

**Uniwersytet Medyczny w Białymstoku**  
**Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii**  
**i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim**



**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu**  
**w dyscyplinie: nauki medyczne.**

**pt. Opracowanie panelu potencjalnych markerów w diagnostyce**  
**stwardnienia rozsianego.**

**Doktorant:**

Lekarz medycyny, specjalista neurolog Ewelina Górska

**Promotorzy:**

**Promotor I**

Prof. dr hab. Adam Hermanowicz  
Klinika Chirurgii i Urologii Dziecięcej  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

**Promotor II**

Prof. dr hab. Ewa Gorodkiewicz  
Pracownia Bioanalizy, Wydział Chemii  
Uniwersytet w Białymstoku

Białystok, 2024

## Spis treści

1. Wykaz skrótów .....	4
2. Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej .....	6
3. Zestawienie publikacji doktoranta .....	7
4. Wstęp .....	8
5. Cele pracy .....	17
6. Materiały i metody .....	18
6.1. Charakterystyka badanych grup pacjentów .....	18
6.2. Pobieranie i przechowywanie próbek.....	19
6.3. Oznaczanie stężeń proteasomu konstytutywnego 20S i immunoproteasomu.....	19
6.4. Oznaczanie stężeń UCHL1, katepsyny S, fibronektyny i leptyny.....	20
6.5. Przygotowanie biosensora SPRi do oznaczeń neuropiliny.....	21
6.6. Przetwarzanie danych.....	22
6.7. Analiza statystyczna.....	22
7. Wyniki i dyskusja.....	23
7.1 Oznaczanie stężeń konstytutywnego proteasomu 20Sc, immunoproteasomu 20Si, UCHL1, katepsyny S, fibronektyny oraz leptyny.....	23
7.2. Zwaliowanie biosensora SPRi do oznaczeń neuropiliny-1.....	26
7.2.1 Optymalizacja stężenia mysiego monoklonalnego przeciwciała przeciw neuropiline-1.....	26
7.2.2 Zależność sygnału SPRi biosensora od stężenia neuropiliny-1.....	27
7.2.3 Wyznaczanie precyzji, odzysku, limitu detekcji oraz limitu oznaczalności biosensora.....	28
7.2.4 Badanie specyficzności przygotowanego biosensora do oznaczenia Neuropiliny-1.....	29
7.2.5. Oznaczanie neuropiliny-1 w próbkach naturalnych.....	30
7.2.6. Dyskusja wyników.....	32
8. Wnioski.....	44
9. Streszczenie w języku polskim .....	45
10. Streszczenie w języku angielskim .....	48
11. Piśmiennictwo.....	51
12. Spis tabel.....	55
13. Spis rysunków.....	56

14. Pozostały dorobek naukowy.....	58
15. Zgoda Komisji Bioetycznej .....	59
16. Praca oryginalna 1A.....	61
17. Praca oryginalna 2A.....	89
18. Praca przeglądowa 3A.....	119

## 1. Wykaz skrótów

- **AUC** - pole pod krzywą traktowane jako miara trafności modelu w trakcie wyznaczania krzywej ROC (ang, area under curve);
- **BHT** – butylohydroksytoluen
- **C** – grupa kontrolna
- **CV** – współczynnik zmienności
- **EAE** – autoimmunologiczne zapalenie mózgu
- **ECM** – macierz zewnątrzkomórkowa
- **EDC/NHS-1**-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimid)/N-hydroksysukcynimid)
- **EDSS** - skala niewydolności ruchowej Kurtzkiego (Kurtzke's Expanded Disability Status Scale)
- **ELISA** – ang. Enzyme-linked immunosorbent assay, test immunoenzymatyczny
- **FN** – fibronektyna
- **HBS-ES** – roztwór buforowy składający się z:
  - **HEPES** – kwas N-(2-hydroksyetylo)piperazyno-N'-(2-etanosulfonowy)
  - **NaCl** – chlorek sodu
  - **EDTA-Na<sub>2</sub>** – wersenian dwusodowy
  - **Tween-20** – monolaurynian polioksyetylenu(20)sorbitanu
- **KAT S** – katepsyna S
- **kDa** – kilo Dalton (jednostka masy cząsteczkowej, często wykorzystywana w biochemii)
- **LOD** – granica wykrywalności
- **LOQ** – granica oznaczalności
- **MS** – ang. Multiple Sclerosis, stwardnienie rozsiane
- **NRP-1** – neuropilina-1
- **OUN** – ośrodkowy układ nerwowy
- **ONX 0914** - inhibitor immunoproteasomu 20Si, (2S)-3-(4-metoksyfenylo)-N-[(2S)-1-(2-metyloksiran-2-ylo)-1-okso-3-fenylopropan-2-ylo]-2-[[[(2S))-2-[(2-morfolin-4-yloacetylo)amino]propanoilo]amino]propanamid
- **ODM** - 1-oktadekanotiol
- **p** – p-wartość, wartość prawdopodobieństwa testowego
- **PBS** – zbuforowany roztwór soli fizjologicznej



- **ROC** – ang. Receiver Operating Characteristic, narzędzie do oceny jakości klasyfikatora
- **RRMS** - rzutowo-remisyjna postać stwardnienia rozsianego
- **RSD** – względne odchylenie standardowe
- **PSI** - inhibitor proteasomu 20S (Z-Ile-Glu (OBut)-Ala-Leu-H)
- **SPRi** – ang. Surface Plasmon Resonance imaging, Powierzchniowy Rezonans Plazmonów w wersji obrazowej
- **UCH-L1** – C-końcowa hydrolaza ubikwityny
- **UPS** – układ (szlak) ubikwityna-proteasom
- **VEGF, VEGF-A** – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego
- $\alpha$  – poziom istotności statystycznej
- $\rho_S$  – współczynnik korelacji rang Spearmana

## 2. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską

### Prace oryginalne

1A Ewelina Górską, Marzena Tylicka, Adam Hermanowicz, Ewa Matuszczak, Anna Sankiewicz, Ewa Gorodkiewicz, Justyna Hermanowicz, Elżbieta Karpińska, Katarzyna Socha, Jan Kochanowicz, Marta Jakoniuk, Joanna Kamińska, Evgenija Homšak & Olga Martyna Koper-Lenkiewicz,” UCHL1, besides leptin and fibronectin, also could be a sensitive marker of the relapsing–remitting type of multiple sclerosis”, *Scientific Reports* | (2023) 13:3423, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30237-3>,

IF: 4,6, MNiSW: 140

2A Ewelina Górską, Marzena Tylicka, Joanna Kamińska, Adam Hermanowicz, Ewa Matuszczak, Łukasz Ołdak, Ewa Gorodkiewicz, Elżbieta Karpińska, Katarzyna Socha, Jan Kochanowicz, Marta Jakoniuk, Evgenija Homšak, 10, Olga Martyna Koper-Lenkiewicz “20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S are high-sensitivity and independent markers of immunological activity in relapsing-remitting type of multiple sclerosis”, *Journal of Neurochemistry* 2024, 24 June 2024, <https://doi.org/10.1111/jnc.16165>

IF: 5,546, MNiSW: 140

### Prace przeglądowe

3A Ewelina Górską, Sylwia Bogdan, Ewa Gorodkiewicz, Adam Hermanowicz “Neurodegenerations are diseases of the present and the future,” *Journal of Education, Health and Sport*. 2022;12(11):23-32.

MNiSW: 40

### 3. Zestawienie publikacji

Rodzaj publikacji	Liczba	Impact Factor	Punktacja MNiSW
Prace włączone do rozprawy doktorskiej	3	10,146	320
Prace, które nie zostały włączone do rozprawy doktorskiej	1	3,9	100
Streszczenia zjazdowe	1	0	0
<b>Razem</b>	5	14,046	420

#### 4. Wstęp

Stwardnienie rozsiane (SM) jest chorobą ośrodkowego układu nerwowego (OUN) o podłożu immunologicznym, która charakteryzuje się uszkodzeniem mieliny i degradacją aksonów. Jest ona spowodowana złożoną interakcją między czynnikami genetycznymi, immunologicznymi i środowiskowymi, które nie są w pełni poznane. SM dotyka głównie młodych dorosłych w wieku 20 - 40 lat [1,2], częściej kobiety niż mężczyzn. Występowanie SM jest uwarunkowane geograficznie oraz jest związane z rasą. Choroba występuje głównie u reprezentantów rasy białej zamieszkujących w północnych rejonach Ameryki Północnej, Europy i Azji. Częstość występowania SM mieści się między 2, a 150 przypadków na 100 tys. mieszkańców. W Polsce na SM choruje ok. 40–60 osób na 100 000.

U pacjentów ze stwardnieniem rozsianym mogą wystąpić objawy neurologiczne, wśród których najczęstsze to: niedowłady, zaburzenia widzenia, drętwienie, ataksja, trudności w chodzeniu, skurcze mięśni, problemy z pęcherzem moczowym lub ze wzrokiem, zmęczenie, ból, depresja i demencja [3]. Patogeneza SM jest złożona i nie jest w pełni poznana, jednak uważa się, że u podstaw choroby leży nawracająco-remisyjny stan zapalny ośrodkowego układu nerwowego lub postępująca choroba neurodegeneracyjna [3A]. Obecnie wiadomo, że utrata aksonów i neuronów następuje już na najwcześniejszych etapach choroby, powodując upośledzenie funkcji poznawczych oraz inne niepełnosprawności we wczesnej fazie [3-7]. W przypadku pacjentów z agresywną postacią kliniczną choroby, są dowody ciągłej aktywności zapalnej dzięki obrazowaniu rezonansem magnetycznym uszkodzeń układu nerwowego.

Około 90% pacjentów ze stwardnieniem rozsianym cierpi na rzutowo-remisyjne stwardnienie rozsiane (RRMS) opisywane jako epizody niepełnosprawności, po których następuje całkowity lub częściowy powrót do zdrowia [8]. Po wielu latach tego typu SM, może ono przejść w formę wtórnie postępującą, w której kumulujące się neurologiczne objawy ubytkowe prowadzą do postępującej niepełnosprawności. W przypadku pacjentów z późnym początkiem choroby występuje pierwotnie postępujące SM, w którym pogorszenie następuje stopniowo bez wyraźnych zaostrzeń. Rzadko występującą formą SM jest postępująco-nawracająca SM, w której postępującemu pogorszeniu towarzyszą okresy zaostrzeń.

Stopień zaawansowania SM ocenia się w 10-stopniowej skali punktów EDSS (Kurtzke's Expanded Disability Status Scale).

Stwardnienie rozsiane jest najczęstszą, nie są związaną z urazem, przyczyną niepełnosprawności u młodych dorosłych, dlatego tak ważne jest precyzyjne i szybkie postawienie rozpoznania oraz wdrożenie terapii ograniczających postęp choroby.

Chorobę obecnie rozpoznaje się na podstawie wywiadu, badania neurologicznego oraz oceny wyniku MRI mózgu i rdzenia kręgowego po podaniu gadoliny (kontrastu różnicującego zmiany aktywne - tzw. „świeże” - od odległych).

W sytuacjach, gdy rozpoznanie jest niepewne, należy wykonać punkcję lędźwiową. Badanie płynu mózgowo-rdzeniowego pod kątem ilości gamma-globulin oraz na obecność tzw. prążków oligoklonalnych pozwala potwierdzić diagnozę.

Poszukiwanie nowych metod diagnostycznych ma duże znaczenie, gdyż punkcja lędźwiowa jest procedurą inwazyjną, czasochłonną, a także narażającą pacjenta na możliwe powikłania (tzw. zespół popunkcyjny).

Ilościowe oznaczenie we krwi obwodowej biomarkera lub panelu biomarkerów charakterystycznych dla SM może usprawnić diagnostykę.

W leczeniu rzutu stwardnienia rozsianego od wielu lat stosuje się dożylnie glikokortykosteroidy. Skracają one czas trwania rzutu, normalizując stan neurologiczny pacjenta.

Leczenie objawowe stwardnienia rozsianego łagodzi dolegliwości utrudniające funkcjonowanie osoby z SM: zaburzenia nastroju, ból, sztywność mięśni, zawroty głowy, zaburzenia czucia czy kontroli zwieraczy.

Do leków modyfikujących przebieg stwardnienia rozsianego, należą m.in. interferon- $\beta$ , octan glatirameru, fingolimod, kladrybina, teryflunomid, fumaran dimetylu czy przeciwciała monoklonalne (np. natalizumab, alemtuzumab, ocrelizumab).

Spowalniają one rozwój choroby, powodują zmniejszenie ilości rzutów i spowalniają narastanie niesprawności oraz hamują proces atrofii mózgu.

Nowoczesne terapie immunomodulujące są dobierane indywidualnie do potrzeb pacjenta chorującego na SM, biorąc pod uwagę postać i aktywność jego choroby oraz płeć, wiek, schorzenia towarzyszące jak również preferencje pacjenta. W Polsce wiele innowacyjnych leków jest dostępnych w ramach tzw. programów lekowych finansowanych przez narodowego płatnika - NFZ.

Ważną rolę w procesie leczenia SM odgrywa rehabilitacja (ćwiczenia fizyczne oraz fizjoterapia) - odpowiednio dobrana do możliwości chorego.

Przypuszcza się, że w fazie rzutu SM autoreaktywne limfocyty T rozpoznają i atakują epitopy mieliny [9], w wyniku czego nieprawidłowa odpowiedź immunologiczna na własne antygeny skutkuje przewlekłym stanem zapalnym i śmiercią tkanek [10]. Kluczowym procesem w demielinizacji charakterystycznej dla SM jest proteolityczna degradacja mieliny na skutek ataku limfocytów T. Dlatego można oczekiwać, że krew pacjentów będzie

wykazywała podwyższone poziomy proteolitycznych enzymów. Główną drogą degradacji wewnątrzcząsteczkowych pozalizosomalnych białek jest układ ubikwityna-proteasom [9].

W przypadku chorób neurodegeneracyjnych, takich jak SM, tworzą się toksyczne agregaty białek, które rozregulowują proteosomalny układ degradacyjny. Pojawiają się doniesienia, że w takim przypadku enzymatyczna aktywność układu proteosomalnego w centralnym systemie nerwowym rośnie [9].

Proteasomy są pierścieniowymi kompleksami enzymatycznymi rozkładającymi zdefektowane lub wadliwie zwinięte białka, które wcześniej zostały poliubikwitynowane. Rozkład do małych polipeptydów następuje przez hydrolizę wiązań peptydowych. Kompletny proteasom (26S) składa się z podjednostek 20S i 19S. Podjednostka 19S rozpoznaje białka zaznaczone poliubikwityną, rozszczepia łańcuchy poliubikwitynowe oraz kieruje substraty do katalitycznej części podjednostki 20S. Proteasomy 20S składają się z 4 pierścieni, z których każdy zawiera 7 podjednostek. Łączna masa cząsteczkowa wynosi około 2000 kDa. Występują dwa proteasomy 20S: konstytutywny proteasom 20S (20Sc) oraz immunoproteasom (20Si). Różnią się one trzema podjednostkami w katalitycznym pierścieniu  $\beta$  ( $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  oraz  $\beta 5i$  w przypadku 20Si). Zwiększenie stężenia immunoproteasomu następuje w odpowiedzi na stany zapalne.

C - końcowa hydrolaza ubikwityny L1 (Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1) (UCHL1) jest deubikwitynującym enzymem hydrolizującym ubikwitynę z poliubikwitynowanych białek. Ponadto należy do najczęściej występujących białek w mózgu, a także odpowiada za właściwe funkcjonowanie systemu nerwowego. UCHL1 bierze udział w naprawianiu uszkodzonych aksonów i neuronów.

Poza układem ubikwityna-proteasom, w komórkach istnieje lizosomalny mechanizm rozkładu wadliwych białek, który degraduje monoubikwitynowane białka. Reprezentantem tej linii degradacyjnej białek jest katepsyna S, czyli cysteinowa proteaza zbudowana z 217 aminokwasów o masie cząsteczkowej 23,7 kDa. Zwiększone wydzielanie katepsyny S obserwuje się w przypadku nowotworów, chorób krążeniowo-naczyniowych czy artretyzmu. Jednak poza recyrkulacją białkowych aminokwasów, katepsyna S uczestniczy w sygnalizacji w komórce, w aktywacji receptorów, prezentacji antygenów. Ponadto katepsyna S uczestniczy w postępie stwardnienia rozsianego, rozszczepiając białka mieliny [11,12].

Fibronektyna jest glikoproteiną będącą istotnym składnikiem macierzy zewnątrzkomórkowej. Odgrywa ona istotną rolę w adhezji komórek, w ich wzroście, różnicowaniu, migracji, w leczeniu ran i rozwoju embrionalnym [13,14]. Współwystępuje w kilku molekularnych formach: jednej rozpuszczalnej i dwóch nierozpuszczalnych.

Rozpuszczalna fibronektyna jest wytwarzana w hepatocytach, a nierozpuszczalne formy – w fibroblastach, makrofagach, komórkach nabłonkowych i śródbłonkowych.

Jest dimerem o masie cząsteczkowej około 250 kDa. Niewydolność remielinizacji jest jedną z głównych cech stwardnienia rozsianego i jest potencjalnie powiązana z postępowaniem choroby. Badania wykazały, że macierz zewnątrzkomórkowa jest powiązana z niewydolnością remielinizacji, ponieważ przebudowa macierzy często kończy się niepowodzeniem zarówno w przypadku przewlekłego, jak i postępującego stwardnienia rozsianego. Agregaty fibronektyny gromadzą się i trwale występują w przewlekłym stwardnieniu rozsianym, hamując w ten sposób remielinizację [15].

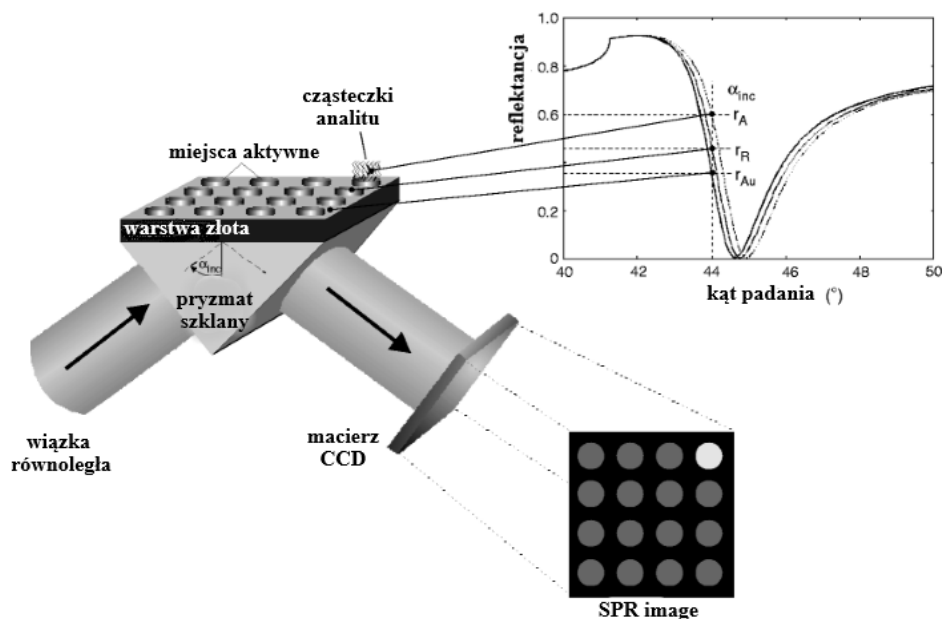
Leptyna jest hormonem odpowiedzialnym za regulację żywienia i bilans energetyczny, ponadto biorącym udział w modulowaniu reakcji immunologicznej. Jest to białko wytwarzane głównie przez komórki tłuszczowe, składające się z 167 aminokwasów o łącznej masie cząsteczkowej 16 kDa [16]. Średnie stężenie leptyny w krwi dorosłych osobników mieści się w przedziale 5-8 ng/ml [17,18]. Otyłość na wczesnym etapie życia została powiązana ze zwiększonym ryzykiem rozwoju stwardnienia rozsianego (SM). Zarówno leptyna, jak i np. insulina, są powiązane z otyłością, co czyni je odpowiednimi kandydatami do badania tego związku. Obecność na wszystkich typach leukocytów receptorów leptynowych sugeruje, że leptyna może modulować aktywność, żywotność i proliferację tych komórek w sposób bezpośredni. Leukocyty są także zdolne do produkcji leptyny. Stwierdzono także, że leptyna działa immunostymulująco na leukocyty odpowiedzi wrodzonej, tj. monocyty, makrofagi, granulocyty i komórki NK. Powoduje między innymi zwiększenie chemotaksji granulocytów i makrofagów oraz podnosi poziom wolnych rodników tlenowych w tych komórkach. Podczas odpowiedzi swoistej leptyna zwiększa proliferację limfocytów T pomocniczych (Th) i B, a także przesuwa polaryzację limfocytów Th w kierunku limfocytów Th1 wspomagających odpowiedź komórkową. Zaobserwowano ponadto, że poziom leptyny podnosi się podczas sepsy, a także w przebiegu wielu chorób autoimmunizacyjnych [19].

Neuropilina-1 i jej izoforma neuropilina-2 są wielofunkcyjnymi transmembranowymi receptorami, m.in. koreceptorami semaforyn, a także receptorami czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF-A) [20-22]. Sekwencja aminokwasów obu izoform pokrywa się w 44% [23]. Rozpuszczalne neuropiliny mają taką samą budowę jak transmembranowe, z wyjątkiem części transmembranowej i cytoplazmatycznej [24]. Doniesienia literaturowe dostarczają dowodów na bezpośrednią rolę neuropiliny-1 w chorobach o podłożu immunologicznym. Zjawisko to jest związane ze zwiększonym zaangażowaniem linii zapalnych i upośledzeniem funkcji regulatorowych limfocytów T.

Wcześniejsze ustalenia potwierdzają, że NRP-1 może być niezbędna do prawidłowej supresji immunologicznej. Nadekspresja NRP-1 osłabia progresję EAE (autoimmunologiczne zapalenie mózgu) i odwrotnie, brak NRP-1 powoduje zaostrzenie choroby. Ten wzrost nasilenia choroby następuje w sposób zależny od limfocytów T CD4 + (co zaburza równowagę limfocytów T pomocniczych z podtypów regulacyjnych w stronę podtypów zapalnych TH - 17) [25].

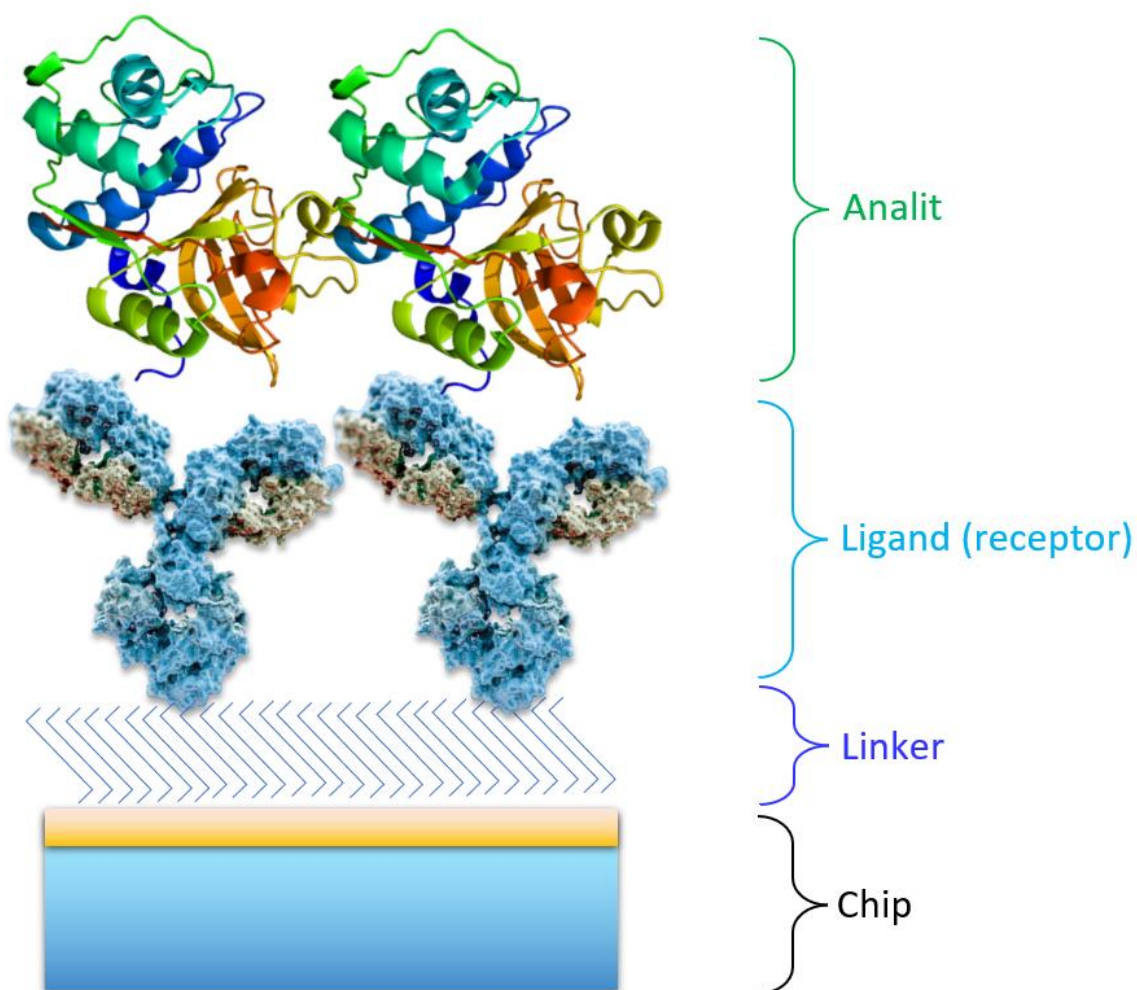
Oznaczanie proteasomu 20Sc, immunoproteasomu 20Si, hydrolazy L1 ubikwityny, katepsyny S, fibronektyny i leptyny może być dokonane z zastosowaniem biosensorów oraz techniki matrycowego powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji obrazowej (imaging) (SPRi). Ta optyczna technika rozwija się w kierunku jej zastosowania do oznaczania biomarkerów w płynach ustrojowych i polega na wykorzystaniu zjawiska powierzchniowego rezonansu plazmonów (SPR). Padający strumień światła wchodzi w rezonansową reakcję z powierzchniowymi plazmonami metali takich jak np. złoto czy srebro, powodując pochłanianie padającego światła w określonym zakresie widma. Efekt ten występuje tylko przy określonym kącie padania ( $\alpha_{inc}$ ) i jest lepiej obserwowalny w przypadku spolaryzowanej równolegle wiązki światła. W widmie (zależność reflektancji od kąta padania) pojawia się ostre minimum, odpowiadające rezonansowemu kątowi padania (SPR dip). Obecność innych substancji na powierzchni metalu (receptora oraz analitu) zimmobilizowanych na miejscach aktywnych powoduje przesunięcie rezonansowego minimum w kierunku dłuższych długości fali światła (red shift), zmniejszenie jego głębokości oraz zmianę płaszczyzny polaryzacji. Pomiar odbywa się przy stałym kącie, przy którym różnice reflektancji ( $r_{Au}$ ,  $r_R$ ,  $r_A$ ) dla poszczególnych warstw na powierzchni sensora są największe. Wynikiem pomiarów techniką SPR w wersji Imaging jest różnica w intensywności obrazów otrzymywanych z kamery CCD dla warstwy receptorowej i po interakcji z badanym analitem. Pozwala to na wykorzystanie właściwości chemicznych powierzchni złota lub srebra do celów badawczych lub analitycznych m.in. przez konstruowanie biosensorów do oznaczania różnych biomarkerów. Zasadę pomiaru techniką SPRi przedstawia Rysunek 1.





**Rysunek 1.** Zasada pomiaru techniką SPRI,  $r_{Au}$ ,  $r_R$ ,  $r_A$  do wartości reflektancji odpowiednio dla warstwy złota, warstwy receptorowej oraz warstwy analitu.

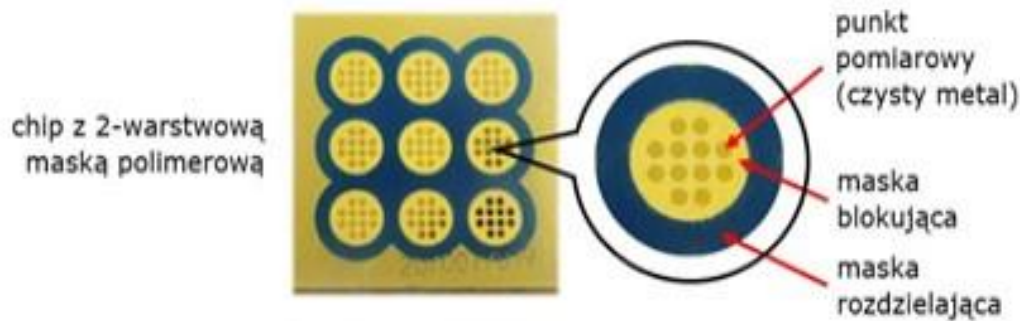
Typowy biosensor posiada umieszczoną na swojej powierzchni warstwę receptorową - ligand. Ligand wiąże anality znajdujące się w badanym roztworze. Ligandem może być przeciwciało specyficzne względem danego analitu, inhibitor tego analitu lub aptamer specyficzny względem analitu. Ligand jest związany ze złotym lub srebrnym chipem za pośrednictwem związku określanego jako linker. Często linkerem jest dwufunkcyjny tiol. Drugą grupą funkcyjną jest grupa aminowa lub karboksylowa. Ogólny schemat budowy części biologicznej biosensora przedstawia Rysunek 2. Innym rozwiązaniem jest stosowanie tiolu zawierającego długi łańcuch alkilowy. Tiolowa grupa wiąże się ze złotym podłożem, podczas gdy drugi koniec molekuly linkera służy do silnego związania z receptorem. Związanie kowalencyjne wiązaniem amidowym jest najczęściej dokonywane poprzez zastosowanie tzw. procedury EDC/NHS. Jest to najczęściej stosowane rozwiązanie jeśli ligandem jest przeciwciało. W przypadku braku grup funkcyjnych liganda może on być związany z chipem za pośrednictwem oddziaływań hydrofobowych, które zapewnia tiol zawierający długi łańcuch alkilowy.



**Rysunek 2.** Ogólny schemat struktury części biologicznej biosensora SPR.

Metoda opierająca się na detekcji matrycowego powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji obrazowej (SPRi) jest opracowywana w celu analitycznego oznaczania różnych biomarkerów. Matrycą jest wiązka dużej liczby punktów pomiarowych, izolowanych od siebie. Punkty te są zorganizowane w ten sposób, że tworzą kilka (najczęściej 9) celek pomiarowych, z których każda obejmuje 12 punktów pomiarowych. Pozwala to na prowadzenie kilku (9) oznaczeń równocześnie. W każdej z celek pomiarowych wynikiem oznaczania jest mediana 12 wyników, co znacząco poprawia precyzję oznaczania. Użyto też dwóch masek polimerowych: jedną rozdzielającą poszczególne pola pomiarowe, a drugą tzw. blokującą (do blokowania powierzchni między poszczególnymi miejscami aktywnymi).

Podstawę biosensora przedstawia Rysunek 3.



**Rysunek 3.** Budowa podstawy biosensora SPRi.

Pierwszym etapem procesu pomiarowego jest wytworzenie biosensora, co jest dokonywane *ex situ*. Jest to różnica w porównaniu do innej powszechnie stosowanej techniki SPR czyli przepływowej SPR, w której wytworzenie biosensora następuje *in situ*. Następnym etapem procesu pomiarowego jest naniesienie na biosensor roztworu (np. surowicy krwi) zawierającego analit. Na tym etapie następuje wyłapanie analitu z roztworu. Po odczekaniu czasu niezbędnego do wyłapania analitu (< 10min), roztwór (surowica) zostaje usunięty, a powierzchnia przepłukana. Pomiar następuje po usunięciu medium przepłukującego. Jest to różnica w odniesieniu do przepływowej wersji SPR, w której pomiar SPR następuje w obecności roztworu. Różnice między matrycową a przepływową SPR powodują, że matrycowa SPRi charakteryzuje się możliwością oznaczania niższych stężeń bez konieczności zateżnienia analitu czy wzmacniania sygnału.

Oznaczanie konstytutywnego proteasomu 20S może być dokonane za pomocą techniki matrycowej SPRi oraz biosensora zawierającego zimmobilizowany inhibitor PSI jako ligand [25], związany kowalencyjnie ze złotą warstwą chipa za pośrednictwem linkera – cysteaminy. Immunoproteasom 20Si jest oznaczany matrycową techniką SPRi i biosensorem zawierającym inhibitor ONX 0914 zimmobilizowany za pomocą linkera ODM (1-oktadekanotiol), dzięki oddziaływaniom hydrofobowym między inhibitorem i linkerem [26,27]. Pozostałe biomarkery (UCH-L1, katepsyna S, fibronektyna, neuropilina-1 oraz leptyna) oznaczane są z zastosowaniem matrycowej SPRi i zimmobilizowanych odpowiednich specyficznych przeciwciał. W przypadku UCH-L1 jest to szczurze monoklonalne przeciwciało specyficzne na ludzki UCH-L1 [28]; w przypadku katepsyny S jest to szczurze monoklonalne przeciwciało specyficzne na ludzką katepsynę S [29] w przypadku fibronektyny jest to królicze poliklonalne przeciwciało specyficzne na ludzką fibronektynę [30] dla neuropiliny-1 jest to mysie monoklonalne przeciwciało przeciw neuropilinie-1; w przypadku leptyny jest to królicze

monoklonalne przeciwciało specyficzne na ludzką leptynę [31]. We wszystkich przypadkach przeciwciało jest zimmobilizowane na powierzchni chipa za pośrednictwem linkera – cysteaminy.

## 5. Cele pracy

Celem badań podjętych w ramach pracy doktorskiej było:

1. Skonstruowanie nowego panelu biosensorów współpracujących z matrycową techniką SPRi jako nowej metody, do diagnostyki stwardnienia rozsianego na podstawie oznaczania wybranych potencjalnych biomarkerów w osoczu krwi pacjentów. Były to: konstytutywny proteasom 20Sc, immunoproteasom 20Si, C-końcowa hydrolaza L1 ubikwityny, katepsyna S, fibronektyna, leptyna oraz neuropilina-1.
2. Określenie przydatności diagnostycznej wybranych potencjalnych biomarkerów w diagnostyce stwardnienia rozsianego, możliwości ustalenia stadium choroby oraz częstotliwości nawrotów choroby.

## **6. Materiał i metody**

Zgodę na badanie uzyskano od Lokalnej Komisji Bioetycznej (nr zezwolenia: APK.002.282.2021). Procedury były zgodne ze standardami etycznymi określonymi w Deklaracji Helsińskiej wydanej przez Światowe Stowarzyszenie Medyczne. Od wszystkich uczestników badania uzyskano pisemną świadomą zgodę. Zgodnie z polskimi standardami medycznymi pobranie płynu mózgowo-rdzeniowego poprzez nakłucie lędźwiowo-krzyżowe może być wykonane wyłącznie w warunkach szpitalnych, ponieważ jest to zabieg inwazyjny. W związku z tym Lokalna Komisja Bioetyczna wyraziła zgodę jedynie na pobieranie krwi od pacjentów, a pobranie płynu mózgowo-rdzeniowego od pacjentów ze stwardnieniem rozsianym i zdrowych ochotników nie było możliwe.

### **6.1 Charakterystyka badanych grup pacjentów**

Grupę badaną stanowiło 100 pacjentów, którzy przebywali w okresie 24-miesięcznej obserwacji w Przychodni Neurologicznej w Białymstoku. Pacjenci kwalifikujący się do badania spełniali kryteria rozpoznania stwardnienia rozsianego McDonald's z 2017 roku. W grupie stwardnienia rozsianego znajdowało się 36 mężczyzn i 64 kobiety. Kryterium włączenia stanowił wiek w przedziale 19–58 lat (mediana: 42 lata) i zdiagnozowana postać stwardnienia rozsianego typu rzutowo-remisyjnego (RRMS). Ta kliniczna postać stwardnienia rozsianego charakteryzuje się ostrymi rzutami (nawrotami), po których następuje częściowy lub całkowity powrót do zdrowia (remisje). W trakcie 2-letniej obserwacji u chorych na stwardnienie rozsiane zaobserwowano 0–6 nawrotów choroby.

Od wszystkich pacjentów z RRMS w remisji pobierano próbki krwi tylko wtedy, gdy pomiędzy atakami nie wystąpiło pogorszenie funkcji neurologicznych. Inne informacje kliniczne charakteryzujące grupę badaną to skala EDSS mieszcząca się w przedziale od 2 do 4 (mediana: 3,5 roku), liczba lat jakie upłynęły do pobrania krwi: od pierwszych objawów stwardnienia rozsianego w zakresie od 3 do 12 (mediana: 8 lat) i od rozpoznania stwardnienia rozsianego w zakresie od 1 do 8 (mediana: 4 lata).

Utworzono grupę kontrolną składającą się z 46 zdrowych osób (15 mężczyzn i 31 kobiet). Uczestnicy, których mediana wieku wynosiła 41 lat i przedział wiekowy od 19 do 64 lat, zostali dobrani do grupy badanej pod względem płci i wskaźnika masy ciała (BMI). Dodatkowo grupa kontrolna spełniała te same kryteria wykluczenia co grupa badana.

	<b>SM</b>	<b>Grupa kontrolna</b>
Płeć	Mężczyźni 36(38%)	Mężczyźni 15(33%)
	Kobiety 64 (62%)	Kobiety 31 (67%)
Wiek* (lata)	42 (32-50)	46 (32-50)
Typ stwardnienia rozsianego	RRMS 100 (100%)	Nie dotyczy
Rzut/ remisja (%)	Rzut 0 (0%)	Nie dotyczy
	Remisja 100 (100%)	Nie dotyczy
EDSS*	3,5 (2-4)	Nie dotyczy
Liczba lat od pierwszych symptomów stwardnienia rozsianego do pobrania krwi*	8 (3-12)	Nie dotyczy
Liczba lat od zdiagnozowania stwardnienia rozsianego do pobrania krwi*	4 (1-8)	Nie dotyczy

**Tabela 1.** Demograficzne i kliniczne dane pacjentów z RRMS oraz grupy kontrolnej.

RRMS – rzutowo-remisyjne stwardnienie rozsiane

EDSS – rozszerzona skala statusu niepełnosprawności wg Kurtzke'go

\*wyniki przytoczone jako mediana między 25 a 75 percentylem

## 6.2 Pobieranie i przechowywanie próbek

Próbki krwi pobierano do probówek z kwasem etylenodiaminotetraoctowym (EDTA), a następnie odwirowano ( $3000 \times g$ ,  $4^{\circ}C$ , 5 min) w celu uzyskania osocza. Porcje (0,5 ml) próbek osocza przeniesiono do probówek i zamrożono, a następnie przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}C$  do czasu analizy.

### **6.3 Oznaczanie stężeń proteasomu konstytutywnego 20S i immunoproteasomu**

Pomiary ilościowe konstytutywnego proteasomu 20S i immunoproteasomu 20Si przeprowadzono przy użyciu biosensorów współpracujących z techniką matrycowego powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji obrazowej (SPRi).

Szczegółowy sposób przygotowania biosensorów do badań opisano w artykułach [26,27]. Oznaczono stężenie całkowitego proteasomu 20S gdzie ligandem był inhibitor PSI (Z-Ile-Glu (OBut)-Ala-Leu-H) immobilizowany na tiolu-cysteaminie (chlorowodoru cysteaminy), natomiast ligandem dla immunoproteasomu 20Si był inhibitor ONX 0914 zimmobilizowany kowalencyjnie za pośrednictwem linkera tiolu-ODM (1-oktadekanotiol). Przygotowany do doświadczeń biosensor przemyto wodą i roztworem buforowym HBS-ES. Anality rozcieńczono w celu dopasowania do krzywej kalibracyjnej (proteasom całkowity 20S: 0,5 µg/ml – 6,0 µg/ml, immunoproteasom 20Si: 0,35 µg/ml – 4,2 µg/ml). W związku z tym badane próbki poddano następującym rozcieńczeniom (stosunek objętości, zarówno dla proteasomu konstytutywnego 20S, jak i immunoproteasomu 20S): próbki pacjentów 1:10 i grupa kontrolna 1:1. Zastosowanym buforem do rozcieńczania był 0,15 M PBS. Maksymalny czas interakcji pomiędzy analitem a receptorem wynosił 10 minut.

Stężenie proteasomu konstytutywnego oznaczono z różnicy otrzymanych stężeń proteasomu całkowitego i immunoproteasomu.

Przeprowadzono również kontrolę nieswoistego wiązania na powierzchni każdego biosensora, stosując miejsca biosensora z buforem PBS. Schematyczny obraz zastosowanego sprzętu przedstawiono w artykule [29].

