STRESZCZENIE

Tytuł: „Strategie proteomiczne w diagnostyce rozrostów i nowotworów trofoblastu”

Doktorant: lek. Paulina Banach

Promotor: prof. zw. dr hab. n. med. Ewa Nowak-MarkwitzRozprawa

na podstawie cyklu prac:

•1 pracy poglądowej

I. Mass spectrometry as a tool for biomarkers searching in gynecological oncology.Biomedicine & Pharmacotherapy. 2017; 92: 836-842

Autorzy: Banach P, Suchy W, DerezińskiP, Matysiak J, Kokot ZJ,Nowak Markwitz EImpact Factor: 3,457; punktacja MNiSW: 25

•3 artykułów oryginalnych:

1. Serum angiogenesis profile in gestational trophoblastic neoplasmusing multipleximmunoassay.Life Sciences. 2018; 211:25-30 doi: 10.1016/j.lfs.2018.08.070

Autorzy: Banach P, Dereziński P, Matysiak J, Horała A, Światły A, Jasiński P,Kokot ZJ, Nowak-Markwitz

EImpact Factor: 3,234;

punktacja MNiSW: 302. MALDI-TOF-MSAnalysis inthe Identification of Urine Proteomic Patterns of Gestational Trophoblastic Disease.Metabolites. 2019; 9,30. doi: 10.3390/metabo9020030

Autorzy: BanachP, DerezińskiP,Matuszewska E, MatysiakJ, BochyńskiH,Kokot ZJ, Nowak-Markwitz E

3. The value of an initial drop in Human Chorionic Gonadotropin levels in predictinga response to methotrexate in women with low-risk Gestational TrophoblasticNeoplasia.Ginekologia Polska. 2019; 90: 1-7. doi: 10.5603/GP.2019.0025

Autorzy: Banach P, Zaborowski MP, Iżycka N, Romała A, Nowak-Markwitz EImpact Factor: 0,621;

punktacja MNiSW: 15

WSTĘP:

Pojęciem ciążowa choroba trofoblastyczna lub rozrosty i nowotwory trofoblastu (RiNT) określa się grupę patologii, której cechą wspólną jest nadmierny rozrost trofoblastu. Rozrostami trofoblastu są zaśniad groniasty częściowy oraz zaśniad groniasty całkowity. Zaśniad inwazyjny, rak kosmówki oraz guz miejsca łożyskowego należą do nowotworów trofoblastu (GTN). Rak kosmówki może rozwinąć się zarówno po ciąży prawidłowej zakończonej urodzeniem dziecka, po poronieniu, ciąży ektopowej, jak i po ciąży zaśniadowej.

Dane epidemiologiczne dotyczące choroby trofoblastu są trudne do oszacowania ze względu na bardzo rzadkie występowanie patologii. Częstość występowania zaśniadu groniastego szacuje się na 1 na 1000 do 1 500 żywych urodzeń. Częstość występowania raka kosmówki szacuje się na 7 na 100 000 ciąż. Około 25% raków kosmówki rozwija się po poronieniu lub ciąży ektopowej, 25% po ciąży prawidłowej, w 50% jest poprzedzone ciążą zaśniadową [1]. Ryzyko rozwoju nowotworu trofoblastu po ciąży zaśniadowej wynosi 15-20%pozaśniadzie całkowitym i 0,5-1%po zaśniadzie częściowym[1]. Guz miejsca łożyskowego stanowi zaledwie 0,2% wszystkich przypadków ciążowej choroby trofoblastycznej [2]. W Polsce w latach 2002-2012 odnotowano 65zachorowań oraz 7 zgonów z powodu nowotworu złośliwego wywodzącego się z łożyska[3].Do czynników ryzyka ciążowej choroby trofoblastycznej zalicza się wiek kobiety powyżej 40 i poniżej 16 lat, a także grupę krwi A, B, Rh D; dietę: ubogo białkową, o niskiej zawartości folianów, z niedoborem ¿-karotenu; stosowanie antykoncepcji; pokrewieństwo rodziców [4,5].

