



REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

Biomarkeri de diagnostic precoce ai cancerului de prostată prin analiza metabolomică

Doctorand: **Ramona Maria Maxim**

Conducător de doctorat: **Prof. dr. Carmen Socaciu**

CUPRINS

INTRODUCERE

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRIILOR.....Error! Bookmark not defined.

STUDIUL DE LITERATURĂ.....Error!

Bookmark not defined.

CAPITOLUL I. METABOLOMICA ȘI TEHNICI DE STUDIU UTILIZATE ÎN METABOLOMICA.....E

rror! Bookmark not defined.

I.1 SCURT ISTORIC. DEFINIȚII. PRINCIPII GENERALE.....**Error! Bookmark not defined.**

I.2 METABOLOMICA NEȚINTITĂ.....**Error! Bookmark not defined.**

I.3 METABOLOMICA ȚINTIT**Error! Bookmark not defined.**

I.4 METODE ANALITICE FOLOSITE ÎN METABOLOMICA**Error! Bookmark not defined.**

CAPITOLUL II. STUDII METABOLOMICE EFECTUATE PE SER ȘI URINĂ ÎN CANCERUL DE PROSTATĂ.....Error! Bookmark not defined.

II.1 Studii efectuate pe ser.....**Error! Bookmark not defined.**

II.2 Studii efectuate pe urin**Error! Bookmark not defined.**

II.2.1 Metode i tehnici de determinare a sarcozinei, utilizat pân în prezent ca principal biomarker urinar pentru cancerul de prostat**Error! Bookmark not defined.**

II.3 Metode i tehnici de determinare a biomarkerilor urinari ai cancerului de prostat**Error! Bookmark not defined.**

II.3.1 Cromatografia de lichide utilizat în identificarea biomarkerilor urinari ai cancerului de prostat**Error! Bookmark not defined.**

II.3.2 Cromatografia de gaze utilizat în identificarea biomarkerilor urinari ai cancerului de prostat**Error! Bookmark not defined.**

II.3.3 Antigenul specific prostatic total.....**Error! Bookmark not defined.**

CERCETĂRI PROPRII.....Error! Bookmark not defined.

CAPITOLUL III. Analiza metabolomică nețintită LC-ESI(+) QTOF-MS aplicată pentru probe de ser sangvin de la pacienți normali și cu cancer de prostată.....Error!

ror! Bookmark not defined.

III.1	Materiale	i
metode.....		Error! Bookmark not defined.
III.1.1 Pacienții analizați.....		5
III.1.2 Procesarea probelor de sânge.....		5
III.1.3 Analiza LC-ESI(+)-Q-TOF-MS.....		5
III.1.4 Analiza statistic		5
III.2 Rezultate și discuții.....		
Error! Bookmark not defined.		
III.2.1.1 Evaluarea preliminar a concentrației PSA din probe.....		5
III.2.2 Analiza LC-QTOF (ESI +) MS.....		6
III.2.3 Identificarea biomarkerilor serici prin analiza biostatistic (chemometrie).....		6
III.3.Concluzii.....		7

CAPITOLUL IV. Metabolomica nețintită și țintită, cu identificarea biomarkerilor serici de diferențiere a pacienților cu hiperplazie și cancer de prostată.....8

IV.1Materiale i		
metode.....		Error! Bookmark not defined.
IV.1.2	Analiza	LC-ESI(+)-Q-TOF-MS.....
MS.....		Error! Bookmark not defined.
IV.1.3.Analiza statistic		
Error! Bookmark not defined.		
IV.2.	Rezultate	i
discuții.....		Error! Bookmark not defined.
IV.2.1 Analiza metabolomic nețintită: Amprenta cromatografică LC-MS a probelor de ser.....		8
IV.2.2 Evidențierea semnalelor majore înregistrate în cromatograme BPC și Dissect și identificarea moleculelor.....		
Error! Bookmark not defined.		
IV.2.3. Analiza biostatistic a probelor : PCA (Principal Component Analysis).....		
Error! Bookmark not defined.		
IV.2.4. Analiza metabolomic țintită, cu evidențierea diferențelor cantitative a unor tipuri de biomolecule, între grupurile de pacienți III-VI,.....		Error! Bookmark not defined.
IV.3		
CONCLUZII.....		Error! Bookmark not defined.

Capitolul V. Analiza profilului metabolomic urinar, nețintit și țintit, diferențiat la pacienții cu hiperplazii și cancer de prostată.....Error!

ror! Bookmark not defined.

V.1 Metode de analiză a probelor de urină..... Materiale și metode..... Error! Bookmark not defined.