### **6.4 Oznaczanie stężeń UCHL1, katepsyny S, fibronektyny i leptyny**

Podczas oznaczeń jako ligandy zastosowano: królicze przeciwciało monoklonalne przeciwko UCH-L1, szczurze przeciwciało monoklonalne specyficzne dla ludzkiej katepsyny S, królicze przeciwciało antyfibronektynowe oraz królicze przeciwciało przeciwko leptynie. Warunki doświadczenia były identyczne jak zastosowane w artykułach dotyczących konstrukcji biosensorów [28-31]. Do przygotowania biosensorów złoty chip zmodyfikowano warstwą cysteaminy (linker). Następnie roztwór przeciwciał w buforze PBS (wartość stężenia: 10 µg/ml dla UCH-L1; 4 µg/ml dla fibronektyny i 60 ng/ml dla leptyny) aktywowano NHS (50 mM) i EDC (200 mM) w środowisku buforu węglanowego (pH = 8,50) i umieszczono na warstwie cysteaminy. Tak przygotowany chip inkubowano w temperaturze 37°C przez 1 godzinę. Po inkubacji biosensor przepłukano wodą i roztworem buforowym HBS-ES (pH = 7,40). Próbki osocza rozcieńczano buforem PBS bezpośrednio przed pomiarem (w celu

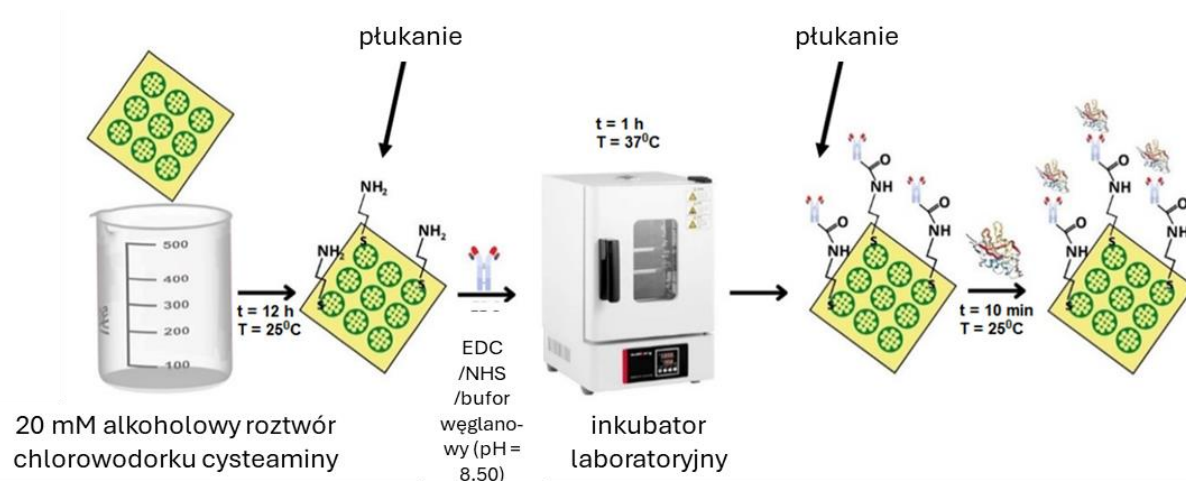


oznaczenia UCHL1: 2–10 razy, katepsyny S: 10 razy (kontrola 1:1), fibronektyny: 1000 razy i leptyny: 2–5 razy). Rozcieńczone próbki osocza nanoszono bezpośrednio na miejsce aktywne przygotowanego biosensora i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Po tym czasie niezwiązane cząsteczki usunięto z powierzchni biosensora poprzez przemycie wodą i buforem HBS-ES.

Na podstawie otrzymanych sygnałów SPRi odczytano stężenia z wcześniej przygotowanych krzywych kalibracyjnych biorąc pod uwagę zastosowane rozcieńczenia. Liniowy zakres krzywych wynosił 0,5–3,0 ng/ml ( $R^2 = 0,9867$ ) dla UCH-L1, 0,05–1,5 ng/ml dla katepsyny S, 5,00–400 ng/ml ( $R^2 = 0,9968$ ) dla fibronektyny i 0,1–10 ng/ml dla leptyny ( $R^2 = 0,9954$ ). Kontrolę nieswoistego wiązania na powierzchni każdego biosensora przeprowadzono wykorzystując miejsca biosensora z buforem PBS.

### **6.5 Przygotowanie biosensora SPRi do oznaczeń neuropiliny**

Bazą do przygotowania biosensora były chipy, w których na szklanej płytce została naniesiona cienka warstwa złota (50 nm). Pierwszym etapem procedury, była immobilizacja linkera – cysteaminy na powierzchni chipa. W tym celu chip został zanurzony w etanolewym roztworze cysteaminy o stężeniu 20 mM na minimum 12 h w temperaturze pokojowej. Po upływie 12 godzin chip był przemyty bezwodnym etanolem i wodą. Następnym etapem była immobilizacja mysiego monoklonalnego przeciwciała przeciw neuropiline-1. W tym celu roztwór przeciwciała o odpowiednim stężeniu aktywowano NHS (50 mM) i EDC (200 mM) w środowisku buforu węglanowego (pH = 8,50) i umieszczano na warstwie cysteaminy. Tak przygotowany biosensor umieszczano w inkubatorze w temperaturze 37°C na okres 1 h, po czym był on przemywany buforem HBS-ES a następnie wodą, w celu usunięcia niezwiązanego przeciwciała. W celu wyeliminowania niespecyficznego adsorpcji, przygotowany biosensor był poddany obróbce roztworem BSA o stężeniu 1mg/ml i przemyty wodą destylowaną – [1B]. Schemat przygotowania biosensora przedstawia Rysunek 4.



**Rysunek 4.** Schemat przygotowania biosensora czułego na neuropilinę-1.

## 6.6 Przetwarzanie danych

Uzyskane w wyniku badań techniką SPRi obrazy miejsc aktywnych biosensorów poddano obróbce przy użyciu programu NIH ImageJ 1.32 z aktualizacją do wersji 1.50i (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA, <http://imagej.nih.gov/ij> , Java 1.8.0\_181 (32-bitowy), 4990 K z 640 MB (< 1%).

## 6.7 Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu STATISTICA PL wersja 13.3 (StatSoft Inc., Tulsa, USA) i oprogramowania GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software, San Diego, USA). Wszystkie wyniki przedstawiono jako medianę z 25. i 75. percentylem. Do analizy rozkładu danych wykorzystano test normalności Shapiro-Wilka. Dane niegaussowskie analizowano za pomocą nieparametrycznego testu U Man-Whitneya lub testu H Kruskala – Wallisa. Do analizy współczynników korelacji wykorzystano metodę rang Spearmana. Różnice uznano za istotne statystycznie, gdy  $p < 0,05$ .

## 7. Wyniki i dyskusja

### 7.1 Oznaczanie stężeń konstytutywnego proteasomu 20Sc, immunoproteasomu 20Si, UCHL1, katepsyny S, fibronektyny oraz leptyny.

Zbadano stężenie konstytutywnego proteasomu 20Sc, immunoproteasomu 20Si, UCHL1, katepsyny S, fibronektyny oraz leptyny w osoczu krwi pacjentów ze stwardnieniem rozsianym oraz wolontariuszy z grupy kontrolnej, stosując technikę matrycowego SPRi współpracującego z biosensorymi specyficznymi dla danego biomarkera [1A, 2A]. Wyniki zebrano w Tabelach 2, 3 i 4.

	20Sc [µg/ml]		20Si [µg/ml]	
	SM	C	SM	C
Mediana	21,362	1,267	21,763	0,976
Percentyle (25%-75%)	13,443- 27,336	0,988–2,286	10,076– 35,942	0,782 – 1,586
p*	<0.0001		<0.0001	
Krotność wzrostu	16,860		22,670	

**Tabela 2.** Wyniki oznaczania stężenia proteasomu 20Sc i 20Si w osoczu pacjentów ze stwardnieniem rozsianym (SM) oraz grupy kontrolnej (C) – [2A].

SM - pacjenci ze stwardnieniem rozsianym

C - kontrolna grupa

\* - wartość  $p < 0.05$  świadczy o istotnej różnicy porównywanych wartości

	UCH-L1 [ng/ml]		Katepsyna S [ng/ml]	
	SM	C	SM	C
Mediana	16,89	4,07	9,995	1,180
Percentyle (25%-75%)	13,66-19,06	3,57-4,34	8,433-11,647	1,004-1,403
p*	<0,001		<0,0001	
Krotność wzrostu	4,15		8,470	

**Tabela 3.** Wyniki oznaczania UCH-L1 i katepsyny S w osoczu pacjentów ze stwardnieniem rozsianym (SM) oraz grupy kontrolnej (C) – [1A i 2A].

SM - pacjenci z stwardnieniem rozsianym

C - kontrolna grupa

\* - wartość  $p < 0.05$  świadczy o istotnej różnicy porównywanych wartości

	Fibronektyna [ng/ml]		Leptyna [ng/ml]	
	SM	C	SM	C
Mediana	232,29	126,93	14,44	11,08
Percentyle (25%-75%)	213,57- 252,40	111,29- 144,10	10,63-17,82	7,97-13,88
p*	<0,001		<0,001	
Krotność wzrostu	1,83		1,30	

**Tabela 4.** Wyniki oznaczania fibronektyny oraz leptyny w osoczu pacjentów ze stwardnieniem rozsianym (SM) oraz grupy kontrolnej (C) – [1A].

SM - pacjenci z stwardnieniem rozsianym

C - kontrolna grupa

\* - wartość  $p < 0.05$  świadczy o istotnej różnicy porównywanych wartości

Zbadano także stężenie konstytutywnego proteasomu 20Sc, immunoproteasomu 20Si, UCH-L1, katepsyny S, fibronektyny oraz leptyny w osoczu krwi pacjentów ze stwardnieniem rozsianym o różnym stopniu zaawansowania choroby.

Wyniki tych badań przedstawiono w Tabelach 5, 6 i 7.

EDSS	1-2,5	3-4,5	5-6,5
Konstytutywny 20Sc proteasom [ $\mu\text{g/ml}$ ]	23,931 (14,477-30,707)	22,508 (15,043-27,672)	23,278 (5,233-26,501)
Immunoproteasom 20Si [ $\mu\text{g/ml}$ ]	20,701 (17,990-23,047)	21,104 (16,541-24,101)	21,913 (15,655-25,702)

**Tabela 5.** Wyniki stężeń proteasomu 20Sc i 20Si w osoczu krwi w zależności od stopnia zaawansowania SM (dane przedstawione jako mediana oraz percentyle (25%-75%) – [2A].

EDSS 1 - 2,5 Od braku niepełnosprawności z minimalnymi symptomami - do minimalnej niepełnosprawności

EDSS 3 - 4,5 Od umiarkowanej - do stosunkowo zaawansowanej niepełnosprawności

EDSS 5 - 6,5 Od niepełnosprawności zakłócającej codzienną aktywność - do potrzeby pomocy przy chodzeniu i pracy

EDSS	1-2,5	3-4,5	5-6,5
UCH-L1 [ng/ml]	16,14 (13,33-18,95)	15,67 (13,54-18,27)	17,03 (16,18-18,18)
Katepsyna S [ng/ml]	9,80 (7,65-11,31)	9,86 (8,45-11,49)	9,10 (6,90-10,87)

**Tabela 6.** Wyniki stężeń UCH-L1 i katepsyny S w osoczu krwi w zależności od stopnia zaawansowania SM (dane przedstawione jako mediana oraz percentyle (25%-75%) - [2A].

EDSS 1 - 2,5 Od braku niepełnosprawności z minimalnymi symptomami – do minimalnej niepełnosprawności

EDSS 3 - 4,5 Od umiarkowanej – do stosunkowo zaawansowanej niepełnosprawności

EDSS 5 - 6,5 Od niepełnosprawności zakłócającej codzienną aktywność - do potrzeby pomocy przy chodzeniu i pracy

EDSS	1-2,5	3-4,5	5-6,5
Fibronektyna [ng/ml]	232,4 (211,0-246,1)	230,4 (217,4-251,8)	226,9 (214,4-244,8)
Leptyna [ng/ml]	14,22 (10,33-17,67)	12,60 (10,39-15,84)	13,78 (10,65-17,48)

**Tabela 7.** Wyniki stężeń fibronektyny i leptyny w osoczu krwi w zależności od stopnia zaawansowania SM (dane przedstawione jako mediana oraz percentyle (25%-75%) - [1A].

EDSS 1 - 2,5 Od braku niepełnosprawności z minimalnymi symptomami - do minimalnej niepełnosprawności

EDSS 3 - 4,5 Od umiarkowanej – do stosunkowo zaawansowanej niepełnosprawności

EDSS 5 - 6,5 Od niepełnosprawności zakłócającej codzienną aktywność - do potrzeby pomocy przy chodzeniu i pracy

Dla wybranych trzech biomarkerów: konstytutywnego proteasomu 20Sc, immunoproteasomu 20Si oraz katepsyny S zbadano ich stężenie w osoczu krwi pacjentów z stwardnieniem rozsianym w zależności od częstotliwości rzutów choroby. Wyniki przedstawiono w Tabeli 8.

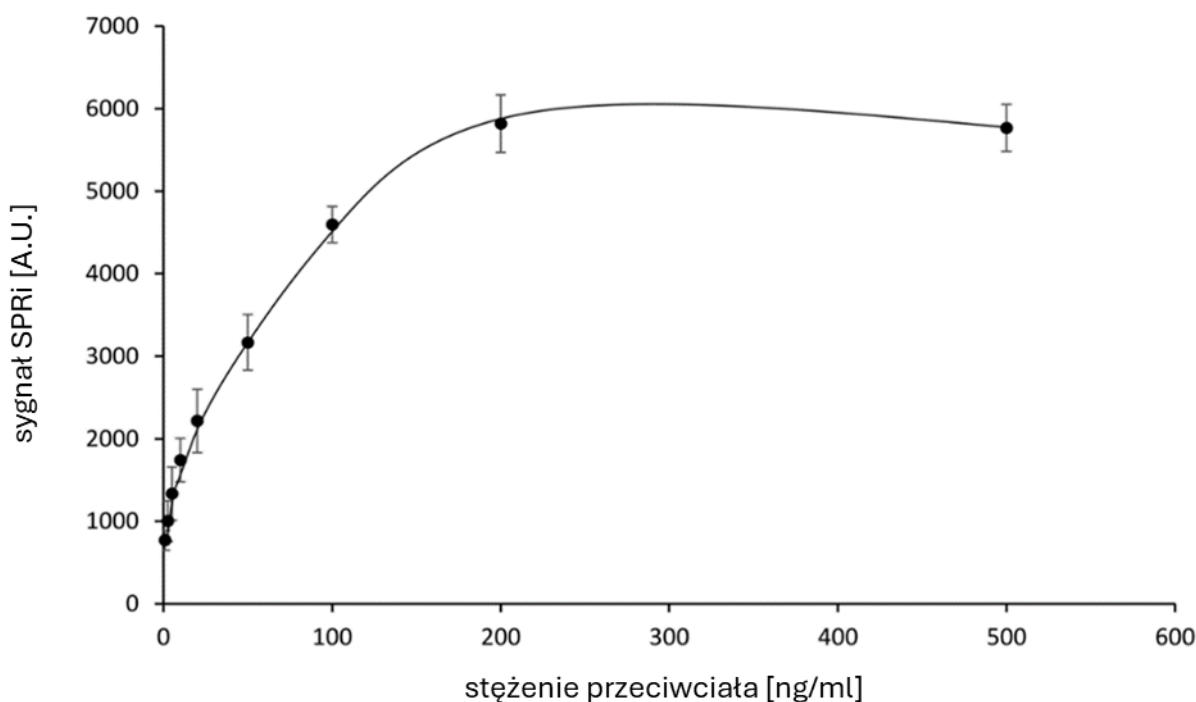
	Ostatnie rzuty więcej niż przed 24 miesiącami	Ostatnie rzuty w okresie ostatnich 24 miesiące	p
Konstytutywny proteasom 20Sc [µg/ml]	21,36 (15,02-27,67)	22,85 (11,51-29,46)	0,8225
Immunoproteasom 20Si [µg/ml]	22,39 (17,79-25,70)	20,51 (16,42-24,25)	0,3800
Katepsyna S [ng/ml]	9,638 (7,932-10,98)	10,61 (8,417-12,49)	0,0855

**Tabela 8.** Zależność stężenia konstytutywnego proteasomu 20Sc, immunoproteasomu 20Si oraz katepsyny S od częstotliwości rzutów choroby – [2A].

## 7.2. Zwalidowanie biosensora SPRi do oznaczeń neuropiliny-1

### 7.2.1 Optymalizacja stężenia mysiego monoklonalnego przeciwciała przeciw neuropiline-1.

Stężenie przeciwciała stosowanego jako receptor decyduje o liczbie aktywnych miejsc biosensora. Badania optymalizacyjne przeprowadzono w zakresie stężeń przeciwciała od 1 ng/ml do 500 ng/ml stosując do rozcieńczeń bufor PBS. Pomiary wykonano przy pH = 7,40. Roztwory przeciwciała o określonym stężeniu nanoszono na aktywne miejsca chipa i dokonywano immobilizacji przeciwciała. W celu immobilizacji roztwór przeciwciała o odpowiednim stężeniu aktywowano NHS (50 mM) i EDC (200 mM) w środowisku buforu węglanowego (pH = 8,50) i umieszczano na warstwie cysteaminy. Tak przygotowany biosensor umieszczano w inkubatorze w temperaturze 37°C na okres 1 h, po czym był on przemywany buforem HBS-ES a następnie wodą, w celu usunięcia niezwiązanego przeciwciała. Tak otrzymany biosensor był traktowany roztworem neuropiliny-1 o stężeniu 5 ng/ml. Dokonywano pomiaru SPRi. Otrzymane wyniki przedstawiono na Rysunku 5.

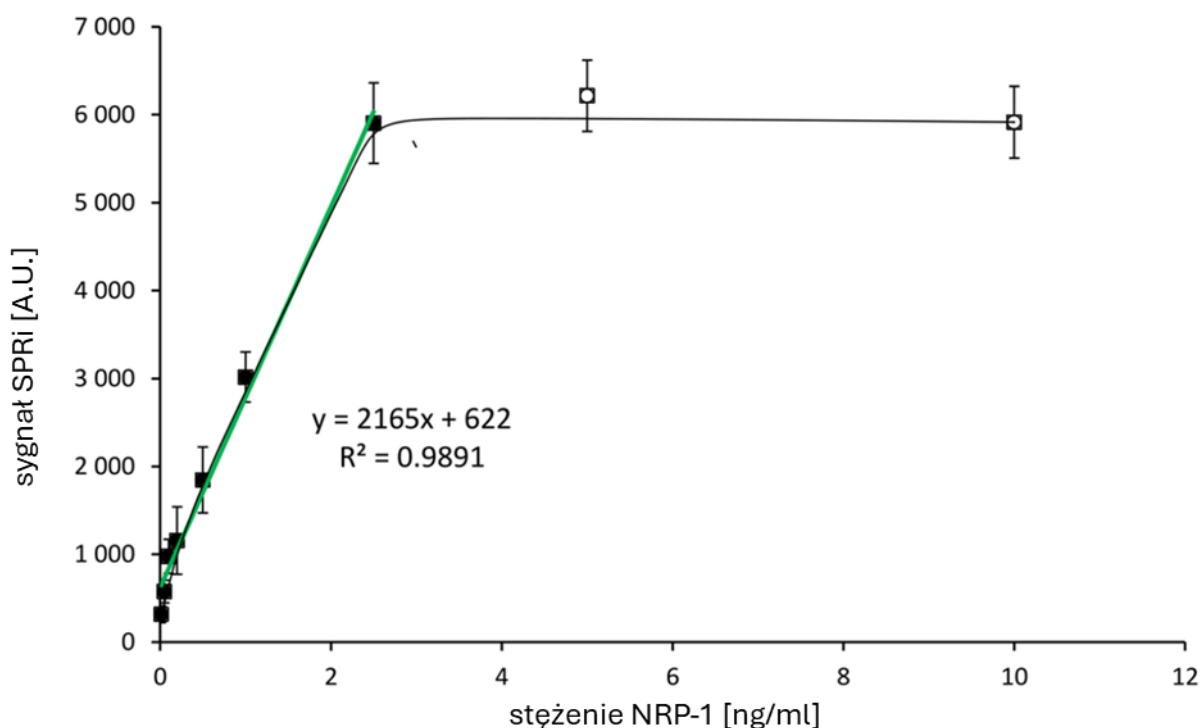


**Rysunek 5.** Zależność sygnału SPRi od stężenia mysiego monoklonalnego przeciwciała przeciw neuropiline-1. Stężenie neuropiliny-1: 5 ng/ml, pH = 7,40.

Jak można było oczekiwać, sygnał biosensora zależy od zastosowanego stężenia przeciwciała. Zależność może być scharakteryzowana jako krzywa typu izotermy Langmuira, z wyraźnie zarysowanym plateau. Zastosowanie stężenia przeciwciała wyższego od 200 ng/ml nie prowadzi do podwyższenia sygnału SPRi. Dlatego tą wartość przyjęto jako optymalną w dalszych badaniach.

### 7.2.2 Zależność sygnału SPRi biosensora od stężenia neuropiliny-1.

Zależność sygnału od stężenia analitu jest kluczowa dla perspektyw wykorzystania biosensora do analizy ilościowej. Zależność sygnału SPRi od stężenia neuropiliny-1 badano w zakresie stężeń neuropiliny-1 od 0,01 do 10 ng/ml. Stężenia te uzyskiwano przez rozcieńczanie wzorca buforem PBS. Badania wykonano stosując biosensor otrzymany przy zastosowaniu mysiego monoklonalnego przeciwciała przeciw neuropiline-1 o stężeniu 200 ng/ml. Otrzymane wyniki przedstawiono na Rysunku 6.



**Rysunek 6.** Krzywa kalibracyjna neuropiliny-1. Stężenie mysiego monoklonalnego przeciwciała przeciw neuropiline-1: 200 ng/ml, pH = 7,40.

Otrzymana krzywa reprezentuje zależność typu izotermy Langmuira, co jest związane z stopniowym wykorzystywaniem receptorowych miejsc biosensora. Dla stężeń neuropiliny-1 powyżej 2,5 ng/ml ukształtowało się plateau. Początkowy fragment krzywej kalibracyjnej jest liniowy, zgodnie z izotermą Henry’ego i charakteryzuje się  $R^2 = 0,9891$ . Zatem ten fragment krzywej kalibracyjnej obejmujący stężenia od 0,01 do 2,5 ng/ml może być wygodnie stosowany do oznaczeń ilościowych. Równanie tej prostej opisuje wzór:

$$y = 2165 x + 622.$$

gdzie: x- stężenie neuropiliny-1 w ng/ml, y – SPRi sygnał w A.U.

### 7.2.3 Wyznaczanie precyzji, odzysku, limitu detekcji oraz limitu oznaczalności biosensora.

Wyznaczenie podstawowych parametrów analitycznych opracowanego biosensora wykonano dokonując pomiarów stężenia neuropiliny -1 w serii próbek o zadanym stężeniu biomarkera. Badania wykonano dla 5 próbek o różnych stężeniach w przedziale od 0,05 do 2,5 ng/ml neuropiliny-1. Każdy pomiar stężenia powtórzono 12-krotnie. Uzyskane wyniki zebrano w Tabeli 9.

Seria pomiarowa	Dodatek neuropiliny-1 [ng/ml]	Oznaczono [ng/ml]	SD [ng/ml]	RSD [%]	Odzysk [%]
1	0,050	0,052	0,003	5,8	104
2	0,500	0,517	0,025	4,8	103
3	1,00	0,965	0,044	4,6	97
4	2,00	1,96	0,097	4,7	98
5	2,50	2,44	0,084	3,4	98

**Tabela 9.** Precyzja i odzysk oznaczania neuropiliny-1 techniką matrycową SPRi z zastosowaniem opracowanego biosensora.

Jak wynika z zamieszczonej wyżej Tabeli 9, odzyski wprowadzonych dodatków mieszczą się w przedziale 97 - 104%, co może być uznane za dobry wynik. Precyzja oznaczania mieści się w przedziale 3,4 - 5,8%, najlepsza precyzja dotyczy wyższych stężeń, a najgorsza-najniższych co jest typowe w tego rodzaju oznaczeniach. Limit wykrywalności określany jako  $3 \times SD$  tła wynosi 0,09 ng/ml, a limit wykrywalności określany jako  $10 \times SD$  – 0,030 ng/ml. Zatem zakres dynamicznej liniowej odpowiedzi mieści się w przedziale 0,030– 2,50 ng/ml.



#### 7.2.4 Badanie specyficzności przygotowanego biosensora do oznaczania neuropiliny -1.

Opracowany biosensor nie tworzy sygnału analitycznego z neuropiliną-2 (1 ng/ml oraz 10 ng/ml), albuminą (1, 10 oraz 100 ng/ml), a także z czynnikiem wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF-A) (0,01, 0,10, 1,00 oraz 10,0 ng/ml). Neuropilina-1 wchodzi w interakcje z VEGF-A. Dlatego wykonano serie pomiarów stężenia neuropiliny-1 w równoczesnej obecności różnych stężeń VEGF-A odpowiadających proporcji od 100:1 do 1:10. Wyniki zebrano w Tabeli 10.

Dodatek neuropiliny-1 [ng/ml]	Dodatek VEGF-A [ng/ml]	Oznaczono neuropiliny-1 [ng/ml]	Odzysk [%]
1	0,01	0,98	98
1	0,10	0,85	85
1	1,00	0,36	36
1	10,0	<0,01	<1

**Tabela 10.** Wpływ VEGF-A na oznaczanie neuropiliny-1.

Jak wynika z Tabeli 10, obserwuje się silny wpływ VEGF-A na oznaczanie neuropiliny-1. Obecność 10-krotnego nadmiaru interferenta całkowicie wygasza sygnał neuropiliny-1. Tylko w obecności 100-krotnego nadmiaru neuropiliny-1 względem VEGF-A odzysk może być uznany za akceptowalny.

Niewątpliwie VEGF-A wiąże neuropilinę-1. Postanowiono jednak sprawdzić, czy VEGF-A zwiąże neuropilinę-1 już wychwyconą przez opracowany biosensor. W tym celu wykonano serie eksperymentów, w których wprowadzono VEGF-A już po immobilizacji neuropiliny-1, utrzymując proporcje neuropiliny-1 i VEGF-A takie same jak w poprzednim eksperymencie. Wyniki przedstawiono w Tabeli 11.

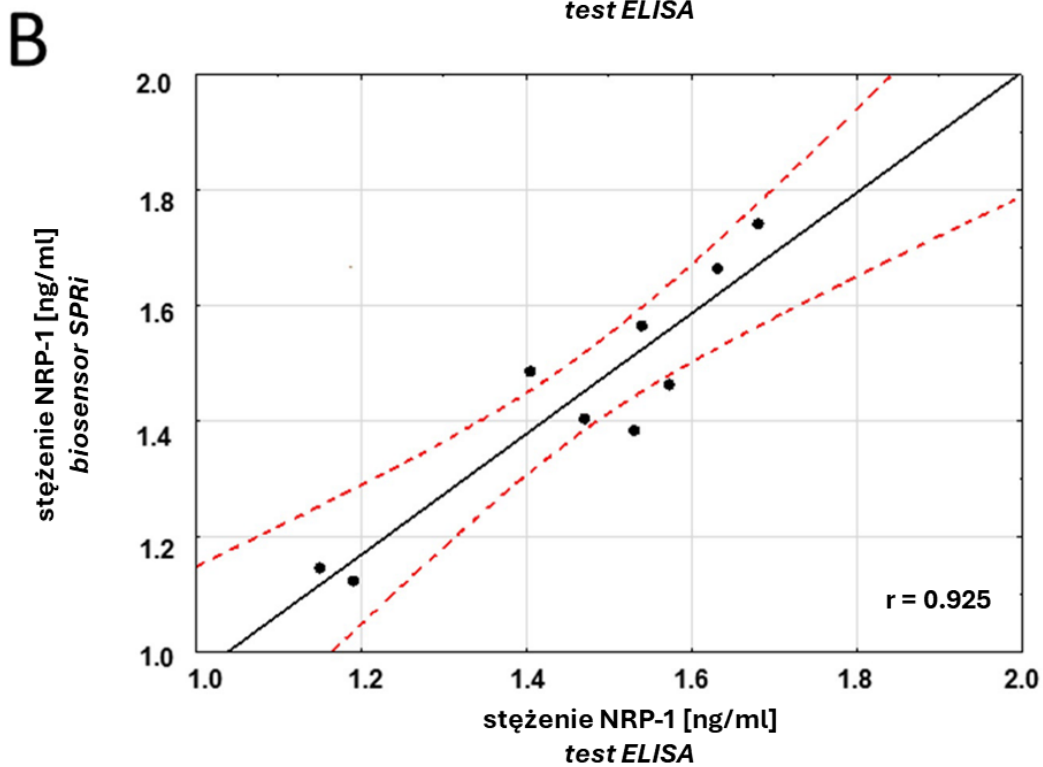
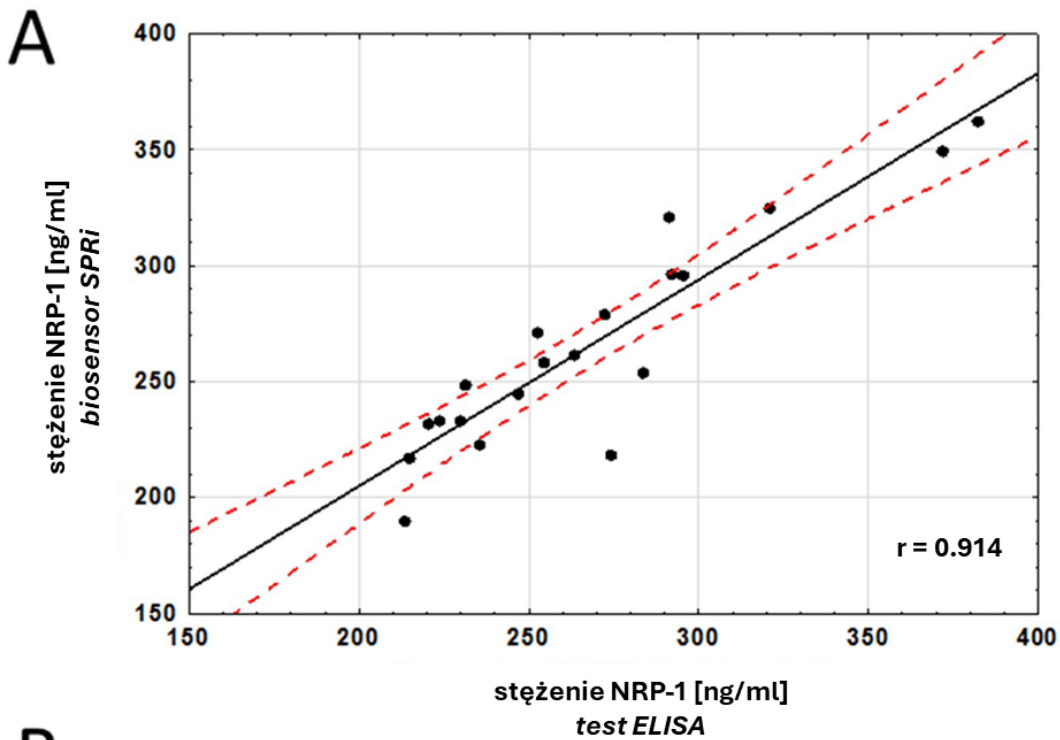
Dodatek neuropiliny-1 [ng/ml]	Dodatek VEGF-A [ng/ml]	Oznaczono neuropiliny-1 [ng/ml]	Odzysk [%]
1	0,01	1,04	103
1	0,10	1,06	106
1	1,00	1,07	107
1	10,0	1,05	105

**Tabela 11.** Wpływ VEGF-A na oznaczanie neuropiliny-1 po jej immobilizacji.

Jak można wywnioskować z przeprowadzonych pomiarów, VEGF-A nie wpływa na oznaczanie neuropiliny-1 wcześniej zimmobilizowanej na opracowanym biosensorze.

#### **7.2.5 Oznaczanie neuropiliny-1 w próbkach naturalnych.**

Decydującym testem stosowalności opracowanego biosensora było oznaczanie neuropiliny-1 w próbkach osocza pacjentów ze stwardnieniem rozsianym. Próbki takie zawierają bardzo dużą liczbę znanych i nieznanymi potencjalnych interferentów. Badaniom poddano 20 próbek osocza. Poza oznaczaniem neuropiliny-1 matrycową techniką SPRi z zastosowaniem opracowanego biosensora, próbki te oznaczono równolegle za pomocą testów ELISA, tym samym dokonując walidacji opracowanego biosensora. Uzyskane wyniki przedstawiono na Rysunku 7.

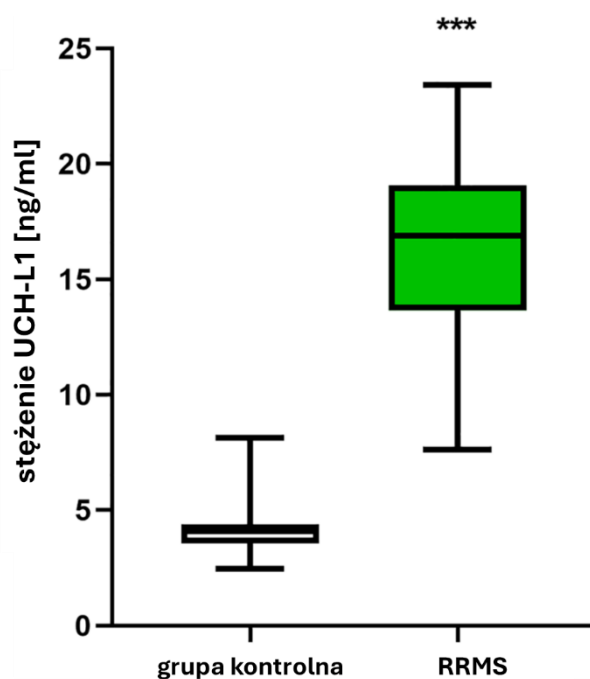


**Rysunek 7.** Korelacja wyników oznaczania neuropiliny-1 w osoczu pacjentów ze stwardnieniem rozsianym - A oraz grupy kontrolnej - B matrycową techniką SPRi z zastosowaniem opracowanego biosensora oraz za pomocą immunotestów ELISA.

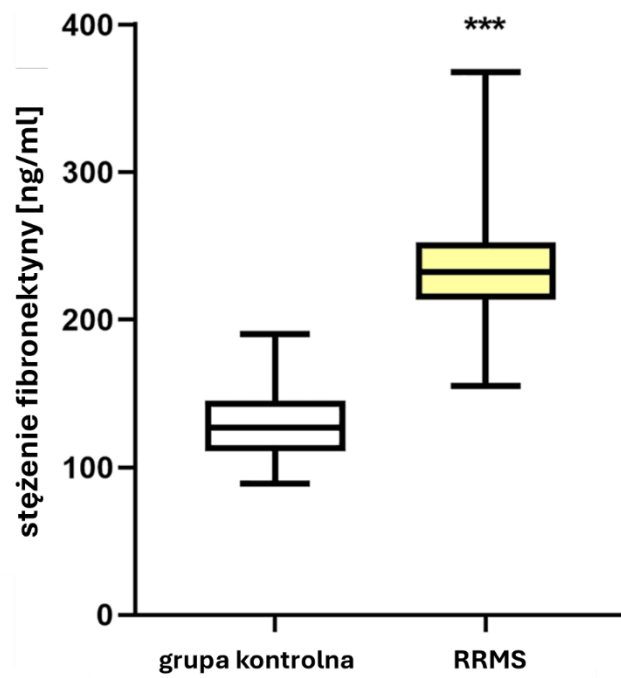
Dobra zgodność wyników ( $R \approx 1$ ) uzyskanych obu technikami świadczy o poprawnej pracy opracowanego biosensora.

#### 7.2.6. Dyskusja wyników

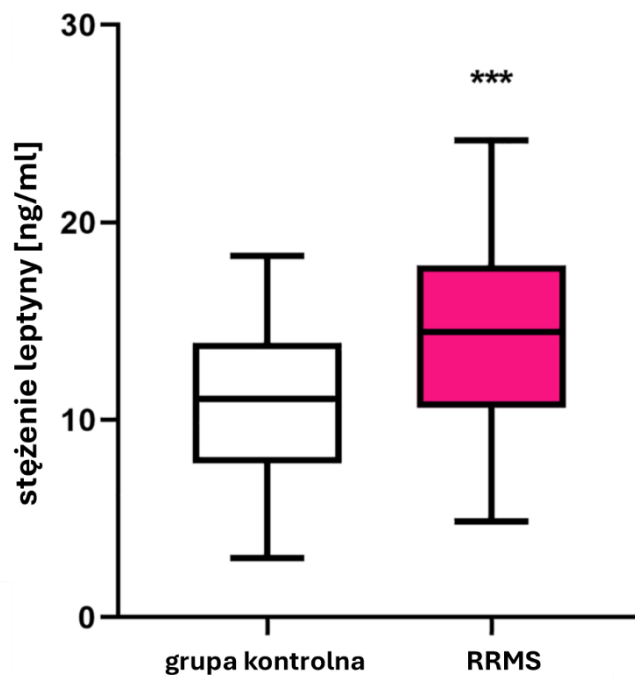
Wyniki zawarte w Tabelach 2, 3 i 4 wskazują, że wszystkie zastosowane biomarkery wykazują na znaczne, statystycznie istotne podwyższenie ich stężenia w osoczu krwi pacjentów chorujących na stwardnienie rozsiane, w porównaniu do wyników w osoczu krwi grupy kontrolnej. Jednak krotność wzrostu poszczególnych biomarkerów różni się istotnie od ponad 22 razy w przypadku immunoproteasomu 20Si do zaledwie 1,3 raza w przypadku leptyny. Stosowane biomarkery pozwalają się uszeregować pod tym względem: immunoproteasom 20Si (22,67), konstytutywny proteasom 20Sc (16,86), katepsyna S (8,47), UCH-L1 (4,15), fibronektyna (1,83) oraz leptyna (1,3). Dobrze trend ten ilustrują Rysunki 8, 9 oraz 10 przedstawiające trzy ostatnie biomarkery wymienionego wyżej szeregu – [1A].



**Rysunek 8.** Stężenie biomarkera UCH-L1 w osoczu krwi pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego w porównaniu do grupy kontrolnej zdrowych osobników. Istotność statystyczna \*\*\* $p \leq 0.001$ .



**Rysunek 9.** Stężenie fibronektyny w osoczu krwi pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego w porównaniu do grupy kontrolnej zdrowych osobników. Istotność statystyczna \*\*\* $p \leq 0.001$ .



**Rysunek 10.** Stężenie leptyny w osoczu krwi pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego w porównaniu do grupy kontrolnej zdrowych osobników. Istotność statystyczna  $***p \leq 0.001$ .

We wszystkich trzech przypadkach różnice między wynikami pacjentów rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego a grupą kontrolną są istotne statystycznie. Jednak pełny zbiór wyników pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego nieomal całkowicie przewyższa pełny zbiór wyników osób z grupy kontrolnej (Rys. 8).

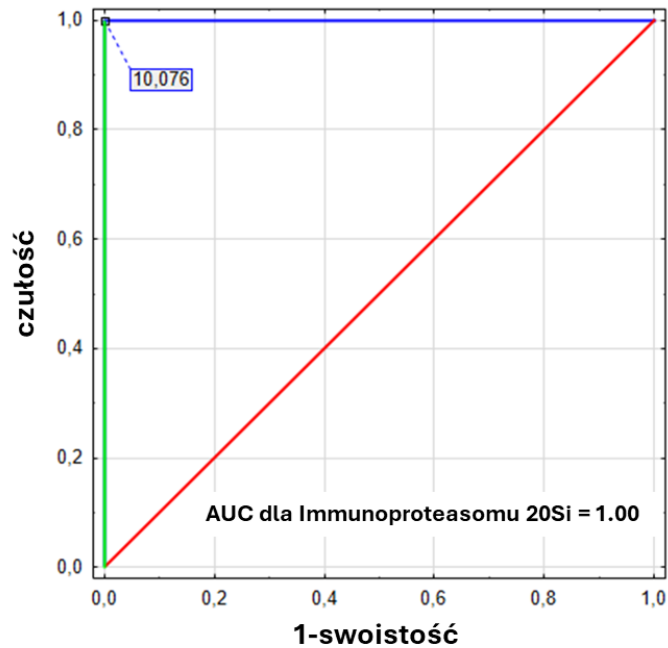
W przypadku fibronektyny najwyższe wyniki grupy kontrolnej pokrywają się z najniższymi wynikami pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego (Rys. 9) natomiast w przypadku leptyny, wyniki obu grup pokrywają się w znacznym stopniu (Rys. 10).

Trzeba jednak podkreślić, że znaczne statystycznie istotne różnice występują tylko między zbiorem wyników pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego rozumianym jako całość, a grupą kontrolną. Niestety, nie ma statystycznie istotnej różnicy między wynikami pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego w różnym stopniu zaawansowania choroby (Tabele 5, 6 i 7), ani pacjentów różniących się częstotliwością nawrotów choroby (Tabela 8).

Z przytoczonych wyżej wyników można wywnioskować, że wszystkie z badanych biomarkerów mogą być rozważane pod kątem wykrycia rzutowo-remisyjnej postaci stwardnienia rozsianego, natomiast nie będą przydatne pod kątem rozróżnienia stadium choroby. Przydatność diagnostyczna biomarkera jest oceniana pod względem czułości (sensitivity) określającej stosunek wykrytych przypadków choroby względem wszystkich przypadków choroby oraz pod względem swoistości (specificity) określającej stosunek negatywnych wyników oznaczania względem wszystkich przypadków choroby. Oba parametry diagnostyczne dobrze ilustruje krzywa ROC wykreślana w układzie współrzędnych: czułość – swoistość. Miarą skuteczności diagnostycznej jest parametr AUC (area under curve), który w przypadku idealnej skuteczności diagnostycznej przybiera wartość 1,00. Innym ważnym parametrem jest wartość cut-off określająca graniczne stężenie danego biomarkera, odcinające wynik negatywny od pozytywnego.

