

(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10) **PL 249333 B1**

(12)

## Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **440574**

(22) Data zgłoszenia: **2022.03.07**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.09.11 BUP 37/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2026.03.30 WUP 13/2026**

(51) MKP:

**C12Q 1/26** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

- (73) Uprawniony z patentu:  
**UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU,  
Białystok, PL  
UNIWERSYTET MEDYCZNY  
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO  
W POZNANIU, Poznań, PL**
- (72) Twórca(-y) wynalazku:  
**MATEUSZ MACIEJCZYK, Białystok, PL  
ANNA ZALEWSKA, Wasilków, PL  
KAROLINA GERRETH, Poznań, PL  
KATARZYNA HOJAN, Poznań, PL**
- (74) Pełnomocnik:  
**rzecz. pat. Dorota Rzążewska, Warszawa, PL**

(54) Tytuł:

**Zastosowanie ślinowej oksydazy ksantynowej jako biomarkera w diagnozowaniu, różnicowaniu i ocenie neuropsychologicznej *in vitro* pacjentów z udarem mózgu**

**PL 249333 B1**

## Opis wynalazku

Wynalazek dotyczy ślinowego biomarkera do nieinwazyjnego różnicowania chorych z udarem mózgu. Bardziej szczegółowo wynalazek dotyczy oksydazy ksantynowej do zastosowania w diagnozowaniu *in vitro* pacjentów z udarem mózgu i różnicowania *in vitro* pacjentów z udarem krwotocznym od pacjentów z udarem niedokrwiennym. Wynalazek dotyczy również oksydazy ksantynowej do zastosowania w ocenie neuropsychologicznej *in vitro* pacjentów, tj. do odróżniania chorych z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi od chorych z umiarkowanymi zaburzeniami poznawczymi.

Choroby naczyniowe mózgu są jedną z najczęstszych przyczyn zgonów i niepełnosprawności osób dorosłych na świecie. Pomimo znacznego postępu wiedzy w badaniach dotyczących patogenezы choroby, liczba chorych z udarem wciąż znacząco rośnie. Dlatego też, intensywnie poszukuje się laboratoryjnych biomarkerów udaru, które pozwoliłyby na szybką i nieinwazyjną diagnostykę. Chociaż rozpoznanie udaru opiera się na badaniu klinicznym i tomografii komputerowej, w ten sposób nie zawsze udaje się wykluczyć inne jednostki chorobowe naśladujące udar, takie jak krwiak podtwardówkowy lub nadtwardówkowy, guzy mózgu, uraz czaszkowo-mózgowy lub odcinka szyjnego kręgosłupa, zakażenia (zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie mózgu, ropień mózgu), napady drgawkowe, powikłania migreny i zaburzenia metaboliczne. Ponadto czułość TK w świeżo rozpoznanym udarze niedokrwiennym mózgu nie przekracza 30–35%, co przy braku powszechnej dostępności perfuzji MRI i TK wskazuje na konieczność poszukiwania nowych strategii diagnostycznych. Nie wszyscy pacjenci są także leczeni w specjalistycznych ośrodkach udarowych/neurologicznych. Nie dziwi więc, że wciąż nieustannie poszukuje się szybkich i nieinwazyjnych biomarkerów udaru.

W patogenezы udaru i jego powikłań naczyniowych kluczową rolę odgrywa lokalne zwiększenie aktywności mózgowego enzymu z klasy oksydoreduktaz – oksydazy ksantynowej (XO; EC 1.17.3.2). XO katalizuje reakcję przekształcenia hipoksantyny w ksantynę oraz ksantyny w kwas moczowy, co wykorzystywane jest do ilościowego oznaczania aktywności enzymu. W patogenezы udaru, szczególnie podczas niedokrwienia, zwiększa się zarówno wytwarzanie XO, jak i jej substratów w mózgu. Kiedy w okresie reperfuzji do mózgu zostaje dostarczony tlen, XO powoduje gwałtowne przekształcanie hipoksantyny do ksantyny. Dlatego też postulowano wykorzystanie XO w diagnostyce chorych z udarem. Choć w tkankach mózgowia zaobserwowano znaczący statystycznie wzrost aktywności XO u pacjentów z udarem (w porównaniu do osób zdrowych), zmian aktywności enzymu nie obserwowano już w rutynowo pobieranych płynach diagnostycznych, takich jak osocze, surowica czy mocz. W publikacji Aygul R., 2006 potwierdzono, że ocena aktywności XO nie ma przydatności diagnostycznej do rozpoznawania udaru mózgu.

U chorych z udarem dochodzi do uszkodzenia bariery krew-mózg, a tym samym uwalniania różnych mózgowych biocząsteczek do krwi. Z krążenia, z uwagi na bardzo dobre unaczynienie gruczołów ślinowych oraz bezpośrednią bliskość z tkankami mózgowia, różne biocząsteczki mogą przechodzić do śliny na drodze dyfuzji biernej, ułatwionej lub aktywnej, co wskazuje na zasadność wykorzystania śliny w diagnostyce medycznej. Wyniki ostatnich badań potwierdziły, że stężenie różnych biomarkerów mózgowia charakteryzuje dużo większy współczynnik korelacji ze śliną niż z krwią czy moczem, co czyni ślinę bardzo atrakcyjną w diagnostyce laboratoryjnej. O zaletach śliny świadczy również jej łatwa dostępność, nieinwazyjne i bezbolesne pobieranie oraz stosunkowo duża trwałość w porównaniu z krwią i płynem mózgowo-rdzeniowym.

W stanie techniki znane są sposoby diagnozowania chorób na podstawie badania poziomu markerów w próbkach biologicznych pobranych od pacjenta.

W publikacji Maciejczyk M. i wsp., 2021 opisano potencjalne zastosowanie czynnika martwicy nowotworu (TNF- $\alpha$ ) w ślinie, ocenianego metodą ELISA, do różnicowania osób zdrowych od chorych z udarem.