V.1.1. Evaluarea și clasificarea pacienților..... Pacienți și metode de evaluare..... Error! Bookmark not defined.

V.1.2. Procesarea probelor de urină..... Procesarea probelor de urină..... Error! Bookmark not defined.

V.1.3. Analiza LC-ESI(+)-Q-TOF-MS..... Analiza LC-ESI(+)-Q-TOF-MS..... Error! Bookmark not defined.

V.1.4. Analiza statistică..... Analiza statistică..... Error! Bookmark not defined.

V.2. Rezultate și discuții..... Rezultate și discuții..... Error! Bookmark not defined.

V.2.1. Determinarea amprentei specifice LC-MS a probelor de urină de la martori și pacienți cu hiperplazii și cancer de prostată (grupuri CB, CO)..... Error! Bookmark not defined.

V.2.2. Analiză biostatistică nețintită de tip PCA: evaluarea omogenității probelor din diferite grupuri și identificarea diferențelor între grupurile de pacienți și identificarea valorilor m/z care diferențiază probele..... 12

V.2.3. Analiză metabolomică țintită: identificarea biomoleculelor individuale din urină, specifice grupurilor de pacienți III-VI..... Error! Bookmark not defined.

V.3. Concluzii..... Concluzii..... Error! Bookmark not defined.

BIBLIOGRAFIA..... Bibliografie..... Error! Bookmark not defined.

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRILOR

Scopul cercetărilor a fost reprezentat de studii menite a identifica biomarkerii de diagnostic precoce ai cancerului de prostată prin analiza metabolomică LC-ESI(+)-QTOF-MS, din probe de ser sanguin și urină.

Obiectivele generale ale cercetărilor au fost reprezentate prin 3 studii experimentale care s-au referit la:

1. Analiza metabolomică neintințită (untargeted) realizată prin cromatografie de înalt performanță cuplată cu spectrometrie de masă, de tip LC-ESI(+)-QTOF-MS, utilizată ca metodă rapidă și globală de evaluare a biomarkerilor pentru detecția timpurie a cancerului de prostată din probe de ser sanguin în corelație cu valorile cu antigenului specific de prostată (PSA)
2. Analiza neintințită și intințită folosită ca și evaluare calitativă și cantitativă a biomarkerilor metabolici serici și urinari, de diferențiere a pacienților cu hiperplazii și cancer de prostată
3. Interpretarea biostatistică prin analiza chemometrică comparativă (Analiza Principalelor Componente, Analiza Cluster) a rezultatelor obținute în urma analizelor metabolomice target și non-target a serului sanguin și a urinei, cu scopul de a identifica biomarkerii de diagnostic precoce ai cancerului de prostată.

Structura tezei. Teza este structurată în două părți, prima parte conține date de literatură referitoare la metabolomică – definiții și principii, tipurile de metabolomica: netințită și tințită, precum și tehnici de studiu utilizate în metabolomica și studii de metabolomica efectuate pe probe de sânge și urină în cancerul de prostată, (2 capitole).

A doua parte se focusează pe contribuțiile personale aduse incluzând 3 studii experimentale ce includ materiale și metode folosite, rezultatele și concluziile aferente

Prima parte a tezei este structurată în 2 capitole:

Capitolul 1 sumarizează informațiile legate de introducerea în domeniul metabolomicii, definiții generale și principiile directoare ale acestui domeniu, cu descrierea tipurilor de metabolomică existente: netințită și tințită, precum și metodele analitice de studiu aplicate în acest domeniu.

Capitolul 2 prezintă studiile din literatură realizate până la ora actuală în metabolomică pe probe de sânge și urină, provenite de la pacienți cu cancer de prostată și descrierea biomarkerilor clinici existenți la ora actuală: antigenul specific prostatic total.

A doua parte a tezei este reprezentată de contribuția personală însumează 3 studii concludente:

Capitolul 3 prezintă rezultatele obținute din analiza metabolomică netințită LC-ESI(+)-QTOF-MS aplicată pentru probe de ser sanguin de la pacienți normali și cu cancer de prostată.

Capitolul 4 arată aplicabilitatea metabolomicii neintințite și intințite, cu identificarea biomarkerilor serici de diferențiere a pacienților cu hiperplazie și cancer de prostată.

Capitolul 5 prezintă comparativ și rezultatele obținute din analiza profilului metabolomic urinar, neintințit și tințit, diferențiat la pacienții cu hiperplazii și cancer de prostată.

