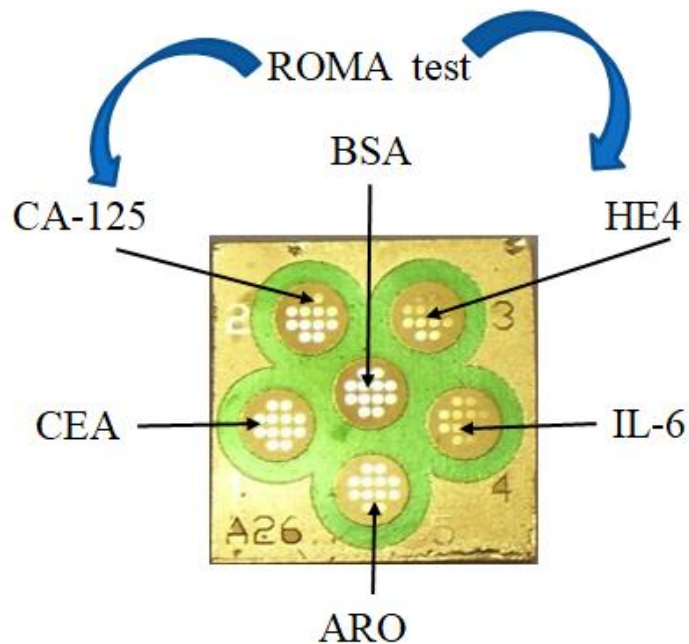
Rysunek 45. Korelacja Pearsona między wynikami stężenia markera CEA w osoczu krwi pacjentek z rakiem jelita grubego uzyskanych metodą SPRI i testem standardowym (Elecsys CEA test na analizatorze COBAS E-411). Współczynnik Pearsona wyniósł $r = 0,997$ ($p < 0,0001$, $n = 14$)



Rysunek 46. Korelacja Pearsona między wynikami stężenia markera IL-6 w osoczu krwi pacjentek z rakiem jelita grubego uzyskanych metodą SPRI i testem standardowym (Elecsys IL-6 test na analizatorze COBAS E-411). Współczynnik Pearsona wyniósł $r = 0,975$ ($p < 0,0001$, $n = 14$)

8. *Jednoczesne oznaczenia wybranych markerów za pomocą nowoopracowanego testu diagnostycznego.*

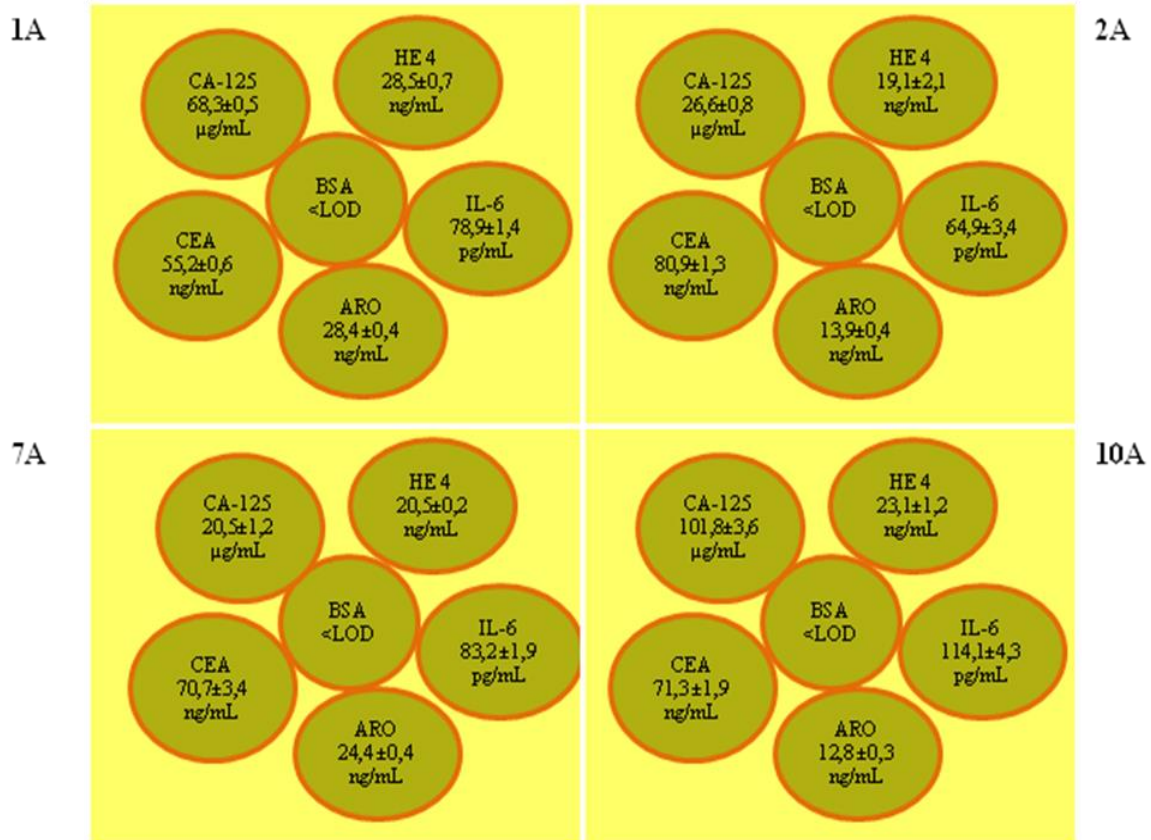
Celem przedstawionych w rozprawie doktorskiej badań była konstrukcja i analityczne opracowanie panelu ginekologiczno-onkologicznego (wraz z kalibracją) do jednoczesnego oznaczania pięciu markerów nowotworowych (CA-125, HE 4, IL-6, CEA oraz aromatazy). Po opracowaniu pojedynczych biosensorów na wyżej wymienione białka wykonano jednoczesny pomiar stężenia badanych markerów przy użyciu nowoskonstruowanego panelu z detekcją SPRI. Schemat panelu przedstawiono na **Rys 47**.



Rysunek 47. Schemat ideowy panelu analitycznego.

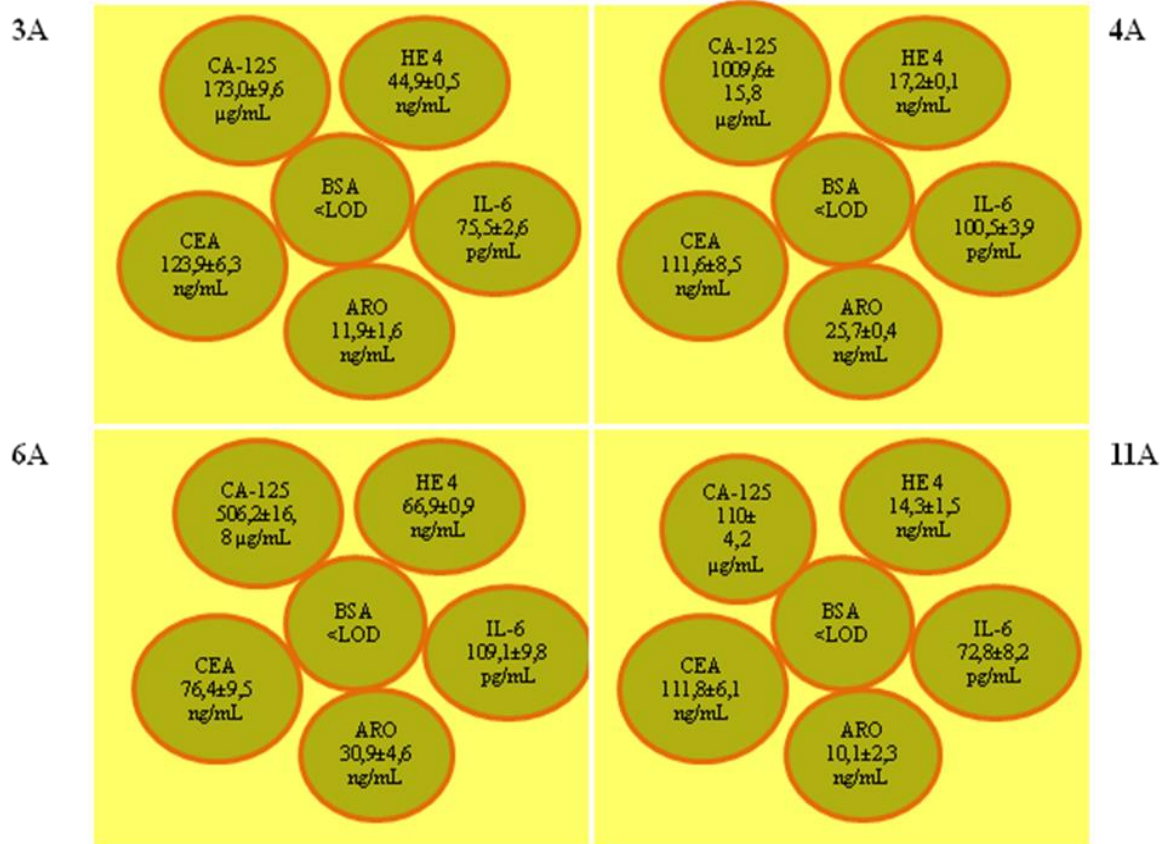
Ponownej analizie przy wykorzystaniu panelu analitycznego poddano po 4 próby pacjentek z rakiem jajnika, torbielą endometrialną, rakiem jelita grubego oraz próby kontrolne (zdrowych dawców). Otrzymane wyniki przedstawiono na **Rys. 48-51**.

Torbiel endometrialna
Nr prób: 1A,2A,7A,10A



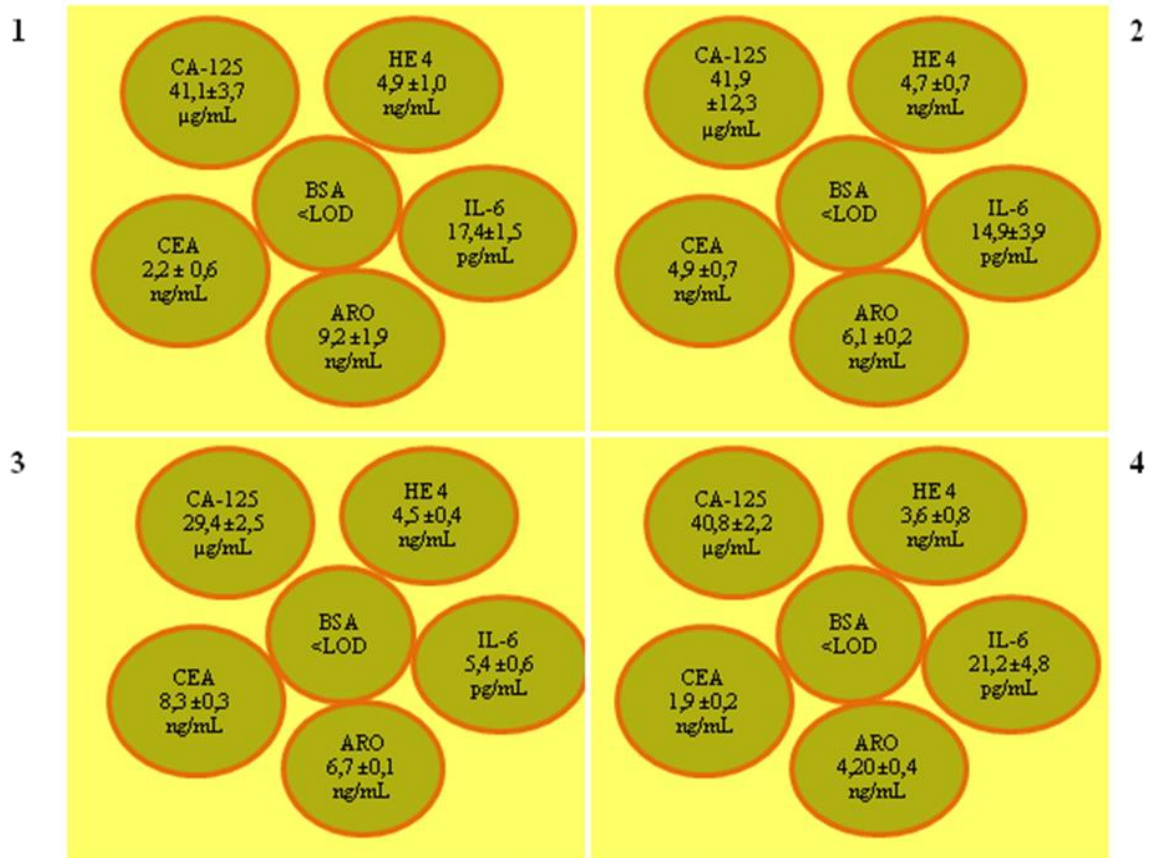
Rysunek 48. Zestawienie stężeń markerów CA-125, HE 4, IL-6, CEA oraz aromatazy dla 4 próbek pacjentek z torbielą endometrialną wykonane jednocześnie za pomocą panelu ginekologiczno-onkologicznego z detekcją SPRI