W publikacji Gerreth P. i wsp., 2020 opisano potencjalne wykorzystanie biomarkerów stresu oksydacyjnego (np. zredukowany glutation, końcowe produkty utleniania białek (AOPP), wodoronadtlenki lipidów (LOOH)) w ślinie niestymulowanej i stymulowanej ocenianych metodami ELISA, kolorymetrycznymi i fluorymetrycznymi do różnicowania osób zdrowych od chorych z udarem.

W publikacji Jabs C.M. i wsp., 1990 opisano sposób oceny poziomu adenozyiny, inozyiny i hipoksantyny/ksantyny w tkankach i w osoczu w oparciu o luminescencję. Podkreślono jednocześnie, że sposób może zostać dostosowany do oznaczania markerów w innych płynach ciała.

W patencie US7608406 ujawniono sposób diagnozowania udaru u osobnika, obejmujący kontaktowanie próbki krwi, surowicy lub osocza od pacjenta z przeciwciałem, które wiąże mieloperoksydazę

i odczytywanie sygnału wskazującego na obecność lub ilość peptydu związanego przez to przeciwciało. Skorelowanie wyniku testu z występowaniem lub brakiem udaru u osobnika, przy czym udar obejmuje udar niedokrwienny i udar krwotoczny. Sposób może obejmować jedno lub więcej dodatkowych oznaczeń dla jednego lub więcej markerów wybranych z szerokiej grupy. Wspomniany etap korelacji obejmuje korelację wyników przeprowadzonego(ych) testu(ów) i wyników tomografii komputerowej przeprowadzonej na osobniku w celu oceny wystąpienia udaru u osobnika. Oznaczenie podstawowe i dodatkowe przeprowadzane są na tej samej próbce otrzymanej od osobnika. Sposób i kompozycja opisane w patencie stanowią szybką, wrażliwą i specyficzną metodę oznaczania do zastosowania do diagnozy i różnicowania różnych postaci udaru i przemijających ataków niedokrwiennych.

W patencie EP 2185926 ujawniono sposób diagnozowania ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego lub udaru mózgu u pacjenta do badania w punkcie medycznym oparty na pomiarze stężenia metabolicznych produktów ubocznych aktywności oksydazy ksantynowej (XO) względem ksantyny i hipoksantyny, takich jak inozyna i hipoksantyna, w próbce biologicznej za pomocą luminescencji; oraz określenie czy pacjent doświadcza ostrego niedokrwienia serca lub udaru na podstawie pomiaru, przy czym w pierwszym etapie następuje dodanie XO do próbki biologicznej otrzymanej od pacjenta, a etap pomiaru obejmuje etap użycia środka chemiluminescencyjnego oraz wzmacniaczy sygnału w próbce biologicznej podczas pomiaru produktów pośrednich i nie ma konieczności oczyszczania próbki przed analizą.

Etapy pobrania, pomiaru i odczytu przeprowadza się w mniej niż 10 minut, korzystnie w 1 minutę lub mniej. Badanymi produktami pośrednimi reakcji są nadtlenek wodoru, anionorodniki ponadtlenkowe (SAR) i wolne rodniki tlenowe. Jeśli pomiar we względnych jednostkach luminescencji odpowiada zmierzonej wartości 4,6  $\mu\text{M}$  lub więcej inozyny, hipoksantyny lub ksantyny w próbce biologicznej, wtedy wynik oznacza, że pacjent doświadczył ostrego niedotlenienia serca lub udaru. Kiedy poziom produktu ubocznego w próbce od pacjenta przekracza 95% lub więcej progu przedziału ufności w porównaniu z normalnymi kontrolami stanowi to pozytywny wskaźnik ostrego niedokrwienia serca.

W ujawnionym w EP 2185926 sposobie etap pomiaru obejmuje zastosowanie substratu z którym związany jest enzym XO, korzystnie substrat jest wybrany spośród testu paskowego lub złoża. Sposób obejmuje ponadto etap zmniejszania przeciwutleniającego działania kwasu moczowego (UA) w próbce biologicznej zwiększający czułość podczas pomiaru. Ponadto sposób obejmuje etap rozcieńczenia próbki biologicznej przed etapem pomiaru, korzystnie rozcieńczalnikiem buforującym pH próbki do pH 7,2–7,8. Ponadto sposób obejmuje dodanie fosforylasy nukleozydów purynowych (PNP) przed etapem dodania XO. Próbką biologiczną według sposobu może być płyn biologiczny wybrany spośród krwi, osocza, śliny, płynu mózgowo-rdzeniowego, moczu.

Celem niniejszego wynalazku jest zastosowanie oceny aktywności ślinowej oksydazy ksantynowej (XO) do rozpoznawania udaru mózgu między osobami zdrowymi i osobami z udarem, jak również do określania rodzaju udaru (krwotoczny lub niedokrwienny). Wykazano, że ocena aktywności specyficznej ślinowej XO (aktywność XO w ślinie/zawartość białka w ślinie) z bardzo dużą specyficznością i dokładnością odróżnia chorych z udarem niedokrwiennym od chorych z udarem krwotocznym oraz osób zdrowych, przez co biomarker ten może znaleźć zastosowanie w nieinwazyjnej diagnostyce różnicowej udaru mózgu. Ślinowa XO odróżnia także chorych z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi od chorych z umiarkowanymi zaburzeniami poznawczymi, przez co może być potencjalnym narzędziem przesiewowym używanym do kompleksowej oceny neuropsychologicznej u pacjentów z udarem mózgu.

W stanie techniki brak jest danych na temat możliwości wykorzystania XO w diagnostyce udaru mózgu, w tym zastosowania śliny do oceny aktywności XO. Jest to pierwsze doniesienie wskazujące na możliwość zastosowania ślinowej XO w diagnostyce różnicowej chorych z udarem. Dotychczas ujawniono jedynie sposób diagnozowania ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego lub udaru mózgu oparty na pomiarze stężenia inozyny i hipoksantyny w osoczu, czyli metabolicznych produktów ubocznych aktywności oksydazy ksantynowej (XO), po dodaniu do próbki biologicznej pobranej od pacjenta określonej ilości enzymu XO (patent EP 2185926).

