



ROLA FOSFOLIPIDÓW W PATOGENEZIE RAKA PROSTATY

Buszewska-Forajta M.¹, Pomastowski P.^{2,3}, Monedeiro F.^{2,3}, Król-Górniak A.^{1,2}, Adamczyk P.⁴, Buszewski B.³, Markuszewski M. J.¹

¹ Katedra Biofarmacji i Farmakodynamiki, Wydział Farmaceutyczny z OML, Gdański Uniwersytet Medyczny

² Centrum Nowoczesnych Technologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika

³ Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitiky, Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika

⁴ Oddział Urologii Ogólnej i Onkologicznej, Specjalistyczny Szpital Miejski w Toruniu

Adres e-mail: m.buszewska@gumed.edu.pl

WSTĘP:

Nowotwór prostaty jest jednym z najczęściej diagnozowanych chorób u mężczyzn powyżej 50 r.ż. Szacuje się, że jest obecnie drugim po raku płuca, pod względem częstości występowania, złośliwym nowotworem rozpoznawanym u mężczyzn w Polsce. Ze względu na jego często bezobjawowy rozwój, wykrywany jest w zaawansowanym stadium choroby, co pogarsza rokowanie. Mimo powszechnie prowadzonych badań wiedza w zakresie patomechanizmu rozwoju tego nowotworu jest w dalszym ciągu ograniczona. Ze względu na fakt, że PSA jest to antygen specyficzny dla tkanki ale nie dla jednostki chorobowej rak prostaty jest często błędnie diagnozowany. W tym celu poszukuje się nowych narzędzi, które umożliwią szybką oraz czułą metodę do diagnostyki. Jednym z nowatorskich narzędzi analitycznych jest zastosowanie spektrometrii mas z desorpcją / jonizacją laserową wspomaganą matrycą z analizatorem typu czas przelotu (MALDI-TOF / MS) do analizy lipidów w próbkach moczu,

CEL BADAŃ:

1. Celem projektu było opracowanie protokołu przygotowania próbki do analiz lipidomicznych z wykorzystaniem MALDI-TOF-MS / MS,
2. Oznaczenie i porównanie profili lipidomicznych próbek moczu pobranych od pacjentów z CaP i łagodnym przerostem gruczołu krokowego,
3. Analiza statystyczna uzyskanych wyników.

SPRZĘT:

MALDI ultrafleXtreme mas spektrometr (Bruker Daltonics, Germany).

Parametr	Wartość
Długość fali	355 nm
Częstotliwość lasera	2 kHz
Napięcie	25 kV
Zakres mas	150 - 2000
Typ polaryzacji	Linear positive



PRÓBKİ:

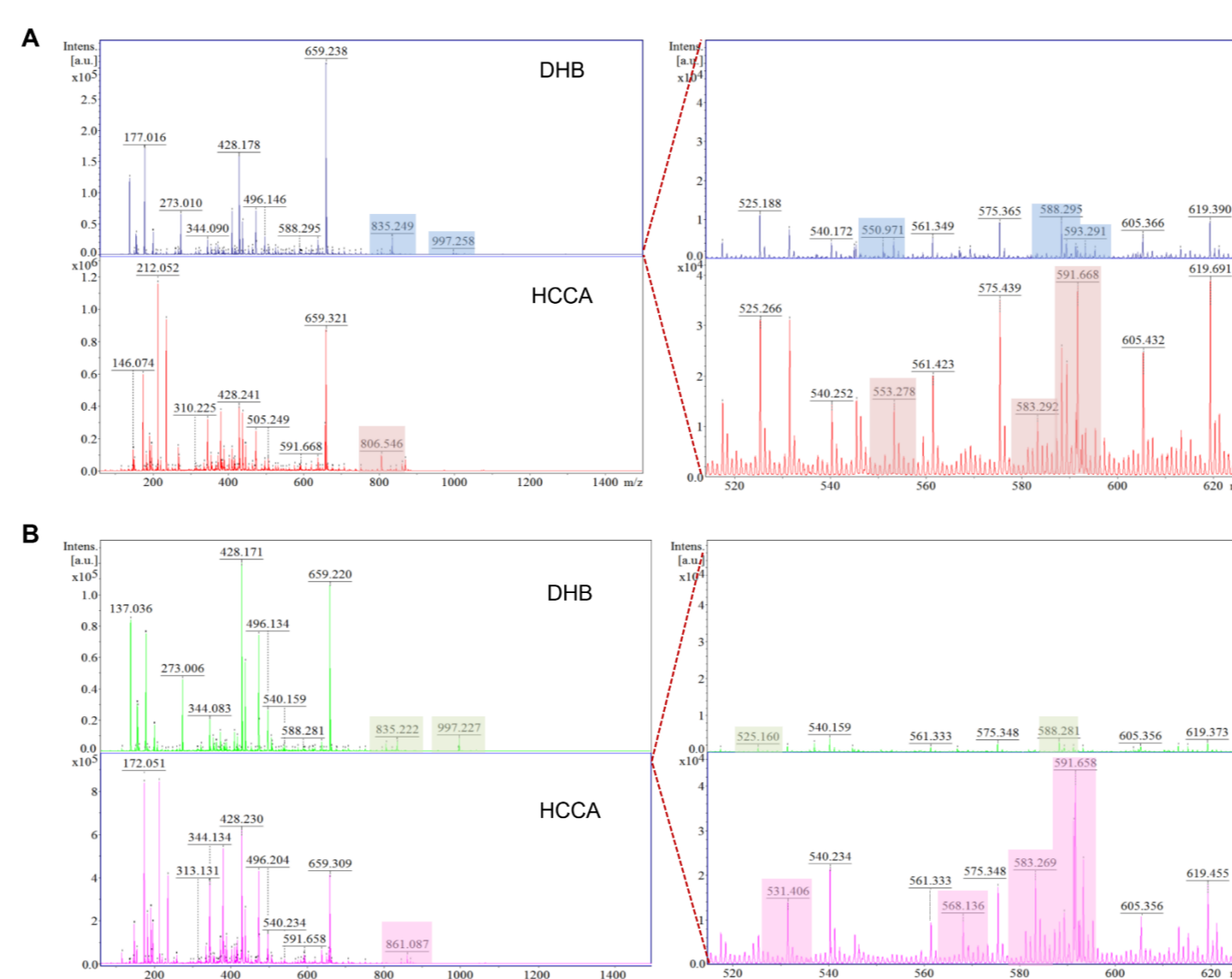
Ekstrakcja

Analiza statystyczna

OPTIMALIZACJA:

Obrazowanie za pomocą MALDI-TOF/MS

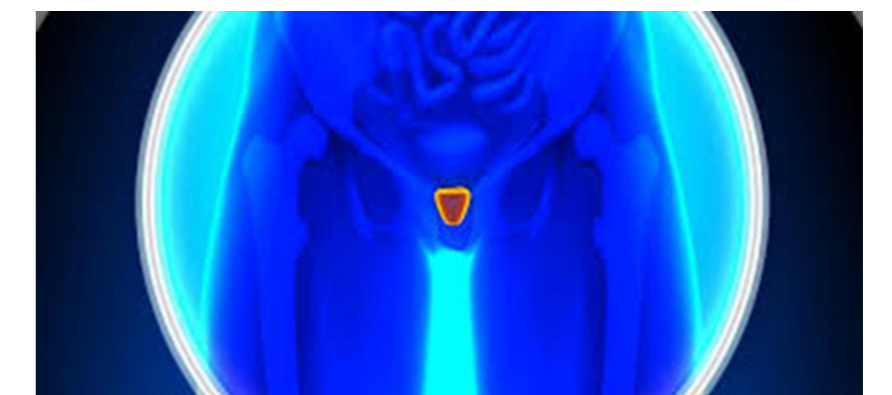
WYNIKI:



Tab. 1 Lista charakterystycznych sygnałów dla obu typów protokołów ekstrakcji lipidów i obu typów matrycy MALDI