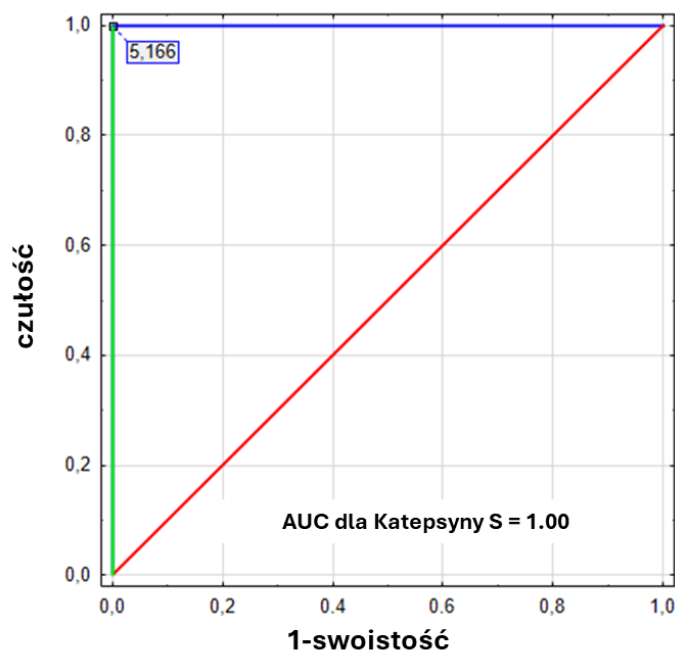
Przydatność diagnostyczną immunoproteasomu 20Si pod względem wykrycia rzutowo-remisyjnego stwardnienia rozsianego ilustruje Rysunek 11. Jest to unikalny wynik (AUC = 1,00) wskazujący pełną wykrywalność przypadków choroby oraz brak wyników fałszywie pozytywnych. Stężenie biomarkera wskazujące obecność rzutowo-remisyjnego stwardnienia rozsianego (cut-off) wynosi 10,076  $\mu\text{g/ml}$ . Wszystkie wyniki powyżej 25% percentyla

mieszczą się w tym zakresie. Ta wartość cut-off kilkakrotnie przewyższa najwyższe wyniki z grupy kontrolnej (Tabela 2) – [2A].



**Rysunek 11.** Krzywa ROC dla immunoproteasomu 20Si, jako biomarkera rzutowo-remisyjnego stwardnienia rozsianego. Powierzchnia pod krzywą ROC, AUC = 1,00. Wartość cut-off odróżniająca przypadki choroby od kontrolnej grupy zdrowych osób = 10,076  $\mu\text{g/ml}$ .

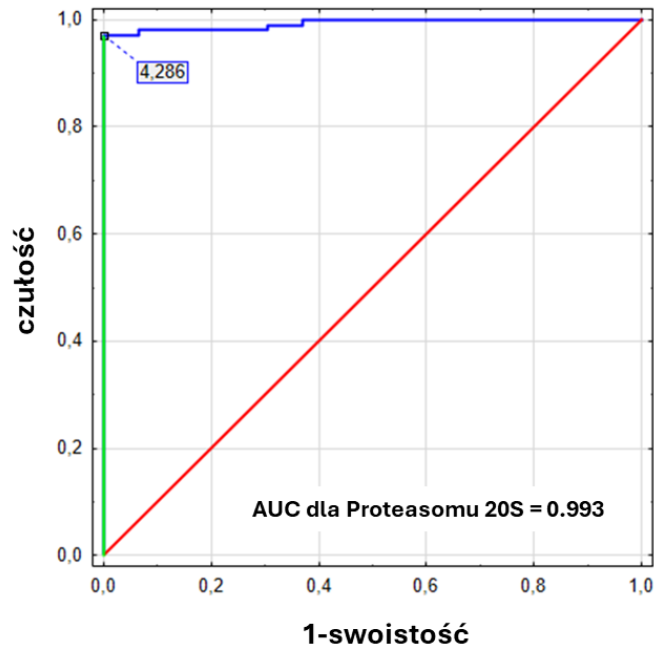
Równie wysoką przydatność diagnostyczną pod względem wykrycia rzutowo-remisyjnego stwardnienia rozsianego wykazują katepsyna S, co ilustruje krzywa ROC na Rysunku 12. Również w tym przypadku biomarker wskazuje pełną wykrywalność przypadków choroby oraz brak wyników fałszywie pozytywnych (AUC = 1,00). Stężenie biomarkera wskazujące obecność rzutowo-remisyjnego stwardnienia rozsianego (cut-off) wynosi 5,166 ng/ml, co jest znacznie niższą wartością stężenia biomarkera niż najniższe wyniki 25% percentyla oraz kilkakrotnie wyższą niż najwyższe wyniki w grupie kontrolnej – [2A].



**Rysunek 12.** Krzywa ROC dla katespiny S jako biomarkera rzutowo-remisyjnego stwardnienia rozsianego. Powierzchnia pod krzywą ROC, AUC = 1,00. Wartość cut-off odróżniająca przypadki choroby od kontrolnej grupy zdrowych osób = 5,166 ng/ml.

Wysoką przydatność diagnostyczną pod względem wykrycia rzutowo-remisyjnego stwardnienia rozsianego wykazuje konstytutywny proteasom 20Sc. Krzywą ROC tego biomarkera przedstawia Rysunek 13. Jednak powierzchnia pod krzywą jest niższa od idealnej wartości 1,00 (AUC = 0,993). Specyficzność tego biomarkera pod względem wykrycia rzutowo-remisyjnego stwardnienia rozsianego jest stuprocentowa, jednak jego selektywność nie jest całkowita (93%). Stężenie biomarkera wskazujące obecność rzutowo-remisyjnego stwardnienia rozsianego (cut-off) wynosi 4,286  $\mu\text{g/ml}$ , co jest stężeniem biomarkera trzykrotnie niższym od najniższych wyników 25% percentyla oraz blisko dwukrotnie wyższą od najwyższych wyników grupy kontrolnej – [2A].





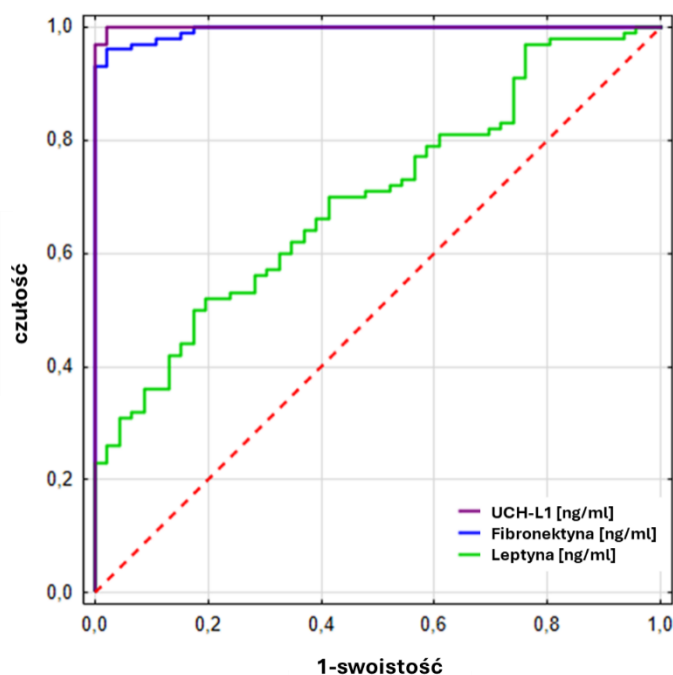
**Rysunek 13.** Krzywa ROC dla konstytutywnego proteasomu 20Sc, jako biomarkera rzutowo-remisyjnego stwardnienia rozsianego. Powierzchnia pod krzywą ROC, AUC = 0,993. Wartość cut-off odróżniająca przypadki choroby od kontrolnej grupy zdrowych osób = 4,286  $\mu\text{g/ml}$ .

Podobnie wysoką przydatność diagnostyczną pod względem wykrycia rzutowo-remisyjnego stwardnienia rozsianego jak konstytutywny proteasom 20Sc wykazuje biomarker UCH-L1, którego krzywą ROC przedstawia Rysunek 14a. Jego powierzchnia pod krzywą jest minimalnie niższa od idealnej wartości 1,00 (AUC = 0,999). Specyficzność UCH-L1 pod względem wykrycia rzutowo-remisyjnego stwardnienia rozsianego wynosi 98%, a selektywność 100%. Stężenie biomarkera wskazujące obecność rzutowo-remisyjnego stwardnienia rozsianego (cut-off) wynosi 7,6 ng/ml. Wartość ta jest prawie dwukrotnie niższa od najniższych wyników 25% percentyla stężenia biomarkera w grupie pacjentów rzutowo-remisyjnego stwardnienia rozsianego oraz blisko dwukrotnie wyższa od najwyższych wyników grupy kontrolnej.

Wysoką przydatność diagnostyczną pod względem wykrycia rzutowo-remisyjnego stwardnienia rozsianego wykazuje biomarker fibronektyna, której krzywa ROC jest przedstawiona na Rysunku 14b. Powierzchnia pod krzywą jest zbliżona do idealnej wartości AUC = 1,00 i wynosi 0,994. Specyficzność biomarkera względem wykrycia rzutowo-

-remisyjnego stwardnienia rozsianego wynosi 98% a jego selektywność – 96%. Są to bardzo wysokie wartości zbliżone do idealnych. Stężenie fibronektyny wskazujące obecność rzutowo-remisyjnego stwardnienia rozsianego (cut-off) wynosi 185 ng/ml i jest niższe od najniższych wyników 25% percentyla stężenia biomarkera w grupie pacjentów rzutowo-remisyjnego stwardnienia rozsianego oraz wyższe od najwyższych wyników grupy kontrolnej.

Niższą przydatność diagnostyczną pod względem wykrycia rzutowo-remisyjnego stwardnienia rozsianego od wyżej rozpatrywanych biomarkerów wykazuje biomarker leptyna, której krzywa ROC jest przedstawiona na Rysunku 14c. Powierzchnia pod krzywą ROC znacznie odbiega od idealnej wartości i wynosi  $AUC = 0,698$ . Specyficzność biomarkera względem wykrycia rzutowo-remisyjnego stwardnienia rozsianego wynosi 83%, a jego selektywność – zaledwie 50%. Stężenie biomarkera wskazujące obecność rzutowo-remisyjnego stwardnienia rozsianego (cut-off) wynosi 14,5 ng/ml. Wartość ta pokrywa się z wynikami stężenia leptyny w grupie kontrolnej.



**Rysunek 14.** Krzywe ROC dla UCH-L1 (a – zielony), fibronektyny (b – niebieski) oraz leptyny (c – czerwony) jako biomarkera rzutowo-remisyjnego stwardnienia rozsianego.

Pełne wyniki badanych biomarkerów zebrano w Tabeli 12. Potwierdzają one idealną przydatność diagnostyczną pod względem wykrycia rzutowo-remisyjnego stwardnienia rozsianego biomarkerów: immunoproteasomu 20Si oraz katepsyny S, bardzo wysoką przydatność diagnostyczną biomarkerów: konstytutywnego proteasomu 20Sc, UCH-L1 oraz

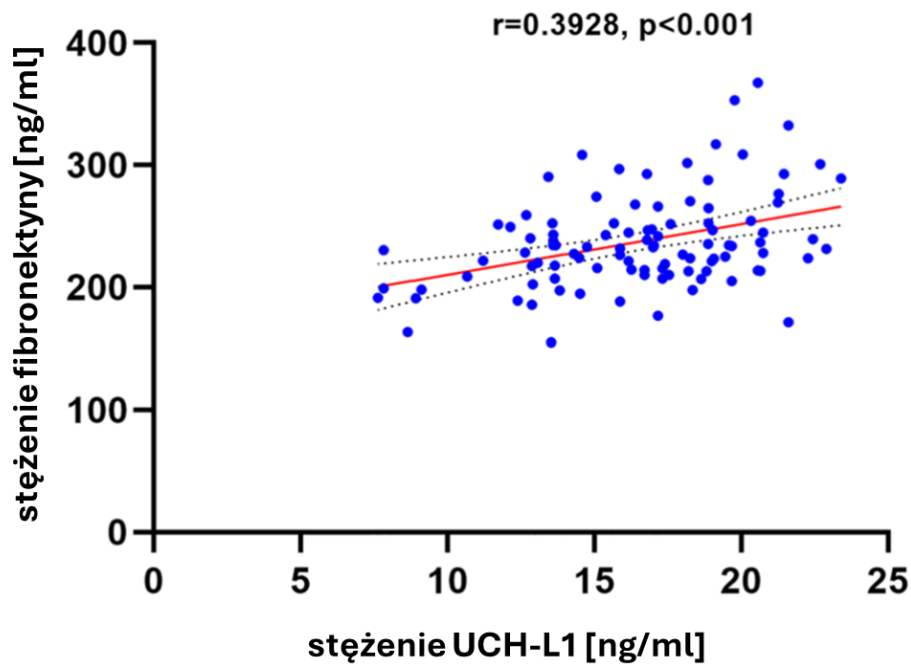
fibronektyny, a także niską przydatność diagnostyczną leptyny. Trzeba podkreślić, że ocena ta dotyczy wykrycia rzutowo-remisyjnej postaci stwardnienia rozsianego, niezależnie od stopnia zaawansowania choroby. Niestety, badane biomarkery nie wykazują prostej przydatności w wykryciu stadium choroby.

Biomarker	Cut-off	Indeks Youden'a	AUC	Se	Sp	PPV	NPV	ACC	p
Immunoproteasom 20Si [ $\mu\text{g/ml}$ ]	10,08	1,00	1,00 $\pm$ 0	100	100	100	100	100	<0,0001
Katepsyna S [ng/ml]	5,17	1,00	1,00 $\pm$ 0	100	100	100	100	100	<0,0001
Konstytutywny proteasom 20Sc [ $\mu\text{g/ml}$ ]	4,29	0,97	0,993 $\pm$ 0,0005	97	100	100	93	98	<0,0001
UCHL1 [ng/ml]	7,63	0,98	0,999 $\pm$ 0,001	100	98	99	100	93	<0,0001
Fibronektyna [ng/ml]	185,76	0,94	0,994 $\pm$ 0,003	96	98	99	92	97	<0,0001
Leptyna [ng/ml]	14,49	0,33	0,698 $\pm$ 0,044	50	83	86	43	60	<0,0001

Se - selektywność diagnostyczna; Sp - diagnostyczna specyficzność; PPV - dodatnia wartość predykcyjna; NPV - ujemna wartość predykcyjna; ACC - dokładność diagnostyczna; indeks Youden'a:  $J = \text{Se} + \text{Sp} - 1$

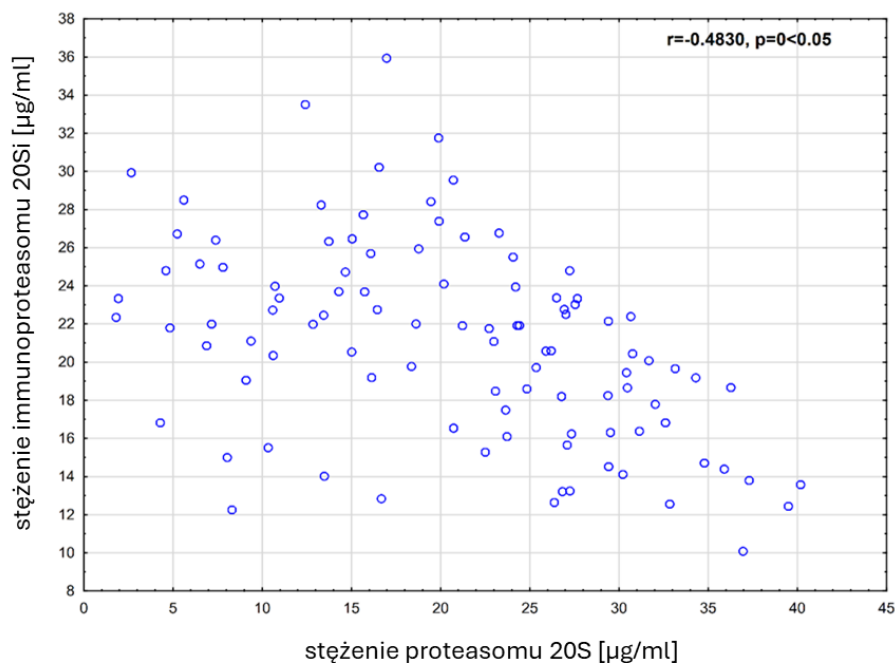
**Tabela 12.** Charakterystyka badanych biomarkerów pod względem przydatności diagnostycznej względem wykrycia stwardnienia rozsianego.

Próbą uzyskania większej ilości informacji z uzyskanych wyników, jest badanie korelacji między wynikami poszczególnych biomarkerów dla wyników osocza krwi pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego – [2A]. Jako przykład może służyć korelacja wyników UCH-L1 i fibronektyny przedstawiona na Rysunku 15. Wyniki ujawniają statystycznie istotną pozytywną korelację ( $r = 0.3928$ ;  $p < 0.001$ ).

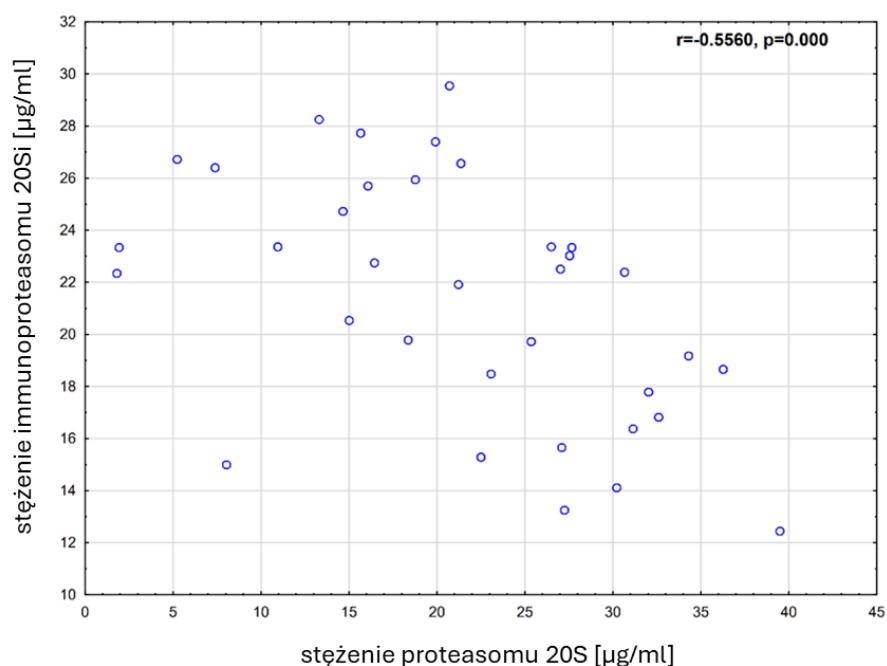


**Rysunek 15.** Korelacja między stężeniem fibronektyny a markera UCH-L1 w osoczu pacjentów ze stwardnieniem rozsianym.

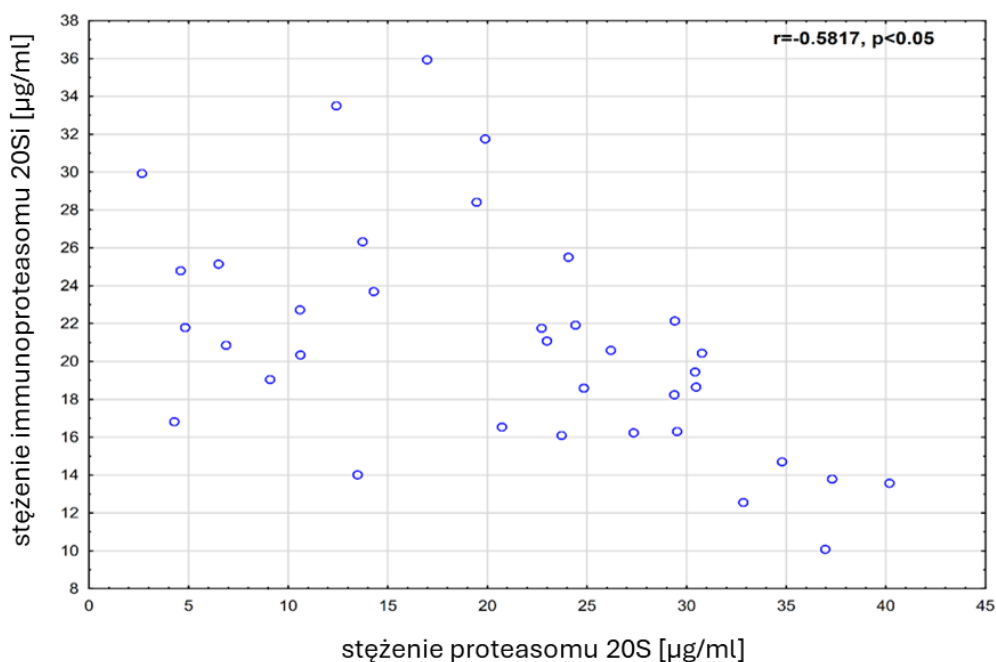
Szczególnie ciekawe wydaje się zbadanie korelacji wyników proteasomu konstytutywnego 20Sc oraz immunoproteasomu 20Si w osoczu pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego. Te biomarkery cechuje daleko posunięte podobieństwo budowy. Korelację wyników tych biomarkerów stwierdzono w przypadku innych chorób (van Scheppingen et al. 2016). Potencjalną korelację konstytutywnego 20Sc oraz immunoproteasomu 20Si w osoczu pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego przeanalizowano w trzech zbiorach wyników: I wszystkich pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego; II pacjentów, u których ostatni nawrót choroby był wcześniej niż przed 24 miesiącami; III pacjentów, u których ostatni nawrót choroby nastąpił podczas ostatnich 24 miesięcy. Wyniki tych analiz przedstawiono na rysunkach 16A, 16B oraz 16C.



**Rysunek 16A.** Korelacja wyników konstytutywnego proteasomu 20Sc i immunoproteasomu 20Si w osoczu krwi pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego ( $r = -0.4830$ ,  $p < 0.05$ ).



**Rysunek 16B.** Korelacja wyników konstytutywnego proteasomu 20Sc i immunoproteasomu 20Si w osoczu krwi pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego, u których ostatni nawrót choroby nastąpił wcześniej niż przed 24 miesiącami ( $r = -0.5560$ ,  $p < 0.05$ ).



**Rysunek 16C.** Korelacja wyników konstytutywnego proteasomu 20Sc i immunoproteasomu 20Si w osoczu krwi pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego, u których ostatni nawrót choroby nastąpił w okresie ostatnich 24 miesięcy ( $r = -0.5871$ ,  $p < 0.05$ ).

We wszystkich trzech przypadkach stwierdzono ujemną statystycznie istotną ( $p < 0,05$ ) korelację stężenia immunoproteasomu 20Si ze stężeniem konstytutywnego proteasomu 20Sc. Im wyższe stężenie konstytutywnego proteasomu 20Sc tym niższe stężenie immunoproteasomu 20Si. Nie jest zatem możliwe wykorzystanie proporcji stężenia tych biomarkerów do określenia czasu od ostatniego nawrotu choroby.

W odróżnieniu od immunoproteasomu 20Si, konstytutywnego proteasomu 20Sc, UCH-L1, katepsyny S, fibronektyny oraz leptyny, program badań dotyczących neuropiliny-1 obejmował przygotowanie biosensora, jego analityczną charakterystykę oraz walidację poprzez pomiary w 20 próbkach osocza pacjentów ze stwardnieniem rozsianym. Użyty biosensor zapewnia liniowość sygnału analitycznego w zakresie od limitu oznaczalności (0,03 ng/ml) do 2,5 ng/ml. Precyzja oznaczania mieści się w przedziale 3,4 – 5,8%, a odzysk w przedziale 97 – 104%. Opracowany biosensor nie odpowiada na neuropilinę-2 oraz czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF-A). Jednak VEGF-A wchodzi w interakcję z neuropiliną-1, co powoduje obniżenie sygnału analitycznego neuropiliny-1, a nawet jego pełne wygaszenie przy odpowiednim nadmiarze VEGF-A. Jednak obecność pewnych stężeń VEGF-A nie wywołuje istotnego obniżenia sygnału neuropiliny-1. Kompleks neuropiliny-1

z VEGF-A charakteryzuje  $K_d = 5-10 \times 10^{-9}$  M [33]. To silne oddziaływanie powoduje, że opracowany biosensor oznacza tylko niezwiązaną z VEGF-A neuropilinę-1. O możliwości oznaczania neuropiliny-1 w osoczu decydują proporcje stężeń VEGF-A i neuropiliny-1. Wg. dostępnych danych [30] stężenie VEGF-A w osoczu mieści się w przedziale 133 – 1657 pg/ml a neuropiliny-1 –  $130,83 \pm 36,24$  ng/ml [15], to jest niemal tysiącrotnie wyższym.

Jak wynika z Tabeli 10, stukrotny nadmiar stężenia neuropiliny-1 względem VEGF-A jest wystarczający dla uzyskania akceptowalnych wyników.

Wiarygodnym dowodem prawidłowości wyników uzyskiwanych za pomocą przygotowanego biosensora jest seria pomiarów stężenia neuropiliny-1 w osoczu krwi 20 pacjentów ze stwardnieniem rozsianym. Pomiary wykonano równolegle z zastosowaniem immunotestu ELISA. Wyniki przedstawione na Rysunku 6 wskazują na dobrą zgodność wyników uzyskanych obu metodami. Zatem biosensor do oznaczania neuropiliny-1 łącznie ze stosowaną procedurą został zwalidowany. Jednocześnie została wykazana użyteczność tego biosensora do oznaczania neuropiliny-1 w próbkach osocza pacjentów ze stwardnieniem rozsianym.

## 8. Wnioski

1. Do diagnostyki stwardnienia rozsianego wprowadzono nowe narzędzie, umożliwiające diagnostykę choroby na podstawie oznaczania biomarkerów z krwi.
2. Z panelu badanych biosensorów dwa: immunoproteasom 20Si oraz katepsyna S zapewniają 100%-ową skuteczność diagnostyczną pod względem wykrycia stwardnienia rozsianego.
3. Trzy kolejne biosensory czułe na: konstytutywny proteasom 20Sc, UCH-L1 oraz fibronektynę charakteryzuje 100%-owa lub niemal 100%-owa specyficzność i selektywność.
4. Biosensor do oznaczania leptyny wykazuje gorszą skuteczność diagnostyczną w porównaniu do pozostałych biomarkerów. Specyficzność biomarkera względem wykrycia rzutowo-remisyjnego stwardnienia rozsianego wynosi 83%, a jego selektywność – zaledwie 50%.
5. Żaden z paneli badanych biosensorów nie wykazuje skuteczności w rozróżnianiu konkretnego stadium stwardnienia rozsianego.



## 9. Streszczenie w języku polskim

Stwardnienie rozsiane (*sclerosis multiplex* – SM) jest przewlekłą postępującą demielinizacyjno-zapalną chorobą centralnego układu nerwowego. Choroba występuje zazwyczaj u młodych kobiet rasy białej, jednak może pojawić się u osób w każdym wieku.

Schorzenie to prowadzi głównie do ogniskowego uszkodzenia osłonek mielinowych włókien nerwowych mózgowia lub rdzenia kręgowego. Umiejscowienie ogniska demielinizacyjnego, w najczęściej występującej postaci rzutowo-remisyjnej SM, skutkuje pojawieniem się określonych objawów neurologicznych podczas zaostrzenia choroby, zwanego rzutem SM.

W rzutowo-remisyjnej postaci SM występują nagłe pogorszenia stanu neurologicznego, po których następuje stopniowa poprawa zdrowia.

W wyniku rzutu rozwija się - w ciągu kilku godzin lub dni - klinicznie izolowany zespół objawów (CIS), który może przebiegać pod postacią: pozagałkowego zapalenia nerwu wzrokowego, niedowładów kończyn, zespołu mózdkowego, zaburzeń czucia. Po kilku dniach lub tygodniach następuje remisja, czyli deficyty neurologiczne wycofują się (na początku choroby - całkowicie).

Inne postacie SM: wtórnie postępująca (następuje po kilkunastu, kilkudziesięciu latach trwania postaci rzutowo-remisyjnej; w postaci tej po rzutach choroby pozostają skutki uszkodzeń układu nerwowego, który stopniowo staje się niewydolny, prowadząc do niepełnosprawności pacjenta) i postać pierwotnie postępująca (w której od początku choroby dochodzi do systematycznego pogarszania się stanu klinicznego) występują znacznie rzadziej.

Atrofia mózgu, również występująca w przebiegu SM, prowadzi do zaburzeń poznawczych, w przebiegu schorzenia często występują zaburzenia nastroju czy też przewlekłe zmęczenie.

Stwardnienie rozsiane to choroba demielinizacyjno-zapalna o złożonym, nie do końca jeszcze poznanym podłożu. Najczęściej brany pod uwagę charakterem schorzenia jest autoimmunologiczny proces, w którym dochodzi do nadreaktywności komórek układu odpornościowego. Kiedy rozszczelniona zostanie bariera krew-płyn mózgowo rdzeniowy, autoreaktywne limfocyty mogą (przy pomocy produkowanych przeciwciał i cytokin prozapalnych) uszkadzać mielinę w ośrodkowym układzie nerwowym.

Uszkodzenia centralnego układu nerwowego powstaje w tej chorobie także na skutek procesu neurodegeneracyjnego, powodując atrofię mózgu (3A).

Rolę w patogenezie SM mają czynniki genetyczne oraz środowiskowe, takie jak: zakażenie wirusem Epsteina i Barr, niedobór witaminy D, nikotynizm, otyłość - zwłaszcza w dzieciństwie.

Obecnie, od około 3 dekad, stosowanych jest wiele terapii zmieniających naturalny przebieg stwardnienia rozsianego, skutecznie możemy leczyć zaostrzenia (rzuty) choroby, jednak nie ma leczenia przyczynowego prowadzącego do wyleczenia tej choroby.

Pełne zrozumienie patogenyzy stwardnienia rozsianego oraz szybkie rozpoznanie choroby umożliwi kontrolę tego schorzenia, które jest jedną z najczęstszych nieurazowych przyczyn niepełnosprawności osób młodych dorosłych.

W pracy użyto panelu biosensorów współpracujących z matrycową techniką SPRi jako nowej metody do wykrywania stwardnienia rozsianego na podstawie oznaczania wybranych potencjalnych biomarkerów w osoczu krwi pacjentów. Były to: konstytutywny proteasom 20Sc, immunoproteasom 20Si, C-końcowa hydrolaza L1 ubikwityny, katepsyna S, fibronektyna, leptyna oraz neuropilina-1. W przypadku tych biomarkerów, z wyjątkiem neuropiliny-1, znane były biosensory, służące do ich oznaczania.

Sprawdzono przydatność diagnostyczną wybranych potencjalnych biomarkerów w diagnostyce stwardnienia rozsianego, możliwości ustalenia stadium choroby, zależności ich stężeń od częstotliwości nawrotów choroby oraz wzajemnej korelacji wybranych biomarkerów. Z panelu badanych biosensorów dwa: immunoproteasom 20Si oraz katepsyna S zapewniają 100% skuteczność diagnostyczną pod względem wykrycia stwardnienia rozsianego. Oba biosensory charakteryzuje 100% specyficzność oraz 100% selektywność z progiem wykrywalności choroby (cut-off) 10,076  $\mu\text{g/ml}$  - dla immunoproteasomu 20Si oraz 5,166  $\text{ng/ml}$  - dla katepsyny S. Trzy kolejne biosensory: konstytutywny proteasom 20Sc, UCH-L1 oraz fibronektynę charakteryzuje 100% lub nieomal 100% specyficzność i selektywność, a cut-off dla konstytutywnego proteasomu 20Sc wynosi 4,29  $\mu\text{g/ml}$ , dla UCH-L1 – 7,63  $\text{ng/ml}$  oraz dla fibronektyny – 186  $\text{ng/ml}$ . Biosensor do oznaczania leptyny wykazuje gorszą skuteczność diagnostyczną. Żaden z badanych biosensorów nie wykazuje skuteczności w rozróżnianiu konkretnego stadium stwardnienia rozsianego.

W ramach badań eksperymentalnych skonstruowano oraz zwalidowano biosensor do oznaczania neuropiliny-1. Dla sprawdzenia prawidłowej pracy biosensora oznaczono stężenie neuropiliny-1 w próbkach pochodzących od pacjentów ze stwardnieniem rozsianym zarówno biosensorem jak i metodą porównawczą - testem ELISA.

Uzyskane wyniki opublikowano w następujących artykułach:

1. Ewelina Górską, Marzena Tylicka, Adam Hermanowicz, Ewa Matuszczak, Anna Sankiewicz, Ewa Gorodkiewicz, Justyna Hermanowicz, Elżbieta Karpińska, Katarzyna Socha, Jan Kochanowicz, Marta Jakoniuk, Joanna Kamińska, Evgenija Homšak & Olga Martyna Koper-Lenkiewicz,” UCHL1, besides leptin and fibronectin, also could be a sensitive marker of the relapsing–remitting type of multiple sclerosis”, *Scientific Reports* | (2023) 13:3423, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30237-3>,
2. Ewelina Górską, Marzena Tylicka, Joanna Kamińska, Adam Hermanowicz, Ewa Matuszczak, Łukasz Ołdak, Ewa Gorodkiewicz, Elżbieta Karpińska, Katarzyna Socha, Jan Kochanowicz, Marta Jakoniuk, Evgenija Homšak, 10, Olga Martyna Koper-Lenkiewicz “20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S are high-sensitivity and independent markers of immunological activity in relapsing-remitting type of multiple sclerosis”, *Journal of Neurochemistry* 2024, 24 June 2024, <https://doi.org/10.1111/jnc.16165>

## 10. Streszczenie w języku angielskim

Multiple sclerosis (MS) is a chronic progressive demyelinating and inflammatory disease of the central nervous system. The disease usually occurs in young Caucasian women, but it can occur in people of any age.

This disease mainly leads to focal damage to the myelin sheaths of nerve fibers in the brain or spinal cord. The location of the demyelinating focus, in the most common form of relapsing-remitting MS, results in the appearance of specific neurological symptoms during an exacerbation of the disease, called an MS relapse.

Relapsing-remitting MS involves sudden neurological deterioration followed by gradual improvement.

As a result of the relapse, a clinically isolated syndrome (CIS) of symptoms develops within a few hours or days, which may include: retrobulbar optic neuritis, limb paresis, cerebellar syndrome, and sensory disturbances. After a few days or weeks, remission occurs, i.e. neurological deficits disappear (at the beginning of the disease - completely).

Other forms of MS: secondary progressive (occurs after several or several dozen years of relapsing-remitting form; in this form, after relapses of the disease, the effects of damage to the nervous system remain, which gradually becomes ineffective, leading to the patient's disability) and primary progressive form (in which from the beginning of the disease, there is a systematic deterioration of the clinical condition) occur much less frequently.

Brain atrophy, also occurring in the course of MS, leads to cognitive disorders, and the disease often results in mood disorders and chronic fatigue. Multiple sclerosis is a demyelinating and inflammatory disease with a complex, yet not fully understood cause. The most frequently considered type of descent is an autoimmune process in which the cells of the immune system become overactive. When the blood-cerebrospinal fluid barrier is broken, autoreactive lymphocytes can damage myelin in the central nervous system with the help of produced antibodies and pro-inflammatory cytokines. Damage to the central nervous system may also occur as a result of the neurodegenerative process, causing brain atrophy (3A).

Genetic and environmental factors play a role in the pathogenesis of MS, such as Epstein-Barr virus infection, vitamin D deficiency, nicotine addiction, and obesity, especially in childhood.

Currently, for about 3 decades, many therapies have been used to change the natural course of multiple sclerosis; we can effectively treat exacerbations (relapses) of the disease, but there is no causal treatment leading to the cure of this disease.

Full understanding of the pathogenesis of multiple sclerosis and quick diagnosis of the disease will enable control of this disease, which is one of the most common non-traumatic causes of disability in young adults.

The work uses a panel of biosensors working with the SPRi matrix technique as a new method to detect multiple sclerosis based on the determination of selected potential biomarkers in patients' blood plasma. These were constitutive proteasome 20Sc, immunoproteasome 20Si, ubiquitin C-terminal hydrolase L1, cathepsin S, fibronectin, leptin, and neuropilin-1. For these biomarkers, with the exception of neuropilin-1, biosensors are known for their determination.

The diagnostic usefulness of selected potential biomarkers in the diagnosis of multiple sclerosis, the possibility of determining the stage of the disease, the dependence of their concentrations on the frequency of disease relapses and the mutual correlation of selected biomarkers were checked. From the panel of tested biosensors, two: immunoproteasome 20Si and cathepsin S provide 100% diagnostic efficiency in terms of detecting multiple sclerosis. Both biosensors are characterized by 100% specificity and 100% selectivity with a disease detection threshold (cut-off) of 10.076  $\mu\text{g/mL}$  for the 20Si immunoproteasome and 5.166  $\text{ng/mL}$  for cathepsin S. Another three biosensors: constitutive 20Sc proteasome, UCH-L1 and fibronectin is characterized by 100% or almost 100% specificity and selectivity, and the cut-off for the constitutive 20Sc proteasome is 4.29  $\mu\text{g/mL}$ , for UCH-L1 - 7.63  $\text{ng/mL}$  and for fibronectin - 186  $\text{ng/mL}$ . The leptin biosensor shows poorer diagnostic performance. None of the tested biosensors are effective in distinguishing the stage of multiple sclerosis.

As part of experimental research, a biosensor for the determination of neuropilin-1 was constructed and validated. To check the proper operation of the biosensor, the concentration of neuropilin-1 was determined in samples from patients with multiple sclerosis, both using the biosensor and the comparative ELISA method.

The obtained results were published in the following articles:

1. Ewelina Górska, Marzena Tylicka, Adam Hermanowicz, Ewa Matuszczak, Anna Sankiewicz, Ewa Gorodkiewicz, Justyna Hermanowicz, Elżbieta Karpińska, Katarzyna Socha, Jan Kochanowicz, Marta Jakoniuk, Joanna Kamińska, Evgenija Homšak & Olga Martyna Koper-Lenkiewicz, "UCHL1, besides leptin and fibronectin, also could be a sensitive marker of the relapsing–remitting type of multiple sclerosis", *Scientific Reports* | (2023) 13:3423, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30237-3>,

2. Ewelina Górska, Marzena Tylicka, Joanna Kamińska, Adam Hermanowicz, Ewa Matuszczak, Łukasz Ołdak, Ewa Gorodkiewicz, Elżbieta Karpińska, Katarzyna Socha, Jan Kochanowicz, Marta Jakoniuk, Evgenija Homšak, 10, Olga Martyna Koper-Lenkiewicz “20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S are high-sensitivity and independent markers of immunological activity in relapsing-remitting type of multiple sclerosis”, *Journal of Neurochemistry* 2024, 24 June 2024, <https://doi.org/10.1111/jnc.16165>

## 11. Piśmiennictwo:

- [1] Misriellal, C., Mauthe, M., Reggiori, F. & Eggen, B. J. L. Autophagy in multiple sclerosis: Two sides of the same coin. *Front. Cell.Neurosci.* 2020; 603710. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.603710>.
- [2] Haase, S. , Linker, R. A. Inflammation in multiple sclerosis. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* 2021;14: 175628642110076, doi: 10.1177/17562864211007687
- [3] Pegoretti, V. , Swanson, K.A., Bethea, J.,R., Probert, L., Eisel, U.L.M., Fischer, R., Inflammation and oxidative stress in multiple sclerosis: Consequences for therapy development. *Oxid. Med. Cell.Longev.* 2020; 7191080, doi: 10.1155/2020/7191080..
- [4] Frisullo G, Mirabella M, Angelucci F, Caggiula M, Morosetti R, Sancricca C, Patanella AK, Nociti V, Iorio R, Bianco A, Tomassini V, Pozzilli C, Tonali PA, Matarese G, Batocchi AP. The effect of disease activity on leptin, leptin receptor and suppressor of cytokine signalling-3 expression in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2007; 192:174-83. doi: 10.1016/j.jneuroim.2007.08.008.
- [5] Fahmi, R. M., Kamel, A. E., Elsayed, D. A., Zidan, A. A. & Sarhan, N. T. Serum levels of leptin and adiponectin in patients with multiple sclerosis. *Egypt. J. Neurol. Psychiatry Neurosurg.* 2021; 57: 114, <https://doi.org/10.1186/s41983-021-00369-2>.
- [6] Evangelopoulos, M. E., Koutsis, G. , Markianos, M. Serum leptin levels in treatment-naive patients with clinically isolated syndrome or relapsing-remitting multiple sclerosis. *Autoimmune Dis.* 2014, 2014:486282. doi: 10.1155/2014/486282.
- [7] Calahorra, L., Camacho-Toledano, C., Serrano-Regal, M. P., Ortega, M. C. , Clemente, D. Regulatory cells in multiple sclerosis: From blood to brain. *Biomedicines* 2022;10, 335, <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020335>.
- [8] Bellavista E., Santoro A., Galimberti D., Comi C., Luciani F., Mishto M. Current understanding on the role of standard and immunoproteasomes in inflammatory/immunological pathways of multiple sclerosis. *Autoimmune Dis.* 2014; 2014: 739705. doi: 10.1155/2014/739705.
- [9] Minagar A., Ma W., Zhang X., Wang X., Zhang K., Steven Alexander J., Gonzalez-Toledo E., Albitar M. Plasma ubiquitin-proteasome system profile in patients with multiple sclerosis: Correlation with clinical features, neuroimaging, and treatment with interferon-beta-1b. *Neurol. Res.* 2012;34, 611–618, doi: 10.1179/1743132812Y.0000000055.
- [10] Yadav D., Lee J. Y., Puranik N., Chauhan P. S., Chavda V., Jin J. O., Lee P. C. W. Modulating the Ubiquitin–Proteasome System: A Therapeutic Strategy for Autoimmune Diseases. *Cells* 2022;11, 1–13, doi: 10.3390/cells11071093.