W przedmiotowym rozwiązaniu wskazano na zastosowanie oceny aktywności specyficznej XO w ślinie (aktywność enzymu w przeliczeniu na zawartość ślinowego białka) za pomocą metody fluorymetrycznej do diagnozowania rodzaju udaru mózgu (krwotoczny i niedokrwienny) oraz oceny funkcji poznawczych u pacjentów z udarem. Po pobraniu śliny od pacjenta w punkcie medycznym lub w warunkach domowych próbka ulega odwirowaniu, a uzyskany płyn nadosadowy (supernatant) używany jest do oceny aktywności XO. Aktywność XO oceniana jest za pomocą szybkiej i powtarzalnej metody fluorymetrycznej, która wymaga bardzo niewielkiej objętości materiału badanego (50  $\mu\text{l}$  próby). W pierwszym etapie oznaczenia do próby dodawana jest ksantyna/hipoksantyna. XO obecna w ślinie katalizuje

utlenianie ksantyny/hipoksantyny do rodnika ponadtlenkowego i kwasu moczowego (UA). Rodnik ponadtlenkowy jest następnie zredukowany do nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ), który reaguje 1:1 z odczynnikiem Amplex Red. Następnie zachodzi reakcja z peroksydazą chrzanową i powstaje czerwony fluorescencyjny związek rezorufina, którego fluorescencja jest proporcjonalna do aktywności XO w oznaczanej próbce. Niniejsza metoda charakteryzuje się łatwością i nieinwazyjnością pobierania materiału badawczego, jak również prostotą i szybkością analizy techniką fluorymetryczną, która mogłaby być wykonana w rutynowym laboratorium diagnostycznym.

Biomarker opisany w wynalazku spełnia wszystkie kryteria dla biomarkera udaru mózgu: mierzony jest standaryzowanymi, zwalidowanymi i powszechnie dostępnymi metodami, jest łatwy do interpretacji oraz obdarzony odpowiednią czułością i swoistością. Może znaleźć zastosowanie w nieinwazyjnej diagnostyce udaru różnicując zarówno osoby zdrowe od chorych, jak również pacjentów z udarem niedokrwiennym od chorych z udarem krwotocznym. Należy zauważyć, że pobieranie śliny jako materiału diagnostycznego wiąże się z niskim kosztem, jest nieinwazyjne oraz bezbolesne.

Ślina może być pobierana w warunkach domowych, bez udziału specjalistycznego personelu medycznego, a transport takiego materiału nie wymaga specjalnej procedury. Ślina jest także materiałem niezakaźnym, w odróżnieniu od powszechnie stosowanej w diagnostyce medycznej krwi. Ponadto, związki oznaczane w ślinie charakteryzują się zwykle większą trwałością niż te obecne we krwi czy płynie mózgowodzeniowym. Proponowany wynalazek wyróżnia więc nie tylko nieinwazyjność pobierania materiału do badania, ale także prostota wykonania oznaczeń oraz niska cena analizy. Ponadto, ślinowy XO różnicuje chorych z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi od chorych z umiarkowanymi zaburzeniami poznawczymi, przez co może być również potencjalnym narzędziem przesiewowym używanym do kompleksowej oceny neuropsychologicznej u pacjentów z udarem mózgu.

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie ślinowej oksydazy ksantynowej jako biomarkera w diagnozowaniu *in vitro* pacjentów z udarem mózgu.

Korzystnie aktywność oksydazy ksantynowej mierzy się metodą fluorymetryczną.

Korzystnie objętość śliny wynosi co najmniej 50  $\mu$ l.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie ślinowej oksydazy ksantynowej jako biomarkera w różnicowaniu *in vitro* pacjentów z udarem mózgu, znamienne tym że aktywność od 46 nU/mg do 60 nU/mg oznacza udar krwotoczny a aktywność od 60 nU/mg oznacza udar niedokrwienny.

Jeszcze kolejnym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie ślinowej oksydazy ksantynowej jako biomarkera w ocenie neuropsychologicznej *in vitro* pacjentów z udarem mózgu, znamienne tym, że aktywność od 51 nU/mg do 62 nU/mg oznacza łagodne zaburzenia poznawcze, a aktywność od 62 nU/mg oznacza umiarkowane zaburzenia poznawcze.

Przedmiot wynalazku został przedstawiony w przykładach wykonania na rysunku, na którym:

Fig. 1 przedstawia aktywność specyficzną oksydazy ksantynowej (XO; nU/mg białka całkowitego) w ślinie u osób zdrowych (grupa kontrolna, n = 30), chorych z udarem krwotocznym (n = 15) i chorych z udarem niedokrwiennym (n = 15). \*\*—p < 0,01; \*\*\*—p < 0,001; \*\*\*\*—p < 0,0001.

Fig. 2 przedstawia krzywe przydatności diagnostycznej ROC dla aktywności specyficjnej oksydazy ksantynowej (XO; nU/mg białka całkowitego) w ślinie różnicujące chorych z udarem krwotocznym vs. grupa kontrolna, chorych z udarem niedokrwiennym vs. grupa kontrolna oraz chorych z udarem krwotocznym vs. chorych z udarem niedokrwiennym.

Fig. 3 przedstawia korelację aktywności specyficjnej oksydazy ksantynowej (XO; nU/mg białka całkowitego) w ślinie z funkcjami poznawczymi w teście ACE III.

Fig. 4 przedstawia aktywność specyficzną oksydazy ksantynowej (XO; nU/mg białka całkowitego) w ślinie chorych z udarem i normalnymi funkcjami poznawczymi, chorych z udarem i łagodnymi zaburzeniami poznawczymi oraz chorych z udarem i umiarkowanymi zaburzeniami poznawczymi, ns—nieistotne statystycznie; \*\*\*\*—p < 0.0001.