Programul de cercetare doctorală a fost realizat și cu sprijinul financiar oferit prin programul POSDRU/159/1.5/S/132765 (2007-2013)

CONTRIBUȚIA PROPRIE

CAPITOLUL III. ANALIZA METABOLOMICĂ NEȚINTITĂ LC-ESI(+) QTOF-MS APLICATĂ PENTRU PROBE DE SER SANGVIN DE LA PACIENȚI NORMALI ȘI CU CANCER DE PROSTATĂ (STUDIUL 1)

Scopul acestui studiu a fost de a folosi metabolomica nețintită prin analiză LC-QTOF-MS pentru a identifica și caracteriza metaboliții serici cu moleculă mică de la pacienții cu valori normale sau patologice ale PSA-ului, și a evalua corelații posibile între valorile PSA și a unor biomarkeri, în scopul găsirii de biomarkeri metabolici relevanți pentru diagnosticul precoce al cancerului de prostată.

MATERIALE ȘI METODE

Pacienții analizați. Un număr total de 100 de pacienți au fost investigați prin analiza de ser. S-au constituit două grupuri în funcție de concentrația PSA-ului. Primul grup de 50 de pacienți (**Grupul I-Normal**) a avut valori PSA sub 4 ng/ml, pe când al doilea grup (**Grupul II-Patologic**) a avut valori PSA peste 4 ng/ml.

Procesarea probelor de sânge: 100 de probe de ser sanguin au fost obținute de la un laborator clinic în conformitate cu consimțământul informat al pacienților. Acestea au fost analizate pentru determinarea PSA-ului.

Pentru analiza metabolomică, probele au fost diluate cu metanol 98% în diluția 1/5 pentru precipitarea proteinelor, vortexate, ultrasonicate 5 minute la 4°C și centrifugate 15 minute la 1500g. Supernatantul a fost colectat, filtrat prin filtre de 0.2 μm, analizat imediat sau păstrat la -20°C până la analiza metabolomică.

Analiza LC-ESI(+)-Q-TOF-MS

Eșantioane de 5 μl din fiecare supernatant au fost injectate pentru separarea lichidului cromatografic, folosind sistemul Thermo Scientific HPLC UltiMate 3000 echipat cu o pompă cuaternară Dionex UltiMate 3000 (UHPLC+ focused), coloana Acclaim C-18 (3 μm, 2.1x50 mm), autosampler și detector array fotodiodă Dionex UltiMate 3000.

Spectrometria de masă a fost realizată pe analizatorul Bruker Daltonics MaXis Impact Q-TOF în modul pozitiv de operare (ESI+).

Analiza statistică a fost realizată prin Analiza Principalelor Componente - PCA (engl. Principal Component Analysis).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Evaluarea preliminară a concentrației PSA din probele de ser, datele privind grupurile de pacienți la care s-au determinat valorile PSA, vârsta medie generală și pe subgrupuri este prezentat în Tabelul 1.

Tabel 1. Grupurile de pacienți utilizate în studiu, valorile PSA

Valori PSA	Grup Normal (PSA, ng/ml)	II. Grup Patologic (PSA, ng/ml)			
		4-10	10-100	100-1000	>1000
n	50	24	15	8	3
Vârsta ± DS	54±2.35	63±3.65	71.66±3.8	60.12±3.02	62.33±4.30
PSA ± DS	1.009±0.001	3.53±0.32	44.10±2.5	595.5±42.8	1133±144.3

Valorile PSA cuprinse între 4-10 ng/ml au fost considerate ca fiind cauzate de hiperplazie benign prostatic sau prostatit (HANKEY, 1999; BELANGER, 1995). Valorile PSA mai mari decât 10 ng/ml au fost considerate ca fiind cauzate de cancerul de prostat .

Analiza LC-QTOF (ESI +) MS

Cromatogramele BPC, engl. "Base Peak Chromatograms" ale probelor de ser sangvin normale i patologice sunt prezentate comparativ în Fig. 1A i respectiv 1B. În total, 14 peak-uri principale au fost identificate în cromatogramele BPC ale probelor normale i 20 de peak-uri principale au fost identificate în cromatogramele BPC ale probelor patologice. Identificarea peak-urilor s-a făcut în corelație cu timpul de retenție, cu forma protonată a ionilor $[M + H]^+$ i datele din literatur .