Rak jajnika
Nr prób: 3A,4A,6A,11A



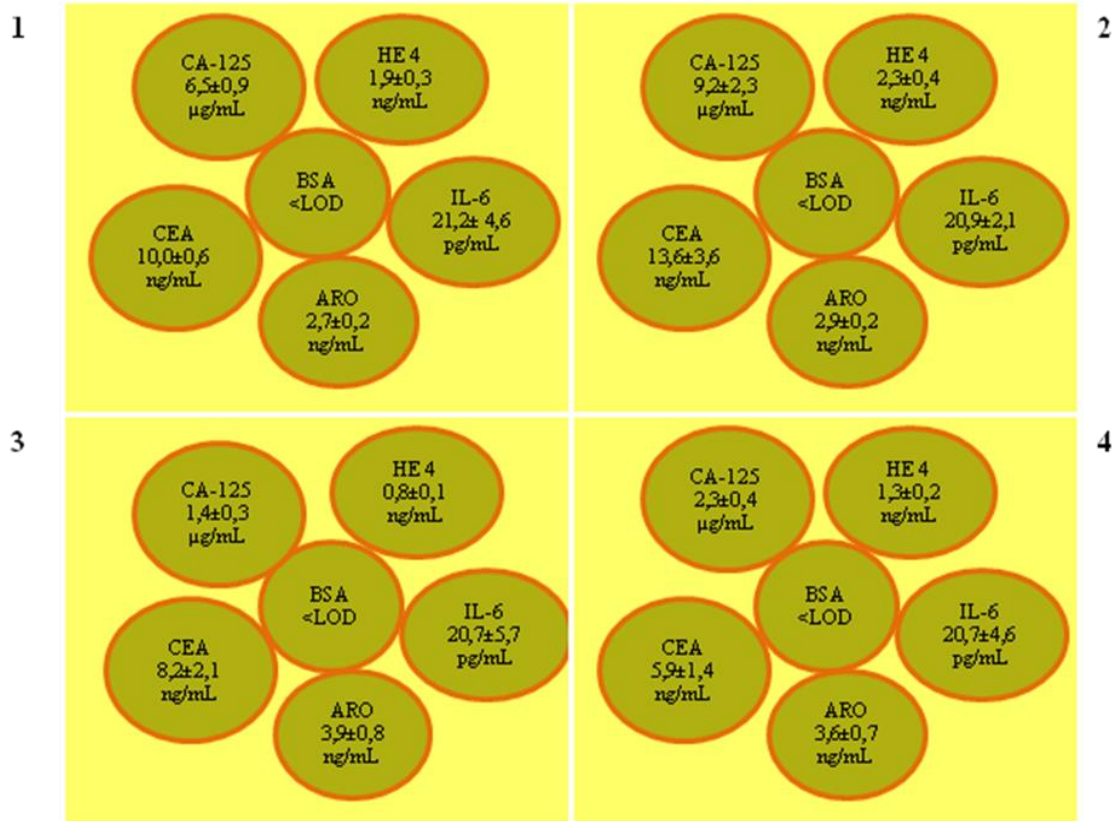
Rysunek 49. Zestawienie stężeń markerów CA-125, HE 4, IL-6, CEA oraz aromatazy dla 4 próbek pacjentek z rakiem jajnika wykonane jednocześnie za pomocą panelu ginekologiczno-onkologicznego z detekcją SPRI

Rak jelita grubego
Nr prób: 1,2,3,4



Rysunek 50. Zestawienie stężeń markerów CA-125, HE 4, IL-6, CEA oraz aromatazy dla 4 próbek pacjentek z rakiem jelita grubego wykonane jednocześnie za pomocą panelu ginekologiczno-onkologicznego z detekcją SPRI.

Zdrowi dawcy
Nr prób: 1,2,3,4



Rysunek 51. Zestawienie stężeń markerów CA-125, HE 4, IL-6, CEA oraz aromatazy dla 4 próbek zdrowych dawców (próby kontrolne) wykonane jednocześnie za pomocą panelu ginekologiczno-onkologicznego z detekcją SPRI.

Po przeprowadzeniu oznaczeń wybranych próbek torbieli endometrialnej, raka jajnika, raka jelita grubego oraz zdrowych dawców porównano wyniki otrzymane za pomocą panelu ginekologiczno-onkologicznego z tymi uzyskanymi przy wykorzystaniu skonstruowanych i analitycznie opracowanych biosensorów SPRI na poszczególne markery nowotworowe. Wyniki zestawiono w **Tabeli 10**.

Tabela 10. Zestawienie porównania stężeń badanych markerów nowotworowych uzyskanych przy wykorzystaniu panelu ginekologiczno-onkologicznego i pojedynczych biosensorów SPRI.

<i>Nazwa markera</i>	<i>Panel ginekologiczno-onkologiczny</i>	<i>Biosensor SPRI</i>
Torbiel endometrialna		
Nr próbki 1A		
CA-125 [$\mu\text{g/mL}$]	68,3 \pm 0,5	73,6 \pm 4,7
HE 4 [ng/mL]	28,5 \pm 0,7	26,2 \pm 1,4
CEA [ng/mL]	55,2 \pm 0,6	55,5 \pm 0,7
IL-6 [pg/mL]	78,9 \pm 1,4	80,2 \pm 5,6
ARO [ng/mL]	28,4 \pm 0,4	28,1 \pm 3,2
Nr próbki 2A		
CA-125 [$\mu\text{g/mL}$]	26,6 \pm 0,8	26,2 \pm 3,2
HE 4 [ng/mL]	19,1 \pm 2,1	19,3 \pm 0,3
CEA [ng/mL]	80,9 \pm 1,3	80,1 \pm 4,3
IL-6 [pg/mL]	64,9 \pm 3,4	65,6 \pm 2,5
ARO [ng/mL]	13,9 \pm 0,4	14,2 \pm 1,8
Nr próbki 7A		
CA-125 [$\mu\text{g/mL}$]	20,5 \pm 1,2	21,2 \pm 4,3
HE 4 [ng/mL]	20,5 \pm 0,2	18,8 \pm 0,1
CEA [ng/mL]	70,7 \pm 3,4	72,0 \pm 4,6
IL-6 [pg/mL]	83,2 \pm 1,9	81,8 \pm 1,1
ARO [ng/mL]	24,4 \pm 0,4	24,7 \pm 0,8
Nr próbki 10A		
CA-125 [$\mu\text{g/mL}$]	102 \pm 3,6	103 \pm 5,1
HE 4 [ng/mL]	23,1 \pm 0,2	23,9 \pm 0,2
CEA [ng/mL]	71,3 \pm 1,9	72,9 \pm 6,8
IL-6 [pg/mL]	114 \pm 4,3	113 \pm 4,5
ARO [ng/mL]	12,8 \pm 0,3	13,8 \pm 1,1

<i>Nazwa markera</i>	<i>Panel ginekologiczno-onkologiczny</i>	<i>Biosensor SPRI</i>
Rak jajnika		
Nr próbki 3A		
CA-125 [$\mu\text{g/mL}$]	173 \pm 9,6	172 \pm 13,5
HE 4 [ng/mL]	44,9 \pm 0,5	45,6 \pm 0,6
CEA [ng/mL]	124 \pm 6,3	125 \pm 3,3
IL-6 [pg/mL]	75,5 \pm 2,6	75,8 \pm 3,1
ARO [ng/mL]	11,9 \pm 1,6	13,2 \pm 0,7
Nr próbki 4A		
CA-125 [$\mu\text{g/mL}$]	1010 \pm 15,8	1020 \pm 28,3
HE 4 [ng/mL]	17,2 \pm 0,1	16,6 \pm 0,4
CEA [ng/mL]	112 \pm 8,5	115 \pm 4,6
IL-6 [pg/mL]	101 \pm 3,9	102 \pm 4,8
ARO [ng/mL]	25,7 \pm 0,4	26,4 \pm 0,7
Nr próbki 6A		
CA-125 [$\mu\text{g/mL}$]	506 \pm 16,8	504 \pm 12,8
HE 4 [ng/mL]	66,9 \pm 0,9	66,2 \pm 1,3
CEA [ng/mL]	76,4 \pm 9,5	76,6 \pm 6,1
IL-6 [pg/mL]	109 \pm 9,8	113 \pm 7,9
ARO [ng/mL]	30,9 \pm 4,6	31,3 \pm 2,3
Nr próbki 11A		
CA-125 [$\mu\text{g/mL}$]	110 \pm 4,2	111 \pm 4,6
HE 4 [ng/mL]	14,3 \pm 1,5	15,5 \pm 1,3
CEA [ng/mL]	112 \pm 6,1	113 \pm 2,6
IL-6 [pg/mL]	72,8 \pm 8,2	74,1 \pm 4,8
ARO [ng/mL]	10,1 \pm 2,3	10,4 \pm 1,2

<i>Nazwa markera</i>	<i>Panel ginekologiczno-onkologiczny</i>	<i>Biosensor SPRI</i>
Rak jelita grubego		
Nr próbki 1		
CA-125 [$\mu\text{g/mL}$]	41,1 \pm 3,7	41,2 \pm 1,7
HE 4 [ng/mL]	4,9 \pm 1,0	4,9 \pm 0,6
CEA [ng/mL]	2,2 \pm 0,6	2,0 \pm 0,7
IL-6 [pg/mL]	17,4 \pm 1,5	17,3 \pm 2,1
ARO [ng/mL]	9,2 \pm 1,9	9,5 \pm 0,4
Nr próbki 2		
CA-125 [$\mu\text{g/mL}$]	41,9 \pm 12,3	40,5 \pm 4,6
HE 4 [ng/mL]	4,7 \pm 0,7	4,5 \pm 0,4
CEA [ng/mL]	4,9 \pm 0,7	5,0 \pm 0,5
IL-6 [pg/mL]	14,9 \pm 3,9	14,9 \pm 0,9
ARO [ng/mL]	6,1 \pm 0,2	5,9 \pm 0,5
Nr próbki 3		
CA-125 [$\mu\text{g/mL}$]	29,4 \pm 2,5	28,2 \pm 2,4
HE 4 [ng/mL]	4,5 \pm 0,4	4,3 \pm 0,8
CEA [ng/mL]	8,3 \pm 0,3	7,8 \pm 0,9
IL-6 [pg/mL]	5,4 \pm 0,6	5,4 \pm 0,7
ARO [ng/mL]	6,7 \pm 0,1	6,6 \pm 0,8
Nr próbki 4		
CA-125 [$\mu\text{g/mL}$]	40,8 \pm 2,2	42,8 \pm 4,3
HE 4 [ng/mL]	3,6 \pm 0,8	3,4 \pm 0,1
CEA [ng/mL]	1,9 \pm 0,2	1,9 \pm 0,9
IL-6 [pg/mL]	21,2 \pm 4,8	22,2 \pm 5,4
ARO [ng/mL]	4,2 \pm 0,4	4,0 \pm 0,6