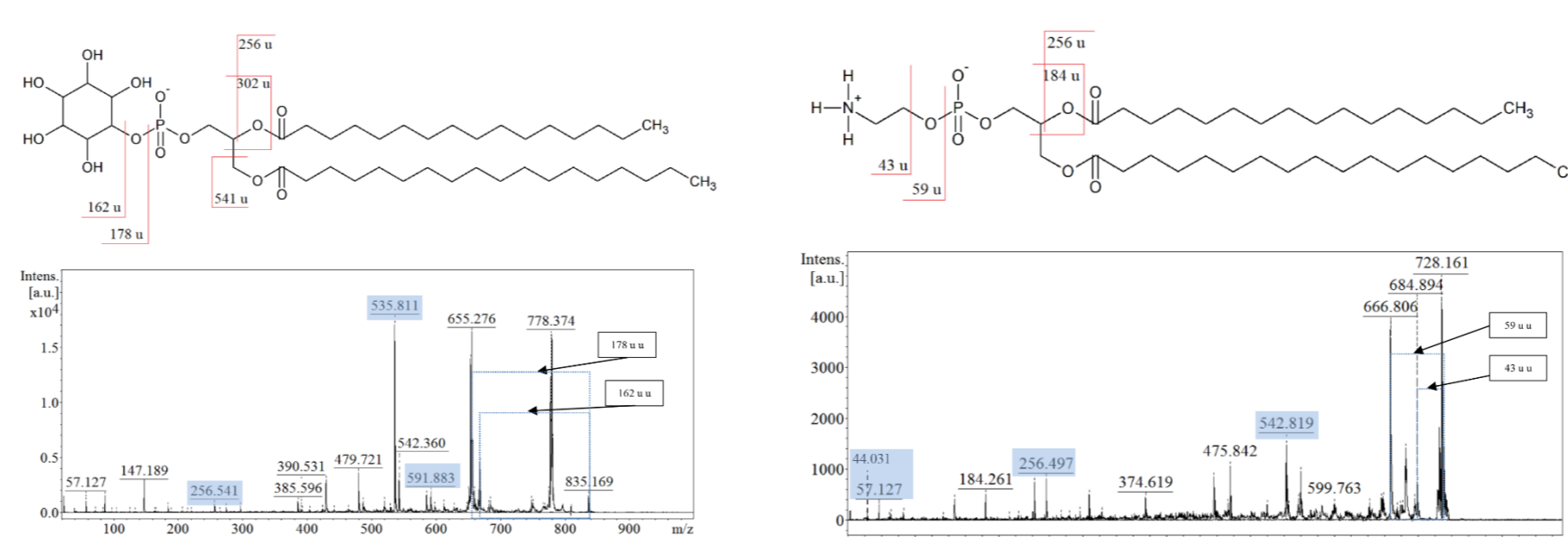
m/z	Metoda ekstrakcji		Rodzaj matrycy	
	Bligh and Dyer	Folch	DHB	HCCA
525		+	+	
531		+		+
550	+		+	
553	+			+
568		+		+
583	+	+		+
588	+	+	+	
591	+	+		+
593	+		+	
806	+			+
835	+	+	+	
861		+		+
997	+	+	+	

Rys. 1 Widma MALDI-TOF / MS dla próbki moczu pobranej od pacjentów z rakiem prostaty przy użyciu protokołów ekstrakcji Bligh and Dyer (A) i Folch (B) do kwasu dihydroksybenzoowego (DHB) i matrycy kwasu α -cyano-4-hydroksycynamonowego (HCCA)