Najczęstszym objawem ciąży zaśniadowej jest krwawienie z dróg rodnych w pierwszym trymestrze ciąży lub na początku drugiego trymestru ciąży. Rzadziej stwierdza się powiększenie macicy nieadekwatne do wieku ciąży, torbiele tekaluteinowe jajników, stan przedrzucawkowy, nudności i wymioty, nadczynność tarczycy. Rak kosmówki może dawać różne objawy związane z obecnością przerzutów do płuc (80%), pochwy (30%), miednicy mniejszej (20%), mózgu (10%), wątroby (10%) i innych narządów (<5%) [6]. Najczęstszymi objawami są kaszel, krwioplucie, duszność w klatce piersiowej, krwawienie z dróg rodnych, bóle głowy, drgawki oraz objawy związane z uogólnieniem choroby, taki jak brak apetytuczy utrata masy ciała. Warunkiem powodzenia leczenia choroby trofoblastycznej jest przede wszystkim wczesne jej rozpoznanie oraz właściwie dobrane i przeprowadzone leczenie. Rozpoznanie choroby polega głównie na oznaczeniu stężenia gonadotropiny kosmówkowej oraz przeprowadzeniu badań obrazowych. Badanie ultrasonograficzne w ciąży zaśniadowej jest

pomocne, jednak z uwagi na zróżnicowanie w nasileniu objawów, jedynie 40-60%przypadków wykrywanych jest przy jego pomocy [7].Postępowanie terapeutyczne zaśniadu groniastego polega na ewakuacji patologicznych tkanek z jamy macicy, jednak około 20% chorych z rozpoznanym zaśniadem groniastym rozwinie przetrwałą chorobę trofoblastyczną i będzie wymagało leczenia systemowego [1]. Nie są znane żadne cechy histopatologiczne i immunohistochemiczne pozwalające na predykcję ewentualnej transformacji zaśniadu groniastego do nowotworu złośliwego [8]. Dobór terapii dla chorej z nowotworem złośliwym trofoblastu jest natomiast bardziej skomplikowany. Zastosowanie terapii zbyt mało agresywnej spowoduje powstanie lekooporności, z kolei wybór terapii zbyt agresywnej wiąże się z nasilonymi działaniami niepożądanymi. Przerwanie leczenia lub zmiana jego rytmu są czynnikami niekorzystnymi prognostycznie. Może to prowadzić do lekooporności i w konsekwencji do niewyleczenia chorej. celu optymalizacji terapii opracowano punktowy system oceny czynników ryzyka oporności na metotreksat [9]. Chore dzieli się na te o ryzyku małym, średnim i wysokim i w zależności od wyliczonego ryzyka podaje się chemioterapię mono-, trój-i wielolekową. System ten z uwagi na różną dynamikę choroby nie w pełni sprawdza się w praktyce klinicznej. Pacjentki z grupy niskiego ryzyka odpowiadają na mono terapię w 99%, natomiast pacjentki z grupy średniego ryzyka (które otrzymały 5 i 6 punktów w prognostycznym systemie punktowym WHO) w 70% nie odpowiadają na pierwszą linię leczenia [10]. Wymagają zatem zmiany schematu leczenia. Bardzo newralgicznym punktem terapii jest wybranie odpowiedniego momentu, kiedy należy podać schematy trój-lub wielolekowe. Niestety, nie opracowano dotychczas markerów predykcyjnych oporności na leczenie, prognozujących konieczność i czas konwersji terapii. Przedstawione powyżej kontrowersje spotykane w praktyce klinicznej u chorych na rozrosty i nowotwory trofoblastu skłoniły mnie do podjęcia badań, których celem było wykorzystanie potencjału proteomiki w poszukiwaniu biomarkerów nowotworów trofoblastu. Badania prowadzone były w oparciu o nowoczesną platformę analityczną, opartą na metodach spektometrii mas (MALDI-TOF-MS) oraz testach immunologicznych. Zastosowanie spektometrii mas w ginekologii onkologicznej zostało szerzej omówione w pracy poglądowej, będącej załącznikiem do streszczenia niniejszej rozprawy doktorskiej [11].