<i>Nazwa markera</i>	<i>Panel ginekologiczno-onkologiczny</i>	<i>Biosensor SPRI</i>
Zdrowi dawcy		
Nr próbki 1		
CA-125 [$\mu\text{g/mL}$]	6,5 \pm 0,9	6,1 \pm 0,5
HE 4 [ng/mL]	1,9 \pm 0,3	2,1 \pm 0,2
CEA [ng/mL]	10,0 \pm 0,6	9,2 \pm 0,7
IL-6 [pg/mL]	21,2 \pm 4,6	20,3 \pm 1,6
ARO [ng/mL]	2,7 \pm 0,2	2,1 \pm 0,6
Nr próbki 2		
CA-125 [$\mu\text{g/mL}$]	9,2 \pm 2,3	8,9 \pm 1,8
HE 4 [ng/mL]	2,3 \pm 0,4	2,1 \pm 0,3
CEA [ng/mL]	13,6 \pm 3,6	12,9 \pm 0,5
IL-6 [pg/mL]	20,9 \pm 2,1	19,5 \pm 3,8
ARO [ng/mL]	2,9 \pm 0,2	2,6 \pm 0,4
Nr próbki 3		
CA-125 [$\mu\text{g/mL}$]	1,4 \pm 0,3	1,1 \pm 0,1
HE 4 [ng/mL]	0,8 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1
CEA [ng/mL]	8,2 \pm 2,1	7,7 \pm 1,8
IL-6 [pg/mL]	20,7 \pm 5,7	19,0 \pm 4,8
ARO [ng/mL]	3,9 \pm 0,8	3,5 \pm 0,3
Nr próbki 4		
CA-125 [$\mu\text{g/mL}$]	2,3 \pm 0,4	2,0 \pm 0,1
HE 4 [ng/mL]	1,3 \pm 0,2	1,2 \pm 0,2
CEA [ng/mL]	5,9 \pm 1,4	5,1 \pm 0,4
IL-6 [pg/mL]	20,7 \pm 4,6	18,9 \pm 3,2
ARO [ng/mL]	3,6 \pm 0,7	3,3 \pm 0,7

Po analitycznym opracowaniu wszystkich czterech biosensorów utworzono panel ginekologiczno-onkologiczny wraz z kalibracją, który wykorzystano do jednoczesnego oznaczania pięciu biomarkerów dla pacjentów z różnymi schorzeniami. Uzyskane wyniki stężeń dla poszczególnych prób były powtarzalne w granicach błędu między panelem a wynikami dla pojedynczych biosensorów. Otrzymane rezultaty jednoznacznie pokazują, że panel ginekologiczno-onkologiczny może być z powodzeniem stosowany jako metoda oznaczania wyżej wymienionych markerów w próbach biologicznych. Przy konstrukcji wyżej opisywanego panelu uwzględniono białko BSA, które stanowiło ślepią próbę. Otrzymane na panelu wyniki stężeń dla tego związku były poniżej granicy wykrywalności.

V. *Dyskusja wyników*

Opracowane w tej pracy biosensory do oznaczania biomarkerów CA 125, HE 4, CEA i IL-6 cechuje prostota ich budowy. Cztery z nich zawierają w części receptorowej biosensora odpowiednie przeciwciało połączone ze złotą powierzchnią chipa za pośrednictwem linkera cysteaminy. Tiolowa grupa cysteaminy „kotwicz się” na powierzchni złota a grupa aminowa służy do kowalencyjnego połączenia z karboksylową grupą przeciwciała, jak to jest uwidocznione na Rys. 18. Połączenie to jest dokonywane z zastosowaniem protokołu NHS/EDC. Zastosowanie linkera z grupą aminową zapewnia korzystną orientację zimmobilizowanego przeciwciała, bowiem grupy karboksylowe są zgrupowane w fragmencie Fc przeciwciała przeciwległym do rejonu wiążącego antygeny (Rys. 19). Zastosowane rozwiązanie korzystnie odróżnia się od komercyjnych chipów typu CM5 zawierających karboksylowany dekstran, jako linker. Takie rozwiązanie budowy warstwy receptorowej a także zastosowanie techniki pomiarowej dry non-fluidic array SPRi spowodowało możliwość oznaczania biomarkerów bez wzmacniania sygnału analitycznego oraz bez wstępnego jego zatężania. W przypadku stosowania przepływowej techniki SPR uzyskanie podobnych parametrów analitycznych w oznaczaniu markera CEA wymaga wzmocnienia sygnału przez zastosowanie np. nanocząsteczek złota [90, 91].

W przypadku markera IL-6, oprócz biosensora zawierającego przeciwciało, opracowano biosensor posiadający inhibitor galiellalaktone jako receptor. Budowa inhibitora wyklucza immobilizację za pośrednictwem wiązania amidowego. Dlatego została ona dokonana za pośrednictwem oddziaływań hydrofobowych a jako linker zastosowano tiol octadecylowy (ODM). Linker „kotwicz się” grupą tiolową na powierzchni złota. Także budowę tego biosensora cechuje prostota, w odróżnieniu od sandwichowych biosensorów ze złotymi nanocząstkami stosowanych w przepływowych wersjach SPR [np. 91].

Panel ginekologiczno-onkologiczny jest pierwszym tego rodzaju narzędziem diagnostycznym współdziałającym z techniką SPR. Pozwala na równoczesne oznaczanie 5 różnych biomarkerów. Na pięciu polach chipa są umieszczone przeciwciała pozwalające oznaczać jednocześnie CA 125, HE 4, IL-6, CEA oraz aromatazę. Cztery z tych biosensorów zostało opracowane w tej pracy. Biosensor na oznaczanie aromatazy został opracowany [92] i stosowany wcześniej [93]. Szóste pole pomiarowe służy jako referencyjne i zawiera immobilizowany BSA. Na wszystkich polach pomiarowych jest

stosowana cysteamina jako linker. Konstrukcję panelu, podobnie jak składowych biosensorów, cechuje prostota, co rzutuje na łatwość wykonania.

Immobilizacja przeciwciała lub inhibitora jako receptorów wymaga zoptymalizowania stężenia tych odczynników w fazie wytwarzania warstwy receptorowej. Konieczne jest dostosowanie stężenia receptora na powierzchni biosensora do wymaganego zakresu stężeń analitu. W przypadku markera CA125 konieczne jest uzyskanie odpowiedzi biosensora w zakresie $\mu\text{g/mL}$, w przypadku IL -6 – w zakresie pg/mL a w przypadku pozostałych markerów – w zakresie ng/mL . Dlatego stężenia biomarkerów stosowanych w tych badaniach były bliskie wartościom cut-off oddzielającej stężenia zdrowych osób i pacjentów nowotworowych. Wyniki badań optymalizujących ilustruje Rysunek 22. Wszystkie wyniki pokazują narastanie sygnału aż do uformowania plateau, wskazującego na wyczerpanie miejsc aktywnych biosensora. Pewien wyjątek stanowi krzywa dla markera CA 125, na której tworzy się łagodne maksimum. Warto tutaj zwrócić uwagę, że marker ten występuje w wyższym zakresie stężeń, to jest $\mu\text{g/mL}$ podczas gdy pozostałe w zakresach ng/mL lub pg/mL . W tak wysokich stężeniach mogą się pojawiać efekty asocjacyjne na powierzchni biosensora.

Krzywe kalibracyjne, odzwierciedlające zależność sygnału analitycznego od stężenia, są najważniejszymi charakterystykami analitycznymi. Dla opracowanych biosensorów, w warunkach zoptymalizowanych, krzywe te przedstawia Rysunek 23. Ponadto zamieszczono krzywą kalibracyjną dla aromatazy, wykonaną na podstawie informacji zawartych w literaturze [92]. Wszystkie krzywe mają kształt podobny do izotermy Langmuira z uformowaniem plateau, co jest związane ze stopniowym wysyceniem aktywnych miejsc biosensora. Początkowe fragmenty tych krzywych mają przebieg liniowy, co ilustruje Rysunek 24. Jest to duże ułatwienie wyznaczania stężenia markera w nieznanymi próbkach. Te liniowe fragmenty krzywych kalibracyjnych obejmują zakres $1\text{-}150 \mu\text{g/mL}$ dla markera CA125, $0,5\text{ - }20 \text{ ng/mL}$ dla markera CEA, $0,1\text{ - }5 \text{ ng/mL}$ dla markera HE 4, $0,1\text{ - }4 \text{ ng/mL}$ dla aromatazy oraz $1\text{ - }20 \text{ pg/mL}$ dla markera IL-6. Zakresy te, określane jako zakres dynamicznej odpowiedzi, pozwalają na oznaczanie tych markerów w surowicy lub osoczu krwi zdrowych osób a po odpowiednim rozcieńczeniu buforem, w próbkach pochodzących od osób chorych. Wykorzystywanie liniowych fragmentów krzywych kalibracyjnych skutkuje tym, że te zakresy są stosunkowo wąskie. Alternatywnym rozwiązaniem jest linearyzacja krzywych kalibracyjnych w układzie

współrzędnych sygnał analityczny – logarytm stężenia analitu. W takim przypadku zakres dynamicznej odpowiedzi obejmuje 2-3 rzędy wielkości stężenia jednak wynikiem jest logarytm stężenia. Niewielkie różnice w odczycie wynikające z błędu precyzji skutkują dużymi różnicami w wartości stężenia analitu. Przykładem takiego podejścia do kalibracji jest oznaczanie CEA opisane w pracach [90,91].

Kolejnymi parametrami analitycznymi charakteryzującymi opracowane biosensory są precyzja pomiaru i odzysk, reprezentujący dokładność pomiaru. Parametry te zebrano w Tabeli 2. Każdy z biosensorów był badany dla trzech stężeń: wybranego z najniższego zakresu, z najwyższego zakresu i pośrednich. Żaden z opracowanych biosensorów nie wyróżnia się szczególnie dobrą ani szczególnie złą precyzją pomiarów; nie występują także wyraźne różnice między biosensorymi. W zasadzie precyzja pomiarów mieści się poniżej 10%, co jest typowe dla tego typu pomiarów. Odzyski wykazują zarówno ujemne jak i dodatnie odchylenia od oczekiwanych, z przewagą dodatnich odchyżeń. Jednak zarówno precyzja jak i odzyski mogą być uznane za zadowalające.