- [11] Wilkinson R. D. A., Williams R., Scott C. J., Burden R. E. Cathepsin S: Therapeutic, diagnostic, and prognostic potential. *Biol. Chem.* 2015; 396, 867–882, doi: 10.1515/hsz-2015-0114.
- [12] Haves-Zburof D., Paperna T., Gour-Lavie A., Mandel I., Glass-Marmor L., Miller A. Cathepsins and their endogenous inhibitors cystatins: Expression and modulation in multiple sclerosis. *J. Cell. Mol. Med.* 2011; 15, 2421–2429, doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01229.x.
- [13] Gorodkiewicz, E., Sankiewicz, A., Laudański, P. 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, 557-567, doi: 10.2478/s11532-014-0512-8.
- [14] Huitema, M. J. D. , Schenk, G. J. Insights into the mechanisms that may clarify obesity as a risk factor for multiple sclerosis. *Curr.Neurol. Neurosci. Rep.* 2018; 18(4), 18, doi: 10.1007/s11910-018-0827-5.
- [15] Shuang-Shuang Wei, Le Chen, Feng-Yuan Yang, Si-Qi Wang, and Peng Wang, The role of fibronectin in multiple sclerosis and the effect of drug delivery across the blood-brain barrier, *Neural Regen Res.*, 2023 Oct, 18(10), 2147–2155, doi: 10.4103/1673-5374.369102.
- [16] Park, H-K., Ahima, R.S., Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism, *Metabolism*, 2015; 64, 24-34, doi: 10.1016/j.metabol.2014.08.004..
- [17] Jiang Y, Zhang J, Yuan Y, Zha X, Xing C, Shen C, Shen Z, Qin C, Zeng M, Yang G, Mao H, Zhang B, Yu X, Sun B, Ouyang C, Xu X, Ge Y, Wang J, Zhang L, Cheng C, Yin C, Zhang J, Chen H, Ma H, Wang N. Association of Increased Serum Leptin with Ameliorated Anemia and Malnutrition in Stage 5 Chronic Kidney Disease Patients after Parathyroidectomy. *Sci Rep.* 2016;6:27918. doi: 10.1038/srep27918.
- [18] Kilic, M., Taskin,E., Ustundag, B., Aygun, A.D., The evaluation of serum leptin level and other hormonal parameters in children with severe malnutrition *Clin. Biochem.*, 2004; 37, 382–387, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2003.12.010.
- [19] Biström, M., Johan Hultdin, J., Andersen, O., Lucia Alonso, M., Jons, D., Gunnarsson, M., Vrethem, M., and Sundström, P., Leptin levels are associated with multiple sclerosis risk, *Multiple Sclerosis Journal*, 27, 1, January 2021, 19-27, doi: 10.1177/1352458520905033.
- [20] Kolodkin, A.L.; Levengood, D.V.; Rowe, E.G.; Tai, Y.T.; Giger, R.J.; Ginty, D.D. Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell*, 1997; 90, 753–762, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80535-8.
- [21] He, Z.; Tessier-Lavigne, M. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent semaphorin III. *Cell*, 1997;90, 739–751, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80534-6.



- [22] Soker, S.; Takashima, S.; Miao, H.Q.; Neufeld, G.; Klagsbrun, M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform- specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*, 1998; 92, 735–745, doi: 10.1016/s0092-8674(00)81402-6.
- [23] Broz, M.; Kolarič, A.; Jukič, M.; Bren, U. Neuropilin (NRPs) Related Pathological Conditions and Their Modulators. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23, 8402, doi: 10.3390/ijms23158402.
- [24] Pellet-Many, C.; Frankel, P.; Jia, H.; Zachary, I. Neuropilins: Structure, function and role in disease. *Biochem. J.* 2008; 411, 211–226, doi: 10.1042/BJ20071639.
- [25] Solomon B.D., Mueller C., Wook-Jin Chae, and Bynoe M.S., Neuropilin-1 attenuates autoreactivity in experimental autoimmune encephalomyelitis, *PNAS*, 2011, 108, 5, 2040–2045, doi: 10.1073/pnas.1008721108.
- [26] Gorodkiewicz, E., Ostrowska, H., Sankiewicz, A., SPR imaging biosensor for the 20S proteasome: sensor development and application to measurement of proteasomes in human blood plasma *Microchim Acta*, 2011; 175, 177–184, doi: 10.1007/s00604-011-0656-6.
- [27] Sankiewicz A., Markowska, A., Lukaszewski, Z., Puzan, B., Gorodkiewicz, E., Methods for 20S Immunoproteasome and 20S Constitutive Proteasome Determination Based on SPRI Biosensors. *Cell. Mol. Bioeng.* 2017; 10, 174–185, doi: 10.1007/s12195-017-0478-7
- [28] Sankiewicz A, Laudanski P, Romanowicz L, Hermanowicz A, Roszkowska-Jakimiec W, Debek W, Gorodkiewicz E. Development of surface plasmon resonance imaging biosensors for detection of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1. *Anal Biochem.* 2015; 469:4-11. doi:10.1016/j.ab.2014.09.021.
- [29] Oldak, L., Sankiewicz, A., Żelazowska-Rutkowska, B., Skoczylas, M., Gorodkiewicz, E., Two SPRi biosensors for the determination of cathepsin S in blood plasma, *Talanta*, 2021; 225, 121900, doi: 10.1016/j.talanta.2020.121900.
- [30] Sankiewicz, A., Romanowicz, L., Pyc, M., Hermanowicz, A., Gorodkiewicz, E. SPR imaging biosensor for the quantitation of fibronectin concentration in blood samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018; 150, 1–8, doi: 10.1016/j.jpba.2017.11.070.
- [31] Sankiewicz, A., Hermanowicz, A., Grycz, A., Łukaszewski, Z. & Gorodkiewicz, E. An SPR imaging immunosensor for leptin determination in blood plasma. *Anal. Methods* 2021; 13, 642–646, doi: 10.1039/d0ay02047h.
- [32] Scheppingen, J. van, Broekaart D. W. M., Scholl T., Zuidberg M. R. J., Anink J. J., Spliet W. G., Rijen P. C. van, et al. Dysregulation of the (immuno)proteasome pathway in malformations of cortical development. *J. Neuroinflammation* 2016, 13, 1–16, doi: 10.1186/s12974-016-0662-z.

[33] Gagonon, M.L., Bielenberg D.R., Gechtman, Z., Miao, H.Q., Takashima, S., Soker, S., Klagsbrun, M. Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: In vivo expression and antitumor activity. *PNAS* 2000; 97, 2573 – 2578, doi: 10.1073/pnas.040337597.

## 12. Spis tabel

**Tabela 1.** Demograficzne i kliniczne dane pacjentów z RRMS oraz grupy kontrolnej.

**Tabela 2.** Wyniki oznaczania stężenia proteasomu 20Sc i 20Si w osoczu pacjentów ze stwardnieniem rozsianym (SM) oraz grupy kontrolnej (C).

**Tabela 3.** Wyniki oznaczania UCH-L1 i katepsyny S w osoczu pacjentów ze stwardnieniem rozsianym (SM) oraz grupy kontrolnej (C).

**Tabela 4.** Wyniki oznaczania fibronektyny oraz leptyny w osoczu pacjentów ze stwardnieniem rozsianym (SM) oraz grupy kontrolnej (C).

**Tabela 5.** Wyniki stężeń proteasomu 20Sc i 20Si w osoczu krwi w zależności od stopnia zaawansowania SM (dane przedstawione jako mediana oraz percentyle (25%-75%).

**Tabela 6.** Wyniki stężeń UCH-L1 i katepsyny S w osoczu krwi w zależności od stopnia zaawansowania SM (dane przedstawione jako mediana oraz percentyle (25%-75%).

**Tabela 7.** Wyniki stężeń fibronektyny i leptyny w osoczu krwi w zależności od stopnia zaawansowania SM (dane przedstawione jako mediana oraz percentyle (25%-75%).

**Tabela 8.** Zależność stężenia konstytutywnego proteasomu 20Sc, immunoproteasomu 20Si oraz katepsyny S od częstotliwości wznowień choroby.

**Tabela 9.** Precyzja i odzysk oznaczania neuropiliny-1 techniką matrycową SPRi z zastosowaniem opracowanego biosensora.

**Tabela 10.** Wpływ VEGF-A na oznaczanie neuropiliny-1.

**Tabela 11.** Wpływ VEGF-A na oznaczanie neuropiliny-1 po jej immobilizacji.

**Tabela 12.** Charakterystyka badanych biomarkerów pod względem przydatności diagnostycznej względem wykrycia stwardnienia rozsianego.

### 13. Spis rysunków

**Rysunek 1.** Zasada pomiaru techniką SPRI,  $r_{Au}$ ,  $r_R$ ,  $r_A$  to wartości refleksyjności odpowiednio dla warstwy złota, warstwy receptorowej oraz warstwy analitu.

**Rysunek 2.** Ogólny schemat struktury części biologicznej biosensora SPR.

**Rysunek 3.** Budowa podstawy biosensora SPRI.

**Rysunek 4.** Schemat przygotowania biosensora czułego na neuropilinę-1.

**Rysunek 5.** Zależność sygnału SPRI od stężenia mysiego monoklonalnego przeciwciała przeciw neuropiline-1. Stężenie neuropiliny-1: 5 ng/ml, pH = 7,40.

**Rysunek 6.** Krzywa kalibracyjna neuropiliny-1. Stężenie mysiego monoklonalnego przeciwciała przeciw neuropiline-1: 200 ng/ml, pH = 7,40.

**Rysunek 7.** Korelacja wyników oznaczania neuropiliny-1 w osoczu pacjentów ze stwardnieniem rozsianym - A oraz grupy kontrolnej - B matrycową techniką SPRI z zastosowaniem opracowanego biosensora oraz za pomocą immunotestów ELISA.

**Rysunek 8.** Stężenie biomarkera UCH-L1 w osoczu krwi pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego w porównaniu do grupy kontrolnej zdrowych osobników. Istotność statystyczna  $***p \leq 0.001$ .

**Rysunek 9.** Stężenie fibronektyny w osoczu krwi pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego w porównaniu do grupy kontrolnej zdrowych osobników. Istotność statystyczna  $***p \leq 0.001$ .

**Rysunek 10.** Stężenie leptyny w osoczu krwi pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego w porównaniu do grupy kontrolnej zdrowych osobników. Istotność statystyczna  $***p \leq 0.001$ .

**Rysunek 11.** Krzywa ROC dla immunoproteasomu 20Si, jako biomarkera rzutowo-remisyjnego stwardnienia rozsianego. Powierzchnia pod krzywą ROC, AUC = 1,00. Wartość cut-off odróżniająca przypadki choroby od kontrolnej grupy zdrowych osób = 10,076  $\mu$ g/ml.

**Rysunek 12.** Krzywa ROC dla katepsyny S jako biomarkera rzutowo-remisyjnego stwardnienia rozsianego. Powierzchnia pod krzywą ROC, AUC = 1,00. Wartość cut-off odróżniająca przypadki choroby od kontrolnej grupy zdrowych osób = 5,166 ng/ml.

**Rysunek 13.** Krzywa ROC dla konstytutywnego proteasomu 20Sc, jako biomarkera rzutowo-remisyjnego stwardnienia rozsianego. Powierzchnia pod krzywą ROC, AUC = 0,993. Wartość cut-off odróżniająca przypadki choroby od kontrolnej grupy zdrowych osób = 4,286 µg/ml.

**Rysunek 14.** Krzywe ROC dla UCH-L1 (a – zielony), fibronektyny (b – niebieski) oraz leptyny (c – czerwony) jako biomarkera rzutowo-remisyjnego stwardnienia rozsianego.

**Rysunek 15.** Korelacja między stężeniem fibronektyny a markera UCH-L1 w osoczu pacjentów ze stwardnieniem rozsianym.

**Rysunek 16A.** Korelacja wyników konstytutywnego proteasomu 20Sc i immunoproteasomu 20Si w osoczu krwi pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego ( $r = -0.4830$ ,  $p < 0.05$ ).

**Rysunek 16B.** Korelacja wyników konstytutywnego proteasomu 20Sc i immunoproteasomu 20Si w osoczu krwi pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego, u których ostatni nawrót choroby nastąpił wcześniej niż przed 24 miesiącami ( $r = -0.5560$ ,  $p < 0.05$ ).

**Rysunek 16C.** Korelacja wyników konstytutywnego proteasomu 20Sc i immunoproteasomu 20Si w osoczu krwi pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego, u których ostatni nawrót choroby nastąpił w okresie ostatnich 24 miesięcy ( $r = -0.5871$ ,  $p < 0.05$ ).

#### **14. Pozostały dorobek naukowy:**

1B. Anna Sankiewicz, Beata Zelazowska-Rutkowska, Ewelina Gorska, Adam Hermanowicz and Ewa Gorodkiewicz, „New Biosensor for Determination of Neuropilin-1 with Detection by Surface Plasmon Resonance Imaging”, *Sensors* 2023, 23, 4118, <https://doi.org/10.3390/s23084118>,  
IF: 3,9, MNiSW: 100

## **15. Zgoda komisji bioetycznej**

**KOMISJA BIOETYCZNA  
PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM W BIAŁYMSTOKU**

ul. Jana Kilińskiego 1  
15-089 Białystok  
tel. 85 748 54 07, fax 85 748 55 08  
komisjabioetyczna@umb.edu.pl

---

Białystok, 27.05.2021 r.

Uchwała nr: APK.002.282.2021

Na podstawie art. 29 ust. 2 i 14 ustawy dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (t.j. Dz. U z 2020, poz. 514 ze zm.), Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku, po zapoznaniu się z projektem badania zgodnie z zasadami GCP/ Guidelines for Good Clinical Practice /- **w y r a ż a z g o d ę** na prowadzenie tematu badawczego: „Ocena stężenia wybranych substancji białkowych w surowicy osób ze stwardnieniem rozsianym” przez prof. dr hab. Adama Hermanowicza wraz z zespołem badawczym z UMB we współpracy z zespołem badawczym z Uniwersytetu w Białymstoku oraz z lek. Ewelina Górską z Centrum Neurologiczno-Diagnostycznego, ul. Stołeczna 7 lok. 110, Białystok.

Planowany okres realizacji od 27.05.2021 r. do 20.12.2023 r.

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej przy UMB

prof. dr hab. Otylia Kowal-Bielecka

*Pouczenie:*

1. Odwołanie od uchwały komisji bioetycznej wyrażającej opinię może wnieść:

1) wnioskodawca;

2) kierownik podmiotu, w którym eksperyment medyczny ma być przeprowadzony;

3) komisja bioetyczna właściwa dla ośrodka, który ma uczestniczyć w wieloośrodkowym eksperymencie medycznym.

2. Odwołanie, o którym mowa w ust. 1, wnosi się za pośrednictwem komisji bioetycznej, która podjęła uchwałę, do Odwoławczej Komisji Bioetycznej w terminie 14 dni od dnia doręczenia uchwały wyrażającej opinię.



## **16. Praca oryginalna 1A**



## OPEN UCHL1, besides leptin and fibronectin, also could be a sensitive marker of the relapsing–remitting type of multiple sclerosis

Ewelina Górka<sup>1,12</sup>, Marzena Tylicka<sup>2,12</sup>✉, Adam Hermanowicz<sup>3</sup>, Ewa Matuszczak<sup>3</sup>, Anna Sankiewicz<sup>4</sup>, Ewa Gorodkiewicz<sup>4</sup>, Justyna Hermanowicz<sup>5</sup>, Elżbieta Karpińska<sup>6</sup>, Katarzyna Socha<sup>6</sup>, Jan Kochanowicz<sup>7</sup>, Marta Jakoniuk<sup>8</sup>, Joanna Kamińska<sup>9</sup>, Evgenija Homšak<sup>10,11</sup> & Olga Martyna Koper-Lenkiewicz<sup>9</sup>✉

Research on the markers of immunoregulatory response in multiple sclerosis (MS) is still of great importance. The aim of our study was the evaluation of leptin, fibronectin, and UCHL1 concentrations as potential biomarkers of a relapsing–remitting type of MS (RRMS). Surface Plasmon Resonance Imaging (SPRI) biosensors were used for the evaluation of proteins concentrations in 100 RRMS patients and 46 healthy volunteers. Plasma leptin, fibronectin, and UCHL1 concentrations were significantly higher in RRMS patients compared to the control group ( $p < 0.001$ , respectively). UCHL1 concentration evaluation revealed the highest diagnostic sensitivity (100%) and negative predictive value (100%) in differentiating MS patients from healthy individuals. There was no significant difference in the UCHL1 concentrations depending on the patient's sex, the presence of relapse within the last 24 months, and the EDSS value ( $p > 0.05$ , respectively). In RRMS patients UCHL1 concentration positively correlated with fibronectin levels ( $r = 0.3928$ ;  $p < 0.001$ ). In the current cohort of patients plasma UCHL1 concentration was independent of the time of MS relapse and the severity of neurological symptoms. Thus current study may indicate that plasma UCHL1, besides leptin and fibronectin, also could be a promising high-sensitive potential biomarker of relapsing–remitting type of MS. However, these results should be validated with a larger group of patients, taking into account neuroimaging and cerebrospinal fluid analysis data, and by comparing them to patients with other neurological diseases as a control group.

### Abbreviations

BMI	Body mass index
CSF	Cerebrospinal fluid
CNS	Central nervous system

<sup>1</sup>Neurological Private Practice, Stołeczna 7/109, 15-879 Białystok, Poland. <sup>2</sup>Department of Biophysics, Medical University of Białystok, Mickiewiczza 2a, 15-089 Białystok, Poland. <sup>3</sup>Department of Pediatric Surgery, Medical University of Białystok, Waszyngtona 17, 15-274 Białystok, Poland. <sup>4</sup>Bioanalysis Laboratory, Faculty of Chemistry, University of Białystok, Ciołkowskiego 1K, 15-245 Białystok, Poland. <sup>5</sup>Department of Clinical Pharmacy, Medical University of Białystok, Mickiewiczza 2C, 15-222 Białystok, Poland. <sup>6</sup>Department of Bromatology, Medical University of Białystok, Mickiewiczza 2 d, 15-222 Białystok, Poland. <sup>7</sup>Department of Neurology, Medical University of Białystok, M. Skłodowskiej - Curie 24A, 15-276 Białystok, Poland. <sup>8</sup>Department of Invasive Neurology, Medical University of Białystok, M. Skłodowskiej-Curie 24a, 15-276 Białystok, Poland. <sup>9</sup>Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Medical University of Białystok, Waszyngtona 15A, 15-269 Białystok, Poland. <sup>10</sup>Department for Laboratory Diagnostics, University Clinical Centre Maribor SI, Ljubljanska Ulica 5, 2000 Maribor, Slovenia. <sup>11</sup>Department for Clinical Biochemistry, Medical Faculty, University of Maribor, Maribor, Slovenia. <sup>12</sup>These authors contributed equally: Ewelina Górka and Marzena Tylicka. ✉email: marzena.tylicka@umb.edu.pl; o.koper@wp.pl

EDSS	Kurtzke's Expanded Disability Status Scale
HSCs	Hepatic stellate cells
IL	Interleukin
MHD	Mild head trauma
MS	Multiple sclerosis
RRMS	A relapsing–remitting type of MS
TBI	Traumatic brain injury
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor alfa
UCHL1	Ubiquitin C-terminal hydrolase L1

Multiple sclerosis (MS) is a complex autoimmune disease of the central nervous system (CNS) in which an unrelenting attack of the immune system results in extensive demyelination, loss of oligodendrocytes, and axonal degeneration<sup>1,2</sup>. MS is driven by a complex interaction between genetic, immunological, and environmental factors, and mainly affects young adults at the age of 20–40<sup>2,3</sup>. MS patients can develop any neurological signs and symptoms among which the most common are numbness, ataxia, walking difficulties, muscle spasms, bladder or visual problems, fatigue, pain, depression, and dementia<sup>4</sup>.

Studies have indicated that the cytokine-like hormone leptin mostly produced by adipose tissue, may play an important role in MS pathogenesis via the regulation of inflammatory responses<sup>5</sup>. Leptin activates the proliferation of monocytes, enhances the phagocytic activity of macrophages, production of proinflammatory cytokines, and stimulates the proliferation of T cells<sup>6,7</sup>. T cells lead to the recruitment of other inflammatory cells which in turn drive the production of the antibodies and proinflammatory cytokines that destroy the myelin sheath<sup>8</sup>. The interaction between leptin and proinflammatory factors could play a significant role in the pathology of MS<sup>9</sup>. An imbalance in leptin levels can impair immunity and exacerbate autoimmune diseases such as MS and related problems<sup>10,11</sup>.

Autoimmune-mediated inflammation may play a principal role in demyelination<sup>1</sup>. The failure of remyelination in the course of MS has likely been mediated also due to the expression of the extracellular matrix molecule fibronectin which affects remyelination by oligodendrocytes progenitors. Fibronectin levels increase both by leakage from the blood circulation and by production from CNS resident cells<sup>12</sup>.

Research on Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCHL1) in the course of MS has not been extensively conducted so far. UCHL1 is a proteolytically stable small protein of neuronal origin whose levels are increased in serum and cerebrospinal fluid (CSF) following traumatic brain injury and correlated with both severities of injury and long-term outcome<sup>12</sup>. This neuron-specific deubiquitinating enzyme is one of the most abundant proteins in the brain and some studies indicated the fundamental importance of UCHL1 in the proper functioning of the nervous system<sup>13</sup>. UCHL1 is involved not only in the process of repairing injured axons and neurons but also takes part in immune reactions<sup>14</sup>.

Controlling the inflammatory reactions may avoid uncontrolled tissue damage, restore peripheral tolerance, and promote remyelination<sup>8</sup>, thus research on the markers of immunoregulatory response in MS is still of great importance. Therefore the aim of our study was the evaluation of leptin, fibronectin, and UCHL1 concentrations as potential biomarkers of a relapsing–remitting type of MS (RRMS). In the next step, we analyzed the relationship of proteins tested with each other and with the age of the patients, the number of years from the first MS symptoms, the number of years from MS diagnosis, the number of relapses within the 24-month observational period, the EDSS value, the EDSS visual functions, the EDSS brainstem functions, the EDSS pyramidal functions, the EDSS cerebellar functions, the EDSS sensory functions, the EDSS bowel/bladder functions, Cerebral functions, and the Ambulation score.

## Material and methods

**Patients.** The study population comprised 100 patients who were within a 24-months observational period at the Outpatient Neurological Clinic NZOZ Kendron in Bialystok. Patients eligible for the study met the 2017 McDonald's criteria for a diagnosis of MS. The MS group was composed of 36 males and 64 females, with a median age of 42 years, and a range of 19–58 years. The inclusion criterion was the relapsing–remitting type of MS (RRMS). This clinical form of MS is characterized by acute attacks (relapses) followed by partial or full recovery (remissions)<sup>5</sup>. During the 2-year follow-up, 0–6 relapses of the disease were observed in MS patients.

All RRMS patients, from whom blood samples were taken in remission have had no worsening of neurological functions between attacks. Exclusion criteria were preexisting infections, diseases that required long-term medication, and other inflammatory or neurological disorders. Clinical and demographical information regarding RRMS patients is summarized in Table 1. The control group was composed of 46 healthy, aged-, sex- and body mass index (BMI)-matched volunteers (15 males, 31 females, with median age of 41 years, range of 19–64 years), subject to the same exclusion criteria.

Approval for this study was obtained from the Local Bioethics Committee (Permission No: APK.002.282.2021). Procedures were under the ethical standards set by the Declaration of Helsinki given by the World Medical Association. Written informed consent was obtained from all study participants. According to Polish medical standards, the collection of CSF through a lumbosacral puncture can only be performed in a hospital setting, as it is an invasive procedure. Therefore, the Local Bioethics Committee gave permission only to collect patients' blood. It was not possible to collect CSF from MS patients and healthy volunteers.

**Leptin, fibronectin, and UCHL1 concentrations evaluation.** *Reagents.* Recombinant human UCHL1 protein and rabbit monoclonal antibody (R&D Systems, USA), recombinant human leptin protein

	MS patients (No. = 100)
Sex: Number (%)	Males: 36 (38%)
	Females: 64 (62%)
Age (years)*	42 (32–50)
MS type: Number (%)	RRMS: 100 (100%)
Relapse/Remission: Number (%)	Patients
	In relapse: 0 (0%)
	In remission: 100 (100%)
EDSS*	3.5 (2–4)
The number of years from the first SM symptoms until the blood sample is collected*	8 (3–12)
The number of years from the diagnosis of SM until the blood sample is collected*	4 (1–8)

**Table 1.** Demographical and clinical data of MS patients. MS multiple sclerosis, RRMS relapsing–remitting multiple sclerosis, EDSS Kurtzke’s Expanded Disability Status Scale. \*Data is presented as Median with 25th and 75th percentiles.

and rabbit anti-leptin antibody (Abcam, United Kingdom), fibronectin from human plasma and rabbit anti-fibronectin antibody (Sigma-Aldrich, Germany) were used.

The reagents described in the previous study<sup>16</sup> were utilized in the current study. „The cysteamine hydrochloride, N-ethyl-N’-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS) were from Sigma-Aldrich, Germany, absolute ethanol, acetic acid, hydrochloric acid, sodium hydroxide, sodium chloride, sodium carbonate, sodium acetate were from POCh, (Poland) HBS-ES buffer pH = 7.4 (0.01 M HEPES, 0.15 M sodium chloride, 0.005% Tween 20, 3 mM EDTA), Phosphate Buffered Saline (PBS) pH = 7.4, carbonate buffer pH = 8.5 from BIOMED (Poland) were used as received. Aqueous solutions were prepared with Milli-Q water (Simplicity® Millipore). Argon N 5.0 with a content Ar ≥ 99,999% was used (AIR LIQUIDE Polska Sp.z o.o., Poland).”

*Procedure for determination of UCHL1, fibronectin, and leptin concentrations with SPRI biosensors.* Surface Plasmon Resonance Imaging (SPRI) biosensors were used for the evaluation of UCHL1, fibronectin, and leptin concentrations in plasma samples. The procedure for the preparation of the biosensors for determinations and the research methodology are presented in the previous articles, the same as the schematic diagram of the SPRI apparatus<sup>15–18</sup>.

A rabbit monoclonal antibody specific for human UCHL1, a rabbit polyclonal antibody for fibronectin, and a rabbit monoclonal anti-leptin antibody as a bio-recognition element of biosensors were used<sup>15–18</sup>.

For the biosensor preparation, the gold chip was modified with layer cysteamine. Next, the antibody solution in a PBS buffer (concentration value: 10 µg/mL for UCHL1, 4 µg/mL for fibronectin, and 60 ng/ml for leptin) was activated with NHS (50 mM) and EDC (200 mM) in a carbonate buffer (pH = 8.5) environment and was placed on the layer of cysteamine. The chip prepared in this way was incubated at 37 °C for 1 h. After incubation, the biosensor was rinsed with water and HBS-ES buffer solution (pH = 7.4). Plasma samples were diluted with PBS buffer directly before measurement (for determination of UCHL1: 2–10 times, fibronectin: 1000 times, and leptin: 2–5 times). The diluted samples of plasma were spotted directly on the active place of the prepared biosensor and incubated at room temperature for 10 min. After this time, unbound molecules were removed from the biosensor surface by washing with water and HBS-ES buffer<sup>15–18</sup>.

The SPRI signal was measured from the images of active sites obtained by the CCD camera before and after analyte-receptor interaction. The NIH ImageJ 1.32 software with actualization to version 1.50i (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>, Java 1.8.0\_181 (32-bit), 4990 K of 640 MB (<1%)) was used to process the images<sup>15,17</sup>. Based on the obtained SPRI signals, the concentrations were read from the previously prepared calibration curves. The linear range of curves was 0.5–3.0 ng/mL ( $r^2 = 0.9867$ ) for UCHL1, 5.00–400 ng/mL ( $r^2 = 0.9968$ ) for fibronectin, and 0.1–10 ng/mL for leptin ( $r^2 = 0.9954$ ). Control of non-specific binding on the surface of each biosensor was performed by using sites of the biosensor with PBS buffer<sup>15–18</sup>.

**Statistical analysis.** Statistical analysis was conducted using the STATISTICA PL release 13.3 Program (StatSoft Inc., Tulsa, USA) and GraphPad Prism 8.4.3 software (GraphPad Software, San Diego, USA). All the results are presented as median with 25th and 75th percentiles. Shapiro–Wilk’s test of normality was used for data distribution analysis. The non-Gaussian data were analyzed using the non-parametric Mann–Whitney U test or the Kruskal–Wallis H test. Spearman’s Rank method was used for the correlation coefficient analysis. The differences were deemed statistically significant when  $p < 0.05$ .

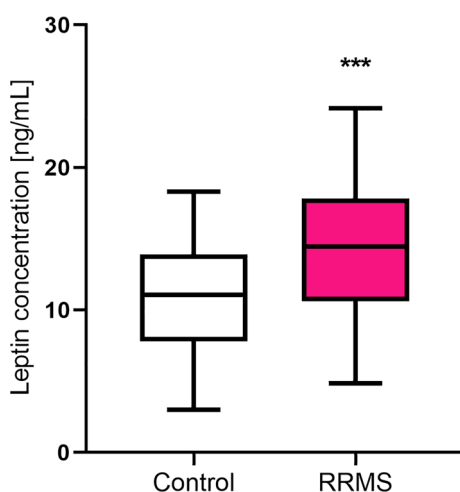
**Ethics approval and consent to participate.** Approval for this study was obtained from the Bioethics Committee of the Medical University of Białystok (No: APK.002.282.2021). Procedures were following the ethical standards set out in the Declaration of Helsinki put out by World Medical Association. We received consent from individual patients who participated in the present study.

## Results

Leptin, fibronectin, and UCHL1 concentrations were detectable in all plasma samples obtained from MS as well as the control subjects.

**Plasma leptin concentration results.** Plasma leptin concentration was significantly higher in MS patients (1.30-fold increase) as compared to the control group (Fig. 1, Table 2). However, there was no difference in the concentration of this marker depending on the patient's sex ( $p > 0.05$ ). Leptin concentration did not differ between patients who had a relapse within the last 24 months compared to those who did not and depending on the EDSS value ( $p > 0.05$ ) (Tables 3, 4). Also, we did not find a correlation between leptin concentration and fibronectin and UCHL1 concentration as well as the age of the patients, the number of years from the first MS symptoms, the number of years from MS diagnosis, the number of relapses within the 24-month observational period, the EDSS value, the EDSS visual functions, the EDSS brainstem functions, the EDSS pyramidal functions, the EDSS cerebellar functions, the EDSS sensory functions, the EDSS bowel/bladder functions, Cerebral functions, and the Ambulation score ( $p > 0.05$ ).

In the control group, plasma leptin concentration did not differ between males and females ( $p > 0.05$ ). Also, we did not find a correlation between leptin concentration and fibronectin and UCHL1 concentration as well as the age of the control individuals ( $p > 0.05$ , respectively).



**Figure 1.** Plasma Leptin concentration in relapse-remitting multiple sclerosis patients (RRMS) as compared to the healthy control individuals. Statistical significance  $***p \leq 0.001$ .

	Leptin [ng/mL]		Fibronectin [ng/mL]		UCHL1 [ng/mL]	
	MS	C	MS	C	MS	C
Median	<b>14.44</b>	<b>11.08</b>	<b>232.29</b>	<b>126.93</b>	<b>16.89</b>	<b>4.07</b>
Percentiles (25–75%)	10.63–17.82	7.97–13.88	213.57–252.40	111.29–144.10	13.66–19.06	3.57–4.34
p-value*	<b><math>p &lt; 0.001</math></b>		<b><math>p &lt; 0.001</math></b>		<b><math>p &lt; 0.001</math></b>	
Fold increase	<b>1.30</b>		<b>1.83</b>		<b>4.15</b>	

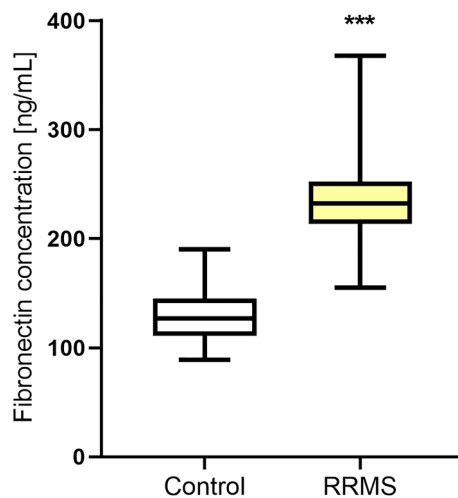
**Table 2.** Plasma leptin, fibronectin, and UCHL1 concentrations in MS patients as compared to the control group (C). Significant values are in bold. MS multiple sclerosis. \*A p-value  $< 0.05$  is considered to show a significant difference between groups (according to the Mann–Whitney U test).

	The last relapse was more than 24 months ago	The last relapse was within 24 months	p-value
Leptin [ng/mL]	13.14 (10.39–17.49)	13.85 (10.65–16.88)	$p = 0.8836$
Fibronectin [ng/mL]	231.70 (213.25–246.80)	234.43 (214.04–251.76)	$p = 0.5579$
UCHL1 [ng/mL]	16.40 (13.60–18.66)	16.82 (13.60–19.01)	$p = 0.6090$

**Table 3.** Plasma leptin, fibronectin, and UCHL1 concentration depending on the presence of relapse within the last 24 months in MS patients. MS multiple sclerosis. Data is presented as Median with the Percentiles (25–75%).

	From no disability with only minimal signs to minimal disability	From moderate to relatively severe disability	From disability affecting full daily activities to the need for assistance with walking and working	p-value
	EDSS: 1–2.5	EDSS: 3–4.5	EDSS: 5–6.5	
Leptin [ng/mL]	14.22 (10.33–17.67)	12.60 (10.39–15.84)	13.78 (10.65–17.48)	p = 0.6450
Fibronectin [ng/mL]	232.36 (211.03–246.08)	230.36 (217.36–251.76)	226.86 (214.36–244.79)	p = 0.8931
UCHL1 [ng/mL]	16.14 (13.33–18.95)	15.67 (13.54–18.27)	17.03 (16.18–18.18)	p = 0.3496

**Table 4.** Plasma leptin, fibronectin, and UCHL1 concentration depending on the EDSS value in MS patients. MS multiple sclerosis, EDSS Kurtzke's Expanded Disability Status Scale. Data is presented as Median with the Percentiles (25–75%).



**Figure 2.** Plasma Fibronectin concentration in relapse-remitting multiple sclerosis patients (RRMS) as compared to the healthy control individuals. Statistical significance \*\*\* $p \leq 0.001$ .

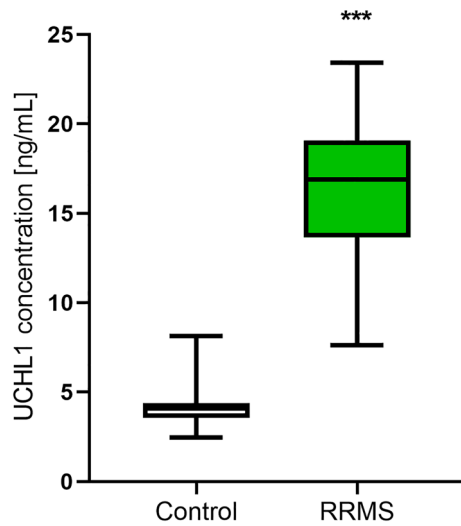
**Plasma fibronectin concentration results.** Plasma fibronectin concentration was significantly higher in MS patients (1.83-fold increase) as compared to the control group (Fig. 2, Table 2). We did not observe differences between the concentration of this parameter in the samples taken from female and male patients ( $p > 0.05$ ). Fibronectin concentration did not differ between patients who had a relapse within the last 24 months compared to those who did not and depending on the EDSS value ( $p > 0.05$ ) (Tables 3, 4). We also did not find a correlation between fibronectin concentration and leptin concentration as well as the age of the patients, the number of years from the first MS symptoms, the number of years from MS diagnosis, the number of relapses within the 24-month observational period, the EDSS value, the EDSS visual functions, the EDSS brainstem functions, the EDSS pyramidal functions, the EDSS cerebellar functions, the EDSS sensory functions, the EDSS bowel/bladder functions, Cerebral functions, and the Ambulation score ( $p > 0.05$ ).

Plasma fibronectin concentration in the control group did not show a sex difference ( $p > 0.05$ ). No correlation was also found between fibronectin concentration and UCHL1 concentration as well as the age of control individuals ( $p > 0.05$ , respectively).

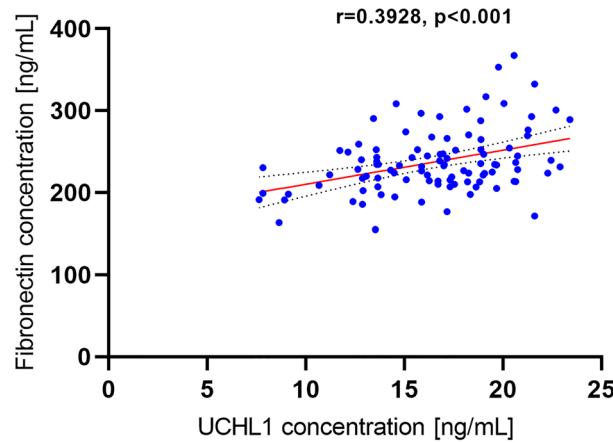
**Plasma UCHL1 concentration results.** We noticed that plasma UCHL1 concentration was significantly higher (a 4.15-fold increase) in patients with MS than in the control group (Fig. 3, Table 2). We did not observe differences between the concentration of this marker in females and males with MS ( $p > 0.05$ ). UCHL1 concentration did not differ between patients who had a relapse within the last 24 months compared to those who did not and depending on the EDSS value ( $p > 0.05$ ) (Tables 3, 4). We also did not find a correlation between UCHL1 concentration and the age of the patients, the number of years from the first MS symptoms, the number of years from MS diagnosis, the number of relapses within the 24-month observational period, the EDSS value, the EDSS visual functions, the EDSS brainstem functions, the EDSS pyramidal functions, the EDSS cerebellar functions, the EDSS sensory functions, the EDSS bowel/bladder functions, Cerebral functions, and the Ambulation score ( $p > 0.05$ ). However, closer inspection showed a positive, average correlation between UCHL1 and fibronectin concentration in MS patients ( $r = 0.3928$ ;  $p < 0.001$ ) (Fig. 4).

In the control group, no difference between plasma UCHL1 concentration in the samples taken from female and male patients was found ( $p > 0.05$ ). Moreover, no correlation between UCHL1 and the age of control individuals was detected ( $p > 0.05$ ).

**Plasma UCHL1 is the most sensitive marker of the relapsing–remitting type of multiple sclerosis.** Plasma UCHL1 was the most useful in differentiating MS patients from healthy individuals. It revealed



**Figure 3.** Plasma UCHL1 concentration in relapse-remitting multiple sclerosis patients (RRMS) as compared to the healthy control individuals. Statistical significance \*\*\* $p \leq 0.001$ .



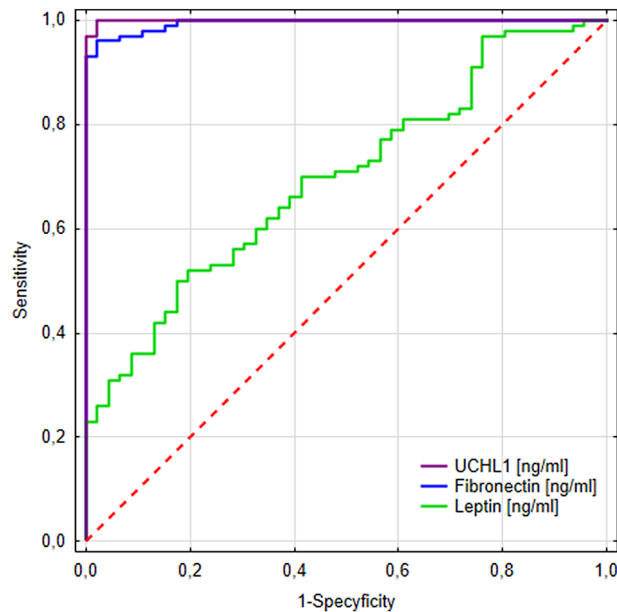
**Figure 4.** The correlation coefficient between fibronectin and UCHL1 concentration in relapse-remitting multiple sclerosis patients.

	Cut-off	Youden index	AUC ± SE	Se [%]	Sp [%]	PPV [%]	NPV [%]	ACC [%]	p-value*
Leptin [ng/mL]	14.49	0.33	0.698 ± 0.044	50	83	86	43	60	$p < 0.0001$
Fibronectin [ng/mL]	0.94	185.76	0.994 ± 0.003	96	98	99	92	97	$p < 0.0001$
UCHL1 [ng/mL]	7.63	0.98	0.999 ± 0.001	100	98	99	100	93	$p < 0.0001$

**Table 5.** Diagnostic usefulness of plasma leptin, fibronectin, and UCHL1 evaluation in differentiating MS patients from healthy individuals. ACC diagnostic accuracy, AUC area under the ROC curve, Cut-off (based on the highest Youden Index), MS multiple sclerosis, NPV negative predictive value, PPV positive predictive value, SE standard error, Se diagnostic sensitivity, Sp diagnostic specificity. \*A p-value < 0.05 is considered to be a statistically significant.

the highest AUC (0.999), diagnostic sensitivity (100%) as well as negative predictive value (100%). Also, the diagnostic specificity (98%), positive predictive value (99%), and diagnostic accuracy (93%) were very high. The AUCs for leptin and fibronectin were also statistically higher than AUC=0.5, which indicates their diagnostic usefulness for differentiating MS patients from healthy individuals (Table 5, Fig. 5).