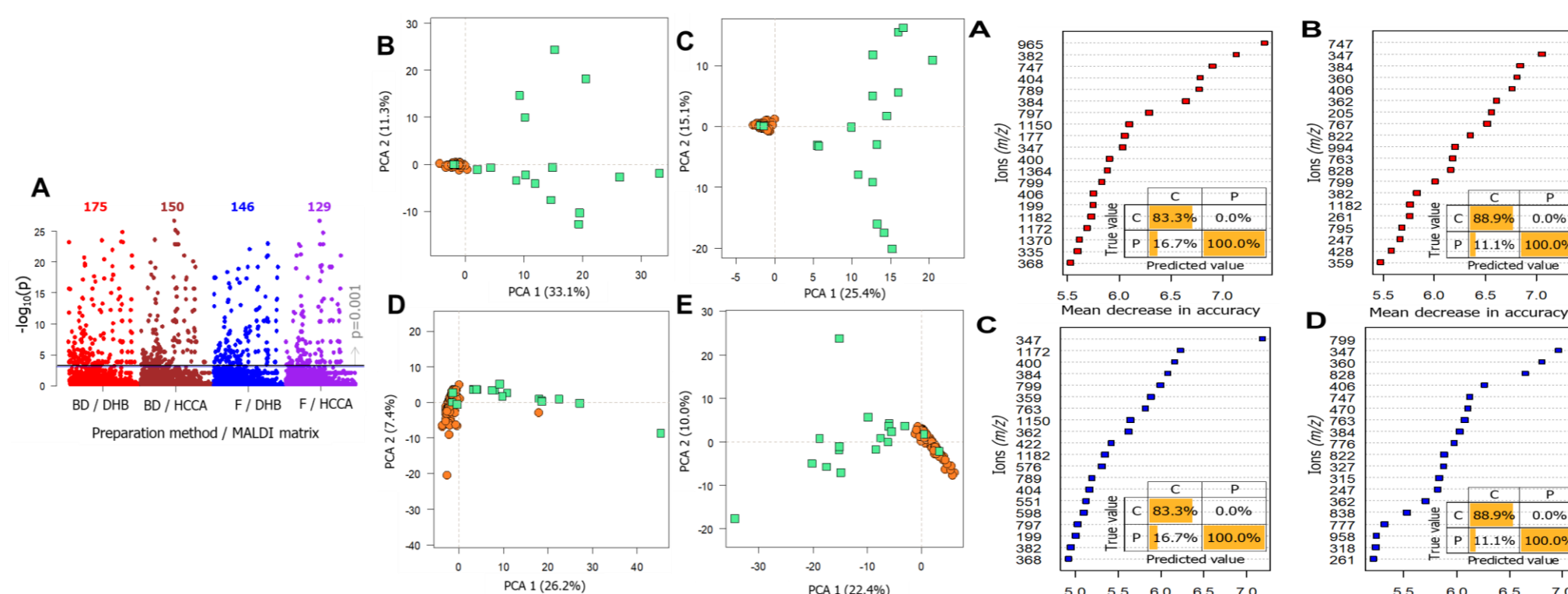


Tab. 2 Lipidy zidentyfikowane w próbkach moczu uzyskanych od pacjentów z rakiem prostaty za pomocą MALDI-TOF/MS

Związek	Wartość obserwowana m/z	Wartość teoretyczna m/z	Błąd pomiaru	Względny błąd pomiaru
1-Oktadecyl-2-hydroksy-PE	464,6	464,3	0,3	0,1
1-Oktadecyl-2-hydroksy-PE	465,7	466,3	0,6	0,1
IS-TG 5:1:0	871,8	871,8	0,0	0,0
LPC 18:1	522,1	522,3	0,2	0,0
LPC 18:2	520,1	520,5	0,4	0,1
LPE 18:0	482,5	482,3	0,2	0,0
LPE 18:0	526,0	526,3	0,3	0,1
PC 12:0/14:0	650,3	650,6	0,3	0,0
PC 14:0/18:3	728,2	727,6	0,4	0,1
PC 16:1/20:4	781,1	780,5	0,6	0,1
PC 36:3	784,3	784,6	0,3	0,0
PC 36:4	783,1	782,6	0,5	0,1
PC 38:5	809,3	808,6	0,7	0,1
PC 38:6	807,1	806,6	0,5	0,1
PC 40:5	836,2	836,6	0,4	0,0
PE 0-34:1	746,0	746,6	0,6	0,1
PE 18:0/20:4	768,9	768,5	0,4	0,1
PE 40:5	838,4	838,5	0,1	0,0
PE 40:6	836,1	836,5	0,4	0,0
PE 0-36:1	774,1	774,5	0,4	0,1
PE 0-38:4	796,0	796,5	0,5	0,1
PE 0-38:6	792,1	792,5	0,4	0,1
PE 0-42:5	851,1	850,5	0,6	0,1
SM 12:1	643,7	644,4	0,7	0,1
SM 18:0	731,8	731,6	0,2	0,0
TG 46:1	799,7	799,6	0,1	0,0
TG 48:2	825,6	825,6	0,0	0,0
TG 50:3	852,2	851,6	0,6	0,1
TG 50:4	849,2	849,6	0,4	0,0
TG 50:5	848,0	847,6	0,4	0,0
TG 52:1	883,3	883,8	0,5	0,1