Fig. 5 przedstawia krzywe przydatności diagnostycznej ROC dla aktywności specyficjnej oksydazy ksantynowej (XO; nU/mg białka całkowitego) w ślinie różnicujące chorych z udarem i normalnymi funkcjami poznawczymi, chorych z udarem i łagodnymi zaburzeniami poznawczymi oraz chorych z udarem i umiarkowanymi zaburzeniami poznawczymi.

Wynalazek został przedstawiony w poniższych przykładach wykonania, które nie mają charakteru ograniczającego.

#### **Przykład wykonania 1**

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (uchwały 59/19 i 890/19). Do badań zakwalifikowano 30 chorych

z udarem mózgu podzielonych na 2 podgrupy w zależności od typu udaru: 15 pacjentów z udarem niedokrwinnym oraz 15 pacjentów z udarem krwotocznym. Grupę kontrolną stanowiło 30 osób ogólnie zdrowych dobranych do grupy badanej pod względem wieku, płci, stanu przyzębia, uzębienia i higieny jamy ustnej.

Stan poznawczy i funkcjonalny chorych mierzono za pomocą następujących skal:

- Addenbrooke's Cognitive Examination III (ACE III) do różnicowania pacjentów z zaburzeniami i bez zaburzeń poznawczych. ACE III ocenia uwagę i orientację, pamięć, płynność słowną, funkcje językowe i wzrokowo-przestrzenne;
- Indeks Barthel (BI) do pomiaru codziennego funkcjonowania jednostki, szczególnie w zakresie czynności życia codziennego (ADL);
- Skala Równowagi Berga (BBS) dla określenia zdolności lub niezdolności pacjenta do bezpiecznego utrzymywania równowagi podczas wykonywania serii określonych zadań;
- Miara niezależności funkcjonalnej (FIM) do badania społecznego, psychologicznego i fizycznego funkcjonowania osoby.

Badanie jamy ustnej i pobranie śliny zostały przeprowadzone między 30 a 35 dniem od wystąpienia udaru mózgu.

Po pobraniu śliny przeprowadzone zostało badanie stomatologiczne. Badanie wykonano w sztucznym oświetleniu lampy czołowej przy użyciu lusterka i zgłębnika dentystycznego, zgodnie z kryteriami Światowej Organizacji Zdrowia (WHO 5th edition). Stan uzębienia oceniono za pomocą wskaźnika PUW według Szpringer-Nodzak, 1999, który jest sumą zębów z aktywną próchnicą pierwotną lub wtórną (P) oraz próchnicą przebytą, gdy zęby zostały usunięte z powodu próchnicy (U) bądź wypełnione (W). Stan dziąseł określony został z zastosowaniem wskaźnika dziąseł (GI – Gingival Index) według Löe i Silness, 1963, który określano przy zębach nr 16, 12, 24, 36, 32, 44, według następującej skali: 0 – dziąsło zdrowe (kolor dziąsła bladoróżowy); 1 – łagodne zapalenie – lekka zmiana w zabarwieniu dziąsła, lekki obrzęk, brak krwawienia przy zgłębnikowaniu; 2 – umiarkowane zapalenie – zaczerwienienie, obrzęk i połysk dziąsła, krwawienie przy zgłębnikowaniu; 3 – ciężkie zapalenie – znaczne zaczerwienienie i obrzęk dziąsła, owrzodzenie, skłonność do samoistnego krwawienia. Do oceny higieny jamy ustnej zastosowany został wskaźnik płytki bakteryjnej (PII – Plaque Index) według Silness i Löe, 1964. Wskaźnik określano przy zębach nr 16, 12, 24, 36, 32, 44, według następujących kryteriów: 0 – brak płytki nazębnej; 1 – cienka warstwa płytki przylegająca do brzegu dziąsłowego niewidoczna gołym okiem; 2 – umiarkowane nagromadzenie miękkich złogów w kieszonce dziąsłowej, na brzegu dziąsła – widoczne gołym okiem; 3 – obfite nagromadzenie miękkich złogów wewnątrz kieszonki dziąsłowej i/lub na brzegu dziąsła i powierzchni zęba.

Materiał do badań stanowiła mieszana ślina niestymulowana. Próbkę śliny zbierano pomiędzy 7.00 a 9.00 rano, metodą odpluwania (ang. *spitting method*) opracowaną przez Maciejczyk i wsp., 2019.

Przed pobraniem śliny pacjentów poinformowano, aby nie przyjmowali żadnych stałych ani płynnych pokarmów poza czystą wodą, co najmniej dwie godziny przed pobraniem śliny. Pacjentów poinformowano również, aby powstrzymali się od intensywnego wysiłku fizycznego oraz procedur higienicznych (płukanie jamy ustnej, mycie zębów, żucie gumy itp.) przez 12 h przed pobraniem śliny.

Wszyscy pacjenci byli w podostrej fazie udaru i brali regularnie leki, dlatego czas od ostatniej dawki leku ustalono na nie mniej niż 2 h. Osobnicy z grupy kontrolnej nie mogli stosować żadnych leków przez 8 h przed pobraniem śliny.

Przed pobraniem jamę ustną płukano dwukrotnie wodą destylowaną o temperaturze pokojowej, aby uniknąć zanieczyszczenia z innych źródeł. Ślinę pobierano w osobnym pokoju po 5 minutowej adaptacji do otoczenia. Pacjent siadał w wygodnym ustawieniu fotela z głową lekko pochyloną w dół w wygodnej pozycji podczas procedury pobrania śliny do sterylnej probówki typu Falcon. Ślinę zebraną podczas 1 minuty odrzucono. Ślinę zbierano przez 10 minut. Zmierzone objętość śliny skalibrowaną pipetą. Tempo przepływu śliny mierzono przez podzielenie objętości przez czas niezbędny do jej zebrania i wyrażono w ml/min.