Kolejnym celem moich badań było oszukiwanie markera bądź markerów przydatnych w predykcji rozwinięcia przetrwałej choroby trofoblastycznej. rupa pacjentek ze zdiagnozowanym zaśniadem groniastym przed zabiegiem odessania była jednak zbyt mała na etapie realizacji badania. Jeszcze mniej liczną grupę stanowiły te pacjentki, które po zabiegu odessania zaśniadu nie rozwinęły nowotworu złośliwego. Cel ten wymaga zatemzwiększenia grupy badanej i kontynuacji badania.

CEL OGÓLNY ROZPRAWY:

Analiza profili proteomicznych w surowicy i moczu pacjentek z nowotworem trofoblastu.

CELE SZCZEGÓŁOWE ROZPRAWY:

1.Ocena przydatności panelu nowotworowego Bio-Plex(Bio-Plex Pro™ Human CancerBiomarker Panel 1) w diagnostyce rozrostów i nowotworów trofoblastu.

2.Analiza profili proteinowo-peptydowych w moczu u chorych z nowotworem złośliwym trofoblastu

3.Ocena spadku stężenia EhCG po pierwszym kursie metotreksatu w predykcji późniejszej oporności na chemioterapię monolekową.

MATERIAŁ i METODY

1. Serum angiogenesis profile in gestational trophoblastic neoplasm using multipleximmunoassay.Life Sciences. 2018; 211:25-30 doi: 10.1016/j.lfs.2018.08.070Do badaniawłączono41 pacjentki: 21pacjentek ze zdiagnozowanym nowotworem złośliwym trofoblastuoraz 21pacjentek będących w pierwszym trymestrze prawidłowo rozwijającej się ciąży. Panel markerów nowotworowych w surowicy krwi analizowano z wykorzystaniem metody separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej przy użyciu zestawu Bio-Plex: Bio-Plex Pro™ Human Cancer Biomarker Panel 1(Bio-Rad), badającego czynniki proangiogenne.2. MALDI-TOF-MS Analysis inthe Identification of Urine Proteomic Patterns ofGestational Trophoblastic Disease.Metabolites. 2019; 9,30. doi: 10.3390/metabo9020030Badanie przeprowadzono w grupie 26 pacjentek ze zdiagnozowanym nowotworem złośliwym trofoblastu. Grupę kontrolną stanowiło 17 zdrowych kobiet. Analizę profiliproteinowo - peptydowych w moczu oparto o technikę MALDI-TOF-MS -spektometrię mas z jonizacją laserową wspomaganą matrycą z detektorem czasu przelotu (ang. matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-spectometry), poprzedzoną refraktometryczną normalizacją moczu.3. The value of an initial drop in Human Chorionic Gonadotropin levels in predictinga response to methotrexate in women with low-risk Gestational Trophoblastic Neoplasia. Ginekologia Polska. 2019; 90: 1-7. doi: 10.5603/GP.2019.0025Analizie retrospektywnej poddano grupę 46 pacjentek z nowotworem złośliwym trofoblastu, zakwalifikowanych do grupy niskiego ryzyka oporności na chemioterapię monolekową. Wszystkie pacjentki leczone były metotreksatem (MTX)w schemacie pięciodniowym. 24 pacjentki wymagały konwersji leczenia dochemioterapii wielolekowej wg chematu EMA/CO. W tym celu oceniono procentowy spadek stężenia EhCG pomiędzy pierwszym a drugim kursem MTX. Stężenia EhCG oceniano przy pomocy testu ELISA.WYNIKI:1. Serum angiogenesis profile in gestationaltrophoblastic neoplasm using multipleximmunoassay. ife Sciences. 2018; 211: 25-30: 10. doi1016/j.lfs.2018.08.070