Pochodnymi pomiarów precyzji są granica wykrywalności (LOD) i granica oznaczalności (LOQ). Te wartości w istocie wyznaczają dolny zakres stężeń dla danego biosensora. Wyniki te dla opracowanych biosensorów zebrano w Tabeli 3. Porównując otrzymane wyniki z zakresami liniowości sygnału analitycznego można stwierdzić, że dla biosensorów na oznaczanie CA125 i CEA wartości LOQ mieszczą się poniżej zakresu liniowości sygnału analitycznego i nie ograniczają tego zakresu. Jednak w przypadku biosensora na oznaczanie markera HE4 zakres liniowości obejmuje 0,1 – 5 ng/mL podczas gdy LOQ wynosi 0,3 ng/mL. Oznacza to, że biosensor pozwala na oznaczanie HE4 tylko w przedziale 0,3–5 ng/mL; w przedziale wyników między 0,09 a 0,3 ng/mL można mówić o wykryciu HE4 czyli o półilościowej ocenie. Podobnie w przypadku biosensora na oznaczanie IL-6 zawierającego przeciwciało w warstwie receptorowej, zakres oznaczalności powinien być ograniczony do 3 – 20 pg/mL a przedział między 0,9–3 pg/mL jest zakresem detekcji IL-6. Biosensor posiadający inhibitor w warstwie receptorowej nie ma tego ograniczenia i pozwala na oznaczanie IL-6 w zakresie 1-20 pg/ml.

Oznaczane markery występują w osoczu lub surowicy krwi w obecności setek innych substancji. Dlatego specyficzność sygnału analitycznego jest warunkiem sukcesu analitycznego. Badania selektywności oznaczania opracowanych markerów w obecności

kilku wybranych potencjalnych interferentów przedstawiono w Tabelach 4–9. W przypadkach biosensorów na oznaczanie markera HE4 (Tabela 6) oraz obu biosensorów na oznaczanie biomarkera IL – 6 (Tabele 8 i 9) wpływ potencjalnych interferentów na wynik okazał się nieznaczny. Trochę gorsze wyniki uzyskano dla biosensora na oznaczanie markera CA125 (Tabela 4), zwłaszcza w przypadku współznaczenia z nadmiarem albuminy. Można spodziewać się kilkuprocentowego zawyżenia wyników oznaczania. Najgorsze wyniki uzyskano dla biosensora na oznaczanie markera CEA (Tabela 7). Obecność każdego z badanych interferentów prowadzi do zawyżonych wyników rzędu 5–8%. Nie dyskwalifikuje to całkowicie tego biosensora, gdyż w badaniach onkologicznych najistotniejsze jest czy wynik przekracza wartość cut-off. Jednak otwiera to możliwość poszukiwania nowego biosensora o lepszej selektywności.

Ostateczną weryfikacją przydatności opracowanych biosensorów jest badanie stężenia markerów w próbkach naturalnych oraz walidacja biosensora poprzez równoległe oznaczanie z zastosowaniem metody standardowej. Badania te wykonano na serii próbek pochodzących od chorych na raka jajnika, torbiel endometrialną i raka jelita grubego oraz dla serii porównawczej od osób zdrowych. W przypadkach guza jajnika oraz torbieli endometrialnej próbki pochodziły z badań przedoperacyjnych oraz po usunięciu zmian. Biosensor do oznaczania markera CA125 wykazał, że stężenie markera w próbkach surowicy pacjentek z rakiem jajnika blisko 50-krotnie przekracza stężenie markera w próbkach zdrowych osób oraz że po usunięciu guza poziom markera szybko obniża się (Rysunek 31). Podobny kierunek zmian stężenia CA125 jest obserwowany po usunięciu torbieli endometrialnej (Rysunek 26), jednak stężenie markera przed operacją przekraczało stężenie w próbkach osób zdrowych tylko około 10-krotnie. Kilkakrotne podwyższenie stężenia CA125 w surowicy krwi zaobserwowano w próbkach pacjentów z rakiem jelita grubego (Rysunek 36). Walidacja tego biosensora dokonana na próbkach surowicy pacjentek z rakiem jajnika wykazała zgodność tych wyników z wynikami uzyskanymi za pomocą metody standardowej (Architect CA 125 test) z współczynnikiem Pearsona $r = 0,955$ (Rysunek 42). Podobna walidacja dokonana na próbkach surowicy pacjentek z torbielą endometrialną wykazała zgodność wyników z testem standardowym z współczynnikiem Pearsona $r = 0,970$ (Rysunek 41).

W przypadku markera HE 4 jego stężenie w serii próbek surowicy pacjentek z rakiem jajnika, zmierzone opracowanym biosensorem, około 8-krotnie przekracza stężenie

markera u zdrowych kobiet (Rysunek 32) i systematycznie obniża się po usunięciu guza. Również torbiel endometrialna powoduje u pacjentek podwyższenie stężenia HE4 w surowicy krwi (Rysunek 27). W badanych przypadkach było to 5-krotne podwyższenie względem stężenia w surowicy zdrowych ochotniczek, stopniowo obniżające się po usunięciu torbieli. W odróżnieniu od markera CA125, stężenie markera HE4 w surowicy krwi pacjentów z rakiem jelita grubego nie różni się od stężenia markera w grupie kontrolnej zdrowych donorów (Rysunek 37). Walidacja opracowanego biosensora do oznaczania markera HE4 została dokonana na dwóch przykładach: surowicy krwi pacjentek z rakiem jajnika oraz surowicy pacjentów z rakiem jelita grubego. W obu przypadkach porównawczy pomiar stężenia HE4 był dokonany standardowym testem Elecsys HE 4 wykonanym na aparacie COBAS E - 411 w laboratorium diagnostycznym. Wyniki przedstawiono na Rysunkach 43 i 44. W obu przypadkach zgodność wyników jest wystarczająca z współczynnikiem Pearsona 0,989 oraz 0,953, co pozwala uznać, że biosensor został zwalidowany.

CEA jest najczęściej oznaczanym markerem raka jelita grubego. Średnie stężenie CEA w kilku próbkach surowicy pacjentów z rakiem jelita grubego oraz grupy kontrolnej, oznaczone z zastosowaniem opracowanego biosensora, przedstawia Rysunek 38. Wzrost stężenia CEA ponad poziom grupy kontrolnej jest stosunkowo niewielki. Wynika to z faktu, że silny wzrost stężenia CEA obserwuje się jeśli guz jest większy od 3 cm [94]. Jednak marker wykazuje ponad 10-krotny wzrost stężenia względem grupy kontrolnej w przypadku raka jajnika (Rysunek 33) oraz torbieli endometrialnej (Rysunek 28). Stężenie CEA w surowicy wyraźnie obniża się po usunięciu guza jajnika i torbieli endometrialnej. Walidację opracowanego biosensora do oznaczania CEA przeprowadzono na próbkach surowicy pacjentów z rakiem jelita grubego oraz donorów z grupy kontrolnej. Porównawcze wyniki uzyskano z oznaczania tych samych próbek testem Elecsys CEA na aparacie COBAS E-411 wykonanego w laboratorium diagnostycznym. Wyniki porównania przedstawia Rysunek 45. Współczynnik Pearsona równy 0,997 wskazuje na skuteczną walidację opracowanego biosensora.

Oba biosensory do oznaczania markera IL-6 są zoptymalizowane do oznaczeń markera w surowicy krwi w zakresie pg/mL, co różni je od pozostałych opracowanych w tej pracy biosensorów pracujących w wyższych zakresach stężeń. Stężenie markera w surowicy pacjentek z rakiem jajnika oraz z torbielą endometrialną jest ponad 10-krotnie

wyższe niż w surowicy zdrowych osób i sukcesywnie się obniża po usunięciu guza lub torbieli (Rysunki 29 i 34). Surowica pacjentów z rakiem jelita grubego wykazuje ponad dwukrotnie wyższe stężenie markera IL-6 niż surowica zdrowych osób (Rysunek 39). Oba biosensory wykazują taką samą tendencję we wszystkich przypadkach. Walidacja biosensora do oznaczania markera IL-6, zawierającego przeciwciało jako element receptorowy, została dokonana na przykładzie serii próbek surowicy pacjentek z rakiem jajnika oraz grupie kontrolnej. Porównawcze wyniki uzyskano z oznaczania tych samych próbek testem Elecsys IL-6 na aparacie COBAS E - 411 wykonanego w laboratorium diagnostycznym. Wyniki porównania przedstawia Rysunek 46. Współczynnik Pearsona równy 0,975 wskazuje na skuteczną walidację opracowanego biosensora.

Biosensor do oznaczania aromatazy został opracowany wcześniej a aromataza okazała się bardzo dobrym markerem raka pęcherza [93]. Próbki osocza pacjentek z rakiem jajnika oraz z torbielą endometrialną wykazały blisko 10-krotne podwyższenie względem poziomu markera u osób z grupy kontrolnej oraz wyraźne obniżenie po usunięciu guza lub torbieli (Rysunki 30 i 35). Także pacjenci z rakiem jelita grubego mieli podwyższone stężenie aromatazy względem grupy kontrolnej (około 50%, Rysunek 40).

Głównym celem tej pracy było zbudowanie panelu ginekologiczno-onkologicznego a diskutowane wcześniej opracowania biosensorów do oznaczania markerów CA 125, HE 4, CEA oraz IL-6 stanowiły zadania cząstkowe. Zestaw markerów wchodzących w skład panelu uzupełniono o aromatazę. Wyniki pomiarów stężenia markerów w czterech przypadkowo dobranych próbkach pacjentek z torbielą endometrialną przedstawiono na Rysunku 48, pacjentek z rakiem jajnika – na Rysunku 49, pacjentów z rakiem jelita grubego – na Rysunku 50 a próbek surowicy grupy kontrolnej – na Rysunku 51. Wyniki te zebrano także w Tabeli 10. Można zaobserwować bardzo wysokie stężenia markerów w przypadku surowicy pochodzącej od pacjentów. W celu porównania wyników pacjentów z wynikami zdrowych osób wyznaczono średnie stężenia markerów w surowicy osób zdrowych. Wyniki przedstawiono w Tabeli 11.

Tabela 11. Średnie stężenia markerów w surowicy w grupie kontrolnej.

Marker	Jednostka	Średnie stężenie
CA 125	µg/mL	4,85
HE 4	ng/mL	1,57
CEA	ng/mL	9,40
IL 6	pg/mL	20,9
ARO	ng/mL	3,27

Porównanie stężenia markerów w surowicy pacjentów oraz grupy kontrolnej prowadzi do wniosku, że różnica stężeń nie jest dobrą miarą zaawansowania choroby. W skrajnym przypadku stężenie markera CA125 w jednej z próbek wynosi $1010 \pm 15,8$ µg/mL, podczas gdy średnia zawartość w próbkach zdrowych donorów – zaledwie 4,85 µg/mL. Różnica wyników jest zatem mniejsza od wahań wynikających z błędu precyzji. Dlatego jako miarę stężenia markera przyjęto krotność stężenia markera w próbce osoby chorej względem średniego poziomu u osób zdrowych.

$C = \text{stężenie markera u osoby chorej} / \text{średnie stężenie markera u zdrowych donorów}$

Tak zdefiniowane stężenie pozwala za pomocą panelu wyznaczyć profil markerów u danego pacjenta w jednostkach bezwymiarowych. Profile markerów dla różnych próbek pacjentek z rakiem jajnika zebrano w Tabeli 12 a z torbielą endometrialną - w Tabeli 13. Ułatwiają one porównanie stanu poszczególnych pacjentek oraz poziomu markerów w przypadku różnych chorób.