Po zebraniu ślinę zwirowano (+4°C, 20 min, 3000 x g w wirówce MPW 351, MPW Med. Instruments) i dodano butylowany hydroksytoluen (BHT – Sigma-Aldrich, USA) do wyrównania supernatantów, w ilości 10 µL 0,5 M BHT w acetonitrylu (ACN)/1 ml śliny, w celu ochrony próbek przed procesami oksydacyjnymi. Próbkę śliny umieszczono w temperaturze ok. -80°C i przechowywano w stanie zamrożonym do dalszych oznaczeń.

Nie zauważono istotnych statystycznie różnic między grupami badanymi i kontrolną pod względem płci, wieku, chorób towarzyszących, przyjmowanych leków oraz higieny jamy ustnej i stanu przyzębia. Jedynie sprawność funkcjonalna i poznawcza mierzone za pomocą wyników BI, FIM, BBS i ACE III oraz stężenie ślinowego białka całkowitego były znacznie niższe u pacjentów z udarem mózgu niż w grupie kontrolnej. Wyniki przedstawiono w Tabeli 1.

		Grupa			Wartość p			
		Grupa kontrolna (A) n = 30	Udar krwotoczny (B) n = 15	Udar niedokrwienny (C) n = 15	ANOV A	B vs, A	C vs, A	C vs, B
<i>Charakterystyka demograficzna</i>								
Płeć	Mężczyźni n (%)	15 (50)	7 (46,66)	7 (46,66)	>0,9999			
	Kobiety n (%)	15 (50)	8 (53,33)	8 (53,33)				
Wiek *		63,07 ± 10,74 [59,06 - 67,08]	64,53 ± 8,123 [60,04 - 69,03]	61,6 ± 12,97 [54,42 - 68,78]	0,7586	0,9032	0,9032	0,7377
<i>Stan kognytywny i funkcjonalny</i>								
ACE III *		97,47 ± 1,48 [96,91 - 98,02]	69,47 ± 25,04 [55,6 - 83,33]	61,47 ± 22,33 [49,1 - 73,84]	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,3929
BI *		20 ± 0 [20 - 20]	10,73 ± 4,166 [8,426 - 13,04]	10,47 ± 3,62 [8,46 - 12,47]	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,9615
FIM *		125,2 ± 0,68 [125 - 125,5]	81,8 ± 34,16 [62,88 - 100,7]	83,47 ± 33,48 [64,93 - 102]	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,9798
BBS *		55,53 ± 0,51 [55,34 - 55,72]	31,53 ± 18,91 [21,06 - 42,01]	28,47 ± 17,6 [18,72 - 38,21]	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,7899
<i>Choroby towarzyszące</i>								
Cukrzyca n (%)		13 (43,33)	7 (46,66)	6 (40)	>0,9999			
Nadciśnienie n (%)		16 (53,33)	8 (53,33)	8 (53,33)	>0,9999			
Miażdżyca n (%)		13 (43,33)	7 (46,66)	7 (46,66)	>0,9999			
Zakrzepica kończyn dolnych n (%)		4 (13,33)	2 (13,33)	2 (13,33)	>0,9999			
Migotanie przedsionków n (%)		5 (16,66)	2 (13,33)	3 (20)	>0,9999			
<i>Leki</i>								
<5 leków/dzień n (%)		16 (53,33)	7 (46,66)	6 (40)	>0,9999			
>5 leków/dzień n (%)		14 (46,66)	8 (53,33)	9 (60)				
<i>Badanie sialochemiczne i stomatologiczne</i>								
Przepływ minutowy śliny (ml/min)*		0,34 ± 0,09 [0,31 - 0,37]	0,39 ± 0,26 [0,24 - 0,52]	0,47 ± 0,25 [0,34 - 0,61]	0,1028	0,7393	0,084	0,4339
Zawartość białka całkowitego w ślinie (µg/ml)*		1121 ± 188,4 [1050 - 1191]	904,5 ± 246,6 [768 - 1041]	817 ± 168,7 [723,5 - 910,4]	<0,0001	0,0033	<0,0001	0,4587
PUW *		24,63 ± 7,25 [21,92 - 27,34]	22 ± 9,67 [16,64 - 27,36]	24,27 ± 3,84 [22,14 - 26,4]	0,5123	0,494	0,9862	0,674
GI *		0,74 ± 0,79 [0,44 - 1,04]	0,91 ± 0,77 [0,49 - 1,33]	0,6 ± 0,61 [0,26 - 0,94]	0,522	0,7598	0,8128	0,4906
PII *		1,28 ± 1 [0,89 - 1,67]	1,45 ± 0,94 [0,93 - 1,96]	1,01 ± 0,90 [0,51 - 1,51]	0,464	0,8551	0,6607	0,4402

\* wyniki wyrażono jako średnia ± odchylenie standardowe (SD) (95% przedział ufności (95% CI))

Aktywność XO badano w ślinie metodą fluorymetryczną przy użyciu komercyjnego zestawu Amplex® Red Xanthine/Xanthine Oxidase Assay (Invitrogen, USA). W tym zestawie XO katalizuje utlenienie ksantyny/hipoksantyny do rodnika ponadtlenkowego i kwasu moczowego (UA). Rodnik ponadtlenkowy jest następnie redukowany do nadtlenku wodoru ( $H_2O_2$ ), który reaguje 1:1 z odczynnikiem Amplex Red. Następnie zachodzi reakcja z peroksydazą chrzanową i powstaje czerwony fluorescencyjny związek rezorufina. Fluorescencję rezorufiny mierzono przy długości fali 540/590 nm. Uznaje się, że jedna jednostka (U) aktywności XO to 1  $\mu$ mol UA otrzymany z hipoksantyny w 25°C. Do pomiaru absorbancji i fluorescencji próbki zastosowano czytnik płytek 96 dołkowych BioTek Synergy H1 (Winooski, VT, USA). Wszystkie analizy wykonano w trzech powtórzeniach. Wyniki wystandaryzowano na zawartość białka całkowitego (TPC) i zaprezentowano jako aktywność specyficzną (nU/mg białka).