92. STRESZCZENIEWceluwyznaczeniawartościgranicznejpozwalającejnazakwalifikowanieanalizowanych próbek do grupy chorych przed terapią grupy kontrolnej najwyższą czułością i swoistością zbudowano krzywe ROC. Spośród16 analizowanych związków 6 charakteryzowało się AUC>0,70(sTIE-2,osteopontyna,sIL-6D,sVEGFR-2, sEGFR, PECAM-1). Różnice stężeń 3 białek (sTIE-2,osteopontyna, sIL-6D)okazały się istotnestatystycznie (p=0,0112;p=0,0442;p=0,0488). Białka te są zatem potencjalnymi markerami nowotworu trofoblastu.2.MALDI-TOF-MS Analysis inthe Identification of Urine Proteomic Patterns ofGestational Trophoblastic Disease.Metabolites.2019; 9,30. doi: 10.3390/metabo9020030Analiza moczu w ciążowej chorobie trofoblastu wykazała różnicę w składzie profili proteinowo-peptydowych pomiędzy badanymi grupami. Porównanie grupy pacjentek z nowotworem złośliwym przed rozpoczęciem terapii pacjentkami ciężarnymi (grupą kontrolną) wykazało dwa różnicujące białka: D-hemoglobinę(m/z=1951,81) oraz komplement C4A (m/z=1895,43). Porównanie moczu pacjentek z nowotworem złośliwym trofoblastu po przebytej terapii z pacjentkami niebędącymi w ciąży(grupa kontrolna) pozwoliło na identyfikację peptydowych fragmentów uromoduliny (m/z=1682,34 i 1913,54) oraz komplementu C4A (m/z=1895,43)3.Thevalue of an initial dropin Human Chorionic Gonadotropin levels in predictingaresponse to methotrexate in women with low-risk Gestational Trophoblastic Neoplasia. Ginekologia Polska.2019; 90: 1-7. doi: 10.5603/GP.2019.0025 Wykazano wyższą wartość stężenia hCG (mediana=6 275 mIU/mL, zakres:21,53-192610,0 mIU/mL) przed rozpoczęciem leczenia w grupie pacjentek opornych a chemioterapię monolekową niż w grupie pacjentek wrażliwych na metotreksat (mediana=532 mIU/mL, zakres:56,5-360397,0 mIU/mL);p=0,034. Procentowy spadek stężenia EhCG pomiędzy dwoma pierwszymi kursami MTX był wyższy p=0,0079) w grupiepacjentek wrażliwych na chemioterapię monolekową (mediana=82,7%,zakres:13,3%-99,9%)niżwgrupiepacjentekopornych(mediana=71,1%, zakres: od wzrostuEhCG o 56,1% do spadkuEhCG o 97,1%). Przy pomocy krzywej ROC wykazano, że wartość początkowa EhCG, równa 6054mIU/mL czułość=55%, swoistość=86%) raz spadki stężenia EhCG o 76,5%(czułość=72%, swoistość=71%) są optymalną wartością graniczną.

WNIOSEK OGÓLNY ROZPRAWY DOKTORSKIEJ:

Profile peptydowo-proteinowe w moczu i w surowicy pacjentek z nowotworem złośliwym trofoblastu różnią się od profili pacjentek zdrowych.

WNIOSKI SZCZEGÓŁOWE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ:

1.Stężeniabiałekangiogennych: sTIE-2, osteopontyna, sEGFR, sIL-6RD, PECAM-1,sVEGFR-2 w surowicy krwi pacjentek z nowotworami rofoblastu różnią się od ich stężenia w surowicy krwi zdrowych kobiet.2.Obecne w moczu białka: komplement C4A oraz alfa hemoglobinę można uznać za potencjalne markery diagnostyczne rozrostów i nowotworów trofoblastu.3.Pacjentki z nowotworem trofoblastu, z początkowym wyższym poziomem EhCG, mają podwyższone ryzyko rozwinięcia oporności na chemioterapię monolekową.

WKŁAD PRACY WPRZEDSTAWIONYCH PUBLIKACJACH

•Przygotowanie koncepcji badań

•Rekrutacja pacjentek

•Przeprowadzenie badania przedmiotowego i podmiotowego, zebranie materiału do badań laboratoryjnych

•Opracowanie bazy danych

•Wykonanie obliczeń statystycznych

•Opracowanie i interpretacja wyników

•Przygotowanie manuskryptów