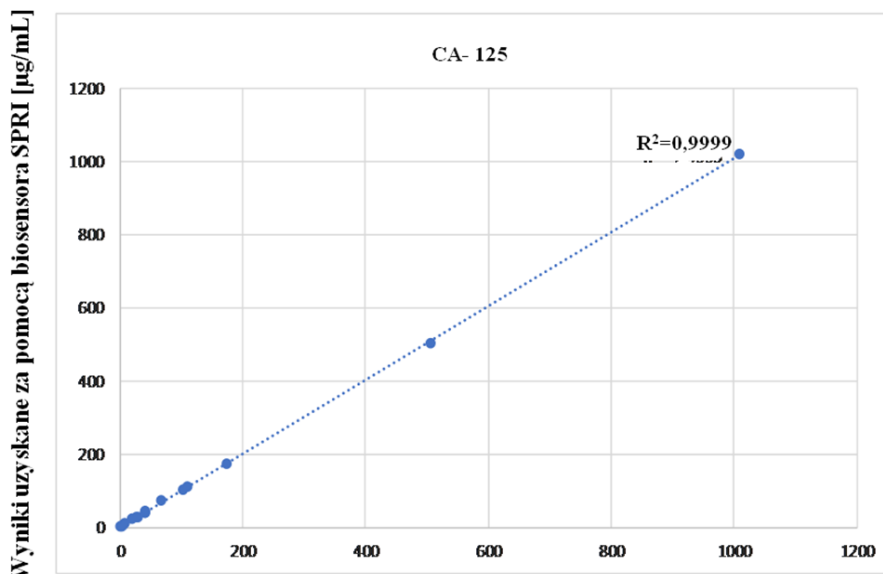
Tabela 12. Profile markerów dla czterech pacjentek z rakiem jajnika.

Marker/ Próbka	3A	4A	6A	11A
CA 125	35,7	208	104	22,7
HE 4	28,6	11,0	42,6	9,1
CEA	13,2	11,9	8,1	11,9
IL 6	3,6	4,8	5,2	3,5
ARO	3,6	7,9	9,4	3,1

Tabela 13. Profile markerów dla czterech pacjentek z torbielą endometrialną.

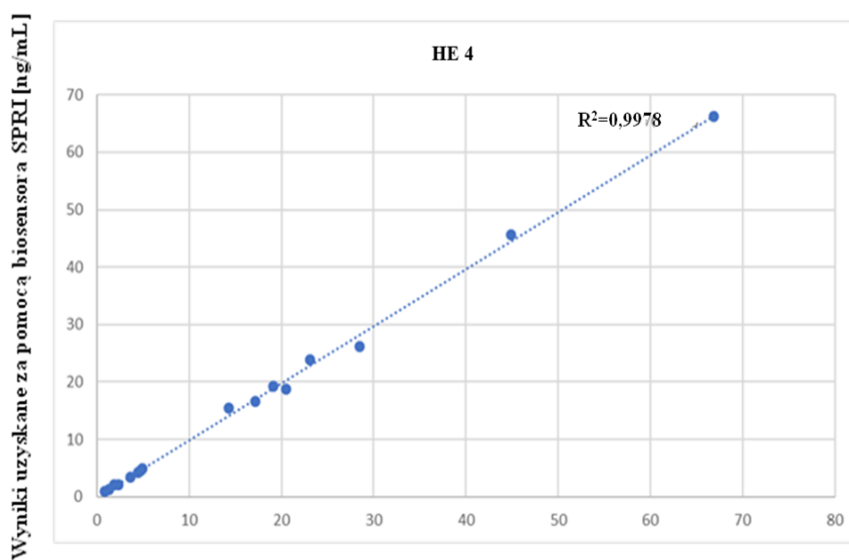
Marker/ Próbka	1A	2A	7A	10A
CA 125	14	5,5	4,2	12
HE 4	18	12	13	15
CEA	5,9	8,6	7,5	7,6
IL 6	3,8	3,1	4,0	5,4
ARO	8,7	4,2	7,5	3,9

Istotnym pytaniem jest czy wyniki otrzymane za pomocą panelu są takie same jak w przypadku biosensorów stosowanych oddzielnie. Porównanie takie ułatwia wykres Pearsona zawierający wyniki uzyskane za pomocą biosensora na osi x a wyniki uzyskane za pomocą panelu – na osi y. Dla markera CA125 i wszystkich 16 próbek surowicy wykres Pearsona przedstawiono na Rysunku 52, dla markera HE4 – na Rysunku 53, dla markera CEA – na Rysunku 54, dla markera IL 6 – na Rysunku 55 oraz dla aromatazy – na Rysunku 56.



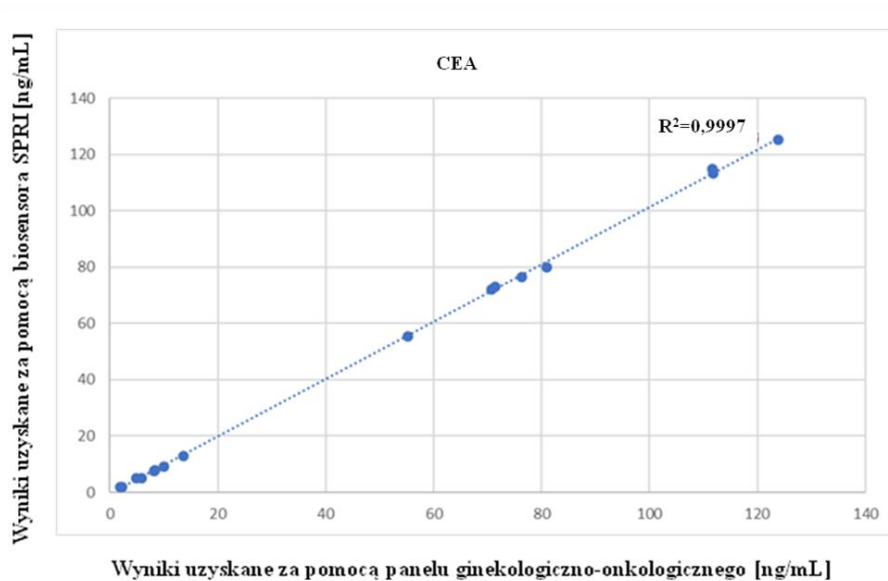
Wyniki uzyskane za pomocą panelu ginekologiczno-onkologicznego [$\mu\text{g/mL}$]

Rysunek 52. Porównanie wyników oznaczania markera CA 125 w próbkach surowicy uzyskanych za pomocą biosensora oraz panelu ginekologiczno-onkologicznego [$\mu\text{g/mL}$].

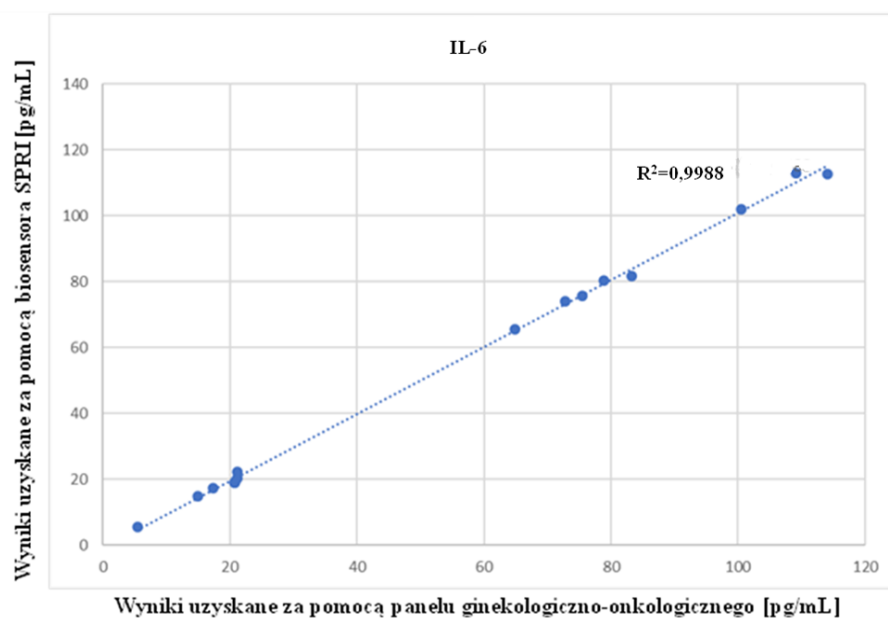


Wyniki uzyskane za pomocą panelu ginekologiczno-onkologicznego [ng/mL]

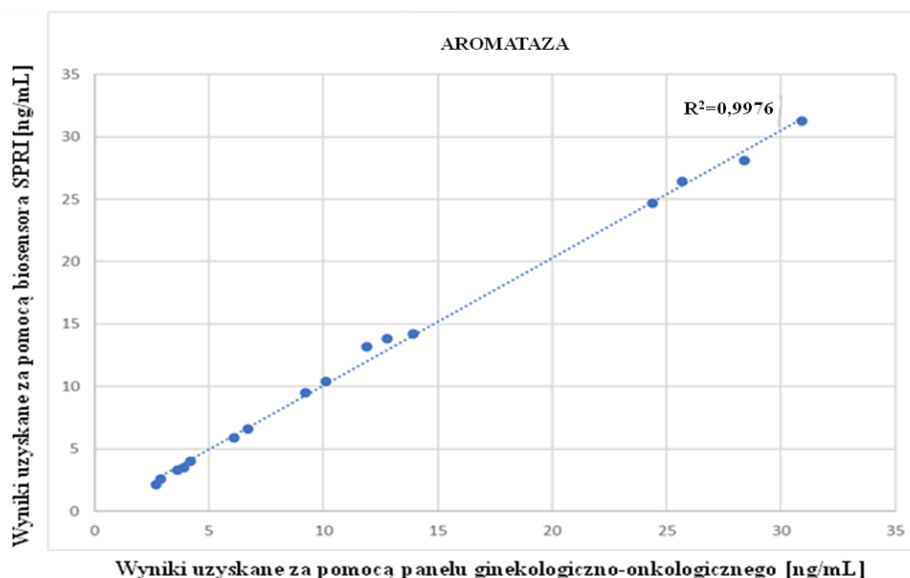
Rysunek 53. Porównanie wyników oznaczania markera HE 4 w próbkach surowicy uzyskanych za pomocą biosensora oraz panelu ginekologiczno-onkologicznego [ng/mL].



Rysunek 54. Porównanie wyników oznaczania markera CEA w próbkach surowicy uzyskanych za pomocą biosensora oraz panelu ginekologiczno-onkologicznego [ng/mL].



Rysunek 55. Porównanie wyników oznaczania markera IL 6 w próbkach surowicy uzyskanych za pomocą biosensora oraz panelu ginekologiczno-onkologicznego [pg/mL].



Rysunek 56. Porównanie wyników oznaczania markera aromatazy w próbkach surowicy uzyskanych za pomocą biosensora oraz panelu ginekologiczno-onkologicznego [ng/mL].

We wszystkich przypadkach zależności i wysokie współczynniki Pearsona wskazują na dobrą zgodność wyników uzyskanych z zastosowaniem panelu ginekologiczno-onkologicznego oraz odpowiedniego markera. Zatem panel, podobnie jak opracowane pięć biosensorów rozszerza zestaw dostępnych narzędzi diagnostycznych.

Większość badań związanych z opracowaniem biosensorów oraz panelu ginekologiczno-onkologicznego wykonano z zastosowaniem standardowego aparatu SPRI. W celu potencjalnego wdrożenia opracowanych biosensorów został opracowany prototyp aparatu SPR Imaging o bardziej zwartej budowie. Jednym z wątków tej pracy było zbadanie czy opracowane biosensory będą mogły być stosowane z zastosowaniem tego rozwiązania aparaturowego. Badania porównawcze wykonano na przykładzie biosensora do oznaczania markera CA 125 z króliczym poliklonalnym przeciwciałem specyficznym na marker CA125. Badania te prowadzą do wniosku, że biosensor do oznaczania CA125 uzyskuje podobne analityczne charakterystyki na obu aparatach. Zakres liniowej odpowiedzi na standardowym aparacie obejmuje wartości od 0,8 (LOQ) do 150 $\mu\text{g/mL}$ a na prototypie aparatu komercyjnego od 1,0 (LOQ) do 150 $\mu\text{g/mL}$. Sygnał analityczny uzyskany na prototypie aparatu komercyjnego jest około 20% wyższy (Rysunek 24). Wartości precyzji, odzysków, LOD oraz LOQ wyznaczone na obu aparatach mają porównywalne wartości (Tablice 2 i 3). Zatem opracowane biosensory mogą być stosowane zarówno z standardowym aparatem jak i z prototypem aparatu komercyjnego.