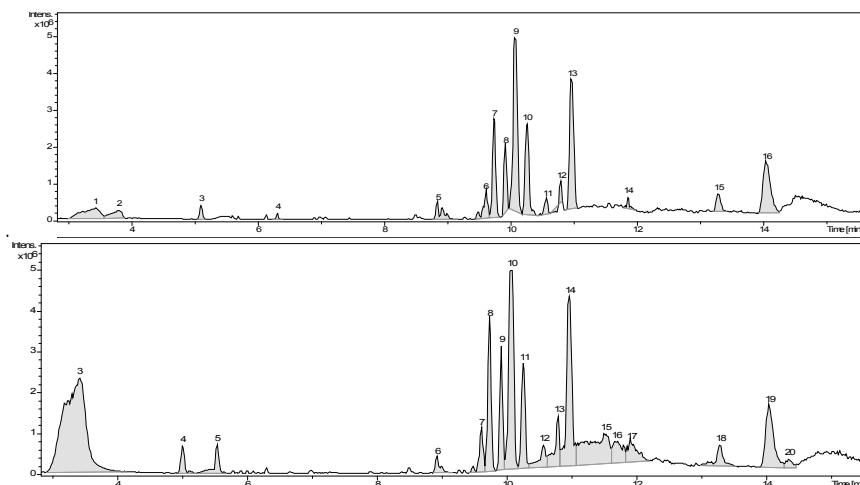


Fig. 4. Cromatogramele BPC comparative a unei probe normale (N) de ser sangvin, PSA<4ng/ml (A) si patologice (P), PSA 728 ng/ml.

Identificarea biomarkerilor serici prin analiza biostatistică (chemometrie)

Pentru a integra toate datele amprentei metabolice ale probelor de ser sangvin obținute prin spectrometria de masă și pentru a evidenția setul întreg de metaboliți prezenți în probele de ser sangvin acestea au fost prelucrate. Astfel, datele obținute din analiza LC-MS au fost procesate folosind algoritmul de detecție a peak-urilor : "Find Molecular Features" (FMF). După cum este ilustrat în Fig. 1, diagramele scorurilor generate prin comparația PC1 și PC2 au reprezentat 97.5% din varianța totală. Diagrama scorului PCA arată o grupare probelor în funcție de nivelul PSA. O variație mare se observă în cadrul grupurilor patologice. Această variație poate fi explicată prin prin valorile mari ale PSA-ului care pot fi corelate cu diferite stadii ale cancerului de prostat , hiperplazie benign de prostat i prostatit care poate fi prezent la o concentrație a PSA-ului mai mare decât 4 ng/ml. Grupul normal a prezentat omogenitate mare. Au fost discriminate două grupuri: unul normal (cu valori PSA = 0-4) i unul patologic (cu valori PSA>4). Se observă o separare acceptabilă al grupului cu PSA = 100-1000. Nu se observă separare între grupurile cu PSA = 4-10 i PSA=10-100.

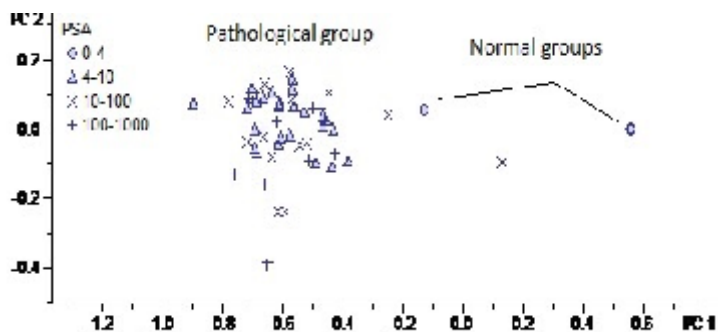


Figura 1. Diagrama scorurilor din analiza PCA a datelor rezultate din spectrometria de masa pentru 50 de probe de ser cu valori normale ale PSA si 50 de probe cu valori patologice. o- probe cu PSA între 0-4 ng/ml; Δ- probe cu PSA între 4-10 ng/ml (n=24); x- probe cu PSA între 10-100ng/ml (n=15); + - probe cu PSA între 100-1000ng/ml (n=8). Probele cu PSA > 1000ng/ml au fost considerate extreme și au fost excluse din modelul PCA.

Compușii principali care au determinat gruparea probelor pot fi identificați ca biomarkeri din probe, după cum urmează: LPC(16:0) (m/z 496.357), PC(O-16:0/2:0) or PS(18:1(9Z)/0:0) (m/z 524.389), LPC(18:2) (m/z 520.358) și LPC(18:1) (m/z 522.374). Principalele clase de compuși identificați în probele patologice, care pot fi considerați biomarkeri au fost fosfatidilcolinele (PC) și fosfatidiletanolaminele (PE), mai ales formele lizate (LPC). De asemenea s-au identificat modificări ale acizilor grași liberi (creșteri la pacienții cu valori mari ale PSA), creșteri ale ariilor corespunzătoare prostaglandinelor (m/z=353.277).

