

STRESZCZENIE

W niniejszej rozprawie doktorskiej zatytułowanej: „Metabolomika celowana w analizie złożonych matryc biologicznych” podjęto próbę rozległej eksploracji metabolomu ludzkiego w złożonych matrycach biologicznych (surowicy, moczu, płynie mózgowo-rdzeniowym). Niniejsza dysertacja składa się z 4 artykułów oryginalnych, opublikowanych w latach 2017-2019, a ich łączny współczynnik oddziaływania Impact Factor wynosi 9,752. Badania przeprowadzono w oparciu o nowoczesną platformę analityczną wykorzystującą chromatografię cieczową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) oraz strategie analityczno-bioinformatyczne dostosowane do specyfiki każdej z matryc i do zastosowanych metod analitycznych. Zaproponowane podejście oparte na metabolomice celowanej pozwoliło uzyskać wyniki ilościowe – w postaci stężenia konkretnych metabolitów. Dzięki powiązaniu uzyskanych wyników z danymi klinicznymi na temat analizowanych grup pacjentów możliwa była próba wyjaśnienia zaobserwowanych zmian w metabolomie w kontekście patomechanizmu onkogenezy. To z kolei pozwoliło na określenie użyteczności metabolitów różnicujących analizowane grupy pacjentów, jako potencjalnych markerów diagnostycznych.

W ramach pierwszego zadania badawczego wykonano oznaczenie stężenia wolnych aminokwasów w zrandomizowanych i zaślepionych próbkach surowicy krwi (*Int. J. Mol. Sci.* 2017;18(12):2727,1-11). Analizy zostały przeprowadzone z wykorzystaniem metodyki aTRAQ. Do badania włączono 150 próbek surowicy. Materiał biologiczny pochodził od pacjentek z nowotworem jajnika, guzem łagodnym jajnika i grupy kontrolnej. W wyniku przeprowadzonych analiz oznaczono stężenia 33 aminokwasów, które poddano dalszym analizom bioinformatyczno-klinicznym. W efekcie zaproponowano szlaki metaboliczne potencjalnie zaangażowane w rozwój i progresję choroby nowotworowej. Na podstawie zaobserwowanych różnic między grupami pacjentek wytypowano aminokwasy (histydyna, cytrulina) mogące pełnić rolę potencjalnych biomarkerów, szczególnie jako część panelu diagnostycznego. Potwierdzono tym samym, że zaproponowane podejście metodyczne wraz z właściwą interpretacją charakteryzuje się wysoką wartością poznawczą w badaniach metabolomu.

W kolejnym etapie opracowano nową metodę ilościową analizy wybranych kwasów organicznych w moczu. Zaproponowana nowatorska metoda charakteryzuje się krótkim czasem analizy (10 minut, dla 10 metabolitów), co w połączeniu z prostym sposobem

przygotowania próbki (tzw. rozcieńczenie i dozowanie, ang. *dilute and shoot*) zapewnia użyteczność zaproponowanej metody analitycznej w badaniu próbek moczu w różnych jednostkach chorobowych. Metoda została następnie wykorzystana do analizy 98 próbek moczu pochodzących od pacjentów z nowotworem złośliwym prostaty i łagodnym przerostem gruczołu krokowego (J. Pharm. Biomed. Anal. 2018; 159, 229-236). Uzyskane wyniki nie wykazały satysfakcjonującej skuteczności w różnicowaniu pacjentów, jednak zaobserwowano istotne obniżenie stężenia kwasu 3-hydroksyzomasłowego w obrębie pacjentów z nowotworem złośliwym prostaty, u pacjentów z oceną patomorfologiczną ≥ 7 według klasyfikacji Gleasona, w porównaniu do pacjentów z oceną < 7 .

W ramach trzeciego zadania badawczego wdrożono metodę oznaczania 188 metabolitów w 2 matrycach biologicznych w oparciu o metodykę AbsoluteIDQ p180 (Biocrates Life Sciences AG). Potwierdzono tym samym możliwość celowanej analizy metabolomicznej surowicy i płynu mózgowo-rdzeniowego w jednym cyklu analitycznym, bazując na wspólnym przygotowaniu próbki (J. Med. Sci., doi.org/10.20883/jms.2019.335). Opracowane zestawienie średnich stężeń i zakresów w obu matrycach poszerza współczesną wiedzę na temat ludzkiego metabolomu, szczególnie jeśli chodzi o tak trudny do pozyskania materiał biologiczny, jakim jest płyn mózgowo-rdzeniowy.

Ostatnim zadaniem badawczym wchodzącym w zakres niniejszej rozprawy doktorskiej było oznaczenie 188 związków z kilku różnych klas (glicerofosfolipidy, sfingolipidy, acylokarnityny, aminokwasy i aminy biogenne oraz suma heksoz) w surowicy pacjentek z nowotworem złośliwym jajnika, guzem łagodnym jajnika i grupy kontrolnej (Life Sci. 2019; 222, 235-244). Zaproponowane podejście metodyczne wraz z interpretacją kliniczną pozwoliło potwierdzić rolę aminokwasów w procesach związanych z onkogenezą, jak i potencjał diagnostyczny samych aminokwasów (histrydyna, cytrulina). Ponadto wytypowano kilka metabolitów z grupy lipidów o wysokim potencjale diagnostycznym. Dodatkową wartością omawianych badań jest wytypowanie szlaków metabolicznych potencjalnie zaangażowanych w zmiany w metabolomie związane z onkogenezą oraz zaproponowanie możliwego mechanizmu wpływu glicerofosfolipidów na proces nowotworzenia na podstawie zmian zaobserwowanych w surowicy badanych pacjentek. Wytypowane związki lipidowe, w szczególności w połączeniu z metabolitami z grupy aminokwasów, mogą potencjalnie stanowić wieloczynnikowy panel diagnostyczny, użyteczny w skryningu pacjentek z nowotworem złośliwym jajnika.

10.04.2019 r.
Szymon Flenda