

Analiza metabolomu ludzkiego, obok powszechnych badań genomu i proteomu, zyskuje coraz większą popularność jako metoda identyfikacji potencjalnych markerów chorób nowotworowych. Przedmiotem niniejszej pracy doktorskiej były dwa zagadnienia obejmujące temat diagnostyki i monitorowania leczenia nowotworów. Pierwsza część dotyczy problemu wczesnej diagnostyki raka płuca, a druga odpowiedzi organizmu na promieniowanie jonizujące u pacjentów poddawanych radioterapii.

Część 1. Identyfikacja cech lipidomu i metabolomu surowicy o możliwym zastosowaniu we wczesnej detekcji raka płuca.

Jedną z metod umożliwiających wczesną detekcję raka płuc, są badania przesiewowe z wykorzystaniem wysokorozdzielczej niskodawkowej tomografii komputerowej przeprowadzane w grupie osób wysokiego ryzyka. Jednakże, zastosowanie tej metody budzi kontrowersje związane z niską swoistością tego badania, a także jego wysokim kosztem. Markery chorób nowotworowych, wykrywane we krwi, mogłyby uzupełniać wczesną diagnostykę raka płuca poprzez preselekcję osób kwalifikowanych do dalszych badań obrazowych lub poprzez rozróżnienie zmian łagodnych od nowotworowych, wykrywanych w obrębie klatki piersiowej w trakcie tomografii komputerowej. Celem tej części pracy była identyfikacja sygnatur molekularnych w obrębie ludzkiego metabolomu i lipidomu, pozwalających na odróżnienie chorych we wczesnych stadiach choroby od osób zdrowych należących do grupy wysokiego ryzyka zachorowania na raka płuca. Analizy przeprowadzono na surowicy izolowanej z krwi obwodowej osób z grupy wysokiego ryzyka zachorowania na raka płuca, którzy zostali wyłonieni głównie w trakcie programu przesiewowego (*Pomorski Pilotażowy Program Badań Przesiewowy Raka Płuca*) w latach 2008-2011.

W ramach tej części pracy, scharakteryzowano lipidową frakcję surowicy krwi za pomocą profilowania molekularnego techniką MALDI-ToF. W tym celu zarejestrowano widma masowe frakcji lipidowej w zakresie mas 320-1000 Da dla 100 próbek surowicy pobranych od osób z nisko zaawansowanym rakiem płuca i 300 próbek surowicy osób zdrowych. W wyniku przeprowadzonych analiz, wykryto kilka składowych lipidowych, których poziom jest statystycznie istotnie zmieniony w surowicy osób chorych na raka płuca we wczesnym stadium w porównaniu do osób zdrowych. Na podstawie tych wyników opracowano klasyfikator, który pozwolił na przypisanie próbek do odpowiednich grup. Zdolność diagnostyczna klasyfikatora oceniona została za pomocą parametrów: AUC 0.79, NPV 100%, PPV 28% dla treningowego zestawu danych oraz AUC 0.72, NPV 92%, PPV 28% dla testowego zestawu danych.

Druga analiza polegała na identyfikacji cech metabolomu surowicy krwi pacjentów we wczesnym stadium raka płuca, odróżniających ich od osób zdrowych z grupy ryzyka.

Metabolity rejestrowane były za pomocą techniki GC-MS w grupie 31 pacjentów oraz 92 osób zdrowych. Również w tym badaniu wykryto kilka metabolitów, których poziom istotnie różnił się pomiędzy analizowanymi grupami. Należał do nich benzaldehyd, którego poziom był istotnie wyższy w grupie chorych. Na podstawie otrzymanych wyników opracowano klasyfikator, który pozwolił na przypisanie próbek do odpowiednich grup ze 100% czułością i 95% specyficznością.