CONCLUZII

1. S-a constatat că un număr de 50 de probe incluse în studiu au avut o concentrație a PSA-ului mai mic de 4 ng/ml și 50 de probe au avut nivelul PSA mai mare de 4 ng/ml, care este s-a considerat patologic, s-a clasat pe trei nivele (4-10, 10-100, >100) asociat cu condițiile inflamatorii ale prostatei (valori între 4-10 ng/ml) și cancer, la o concentrație a PSA-ului mai mare de 10 ng/ml.
2. Folosind metabolomica nețintită prin analiza HPLC-(ESI+) QTOF-MS în cromatograme de tip BPC s-au obținut separări a 17-20 compuși majori. Aceștia au fost identificați pe baza valorilor m/z, prin consultarea bazei de date HMDB.
3. Prin prelucrarea statistică de tip PCA s-au comparat amprentele pacienților și s-au grupat, discriminându-se grupurile cu valori PSA < 4 de grupurile cu valori PSA patologice.
4. Moleculele-candidat de a fi considerate biomarker sunt de tip lizofosfatidil colina (cu C18:2, C18:1, C16:0, C20:3) dar și prostaglandinele precum și sfingozina și unii acizi grași liberi. În concluzie, se poate considera că lipidele polare apar în rândul acestor clase pot fi buni candidați pentru diagnosticul precoce al cancerului de prostată și bine corelați cu valorile PSA.

Aceste rezultate au fost valorificate prin elaborarea unui articol științific publicat în Buletinul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară :

Ramona Maria MAXIM, Carmen SOCACIU, Anca Dana BUZOIANU, Raluca Maria POP, Florina ROMANCIUC, **Untargeted LC-QTOF (ESI +) MS Analysis of Small Serum Metabolites Related to Prostate Cancer and Prostate Specific Antigen**, Bulletin UASVM Food Science and Technology 71(2) / 71(2)/2014, 165-17.

CAPITOLUL IV. METABOLOMICA NEȚINTITĂ ȘI ȚINTITĂ, CU IDENTIFICARE DE BIOMARKERI SERICI DE DIAGNOSTIC HIPERPLAZIE ȘI CANCER DE PROSTATĂ (STUDIU 2)

Scopul acestui studiu a fost de a analiza metabologic, în sistem nețintit și țintit, un total de 136 de probe de ser sangvin pentru a identifica biomarkerii serici de diferențiere a pacienților cu hiperplazie și cancer de prostată .

Pacienți și parametri clinici determinați

În acest studiu au fost incluse 4 loturi de pacienți de la care s-au recoltat probe de ser sangvin, grupate astfel: lotul de pacienți diagnosticați cu hiperplazie benignă de prostată (lot IV-H), lot de pacienți cu presupus cancer de prostată, recoltați înainte de biopsie (V-CB), lotul de pacienți cu cancer de prostată confirmat, pre-operator (VI-CO) și lotul martor care cuprinde pacienți sănătoși (III-M).

Procesarea probelor de sânge: 100 de probe de ser sangvin au fost obținute de la un laborator clinic în conformitate cu consimțământul informat al pacienților. Acestea au fost analizate pentru determinarea PSA-ului.

Pentru analiza metabologică, probele au fost diluate cu metanol 98% în diluția 1/5 pentru precipitarea proteinelor, vortexate, ultrasonicate 5 minute la 4°C și centrifugate 15 minute la 1500g. Supernatantul a fost colectat, filtrat prin filtre de 0.2 μm, analizat imediat sau păstrat la -20°C până la analiza metabologică .

Analiza LC-ESI(+)-Q-TOF-MS

5 μl din fiecare supernatant au fost injectate pentru separarea lichid cromatografic, folosind sistemul Thermo Scientific HPLC UltiMate 3000 echipat cu o pompă cuaternară Dionex UltiMate 3000 (UHPLC+ focused), coloana Acclaim C-18 (3 μm, 2.1x50 mm), autosampler și detector array fotodiod Dionex UltiMate 3000.

Spectrometria de masă a fost realizată pe analizatorul Bruker Daltonics MaXis Impact Q-TOF în modul pozitiv de operare (ESI+).

Analiza Principalelor Componente - PCA (engl. Principal Component Analysis) a fost folosită pentru a discrimina probele normale (grup III) de probe patologice (IV-VI). Această analiză a fost realizată prin softul Profile Analysis (Bruker, Daltonics) precum și prin softul Unscrambler 10.X.

