

Streszczenie

Poszukiwanie markerów, których poziom zmienia się pod wpływem kancerogenezy ma ogromny potencjał w zakresie opracowywania nowych metod diagnostycznych, wczesnego wykrywania choroby, doboru i monitorowania leczenia, czy prognozowania rozwoju nowotworu. Ze względu na to, że rak jajnika należy do jednych z najczęściej występujących nowotworów u kobiet, a stosowane metody diagnostyczne i terapeutyczne nie są wystarczające, konieczne jest pogłębienie wiedzy na temat związanych z nim procesów. Celem niniejszej pracy doktorskiej zatytułowanej „Wybrane strategie proteomiczne w poszukiwaniu wskaźników chorób nowotworowych układu płciowego” było opracowanie i wdrożenie metod analitycznych pozwalających na szeroką analizę proteomiczną surowicy osób z nowotworem układu płciowego. W celu przeprowadzenia badań zebrano próbki surowicy krwi pochodzące od pacjentek z nabłonkowym rakiem jajnika, stanowiących grupę badaną, oraz od pacjentek z guzem łagodnym jajnika i zdrowych kobiet, stanowiących grupę kontrolną. Zaproponowano różne strategie analityczne obejmujące zarówno analizy celowane, jak i niecelowane. Badania prowadzono z wykorzystaniem między innymi spektrometru mas typu MALDI-TOF oraz technologii Luminex. Na przedstawioną pracę składają się 4 publikacje, w tym 1 praca pogładowa oraz 3 prace oryginalne, które zostały opublikowane w latach 2017-2018, a ich łączny współczynnik oddziaływania *impact factor* (IF) wynosi 13,029. Porównanie wyników uzyskanych z analiz różnych grup pacjentów umożliwiło wytypowanie związków, które mają największy potencjał diagnostyczny.

Pierwsze zadanie badawcze polegało na oznaczeniu panelu markerów angiogenezy za pomocą testu immunologicznego opartego o technologię Luminex (*Diagnostic Value of Serum Angiogenesis Markers in Ovarian Cancer Using Multiplex Immunoassay*, Int. J. Mol. Sci. 2017). Zmierzono stężenia 16 białek proangiogennych, w tym czynników wzrostu, hormonów, receptorów oraz cytokin. Wyniki poddano analizie statystycznej, dzięki której szacowano użyteczność danych markerów w wykrywaniu raka jajnika, w rozróżnianiu typów nowotworu oraz w diagnostyce różnicowej. Wytypowano szereg białek statystycznie istotnych, spośród których najlepsze wyniki uzyskano dla osteopontyny. Marker ten nie jest specyficzny dla raka jajnika, jednak może być przydatnym parametrem oznaczanym w panelu razem z obecnie powszechnie stosowanymi markerami raka jajnika: CA125 oraz HE4. Ponadto zaproponowano test wielomarkerowy w kierunku diagnostyki raka jajnika oparty o 6 białek zaangażowanych w proces angiogenezy.



Profilowanie białkowo-peptydowe stanowiło kolejną strategię analityczną zastosowaną w celu proteomicznej charakterystyki raka jajnika (*MALDI-TOF-MS analysis in discovery and identification of serum patterns of ovarian cancer*, BMC Cancer 2017). Próbkę surowicy od osób chorych oraz od zdrowych kontroli oczyszczono i zagęszczono w oparciu i ekstrakcję do fazy stałej w postaci końcówek do mikropipet. Tak przygotowane próbki analizowano za pomocą spektrometru mas typu MALDI-TOF w trybie liniowym. Uzyskano widma w zakresie mas od 1 do 10 kDa, które poddano analizie chemometrycznej. Stworzono model dyskryminacyjny pozwalający na rozróżnienie profilu osób z rakiem jajnika i osób zdrowych, składający się z następujących pików (m/z): 1505,24; 1945,38; 2023,17; 2082,73; 2116,08; 2210,80; 3158,75; 6560,82; 7567,69 oraz 7830,60. Wdrożono metodę opartą o chromatografię cieczową typu nano oraz tandemową spektrometrię mas MALDI-TOF/TOF w celu identyfikacji białek. Wytypowano 4 białka odgrywające istotną rolę w patomechanizmie raka jajnika i mogące służyć jako potencjalne markery tej choroby: dopełniacz C3, kininogen, prealbumina oraz inhibitor inter-alfa-trypsyny.

W ramach realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej wdrożono również analizę próbek surowicy wykorzystując znakowanie izobaryczne peptydów (*Understanding ovarian cancer: iTRAQ-based proteomics for biomarker discovery*, Int. J. Mol. Sci. 2018). Pierwszy etap badań polegał na analizie za pomocą tandemowej spektrometrii mas MALDI-TOF/TOF próbek surowicy o znakowanych peptydach. Pozwoliło to na jednoczesną identyfikację białek oraz ich analizę ilościową, na podstawie stosunku intensywności pików pochodzących od peptydów z poszczególnych grup badanych. Uzyskane wyniki wskazywały na 10 białek o potencjalnym znaczeniu w rozwoju nowotworów jajnika. Kolejnym krokiem było przeprowadzenie walidacji zewnętrznej, wykorzystując odrębną grupę próbek. Ilościowa analiza przeprowadzona w oparciu o test immunoenzymatyczny potwierdziła zmiany w ekspresji następujących białek u pacjentek z rakiem jajnika: białka C-reaktywnego, hemopeksyny, transferyny, albuminy oraz amyloidu A1.

Ponadto na niniejszą pracę doktorską składa się również praca poglądowa dotycząca przeglądu piśmiennictwa na temat różnych strategii proteomicznych w badaniach nad rakiem jajnika (*Mass spectrometry-based proteomics techniques and their application in ovarian cancer research*, J Ovarian Res. 2018). W publikacji zostały szeroko opisane podejścia analityczne z wykorzystaniem spektrometrii mas. Przedstawione zostały zarówno osiągnięcia naukowe wynikające z zastosowania proteomiki klinicznej w charakterystyce raka jajnika, jak i wyzwania i ograniczenia zaproponowanych metod.

10.12.2018r.
Agata Jurek - Bieszkiewicz²