

mgr farm. Agnieszka Klupczyńska

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Zastosowanie nowoczesnych strategii metabolomicznych i proteomicznych w charakterystyce raka płuca

Rak płuca należy do największych wyzwań współczesnej onkologii, ponieważ jest jednym z najczęściej występujących nowotworów złośliwych, zarówno u kobiet, jak i u mężczyzn oraz stanowi główną przyczynę śmierci z powodu nowotworów złośliwych na świecie. Obecnie stosowane metody diagnostyczne nie są wystarczające, ponieważ większość chorych jest diagnozowanych w stadium zaawansowanym, kiedy możliwości leczenia są bardzo ograniczone. Jednym ze sposobów lepszego poznania patomechanizmu rozwoju i przebiegu chorób nowotworowych oraz identyfikacji nowych markerów biologicznych raka jest podejmowanie badań z zakresu metabolomiki i proteomiki.

Celem niniejszej pracy doktorskiej zatytułowanej „Zastosowanie nowoczesnych strategii metabolomicznych i proteomicznych w charakterystyce raka płuca” było poszukiwanie zmian w ludzkim metabolomie i proteomie związanych z występowaniem niedrobnokomórkowego raka płuca oraz określenie ich użyteczności jako potencjalnych markerów diagnostycznych tej choroby. W tym celu zastosowano różne strategie metabolomiczne oraz proteomiczne: niecelowaną analizę metabolomiczną, celowaną analizę metabolomiczną (oznaczanie wolnych aminokwasów i ich pochodnych oraz kwasów organicznych), profilowanie peptydowo-białkowe oraz oznaczanie białek o aktywności proangiogennej. Badania były prowadzone z wykorzystaniem kilku różnych metod opartych na spektrometrii mas oraz metody cytometrii przepływowej. Przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej badania stanowią obszerną analizę zmian zachodzących u pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca na poziomie metabolomu i proteomu. Na niniejszą rozprawę składa się 6 publikacji, w tym 5 prac oryginalnych oraz 1 praca poglądowa, opublikowanych w latach 2015-2017 o łącznym współczynniku oddziaływania *impact factor* (IF) wynoszącym 16,537. Zrealizowane badania umożliwiły pełniejszą charakterystykę zmian związanych z rozwojem i przebiegiem niedrobnokomórkowego raka płuca. Spośród badanych metabolitów i białek wytypowano cząsteczki o potencjalnej użyteczności w praktyce klinicznej.

Kompleksowym analizom metabolomicznym i proteomicznym zostały poddane próbki surowicy krwi pobrane od osób ze zdiagnozowanym niedrobnokomórkowym rakiem płuca przed rozpoczęciem leczenia przeciwnowotworowego oraz zdrowych ochotników

(grupy kontrolnej). Chorzy z I stopniem zaawansowania nowotworu stanowili 47% grupy badanej, co pozwoliło na oszacowanie skuteczności badanych związków we wczesnym wykrywaniu raka płuca. Uzyskane wyniki poddano zaawansowanej analizie statystycznej, z wykorzystaniem wielowymiarowych technik eksploracji danych, w celu oceny potencjału diagnostycznego badanych związków. Na przeprowadzenie badań wyraziła zgodę Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu (Uchwała nr 200/13).

Oznaczanie wolnych aminokwasów zostało przeprowadzone za pomocą wysokosprawnego chromatografu cieczowego połączonego z tandemowym spektrometrem mas (HPLC-QqQ-MS/MS), który pracował w selektywnym trybie monitorowania reakcji wielokrotnych (MRM). Do przygotowania próbek użyto odczynnika aTRAQ znakującego grupy aminowe. Zastosowana metodyka pozwoliła na oznaczenie niezwykle szerokiego profilu wolnych aminokwasów w próbkach surowicy krwi chorych na nowotwór płuca, obejmującego 42 związki (aminokwasy białkowe i niebiałkowe). Celem przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej badań była ocena użyteczności profili aminokwasowych w wykrywaniu raka płuca u polskich pacjentów. Na podstawie jednowymiarowych analiz statystycznych stwierdzono statystycznie istotne różnice w poziomach ośmiu aminokwasów, przy czym największe różnice zaobserwowano w stężeniach następujących metabolitów: kwasu asparaginowego, β -alaniny, argininy, seryny i fenyloalaniny. Otrzymane wyniki umożliwiły weryfikację modeli dyskryminacyjnych służących do wykrywania chorych na raka płuca zaproponowanych przez japońskich badaczy i opierających się na stężeniach 6 wybranych aminokwasów. Ponadto opracowano nowy model o wyższej zdolności klasyfikacyjnej, składający się z następujących aminokwasów: β -alaniny, asparaginy, cytruliny, fenyloalaniny, histydyny oraz kwasu asparaginowego. Udowodniono użyteczność opracowanego modelu w wykrywaniu zarówno podtypu płaskonabłonkowego, jak i gruczołowego raka płuca. Ponadto, stwierdzono, że podwyższony poziom fenyloalaniny i obniżone stężenie cytruliny należą do najbardziej charakterystycznych zmian w profilu wolnych aminokwasów występujących we krwi chorych z rakiem płuca, które występują niezależnie od pochodzenia etnicznego, stylu życia oraz charakterystyki klinicznej pacjentów.