Analiza PCA s-a aplicat atât pentru a verifica omogenitatea fiecărui grup de pacienți (pe baza amprentei cromatografice, a valorilor m/z și a compoziției asemănătoare) dar și pentru a identifica diferențele între grupurile de pacienți III-VI.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Analiza metabologică nețintită: Amprenta cromatografică LC-MS a probelor de ser

Separarea și identificarea moleculelor din ser de la pacienții martor (lot III), comparativ cu pacienții patologici: hiperplazie (lot IV), cancer-biopsie (lot V), cancer-operativ (lot VI) s-a făcut prin preluarea cromatogramelor BPC și a cromatogramelor de tip Dissect pentru fiecare grup de studiu în parte.

Din cromatogramele de tip Dissect și tabelele aferente s-au identificat semnalele majore, moleculele comune sau cele specifice fiecărui timp de retenție. A fost apoi făcută alinierea manuală a acestora pentru fiecare grup de studiu în funcție de raportul m/z începând de la minutul 6 până la minutul 17. S-a considerat că până la

minutul 1 moleculele identificabile nu s-au separat (volumul mort al coloanei), iar pe intervalul 1- 6 minute, moleculele separate nu sunt semnificative, sunt minore, având loc doar o etapă de separare a coloanei.

Analiza biostatistică a probelor: PCA (Principal Component Analysis)

Din valorile m/z obținute s-au putut identifica biomarkerii, stabilindu-se omogenitatea fiecărui grup de pacienți (asemănări).

Analiza metabolomică țintită, cu evidențierea diferențelor cantitative a unor tipuri de biomolecule, între grupurile de pacienți III-VI, pe baza valorilor TR

Pentru a evalua diferențele din punct de vedere cantitativ între grupuri, s-au luat în considerare anumite intervale semnificative de TR (min) unde au fost identificați compuși specifici și s-a calculat media și deviația standard, după cum reiese din Tabelul 2.

Tabel 2. Reprezentarea valorilor ariilor pentru diferite intervale de timp retenție (TR) între grupurile M, H, CB și CO

Intervale TR (min)	Categorie de compuși	Valori medii ± Deviația Standard			
		M	H	CO	CB
8.1 + 8.2	Testosteron	34896542.59± 26470337.1	21779026.± 4635572.482	22859509 ± 20341381	24812935 ± 17125668.41
De la 8.2 la 9.9	Aminoacizi peptide	56789817.72 ± 61040561.42	60452030.5 ± 71737855.8	61576401. ± 73815722.	57410635.85 ± 75670112.17
De la 9.5 la 11.1	Lizozomi și alte lizo	109334969± 134379209	118235399. ± 145287315.	122561641 ± 143265517	109442529.5± 135346489.5
11.1; 12.4 ; 12.5; 13.8; 13.9+ 14 ;+ 14.2	DG + MG	125786092.2 ± 87006755	103771756 ± 64484307.67	102987391 ± 76668269.1 9	121187660.7 ± 87288251.58
De la 11.6 la 11.9	Prostaglandine	100718008.7 ± 68248000.5	111419925. ± 87157590.47	204470998 ± 211455696	144231018.3 ± 154271544.9
12.8; 14.1 -15.6	PC	45276788.03 ± 66164509.02	50897656.8 ± 65765912.3	46769355. ± 41502216	64103899.6 ± 69262590.57

S-au reprezentat grafic mediile ariilor pentru fiecare categorie de compuși. Au fost identificate molecule din categoria ceramidelor, a fosfatidilcolinelor de tip PC(38:6), PC(39:2), PC(40:6), cu valori crescute la pacienții cu cancer, înainte de biopsie (CB).

Analiza metabolomică țintită, cu evidențierea diferențelor cantitative a unor biomolecule individuale, între grupurile de pacienți III-VI

Ceramidele, alături de LPC 18:0 pot fi markeri utili în diagnosticarea hiperplaziilor de prostată .