**Figure 5.** Areas under the ROC curves (AUCs) for plasma leptin, fibronectin, and UCHL1 evaluation in differentiating relapse–remitting multiple sclerosis patients from healthy individuals. For plasma leptin the AUC=0.698, cut-off= 14.49 ng/ml; for plasma fibronectin the AUC=0.994, cut-off=0.94 ng/ml; for plasma UCHL1 the AUC=0.999, cut-off=7.63 ng/ml.

## Discussion

Multiple Sclerosis (MS) is a chronic autoimmune disease<sup>10</sup>. It is indicated that various genetic, environmental, and lifestyle factors contribute to the disease's onset and progression<sup>9</sup>. In most MS patients the disease manifests itself in a relapsing–remitting form (RRMS). This type of MS is typically associated with a clinical event and subsequently complete or partial recovery<sup>19</sup>.

There are some pieces of evidence that human leptin, which the main role is the regulation of adipose tissue mass and energy balance, may participate also in MS pathogenesis<sup>20</sup>. Leptin production can be induced by inflammatory mediators such as TNF- $\alpha$  and IL-1. Moreover, leptin together with C-reactive protein, IL-6, and IL-1 can act as an early acute-phase reactant<sup>21</sup>. The current study presented that plasma leptin levels were significantly higher in MS patients as compared to the healthy control subjects, which confirms that it could be recognized as a pro-inflammatory cytokine affecting immune response in MS and indicate this protein as a potential circulating marker useful in disease diagnosis. Previously also Bahrami et al.<sup>20</sup> noticed a significant difference in leptin levels between healthy volunteers and the MS group. Moreover, Düzel et al.<sup>22</sup> in their study on adipokines in multiple sclerosis showed that the levels of leptin were significantly higher in relapsing–remitting MS patients compared with the healthy control group. Frisullo et al.<sup>5</sup>, who examined the effect of disease activity on leptin concentration in relapsing–remitting MS, observed higher leptin levels in RRMS patients in remission than in controls. Additionally, they found that leptin concentration is higher in remission than in relapse of MS. Although several studies suggested a statistically significant difference in leptin levels between female and male MS patients<sup>5,7,20</sup>, our observation did not confirm these results, which is in agreement with the research of Fahmi et al. and Eftekhari et al.<sup>6,23</sup>. We also did not observe any significant difference between leptin concentration in females and males from the control group.

Inflammation in the course of MS leads also to the loss of myelin (demyelination) and incomplete remyelination which are pathological characteristics of the disease. The failure of remyelination is likely mediated by changes in the extracellular signaling environment. Stoffels et al.<sup>12</sup> presented that extracellular matrix (ECM) molecule fibronectin aggregates are observed in MS lesions and are responsible for remyelination impairment. Fibronectin, a high-molecular-weight multifunctional glycoprotein, regulates cell adhesion, spreading, migration, proliferation, as well as apoptosis<sup>24,25</sup>. It exists as soluble plasma disulfide-linked dimeric form produced by hepatic stellate cells (HSCs) and as a cellular-derived insoluble component of ECM produced by a wide range of cells such as fibroblasts, myocytes, chondrocytes, and synovial cells<sup>24–26</sup>. Fibronectin is expressed at low levels in healthy adult tissues and increases in response to injury or inflammatory processes, which are presented within the CNS in the course of MS<sup>27</sup>. According to Stoffels et al., the best way to positively modulate the remyelination process in MS is to avoid fibronectin aggregation and promote fibronectin clearance<sup>12</sup>. Previous studies by van Horsen et al., Sobel et al., and Satoh et al.<sup>28–30</sup> also demonstrated the expression of fibronectin in chronically demyelinated MS lesions. Our results have indicated that also circulating levels, not only fibronectin aggregates, may indicate the process of inflammation in the course of MS. We observed that plasma fibronectin concentration increased 1.83-fold in patients with RRMS in comparison to the control group. Interestingly, we also found



a positive correlation between fibronectin and UCHL1 concentrations. However, in the control group, we did not present such a correlation.

The potential role of UCHL1 in MS has not been studied so far, therefore in the current study, we examined this protein as a potential candidate biomarker for MS diagnosis. UCHL1 is mostly expressed in neuroendocrine cells and CNS and under physiological conditions constitutes about 2% of soluble proteins in the brain<sup>14</sup>. It is hypothesized that the measurement of circulating neuroglial proteins levels such as UCHL1 in the CSF or blood can be used to detect and assess injury to the nervous system in neurological diseases and trauma, such as MS, amyotrophic lateral sclerosis (ALS), stroke, or traumatic brain injury (TBI)<sup>31,32</sup>. According to Sjölin et al.<sup>32</sup> analysis of UCHL1 concentration in the blood may reflect the size and location of CNS damage. Especially, that Li et al.<sup>31</sup> have indicated that in ALS patients CSF UCHL1 concentrations significantly correlate with its serum levels ( $r = 0.7709$ ,  $p < 0.0001$ ). However, proper interpretation of such data could be possible only by having detailed knowledge about the distribution of UCHL1 in the CNS<sup>32</sup>. Thus the Authors create a map of the UCHL1 concentration in 17 different anatomical regions of the CNS in humans. In their study post-mortem tissue homogenates were obtained from deceased donors without a history of neurological disease. The authors presented, that throughout the cerebrum, the concentration of UCHL1 was higher in the cortex than in white matter. The highest concentration of UCHL1 was found in the hippocampus and the lowest in the cerebellum<sup>32</sup>.

In the current cohort of RRMS patients plasma UCHL1 concentration increased the most (4.15-fold) in comparison to the healthy control group. This could be justified by the fact, that UCHL1 has biological significance in many processes including inflammation and neuronal injury<sup>14</sup>. This enzyme plays an important role in the removal of excessive, oxidized, and misfolded proteins during neuropathological conditions. Brophy et al.<sup>33</sup>, demonstrated that UCHL1 levels are increased following traumatic brain injury (TBI) and the enzyme growth is correlated with both severities of injury and long-term outcome. Papa et al.<sup>34</sup> showed that UCHL1 as a novel biomarker has the potential to determine injury severity in TBI. However, in contrast to the above data, our previous study on the markers of brain injury caused by mild head trauma (MHD) presented that UCHL1 is not a useful marker of MHD due to less tissue damage in comparison to TBI<sup>35</sup>. Despite this, it should be mentioned that our earlier research on UCHL1 as a potential marker showed a higher concentration of this deubiquitinating enzyme in the case of cryptorchidism, thermal injury, and acute appendicitis<sup>36–38</sup>.

This study is the first, that showed the possibility of UCHL1 being a promising high-sensitive potential biomarker of RRMS, especially since the sensitivity of plasma UCHL1 concentration evaluation in differentiating MS patients from healthy individuals was very high (100%). We have demonstrated that there is no statistically significant difference in the concentrations of plasma UCHL1 depending on the patient's sex, the presence of relapse within the last 24 months, and the EDSS value. Plasma UCHL1 concentration also did not correlate with the age of the patients, the number of years from the first MS symptoms, the number of years from MS diagnosis, the EDSS visual functions, the EDSS brainstem functions, the EDSS pyramidal functions, the EDSS cerebellar functions, the EDSS sensory functions, the EDSS bowel/bladder functions, Cerebral functions, and the Ambulation score. These data may indicate that plasma UCHL1 concentration is independent of the time of MS relapse and independent of the severity of neurological symptoms. In the control group UCHL1 concentration was independent of the sex and age of healthy individuals. However, these findings should be further validated on a larger cohort of patients and regarding in relationship to neuroimaging and cerebrospinal fluid analysis data. Here we also have reported for the first time, that the increasing concentration of fibronectin, which has an essential role in the pathological immune response contributing to MS<sup>27</sup>, correlated with the concentration of UCHL1 in the course of RRMS.

One limitation of the study is that the evaluation of biomarkers has not been tested in patients with other neurological diseases as a control group. Therefore, to definitively determine if the candidate markers are specific to MS, additional research should be conducted in neurological conditions other than MS.

## Conclusion

Our current study showed, that besides leptin and fibronectin, also plasma UCHL1 could be a promising high-sensitive potential biomarker of relapsing–remitting MS, as it was the most useful in differentiating RRMS patients from healthy individuals. Plasma UCHL1 concentration evaluation revealed the highest AUC (0.999), diagnostic sensitivity (100%) as well as negative predictive value (100%) in differentiating MS patients from healthy individuals. Moreover, in the current cohort of patients plasma UCHL1 concentration was independent of the time of MS relapse and the severity of neurological symptoms. Thus it could be potentially recognized as an independent circulating marker of RRMS. However, these results should be validated with a larger group of patients, taking into account neuroimaging and cerebrospinal fluid analysis data, and by comparing them to patients with other neurological diseases as a control group.

## Data availability

The datasets generated and analyzed during the current study are not publicly available but all are kept at the Medical University of Białystok and are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 8 November 2022; Accepted: 20 February 2023

Published online: 28 February 2023

## References

1. McQualter, J. L. & Bernard, C. C. A. Multiple sclerosis: A battle between destruction and repair. *J. Neurochem.* **100**, 295–306 (2007).
2. Misriellal, C., Mauthe, M., Reggiori, F. & Eggen, B. J. L. Autophagy in multiple sclerosis: Two sides of the same coin. *Front. Cell. Neurosci.* <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.603710> (2020).
3. Haase, S. & Linker, R. A. Inflammation in multiple sclerosis. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **14**, 175628642110076 (2021).

4. Pegoretti, V. *et al.* Inflammation and oxidative stress in multiple sclerosis: Consequences for therapy development. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2020**, 1–19 (2020).
5. Frisullo, G. *et al.* The effect of disease activity on leptin, leptin receptor and suppressor of cytokine signalling-3 expression in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **192**, 174–183 (2007).
6. Fahmi, R. M., Kamel, A. E., Elsayed, D. A., Zidan, A. A. & Sarhan, N. T. Serum levels of leptin and adiponectin in patients with multiple sclerosis. *Egypt. J. Neurol. Psychiatry Neurosurg.* **57**, 114 (2021).
7. Evangelopoulos, M. E., Koutsis, G. & Markianos, M. Serum leptin levels in treatment-naive patients with clinically isolated syndrome or relapsing-remitting multiple sclerosis. *Autoimmune Dis.* **2014**, 1–6 (2014).
8. Calahorra, L., Camacho-Toledano, C., Serrano-Regal, M. P., Ortega, M. C. & Clemente, D. Regulatory cells in multiple sclerosis: From blood to brain. *Biomedicines* **10**, 335 (2022).
9. Rijnsburger, M., Djuric, N., Mulder, I. A. & de Vries, H. E. Adipokines as immune cell modulators in multiple sclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–22 (2021).
10. Moharami, S. *et al.* Investigation of serum levels of orexin-A, transforming growth factor  $\beta$ , and leptin in patients with multiple sclerosis. *J. Clin. Lab. Anal.* **36**, 1–6 (2022).
11. Cojocar, M., Cojocar, I. M., Siloși, I. & Rogoz, S. Role of Leptin in Autoimmune Diseases. *MAEDICA* **8**, 75–79 (2013).
12. Stoffels, J. M. J. *et al.* Fibronectin aggregation in multiple sclerosis lesions impairs remyelination. *Brain* **136**, 116–131 (2013).
13. Bilguvar, K. *et al.* Recessive loss of function of the neuronal ubiquitin hydrolase UCHL1 leads to early-onset progressive neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 3489–3494 (2013).
14. Matuszczak, E., Tylicka, M., Komarowska, M. D., Debek, W. & Hermanowicz, A. Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1—Physiology and pathology. *Cell Biochem. Funct.* **38**, 533–540 (2020).
15. Sankiewicz, A. *et al.* Development of surface plasmon resonance imaging biosensors for detection of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1. *Anal. Biochem.* **469**, 4–11 (2015).
16. Sankiewicz, A., Romanowicz, L., Pyc, M., Hermanowicz, A. & Gorodkiewicz, E. SPR imaging biosensor for the quantitation of fibronectin concentration in blood samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **150**, 1–8 (2018).
17. Sankiewicz, A., Hermanowicz, A., Grycz, A., Łukaszewski, Z. & Gorodkiewicz, E. An SPR imaging immunosensor for leptin determination in blood plasma. *Anal. Methods* **13**, 642–646 (2021).
18. Gorodkiewicz, E., Sankiewicz, A. & Laudanski, P. 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.* **12**, 557–567 (2014).
19. Huitema, M. J. D. & Schenk, G. J. Insights into the mechanisms that may clarify obesity as a risk factor for multiple sclerosis. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **18**, 18 (2018).
20. Bahrami, E. *et al.* Leptin hormone level in serum of opticospinal, neuromyelitisoptica and multiple sclerosis patients. *Clin. Exp. Neuroimmunol.* **5**, 77–83 (2014).
21. Matarese, G., Proccaccini, C. & De Rosa, V. The intricate interface between immune and metabolic regulation: A role for leptin in the pathogenesis of multiple sclerosis?. *J. Leukoc. Biol.* **84**, 893–899 (2008).
22. Düzel, B., Tamam, Y., Çoban, A. & Tüzün, E. Adipokines in multiple sclerosis patients with and without optic neuritis as the first clinical presentation. *Immunol. Invest.* **48**, 190–197 (2019).
23. Eftekhari, E., Etamadifar, M., Ebrahimi, A. & Baradaran, S. The relation between peptide hormones and sex hormone in patients with multiple sclerosis. *Iran. J. Neurol.* **12**, 60–65 (2013).
24. Patten, J. & Wang, K. Fibronectin in development and wound healing. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **170**, 353–368 (2021).
25. Liu, X. Y. *et al.* Fibronectin expression is critical for liver fibrogenesis in vivo and in vitro. *Mol. Med. Rep.* **14**, 3669–3675 (2016).
26. Dalton, C. J. & Lemmon, C. A. Fibronectin: Molecular structure, fibrillar structure and mechanochemical signaling. *Cells* **10**, 2443 (2021).
27. Stoffels, J. M. J., Zhao, C. & Baron, W. Fibronectin in tissue regeneration: Timely disassembly of the scaffold is necessary to complete the build. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 4243–4253 (2013).
28. van Horsen, J., Bó, L., Dijkstra, C. D. & de Vries, H. E. Extensive extracellular matrix depositions in active multiple sclerosis lesions. *Neurobiol. Dis.* **24**, 484–491 (2006).
29. Sobel, R. A. & Mitchell, M. E. Fibronectin in multiple sclerosis lesions. *Am. J. Pathol.* **135**, 161–168 (1989).
30. Satoh, J. I., Tabunoki, H. & Yamamura, T. Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain-lesion proteome. *Mult. Scler.* **15**, 531–541 (2009).
31. Li, R., Wang, J., Xie, W., Liu, J. & Wang, C. UCHL1 from serum and CSF is a candidate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **7**, 1420–1428 (2020).
32. Sjölin, K. *et al.* Distribution of five clinically important neuroglial proteins in the human brain. *Mol. Brain* **15**, 1–8 (2022).
33. Brophy, G. M. *et al.* Biokinetic analysis of ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 (UCH-L1) in severe traumatic brain injury patient biofluids. *J. Neurotrauma* **28**, 861–870 (2011).
34. Papa, L. *et al.* UCH-L1 is a novel biomarker for severe traumatic brain injury in human. *Crit. Care Med.* **38**, 138–144 (2010).
35. Tylicka, M. *et al.* BDNF and IL-8, but not UCHL-1 and IL-11, are markers of brain injury in children caused by mild head trauma. *Brain Sci.* **10**, 665 (2020).
36. Toliczenko-Bernatowicz, D. *et al.* Overexpression of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1 (UCHL1) in boys with cryptorchidism. *PLoS ONE* **13**, e0191806 (2018).
37. Matuszczak, E. *et al.* Overexpression of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCHL1) in serum of children after thermal injury. *Adv. Med. Sci.* **62**, 83–86 (2017).
38. Matuszczak, E. *et al.* Concentration of UHCL1 in the serum of children with acute appendicitis, before and after surgery, and its correlation with CRP and prealbumin. *J. Investig. Surg.* **31**, 136–141 (2018).

## Author contributions

E.G.: (1) the conception and design of the study, acquisition of data, analysis and interpretation of data; visualization; (2) drafting of the article; (3) final approval of the version to be published. M.T.: (1) the conception and design of the study, acquisition of data, analysis and interpretation of data; visualization; (2) drafting of the article; (3) final approval of the version to be published. A.H.: (1) acquisition of data; (2) revising the article for its content; (3) final approval of the version to be published. E.M.: (1) analysis and interpretation of data; (2) revising the article for its content; (3) final approval of the version to be published. A.S.: (1) methodology; (2) revising the article for its content; (3) final approval of the version to be published. E.G.: (1) acquisition of data; (2) revising the article for its content; (3) final approval of the version to be published. J.H.: (1) analysis and interpretation of data; (2) revising the article for its content; (3) final approval of the version to be published. E.K.: (1) acquisition of data; (2) revising the article for its content. K.S.: (1) revising the article for its content; (2) final approval of the version to be published. Ja.K.: (1) acquisition of data; (2) revising the article for its content; (3) final approval of the version to be published. M.J.: (1) acquisition of data; (2) revising the article for its content.

Jo.K.: (1) visualization; (2) revising the article for its content; (3) final approval of the version to be published. E.H.: (1) analysis and interpretation of data; (2) revising the article for its content; (3) final approval of the version to be published. O.M.K.-L.: (1) analysis and interpretation of data; visualization; (2) drafting of the article; (3) final approval of the version to be published, supervision.

### Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### Competing interests

The authors declare no competing interests.

### Additional information

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to M.T. or O.M.K.-L.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023



Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacji:

”UCHL1, besides leptin and fibronectin, also could be a sensitive marker of the relapsing–remitting type of multiple sclerosis”, *Scientific Reports* | (2023) 13:3423, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30237-3>

Pomoc współautorów polegała na:

lek. med. Ewelina Górską	opracowanie koncepcji badania, dobór grupy badawczej, opracowanie tekstu, przeprowadzenie eksperymentu, analizy formalnej, interpretacji wyniku, redakcja manuskryptu
dr hab. n. med. Marzena Tylicka	pomocy przy opracowaniu koncepcji i projektu badania, pozyskiwaniu danych, analizie i interpretacji danych, wizualizacji i opracowaniu projektu artykułu, ostatecznym zatwierdzeniu wersji do publikacji
prof. dr hab. n. med. Adam Hermanowicz	pomocy przy opracowaniu koncepcji badania, analizie i interpretacji wyników oraz nadzór merytoryczny nad badanie, redakcja manuskryptu
prof. hab. n. med. Ewa Matuszczak	pomocy przy opracowaniu koncepcji badania, analizie i interpretacji wyników
dr Anna Sankiewicz	pomocy przy opracowaniu koncepcji badania, analizie i interpretacji wyników, konstrukcja biosensora
prof. dr hab. Ewa Gorodkiewicz	pomocy przy opracowaniu koncepcji badania, analizie i interpretacji wyników oraz nadzór merytoryczny nad badanie, konstrukcja biosensora
dr hab. n. med. Justyna Hermanowicz	pomocy przy doborze grupy badawczej, opracowaniu koncepcji badania i analizie wyników
dr n. med. Elżbieta Kapińska	pomocy przy opracowaniu koncepcji badania, analizie i interpretacji wyników
prof. dr hab. n. farmaceutycznych Katarzyna Socha	pomocy przy doborze grupy badawczej, opracowaniu koncepcji badania i analizie wyników, zebranie materiału
prof. dr hab. n. med. Jan Kochanowicz	pomocy przy doborze grupy badawczej, analizie i interpretacji wyników, przygotowanie koncepcji badania
dr n. med. Marta Jakoniuk	pomocy przy doborze grupy badawczej, analizie wyników, nadzór merytoryczny

dr hab. n. med. Joanna Kamińska	pomocy przy wizualizacji, sprawdzeniu artykułu pod kątem jego treści, ostatecznym zatwierdzeniu wersji do publikacji
Evgenija Homšak	pomocy przy analizie i interpretacji wyników, opracowaniu koncepcji badania, ostatecznym zatwierdzeniu wersji do publikacji
dr hab. n. med. Olga Koper-Lenkiewicz	pomocy przy analizie i interpretacji danych, wizualizacji, opracowaniu projektu artykułu, ostatecznej akceptacji wersji do publikacji, nadzorze merytorycznym.

Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej lek. Eweliny Górskiej

Podpis kandydata

Potwierdzam opisany powyżej merytoryczny wkład kandydata w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej.

Podpis promotora



Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacji:

"UCHL1, besides leptin and fibronectin, also could be a sensitive marker of the relapsing–remitting type of multiple sclerosis", *Scientific Reports* | (2023) 13:3423, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30237-3>

Pomoc współautorów polegała na:

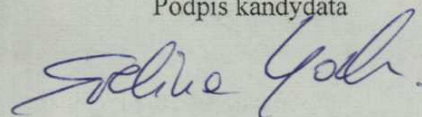
lek. med. Ewelina Górską	opracowanie koncepcji badania, dobór grupy badawczej, opracowanie tekstu, przeprowadzenie eksperymentu, analizy formalnej, interpretacji wyniku, redakcja manuskryptu
dr hab. n. med. Marzena Tylicka	pomocy przy opracowaniu koncepcji i projektu badania, pozyskiwaniu danych, analizie i interpretacji danych, wizualizacji i opracowaniu projektu artykułu, ostatecznym zatwierdzeniu wersji do publikacji
prof. dr hab. n. med. Adam Hermanowicz	pomocy przy opracowaniu koncepcji badania, analizie i interpretacji wyników oraz nadzór merytoryczny nad badanie, redakcja manuskryptu
prof. hab. n. med. Ewa Matuszczak	pomocy przy opracowaniu koncepcji badania, analizie i interpretacji wyników
dr Anna Sankiewicz	pomocy przy opracowaniu koncepcji badania, analizie i interpretacji wyników, konstrukcja biosensora
prof. dr hab. Ewa Gorodkiewicz	pomocy przy opracowaniu koncepcji badania, analizie i interpretacji wyników oraz nadzór merytoryczny nad badanie, konstrukcja biosensora
dr hab. n. med. Justyna Hermanowicz	pomocy przy doborze grupy badawczej, opracowaniu koncepcji badania i analizie wyników
dr n. med. Elżbieta Karpińska	pomocy przy opracowaniu koncepcji badania, analizie i interpretacji wyników
prof. dr hab. n. farmaceutycznych Katarzyna Socha	pomocy przy doborze grupy badawczej, opracowaniu koncepcji badania i analizie wyników, zebranie materiału
prof. dr hab. n. med. Jan Kochanowicz	pomocy przy doborze grupy badawczej, analizie i interpretacji wyników, przygotowanie koncepcji badania
dr n. med. Marta Jakoniuk	pomocy przy doborze grupy badawczej, analizie wyników, nadzór merytoryczny



dr hab. n. med. Joanna Kamińska	pomocy przy wizualizacji, sprawdzeniu artykułu pod kątem jego treści, ostatecznym zatwierdzeniu wersji do publikacji
Evgenija Homšak	pomocy przy analizie i interpretacji wyników, opracowaniu koncepcji badania, ostatecznym zatwierdzeniu wersji do publikacji
dr hab. n. med. Olga Koper-Lenkiewicz	pomocy przy analizie i interpretacji danych, wizualizacji, opracowaniu projektu artykułu, ostatecznej akceptacji wersji do publikacji, nadzorze merytorycznym.

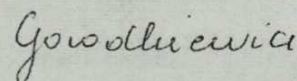
Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej lek. Eweliny Górskiej

Podpis kandydata



Potwierdzam opisany powyżej merytoryczny wkład kandydata w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej.

Podpis promotora



dr hab. n. med. Marzena Tylicka

Białystok, 06.09.2024

Katedra Biofizyki,  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku,  
ul. Mickiewicza 2A, 15-089 Białystok

### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„UCHL1, besides leptin and fibronectin, also could be a sensitive marker of the relapsing–remitting type of multiple sclerosis”, Scientific Reports (2023) 13:3423, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30237-3>

Autorów Ewelina Górską, Marzena Tylicka, Adam Hermanowicz, Ewa Matuszczak, Anna Sankiewicz, Ewa Gorodkiewicz, Justyna Hermanowicz, Elżbieta Karpińska, Katarzyna Socha, Jan Kochanowicz, Marta Jakoniuk, Joanna Kamińska, Evgenija Homšak & Olga Martyna KoperLenkiewicz, opublikowanej w Scientific Reports wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „**Opracowanie potencjalnego panelu markerów w diagnostyce stwardnienia rozsianego**” polegał na pomocy przy opracowaniu koncepcji i projektu badania, pozyskiwaniu danych, analizie i interpretacji danych, wizualizacji i opracowaniu projektu artykułu, ostatecznym zatwierdzeniu wersji do publikacji

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewelinę Górską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]

*Marzena Tylicka*



prof. dr hab.n. med. Adam Hermanowicz

Białystok, 03.10.2024

Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i  
Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim UMB,  
Klinika Chirurgii i Urologii Dziecięcej  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

### Oświadczenie

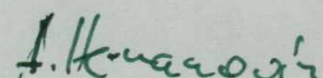
Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„UCHL1, besides leptin and fibronectin, also could be a sensitive marker of the relapsing–remitting type of multiple sclerosis”, Scientific Reports (2023) 13:3423, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30237-3>,

Autorów Ewelina Górską, Marzena Tylicka, Adam Hermanowicz, Ewa Matuszczak, Anna Sankiewicz, Ewa Gorodkiewicz, Justyna Hermanowicz, Elżbieta Karpińska, Katarzyna Socha, Jan Kochanowicz, Marta Jakoniuk, Joanna Kamińska, Evgenija Homšak & Olga Martyna KoperLenkiewicz, opublikowanej w Scientific Reports wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „**Opracowanie potencjalnego panelu markerów w diagnostyce stwardnienia rozsianego**” polegał na pomocy przy opracowaniu koncepcji badania, analizie i interpretacji wyników, nadzór merytoryczny nad badaniem oraz pomoc przy redagowaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewelinę Górską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]



prof. dr hab.n. med Ewa Matuszczak

Białystok, 07.10.2024

Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i  
Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim UMB,  
Klinika Chirurgii i Urologii Dziecięcej  
Uniwersytet medyczny w Białymstoku

### Oświadczenie

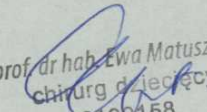
Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„UCHL1, besides leptin and fibronectin, also could be a sensitive marker of the relapsing–remitting type of multiple sclerosis”, Scientific Reports (2023) 13:3423,  
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-30237-3>

Autorów Ewelina Górską, Marzena Tylicka, Adam Hermanowicz, Ewa Matuszczak, Anna Sankiewicz, Ewa Gorodkiewicz, Justyna Hermanowicz, Elżbieta Karpińska, Katarzyna Socha, Jan Kochanowicz, Marta Jakoniuk, Joanna Kamińska, Evgenija Homšak & Olga Martyna KoperLenkiewicz, opublikowanej w Scientific Reports wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „**Opracowanie potencjalnego panelu markerów w diagnostyce stwardnienia rozsianego**” polegał na pomocy przy opracowaniu koncepcji badania, analizie i interpretacji wyników oraz redakcji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewelinę Górską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]

  
prof. dr hab. Ewa Matuszczak  
chirurg dziecięcy  
2199158



dr Anna Sankiewicz

Białystok, 26.07.2024

Laboratorium Bioanalizy, Wydział Chemii,  
Uniwersytet w Białymstoku,  
ul. Ciołkowskiego 1K, 15-245 Białystok

### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„UCHL1, besides leptin and fibronectin, also could be a sensitive marker of the relapsing–remitting type of multiple sclerosis”, Scientific Reports (2023) 13:3423, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30237-3>

Autorów Ewelina Górską, Marzena Tylicka, Adam Hermanowicz, Ewa Matuszczak, Anna Sankiewicz, Ewa Gorodkiewicz, Justyna Hermanowicz, Elżbieta Karpińska, Katarzyna Socha, Jan Kochanowicz, Marta Jakoniuk, Joanna Kamińska, Evgenija Homšak & Olga Martyna KoperLenkiewicz, opublikowanej w Scientific Reports wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „**Opracowanie potencjalnego panelu markerów w diagnostyce stwardnienia rozsianego**” polegał na pomocy przy opracowaniu koncepcji badania oraz analizie i interpretacji wyników.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewelinę Górską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

*Sankiewicz Anna*

[Podpis]

prof. dr hab. Ewa Gorodkiewicz

Białystok, 26.07.2024

Laboratorium Bioanalizy, Wydział Chemii,  
Uniwersytet w Białymstoku,  
ul. Ciołkowskiego 1K, 15-245 Białystok

### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„UCHL1, besides leptin and fibronectin, also could be a sensitive marker of the relapsing–remitting type of multiple sclerosis”, Scientific Reports (2023) 13:3423, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30237-3>

Autorów Ewelina Górską, Marzena Tylicka, Adam Hermanowicz, Ewa Matuszczak, Anna Sankiewicz, Ewa Gorodkiewicz, Justyna Hermanowicz, Elżbieta Karpińska, Katarzyna Socha, Jan Kochanowicz, Marta Jakoniuk, Joanna Kamińska, Evgenija Homšak & Olga Martyna KoperLenkiewicz, opublikowanej w Scientific Reports wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „**Opracowanie potencjalnego panelu markerów w diagnostyce stwardnienia rozsianego**” polegał na pomocy przy opracowaniu koncepcji badania, analizie i interpretacji wyników oraz nadzorze merytorycznym.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewelinę Górską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

*Gorodkiewicz*  
[Podpis]



dr hab.n. med. Justyna Hermanowicz

Białystok, 03.10.2024

Zakład Farmacji Klinicznej,  
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

### Oświadczenie

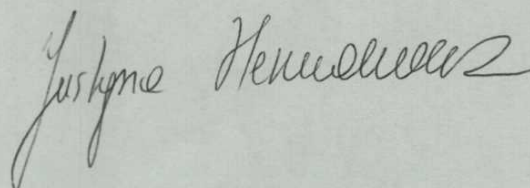
Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„UCHL1, besides leptin and fibronectin, also could be a sensitive marker of the relapsing–remitting type of multiple sclerosis”, Scientific Reports (2023) 13:3423, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30237-3>

Autorów Ewelina Górską, Marzena Tylicka, Adam Hermanowicz, Ewa Matuszczak, Anna Sankiewicz, Ewa Gorodkiewicz, Justyna Hermanowicz, Elżbieta Karpińska, Katarzyna Socha, Jan Kochanowicz, Marta Jakoniuk, Joanna Kamińska, Evgenija Homšak & Olga Martyna KoperLenkiewicz, opublikowanej w Scientific Reports wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „**Opracowanie potencjalnego panelu markerów w diagnostyce stwardnienia rozsianego**” polegał na pomocy przy opracowaniu koncepcji badania oraz analizie i interpretacji wyników.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewelinę Górską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]



dr n. med. Elżbieta Karpińska

Białystok, 03.10.2024

Zakład Bromatologii,  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku,  
ul. Mickiewicza 2D, 15-222 Białystok

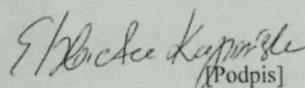
#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„UCHL1, besides leptin and fibronectin, also could be a sensitive marker of the relapsing–remitting type of multiple sclerosis”, Scientific Reports (2023) 13:3423, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30237-3>

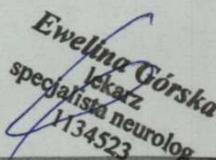
Autorów Ewelina Górską, Marzena Tylicka, Adam Hermanowicz, Ewa Matuszczak, Anna Sankiewicz, Ewa Gorodkiewicz, Justyna Hermanowicz, Elżbieta Karpińska, Katarzyna Socha, Jan Kochanowicz, Marta Jakoniuk, Joanna Kamińska, Evgenija Homšak & Olga Martyna KoperLenkiewicz, opublikowanej w Scientific Reports wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „**Opracowanie potencjalnego panelu markerów w diagnostyce stwardnienia rozsianego**” polegał na pomocy przy opracowaniu koncepcji badania oraz analizie i interpretacji wyników.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewelinę Górską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

  
[Podpis]

ZA ZGODNOŚĆ  
Z ORYGINAŁEM

17-10-2024

  
Ewelina Górską  
lek. med.  
specjalista neurolog  
1134523



prof. dr hab.n. farmaceutycznych Katarzyna Socha

Białystok, 03.10.2024

Zakład Bromatologii,  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku,  
ul. Mickiewicza 2D, 15-222 Białystok

### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

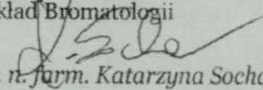
„UCHL1, besides leptin and fibronectin, also could be a sensitive marker of the relapsing–remitting type of multiple sclerosis”, Scientific Reports (2023) 13:3423,  
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-30237-3>

Autorów Ewelina Górską, Marzena Tylicka, Adam Hermanowicz, Ewa Matuszczak, Anna Sankiewicz, Ewa Gorodkiewicz, Justyna Hermanowicz, Elżbieta Karpińska, Katarzyna Socha, Jan Kochanowicz, Marta Jakoniuk, Joanna Kamińska, Evgenija Homšak & Olga Martyna KoperLenkiewicz, opublikowanej w Scientific Reports wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Opracowanie potencjalnego panelu markerów w diagnostyce stwardnienia rozsianego” polegał na pomocy przy zebraniu materiałów, opracowaniu koncepcji badania oraz analizie i interpretacji wyników.

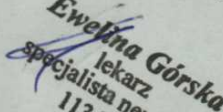
Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewelinę Górską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]

KIEROWNIK  
Zakład Bromatologii

  
prof. dr hab. n. farm. Katarzyna Socha

17-10-2024  
ZA ZGODNOŚĆ  
Z ORYGINAŁEM

  
Ewelina Górską  
lekarz  
specjalista neurolog  
1134523

prof. dr hab. n. med. Jan Kochanowicz

Białystok, 03.10.2024

Klinika Neurologii  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku,  
Ul. M. Skłodowskiej-Curie 24A, 15-276 Białystok

### Oświadczenie

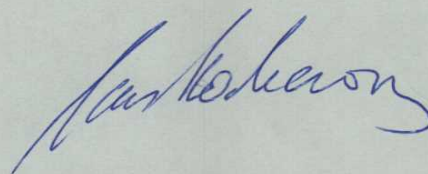
Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„UCHL1, besides leptin and fibronectin, also could be a sensitive marker of the relapsing–remitting type of multiple sclerosis”, Scientific Reports (2023) 13:3423, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30237-3>

Autorów Ewelina Górską, Marzena Tylicka, Adam Hermanowicz, Ewa Matuszczak, Anna Sankiewicz, Ewa Gorodkiewicz, Justyna Hermanowicz, Elżbieta Karpińska, Katarzyna Socha, Jan Kochanowicz, Marta Jakoniuk, Joanna Kamińska, Evgenija Homšak & Olga Martyna KoperLenkiewicz, opublikowanej w Scientific Reports wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „**Opracowanie potencjalnego panelu markerów w diagnostyce stwardnienia rozsianego**” polegał na pomocy przy doborze grupy badawczej, analizie i interpretacji wyników oraz przygotowaniu koncepcji badania.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewelinę Górską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]





dr n. med. Jakoniuk Marta

Białystok, 03.10.2024

Klinika Neurochirurgii  
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku  
ul. M. Skłodowskiej-Curie 24A, 15-276 Białystok

### Oświadczenie

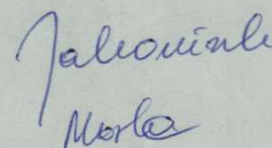
Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„UCHL1, besides leptin and fibronectin, also could be a sensitive marker of the relapsing–remitting type of multiple sclerosis”, Scientific Reports (2023) 13:3423, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30237-3>

Autorów Ewelina Górską, Marzena Tylicka, Adam Hermanowicz, Ewa Matuszczak, Anna Sankiewicz, Ewa Gorodkiewicz, Justyna Hermanowicz, Elżbieta Karpińska, Katarzyna Socha, Jan Kochanowicz, Marta Jakoniuk, Joanna Kamińska, Evgenija Homšak & Olga Martyna KoperLenkiewicz, opublikowanej w Scientific Reports wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „**Opracowanie potencjalnego panelu markerów w diagnostyce stwardnienia rozsianego**” polegał na pomocy przy doborze grupy badawczej, analizie wyników oraz nadzorze merytorycznym.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewelinę Górską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]



dr hab. n. med. Joanna Kamińska  
Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Klinicznej  
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Białystok, 06.09.2024

### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„UCHL1, besides leptin and fibronectin, also could be a sensitive marker of the relapsing–remitting type of multiple sclerosis”, Scientific Reports (2023) 13:3423, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30237-3t>,

Autorów Ewelina Górską, Marzena Tylicka, Adam Hermanowicz, Ewa Matuszczak, Anna Sankiewicz, Ewa Gorodkiewicz, Justyna Hermanowicz, Elżbieta Karpińska, Katarzyna Socha, Jan Kochanowicz, Marta Jakoniuk, Joanna Kamińska, Evgenija Homšak & Olga Martyna KoperLenkiewicz, opublikowanej w Scientific Reports wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „**Opracowanie potencjalnego panelu markerów w diagnostyce stwardnienia rozsianego**” polegał na pomocy przy wizualizacji, sprawdzeniu artykułu pod kątem jego treści, ostatecznym zatwierdzeniu wersji do publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewelinę Górską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]

08023 dr hab. n. med. Joanna Kamińska  
DIAGNOSTA LABORATORYJNY  
specjalista laboratoryjnej diagnostyki medycznej

*Joanna Kamińska*



Evgenija Homšak

Białystok, 06.09.2024

Department for Laboratory Diagnostics,  
University Clinical Centre Maribor  
SI, Ljubljanska Ulica 5, 2000, Maribor, Slovenia  
Department for Clinical Biochemistry, Medical Faculty,  
University of Maribor, Maribor, Slovenia

### Statement

I experience my participation in the preparation of the publication:

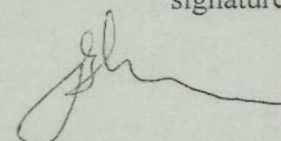
"UCHL1, in addition to leptin and fibronectin, may also be a sensitive marker of relapsing-remitting multiple sclerosis", Scientific Reports (2023) 13:3423,

<https://doi.org/10.1038/s41598-023-30237-3>

Authors Ewelina Górska, Marzena Tylicka, Adam Hermanowicz, Ewa Matuszczak, Anna Sankiewicz, Ewa Gorodkiewicz, Justyna Hermanowicz, Elżbieta Karpińska, Katarzyna Socha, Jan Kochanowicz, Marta Jakoniuk, Joanna Kamińska, Evgenija Homšak and Olga Martyna Koper Lenkiewicz, rate in Scientific Reports connection part of the doctoral dissertation "Development of the use of a panel of markers in the diagnosis of multiple sclerosis" consisting in analysis and interpretation of data; revising the article for its content; final approval of the version to be published.

This includes the use by Ewelina Górska of the publication in the application of the award of a doctoral degree in the field of medical sciences and protective sciences in the disciplines of medical sciences.

signature



28-10-2024  
ZA ZGODNOŚĆ  
Z ORYGINAŁEM  
Ewelina Górska  
lekarz  
specjalista neurolog  
1134523

dr hab. n. med. Olga Koper-Lenkiewicz

Białystok, 06.09.2024

Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Klinicznej,  
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„UCHL1, besides leptin and fibronectin, also could be a sensitive marker of the relapsing–remitting type of multiple sclerosis”, Scientific Reports (2023) 13:3423,  
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-30237-3>

Autorów Ewelina Górską, Marzena Tylicka, Adam Hermanowicz, Ewa Matuszczak, Anna Sankiewicz, Ewa Gorodkiewicz, Justyna Hermanowicz, Elżbieta Karpińska, Katarzyna Socha, Jan Kochanowicz, Marta Jakoniuk, Joanna Kamińska, Evgenija Homšak & Olga Martyna KoperLenkiewicz, opublikowanej w Scientific Reports wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „**Opracowanie potencjalnego panelu markerów w diagnostyce stwardnienia rozsianego**” polegał na pomocy przy analizie i interpretacji danych, wizualizacji, opracowaniu projektu artykułu, ostatecznej akceptacji wersji do publikacji, nadzorze merytorycznym.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewelinę Górską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



[Podpis]

09744 dr hab. n. med. Olga Martyna Koper-Lenkiewicz  
DIAGNOSTA LABORATORYJNY  
O. Koper - Lenkiewicz  
specjalista laboratoryjnej  
diagnostyki medycznej

## **17. Praca oryginalna 2A**



# 20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S are high-sensitivity and independent markers of immunological activity in relapsing-remitting type of multiple sclerosis

Ewelina Górska<sup>1,2,3</sup> | Marzena Tylicka<sup>4</sup>  | Joanna Kamińska<sup>5</sup>  | Adam Hermanowicz<sup>2</sup> | Ewa Matuszczak<sup>2</sup> | Łukasz Ołdak<sup>3</sup> | Ewa Gorodkiewicz<sup>3</sup> | Elżbieta Karpińska<sup>6</sup> | Katarzyna Socha<sup>6</sup> | Jan Kochanowicz<sup>7</sup> | Marta Jakoniuk<sup>8</sup> | Evgenija Homšak<sup>9,10</sup> | Olga Martyna Koper-Lenkiewicz<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Neurological Private Practice, Białystok, Poland

<sup>2</sup>Department of Pediatric Surgery, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

<sup>3</sup>Bioanalysis Laboratory, Faculty of Chemistry, University of Białystok, Białystok, Poland

<sup>4</sup>Department of Biophysics, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

<sup>5</sup>Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

<sup>6</sup>Department of Bromatology, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

<sup>7</sup>Department of Neurology, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

<sup>8</sup>Department of Invasive Neurology, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

<sup>9</sup>Department for Laboratory Diagnostics, University Clinical Centre Maribor, Maribor, Slovenia

<sup>10</sup>Department for Clinical Biochemistry, Medical Faculty, University Maribor, Maribor, Slovenia

## Correspondence

Marzena Tylicka, Department of Biophysics, Medical University of Białystok, Mickiewicza 2a, 15-089 Białystok, Poland.  
Email: [marzena.tylicka@umb.edu.pl](mailto:marzena.tylicka@umb.edu.pl)

Olga Martyna Koper-Lenkiewicz, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Medical University of Białystok, Waszyngtona 15A, 15-269 Białystok, Poland.  
Email: [o.koper@wp.pl](mailto:o.koper@wp.pl)

## Abstract

Research on the markers of autoimmune response in multiple sclerosis (MS) is still of great importance. The aim of our study was the evaluation of plasma 20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S concentrations as potential biomarkers of a relapsing-remitting type of MS (RRMS). Surface plasmon resonance imaging (SPRI) biosensors were used for the evaluation of protein concentrations. Plasma 20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S concentrations were significantly higher in RRMS patients compared to the control group. All three parameters were characterized by excellent usefulness in differentiating MS patients from healthy individuals (AUC equal to or close to 1.000). The plasma concentration of analyzed parameters was not correlated with severity of disability in the course of RRMS (EDSS value), the number of years from the first MS symptoms,

**Abbreviations:** AUC, area under the ROC (Receiver Operator Characteristics) curve; BMI, body mass index; BSA, bovine serum albumin; CIS, Clinically Isolated Syndrome; CNS, central nervous system; CSF, cerebrospinal fluid; EDSS, Kurtzke's Expanded Disability Status Scale; MCTD, mixed connective tissue disease; MS, multiple sclerosis; PBS, phosphate-buffered saline; RIS, Radiologically Isolated Syndrome; RRMS, relapsing-remitting type of multiple sclerosis; SLE, systemic lupus erythematosus; SPRI, surface plasmon resonance imaging.