VI. Wnioski

1. Opracowano pięć nowych biosensorów przeznaczonych do oznaczania markerów CA125, HE4, CEA, IL-6 (dwa różne biosensory) oraz panel ginekologiczno-onkologiczny umożliwiający jednoczesne oznaczanie CA125, HE4, CEA, IL-6 i aromatazy.
2. Na przykładzie markera CA125 wykazano, że opracowane biosensory działają współpracując zarówno z standardowym aparatem SPRI jak i z prototypem aparatu SPRI.
3. Na przykładzie markera IL-6 wykazano, że biosensor mający przeciwciało w warstwie receptorowej wykazuje podobne charakterystyki analityczne jak biosensor posiadający inhibitor jako receptor.
4. W zoptymalizowanych warunkach krzywe kalibracyjne wszystkich opracowanych biosensorów posiadają liniowe segmenty w początkowych przebiegach krzywych. W przypadku biosensora na marker IL-6 zakres ten obejmuje 1-20 pg/mL, w przypadku markera HE 4 – 100-5000 pg/mL, dla markera CEA – zakres 0,5–20 ng/mL oraz dla markera CA125 – zakres 1-150 µg/mL. Tak różne zakresy stężeń markerów obejmują jednak zakresy stężeń odpowiednie do oznaczania określonego markera w surowicy krwi zarówno zdrowych osób jak i pacjentów, po odpowiednim rozcieńczeniu.
5. Wyznaczono analityczne charakterystyki opracowanych biosensorów (oraz panelu ginekologiczno-onkologicznego) obejmujące precyzję, odzysk, limity detekcji oraz oznaczalności. Charakterystyki te mieszczą się w akceptowalnych granicach i są typowe dla tego typu oznaczeń.
6. Dokonano walidacji opracowanych biosensorów przez równoległe oznaczenia markerów z zastosowaniem opracowanego biosensora oraz stosując metodę stosowaną rutynowo do tego celu w laboratoriach diagnostycznych. Biosensor do oznaczania markera CA125 został zwalidowany na próbkach surowicy od pacjentek z rakiem jajnika oraz torbieli endometrialnej stosując Architect CA 125 jako test rutynowy. Na takich samych próbkach został zwalidowany biosensor do oznaczania markera HE4 przy zastosowaniu rutynowego testu Elecsys HE4

wykonanego na aparacie COBAS E-411. Surowica pacjentów z rakiem jelita grubego posłużyła do walidacji biomarkerów do oznaczania markerów HE4, CEA oraz IL-6 przy zastosowaniu testów Elecsys HE 4, Elecsys CEA oraz Elecsys IL-6. We wszystkich przypadkach zgodność wyników była akceptowalna.

7. Wykazano użyteczność diagnostyczną panelu ginekologiczno-onkologicznego dokonując oznaczania serii próbek surowicy pacjentek z rakiem jajnika a dla porównania serii próbek surowicy pacjentek z torbielą endometrialną oraz zdrowych osobników. Wykazano, że wyniki uzyskane z zastosowaniem panelu są bardzo zbliżone do wyników uzyskanych z zastosowaniem odpowiednich biosensorów stosowanych oddzielnie.

VII. Streszczenie

Celem badań przedstawionych w poniższej rozprawie doktorskiej było skonstruowanie nowego panelu analitycznego jako instrumentu do oznaczeń wybranych biomarkerów w płynach ustrojowych człowieka (surowicy/osoczu krwi) z wykorzystaniem techniki Powierzchniowego Rezonansu Plazmonów w wersji Imaging (SPRI) jako metody detekcji. Konstrukcja i analityczne opracowaniu biosensorów na poszczególne biomarkery pozwoliło na użycie ich w jednym panelu (wraz z kalibracją) do jednoczesnego oznaczania pięciu markerów w próbkach pochodzących od poszczególnych pacjentów.

Metodą detekcji sygnału analitycznego pochodzącego od konstruowanych biosensorów jaką wykorzystano w badaniach jest Powierzchniowy Rezonans Plazmonów w wersji Imaging (SPRI).

Skonstruowano i analitycznie opracowano 4 biosensory w oparciu o interakcje określonych białek (CA-125, HE4, IL-6 i CEA) z odpowiednimi przeciwciałami jako receptorami. Dla interleukiny 6 opracowano także biosensor wykorzystując interakcje inhibitora z badanym białkiem. W celu szerszej diagnostyki badanych próbek w składzie testu analitycznego uwzględniono również aromatazę, której biosensor został już wcześniej skonstruowany. Dla markera CA-125 wykonano równoległe konstrukcję i analityczne opracowanie biosensora na aparacie SPRI i jego prototypie.

Oznaczono badane markery w próbkach biologicznych (rak jajnika, torbiel endometrialna, rak jelita grubego) z wykorzystaniem pojedynczych biosensorów jak i nowo stworzonego panelu ginekologiczno-onkologicznego porównując uzyskane wyniki z próbą kontrolną (zdrowi dawcy). Wykonano także oznaczenia badanych markerów nowotworowych w standardowych laboratoriach diagnostycznych.

Streszczenie (język angielski)

The aim of the research presented in the doctoral dissertation below was to construct a new analytical panel as an instrument for the determination of selected biomarkers in human body fluids, mainly serum / blood plasma, using the Imaging Surface Plasmon Resonance (SPRI) technique as a detection method. The construction and analytical development of biosensors for individual biomarkers made it possible to use them in one panel (with calibration) for the simultaneous determination of five markers in samples from individual patients.

The method of detecting the analytical signal from the constructed biosensors used in the research is Surface Plasmon Resonance Imaging (SPRI). Four biosensors were constructed and analytically developed based on the interactions of specific proteins (CA-125, HE4, IL-6 and CEA) with the relevant antibodies as receptors. For interleukin 6, a biosensor was also developed using the inhibitor's interactions with the studied protein. In order to broaden the diagnostics of the tested samples, the composition of the analytical test also included aromatase, the biosensor of which had already been constructed. The construction and analytical development of a biosensor on the SPRI apparatus and its prototype were carried out in parallel for the CA-125 marker.

The investigated markers were determined in biological samples (ovarian cancer, endometrial cyst, colorectal cancer) using single biosensors and a newly created gynecological and oncological panel, comparing the obtained results with the control sample (healthy donors). Moreover, the investigated tumor markers were determined in standard diagnostic laboratories.

VIII. Literatura

- [1]. G. Steiner, "Surface plasmon resonance imaging.", *Anal. Bioanal. Chem.* 2004, 379, 328–331.
- [2]. J. Homola., S.S.Yee., G.Gauglitz, "Surface plasmon resonance sensors: review", *Sensors and Actuators*, 1999, 3-15.
- [3]. R.B.M Schasfoort., A.J Tudos., „ Handbook of Surface Plasmon Resonance”, University of Twente, Enschede, The Netherlands, 2008, The Royal Society of Chemistry.
- [4]. N.V.Q. Huy, V.V. Khoa, L.M. Tam, T.Q. Vinh, N.S. Tung, C.N. Thanh, L. Chuang, "Standard and optimal cut-off values of serum ca-125, HE4 and ROMA in preoperative prediction of ovarian cancer in Vietnam", *Gynecol. Oncol.Rep*, 2018, 110-114.
- [5]. B.W.T. Yin, K.O. Lloyd, "Molecular Cloning of the CA125 Ovarian Cancer Antigen. Identification as a new mucin, MUC16", *J.Biol.Chem.*,2001, 27371–27375.
- [6]. B.H. Perez, I.K. Gipson, "Focus on Molecules: Human mucin MUC16", *Exper. Eye Res.* 2008, 400-401.
- [7]. H. Bouanene, A. Miled, "Conflicting views on the molecular structure of the cancer antigen CA125/MUC16", *Disease Markers*, 2010, 385–394.
- [8]. R.C. Bast Jr., M. Feeney, H. Lazarus, L.M. Nadler, R.B. Colvin, R.C. Knapp, "Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma", *J. Clin. Investig.* 1981, 1331–1337.
- [9]. N.Scholler, N Urban, "CA125 in Ovarian Cancer", *Biomark. Med.* 2007; 1(4): 513–523.
- [10]. Protein data bank (<http://www.rcsb.org/>)
- [11]. F. Chen, J. Shen, P. Cai, Y. Huang, "Clinical analysis of four serum tumor markers in 458 patients with ovarian tumors: diagnostic value of the combined use of HE4, CA125, CA19-9, and CEA in ovarian tumors", *Cancer Manag. Res.*, 2018, 1313–1318.
- [12]. J. Li, X.Wang, W. Qu, J. Wang, S.-W. Jiang, "Comparison of serum human epididymis protein 4 and CA125 on endometrial cancer detection: A meta-analysis", *Clinica Chim. Acta*, 2019, 215-220.
- [13]. X. Zheng, S. Chen, L. Li, X. Liu, X. Liu, S. Dai, P. Zhang, H. Lu, Z. Lin, Y. Yu, G. Li, "Evaluation of HE4 and TTR for diagnosis of ovarian cancer: Comparison with CA-125", *J. Gynecol. Obstet. Hum. Reprod.* 2018, 227–230.
- [14]. A. Cymbaluk-Płoska, A. Chudecka-Głaz, E. Pius-Sadowska, B. Machaliński, J. Menkiszak, A. Sompolska-Rzechuła, "Suitability assessment of baseline concentration of

MMP3, TIMP3, HE4 and CA125 in the serum of patients with ovarian cancer”, *J.Ovarian Res.* 2018, 1-9.

[15]. R.G Moore, A.K Brown, M.C Miller, et al. “The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass.”, *Gynecologic Oncology*, 2008, 108, 402–8.

[16]. N. Chhikara, M. Saraswat, T. Sharmistha Dey, S. Singh, S. Yadav, “Human Epididymis Protein-4 (HE-4): A Novel Cross-Class Protease Inhibitor”, *PLoS One*. 2012; 7(11), 1-12.

[17]. J.M Escudero, J.M Auge, X Filella, A Torne, J Pahisa, R Molina. “Comparison of serum human epididymis protein 4 with cancer antigen 125 as a tumor marker in patients with malignant and nonmalignant diseases.”, *Clinical Chemistry*, 2011,57, 1534–44.

[18]. M Lenhard, P Stieber, L Hertlein, et al. “The diagnostic accuracy of two human epididymis protein 4 (HE4) testing systems in combination with CA125 in the differential diagnosis of ovarian masses.”, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2011,49, 2081–8.

[19]. L Hertlein, P Stieber, A Kirschenhofer, et al. “Human epididymis protein 4 (HE4) in benign and malignant diseases.”, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2012, 50, 2181–8.

[20]. Jr R.C Bast, F.J Xu, Y.H Yu, S Barnhill, Z Zhang, G.B Mills. “CA125: the past and the future.”, *Int. J. Biol. Markers*, 1998, 13, 179–87.

[21]. J. Wu, Z. Fu, F. Yan, H. Ju, “Biomedical and clinical applications of immunoassays and immunosensors for tumor markers.”, *Trends Anal. Chem.*, 2007, 26, 679-688 .

[22]. N. Abdalla, R. Piorowski, M. Bachanek, P. Stanirowski, K. Cendrowski, W. Sawicki, “Does the Risk of Ovarian Malignancy Algorithm provide better diagnostic performance than HE4 and CA125 in the presurgical differentiation of adnexal tumors in Polish women?”, *Disease Markers*, 2018, 5289804, 1-12.