CONCLUZII

1. Au fost analizate un total de 133 de probe de ser sanguin de la pacienți hiperplazie benignă de prostată (H=grup IV=39 probe), cancer de prostată -recoltați înainte de biopsie CB=grup V=46 probe), cancer de prostată recoltați înainte de operație (CO=grup VI=37 probe).
2. Au fost aplicate protocoale de separare cromatografică de tip LC_QTOF (ESI+) MS, înregistrându-se cromatograme de tip Base Peak (BPC) și Dissect.
3. Au fost aliniat manual valorile m/z în funcție de valorile TR din cromatogramele de tip dissect.
4. Au fost reprezentate, prin analiza statistică de tip PCA, grupările probelor pe baza valorilor m/z și a ariilor semnalelor, efectuându-se o analiză calitativă cu evidențierea omogenității grupărilor și a semnificației diferențelor între probele aparținând grupurilor de pacienți III-VI.
5. Au fost identificate moleculele separate, pe intervale de TR și individual și s-a calculat media valorilor ariilor, fiind apoi reprezentate grafic pe grupe de pacienți pentru a se identifica biomarkerii specifici și modificările lor în funcție de patologie.
6. Au fost discutate rezultatele și semnificația lor statistică, cu relevanță pentru diagnosticul hiperplaziilor și a cancerului de prostată în diferite situații (înainte de biopsie sau înainte de operație).
7. S-au identificat ca biomarkeri-candidat pentru diagnosticul precoce diferențiat H-CB-CO, molecule de tip lizofosfolipide PC 18:0, PC 16:1, PC 18:1, PC 18:2, butenil carnitinele, precum și galactozil ceramidele C18:1/24:1, tromboxani și pregnenolone.

CAPITOLUL V. ANALIZA PROFILULUI METABOLOMIC URINAR, NEȚINTIT ȘI ȚINTIT, DIFERENȚIAT LA PACIENȚII CU HIPERPLAZII ȘI CANCER DE PROSTATĂ

Scopul acestui studiu a fost analiza metabolomică urinară, de la o parte din pacienții investigați anterior, pentru a face corelația cu biomarkerii serici.

Pacienți evaluați

În acest studiu au fost analizate un număr de 39 de probe de urină patologice provenind de la 4 loturi de pacienți, grupate similar cu probele de ser: lotul de 9 pacienți diagnosticați cu hiperplazie benignă de prostată (lot IV=H), lot de 12 pacienți cu cancer de prostată (probe recoltate înainte de biopsie= lot V=CB), lotul de 8 pacienți cu cancer confirmat de prostată (lot VI-CO) și 10 pacienți din lotul martor (lot III- MU).

Procesarea probelor de urină

Probele de urină de la cele 4 grupuri de pacienți au fost recoltate prin procedura standard, în recipiente sterile, în conformitate cu consimțământul informat al pacientului. Pentru analiza metabolomică, probele de urină au fost diluate cu metanol 98% în raport volumetric 1:5 (urină :metanol) pentru precipitarea proteinelor,

apoi au fost vortexate și centrifugate 5 minute la 3000 rpm. Supernatantul a fost colectat, filtrat prin filtre de 0.2 μm, analizat imediat sau păstrat la -20°C până la analiza metabolomică.

Analiza LC-ESI(+)-Q-TOF-MS

Extracții de 5 μl din fiecare supernatant au fost injectate pentru separarea lichidă cromatografică, folosind sistemul Thermo Scientific HPLC UltiMate 3000 echipat cu o pompă cuaternară Dionex UltiMate 3000 (UHPLC+ focused), coloana Acclaim C-18 (3 μm, 2.1x50 mm), autosampler și detector array fotodiodă Dionex UltiMate 3000.

Spectrometria de masă a fost realizată pe analizatorul Bruker Daltonics MaXis Impact Q-TOF în modul pozitiv de operare (ESI+).

Analiza statistică

Analiza Principalelor Componente - PCA (engl. Principal Component Analysis) a fost folosită pentru a discrimina probele normale (grup III) de probele patologice (IV-VI) de urină. Această analiză a fost realizată prin softul Profile Analysis (Bruker, Daltonics) precum și prin softul Unscrambler 10.X.

Analiza PCA s-a aplicat atât pentru a verifica omogenitatea fiecărui grup de pacienți (pe baza amprentei cromatografice, a valorilor m/z și a compoziției asemănătoare) dar și pentru a identifica diferențele între grupurile de pacienți III-VI.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Determinarea amprentei specifice LC-MS a probelor de urină de la martori și pacienți cu hiperplazii și cancer de prostată (grupuri CB, CO)

S-a realizat separarea și identificarea moleculelor din urină de la pacienții martor (M), comparativ cu pacienții patologici: hiperplazie (H), cancer-biopsie (CB), cancer-operativ (CO) și preluarea cromatogramelor BPC și Dissect pentru fiecare grup de studiu în parte.