Drugą celowaną analizą metabolomiczną przeprowadzoną w ramach pracy doktorskiej było oznaczanie małocząsteczkowych kwasów organicznych. Celem badań było opracowanie nowej metodyki jednoczesnej analizy ilościowej 6 wybranych kwasów organicznych w surowicy krwi (kwasu mlekowego, kwasu fumarowego, kwasu bursztynowego, kwasu piroglutaminowego, kwasu glutarowego oraz kwasu 2-hydroksymasłowego) i zastosowanie jej do określenia przydatności badanych metabolitów w wykrywaniu niedrobnokomórkowego

raka płuca. Nowo opracowana metodyka opierała się na wykorzystaniu techniki ekstrakcji do fazy stałej z użyciem kolumnienek Clean-up CUQAX oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (HPLC-QqQ-MS/MS). W wyniku przeprowadzonej walidacji potwierdzono dobrą dokładność i precyzję nowej metodyki oraz uzyskano niskie wartości granicy oznaczalności i wykrywalności. Dodatkowo zbadano efekt matrycy i trwałość analitów w różnych warunkach. Przeprowadzone pomiary stężeń małowymiarowych kwasów organicznych były pierwszymi badaniami przedstawiającymi oznaczanie tej grupy metabolitów w surowicy krwi chorych z nowotworem płuca za pomocą metody ilościowej, a nie półilościowej. Wykonane analizy wskazały na możliwość wykorzystania kwasu piroglutaminowego jako potencjalnego wskaźnika diagnostycznego raka płuca. Przeprowadzone dodatkowe analizy statystyczne uwzględniające tylko pacjentów z I stopniem zaawansowania raka płuca potwierdziły zdolność tego metabolitu do wykrywania wczesnych postaci tego nowotworu. Warto zauważyć, że opracowana w ramach niniejszej pracy doktorskiej metodyka może zostać wykorzystana do badania zmian w profilu kwasów organicznych we krwi związanych z przebiegiem innych chorób nowotworowych.

Kolejne zadanie badawcze obejmowało zastosowanie niecelowanego profilowania metabolicznego do identyfikacji nowych grup metabolitów związanych z rozwojem niedrobnokomórkowego raka płuca. Do badań został wykorzystany ultrawysokosprawny chromatograf cieczowy sprzężony ze spektrometrem mas z wysokorozdzielczym analizatorem mas Orbitrap (UHPLC-Orbitrap-MS). Była to pierwsza nieukierunkowana analiza metabolomiczna przeprowadzona u pacjentów z rakiem płuca z zastosowaniem tego analizatora mas. Dla związków wykazujących statystycznie istotne różnice przeprowadzono identyfikację za pomocą 3 baz metabolitów. W grupie zidentyfikowanych związków znalazły się m.in. 4 aminokwasy (histydyna, leucyna, metionina i tyrozyna), 2 kwasy organiczne (kwas piroglutaminowy i kwas jabłkowy), a także karnityna i 2 acylokarnityny. Podsumowując, na podstawie analizy całościowego profilu metabolitów w surowicy krwi chorych z niedrobnokomórkowym rakiem płuca oraz osób z grupy kontrolnej wytypowano acylokarnityny, obok aminokwasów i kwasów organicznych, jako kolejną ważną grupę metabolitów z punktu widzenia poszukiwania nowych markerów raka płuca.

W ramach proteomicznej analizy surowicy krwi osób z niedrobnokomórkowym rakiem płuca zbadano również profil peptydowo-białkowy pacjentów. Badania wykonano z użyciem techniki spektrometrii mas MALDI-TOF-MS w zakresie mas 1-10 kDa. Do oczyszczania i zagęszczania próbek surowicy krwi wykorzystano ekstrakcję do fazy stałej

w postaci końcówek do mikropipet ZipTip. Na podstawie porównania uzyskanych widm osób z niedrobnokomórkowym rakiem płuca i osób zdrowych z grupy kontrolnej stworzono model dyskryminacyjny, w skład którego wchodziło 10 peptydów o wartościach m/z: 1450,94; 1466,90; 1520,16; 1546,72; 1568,45; 1617,88; 1880,97; 5904,39; 6330,86; 6432,69. Opracowany model cechował się dobrą czułością i swoistością, co zostało potwierdzone przez walidację zewnętrzną. Analiza MS/MS wybranych różnicujących sygnałów z profilu peptydowo-białkowego pozwoliła na identyfikację 2 białek: białka dopełniacza C3 oraz łańcucha alfa fibrynogeny. Walidacja przeprowadzona za pomocą testu ELISA nie potwierdziła istotnych różnic w stężeniu białka dopełniacza C3 pomiędzy osobami z rakiem płuca a grupą kontrolną. Aby lepiej poznać zmieniony profil białkowy u pacjentów z rakiem płuca należy podjąć się dalszej identyfikacji oraz walidacji pozostałych peptydów wchodzących w skład opracowanego modelu dyskryminacyjnego.

W ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono ponadto analizę ilościową białkowych czynników regulujących angiogenezę w surowicy krwi osób z niedrobnokomórkowym rakiem płuca i osób z grupy kontrolnej. Projekt obejmował oznaczanie 16 białek biorących udział w procesie angiogenezy, wśród których znajdowały się czynniki wzrostu, receptory, cytokiny, chemokiny i hormony. Analizy wykonano przy użyciu zwalidowanej metodyki opartej na wykorzystaniu przeciwciał, kulek magnetycznych znakowanych fluorescencyjnie oraz cytometrii przepływowej. W niniejszym badaniu grupa chorych z niedrobnokomórkowym rakiem płuca została ograniczona do osób z I stopniem zaawansowania nowotworu. Taki wybór pacjentów pozwolił na oszacowanie użyteczności badanych białek we wczesnym wykrywaniu raka płuca. Stwierdzono, że osteopontyna, czynnik wzrostu hepatocytów (HGF) oraz płytkopochodny czynnik wzrostu typu AB i BB (PDGF-AB/BB) mogą znaleźć zastosowanie we wczesnej diagnostyce niedrobnokomórkowego raka płuca, przy czym największą zdolność dyskryminacyjną posiadała osteopontyna.

Agnieszka Kluczyńska

Poznań, 2 marca 2017 r.