[23]. M. Lycke, B. Kristjansdottir, K. Sundfeldt, “A multicenter clinical trial validating the performance of HE4, CA125, risk of ovarian malignancy algorithm and risk of malignancy index”, *Gynecol. Oncol.* 2018, 159–165.

[24]. P. Thomas, C.A. Toth, K.S. Saini, J.M. Jessup, G. Steele Jr., “The structure, metabolism and function of the carcinoembryonic antigen gene family.” *Biochim. Biophys. Acta.* 1990, 1032, 177–189.

[25]. S. Hammarström, “The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues.” *Semin. Cancer Biol.* 1999, 67-81.

- [26]. M.J. Duffy., “Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful?”, *Clin. Chem.* 2001, 624–630.
- [27]. J. A. Thompson, F. Grunert, W. Zimmermann, “Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives.”, *J. Clin. Lab. Anal.* 1991, 344–366.
- [28]. J. Nan, J. Li, X. Li, G. Guo, X. Wen, Y. Tian, “Preoperative Serum Carcinoembryonic Antigen as a Marker for Predicting the Outcome of Three Cancers.”, *Biomarkers in Cancer*, 2017, 1–7.
- [29]. F. Canizares, J. Sola, M. Perez, et al., “Preoperative values of CA 15-3 and CEA as prognostic factors in breast cancer: a multivariate analysis.”, *Tumour Biol.* 2001, 273–281.
- [30]. G. Reynoso, T.M Chu, D. Holyoke, et al., “Carcinoembryonic antigen in patients with different cancers.”, *JAMA.* 1972, 361–365.
- [31]. Y. Xie, X. Zhi, H. Su, et al., “A novel electrochemical microfluidic chip combined with multiple biomarkers for early diagnosis of gastric cancer.”, *Nanoscale Res. Lett.* 2015, 477.
- [32]. J. Y. Wang,. Y. Cao,. G. Xu. Li, “Colorimetric multiplexed immunoassay for sequential detection of tumor markers.”, *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 532–536.
- [33]. C.X. Shen, L.H. Hu, L. Xia, R. Li, “Quantitative Real-time RT–PCR Detection for Survivin, CK20 and CEA in Peripheral Blood of Colorectal Cancer Patients.”, *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 2008, 770–776.
- [34]. W. Limbut , P. Kanatharana , B. Mattiasson , P. Asawatreratanakul, P. Thavarungkul, “A reusable capacitive immunosensor for carcinoembryonic antigen (CEA) detection using thiourea modified gold electrode.”, *Anal. Chim. Acta.* , 2006, 55–61.
- [35]. H. Chon, S. Lee, S. W. Son, C. H. Oh, J. Choo, “Highly Sensitive Immunoassay of Lung Cancer Marker Carcinoembryonic Antigen Using Surface-Enhanced Raman Scattering of Hollow Gold Nanospheres.”, *Anal. Chem.* 2009, 81, 3029–3034.
- [36]. J. Wu, Z. Fu, F. Yan, H. Ju, “Biomedical and clinical applications of immunoassays and immunosensors for tumor markers.”, *Trends Anal. Chem.* 2007, 26(7), 679–688.
- [37]. J.F Bazan., “Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily.”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990, 94, 6934–8.
- [38]. M. Łukaszewicz., B. Mroczko., M. Szmitowski, „Znaczenie kliniczne interleukiny 6 (IL6) jako czynnika rokowniczego w chorobie nowotworowej.”, *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2007, 95, 247–251.
- [39]. M. Jakóbsiak, „*Immunologia.*”, Wyd Nauk PWN 1995, 280–284.

- [40]. J. Breton, A. la Fiura, F. Bertolero, G. Orsini, B. Valsasina et al, "Structure, stability and biological properties of a N-terminally truncated form of recombinant human interleukin-6 containing a single disulfide bond.", *Eur. J. Biochem.* 1995, 573-581.
- [41]. W. Shulin, Y. Jianheng, "Expression of aromatase in tumor related stroma is associated with human bladder cancer progression", *Cancer biology & therapy*, 2018, 19(3), 175–180.
- [42]. D.P Nguyen, P. O'Malley, A. Bashir, A. Hussein, M. Awamlh, P. Furrer, et al, „Association of Aromatase With Bladder Cancer Stage and Long-Term Survival: New Insights Into the Hormonal Paradigm in Bladder Cancer”, *Clin. Genitourin. Cancer*, 2017, 15(2), 256-262.
- [43]. S. Carreau, S. Lambard, C. Delalande, I. Denis-Galeraud, B. Bilinska, S. Bourguiba, „Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review”, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2003, 35, 1-6.
- [44]. S.U. Miedlich, N. Karamooz, S.R. Hammes, „Aromatase deficiency in a male patient - Case report and review of the literature”, *Bone*, 2006, 93, 181-186
- [45]. W.R Miller., „Aromatase inhibitors: mechanism of action and role in the treatment of breast cancer.”, *Semin. Oncol*, 2003, 30(14), 3-11
- [46]. C.T. Chung, R.W. Carlson „The role of aromatase inhibitors in early breast cancer.”, *Curr. Treat. Options Oncol.*, 2003, 4(2), 133-40.
- [47]. L.S. Noble, K. Takayama, et al, "Prostaglandin E2 Stimulates Aromatase Expression in Endometriosis-Derived Stromal Cells", *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997, 82(2), 600–606.
- [48]. J.D. Brooks, L.U. Thompson, "Mammalian lignans and genistein decrease the activities of aromatase and 17 α -hydroxysteroid dehydrogenase in MCF-7 cells.", *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*, 2005, 94(5), 461–467.
- [49]. N.W Jacobsen, B. Halling-Sørensen, F.K. Birkved., "Inhibition of human aromatase complex (CYP19) by antiepileptic drugs.", *Toxicol In Vitro.* 2008, 22(1), 146-53.
- [50]. T. Price, J. Aithenp et al, "Determination of Aromatase Cytochrome P450 Messenger Ribonucleic Acid in Human Breast Tissue by Competitive Polymerase Chain Reaction Amplification"., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1992, 74(6), 1247-1253.

- [51]. J. Grodecka, J. Kobos, P. Arkuszewski, B. Zielińska-Każmierska, B. Manowska , „Ocena ekspresji lamininy w torbielach i nowotworach zębopochodnych”, *Czas. Stomatol.*, 2009, 62, 3, 169-177.
- [52]. R.M. Lequin “Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)”, *Clinical Chemistry*. 2005, 51(12), 2415-2418.
- [53]. G.Odrowąż–Sypniewska, T.Czerski, „Nowe metody diagnostyki molekularnej w badaniach epidemiologicznych.”, *Laboratorium – Przegląd ogólnopolski*, 2004, 6, 36-38.
- [54]. A.Dębińska-Kieć, J.Naskalski, „Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.”, Wrocław 2002, 59-106.
- [55]. L. Cinquanta, D. Ethel Fontana, N. Bizzaro, „Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection?”, *Autoimmun Highlights* 2017, 8,1-9.
- [56].<https://diagnostics.roche.com/global/en/products/params/electsys-he4-human-epididymal-protein-4.html>
- [57]. <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/params/electsys-il-6.html>
- [58]. A.Ruibal Morell, „CEA serum levels in nonneoplastic disease.”, *Int. J. Biol. Markers* 1992, 7(3), 160-166.
- [59]. I. Fukuda, M. Yamakado, H. Kiyose. „Influence of Smoking on Serum Carcinoembryonic Antigen Levels in Subjects Who Underwent Multiphasic Health Testing and Services.”, *J. Med. Syst.* 1998, 22, 89-93.
- [60]. M.Satoh, M.V Del Mercado., E.K Chan. Clinical interpretation of antinuclear antibody tests in systemic rheumatic diseases. *Mod. Rheumatol.* 2009, 19(3), 219–228.
- [61]. P.Kern, M.Kron, K.Hiesche, “Measurement of Antinuclear Antibodies: Assessment of Different Test Systems.”, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2000; 7(1), 72–78.
- [62]. H. Shariatifar, M.-S. Hakhamaneshi, M. Abolhasani, F. Haji, A., “Immunofluorescence labeling of the tumor marker CD20 with quantum dots for the rapid and quantitative detection of diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma”, *J. Cell Biochem*, 2019,120(3), 4564-4572.
- [63]. C.Chen, J.Peng et al, “Quantum dot immunofluorescence technology to quantify HER2 expression in breast cancer.”, 2009, 30(15), 2912-2918.
- [64] S.Rodriguez-Mozaz, M. J López de Alda., M.P Marco., D.Barcelo, „Biosensors for environmental monitoring. A global perspective.”, *Talanta*, 2005, 65(2), 291–297.

- [65]. I.E. Tothill, „Biosensors for cancer markers diagnosis.”, *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2009, 20(1), 55–62.
- [66]. R Monošík., M.Stred’anský, E Šturdík, „Application of Electrochemical Biosensors in Clinical Diagnosis.”, *J. Clin. Lab. Anal.* 2012, 26(1), 22–34.
- [67]. J.Katrlík, V.Mastihuba, I.Vostiar, J.Sefčovičová, V Stefuca., P.Gemeinar, “Amperometric biosensors based on two different enzyme systems and their use for glycerol determination in samples from biotechnological fermentation process.”, *Anal. Chim. Acta* 2006, 566(1), 11–18.
- [68]. M. Delvaux, S. Demoustier-Champagne, „Immobilisation of glucose oxidase within metallic nanotubes arrays for application to enzyme biosensors,”, *Biosensors and Bioelectronics* 2003, 18(7), 943-951.
- [69]. W.S Frieder, U.Wollenberger^a, A.Warsinke^a, F.Lisda, “Research and development in biosensors.”, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2001, 12(1), 35-40.
- [70]. J. Wang, “Microfabricated electrophoresis chip for bioassay of renal markers.”, *Anal. Chem.* 2003, 75(3), 525-529.
- [71]. A. Ramanavicius, “Amperometric biosensor for the determination of creatine.”, *Anal.Bioanal. Chem.* 2007, 387(5), 1899-1906.
- [72]. M. Singh, N. Verma, A.K Garg, N. Redhu, “Urea biosensors”., *Sensors and actuators. B Chemical.* 2008, 134(1), 345-351.
- [73]. J.Lin, H. Ju , “Electrochemical and chemiluminescent immunosensors for tumor markers, *Biosensors and Bioelectronics*”, 2005, 20(8), 1461–1470.
- [74]. G. Rocchitta , A. Spanu, S. Babudieri, G. Latte, at al, “Enzyme Biosensors for Biomedical Applications: Strategies for Safeguarding Analytical Performances in Biological Fluids”, *Sensors (Basel)*, 2016, 16(6), 780.
- [75] N. Backmann, C. Zahnd, F. Huber, A. Bietsch, A. Plückthun, H.P Lang et al, “A label-free immunosensor array using single-chain antibody fragments *PNAS*”, 2005, 102(41), 14587-14592.
- [76]. J. Wu, Z. Fu, F. Yan, H. Ju, “Biomedical and clinical applications of immunoassays and immunosensors for tumor markers”, *Trends Anal. Chem* , 2007, 26(7), 679-688.
- [77]. M Mascini, S Tombelli, „Biosensors for biomarkers in medical diagnostics. *Biomarkers*”., 2009, 13(7), 637-57.