Całkowitą zawartość białka (TPC) oznaczono kolorymetrycznie z zastosowaniem kwasu bicononinowego (BCA) z albuminą surowicy bydłowej (BSA) jako standardem (Thermo Scientific PIERCE BCA Protein Assay Kit, Rockford, IL, USA). Oznaczenia wykonano za pomocą komercyjnie dostępnego zestawu diagnostycznego. Uzyskane wyniki wystandaryzowano na zawartość białka w ślinie oznaczonego metodą kolorymetryczną BCA.

Uzyskane dane poddano analizie statystycznej. Analizę danych przeprowadzono przy użyciu programu GraphPad Prism 8 dla systemu macOS (oprogramowanie GraphPad, La Jolla, CA, USA). Rozkład zmiennych został oceniony testem Kołmogorowa-Smirnowa, natomiast jednorodność wariancji – testem Levene'a. Do porównania dwóch grup eksperymentalnych zastosowano test t-Studenta, natomiast trzech grup – analizę wariancji (ANOVA) z testem post hoc Tukeya. Zdefiniowana istotność statystyczna wyniosła  $p < 0,05$ . Wartości p obliczono z poprawką dla porównań wielokrotnych. Wyniki wyrażono jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe (SD) i 95% przedział ufności (95% CI). Korelacje między danymi klinicznymi a biomarkerami śliny przeprowadzono za pomocą współczynnika korelacji Pearsona. Dokonano także oceny wpływu wielu zmiennych niezależnych na jedną ilościową zmienną zależną za pomocą analizy regresji liniowej. Typy udaru, ACE III, BI, FIM, BBS i przepływ minutowy śliny zostały użyte jako zmienne niezależne, a wyniki raportowano jako 95% CI wraz z parametrami regresji. Przydatność diagnostyczną biomarkerów śliny oceniono dodatkowo za pomocą krzywej oceny jakości klasyfikatora (ROC). Obliczono obszar pod krzywą (AUC) i punkt odcięcia dla biomarkera charakteryzujący się najwyższą czułością i swoistością.

Wykazano, że aktywność specyficzna oksydazy ksantynowej (XO; nU/mg białka całkowitego) jest znacząco wyższa zarówno w ślinie chorych z krwotocznym, jak i niedokrwiennym udarem mózgu w porównaniu do osób zdrowych (grupa kontrolna). Aktywność ślinowej XO jest także znacząco wyższa w ślinie chorych z udarem niedokrwiennym w porównaniu do chorych z udarem krwotocznym (Fig. 1).

Za pomocą analizy regresji wieloczynnikowej wykazano, że aktywność specyficzna oksydazy ksantynowej (XO; nU/mg białka całkowitego) zależy od rodzaju udaru, jak również funkcji poznawczych (ACE III), natomiast nie zależy od stanu funkcjonalnego pacjenta w skali BI, FIM i BBS oraz przepływu śliny (Tabela 2).

Parametry regresji		Aktywność specyficzna (nU/mg białka) XO w ślinie
$\beta$ 1: typ udaru	Współczynnik kierunkowy	16,45
	95% CI	8,67 - 24,23
	p-Value	0,0002
$\beta$ 2: ACE III	Współczynnik kierunkowy	-0,2998
	95% CI	-0,52 - -0,07
	p-Value	0,0101
$\beta$ 3: BI	Współczynnik kierunkowy	-1,223
	95% CI	-2,63 - 0,18
	p-Value	0,0848

Parametry regresji		Aktywność specyficzna (nU/mg białka) XO w ślinie
β4: FIM	Współczynnik kierunkowy	0,03768
	95% CI	-0,08 - 0,16
	p-Value	0,5199
β5: BBS	Współczynnik kierunkowy	-0,1856
	95% CI	-0,48 - 0,10
	p-Value	0,2018
β6: przepływ śliny	Współczynnik kierunkowy	12,23
	95% CI	-4,22 - 28,69
	p-Value	0,1377

Krzywa ROC (ang. *Receiver Operating Characteristic*) jest graficznym przedstawieniem zależności pomiędzy czułością i swoistością markeru diagnostycznego. Pozwala na wyznaczenie optymalnego punktu odcięcia dzielącego zbiór wyników na dwie grupy: taką, w której obecne jest określone zjawisko (np. choroba) i taką, w której jest ono nieobecne. Pole pod krzywą ROC – AUC (ang. *Area Under Curve*) ocenia zdolność testu do odgraniczania wyników prawidłowych i nieprawidłowych. AUC przyjmuje wartości w przedziale od 0 do 1. Im większe jest pole, tym dokładniej na podstawie wyniku analizowanej zmiennej diagnostycznej mamy szansę zaklasyfikować pacjentów do grupy z dodatnim wynikiem testu lub do grupy z ujemnym wynikiem testu, a AUC powinno być istotnie większe niż 0,5. Za pomocą analizy przydatności diagnostycznej ROC wykazano, że biomarker XO oceniany w ślinie znacząco statystycznie różnicuje chorych z udarem niedokrwiennym mózgu od chorych z udarem krwotocznym (AUC: 0,764) i osób zdrowych (AUC: 0,973) (Fig. 2). Biomarker ten charakteryzuje się zarówno wysoką czułością (udar niedokrwienny vs. krwotoczny: 66,67%; udar niedokrwienny vs. grupa kontrolna: 93,33%), jak i swoistością (udar niedokrwienny vs. krwotoczny: 66,67%; udar niedokrwienny vs. grupa kontrolna: 90%), co potwierdza jego przydatność diagnostyczną.