Rys. 2 Przykładowe widma fragmentacyjne dla fosfatydylinozytoli (16:0/18:0) m/z = 835,2 oraz fosfatydylleotanolaminy (16:0/18:0) m/z = 728,2



Rys. 3 Wykres Manhattan przedstawiający rozkład zmiennych dla każdego z przeprowadzonych testów. Cechy przedstawione powyżej linii progowej ($p < 0,001$) są uważane za najbardziej istotne.

Rys. 4 Analiza RF na podstawie danych uzyskanych z następujących eksperymentów (metoda ekstrakcji / matryca): BD / DHB (A); BD / HCCA (B); F / DHB (C); i F / HCCA (D).

APLIKACYJNOŚĆ:

APLIKACYJNOŚĆ

143 próbek pobranych od pacjentów z CaP i grupy kontrolnej

Tab. 3 Charakterystyka biochemiczna próbek pacjentów

Parametr biochemiczny	Pacjenci CaP (n=123) mean±SD	Grupa kontrolna (n=17) mean±SD
Cholesterol całkowity [mg/dl]	198,77 ± 37,71	208,08 ± 45,73
LDL [mg/dl]	130,47 ± 34,63	135,47 ± 44,31
HDL [mg/dl]	52,25 ± 14,50	50,83 ± 10,77
Trójglicerydy [mg/dl]	155,70 ± 75,97	208,75 ± 137,49
Prolaktyna [ng/ml]	9,52 ± 5,13	8,95 ± 3,61

WNIOSKI:

Lipidy ekstrahowano stosując dwie metody ekstrakcji: metodę Folcha oraz Bligha i Dyera - obie te metody wykazują duże podobieństwo pod względem uzyskanych profili lipidowych.

Zastosowane matryce skutecznie jonizują próbki lipidów. W przypadku stosowania DHB efektywna jonizacja jest możliwa dzięki uniknięciu tworzenia się skupisk macierzy. Zastosowanie kwasu HCCA, jako matrycy zapewnia oznaczenie większej liczby sygnałów i ich większej intensywności. Opracowana metoda umożliwiła opisanie szlaków fragmentacji 5 klas lipidów: LPC, PC, PI, PE i TG. Metoda oparta na Bligha i Dyera z zastosowaniem matrycy HCCA okazała się najskuteczniejsza. Wstępny model statystyczny sugerował, że dokładność klasyfikacji powyżej 90% można osiągnąć przy użyciu wcześniej wybranych sygnałów MS.

Podsumowując, metoda zaproponowana w tym badaniu umożliwia skuteczną, prostą i szybką identyfikację składników lipidowych w ludzkim moczu, a także zapewnia ich szczegółowe charakterystyki SM. Podejście MALDI wydaje się obiecującym narzędziem w diagnostyce i prognozowaniu CaP poprzez analizę profilu lipidowego.

PODZIĘKOWANIA:

Praca została sfinansowana przez Narodowe Centrum Nauki, grant Sonata nr. UMO-2016/21/D/ST4/03730