

**Streszczenie pracy doktorskiej pt. „Proteomiczna i metabolomiczna analiza surowicy krwi i moczu w poszukiwaniu biomarkerów raka prostaty”**

W rozprawie doktorskiej zatytułowanej: „Proteomiczna i metabolomiczna analiza surowicy krwi i moczu w poszukiwaniu biomarkerów raka prostaty” podjęto próbę zastosowania nowoczesnej i złożonej strategii analityczno-bioinformatycznej w analizie związków endogennych w płynach ustrojowych (surowicy oraz moczu) w poszukiwaniu biomarkerów o wartości diagnostycznej mających znaczenie w wykrywaniu raka prostaty. Badania prowadzone były w oparciu o nowoczesną platformę analityczną, wykorzystującą metody spektrometrii mas (LC-ESI-QqQ-MS/MS, MALDI-TOF-MS) oraz testy immunologiczne. Nowatorski model poszukiwania biomarkerów raka prostaty w oparciu o powyższe techniki wsparty został zaawansowaną analizą chemometryczną. Do badań wykorzystano próbki surowicy i moczu pobrane od pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem prostaty (n = 49) oraz od zdrowych mężczyzn (n = 40).

Oznaczanie małowymagających metabolitów, w tym aminokwasów, w płynach biologicznych jest małoinwazyjną metodą o wysokim potencjale diagnostycznym. Badanie profili wolnych aminokwasów w surowicy i moczu oparto o technikę LC-ESI-QqQ-MS/MS oraz o odczynnik aTRAQ (AB Sciex). Zestaw aTRAQ umożliwia oznaczenie 42 wolnych aminokwasów w różnych płynach ustrojowych i matrycach biologicznych. Do przeprowadzenia analiz wykorzystano chromatograf ciekłowy 1260 Infinity (Agilent Technologies) sprzężony ze spektrometrem mas 4000 QTRAP (AB Sciex). Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na kolumnie chromatograficznej AB Sciex C18 (150 mm x 4,6 mm, 5,0 µm). Przepływ faz ruchomych wynosił 800 µl/min. Fazami ruchomymi były woda (faza A) oraz metanol (faza B), obie z dodatkiem 0,1 % kwasu mrówkowego i 0,01 % kwasu heptafluoromasłowego. Czas analizy wynosił 18 minut. Rozdział chromatograficzny przebiegał przy zastosowaniu elucji gradientowej. Temperatura kolumny była utrzymywana na poziomie 50 °C, a objętość nstrzyku wynosiła 2 µl. Aminokwasy były analizowane w trybie planowanego monitorowania reakcji wielokrotnych (sMRM). W celu weryfikacji walidacji wykorzystanej metody oznaczania aminokwasów ocenie poddano następujące parametry: dokładność, precyzja (powtarzalność i odtwarzalność) w odniesieniu do oznaczanych stężeń aminokwasów i czasów retencji.

Grupą związków, mogących potencjalnie pełnić rolę biomarkerów, są także peptydy i białka. Ponieważ peptydy mają wyższe masy cząsteczkowe w porównaniu do aminokwasów, ich analiza wymaga innego podejścia analitycznego. Badanie profili peptydowych w surowicy

i moczu oparto o technikę MALDI-TOF-MS. Do przeprowadzenia analiz wykorzystano spektrometr mas UltrafleXtreme (Bruker Daltonics). Przygotowanie próbek surowicy i moczu do profilowania peptydowego wykorzystującego technikę MALDI-TOF-MS obejmowało między innymi wykorzystanie końcówek ZipTip (Millipore) w celu załadowania peptydów w surowicy i moczu oraz oczyszczenia próbek z zanieczyszczających je składników utrudniających dalszą analizę. Następnie próbki surowicy mieszano z odpowiednio przygotowanym roztworem HCCA, który pełnił rolę matrycy, i наносono na płytkę AnchorChip Standard 800  $\mu\text{m}$  (Bruker Daltonics). Z kolei próbki moczu najpierw наносono na płytkę AnchorChip, a następnie po wyschnięciu dodawano odpowiedni roztwór HCCA. Widma MS (profile peptydowe) zostały wygenerowane w zakresie mas 1000 – 10000 Da. W celu otrzymania listy pików wraz z intensywnościami dla widma każdej analizowanej próbki surowicy i moczu przeprowadzono wstępną obróbkę profili peptydowych.