- [78]. M.D.Schlenso, T.M.A.Gronewold, M.Tewes, M.Famulok, E.Quandt, "Love-wave biosensor using nucleic acids as ligands," *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2004, 101(3), 308-315
- [79]. J. Wang, „DNA biosensors based on Peptide Nucleic Acid (PNA) recognition layers. A review,”, *Biosensors and Bioelectronics*, 1998, 13 (7-8), 757-762.
- [80]. K.N. Naveen Avani, Nucleic acid aptamers and enzymes as sensors, *Current Opinion in Chemical Biology*, 2006, 10(3), 272-281.
- [81]. J.Radecki , H. Radecka., J.Cieśła B.Tudek, „Sensory chemiczne i biosensory w kontroli żywności zmodyfikowanej Genetycznie.” *Biotechnologia*, 2006, 3, 67–78.
- [82]. Mao Ch., A Liu., B Cao., *Virus-Based Chemical and Biological Sensing. Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2009, 48(37), 6790–6810.
- [83] A.E. Smartt, S:Ripp, “Bacteriophage reporter technology for sensing and detection microbial targets.” *Anal. Bioanal. Chem.* 2011,400,991-1007.
- [84] A. Touhami, “Biosensors and nanosensors: design and applications.”, *Physics & Astronomy Department, University of Texas at Brownsville*. 2014, 392-395
- [85] F. Potolsky, M Lieber, “Nanowire nanosensors.”, *Mater Today*, 2005, 8(4), 20-28.
- [86]. F. Arpacı, M. I.Yılmaz, A. Ozet, „Low Serum Leptin Level in Colon Cancer Patients without Significant Weight Loss.”, 2002, Mar 1, 147-149.
- [87] T. Erwin, Waas, Thijs Hendriks, M. L. M Roger. Lomme, T. Wobbes, „Plasma Levels of Matrix Metalloproteinase-2 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Correlate With Disease Stage and Survival in Colorectal Cancer Patients.” *Diseases of the Colon & Rectum* 2005, 48, 700–710.
- [88]. B. Szymańska , Z. Lukaszewski , K. Hermanowicz-Szamatowicz , E. Gorodkiewicz, „A biosensor for determination of the circulating biomarker CA125/MUC16 by Surface Plasmon Resonance Imaging.”, *Talanta*, 2020, 206, 120-187.
- [89]. F.G. Hanisch, G. Uhlenbruck, C. Dienst, M. Stottrop, „Ca 125 and Ca 19-9: two cancer-associated sialylsaccharide antigens on a mucus glycoprotein from human milk.” *Eur. J. Biochem.* 1985,149, 323-330.
- [90] R. Li, F. Feng, Z.Z. Chen, Y.F. Bai, F.F. Guo, F.Y. Wu, G. Zhou, “Sensitive detection of carcinoembryonic antigen using surface plasmon resonance biosensor with gold nanoparticles signal amplification.” *Talanta*, 2015,140, 143–149, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.03.041>.

- [91] M.L. Ermini, X. Chadov'a Song, T. Springer, J. Homola, "Peptide functionalization of gold nanoparticles for the detection of carcinoembryonic antigen in blood plasma via SPR-based biosensor." *Front. Chem.* 7 (2019) 40, <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00040>.
- [92] E. Gorodkiewicz, A. Sankiewicz, P. Laudański, "Surface plasmon resonance imaging biosensors for aromatase based on a potent inhibitor and a specific antibody: Sensor development and application for biological material." *Cent. Eur. J. Chem.*, 2014,12(5), 557-567.
- [93] T. Guszcz, B. Szymańska, R. Kozłowski, Z. Lukaszewski, P. Laskowski, E. Gorodkiewicz, "Plasma aromatase as a sensitive and selective potential biomarker of bladder cancer and its role in tumorigenesis.", *Oncology Letters*, 2020, 19, 562-568.
- [94] B.Szymańska, Z.Lukaszewski, K.Hermanowicz-Szamatowicz, E.Gorodkiewicz, "An immunosensor for the determination of carcinoembryonic antigen by Surface Plasmon Resonance Imaging.", *Anal. Biochem.*, 2020, 1139-64.

IX. Dorobek naukowy

Wykaz publikacji:

1. A. Sankiewicz, **B. Puzan**, E. Gorodkiewicz “Biosensors SPRI as a diagnostic tool in the future”, Chemik, 2014, **68**, 528-535.
2. A. Sankiewicz, L. Romanowicz, P. Laudański, B. Żelazowska- Rutkowska, **B. Puzan**, B. Cylwik, E. Gorodkiewicz „SPR imaging biosensor for determination of laminin-5 as a potential cancer marker in biological material”, Anal.Bioanal. Chem, 2016, **408**, 5269-5276. **IF=3.431**
3. A. Sankiewicz, Markowska A., Z. Łukaszewski, **B. Puzan**, E. Gorodkiewicz, „Methods for 20S Immunoproteasome and 20S Constitutive Proteasome Determination Based on SPRI Biosensors”, Cellular and Molecular Bioengineering, 2017, **10**, 174-185. **IF=2,535**
4. D. Toliczenko-Bernatowicz, E. Matuszczak, M. Tylicka, **B. Szymańska**, M. Komarowska, E. Gorodkiewicz, W. Debek, A. Hermanowicz “Overexpression of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1 (UCHL1) in boys with cryptorchidism”, Plos One, 2018, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191806>,. **IF=2,806**
5. **B. Szymańska**, E. Gorodkiewicz, ”Markery nowotworowe i wybrane metody ich oznaczeń. „, rozdział monografii, Wydawnictwo Naukowe Tygiel, 2018, 9-12.
6. T. Guszcz, **B. Szymańska**, R. Kozłowski, Z. Łukaszewski, P. Laskowski, E. Gorodkiewicz, „Plasma aromatase as a sensitive and selective potential bladder cancer biomarker and the enzyme role in tumorigenesis”, Oncology Letters, 2019, 562-568. **IF= 4,122**
7. M. Komarowska, E. Gorodkiewicz, E. Matuszczak, R. Milewski, W. Debek, **B. Szymańska**, A. Sankiewicz, L. Oldak,” Plasma level of laminin 5 and collagen IV in cryptorchidism.”, Advances in Medical Sciences, 2020, 176-181. **IF= 2,064**
8. **B. Szymańska**, Z. Łukaszewski, K. Hermanowicz-Szamatowicz, E. Gorodkiewicz, A biosensor for determination of the circulating biomarker CA125/MUC16 by Surface Plasmon Resonance Imaging., Talanta, 2020, 120-187. **IF= 5,339**

9. **Szymanska B.**, Łukaszewski Z., Hermanowicz-Szamatowicz K., Gorodkiewicz E., „An immunosensor for the determination of carcinoembryonic antigen by Surface Plasmon Resonance Imaging “Analytical Biochemistry, 2020, 1139-64. **IF= 2,219**

Uzyskane patenty:

1. Gorodkiewicz Ewa, **Szymańska Beata**, Łukaszewski Zenon, Bogdan Wyrwas” „Biosensor do specyficznego oznaczania stężenia białka CA 125.” Numer patentu: P.428062 z dnia 15.09.2020

Złożone wnioski patentowe:

1. Gorodkiewicz Ewa, **Szymańska Beata**, Łukaszewski Zenon, Bogdan Wyrwas” „Biosensor do oznaczania interleukiny 6 (IL-6) techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging.”Zgłoszenie oznaczono numerem:P.433106 z dnia 02.03.2020

2. Gorodkiewicz Ewa, **Szymańska Beata**, Łukaszewski Zenon, Bogdan Wyrwas, „Biosensor do oznaczania interleukiny 6 (IL-6) techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging Zgłoszenie oznaczono numerem:P.434504 z dnia 30.06.2020

3. Gorodkiewicz Ewa, **Szymańska Beata**, Łukaszewski Zenon, Bogdan Wyrwas „Biosensor do specyficznego oznaczania stężenia ludzkiego białka z komórek nabłonkowych najądrza 4 (HE 4)”. Zgłoszenie oznaczono numerem:P.432625 z dnia 23.01.2020

4. Gorodkiewicz Ewa, **Szymańska Beata**, Łukaszewski Zenon, Bogdan Wyrwas „Biosensor do specyficznego oznaczania stężenia ludzkiego antygenu rakowo-łożniowego CEA”. Zgłoszenie oznaczono numerem:P.432021 z dnia 21.04.2020

Konferencje naukowe:

1. „Oznaczanie ilościowe immunoproteasomu w próbkach naturalnych z wykorzystaniem biosensorów SPRI”, VII Ogólnopolska Konferencja Postępy w Badaniach Biomedycznych, , 10-11.12.2016 Warszawa.

2. „ Wykorzystanie biosensora SPRI do oznaczania immunoproteasomu jako potencjalnego markera nowotworowego” na IV Ogólnopolskiej Konferencji Studentów Medycyny Laboratoryjnej i Młodych Diagnostów „ Wschodząca Diagnostyka”, 8.04.2017

Białystok- **nagroda za najlepszą pracę (I miejsce w Interdyscyplinarnej Sesji Doktoranckiej)**

3. Wykorzystanie biosensorów SPRI do oznaczania kolagenu IV i lamininy-5 w próbkach pacjentów z wnątrostwem.” The International Conference of Natural and Medical Sciences: Young Scientists, PhD Students and Students. 1-3.12.2017 Lublin- współautor posteru

4. „Markery nowotworowe i wybrane metody ich oznaczeń.”, VIII Ogólnopolska Konferencja Postępy w Badaniach Biomedycznych. 16-17.12.2017 Warszawa-doniesienie ustne

5. „ Wykorzystanie biosensora SPRI do oznaczania białka UCHL-1 jako potencjalnego markera u pacjentów z wnątrostwem” na V Ogólnopolskiej Konferencji Studentów Medycyny Laboratoryjnej i Młodych Diagnostów „ Wschodząca Diagnostyka”. 14.04.2018 Białystok- doniesienie ustne - **nagroda za najlepszą pracę (III miejsce w Interdyscyplinarnej Sesji Doktoranckiej)**

6. „Aromatase as a potencial cancer marker in patients diagnosed with bladder cancer”, The International Conference of Analytical methods to study oxidative damage, antioxidants and drugs. Advanted analytical chemistry for life sciences. 24-26.05.2018 Białystok - poster

7. „Aromataza jako potencjalny biomarker u pacjentów z nowotworem pęcherza moczowego..”, IX Ogólnopolska Konferencja Postępy w Badaniach Biomedycznych. 1-2.12.2018 Warszawa-doniesienie ustne- **wyróżnienie w sesji Nowe Technologie Biomedyczne.**

8. „Biosensor do oznaczania krążącego biomarkera CA125 / MUC16 metodą Powierzchniowego Rezonansu Plazmonów w wersji Imaging.” na VI Ogólnopolskiej Konferencji Studentów Medycyny Laboratoryjnej i Młodych Diagnostów „ Wschodząca Diagnostyka”. 13.04.2019 Białystok- doniesienie ustne

9. „Biosensor do oznaczania antygenu karcinoembrionalnego (CEA) metodą Powierzchniowego Rezonansu Plazmonów w wersji Imaging..”,X Ogólnopolska Konferencja Postępy w Badaniach Biomedycznych., Warszawa, 30.11.2019- poster

X. Wykaz wzorów statystycznych

Odchylenie standardowe:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Granica oznaczalności:

$$LOQ = 10 \times S.D.$$

S.D.- odchylenie standardowe dla ślepej próby

Granica wykrywalności:

$$LOD = 3 \times S.D.$$

S.D.- odchylenie standardowe dla ślepej próby

Korelacja Pearsona:

$$r = \frac{n \sum_{i=1}^n x_i y_i - \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i}{\sqrt{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2} \sqrt{n \sum_{i=1}^n y_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n y_i \right)^2}}$$