Część 2. Scharakteryzowanie zmian lipidomu i metabolomu surowicy krwi, towarzyszących odpowiedzi organizmu na promieniowanie jonizujące w trakcie radioterapii u pacjentów z rakiem prostaty lub rakami regionu głowy i szyi.

Skuteczność radioterapii związana jest z zastosowaniem maksymalnej tolerowanej dawki promieniowania. Z drugiej strony, wiąże się to z ryzykiem powstawania ostrych i późnych odczynów popromiennych, które powodują zmniejszenie komfortu pacjenta, a także mogą prowadzić do opóźnienia lub całkowitego wstrzymania leczenia. W praktyce klinicznej obserwuje się dużą różnorodność reakcji organizmów na radioterapię. Dlatego też, prowadzi się badania mające za zadanie znalezienie markerów molekularnych indywidualnej odpowiedzi organizmu na promieniowanie. Celem tej części pracy była identyfikacja zmian lipidomu i metabolomu surowicy krwi, towarzyszących odpowiedzi organizmu na promieniowanie jonizujące w trakcie radioterapii. Efekt ten oceniany był w grupie pacjentów z rakiem prostaty oraz w grupie pacjentów rakami regionu głowy i szyi.

Dla scharakteryzowania zmian zachodzących w składnikach lipidowych surowicy krwi pacjentów poddawanych radioterapii, wykorzystano profilowanie molekularne z użyciem spektrometru mas MALDI-ToF. Analizy przeprowadzono na próbkach surowicy 129 pacjentów z rakiem prostaty oraz 66 pacjentów z rakiem regionu głowy i szyi. Próbkę krwi pobierane były w trzech punktach czasowych – przed radioterapią, w trakcie oraz około miesiąca po zakończeniu leczenia. Większość zmian indukowanych pod wpływem promieniowania jonizującego była odwracalna lub kompensowana przez zmiany, zachodzące w ciągu miesiąca od zakończenia radioterapii. Zmiany poziomu lipidów były lepiej widoczne w przypadku pacjentów z rakiem regionu głowy i szyi niż w grupie pacjentów z rakiem prostaty, pomimo, że w obu grupach dawki promieniowania, a także objętość napromienianych tkanek były porównywalne. Intensywność obserwowanych zmian była natomiast związana z nasileniem ostrej toksyczności popromiennej, która była dużo wyższa w przypadku pacjentów z rakiem regionu głowy i szyi.

Ponadto, w niniejszej pracy scharakteryzowano indukowaną przez radioterapię zmianę profilu metabolitów surowicy krwi. W tym celu metabolity rejestrowane były za pomocą techniki GC-

MS w grupie 20 pacjentów z nowotworami regionu głowy i szyi. Próbki krwi pobierane były w dwóch punktach czasowych – około tygodnia przed radioterapią oraz po jej zakończeniu (w ostatnim dniu leczenia). Zidentyfikowano 22 związki, których poziom istotnie statystycznie różnił się pomiędzy próbkami pobieranym przed i po radioterapii. Większość z tych związków bierze udział w takich ścieżkach metabolicznych, jak biosynteza białek oraz metabolizm aminokwasów. Wśród związków o największym wzroście w próbkach zebranych po radioterapii znajdował się kwas 3-hydroksymasłowy.

Dane przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej pokazują, że metabolom oraz lipidom surowicy może być wartościowym źródłem informacji na temat zmian molekularnych towarzyszących wczesnym etapom rozwoju raka płuca. Ponadto, w pracy wykazano, że profile metabolomiczne i lipidomiczne surowicy ulegają zmianie pod wpływem promieniowania jonizującego i jego toksyczności, więc mogłyby potencjalnie odzwierciedlać ryzyko wystąpienia reakcji popromiennej u pacjentów poddawanych radioterapii. Jednakże wyniki przedstawione w pracy powinny zostać poddane dalszym badaniom walidującym, które pozwoliłyby na ocenę rzeczywistego znaczenia klinicznego otrzymanych sygnatur.