Ewelina Górska and Marzena Tylicka contributed equally.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2024 The Author(s). *Journal of Neurochemistry* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of International Society for Neurochemistry.

the number of years from MS diagnosis, or the number of relapses within the 24-month observational period. Our study has shown that plasma concentrations of 20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S have promising potential in differentiating RRMS patients from healthy individuals. All of the analyzed parameters were found to be independent of the time of MS relapse and the severity of neurological symptoms. Hence, their potential as highly sensitive and independent circulating markers of RRMS suggests a stronger association with immunological activity (inflammatory processes) than with the severity of the disease.

#### KEYWORDS

autoimmune response, biomarker, cathepsin S, immunoproteasome, proteasome, relapsing-remitting type of multiple sclerosis

## 1 | INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS) is an immune-mediated disease of human central nervous system (CNS) which is characterized by the presence of myelin damage and axonal degradation. About 90% of MS patients suffer the relapsing-remitting MS (RRMS) described by episodes of disability followed by complete or partial recovery (Bellavista et al., 2014). It is hypothesized that during relapse phase of MS auto-reactive T lymphocytes recognize and attack myelin epitopes (Minagar et al., 2012). Consequently, the abnormal immune response to self-antigens results in chronic inflammation and tissue death (Yadav et al., 2022).

Diseases of the CNS are frequently associated with imbalance between proteolysis and protein synthesis; therefore, the analysis of protein degradation pathway seems to be essential in understanding nervous system disease pathology. The major pathway for degradation of intracellular proteins is the ubiquitin-proteasome system (Minagar et al., 2012). Proteasomes are large multi-catalytic protease complexes responsible for the selective degradation of damaged and misfolded proteins. The 20S proteasome is responsible for most non-lysosomal protein degradation in eukaryotes (Mayo et al., 2002). When this degradation pathway is affected, cellular homeostasis is altered and may lead to induction of a range of diseases. In many neurodegenerative diseases including MS toxic protein aggregates are formed and lead to the dysregulation of the proteasomal degradation system. There are some pieces of evidences which indicate that the enzymatic activities of the proteasome are increased in the CNS in patients with MS (Minagar et al., 2012).

Recent observations emphasized the role of immunoproteasomes in protein degradation. Immunoproteasomes are a variant of proteasomes with structural differences in 20S subunits (Chen et al., 2023) which are formed by incorporation of immunosubunits into the 20S core after de novo synthesis in response to inflammatory processes (Kloetzel, 2004). Immunoproteasomes as an alternative form of proteasomes can degrade proteins faster than the constitutive proteasomes and are associated with more severe experimental autoimmune encephalomyelitis. In contrast, some other studies showed that 20S constitutive proteasomes and 20S immunoproteasomes

degraded non-ubiquitinated proteins at similar rates. Therefore, immunoproteasomes do not degrade proteins more efficiently than constitutive particles. However, it is established that the presence of immunoproteasome is important in cytokine production, which is connected with their presence in white blood cells and their induction during inflammation (Nathan et al., 2013). According to available knowledge, the constitutive proteasomes take nearly 82 min to be assembled in contrast to immunoproteasomes, which are formed in only 21 min. This fact indicates that quick assembly of immunoproteasome is related to their role in providing a rapid response to inflammation or stress as signaled by proinflammatory cytokines or oxidative stress pathway. Immunoproteasome dysfunction is connected with the pathogenesis of various immune diseases and inflammatory disorders. Experiments conducted in mice models show that immunoproteasome hyperactivity has been found in cancers, autoimmune diseases such as Crohn's colitis, diabetes, experimental rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, and MS and also in the case of viral and fungal infections (Eskandari et al., 2017).

Besides the pathway for degradation of intracellular proteins which involves proteasomes and immunoproteasomes, the proteins can be degraded in the lysosomal pathway. Cathepsin S is a lysosomal protease which can promote degradation of damaged and unwanted proteins. Dysregulation of these processes induces the secretion of cathepsin S in a variety of pathological processes including arthritis, cancer, or cardiovascular disease. The role of this protease is not only limited to the protein turnover but it also contributes to cell signaling, control of receptor activation, chemokine/cytokine processing, or antigen presentation. It has been demonstrated that in the course of MS, cathepsin S cleaves the myelin basic protein and plays a key role in the disease's progression (Haves-Zburof et al., 2011; Wilkinson et al., 2015).

Because proteolytic degradation is the key process in demyelination during the course of MS, leading to neurodegeneration, the aim of this study was to evaluate the concentrations of proteasomes, immunoproteasomes, and cathepsin S in plasma obtained from patients diagnosed with the relapsing-remitting type of MS. In the next step, we also analyzed the correlations between tested parameters and the following data: age of the patients, the number of years from the first MS symptoms, the number of years from MS diagnosis, the



number of relapses within the 24-month observational period, and the Kurtzke's Expanded Disability Status Scale (EDSS) value.

The evaluation of the above-mentioned proteins was carried out using biosensors coupled with the surface plasmon resonance imaging (SPRI). SPRI, first presented by Rothenhausler and Knoll, is now used to observe interactions between biomolecules, with high throughput (thanks to a CCD camera as a detector) and without the use of labels. SPRI has found wide application in drug discovery, biomarker screening, nucleic acid detection, environmental monitoring, and food safety (Spoto & Minunni, 2012; Wong & Olivo, 2014).

## 2 | MATERIALS AND METHODS

The study was not pre-registered.

### 2.1 | Patients

The study group contained 100 patients who were within a 24-month observational period at the Outpatient Neurological Clinic NZOZ Kendron in Białystok. Patients eligible for the study met the 2017 McDonald's criteria for a diagnosis of MS. The MS group included 36 males and 64 females. The inclusion criterion was the age range 19–58 years (Median: 42 years) and diagnosed relapsing-remitting type of MS (RRMS). This clinical form of MS is characterized by acute attacks (relapses) followed by partial or full recovery (remissions). During the 2-year follow-up, 0–6 relapses of the disease were observed in MS patients. 52% of RRMS patients were not treated, while the remaining patients received disease-modifying therapies. Fingolimod was used by 18% of patients, beta-interferon by 15%, natalizumab by 5%, and daclizumab by 10%.

Blood samples were taken in all RRMS patients in remission only if they had no worsening of neurological functions between attacks. Other clinical information characterized the study group were the EDSS scale ranges from 1 to 6.5 (Median: 3.5), the number of years that elapsed until the blood was collected: from the first MS symptoms in range from 3 to 12 (Median: 8 years) and from the diagnosis of MS in range from 1 to 8 (Median: 4 years). Exclusion criteria for study group were preexisting infections, diseases that required long-term medication, and other inflammatory or neurological disorders.

A control group comprising 46 healthy individuals (15 males and 31 females) was established. The participants, with a median age of 41 years and an age range of 19–64 years, were matched in terms of sex and body mass index (BMI) to the study group. Additionally, the control group adhered to the same exclusion criteria as the study group.

Approval for this study was obtained from the Local Bioethics Committee (Permission No: APK.002.282.2021). Procedures were under the ethical standards set by the Declaration of Helsinki given by the World Medical Association. Written informed consent was obtained from all study participants. According to Polish medical standards, the collection of CSF through a lumbosacral puncture can only be performed in a hospital setting, as it is an invasive procedure.

Therefore, the Local Bioethics Committee gave permission only to collect patients' blood. It was not possible to collect CSF from MS patients and healthy volunteers.

### 2.2 | 20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome and cathepsin S concentrations evaluation

Quantitative measurements of 20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S were carried out using biosensors coupled with the SPRI.

The detailed procedure for the preparation of biosensors for research was described in the previous article (Sankiewicz et al., 2017). The quantities of the 20S constitutive proteasome and 20S immunoproteasome were determined using suitable biosensors. In the case of the 20S constitutive proteasome, the receptor was the PSI inhibitor (Z-Ile-Glu (OBut)-Ala-Leu-H) (CAS no. 158442-41-2) immobilized on thiol-cysteamine (cysteamine hydrochloride, CAS no. 156-57-0) (Sigma, Steinheim, Germany), while the receptor for the 20S immunoproteasome was the ONX 0914 inhibitor (CAS no. 960374-59-8) (Selleckchem, Houston, USA) coated with a thiol-ODM (1-octadecanethiol, CAS no. 2885-00-9) (Aldrich, Munich Germany). The biosensor prepared for the experiments was washed with water and HBS-ES buffer solution. The analytes were diluted to fit the calibration curve of the methods (20S constitutive proteasome: 0.5–6.0 µg/mL, 20S immunoproteasome: 0.35–4.2 µg/mL). Therefore, the tested samples were subjected to the following dilutions (volume ratio, for both 20S constitutive proteasome and 20S immunoproteasome): patient samples 1:10, and the control group 1:1. The dilution buffer used was 0.15 M PBS (CAS no. 7778-77-0). The maximum interaction time between the analyte and the receptor was 10 min.

The procedure for preparing the biosensor for determinations as well as methodology are presented in the previous article (Oldak et al., 2021). A rat monoclonal antibody specific for human cathepsin S (Cat. no. AF1183; R&D Systems, USA) was used for quantification of the protein in MS samples and control group. After incubation of the biosensor in appropriate conditions, it was rinsed with water and HBS-ES buffer solution pH=7.4, the composition of which is as follows: 0.01 M 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid (CAS no. 7365-45-9), 0.15 M sodium chloride (CAS no. 7647-14-5), 0.005% Tween 20 (CAS no. 9005-64-5), 3 mM EDTA (CAS no. 6381-92-6) (Aldrich, Munich Germany). Subsequently, plasma samples diluted with 0.15 M PBS buffer in the volume ratio 1:10 (patient samples) and 1:1 (control samples) were applied to the active sites of the biosensor, where the interaction between the antibody and cathepsin S occurred for a maximum of 10 min. After the specified time, unbound molecules were removed from the biosensor surface by washing the active site surfaces with water and HBS-ES buffer. From the rectilinear range (0.05–1.5 ng/mL) of the previously prepared calibration curve, the concentration of cathepsin S in the samples was read, taking into account the dilution.

We performed a control for non-specific binding on the surface of each biosensor using biosensor sites with 1 mg/mL BSA (CAS no.



9048-46-8) in PBS buffer. A schematic image of the equipment used is presented in the published article (Falkowski et al., 2021).

The images of active sites of SPRI biosensors obtained as a result of the research were processed using the NIH ImageJ 1.32 software with actualization to version 1.50i (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>, Java 1.8.0\_181 (32-bit), 4990K of 640MB (<1%)).

## 2.3 | Statistical analysis

Statistical analysis was conducted using the STATISTICA PL release 13.3 Program (StatSoft Inc., Tulsa, USA) and GraphPad Prism 8.4.3 software (GraphPad Software, San Diego, USA). All the results are presented as the median with 25th and 75th percentiles. To analyze the normality of the data distribution, the Shapiro–Wilk's test was used. If the tested parameters did not pass the normality test the results were analyzed using the non-parametric Mann–Whitney *U* test or the Kruskal–Wallis *H* test. Spearman's Rank method was used for the correlation coefficient analysis. No test for outliers was conducted. The sample size was calculated using an independent two-sided *t*-test, with a 95% confidence level and a margin of error of  $\pm 5\%$ , with  $\alpha = 0.05$  and a power analysis of 80% (0.8). We utilized the Sample Size Calculator on [ClinCalc.com](https://clincalc.com/stats/samplesize.aspx) from <https://clincalc.com/stats/samplesize.aspx> for these calculations. The differences were considered statistically significant with the values  $p < 0.05$ .

## 3 | RESULTS

### 3.1 | The plasma 20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S concentration results

The 20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S concentrations were detectable in all plasma samples obtained from MS as well as the control subjects.

The concentrations of plasma 20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S were significantly higher ( $p < 0.05$ ) in MS patients as compared to the control group (respectively: 16.860-fold increase, 22.670-fold increase, and 8.470-fold increase) (Table 1). Moreover, in the MS group, the concentration of 20S constitutive proteasome negatively correlated with the concentration of 20S immunoproteasome ( $r = -0.4830$ ,  $p < 0.05$ ) (Figure 1). Neither the 20S constitutive proteasome concentration nor the 20S immunoproteasome concentration correlated with the cathepsin S concentration ( $p > 0.05$ ). None of the three tested molecules correlated with the patients' age, sex, the number of years from the first MS symptoms, the number of years from MS diagnosis, the number of relapses within the 24-month observational period, or the EDSS value ( $p > 0.05$ ). Plasma 20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S concentrations did not differ between MS patients subgroups according to the EDSS value ( $p > 0.05$ ) (Table 2) and between MS patients who had a relapse within the last 24 months compared to those who did not ( $p > 0.05$ ) (Table 3). Deeper analysis presented that both, in the subgroup of MS patients in which relapses did not occur within 24 months and in the subgroup of patients in which the relapses were observed, the concentration of 20S constitutive proteasome negatively correlated with the concentration of 20S immunoproteasome ( $r = -0.4001$ ,  $p < 0.05$  and  $r = -0.5817$ ,  $p < 0.05$ , respectively) (Figures 2 and 3).

### 3.2 | The plasma 20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S concentration depending on the disease-modifying therapies (DMTs)

The concentrations of 20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S in patients without treatment and in patients receiving different DMTs (fingolimod, interferon beta, natalizumab, daclizumab) did not differ significantly between the analyzed groups (Table 4).

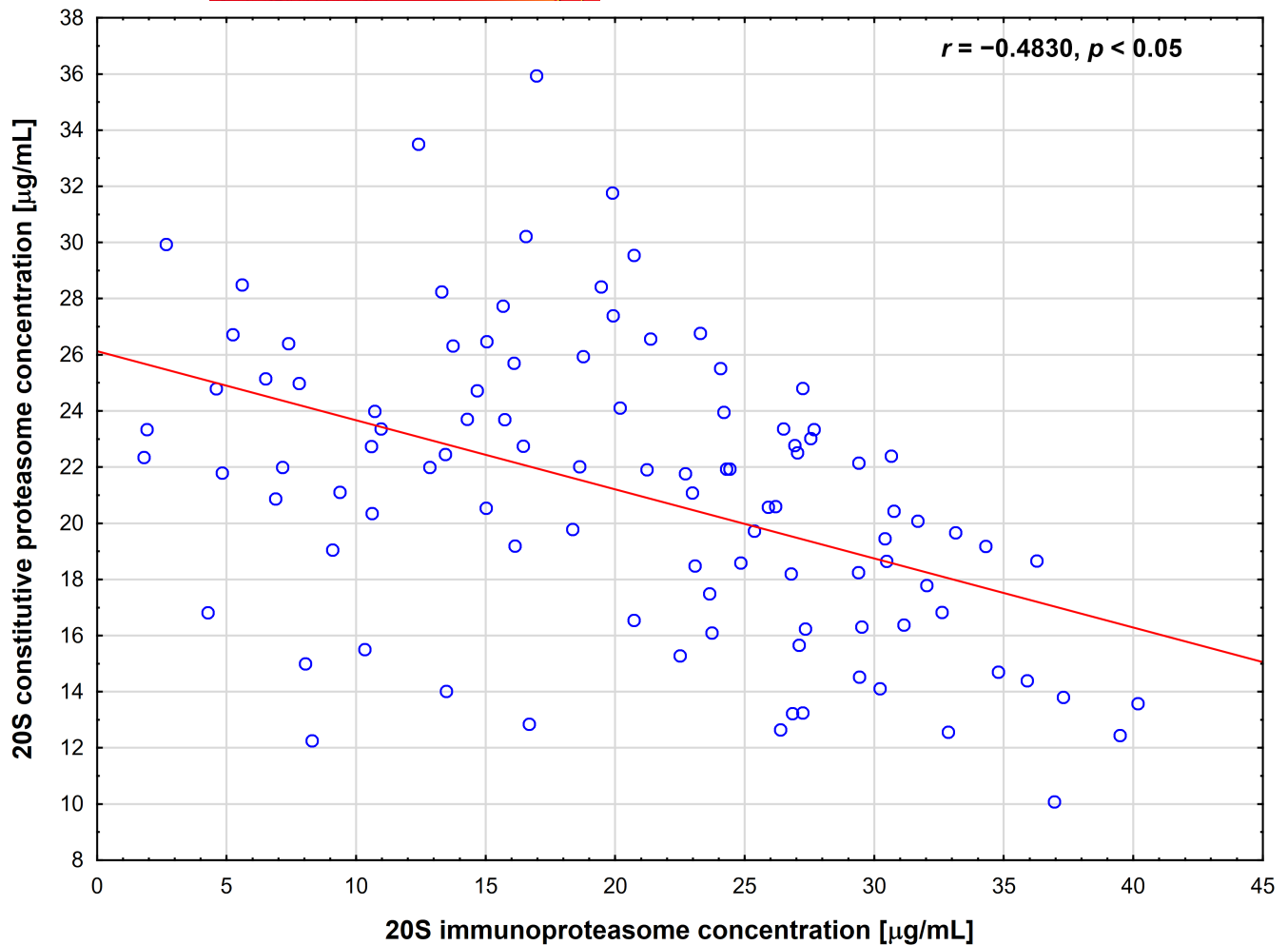
TABLE 1 The plasma 20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S concentrations in MS patients as compared to the control group (C).

	20S constitutive proteasome concentration [ $\mu\text{g/mL}$ ]		20S immunoproteasome concentration [ $\mu\text{g/mL}$ ]		Cathepsin S concentration [ $\text{ng/mL}$ ]	
	MS (N = 100)	C (N = 46)	MS (N = 100)	C (N = 46)	MS (N = 100)	C (N = 46)
Median	21.362	1.267	21.763	0.976	9.995	1.180
Percentiles (25%–75%)	13.443–27.336	0.988–2.286	10.076–35.942	0.782–1.586	8.433–11.647	1.004–1.403
<i>p</i> -value*	$p < 0.0001$ ( $U = 34.000$ ; $p = 0.000$ )		$p < 0.0001$ ( $U = 0.000$ ; $p = 0.000$ )		$p < 0.0001$ ( $U = 0.000$ ; $p = 0.000$ )	
Fold increase	16.860		22.670		8.470	

Note: Statistical parameters according to the Mann–Whitney *U* test (*U*-value; *p*-value): 20S constitutive proteasome concentration [ $\mu\text{g/mL}$ ] ( $U = 34.000$ ;  $p = 0.000$ ), 20S immunoproteasome concentration [ $\mu\text{g/mL}$ ] ( $U = 0.000$ ;  $p = 0.000$ ), Cathepsin S concentration [ $\text{ng/mL}$ ] ( $U = 0.000$ ,  $p = 0.000$ ).

Abbreviation: MS, multiple sclerosis.

\*A *p*-value  $< 0.05$  is considered to show a significant difference between groups.



**FIGURE 1** Correlation between 20S constitutive proteasome concentration and 20S immunoproteasome concentration in patients with relapsing-remitting type of multiple sclerosis ( $r = -0.4830$ ,  $p < 0.05$ ) ( $N = 100$ ).

**TABLE 2** The plasma 20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S concentration depending on the EDSS value in MS patients.

	From no disability with only minimal signs to minimal disability	From moderate to relatively severe disability	From disability affecting full daily activities to the need for assistance with walking and working	<i>p</i> -value
	EDSS: 1–2.5 ( $N = 35$ )	EDSS: 3–4.5 ( $N = 33$ )	EDSS: 5–6.5 ( $N = 32$ )	
20S constitutive proteasome concentration [µg/mL]	23.921 (14.477–30.707)	22.508 (15.043–27.672)	23.278 (5.233–26.501)	$p = 0.7780$ ( $H = 0.502$ ; $df = 2$ )
20S immunoproteasome concentration [µg/mL]	20.701 (17.990–23.047)	21.104 (16.541–24.101)	21.913 (15.655–25.702)	$p = 0.8931$ ( $H = 0.226$ ; $df = 2$ )
Cathepsin S concentration [ng/mL]	9.803 (7.654–11.306)	9.863 (8.449–11.438)	9.100 (6.904–10.867)	$p = 0.6840$ ( $H = 0.759$ ; $df = 2$ )

Note: Statistical parameters according to the Kruskal–Wallis  $H$  test ( $p$ -value;  $H$ -value;  $df$ ): 20S constitutive proteasome concentration [µg/mL] ( $p = 0.7780$ ;  $H = 0.502$ ;  $df = 2$ ), 20S immunoproteasome concentration [µg/mL] ( $p = 0.8931$ ;  $H = 0.226$ ;  $df = 2$ ), Cathepsin S concentration [ng/mL] ( $p = 0.6840$ ;  $H = 0.759$ ;  $df = 2$ ).

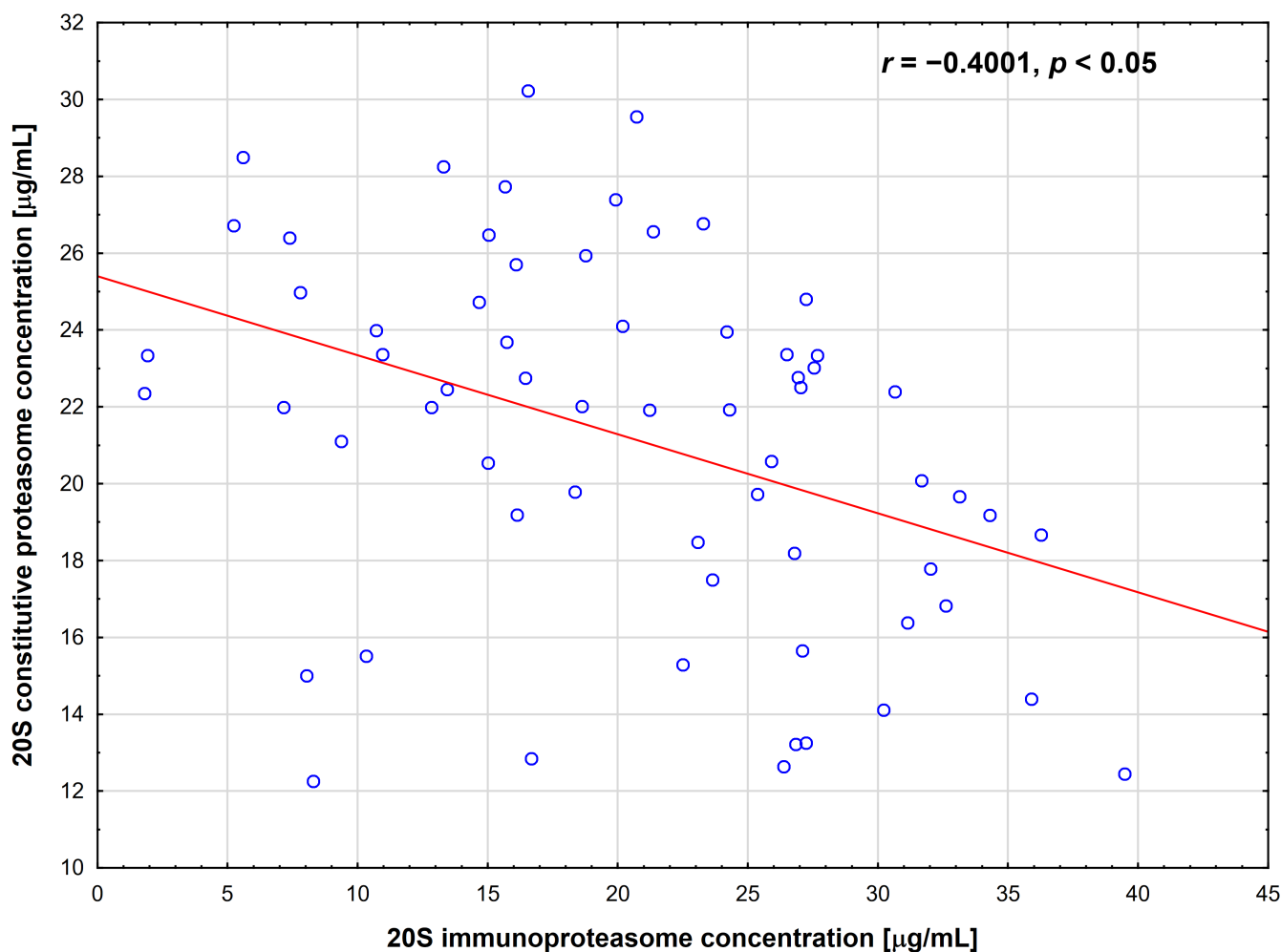
Abbreviations: EDSS, Kurtzke's Expanded Disability Status Scale; MS, multiple sclerosis.

**TABLE 3** The plasma 20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S concentration depending on the presence of relapse within the last 24 months in MS patients.

	The last relapse was more than 24 months ago (N = 64)	The last relapse was within 24 months (N = 36)	p-value
20S constitutive proteasome concentration [ $\mu\text{g/mL}$ ]	21.228 (14.666–27.028)	22.848 (11.514–29.461)	$p=0.9069$ ( $U=1153.000$ )
20S immunoproteasome concentration [ $\mu\text{g/mL}$ ]	21.989 (18.193–24.101)	20.515 (16.424–24.247)	$p=0.4375$ ( $U=1060.000$ )
Cathepsin S concentration [ $\text{ng/mL}$ ]	9.638 (7.932–10.983)	9.821 (8.387–11.378)	$p=0.0949$ ( $U=934.000$ )

Note: Statistical parameters according to the Mann-Whitney  $U$  test ( $U$ -value;  $p$ -value): 20S constitutive proteasome concentration [ $\mu\text{g/mL}$ ] ( $U=610.000$ ;  $p=0.8225$ ), 20S immunoproteasome concentration [ $\mu\text{g/mL}$ ] ( $U=553.000$ ;  $p=0.3800$ ), Cathepsin S concentration [ $\text{ng/mL}$ ] ( $U=480.000$ ;  $p=0.0855$ ).

Abbreviation: MS, multiple sclerosis.

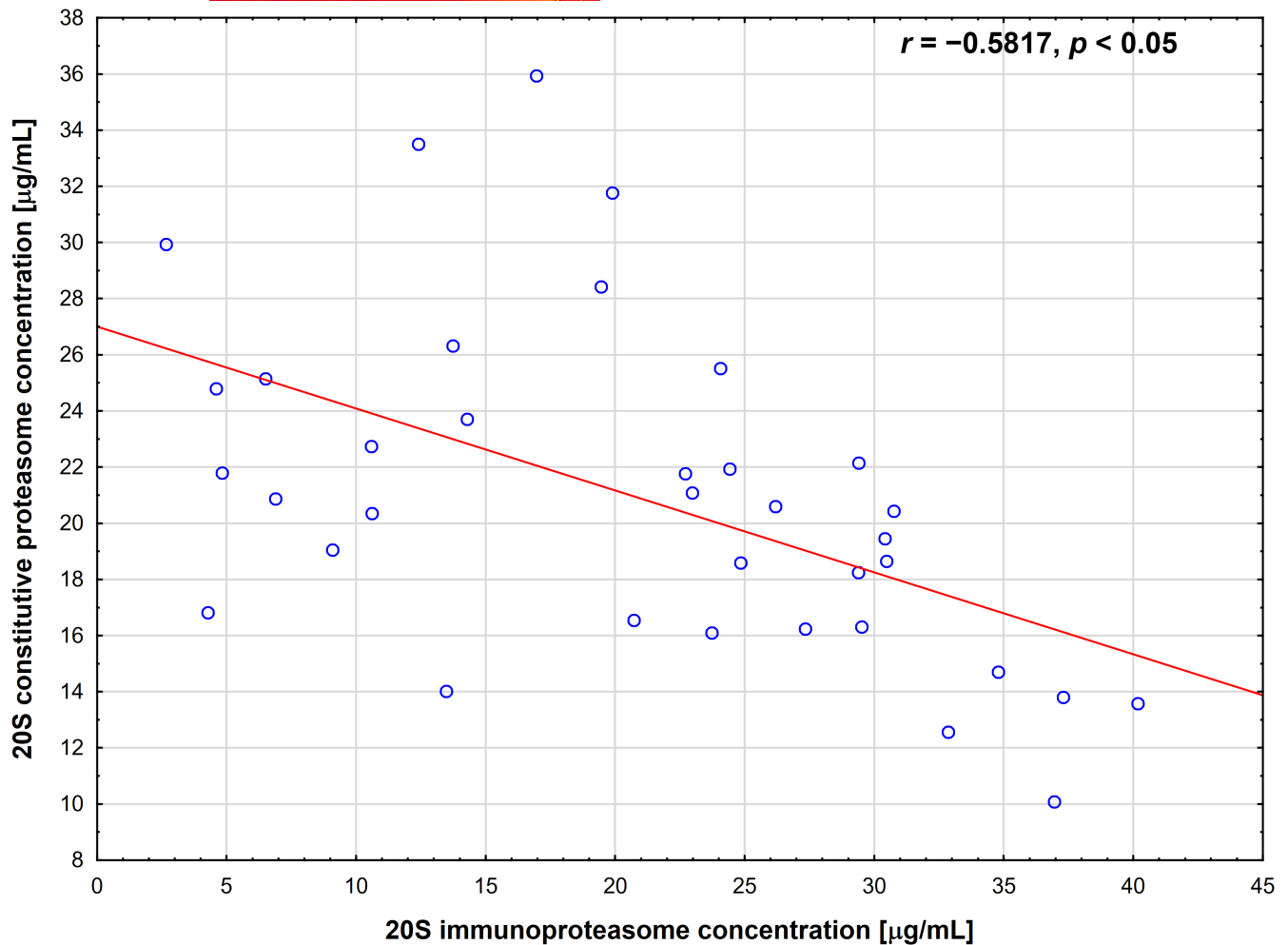


**FIGURE 2** Correlation between 20S constitutive proteasome concentration and 20S immunoproteasome concentration in multiple sclerosis patients in which the last relapse was more than 24 months ago ( $r = -0.4001, p < 0.05$ ) (N = 64).

### 3.3 | Diagnostic utility analysis of the plasma 20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S in differentiating MS patients from healthy individuals

The analysis of diagnostic utility demonstrated that all three analyzed parameters (20S constitutive proteasome, 20S

immunoproteasome, and cathepsin S) exhibit excellent utility in distinguishing MS patients from healthy individuals. The area under the ROC curve (AUC) for these parameters was equal to or close to 1.000. This indicates that these circulating markers possess the highest levels of sensitivity, specificity, positive and negative predictive value, as well as diagnostic accuracy (Table 5; Figures 4–6).



**FIGURE 3** Correlation between the concentration of 20S constitutive proteasome and 20S immunoproteasome in multiple sclerosis patients, where the last relapse occurred within the last 24 months ( $r = -0.5817$ ,  $p < 0.05$ ) ( $N = 36$ ).

**TABLE 4** The plasma 20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S concentration depending on the disease-modifying therapies.

	Without treatment (N = 52)	Treatment with fingolimod (N = 18)	Treatment with interferon beta (N = 15)	Treatment with natalizumab (N = 5)	Treatment with daclizumab (N = 10)	p-value
20S constitutive proteasome concentration [ $\mu\text{g/mL}$ ]	22.038 (12.927–26.978)	18.401 (7.387–32.031)	19.918 (10.587–29.406)	33.141 (31.679–36.950)	23.750 (16.450–27.546)	$p = 0.1334$ ( $H = 7.047$ ; $df = 2$ )
20S immunoproteasome concentration [ $\mu\text{g/mL}$ ]	21.434 (16.271–24.450)	23.350 (17.785–25.702)	20.593 (18.663–23.705)	19.664 (12.446–20.080)	22.568 (18.477–23.365)	$p = 0.2860$ ( $H = 5.013$ ; $df = 2$ )
Cathepsin S concentration [ $\text{ng/mL}$ ]	11.043 (9.554–11.838)	9.639 (8.066–10.555)	9.978 (7.704–12.542)	8.245 (5.667–9.157)	8.757 (7.846–10.867)	$p = 0.2430$ ( $H = 11.212$ ; $df = 2$ )

Note: Statistical parameters according to the Kruskal–Wallis  $H$  test ( $p$ -value;  $H$ -value;  $df$ ).

### 3.4 | Power analysis and sample size calculations

The investigation of 20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S concentrations is the first in patients with relapsing–remitting type of MS. Therefore, we did not conduct a priori power analysis and sample size calculations. However, we assessed the test power based on the values

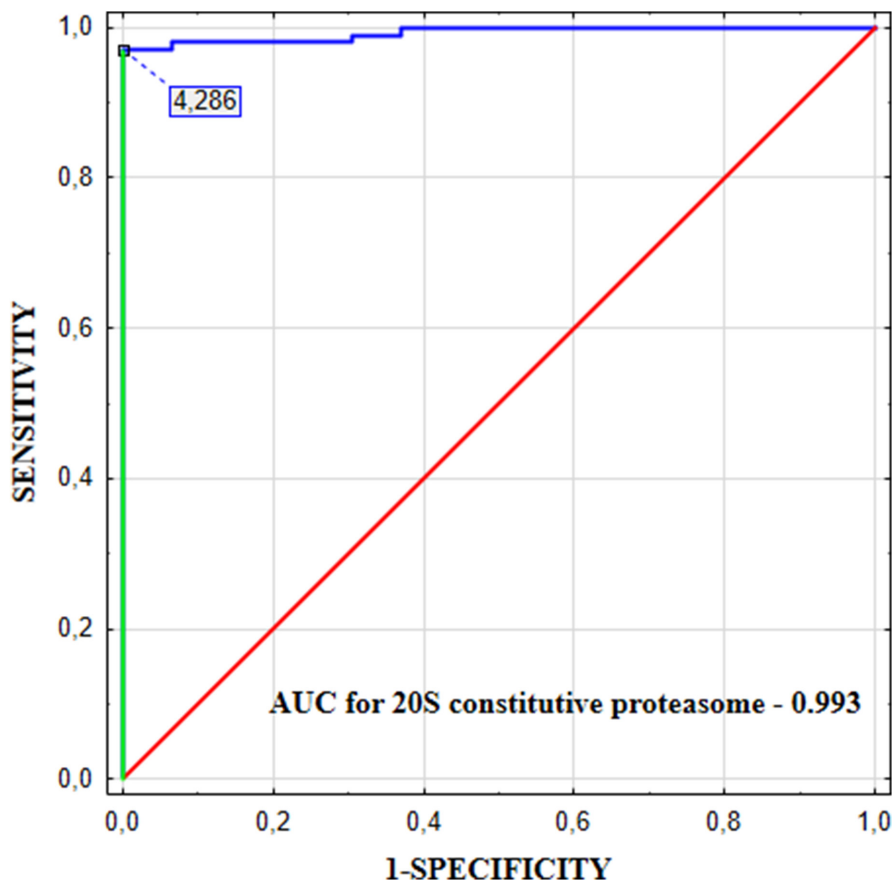
obtained in this study, utilizing an independent two-sided  $t$ -test with a 95% confidence level and a margin of error of  $\pm 5\%$ . This analysis yielded a power of 100% (1.0). Additionally, we performed sample size calculations for the three markers. The analysis revealed that a minimum sample size of 4 is required for both the research and control groups. With our study group consisting of  $N = 100$  patients and the control group  $N = 46$ , we meet this

**TABLE 5** Diagnostic parameters of the plasma 20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S in differentiating MS patients from healthy individuals.

	Cut-off	Youden index	AUC ± SE	Se [%]	Sp [%]	PPV [%]	NPV [%]	ACC [%]	p-value
20S constitutive proteasome [μg/mL]	4.29	0.97	0.993 ± 0.005	97	100	100	93	98	<0.0001
20S immunoproteasome [μg/mL]	10.08	1.00	1.000 ± 0.000	100	100	100	100	100	<0.0001
Cathepsin S [ng/mL]	5.17	1.00	1.000 ± 0.000	100	100	100	100	100	<0.0001

Abbreviations: ACC, diagnostic accuracy; AUC, area under the ROC curve; Cut-off (based on the highest Youden index); NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value; Se, diagnostic sensitivity; SE, Standard Error; Sp, diagnostic specificity.

**FIGURE 4** Area under the ROC curve (AUC) for the plasma 20S constitutive proteasome evaluation in differentiating relapse-remitting multiple sclerosis patients from healthy individuals. For plasma proteasome 20S the AUC=0.993, cut-off=4.29 μg/mL.



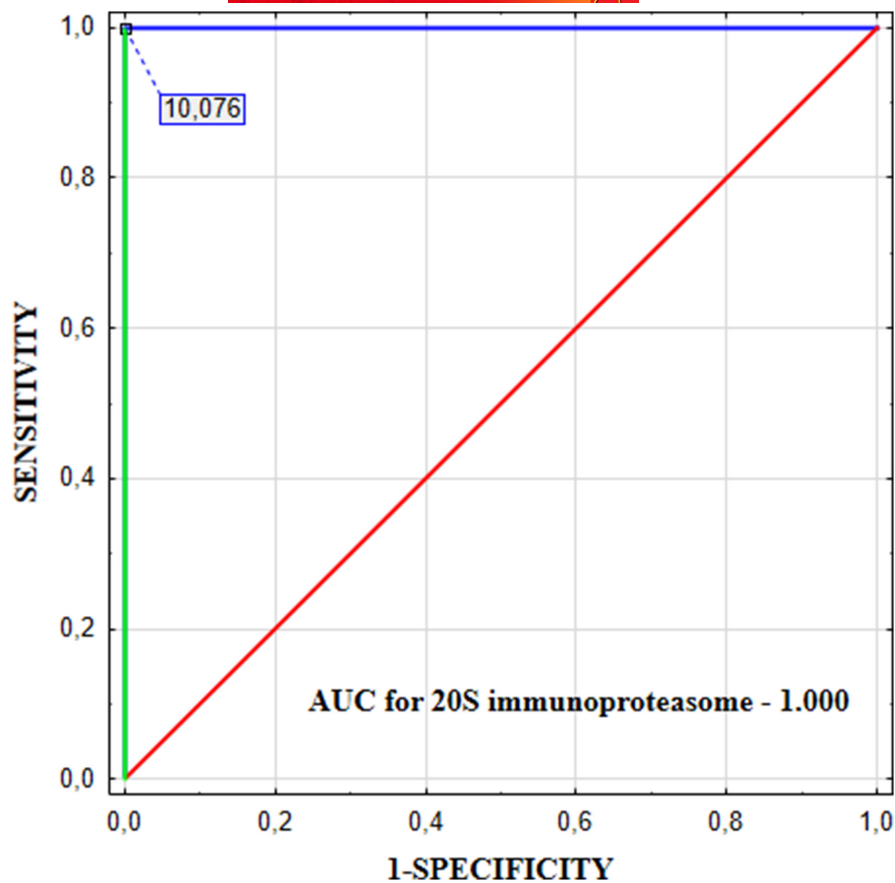
requirement. Therefore, the sample size criteria for analyzing the three evaluated markers are satisfied.