Za pomocą współczynnika korelacji Pearsona wykazano, że aktywność specyficzna XO (nU/mg białka całkowitego) w ślinie koreluje ujemnie z równowagą posturalną w skali BBS ( $r = -0,61$ ,  $p < 0,001$ ) oraz sprawnością w czynnościach życiowych według skali BI ( $r = -0,58$ ,  $p = 0,001$ ). Ślinowa XO była także negatywnie skorelowana z czynnościami poznawczymi w skali ACE III ( $r = -0,71$ ,  $p < 0,001$ ), w tym szczególnie z uwagą i orientacją ( $r = -0,57$ ,  $p = 0,001$ ), pamięcią ( $r = -0,63$ ,  $p = 0,0002$ ), percepcją wzrokową ( $r = -0,54$ ,  $p = 0,002$ ), językiem ( $r = -0,56$ ,  $p = 0,001$ ) i funkcjami wizualno-przestrzennymi ( $r = -0,53$ ,  $p = 0,003$ ) (Fig. 3).

### Przykład wykonania 2

W kolejnym etapie badań podzielono pacjentów z udarem krwotocznym i niedokrwiennym (grupa badana) na trzy podgrupy w oparciu o nasilenie zaburzeń funkcji poznawczych ocenianych w skali ACE III: brak zaburzeń poznawczych (100–89 w skali ACE III), łagodne zaburzenia poznawcze (88–61 w skali ACE III) i umiarkowane zaburzenia poznawcze (< 61 w skali ACE III).

Wykazano, że aktywność specyficzna XO (nU/mg białka całkowitego) w ślinie jest znacząco wyższa u chorych z umiarkowanymi zaburzeniami poznawczymi w porównaniu do chorych z udarem i łagodnymi zaburzeniami poznawczymi oraz osób z udarem bez zaburzeń poznawczych ocenianych w teście ACE III (Fig. 4).

Za pomocą analizy ROC wykazano, że aktywność specyficzna XO z wysoką dokładnością i swoistością różnicuje pacjentów z udarem mózgu i łagodnymi zaburzeniami funkcji poznawczych w porównaniu do umiarkowanych zaburzeń poznawczych (Fig. 5).

	Punkt odcięcia	AUC	95% CI	Czułość %	95% CI	Specyficzność %	95% CI
Brak zaburzeń poznawczych vs. łagodne zaburzenia poznawcze	> 50,79	0,688	0,42 - 0,95	62,5	38,64% - 81,52%	75	30,06% - 98,72%
Brak zaburzeń poznawczych vs. umiarkowane zaburzenia poznawcze	> 62,22	1	1,00 - 1,00	100	72,25% - 100,0%	100	51,01% - 100,0%
Łagodne zaburzenia poznawcze vs. umiarkowane zaburzenia poznawcze	> 65,86	0,988	0,95 - 1,00	100	72,25% - 100,0%	93,75	71,67% - 99,68%

Aktywność specyficzna XO w ślinie odróżnia chorych z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi od chorych z umiarkowanymi zaburzeniami poznawczymi, przez co może być potencjalnym narzędziem przesiewowym używanym do kompleksowej oceny neuropsychologicznej u pacjentów z udarem mózgu.

#### Literatura:

1. Jabs C.M., Neglen P., Eklof B., Thomas E.J., Adenosine, inosine, and hypoxanthine/xanthine measured in tissue and plasma by a luminescence method; Clin. Chem. 1990: 36 (1) p.81–87; <https://doi.org/10.1093/clinchem/36.1.81>.
2. Aygul R, Kotan D, Demirbas F, Ulvi H, Deniz O. Plasma Oxidants and Antioxidants in Acute Ischaemic Stroke. Journal of International Medical Research.; 2006: 413–418. doi:10.1177/147323000603400411.
3. Maciejczyk M, Zalewska A, Ładny JR. Salivary Antioxidant Barrier, Redox Status, and Oxidative Damage to Proteins and Lipids in Healthy Children, Adults, and the Elderly. Oxid Med Cell Longev.; 2019: 4393460. doi:10.1155/2019/4393460.
4. Maciejczyk M, Pawlukianiec C, Żendzian-Piotrowska M, Ładny JR, Zalewska A. Salivary Redox Biomarkers in Insulin Resistance: Preclinical Studies in an Animal Model. Oxid Med Cell Longev. 2021: 3734252. doi:10.1155/2021/3734252.
5. Gerreth P., Maciejczyk M., Zalewska A., Gerreth K., Hojan K. Comprehensive Evaluation of the Oral Health Status, Salivary Gland Function, and Oxidative Stress in the Saliva of Patients with Subacute Phase of Stroke: A Case-Control Study. Journal of Clinical Medicine, 2020. 9. 2252. 10.3390/jcm9072252.

#### Zastrzeżenia patentowe

1. Zastosowanie ślinowej oksydazy ksantynowej jako biomarkera w diagnozowaniu *in vitro* pacjentów z udarem mózgu.
2. Zastosowanie ślinowej oksydazy ksantynowej do według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że aktywność mierzy się metodą fluorymetryczną.
3. Zastosowanie ślinowej oksydazy ksantynowej według zastrz. 2, **znamiennie tym**, że objętość śliny wynosi co najmniej 50  $\mu$ l.
4. Zastosowanie ślinowej oksydazy ksantynowej jako biomarkera w różnicowaniu *in vitro* pacjentów z udarem mózgu, **znamiennie tym**, że aktywność od 46 nU/mg do 60 nU/mg oznacza udar krwotoczny a aktywność od 60 nU/mg oznacza udar niedokrwienny.
5. Zastosowanie ślinowej oksydazy ksantynowej jako biomarkera w ocenie neuropsychologicznej *in vitro* pacjentów z udarem mózgu, **znamiennie tym**, że aktywność od 51 nU/mg do 62 nU/mg oznacza łagodne zaburzenia poznawcze, a aktywność od 62 nU/mg oznacza umiarkowane zaburzenia poznawcze.