Ponadto analizowano panel markerów nowotworowych (białek uczestniczących w procesie angiogenezy) w surowicy z wykorzystaniem metody separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej przy użyciu zestawu Bio-Plex (Bio-Rad). Metoda jest przykładem testu immunologicznego oraz techniki multipleksowej i pozwala równocześnie analizować wiele analitów w jednym cyklu analitycznym. Wykorzystany zestaw Bio-Plex umożliwia jednoczesne oznaczenie 16 białek w różnych matrycach biologicznych. W metodzie stosuje się barwione fluorescencyjnie kulki magnetyczne, stanowiące podstawę technologii Luminex/xMAP. Do przeprowadzenia analiz wykorzystano cytometr przepływowy Bio-Plex MAGPIX (Bio-Rad), wyposażony w dwie diody elektroluminescencyjne, z których jedna emituje światło czerwone o długości fali 635 nm, a druga emituje światło zielone o długości fali 532 nm. W celu weryfikacji walidacji wykorzystanej metody oznaczania białek oceniono dokładność metody oraz wykreślono krzywe wzorcowe dla analitów z wykorzystaniem 5-parametrowej regresji logistycznej, oceniono poprawność ich dopasowania i określono zakres (LLOQ/ULOQ) dla każdego analitu.

Analiza moczu jest procedurą, która wymaga specyficznego podejścia ze względu na różnice w objętości moczu w próbkach pobieranych jednorazowo. Konieczna jest kompensacja różnic w objętości moczu poprzez normalizację stężeń oznaczanych związków do stężenia kreatyniny w moczu. Opracowano metodę oznaczania kreatyniny w moczu z wykorzystaniem techniki LC-ESI-QqQ-MS/MS oraz nafazoliny jako wzorca wewnętrznego. Do przeprowadzenia analiz wykorzystano chromatograf ciekłowy 1260 Infinity (Agilent Technologies) sprzężony ze spektrometrem mas 4000 QTRAP (AB Sciex). Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na kolumnie chromatograficznej XTerra C18 (100 mm  $\times$  2,1 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ) (Waters Corporation). Przepływ faz ruchomych wynosił 100  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Fazami ruchomymi były 0,1 % roztwór kwasu mrówkowego w wodzie (faza A) oraz 0,1 % roztwór kwasu mrówkowego w acetonitrylu (faza B). Czas analizy wynosił 15 minut. Rozdział

chromatograficzny przebiegał przy zastosowaniu elucji gradientowej. Temperatura kolumny była utrzymywana na poziomie 25 °C, a objętość nastrzyku wynosiła 5 µl. Wykorzystanym trybem skanowania było monitorowanie reakcji wielokrotnych (MRM). Przeprowadzono walidację opracowanej metody oznaczania kreatyniny w moczu. Walidacji poddano następujące parametry: selektywność, dokładność, precyzję (powtarzalność i odtwarzalność), liniowość, zakres, granicę wykrywalności, granicę oznaczalności oraz stabilność. Opracowaną metodę wykorzystano następnie do normalizacji stężeń aminokwasów w próbkach moczu uzyskanych z wykorzystaniem techniki LC-ESI-QqQ-MS/MS oraz odpowiedniego rozcieńczenia próbek moczu przed profilowaniem peptydowym wykorzystującym technikę MALDI-TOF-MS.

W celu analizy danych metabolomicznych i proteomicznych otrzymanych w przeprowadzonych badaniach wykorzystano analizy statystyczne jednozmiennowe (test U Manna-Whitney'a, test t-Studenta, test F Welcha, krzywe ROC) oraz wielozmiennowe (PLS-DA, krzywe ROC, analiza dyskryminacyjna, algorytmy QC, SNN i GA). Zmiennymi w analizach były stężenia aminokwasów oznaczone w próbkach surowicy i moczu, intensywności peptydów z widm MS otrzymanych w wyniku profilowania próbek surowicy i moczu oraz stężenia białek oznaczone w próbkach surowicy.