## 4 | DISCUSSION

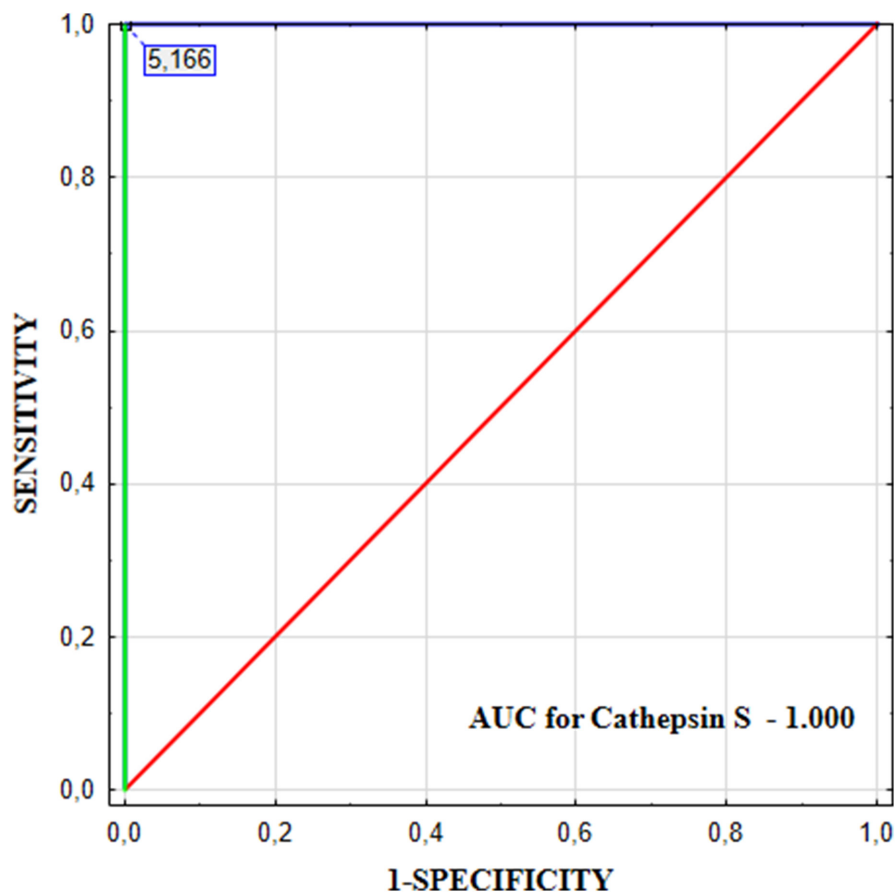
According to our best knowledge, our study is the first to evaluate plasma 20S constitutive proteasome and 20S immunoproteasome concentrations in patients diagnosed with relapsing-remitting type of MS (RRMS). We found that both proteins were significantly higher in RRMS patients compared to the healthy individuals. We also observed statistically significant elevation in cathepsin S concentration in the plasma of patients with RRMS compared to the

control group. These results altogether may suggest an association between impairment in protein degradation and disease pathology.

Both the constitutive proteasome and immunoproteasome are present in the cytosol and in the nucleus of most eukaryotic cells (Breczko et al., 2021). Dwivedi et al. (2021) emphasize the existence of a 20S constitutive proteasome circulating also in the plasma of humans. Elevated plasma levels of proteasomes have been found in patients suffering from blood, skin and solid cancers, sepsis, trauma, and autoimmune diseases (Dwivedi et al., 2021). It is proposed that the origin of proteasomes in human plasma may be endothelial cells, considering their role in angiogenesis and vascular inflammation (Dwivedi et al., 2021). In this context, it is interesting to note that our previous studies also pointed on the elevation of the plasma 20S



**FIGURE 5** Areas under the ROC curve (AUC) for the plasma 20S immunoproteasome evaluation in differentiating relapse-remitting multiple sclerosis patients from healthy individuals. For plasma immunoproteasome 20S the AUC=1.000, cut-off=10.08  $\mu\text{g/mL}$ .



**FIGURE 6** Areas under the ROC curve (AUC) for the plasma cathepsin S evaluation in differentiating relapse-remitting multiple sclerosis patients from healthy individuals. For plasma cathepsin S the AUC=1.000, cut-off=5.17  $\text{ng/mL}$ .



constitutive proteasome activity in cases of cryptorchidism, acute appendicitis, thermal, head, or surgical injury in children or brain tumors in adult patients (Koper-Lenkiewicz et al., 2020; Matuszczak et al., 2015; Matuszczak et al., 2018; Toliczenko-Bernatowicz et al., 2018; Tylicka et al., 2018).

The 20S constitutive proteasome is an essential component of the central non-lysosomal protein degradation machinery. Egerer et al. showed that levels of circulating 20S constitutive proteasome significantly increased in patients with autoimmune myositis, primary Sjögren's syndrome, and autoimmune hepatitis and moreover correlated with disease activity (Egerer et al., 2002). Thus they suggested that circulating proteasomes may serve as markers of autoimmune inflammatory processes and reflect the cellular damage (Egerer et al., 2002). Further studies conducted by Majetschak et al. may confirm this hypothesis, as the authors have presented that levels of circulating proteasomes are elevated in patients suffering from mixed connective tissue disease (MCTD) and systemic lupus erythematosus (SLE), and these levels correlate with clinically relevant changes in disease activity (Majetschak et al., 2008). Other studies also reported high circulating proteasome concentrations in patients with primary Sjögren's syndrome, rheumatoid arthritis, autoimmune myositis, and autoimmune hepatitis, suggesting that circulating proteasome purified from blood plasma may be released from immune-competent cells (Morawietz et al., 2009; Sixt & Dahlmann, 2008; Verbrugge et al., 2015). Moreover, Verbrugge et al. demonstrated that proteasomes play a prominent role in multiple cellular processes, including MHC-mediated antigen presentation, cytokine and cell cycle regulation, apoptosis, and therefore may be crucial in the development and progression of inflammatory and autoimmune diseases (Verbrugge et al., 2015). They also mentioned that the observed increased levels of circulating proteasomes in autoimmune diseases might function as autoantigens that could induce an autoimmune response (Verbrugge et al., 2015). In contrast, Bellavista et al. suggested that the causative mechanism for increased circulating proteasome levels is connected with immunological activity rather than the cellular damage. Their preliminary observation was that circulating proteasomes are not only biomarkers of inflammatory status but also might control cytokine levels and synergize with other components to ameliorate tissue damage (Bellavista et al., 2014).

The 20S immunoproteasomes, which are isoforms of the 20S constitutive proteasomes, are linked to different inflammatory processes (Bellavista et al., 2014; Verbrugge et al., 2015). Kaur et al. pointed out that immune and standard proteasomes share the functions in the immune response, but immunoproteasomes have been closely linked to the emergence of the autoimmune diseases (Kaur & Batra, 2016). These results are, in general, consistent with those obtained by Breczko et al., who have indicated that immunoproteasomes are important in pathogenesis of many inflammatory diseases, including autoimmune diseases (Breczko et al., 2021). They also reported that 20S immunoproteasomes are more active in specific condition, such as inflammation and infection, which result in immune activation (Breczko et al., 2021). The correlation between

20S constitutive proteasome and 20S immunoproteasomes was confirmed by Scheppingen et al., who investigated the expression and cellular distribution of both constitutive and immunoproteasome in the course of epilepsy and indicated a relationship between changes in the expression of these subunits (van Scheppingen et al., 2016).

In the current study, we observed a negative correlation between the concentration of plasma 20S constitutive proteasome and 20S immunoproteasome in the entire group of RRMS patients. We also found this negative correlation when we analyzed the patients in two subgroups: those who did not experience relapses within 24 months and those who did experience relapses during that time period. These results support previous observations suggesting that 20S immunoproteasome is formed from 20S constitutive proteasome in response to inflammatory conditions (Bellavista et al., 2014; Verbrugge et al., 2015). Furthermore, our results demonstrated that in patients diagnosed with RRMS, the 20S constitutive proteasome concentration as well as 20S immunoproteasome concentration did not depend on the severity of disability (EDSS value) and the occurrence of relapses within the last 24 months. We also did not find correlations between the number of years from the first MS symptoms, the number of years from MS diagnosis, and the number of relapses within the 24-month observational period.

In the current study, we observed statistically significant elevation in cathepsin S concentration in the plasma of patients with RRMS compared to the control group. In contrast to proteasomes, cathepsin S is a lysosomal protease that is involved in the degradation of damaged or unwanted proteins in the endo-lysosomal pathway. Compared to other cysteine cathepsin proteases, cathepsin S is characterized by restricted tissue expression and is more stable in neutral pH, which increases the potential of this protease for involvement in extracellular proteolytic activities (Wilkinson et al., 2015). Increased cathepsin S concentration or activity is found in variety of autoimmune diseases, including atherosclerosis (Figueiredo et al., 2015; Steimle et al., 2016), MS (Haves-Zburuf et al., 2011; Steimle et al., 2016), psoriasis (Schönefuß et al., 2010; Steimle et al., 2016), Sjögren's syndrome (Edman et al., 2018; Hamm-Alvarez et al., 2014; Steimle et al., 2016) and rheumatoid arthritis (Wilkinson et al., 2015).

In this context, it is interesting to note that Martino et al., who investigated the expression of cathepsin S in the peripheral blood of RRMS patients, suggested that lysosomal cathepsins play a key role in psychological and pathological processes mediated by immune response. They observed an increased level of cathepsin S in the serum of MS patients, depending on disease's clinical stage (stable—without relapses for at least 6 months or acute MS) (Martino et al., 2013). These suggestions are in line with the previous results obtained by Haves-Zburuf et al., who observed a 66% increase in the serum cathepsin S levels in MS patients in the relapse group compared to controls, and also a 33% increase in this parameter compared to remission group (Haves-Zburuf et al., 2011). Gao et al. have also demonstrated that the expression and activity of cathepsin S were elevated in MS patients and were associated with the degradation of myelin basic protein (Gao et al., 2018).





Interestingly, in the current study we did not observe any correlation between the plasma cathepsin S concentration and both 20S constitutive proteasome and 20S immunoproteasome concentration. This may support the hypothesis that these parameters are involved in two different protein degradation pathways. The available literature suggests that cathepsin S concentration is dependent on the relapsing and remitting stages of MS (Haves-Zburuf et al., 2011). However, our current study focused on patients in remission, and we did not observe any correlation between the plasma concentration of this protease and severity of disability in the course of RRMS (EDSS value), the number of years from the first MS symptoms, the number of years from MS diagnosis, and the number of relapses within the 24-month observational period.

Accumulating evidences suggested that the presence of 20S proteasome in the circulatory system may potentially reflect specific pathophysiological conditions. Some authors indicated associations between genes encoding the proteasome, their polymorphism, and various diseases (Žemeckiene et al., 2013). Polymorphisms in gene encoding proteasome subunits are associated with cardiovascular diseases, diabetes, neurological diseases, and cancer (Gomes, 2013).

Choi et al. (2021) in their review collected data from other studies which reported plasma or serum proteasome concentration in different diseases including systemic autoimmune diseases, such as autoimmune myositis, Jo-1 syndrome, systemic lupus erythematosus, autoimmune hepatitis, primary Sjögren syndrome, antiphospholipid syndrome, rheumatoid arthritis, systemic scleroderma, CREST syndrome, myasthenia gravis, and connective tissue disease. Proteasome concentration was elevated in all types of mentioned diseases in comparison to the control group. Additionally, there were differences in proteasome concentration among patients with different types of autoimmune diseases. Furthermore, the authors demonstrated an elevation of proteasome concentration in serum or plasma in patients with hematological malignancies, liver diseases, multiple myeloma, hematopoietic malignancies, or metastatic malignant melanoma. Similar results were presented by Eggerer et al. (2002) who measured proteasome concentration in serum samples obtained from patients with different autoimmune diseases. They demonstrated that proteasome concentration was elevated in a variety of autoimmune diseases. Additionally analyzing results of pairwise comparisons of means of proteasome concentrations they postulated that patients with autoimmune myositis and systemic lupus erythematosus showed enhanced proteasome levels compared with other autoimmune diseases (Egerer et al., 2002). In the literature, there is no available data regarding multiple sclerosis patients. Therefore, further research should evaluate whether proteasomes can serve as specific biomarkers for multiple sclerosis.

#### 4.1 | Study limitations

First, to confirm the specificity of our method regarding MS, future research should compare the evaluated biomarkers in MS patients and in individuals with various diseases, including demyelinating,

inflammatory, and/or degenerative diseases of the central nervous system, as well as systemic autoimmune diseases. Secondly, for the current study, we only included patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. In future studies, it is important to improve the quality of our research by evaluating the specificity of our method in differentiating patients with Clinically Isolated Syndrome (CIS) and Radiologically Isolated Syndrome (RIS), both of which are considered prodromal syndromes of the disease and may or may not progress to MS, and also in cases with progressive MS compared to RRMS or, depending on other parameters of disease activity, such as radiological activity either as new/enlarging T2 lesions or gadolinium-enhancing T1 lesions on brain/cervical MRI.

## 5 | CONCLUSION

Our current study has shown promising potential in using the evaluation of plasma concentrations of 20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S to differentiate RRMS patients from healthy individuals. All the examined parameters exhibit high sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, as well as diagnostic accuracy, suggesting their utility for the diagnosis of patients with MS. In the present patient cohort, the concentrations of plasma 20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S did not demonstrate a correlation with the clinical disease phenotype regarding disease duration, degree of disability, or frequency of relapses during the 24-month observational period. Consequently, the potential of these markers as prognostic indicators in MS is not supported by the data presented in this study. However, further research is needed to determine whether these markers will prove useful in the differential diagnosis of multiple sclerosis from different diseases, including neurological or systemic autoimmune diseases. Moreover, whether their specificity will be maintained across other forms of MS (progressive MS vs. RRMS), such as CIS syndromes or RIS, or further investigation of these markers in relation to other parameters of disease activity.

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

**Ewelina Górska:** Conceptualization; writing – original draft; visualization; writing – review and editing; investigation. **Marzena Tylicka:** Conceptualization; writing – original draft; investigation; writing – review and editing; formal analysis; visualization; data curation; validation. **Joanna Kamińska:** Visualization; writing – original draft; writing – review and editing. **Adam Hermanowicz:** Data curation; writing – review and editing. **Ewa Matuszczak:** Formal analysis; writing – review and editing. **Łukasz Ołdak:** Methodology; writing – review and editing; formal analysis. **Ewa Gorodkiewicz:** Writing – review and editing; formal analysis; methodology. **Elżbieta Karpińska:** Conceptualization; writing – review and editing. **Katarzyna Socha:** Writing – review and editing; formal analysis. **Jan Kochanowicz:** Conceptualization; writing – review and editing; formal analysis. **Marta Jakoniuk:** Writing – review and editing; conceptualization. **Evgenija Homšak:** Formal analysis; writing – review and editing.



**Olga Martyna Koper-Lenkiewicz:** Visualization; writing – original draft; conceptualization; supervision.

## FUNDING INFORMATION

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated and analyzed during the current study are not publicly available but all are kept at the Medical University of Białystok and are available from the corresponding author on reasonable request.

## CONSENT TO PARTICIPATE

We received consent from individual patients who participated in the present study.

## ORCID

Marzena Tylicka  <https://orcid.org/0000-0002-9594-8173>

Joanna Kamińska  <https://orcid.org/0000-0002-2986-4852>

## REFERENCES

- Bellavista, E., Santoro, A., Galimberti, D., Comi, C., Luciani, F., & Mishto, M. (2014). Current understanding on the role of standard and immunoproteasomes in inflammatory/immunological pathways of multiple sclerosis. *Autoimmune Diseases*, 2014, 1–12.
- Breczko, W., Lemancewicz, D., Dzięcioł, J., Kłoczko, J., & Bołkun, Ł. (2021). High immunoproteasome concentration in the plasma of patients with newly diagnosed multiple myeloma treated with bortezomib is predictive of longer OS. *Advances in Medical Sciences*, 66, 21–27.
- Chen, B., Zhu, H., Yang, B., & Cao, J. (2023). The dichotomous role of immunoproteasome in cancer: Friend or foe? *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 13, 1976–1989.
- Choi, W. H., Kim, S., Park, S., & Lee, M. J. (2021). Concept and application of circulating proteasomes. *Experimental & Molecular Medicine*, 53, 1539–1546.
- Dwivedi, V., Yaniv, K., & Sharon, M. (2021). Beyond cells: The extracellular circulating 20S proteasomes. *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular Basis of Disease*, 1867, 166041.
- Edman, M. C., Janga, S. R., Meng, Z., Bechtold, M., Chen, A. F., Kim, C., Naman, L., Sarma, A., Teekappanavar, N., Kim, A. Y., Madrigal, S., Singh, S., Ortiz, E., Christianakis, S., Arkfeld, D. G., Mack, W. J., Heur, M., Stohl, W., & Hamm-Alvarez, S. F. (2018). Increased cathepsin S activity associated with decreased protease inhibitory capacity contributes to altered tear proteins in Sjögren's syndrome patients. *Scientific Reports*, 8, 1–12.
- Egerer, K., Kuckelkorn, U., Rudolph, P. E., Rückert, J. C., Dörner, T., Burmester, G. R., Kloetzel, P. M., & Feist, E. (2002). Circulating proteasomes are markers of cell damage and immunologic activity in autoimmune diseases. *The Journal of Rheumatology*, 29, 2045–2052.
- Eskandari, S. K., Seelen, M. A. J., Lin, G., & Azzi, J. R. (2017). The immunoproteasome: An old player with a novel and emerging role in alloimmunity. *American Journal of Transplantation*, 17, 3033–3039.
- Falkowski, P., Mrozek, P., Lukaszewski, Z., Oldak, L., & Gorodkiewicz, E. (2021). An immunosensor for the determination of cathepsin s in blood plasma by array spri—A comparison of analytical properties of silver-gold and pure gold chips. *Biosensors*, 11, 298.
- Figueiredo, J. L., Aikawa, M., Zheng, C., Aaron, J., Lax, L., Libby, P., de Lima Filho, J. L., Gruener, S., Fingerle, J., Haap, W., Hartmann, G., & Aikawa, E. (2015). Selective cathepsin S inhibition attenuates atherosclerosis in apolipoprotein e-deficient mice with chronic renal disease. *The American Journal of Pathology*, 185, 1156–1166.
- Gao, S., Zhu, H., Zuo, X., & Luo, H. (2018). Cathepsin g and its role in inflammation and autoimmune diseases. *Archives of Rheumatology*, 33, 748–749.
- Gomes, A. V. (2013). Genetics of proteasome diseases. *Scientifica (Cairo)*, 2013, 1–30.
- Hamm-Alvarez, S. F., Janga, S. R., Edman, M. C., Madrigal, S., Shah, M., Frousiakis, S. E., Renduchintala, K., Zhu, J., Bricel, S., Silka, K., Bach, D., Heur, M., Christianakis, S., Arkfeld, D. G., Irvine, J., Mack, W. J., & Stohl, W. (2014). Tear cathepsin s as a candidate biomarker for sjögren's syndrome. *Arthritis & Rheumatology*, 66, 1872–1881.
- Haves-Zburof, D., Paperna, T., Gour-Lavie, A., Mandel, I., Glass-Marmor, L., & Miller, A. (2011). Cathepsins and their endogenous inhibitors cystatins: Expression and modulation in multiple sclerosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15, 2421–2429.
- Kaur, G., & Batra, S. (2016). Emerging role of immunoproteasomes in pathophysiology. *Immunology and Cell Biology*, 94, 812–820.
- Kloetzel, P. M. (2004). Generation of major histocompatibility complex class I antigens: Functional interplay between proteasomes and TPII. *Nature Immunology*, 5, 661–669.
- Koper-Lenkiewicz, O. M., Kamińska, J., Reszec, J., Dymicka-Piekarska, V., Ostrowska, H., Karpińska, M., Matowicka-Karna, J., & Tylicka, M. (2020). Elevated plasma 20S proteasome chymotrypsin-like activity is correlated with IL-8 levels and associated with an increased risk of death in glial brain tumor patients. *PLoS One*, 15, e0238406.
- Majetschak, M., Perez, M., Sorell, L. T., Lam, J., Maldonado, M. E., & Hoffman, R. W. (2008). Circulating 20S proteasome levels in patients with mixed connective tissue disease and systemic lupus erythematosus. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15, 1489–1493.
- Martino, S., Montesano, S., di Girolamo, I., Tiribuzi, R., Di Gregorio, M., Orlacchio, A., Datti, A., Calabresi, P., Sarchielli, P., & Orlacchio, A. (2013). Expression of cathepsins S and D signals a distinctive biochemical trait in CD34+ hematopoietic stem cells of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Multiple Sclerosis Journal*, 19, 1443–1453.
- Matuszczak, E., Tylicka, M., Dębek, W., Hermanowicz, A., & Ostrowska, H. (2015). The comparison of C-proteasome activity in the plasma of children after burn injury, mild head injury and blunt abdominal trauma. *Advances in Medical Sciences*, 60, 253–258.
- Matuszczak, E., Tylicka, M., Dębek, W., Sankiewicz, A., Gorodkiewicz, E., & Hermanowicz, A. (2018). Concentration of proteasome in the blood plasma of children with acute appendicitis, before and after surgery, and its correlation with CRP. *World Journal of Surgery*, 42, 2259–2264.
- Mayo, I., Arribas, J., Villoslada, P., DoForno, R. A., Rodríguez-Vilariño, S., Montalban, X., De Sagarra, M. R., & Castaño, J. G. (2002). The proteasome is a major autoantigen in multiple sclerosis. *Brain*, 125, 2658–2667.
- Minagar, A., Ma, W., Zhang, X., Wang, X., Zhang, K., Steven, A. J., Gonzalez-Toledo, E., & Albitar, M. (2012). Plasma ubiquitin-proteasome system profile in patients with multiple sclerosis: Correlation with clinical features, neuroimaging, and treatment with interferon-beta-1b. *Neurological Research*, 34, 611–618.
- Morawietz, L., Martinez-Gamboa, L., Scheffler, S., Hausdorf, G., Dankof, A., Kuckelkorn, U., Doerner, T., Egerer, K., Burmester, G. R., Faustman, D. L., & Feist, E. (2009). Expression of proteasomal immunosubunit  $\beta$ 1i is dysregulated in inflammatory infiltrates of minor



- salivary glands in Sjögren's syndrome. *The Journal of Rheumatology*, 36, 2694–2703.
- Nathan, J. A., Spinnenhirn, V., Schmidtke, G., Basler, M., Groettrup, M., & Goldberg, A. L. (2013). Immuno- and constitutive proteasomes do not differ in their abilities to degrade ubiquitinated proteins. *Cell*, 152, 1184–1194.
- Oldak, L., Sankiewicz, A., Żelazowska-Rutkowska, B., Cylwik, B., Lukaszewski, Z., Skoczylas, M., & Gorodkiewicz, E. (2021). Two SPRI biosensors for the determination of cathepsin S in blood plasma. *Talanta*, 225, 121900.
- Sankiewicz, A., Agnieszka, M., Zenon, L., Beata, P., & Ewa, G. (2017). Methods for 20S immunoproteasome and 20S constitutive proteasome determination based on SPRI biosensors. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 10, 174–185.
- Schönefuß, A., Wendt, W., Schattling, B., Schulten, R., Hoffmann, K., Stuecker, M., Tigges, C., Lübbert, H., & Stichel, C. C. (2010). Upregulation of cathepsin S in psoriatic keratinocytes. *Experimental Dermatology*, 19, e80–e88.
- Sixt, S. U., & Dahlmann, B. (2008). Extracellular, circulating proteasomes and ubiquitin—Incidence and relevance. *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular Basis of Disease*, 1782, 817–823.
- Spoto, G., & Minunni, M. (2012). Surface plasmon resonance imaging: What next? *Journal of Physical Chemistry Letters*, 3, 2682–2691.
- Steimle, A., Kalbacher, H., Maurer, A., Beifuss, B., Bender, A., Schäfer, A., Müller, R., Autenrieth, I. B., & Frick, J. S. (2016). A novel approach for reliable detection of cathepsin S activities in mouse antigen presenting cells. *Journal of Immunological Methods*, 432, 87–94.
- Toliczenko-Bernatowicz, D., Matuszczak, E., Tylicka, M., Sankiewicz, A., Komarowska, M., Gorodkiewicz, E., Debek, W., & Hermanowicz, A. (2018). 20S proteasome in the blood plasma of boys with cryptorchidism. *Journal of Endocrinological Investigation*, 41, 1103–1106.
- Tylicka, M., Matuszczak, E., Karpińska, M., Hermanowicz, A., Dębek, W., & Ostrowska, H. (2018). Proteasome activity and C-reactive protein concentration in the course of inflammatory reaction in relation to the type of abdominal operation and the surgical technique used. *Mediators of Inflammation*, 2018, 1–8.
- van Scheppingen, J., Broekaart, D. W. M., Scholl, T., Zuidberg, M. R. J., Anink, J. J., Spliet, W. G., van Rijen, P. C., Czech, T., Hainfellner, J. A., Feucht, M., Mühlebner, A., van Vliet, E. A., & Aronica, E. (2016). Dysregulation of the (immuno)proteasome pathway in malformations of cortical development. *Journal of Neuroinflammation*, 13, 1–16.
- Verbrugge, E. E., Scheper, R. J., Lems, W. F., de Gruijl, T. D., & Jansen, G. (2015). Proteasome inhibitors as experimental therapeutics of autoimmune diseases. *Arthritis Research & Therapy*, 17, 1–10.
- Wilkinson, R. D. A., Williams, R., Scott, C. J., & Burden, R. E. (2015). Cathepsin S: Therapeutic, diagnostic, and prognostic potential. *Biological Chemistry*, 396, 867–882.
- Wong, C. L., & Olivo, M. (2014). Surface plasmon resonance imaging sensors: A review. *Plasmonics*, 9, 809–824.
- Yadav, D., Lee, J. Y., Puranik, N., Chauhan, P. S., Chavda, V., Jin, J. O., & Lee, P. C. W. (2022). Modulating the ubiquitin–proteasome system: A therapeutic strategy for autoimmune diseases. *Cells*, 11, 1–13.
- Žemeckienė, Ž., Vitkauskienė, A., Sjakste, T., Šitkauskienė, B., & Sakalauskas, R. (2013). Proteasomes and proteasomal gene polymorphism in association with inflammation and various diseases. *Medicina*, 49, 207–213.

**How to cite this article:** Górska, E., Tylicka, M., Kamińska, J., Hermanowicz, A., Matuszczak, E., Ołdak, Ł., Gorodkiewicz, E., Karpińska, E., Socha, K., Kochanowicz, J., Jakoniuk, M., Homšak, E., & Koper-Lenkiewicz, O. M. (2024). 20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S are high-sensitivity and independent markers of immunological activity in relapsing-remitting type of multiple sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 168, 2880–2892. <https://doi.org/10.1111/jnc.16165>

Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacji:

“20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S are high-sensitivity and independent markers of immunological activity in relapsing-remitting type of multiple sclerosis” *Journal of Neurochemistry*

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jnc.16165>

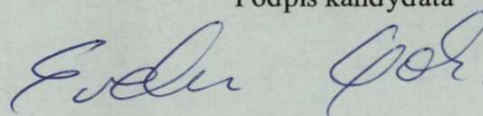
lek. med. Ewelina Górka	opracowanie koncepcji badania, dobór grupy badawczej, opracowanie tekstu, przeprowadzenie eksperymentu, analizy formalnej, interpretacji wyniku, redakcja manuskryptu
dr hab. n. med. Marzena Tylicka	pomoc przy opracowaniu koncepcji badania, opracowaniu tekstu w wersji oryginalnej, opracowaniu recenzji i redakcji artykułu, przeprowadzeniu eksperymentu, analizie formalnej, wizualizacji, archiwizacji danych i walidacji
dr hab. n. med. Joanna Kamińska	pomoc przy wizualizacji, opracowaniu wersji oryginalnej, opracowaniu recenzji i redakcji artykułu
prof. dr hab. n. med. Adam Hermanowicz	pomoc przy opracowaniu koncepcji badania, analizie i interpretacji wyników oraz nadzór merytoryczny nad badaniem
prof. dr hab. n. med. Ewa Matuszczak	pomoc przy opracowaniu koncepcji badania, analizie i interpretacji wyników oraz redakcji manuskryptu
dr Łukasz Ołdak	pomoc przy opracowaniu koncepcji badania, analizie i interpretacji wyników oraz oznaczeniach laboratoryjnych
prof. dr hab. Ewa Gorodkiewicz	pomoc przy opracowaniu koncepcji badania, analizie i interpretacji wyników oraz nadzór merytoryczny nad badaniem
dr n. med. Elżbieta Karpińska	pomoc przy opracowaniu koncepcji badania, zebranie materiałów oraz analizie i interpretacji wyników
prof. dr hab. n. farmaceutycznych Katarzyna Socha	pomoc przy doborze grupy badawczej, opracowaniu koncepcji badania, analizie wyników, zebraniu materiałów oraz nadzór merytoryczny



prof. dr hab. n. med. Jan Kochanowicz	pomoc przy doborze grupy badawczej, opracowanie koncepcji badania
dr n. med. Marta Jakoniuk	pomoc przy doborze grupy badawczej, analizie wyników oraz przygotowaniu manuskryptu
Evgenija Homšak	pomocy przy analizie formalnej, opracowaniu recenzji i redakcji artykułu
dr hab. n. med. Olga Koper-Lenkiewicz	pomoc przy opracowywaniu koncepcji badania, opracowaniu tekstu w wersji oryginalnej, wizualizacji, nadzorze merytorycznym

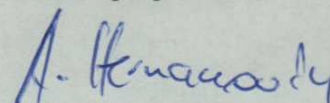
Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej lek. Eweliny Górskiej

Podpis kandydata



Potwierdzam opisany powyżej merytoryczny wkład kandydata w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej.

Podpis promotora



dr hab. n. med. Marzena Tylicka

Białystok, 06.09.2024

Katedra Biofizyki,  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku,  
ul. Mickiewicza 2A, 15-089 Białystok

### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

“20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S are high-sensitivity and independent markers of immunological activity in relapsing-remitting type of multiple sclerosis” Journal of Neurochemistry <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jnc.16165>

Autorów Ewelina Górską, Marzena Tylicka, Joanna Kamińska, Adam Hermanowicz, Ewa Matuszczak, Łukasz Ołdak, Ewa Gorodkiewicz, Elżbieta Karpińska, Katarzyna Socha, Jan Kochanowicz, Marta Jakoniuk, Evgenija Homšak, 10, Olga Martyna Koper-Lenkiewicz, opublikowanej w Journal of Neurochemistry wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „**Opracowanie potencjalnego panelu markerów w diagnostyce stwardnienia rozsianego**” polegał na pomocy przy opracowaniu koncepcji badania, opracowaniu tekstu w wersji oryginalnej, opracowaniu recenzji i redakcji artykułu, przeprowadzeniu eksperymentu, analizie formalnej, wizualizacji, archiwizacji danych i walidacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewelinę Górską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]

*Marzena Tylicka*



Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacji:

“20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S are high-sensitivity and independent markers of immunological activity in relapsing-remitting type of multiple sclerosis” *Journal of Neurochemistry*

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jnc.16165>

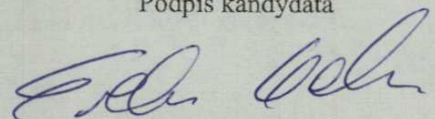
dr hab. n. med. Marzena Tylicka	pomoc przy opracowaniu koncepcji badania, opracowaniu tekstu w wersji oryginalnej, opracowaniu recenzji i redakcji artykułu, przeprowadzeniu eksperymentu, analizie formalnej, wizualizacji, archiwizacji danych i walidacji
dr hab. n. med. Joanna Kamińska	pomoc przy wizualizacji, opracowaniu wersji oryginalnej, opracowaniu recenzji i redakcji artykułu
prof. dr hab. n. med. Adam Hermanowicz	pomoc przy opracowaniu koncepcji badania, analizie i interpretacji wyników oraz nadzór merytoryczny nad badaniem
prof. dr hab. n. med. Ewa Matuszczak	pomoc przy opracowaniu koncepcji badania, analizie i interpretacji wyników oraz redakcji manuskryptu
dr Łukasz Ołdak	pomoc przy opracowaniu koncepcji badania, analizie i interpretacji wyników oraz oznaczeniach laboratoryjnych
prof. dr hab. Ewa Gorodkiewicz	pomoc przy opracowaniu koncepcji badania, analizie i interpretacji wyników oraz nadzór merytoryczny nad badaniem
dr n. med. Elżbieta Karpińska	pomoc przy opracowaniu koncepcji badania, zebranie materiałów oraz analizie i interpretacji wyników
prof. dr hab. n. farmaceutycznych Katarzyna Socha	pomoc przy doborze grupy badawczej, opracowaniu koncepcji badania, analizie wyników, zebraniu materiałów oraz nadzór merytoryczny
prof. dr hab. n. med. Jan Kochanowicz	pomoc przy doborze grupy badawczej, opracowanie koncepcji badania
dr n. med. Marta Jakoniuk	pomoc przy doborze grupy badawczej, analizie wyników oraz przygotowaniu manuskryptu



<u>Evgenija Homšak</u>	pomocy przy analizie formalnej, opracowaniu recenzji i redakcji artykułu
dr hab. n. med. Olga Koper-Lenkiewicz	pomoc przy opracowywaniu koncepcji badania, opracowaniu tekstu w wersji oryginalnej, wizualizacji, nadzorze merytorycznym

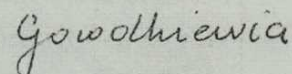
Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej lek. Eweliny Górskiej

Podpis kandydata



Potwierdzam opisany powyżej merytoryczny wkład kandydata w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej.

Podpis promotora





dr hab. n. med. Joanna Kamińska

Białystok, 06.09.2024

Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Klinicznej  
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

“20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S are high-sensitivity and independent markers of immunological activity in relapsing-remitting type of multiple sclerosis” Journal of Neurochemistry  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jnc.16165>

Autorów Ewelina Górską, Marzena Tylicka, Joanna Kamińska, Adam Hermanowicz, Ewa Matuszczak, Łukasz Ołdak, Ewa Gorodkiewicz, Elżbieta Karpińska, Katarzyna Socha, Jan Kochanowicz, Marta Jakoniuk, Evgenija Homšak, 10, Olga Martyna Koper-Lenkiewicz, opublikowanej w Journal of Neurochemistry wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „**Opracowanie potencjalnego panelu markerów w diagnostyce stwardnienia rozsianego**” polegał na pomocy przy wizualizacji, opracowaniu wersji oryginalnej, opracowaniu recenzji i redakcji artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewelinę Górską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

06023 dr hab. n. med. Joanna Kamińska  
DIAGNOSTA LABORATORYJNY  
specjalista laboratoryjnej diagnostyki medycznej

Joanna Kamińska



prof. dr hab.n. med. Adam Hermanowicz

Białystok, 03.10.2024

Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i  
Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim UMB,  
Klinika Chirurgii i Urologii Dziecięcej  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

#### Oświadczenie

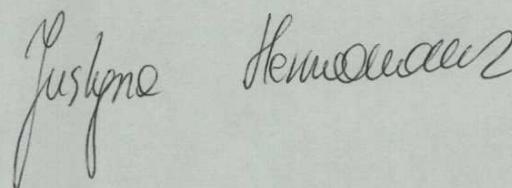
Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

“20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S are high-sensitivity and independent markers of immunological activity in relapsing-remitting type of multiple sclerosis” Journal of Neurochemistry <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jnc.16165>

Autorów Ewelina Górską, Marzena Tylicka, Joanna Kamińska, Adam Hermanowicz, Ewa Matuszczak, Łukasz Ołdak, Ewa Gorodkiewicz, Elżbieta Karpińska, Katarzyna Socha, Jan Kochanowicz, Marta Jakoniuk, Evgenija Homšak, 10, Olga Martyna Koper-Lenkiewicz, opublikowanej w Journal of Neurochemistry wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „**Opracowanie potencjalnego panelu markerów w diagnostyce stwardnienia rozsianego**” polegał na pomocy przy opracowaniu koncepcji badania, analizie i interpretacji wyników oraz nadzór merytoryczny nad badaniem.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewelinę Górską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]



prof. dr hab.n. med Ewa Matuszczak

Białystok, 07.10.2024

Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i  
Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim UMB,  
Klinika Chirurgii i Urologii Dziecięcej  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

“20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S are high-sensitivity and independent markers of immunological activity in relapsing-remitting type of multiple sclerosis” Journal of Neurochemistry <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jnc.16165>

Autorów Ewelina Górską, Marzena Tylicka, Joanna Kamińska, Adam Hermanowicz, Ewa Matuszczak, Łukasz Ołdak, Ewa Gorodkiewicz, Elżbieta Karpińska, Katarzyna Socha, Jan Kochanowicz, Marta Jakoniuk, Evgenija Homšak, 10, Olga Martyna Koper-Lenkiewicz, opublikowanej w Journal of Neurochemistry wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „**Opracowanie potencjalnego panelu markerów w diagnostyce stwardnienia rozsianego**” polegał na pomocy przy opracowywaniu koncepcji badania, analizie i interpretacji wyników oraz redakcji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewelinę Górską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]

prof. dr hab. Ewa Matuszczak  
chirurgia dziecięca  
21094588



dr Łukasz Ołdak

Białystok, 26.07.2024

Wydział Chemii  
Uniwersytet w Białymstoku  
ul.K. Ciołkowskiego 1K, 15-245 Białystok

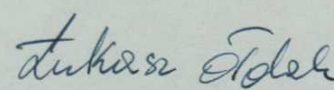
### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

“20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S are high-sensitivity and independent markers of immunological activity in relapsing-remitting type of multiple sclerosis” Journal of Neurochemistry  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jnc.16165>

Autorów Ewelina Górską, Marzena Tylicka, Joanna Kamińska, Adam Hermanowicz, Ewa Matuszczak, Łukasz Ołdak, Ewa Gorodkiewicz, Elżbieta Karpińska, Katarzyna Socha, Jan Kochanowicz, Marta Jakoniuk, Evgenija Homšak, 10, Olga Martyna Koper-Lenkiewicz, opublikowanej w Journal of Neurochemistry wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „**Opracowanie potencjalnego panelu markerów w diagnostyce stwardnienia rozsianego**” polegał na pomocy przy opracowaniu koncepcji badania, analizie i interpretacji wyników oraz oznaczeniach laboratoryjnych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewelinę Górską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

  
[Podpis]

prof. dr hab. Ewa Gorodkiewicz

Białystok, 26.07.2024

Laboratorium Bioanalizy, Wydział Chemii,  
Uniwersytet w Białymstoku,  
ul. Ciołkowskiego 1K, 15-245 Białystok

### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

“20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S are high-sensitivity and independent markers of immunological activity in relapsing-remitting type of multiple sclerosis” *Journal of Neurochemistry*  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jnc.16165>

Autorów Ewelina Górską, Marzena Tylicka, Joanna Kamińska, Adam Hermanowicz, Ewa Matuszczak, Łukasz Ołdak, Ewa Gorodkiewicz, Elżbieta Karpińska, Katarzyna Socha, Jan Kochanowicz, Marta Jakoniuk, Evgenija Homšak, 10, Olga Martyna Koper-Lenkiewicz, opublikowanej w *Journal of Neurochemistry* wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „**Opracowanie potencjalnego panelu markerów w diagnostyce stwardnienia rozsianego**” polegał na pomocy przy opracowaniu koncepcji badania, analizie i interpretacji wyników oraz nadzór merytoryczny nad badaniem.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewelinę Górską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

*Gorodkiewicz*  
[Podpis]



dr n. med. Elżbieta Karpińska

Białystok, 03.10.2024

Zakład Bromatologii,  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku,  
ul. Mickiewicza 2D, 15-222 Białystok

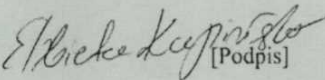
#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

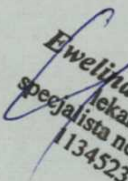
“20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S are high-sensitivity and independent markers of immunological activity in relapsing-remitting type of multiple sclerosis” *Journal of Neurochemistry*  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jnc.16165>

Autorów Ewelina Górską, Marzena Tylicka, Joanna Kamińska, Adam Hermanowicz, Ewa Matuszczak, Lukasz Ołdak, Ewa Gorodkiewicz, Elżbieta Karpińska, Katarzyna Socha, Jan Kochanowicz, Marta Jakoniuk, Evgenija Homšak, 10, Olga Martyna Koper-Lenkiewicz, opublikowanej w *Journal of Neurochemistry* wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Opracowanie potencjalnego panelu markerów w diagnostyce stwardnienia rozsianego” polegał na pomocy przy opracowaniu koncepcji badania, zebraniu materiałów oraz analizie interpretacji wyników.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewelinę Górską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

  
[Podpis]

ZA ZGODNOŚĆ  
Z ORYGINAŁEM

  
Ewelina Górską  
lekarz  
specjalista neurolog  
1134523

17 -10- 2024

prof. dr hab.n. farmaceutycznych Katarzyna Socha

Białystok, 03.10.2024

Zakład Bromatologii,  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku,  
ul. Mickiewicza 2D, 15-222 Białystok

### Oświadczenie

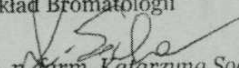
Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

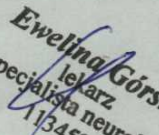
“20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S are high-sensitivity and independent markers of immunological activity in relapsing-remitting type of multiple sclerosis” Journal of Neurochemistry  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jnc.16165>

Autorów Ewelina Górską, Marzena Tylicka, Joanna Kamińska, Adam Hermanowicz, Ewa Matuszczak, Łukasz Oldak, Ewa Gorodkiewicz, Elżbieta Karpińska, Katarzyna Socha, Jan Kochanowicz, Marta Jakoniuk, Evgenija Homšak, 10, Olga Martyna Koper-Lenkiewicz, opublikowanej w Journal of Neurochemistry wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Opracowanie potencjalnego panelu markerów w diagnostyce stwardnienia rozsianego” polegał na pomocy przy doborze grupy badawczej, opracowaniu koncepcji badania i analizie wyników, zebraniu materiałów oraz nadzorze merytorycznym. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewelinę Górską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]

KIEROWNIK  
Zakład Bromatologii

  
prof. dr hab. n. farm. Katarzyna Socha

  
Ewelina Górską  
lekarz  
specjalista neurolog  
1134523

ZA ZGODNOŚĆ  
Z ORYGINAŁEM  
17 -10- 2024



prof. dr hab.n. med. Jan Kochanowicz

Białystok, 03.10.2024

Klinika Neurologii  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku,  
Ul. M. Skłodowskiej-Curie 24A, 15-276 Białystok

### Oświadczenie

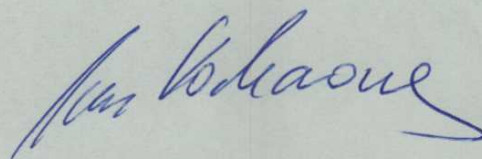
Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

“20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S are high-sensitivity and independent markers of immunological activity in relapsing-remitting type of multiple sclerosis” Journal of Neurochemistry  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jnc.16165>

Autorów Ewelina Górską, Marzena Tylicka, Joanna Kamińska, Adam Hermanowicz, Ewa Matuszczak, Łukasz Oldak, Ewa Gorodkiewicz, Elżbieta Karpińska, Katarzyna Socha, Jan Kochanowicz, Marta Jakoniuk, Evgenija Homšak, 10, Olga Martyna Koper-Lenkiewicz, opublikowanej w Journal of Neurochemistry wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „**Opracowanie potencjalnego panelu markerów w diagnostyce stwardnienia rozsianego**” polegał na pomocy przy doborze grupy badawczej oraz pracowaniu koncepcji badania.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewelinę Górską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]



dr n. med. Jakoniuk Marta

Białystok, 03.10.2024

Klinika Neurochirurgii  
Uniwersytet Medycznego w Białymstoku  
ul. M. Skłodowskiej-Curie 24A, 15-276 Białystok

#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

“20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S are high-sensitivity and independent markers of immunological activity in relapsing-remitting type of multiple sclerosis” Journal of Neurochemistry  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jnc.16165>

Autorów Ewelina Górską, Marzena Tylicka, Joanna Kamińska, Adam Hermanowicz, Ewa Matuszczak, Łukasz Ołdak, Ewa Gorodkiewicz, Elżbieta Karpińska, Katarzyna Socha, Jan Kochanowicz, Marta Jakoniuk, Evgenija Homšak, 10, Olga Martyna Koper-Lenkiewicz, opublikowanej w Journal of Neurochemistry wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „**Opracowanie potencjalnego panelu markerów w diagnostyce stwardnienia rozsianego**” polegał na pomocy przy doborze grupy badawczej, analizie wyników oraz przygotowaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewelinę Górską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]

*Jakoniuk  
Marta*



Evgenija Homšak

Białystok, 06.09.2024

Department for Laboratory Diagnostics,  
University Clinical Centre Maribor  
SI, Ljubljanska Ulica 5, 2000, Maribor, Slovenia  
Department for Clinical Biochemistry, Medical Faculty,  
University of Maribor, Maribor, Slovenia

### Statement

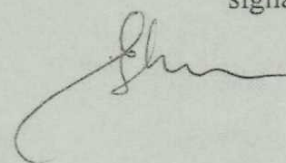
I experience my participation in the preparation of the publication:

"20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome and cathepsin S are highly sensitive and independent markers of immune activity in relapsing-remitting multiple sclerosis"  
Journal of Neurochemistry, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jnc.16165>

Authors Ewelina Górska, Marzena Tylicka, Joanna Kamińska, Adam Hermanowicz, Ewa Matuszczak, Łukasz Ołdak, Ewa Gorodkiewicz, Elżbieta Karpińska, Katarzyna Socha, Jan Kochanowicz, Marta Jakoniuk, Evgenija Homšak, 10, Olga Martyna Koper-Lenkiewicz, rate in the Journal of Neurochemistry connection to the doctoral dissertation "Development of the use of a panel of markers in the diagnosis of multiple sclerosis" consisting in formal analysis, writing – review and editing.