## Rysunki

Aktywność specyficzna (nU/mg białka)  
XO w ślinie

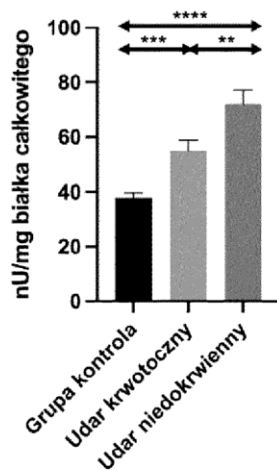
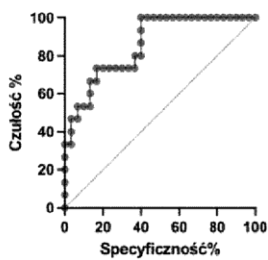
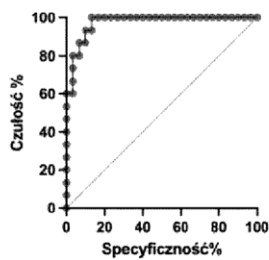


Fig.1

Krzywa ROC  
Udar krwotoczny vs. Grupa kontrolna



Krzywa ROC  
Udar niedokrwienny vs. Grupa kontrolna



Krzywa ROC  
Udar krwotoczny vs. Udar niedokrwienny

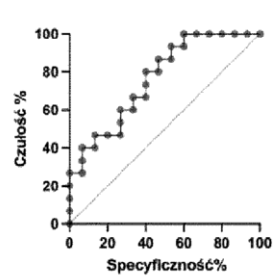


Fig. 2

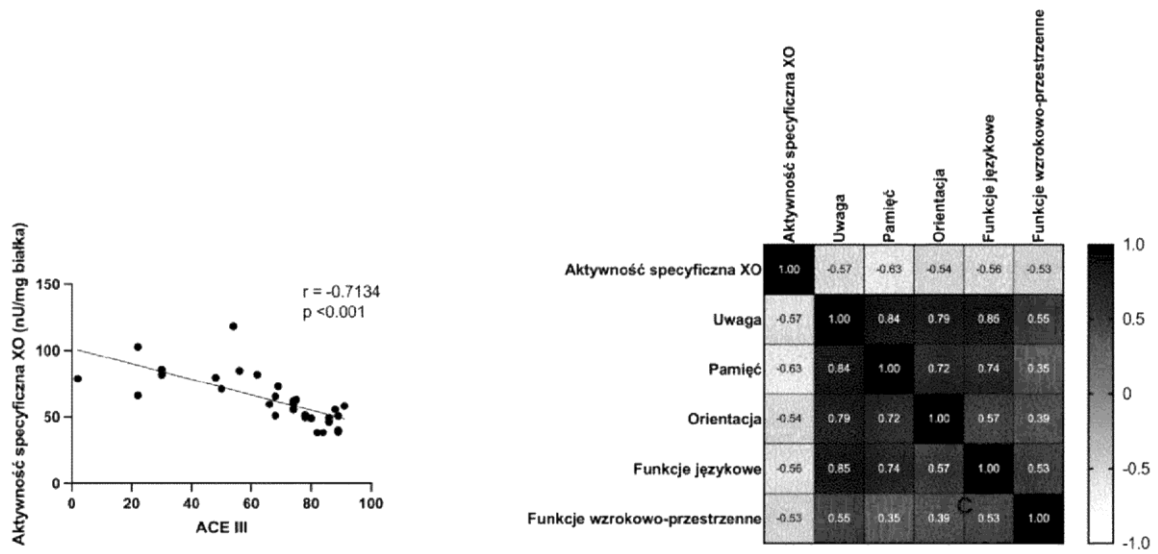


Fig. 3

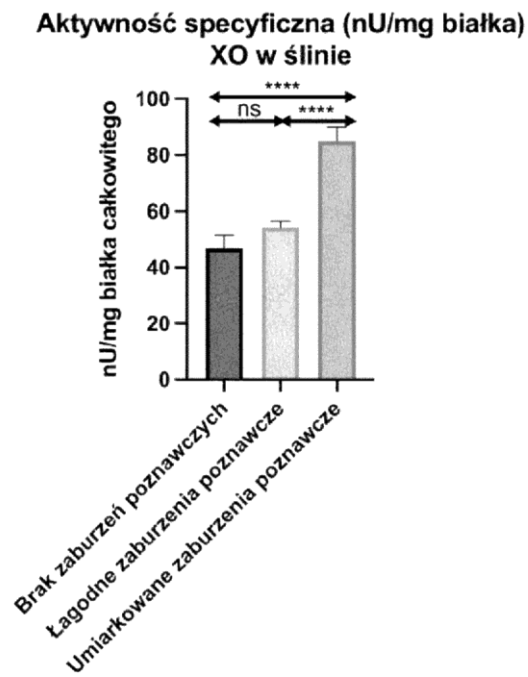


Fig. 4

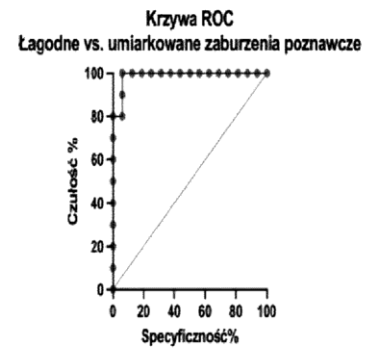
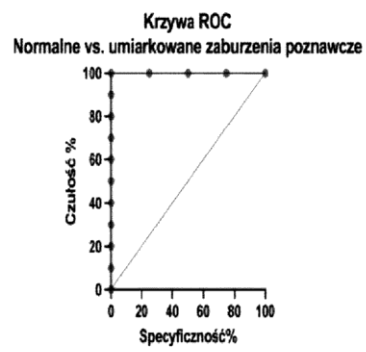
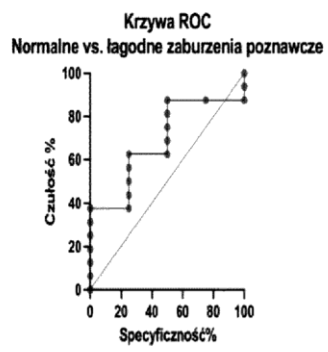


Fig. 5