Otrzymane wyniki dowodzą, że rak prostaty wywołuje zmiany w surowicy i moczu na poziomie proteomicznym i metabolomicznym. Istnieje zatem korelacja pomiędzy stanem biologicznym pacjenta a jego statusem proteomicznym i metabolomicznym.

Przeprowadzone badania potwierdziły, że aminokwasy to grupa metabolitów, która posiada wysoki potencjał wykorzystania jako biomarkery raka prostaty. Prezentowane badania są pierwszymi, w których przeprowadzono kompleksową analizę profili aminokwasowych w dwóch różnych płynach ustrojowych pobranych od pacjentów z rakiem prostaty i zdrowych mężczyzn, analizując aż 42 metabolity w jednym cyklu analitycznym. Wykazano, że rak prostaty wywołuje zmiany w profilach wolnych aminokwasów w surowicy i moczu. Stwierdzono, że w przypadku surowicy statystycznie istotne różnice dotyczyły 18 z 32 oznaczonych aminokwasów, spośród których 4 były obecne na istotnie wyższych poziomach w grupie badanej (sarkozyna, 3-metylo-L-histydyna, β-alanina oraz kwas asparaginowy), natomiast 14 wykazywało poziomy istotnie niższe w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną (między innymi: metionina, etanoloamina, glutamina, izoleucyna, arginina oraz leucyna). W przypadku moczu różne statystycznie poziomy stwierdzono dla 26 z 39 aminokwasów, spośród których jeden (tauryna) był obecny na istotnie wyższym poziomie w grupie badanej, natomiast poziomy 25 były istotnie niższe w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną (między innymi: kwas γ-amino-n-masłowy, fosfoetanoloamina, etanoloamina, homocytrulina, arginina, δ-hydroksylizyna i asparagina). Nie wykazano natomiast istotnych statystycznie różnic w poziomach sarkozyny w moczu

pomiędzy grupą pacjentów z rakiem prostaty a grupą kontrolną. Na podstawie przeprowadzonych analiz wielozmiennowych wykazano, że zmienione obecnością raka prostaty profile aminokwasowe zarówno w surowicy, jak i w moczu, są użyteczne w klasyfikacji pacjentów z rakiem prostaty i osób zdrowych z wysoką czułością i swoistością.

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że rak prostaty wywołuje zmiany w profilach peptydowych w surowicy i moczu. Stwierdzono statystycznie istotne różnice intensywności dotyczące 65 ze 136 peptydów w przypadku surowicy i 108 ze 149 w przypadku moczu. Pięć peptydów, dla których wartość p była najniższa w przypadku surowicy to peptydy o masach: 1288,69 Da, 1099,41 Da, 1866,53 Da, 1888,55 Da i 1779,38 Da. Natomiast w przypadku moczu najniższe wartości p uzyskano dla peptydów o masach: 1793,20 Da, 2444,56 Da, 2235,57 Da, 1237,03 Da i 2050,43 Da. Wielozmiennowe modele zbudowane z wykorzystaniem profili peptydowych w surowicy i moczu wykazały ich użyteczność w dyskryminacji mężczyzn cierpiących na raka prostaty i zdrowych. Większy potencjał dyskryminacyjny w raku prostaty charakteryzuje jednak peptydy w próbkach surowicy.

W pracy stwierdzono grupowanie się pacjentów w zależności od punktów w skali Gleasona. Zatem stopień złośliwości histologicznej raka prostaty ma swoje odbicie w profilu aminokwasowym i peptydowym płynów ustrojowych.

Przeprowadzone badania wykazały, że 10 białek (sVEGFR-1, HGF, osteopontyna, FGF-basic, G-CSF, PDGF-AB/BB, SCF, sEGFR, PECAM-1 i sVEGFR-2) uczestniczących w procesie angiogenezy było obecnych na istotnie wyższych poziomach w grupie pacjentów z rakiem prostaty w porównaniu z grupą kontrolną.