This includes the use by Ewelina Górska of the publication in the application of the award of a doctoral degree in the field of medical sciences and protective sciences in the disciplines of medical sciences.

signature



28-10-2024  
ZA ZGODNOŚĆ  
Z ORYGINAŁEM  
Ewelina Górska  
lekarz  
specjalista neurolog  
1134523

dr hab. n. med. Olga Koper-Lenkiewicz

Białystok, 06.09.2024

Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Klinicznej,  
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

“20S constitutive proteasome, 20S immunoproteasome, and cathepsin S are high-sensitivity and independent markers of immunological activity in relapsing-remitting type of multiple sclerosis” Journal of Neurochemistry  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jnc.16165>

Autorów Ewelina Górską, Marzena Tylicka, Joanna Kamińska, Adam Hermanowicz, Ewa Matuszczak, Łukasz Ołdak, Ewa Gorodkiewicz, Elżbieta Karpińska, Katarzyna Socha, Jan Kochanowicz, Marta Jakoniuk, Evgenija Homšak, 10, Olga Martyna Koper-Lenkiewicz, opublikowanej w Journal of Neurochemistry wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „**Opracowanie potencjalnego panelu markerów w diagnostyce stwardnienia rozsianego**” polegał na pomocy przy opracowywaniu koncepcji badania, opracowaniu tekstu w wersji oryginalnej, wizualizacji, nadzorze merytorycznym.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewelinę Górską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]

dr hab. n. med. Olga Martyna Koper-Lenkiewicz  
DIAGNOSTA LABORATORYJNY  
09744 *O. Koper-Lenkiewicz*  
specjalista laboratoryjnej  
0 diagnostyki medycznej

## **18. Praca przeglądowa 3A**



The journal has had 40 points in Ministry of Education and Science of Poland parametric evaluation. Annex to the announcement of the Minister of Education and Science of December 21, 2021. No. 32343. Has a Journal's Unique Identifier: 201159. Scientific disciplines assigned: Physical Culture Sciences (Field of Medical sciences and health sciences); Health Sciences (Field of Medical Sciences and Health Sciences). Punkty Ministerialne z 2019 - aktualny rok 40 punktów. Załącznik do komunikatu Ministra Edukacji i Nauki z dnia 21 grudnia 2021 r. Lp. 32343. Posiada Unikatowy Identyfikator Czasopisma: 201159. Przynależność dyscypliny naukowej: Nauki o kulturze fizycznej (Dziedzina nauk medycznych i nauk o zdrowiu); Nauki o zdrowiu (Dziedzina nauk medycznych i nauk o zdrowiu). © The Authors 2022; This article is published with open access at Licensee Open Journal Systems of Nicolaus Copernicus University in Torun, Poland Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author (s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non commercial license Share alike. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited. The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper. Received: 15.09.2022. Revised: 10.10.2022. Accepted: 16.10.2022.

## Neurodegenerations are diseases of the present and the future

Ewelina Górska<sup>1</sup>, Sylwia Bogdan<sup>2</sup>, Ewa Gorodkiewicz<sup>2</sup>, Adam Hermanowicz<sup>3</sup>

1. Neurological Private Practice; Białystok, Poland
2. Bioanalysis Laboratory, Faculty of Chemistry, University of Białystok, Poland
3. Pediatric Surgery Department, Medical University of Białystok, Poland

### Summary

Neurodegenerations are diseases of the present and the future. As the human population grows, the number of people suffering from neurodegenerative diseases will increase. Neurodegenerations diseases are Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease, spinocerebellar ataxia, spinal muscular ataxia), sporadic (amyotrophic lateral sclerosis) or infectious (prion disease). Nerve cells (neurons) can't regenerate and therefore die under the influence of pathological factors. Neurodegenerations diseases can be serious or life-threatening. It depends on the type. Drugs and treatments may help improve symptoms, relieve pain, and increase mobility.

**Key words:** Neurodegenerations, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease, spinocerebellar ataxia, spinal muscular ataxia, sporadic (amyotrophic lateral sclerosis) or infectious (prion disease).

### Introduction

Due to the changing demographics of the human population, there is an increasing chance that we will develop diseases related to neuronal damage.

Neurons are part of the nervous system that cannot regenerate, therefore when they are affected by damaging factors (pathological forms of proteins), they die.

The main neurodegenerative diseases in the Polish population are dementias (most often Alzheimer's disease) and movement disorders (Parkinson's disease).

Degenerative diseases are closely related to age (Parkinson's and Alzheimer's disease) - the older the population, the greater percentage of people become ill. These conditions can be hereditary (Huntington's disease, spinocerebellar ataxia, spinal muscular ataxia), sporadic (amyotrophic lateral sclerosis) or infectious (prion disease).

The main symptoms of neurodegenerative diseases are progressive dementia or movement disorders.

Neurodegenerative diseases are a group of inherited or acquired disorders of the nervous system, the essence of which is the loss of nerve cells. This process begins with an asymptomatic phase that may precede clinical symptoms for many years.

Statistics of the incidence of neurodegenerative diseases

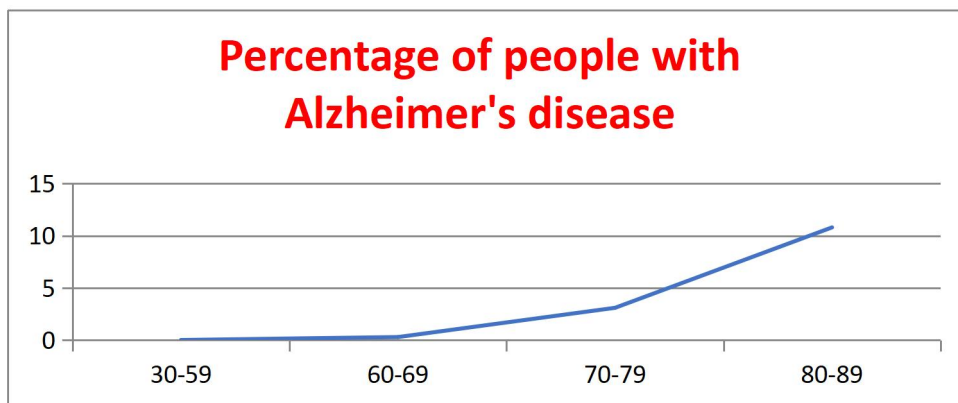
In July 2021, the Central Statistical Office published data on the average life expectancy of Poles. They show that the average life expectancy of men was 72.6 years, and that of women - 80.7 years (Dementia in Europe Yearbook 2019 Estimating the prevalence of dementia in Europe, 2019) . There has been a steady increase in the statistical life expectancy since the mid-nineteenth century. It will also increase in the future, but it is not known at what rate. According to the report of the Central Statistical Office on Alzheimer's disease in Poland, over 65 years of age currently makes up approx. 14.7% of the population, in 2035 it will increase to 24.5%, and in 2050 it will reach over 30%. Currently, there are over 300.000 diagnosed and undiagnosed people with Alzheimer's disease in the country.

This is a significant number, and it should be remembered that the disease also affects caregivers and the entire families of patients. By 2050, the number of patients will triple and reach almost a million (Braak H, 2012) . In Europe, about 10 million patients suffer from Alzheimer's disease, and by 2050 this number will almost double.

In Europe, the incidence of Alzheimer's disease by age is presented in Table 1 and Figure 1a below.

**Table 1 The prevalence of dementia in Europe**

Age	Percent
60–64	0.6
65–69	1.3
70–74	3.3
75–79	8.0
80–84	12.1
85–89	21.9
90+	40.8



**Picture 1 The prevalence of Alzheimer's disease in Europe (EURODEM Prevalence Research Group)**

Parkinson's disease is the next - after Alzheimer's disease - most common neurodegenerative disease in the global population. In Europe, around 1.6% of people over the age of 60 have Parkinson's. According to estimates, there are approximately 60-80 thousand patients in Poland, and each year there are approximately 4-8 thousand new cases of this disease (Von Campenhausen S., 2005).

Huntington's disease affects 5-10 people out of 100.000 (Pringsheim T., 2012), (Bates G., 2002)

A similar incidence applies to ALS (5-10 people per 100.000). Usually middle-aged and elderly people are sick.

In prion disease, the incidence is 1 per million (Nowacki P., 2019).

Another neurodegenerative disease is spinal muscular atrophy (SMA), which affects 10 people per 100000 births (Saniewska N., 2019).

#### Alzheimer's disease

Alzheimer's disease is the most common cause of dementia.

The clinical symptom of this disease is progressive disturbance of cognitive functions (memory, thinking, language functions) and post-cognitive functions (behavioural and psychotic disorders).

Pathological proteins beta-amyloid extracellularly and tau protein intracellularly accumulate in the neurons of Alzheimer's disease patients. This leads to the destruction of neurons, cortical synapses and certain subcortical areas. This phenomenon is many years ahead of the onset of clinical symptoms of the disease. The atrophy of the cerebral cortex mainly affects the temporal and parietal lobes, as well as some of the frontal lobes and gyrus (Morris J., 2003) (Hulstaert F., 1999).

This is confirmed by MRI (magnetic resonance imaging) and PET (positron emission tomography).

The basis for the diagnosis of Alzheimer's disease in a patient is the performance of screening tests to assess cognitive functions, including the Mental State Examination Scale - MMSE (Mini-Mental State Examination) and the Clock Drawing Test (CDT) (Bateman Randall J.B.R., 2007).

In addition, clinical trials investigate markers such as:  $\beta$ -amyloid, tau protein, and the phosphorylated tau protein in the cerebrospinal fluid.

In patients diagnosed with Alzheimer's disease, a decrease in the amount of  $\beta$ -amyloid as well as an increase in the amount of tau protein can be noticed (Mckhann G., 1984).

Age is the first risk factor to be considered. Genetic factors also influence the occurrence of this disease (Apo E gene polymorphism) (Han X., 2004). The level of education and social contacts, mood, diet rich in unsaturated fatty acids (Scarmeas N., 2009), lifestyle and accompanying diseases are also important.

The diagnosis of Alzheimer's disease in clinical practice is based on the criteria contained in the International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10 revision, as shown in Table 2.

**Table 2 Diagnostic criteria for dementia according to ICD-10 (WHO, 1993)**

1	It is stated, confirmed by an objective interview and psychometric tests, the presence of:
	a. memory impairment (especially in terms of learning new information),
	b. disturbances in other cognitive functions that have worsened compared to the previous level of functioning, to a degree that significantly disrupts the proper functioning of everyday life activities.
2	There are no disturbances in consciousness during the evaluation period.
3	There is a disturbance of emotional control over motivation or a change in social behaviour, manifested by at least one of the following symptoms:
	a. emotional lability
	b. irritability
	c. apathy
	d. primitization of social behaviour
4	Memory and other cognitive dysfunction have been present for at least six months.
5	Additionally, diagnosis is enhanced by the occurrence of disorders of other higher cortical functions in the form of aphasia, agnosia, apraxia.

Alzheimer's disease develops from the 4-5th decade of life. There is a gradual degeneration of neurons, which corresponds to the different stages of cognitive impairment, which are defined by the GDS scale (Table 3).



**Table 3 GDS (Global Deterioration Scale) according to Reisberg et al., 1982.**

Stage of advancement	Scale description
No cognitive impairment	No subjective complaints about memory deficits.
Very mild cognitive impairment	Subjective complaints about memory deficits, most often in the following areas: (a) forgetting where we have placed familiar objects; (b) Lack of objective evidence of a memory deficit in a clinical history. No objective deficits at work or other social situations.
Mild cognitive decline (mild cognitive impairment)	Earliest significant deficits. Manifestations in more than one of the following areas: (a) the patient may have become lost while traveling to an unknown place; (b) co-workers notice a deterioration in the professional functioning of the patient; (c) unable to find words and names becomes obvious to those close to you; (d) the patient can read a passage of text or a book and remember relatively little material; (e) the patient may show diminished ease in remembering names after reading it with new people; (f) the patient may have lost a valuable item; g) memory deficits may be evident in clinical trials. Objective evidence of deterioration in memory function obtained only during intensive interviewing. Decreased performance in demanding employment conditions and social. In the patient, denial begins to manifest. The symptoms are accompanied by mild to moderate anxiety.
Moderate cognitive decline (mild dementia)	A clear deficit in a thorough clinical history. The deficit manifests itself in the following areas: (a) reduced knowledge of the current and recent events; (b) may have some memory deficit of personal history; (c) makes mistakes in subsequent subtractions (memory test item); (d) reduced ability to travel, deal with finances, etc. Often lack of deficits in the following areas: (a) orientation in time and place; (b) recognizing familiar people and faces; (c) the ability to travel to famous places. Inability to perform complex tasks. Denial is the dominant defense mechanism. Affection is often shallow and withdrawn from difficult situations.
Moderately severe cognitive decline (moderate dementia)	The patient can no longer survive without the help of others. During the conversation, the patient is not able to recall an important aspect of his current life, e.g. address or telephone number, names of immediate family members (e.g. grandchildren), the name of the secondary school or university he graduated from. Often confusion about time (date, day of the week, season, etc.) or place. An educated person may have difficulty counting down from memory tests. People at this stage keep knowledge of many important facts about themselves and others. They invariably know their names and they generally know the names of their spouses and children. They do not require any help with using from the toilet and food, but may have difficulty with the selection of appropriate clothing.

<p>Severe cognitive decline (moderately severe dementia)</p>	<p>The patient may sometimes forget the spouse's name, on whom his or her survival completely depends. He is largely unaware of all recent life events and experiences. Retains some knowledge of past life events, but this is very sketchy. He is generally unaware of his surroundings, of the year, season, etc. May have difficulty counting to 10, both backwards and sometimes forwards. Will require some help with daily activities, e.g. the patient may have urinary incontinence, will not be able to travel alone, but will sometimes be able to travel to previously known places. He often has a disturbed circadian rhythm. He almost always remembers his name. Often it still is able to distinguish between known and unknown people in your surroundings. There are personality and emotional changes. They are quite variable and include: (a) delusional behaviour, e.g. patients may accuse their spouse of being a cheat, they may talk to imaginary characters in their surroundings or with their own reflection in the mirror; (b) obsessive symptoms, e.g. the person may repeat simple related activities over and over again with cleaning; (c) symptoms of anxiety, agitation and even previously non-existent violent behaviour may occur; (d) cognitive a bulla, i.e. loss of willpower because the individual is unable to hold thoughts long enough to determine the deliberate course of action.</p>
<p>Very severe decline in cognitive function (severe dementia)</p>	<p>At this stage, all verbal skills are lost. Often the patient does not speak at all - at this stage of the disease, we observe only incomprehensible statements and the rare appearance of intelligible words and phrases. Urinary incontinence occurs, the patient requires assistance in the toilet and with feeding. As this stage progresses, basic psychomotor skills, such as the ability to walk, decline. The brain seems no longer able to tell the body what to do. Often there is generalized stiffness and developmental neurological reflexes.</p>

Unfortunately, there is no causal treatment for Alzheimer's disease. We can only treat Alzheimer's dementia. Treatment is aimed at slowing the development of dementia, preventing the occurrence of psychotic disorders, and improving the daily activities of patients. Currently, pharmacotherapy includes: cholinesterase inhibitor (ChE) or / and butyrylcholinesterase inhibitor (butyrylcholinesterase inhibitor), and / or NMDA N-methyl-D-aspartic receptor antagonist (N-methyl-D-. aspartate receptor) such as rivastigmine, donepezil and memantine. This treatment is only symptomatic. Numerous clinical trials are currently underway, offering hope for a causal treatment for Alzheimer's disease.

**Parkinson's disease**

Parkinson's disease is the most common neurodegenerative movement disease in the Polish population. It is the second most common neurodegenerative disorder. The clinical symptoms of this disease include psychomotor slowing, increased muscle tone and involuntary movements similar to resting tremor.

Destruction occurs in substantia nigra and other dopamine-producing pigmented areas of the brain. In the affected areas of the brain, the presence of the pathological protein alpha-synuclein with intracytoplasmic inclusions, referred to as Lewy's bodies, is found. These pathological forms of proteins that damage neurons cause their death (Stefanis L., 2012).

The basis for the diagnosis of Parkinson's disease is a clinical examination confirming the presence of muscle stiffness, resting tremor and slowness.

Imaging tests performed in this disease include: MRI of the central nervous system and scintigraphy using the DaTSCAN marker.

In addition, scientific research measures the level of  $\alpha$ -synuclein in the plasma, which is the main component of Lewy bodies. According to studies, the increase in plasma concentration of  $\alpha$ -synuclein oligomers turned out to be highly specific (85%) in detecting Parkinson's disease compared to the control group. Lowering the concentration of this biomarker occurs in the cerebrospinal fluid of patients with synucleinopathies (Parkinson's disease, dementia with the bodies of Levi). Patients with Parkinson's disease have an increased expression of  $\alpha$ -synuclein also in fibroblasts (skin cells), and their concentration can be used as a diagnostic marker (Mollenhauer B, 2008) (Hoepken HH, 2008).

The risk factors for the occurrence of Parkinson's disease are: age, male sex (the effect of estrogens (Reuter I., 2019), and genetic determinants. The factors protecting against the disease are smoking and drinking coffee (Louis E.D., 2015).

There are different classifications for the severity of symptoms in Parkinson's disease:

1. Stages of Parkinson's disease are correlated with the level of dopaminergic cell loss. They are presented in Table 4. (Reuter I., 2019).

**Table 4 Phase model of the division of Parkinson's disease into stages**

Pre-clinical phase	Prodromal phase	Clinical phase
The lack of a marker allowing for the detection of this stage of the disease, although the neurodegenerative process continues, does not give any clinical symptoms	They appear here: 1. Disturbance of smell 2. Constipation 3. Autonomic dysfunction 4. Behavior and mood disorders 5. Disturbances during REM sleep 6. Changes in neuroimaging research	It is characterized by the occurrence of: 1. Motor symptoms: bradykinesia, stiffness, tremors, postural instability 2. Symptoms beyond movement: cognitive disorders, psychotic disorders, mood disorders, sleep disorders, sexual functions, micturition, constipation, weakness

2. Another division of the disease advancement stages was developed by Hoehn and Yahr. Their division determines the severity of motor symptoms. It has 5 steps, as shown in Table 5

**Table 5 Division into stages according to Hoehn and Yahr**

Grade of severity according to Hoehn and Yahr	Description
I	clearly unilateral symptoms, without or with a slight functional disability
II	bilateral symptoms, no imbalance
III	bilateral symptoms, mild to moderate intensity with limited postural reflexes, abnormal arm pull test result, the patient is still physically independent
IV	a severe disease; the patient is still there able to stand or walk without assistance
V	the patient requires the help of others, is in a wheelchair or is lying down.

3. The Unified Parkinson's Disease Rating Scale describes the mobility status and the severity of the condition. It is presented in Table 6.

**Table 6 The unified Parkinson's disease rating scale**

Terms	Description
The honeymoon period	the initial phase of the disease, very good mobility after the initiation of dopaminergic treatment
“On” phase	good mobility, good drug effect
"Off" phase	poor mobility, poor drug effect
Wearing-off	reduction of mobility at the end of time of dopaminergic drug action before taking the next dose
Dyskinesia	involuntary movements
Dose peak dyskinesia	involuntary movements at the time of the highest concentration of levodopa in the blood serum
Dyskinesia phase "off"	"oneff" phase dyskinesia involuntary movements, especially of the lower limbs in the "off" phase
Dystonia	dystonia contractions of the muscles of one limb in the "off" phase, partly also in the "on" phase, causing incorrect positioning

Pharmacological treatment of Parkinson's disease consists of increasing the level of dopamine in the central nervous system, as the deficiency of this neurotransmitter is at the root of the symptoms of the disease. Pharmacotherapy is aimed at supplementing the level of levodopa or reducing the breakdown of dopamine (MAO inhibitors, e.g. selegiline and rasagiline), also drugs belonging to dopamine agonists (DA) (dopamine agonists) such as apomorphine, bromocriptine, ropinirole, pramipexole, rotigotine are used. COMT inhibitors (e.g. entacapone) are also used in the treatment.

In very advanced cases, those poorly responding to pharmacological treatment, deep brain stimulation DBS (Deep Brain Stimulation) can be used. It is a surgical method in which electrodes are implanted into the brain that affect specific areas of the extrapyramidal system (Wei Z., 2018).

It is also important to treat non-motor symptoms (psychiatric - psychotic disorders, sleep and mood disorders; internal medicine - orthostatic hypotension, constipation; neurological - cognitive disorders, dizziness). Extremely important in this disease is physical rehabilitation preventing disability and prevention against falls and injuries - adjusting the bathroom, orthotics, e.g. walking frames.

ALS - amyotrophic lateral sclerosis.

ALS is a neurodegenerative disorder of the upper and lower motor neurons.

The main symptom of this disease is muscle atrophy, manifested by fatigue, walking problems, trembling limbs, and disturbed breathing and swallowing.

The diagnostic test that confirms the diagnosis of ALS is electromyography (EMG). Neuroimaging tests are also performed, which allow for differential diagnosis.

The pathogenesis of ALS is not fully understood, it is probably multifactorial:

- superoxide dismutase (metalloprotein) hyperactivity - a free radical mechanism, i.e. neurons are damaged as a result of oxidative stress,
- glutamic acid toxicity,
- axonal transport disorders,
- rapidly degraded SOD1 mutant protein can cause loss of control of interactions between proteins and the formation of insoluble conglomerates in motoneurons (containing  $\beta$ -amyloid) and has a neuro-inflammatory effect,

- cytoskeleton dysfunction,
- genetic factors (Ince P.G.), (Barber S.C., 2010), (Ferraiuolo L., 2011).

The degeneration and loss of neurons in the spinal cord have different locations that define different types of motor neuron disease [Table 7].

**Table 7 Variations of motor neuron disease**

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)	Degeneration of the upper and lower motor neurons
Progressive Muscle Atrophy (PMA)	Only the inferior motor neuron is involved
Primary Lateral Sclerosis (PLS)	Only the upper motor neuron is involved
Progressive Bulbar Paralysis	Only bulbar symptoms or bulbar-onset ALS One-limb muscle atrophy
One-limb Atrophy.	Dominant damage to the lower motor neuron, one upper limb
Two-arm muscle atrophy.	Dominant damage to the lower motor neuron, both upper limbs

Unfortunately, there is no effective causal treatment modifying the course of ALS. A slight increase in the percentage of survival in 12- and 18-month follow-up was demonstrated by the glutamate inhibitor - orally administered riluzole (Bensimon G, 2004).

It is also possible to administer edaravon by intravenous injection. It is a drug not registered in Poland, but it can be imported to the so-called target import. It is administered in 2-week series (14 daily infusions, then 14 days off, then infusions for 2 weeks, and then rest from therapy). This drug offers hope for the inhibition of the atrophy of neurons in the anterior horns of the spinal cord (Sawada H., 2017).

ALS is a disease that inevitably leads to death. It requires multidisciplinary care, including non-invasive ventilation, physiotherapy, PEG feeding - gastric tube, in terminal states - mechanical ventilation, of course, if the patient agrees to such therapy.

Symptomatic treatment includes inhibition of drooling, spasticity and mood disorders. The support of caregivers is very important in this disease.

It is worth noting that the average survival time from the onset of this neurodegenerative disease without treatment is 3 years (Siddique N., 2001).

#### Huntington's disease

Huntington's disease is a genetically determined progressive neurodegenerative disorder of the nervous system. It manifests itself as movement disorders (choreic movements), dementia and mental disorders. The disease progresses as a result of the genetically programmed death of neurons in the central nervous system. A genetic marker is a gene mutation in the gene that codes for a protein called huntingtin. Excess of this protein leads to the death of neurons. Atrophy and secondary gliosis of the nervous system particularly affect the pale glue and the crust. In order to diagnose Huntington's chorea, genetic tests that confirm the mutations should be performed (Sławek J., 2013).

Changes in brain resonance are also associated with Huntington's disease.

The disease usually begins in the 4th decade of life. In the initial stages, there is awkwardness in movements, restlessness, irritability and distraction. This is followed by chorea and dementia. Very often this disease is accompanied by psychiatric disorders (psychotic symptoms, depression, carelessness). Average survival is about 15 years (Louis E.D., 2015).

For several years, therapy with tetrabenazine or deutetabenazine has been possible. It is worth mentioning that scientists from the University of British Columbia Center for Huntington's Disease, led by Dr. Blair Leavitt, are conducting research on a new drug - pridopidine, which can restore the balance of the activity of the neurotransmitter dopamine in the brain's motor centers.



Huntington's chorea leads to disability and death, as programmed brain death is currently impossible to stop.

SMA- spinal muscle atrophy.

SMA is a neurodegenerative disorder that causes muscle wasting. It occurs at different ages, depending on the type of disease.

The 4 types differ in the age of the first symptoms, the severity of the disease and the prognosis.

**Table 8 Clinical classification of SMA**

Type of SMA	The highest level of motor development in case of untreated treatment	Most common observed age first symptoms
Type 1	Doesn't sit unsupported	Under 6 months of age
Type 2	Sits unsupported, does not stand	6–18 months
Type 3	Steps unsupported	From 12. Months of age
Type 4	Normal	Over 30 years of age

SMA is a neuromuscular disorder that causes the muscles to become loose.

The disease is genetically determined, inherited autosomal recessively. This condition is caused by the dying of the neurons in the spinal cord, which are responsible for how the muscles work. As a result of the disease, there is a progressive weakening of the muscles and their gradual atrophy. Depending on the clinical form, the disease affects children from the first months of life to adults after the third decade of life.

It is the only neurodegenerative disease for which, recently, causal treatment has become possible, if applied quickly enough.

In 2016, the drug nusinersen was registered. This substance modulates alternative splicing of the SMN2 gene by functionally converting it into the SMN1 gene. A mutation in the SMN1 gene causes SMA, leading to a decrease in the level of the SMN protein in the central nervous system. Nusinersen increases the level of the SMN protein, reducing the symptoms of the disease. A difficulty in administering nusinersen is the need for repeated intrathecal injections every 4 months.

Since 2019, gene therapy with abeparvovec onasemnogen is possible. It also raises the levels of the SMA protein in the motor neurons to slow the progression of the disease, but it is given only once into a vein. Since 2021, it is also possible to use Zincfinger Nucleases in causal treatment. Zincfinger Nucleases is administered daily orally. It works by correcting the folding of SMN2 to increase the concentration of the functional and stable SMN protein.

Intrathecal or orally administered Nusinersen raises the level of the SMN protein by modifying the SMN2 gene to make it act as the SMN1 gene, and the abeparvovec onasemnogen, when administered intravenously, delivers the finished SMN1 transgene to the cells.

SMA diagnosis includes clinical, genetic and electromyographic examination. Due to the possibility of causal treatment, it is very important to diagnose this disease early in order to start an effective therapy as soon as possible.

#### Summary

The above-described neurodegenerative diseases seem to be the most important due to the frequency of occurrence and their social and economic consequences. However, they do not exhaust the range of diseases associated with damage to the central nervous system.

Diseases with a neurodegenerative basis include, among others, prion diseases, cerebrosplinal ataxias, progressive supranuclear palsy, Alexander's disease, ataxia-telangiectasia syndrome, Refsum's disease and many others.

The prognosis for all neurodegenerative diseases is poor, as they lead to progressive failure of the nervous system functions. The symptoms of neurodegeneration are related to impairment of motor functions or memory.

Treatment is usually (only in SMA we can treat patients causally) symptomatic, it can only slow down the process of neurons dying. This situation is not optimistic, considering the fact that - due to the aging of the population - the number of patients will increase dramatically.

As the process of neurodegeneration begins with an asymptomatic phase, which may precede clinical symptoms for many years, only the initiation of treatment in the asymptomatic phase gives hope for stopping neuronal atrophy, therefore it is necessary to use early diagnosis of these diseases. Thanks to neuroimaging tests (e.g. PET), tests of the concentration of proteins in the blood and cerebrospinal fluid (beta-amyloid, tau protein, alpha-synuclein, fibronectin) and genetic tests, we can recognize some diseases in the preclinical phase.

As life expectancy continues to rise statistically, it is expected that more people will develop neurodegenerative disorders. It remains to be hoped that thanks to preventive measures and the advancement of medicine in the future, we will be able to better cope with the consequences of these diseases.

It is worth mentioning the Nobel Prize in the field of chemistry for the so-called "Molecular scissors", which cut DNA, cut out fragments of it, or insert new ones. This modern technology also offers hope for effective treatment of neurodegenerative diseases.

#### Bibliography

1. Barber S.C., S. P. (2010). Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radic. Free Radic. Biol.Med.*, 48: 629-641.
2. Bateman Randall J.B.R. (2007). Testing a test for Alzheimer disease. *Neurology*, 68.
3. Bates G., H. P. (2002). The epidemiology of Huntington's disease. Huntington's disease. *Oxford University Press, New York*, 159-197.
4. Bensimon G, D. A. (2004). The tolerability of riluzole in the treatment of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin Drug Saf.*, 3: 525-34.
5. Braak H, D. T. (2012). Where, when, and in what form does sporadic Alzheimer's Disease begin? *Curr Opin Neurol*, 708-714.
6. Dementia in Europe Yearbook 2019 Estimating the prevalence of dementia in Europe. (2019).
7. Ferraiuolo L., K. J. (2011). Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.*, 7: 616-630.
8. Han X. (2004). The role of apolipoprotein E in lipid metabolism in the central nervous system. *Cell Mol Life Sci.*, 61:1896-1906.
9. Hoepken HH, G. S. (2008). Parkinson patient fibroblasts show increased alpha-synuclein expression. *Exp Neurol*, 212: 307-313.
10. Hulstaert F., B. K. (1999). Improved discrimination of AD patients using beta-amyloid (1-42) and tau levels in CSF. *Neurology* 52, 1555-1562.
11. Ince P.G., C. B. (1991). Disease of movement and system degeneration. Motor neuron disease (amyotrophic lateral sclerosis). *Greenfield's Neuropat.*
12. Louis E.D., M. S. (2015). *Merritt Neurology*.
13. Mckhann G., D. D. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of department of health and human services task. *Neurology* 34, 939-944.
14. Mollenhauer B, C. V. (2008). Direct quantification of CSF alpha-synuclein by ELISA and first cross-sectional study in patients with neurodegeneration. *Exp Neurol.*, 213: 315-325.
15. Morris J. (2003). Antecedent biomarkers in Alzheimer's disease. *Alzforum*, 11:7.
16. Nowacki P. (2019). Mechanisms underlying amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Prakt.*, 1: 7-12.
17. P., N. (2019). Mechanisms underlying amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Prakt.*, 1: 7-12.
18. Pringsheim T., W. K. (2012). The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov. Disord.*, 27: 1083-1089.
19. Reuter I. (2019). *Choroba Parkinsona*. Edra Urban & Partner.
20. Saniewska N., S. N. (2019). Wiedza pacjentów obciążonych rdzeniowym zanikiem mięśni (SMA) oraz ich opiekunów na temat choroby. *Prymat*.
21. Sawada H. (2017). Clinical efficacy of edaravone for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin Pharmacother.*, 18: 735-8.
22. Scarmeas N., S. Y. (2009). Mediterranean diet and mild cognitive impairment. *Arch. Neurol.*, 66: 216-225.
23. Siddique N., S. T. (2001). Amyotrophic Lateral Sclerosis. *National Library of Medicine*.
24. Sławek J., S. W. (2013). Choroba Huntingtona — w 20. rocznicę odkrycia genu IT15; patogeneza, diagnostyka i leczenie. *Pol. Przegl. Neurol.*, 9(3):85-95.
25. Stefanis L. (2012). Alpha-Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*
26. Von Campenhausen S., B. B. (2005). Prevalance and ncience of Parkinson's disease in Europe . *Neuropsychopharma-col*, 15: 473-490.
27. Wei Z., X. L. (2018). Oxidative Stress in Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Mol. Neurosci.*

Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacji:

## Neurodegenerations are diseases of the present and the future

Ewelina Górska <sup>1</sup>, Sylwia Bogdan <sup>2</sup>, Ewa Gorodkiewicz <sup>2</sup>, Adam Hermanowicz <sup>3</sup>

1. Neurological Private Practice; Białystok, Poland

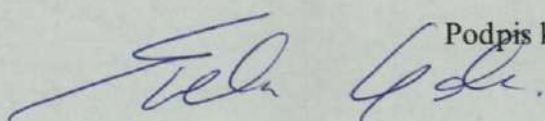
2. Bioanalysis Laboratory, Faculty of Chemistry, University of Białystok, Poland

3. Pediatric Surgery Department, Medical University of Białystok, Poland

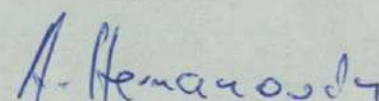
Pomoc współautorów polegała na:

lek. med. Ewelina Górska	opracowanie projektu artykułu, ostateczne zatwierdzenie wersji do druku
mgr Sylwia Bogdan	pomocy przy opracowaniu projektu artykułu ostatecznym zatwierdzeniu wersji do publikacji
prof. dr hab. n. med. Adam Hermanowicz	pomocy przy opracowaniu koncepcji artykułu, nadzór merytoryczny
prof. dr hab. Ewa Gorodkiewicz	pomocy przy opracowaniu koncepcji badania, nadzór merytoryczny

Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej lek. Eweliny Górskiej

 Podpis kandydata

Potwierdzam opisany powyżej merytoryczny wkład kandydata w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej.

Podpis promotora  




Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacji:

### Neurodegenerations are diseases of the present and the future

Ewelina Górska <sup>1</sup>, Sylwia Bogdan <sup>2</sup>, Ewa Gorodkiewicz <sup>2</sup>, Adam Hermanowicz <sup>3</sup>

1. Neurological Private Practice; Białystok, Poland

2. Bioanalysis Laboratory, Faculty of Chemistry, University of Białystok, Poland

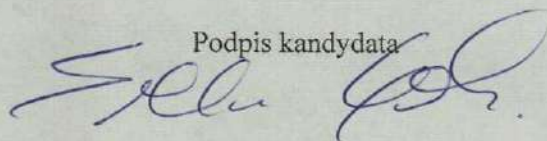
3. Pediatric Surgery Department, Medical University of Białystok, Poland

Pomoc współautorów polegała na:

lek. med. Ewelina Górska	opracowanie projektu artykułu, ostateczne zatwierdzenie wersji do druku
mgr Sylwia Bogdan	pomocy przy opracowaniu projektu artykułu ostatecznym zatwierdzeniu wersji do publikacji
prof. dr hab. n. med. Adam Hermanowicz	pomocy przy opracowaniu koncepcji artykułu, nadzór merytoryczny
prof. dr hab. Ewa Gorodkiewicz	pomocy przy opracowaniu koncepcji badania, nadzór merytoryczny

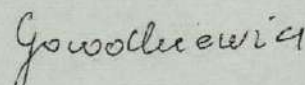
Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej lek. Eweliny Górskiej

Podpis kandydata



Potwierdzam opisany powyżej merytoryczny wkład kandydata w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej.

Podpis promotora



mgr Sylwia Bogdan

Białystok, 07.10.2024

Laboratorium Bioanalizy, Wydział Chemii,  
Uniwersytet w Białymstoku,  
ul. Ciołkowskiego 1K, 15-245 Białystok

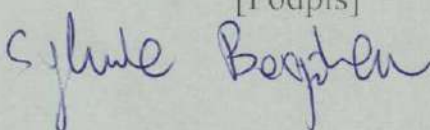
### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

23GórskaEwelina,BogdanSylwia,GorodkiewiczEwa,HermanowiczAdam.Neurodegenerationsarediseasesofthepresentandthefuture.JournalofEducation,HealthandSport.2022;12(11):23-32.eISSN2391-8306.DOIhttp://dx.doi.org/10.12775/JEHS.2022.12.11.003https://apcz.umk.pl/JEHS/article/view/40474https://zenodo.org/record/7212958

Autorów Ewelina Górska, Sylwia Bogdan, Adam Hermanowicz, Ewa Gorodkiewicz, polegał na pomocy przy opracowaniu projektu artykułu oraz ostatecznym zatwierdzeniu wersji do publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewelinę Górską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]  




prof. dr hab.n. med. Adam Hermanowicz

Białystok, 07.10.2024

Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i  
Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim UMB,  
Klinika Chirurgii i Urologii Dziecięcej  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

### Oświadczenie

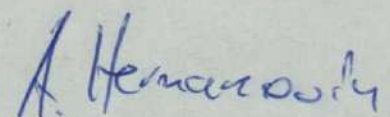
Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

23GórskaEwelina,BogdanSylwia,GorodkiewiczEwa,HermanowiczAdam.Neurodegenerationsarediseasesofthepresentandthefuture.JournalofEducation,HealthandSport.2022;12(11):23-32.eISSN2391-8306.DOIhttp://dx.doi.org/10.12775/JEHS.2022.12.11.003https://apcz.umk.pl/JEHS/article/view/40474https://zenodo.org/record/7212958

Autorów Ewelina Górska, Sylwia Bogdan, Adam Hermanowicz, Ewa Gorodkiewicz, polegał na pomocy przy opracowaniu projektu artykułu oraz ostatecznym zatwierdzeniu wersji do publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewelinę Górską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]



prof. dr hab. Ewa Gorodkiewicz

Białystok, 07.10.2024

Laboratorium Bioanalizy, Wydział Chemii,  
Uniwersytet w Białymstoku,  
ul. Ciołkowskiego 1K, 15-245 Białystok

### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

23GórskaEwelina,BogdanSylwia,GorodkiewiczEwa,HermanowiczAdam.Neurodegenerationsarediseasesofthepresentandthefuture.JournalofEducation,HealthandSport.2022;12(11):23-32.eISSN2391-8306.DOI<http://dx.doi.org/10.12775/JEHS.2022.12.11.003><https://apcz.umk.pl/JEHS/article/view/40474><https://zenodo.org/record/7212958>

Autorów Ewelina Górska, Sylwia Bogdan, Adam Hermanowicz, Ewa Gorodkiewicz, polegał na pomocy przy opracowaniu koncepcji badania, nadzór merytoryczny. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewelinę Górską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]

*Gorodkiewicz*