Din analiza comparativă a profilelor cromatografice la probele de urină martori și pacienți din grupurile H, CB, CO, se constată următoarele:

- Profilele generale la martori sunt mai încălcate în molecule și mai heterogene, comparativ cu probele de la grupurile patologice, fiind reprezentate de mai multe molecule (180-200 molecule).
- Probele au fost caracterizate prin grupuri de molecule majore în intervalele 4.5-4.8 min, 9.2-9.4 min, 10.1-10.2 min, 11.1-11.7, 12.5, 16-17.1 min
- Valorile m/z specifice oscilează între m/z= 114 și m/z=425. Nu s-au identificat molecule majore cu mase mai mari, deși ca molecule minore se pot identifica valori m/z cuprinse între 450-780.

Analiză biostatistică nețintită de tip PCA: evaluarea omogenității probelor din diferite grupuri și identificarea diferențelor între grupurile de pacienți și identificarea valorilor m/z care diferențiază probele

Prin analiza nețintită a probelor, utilizând softul Bruker-Profile Analysis bazat pe bucketuri statistice, s-au identificat grupuri bine conturate, precum și probe izolate.

Ca o concluzie a acestor procesuri statistice utilizând softul Unscrambler 10.X putem menționa:

1. Statistica bazat pe diferențe între valorile m/z, arată o bună omogenitate a valorilor m/z din grupul MU. Analiza PCA bidimensional și tridimensional evidențiază care sunt intervalele de timpi de retenție prin care se deosebesc probele din grupul M. Proba MU10 are valori semnificativ diferite față de probele MU1-9.

Statistica bazat pe diferențe între valorile ariilor peakurilor, cantitativă, arată valori diferite ale ariilor, subliniind faptul că diferențele cantitative sunt mai importante decât cele calitative în cazul acestui grup.

În acest caz se vede diferențe semnificative pentru proba MU1 în raport cu restul probelor.

2. Statistica bazat pe diferențe între valorile m/z, pentru grupul H arată o heterogenitate a valorilor m/z, probele H4, H6, H10 fiind semnificativ inferioare față de restul probelor.

Analiza comparativ PCA și PCR (Principal Component Regression) a evidențiat trei subgrupuri în cadrul probelor H: probele H4, H6, H10 constituie un subgrup cu valori mici ale m/z, în timp ce restul probelor, cu excepția lui H15, sunt mai omogene. Analiza clusterizării probelor arată o segregare, acestea pot fi considerate omogene. Statistica bazat pe diferențe între valorile ariilor peakurilor, cantitativă, evidențiază o omogenitate bună, cu valori ușor scăzute în cazul celor trei probe H4, H6, H10.

3. Statistica bazat pe diferențe între valorile m/z, pentru grupul CB arată o heterogenitate a valorilor m/z, probele CB2, CB3, CB14, CB16 și CB17, având valori semnificativ mai mari decât restul probelor. Analiza PCA bidimensional și tridimensional evidențiază care sunt intervalele de timpi de retenție prin care se deosebesc probele din grupul H (cu TR=13.1, 14.4 min).

4. Analiza clusterizării probelor arată o slabă segregare a probelor, acestea pot fi considerate omogene. Statistica bazată pe diferențe între valorile ariilor peakurilor, cantitativă, evidențiază o omogenitate bună, cu excepția probelor CB13 și CB14.

5. Statistica bazat pe diferențe între valorile m/z, pentru grupul CO arată o bună omogenitate a valorilor m/z. Analiza PCA bidimensional și tridimensional evidențiază care sunt intervalele de timpi de retenție prin care se deosebesc probele din grupul CO. Analiza clusterizării probelor arată o segregare a probelor marcate roșu (distanța max=10) față de restul probelor. Oricum probele pot fi considerate omogene. Statistica bazată pe diferențe între valorile ariilor peakurilor, cantitativă, evidențiază o omogenitate bună, cu excepția probelor CO22 și CO28, care au valori ușor crescute ale m/z.

Analiza metabolomică țintită: identificarea biomoleculor individuale din urină, specifice grupurilor de pacienți III-VI

- Moleculele 1,3,4,8 și 10 cresc semnificativ la loturile CB și CO și pot constitui buni candidați de a fi considerați biomarkeri reali de identificare a evoluției de la Hiperplazie la cancer de prostată - marcate **BOLD**
- Pentru a evidenția hiperplazia, sunt utile datele privind evoluția moleculelor pregnenolon sulfat, alfa-N-fenilacetil-L-glutamin (2-cetone), dihidrocortizol, tetrahidrocortizon (9-cetone), MG(18:3/0:0/0:0), prostaglandina D2, E2 (12-cetone) și L-triptofan, prolină, betaină, indoxil sulfat (14-cetone) și **acid N-fenilacetil piroglutamic, S-3-oxodecanoil cisteamină** (3-scădere).

- Evoluția gradată de la CB **și mai ales CO poate fi evidențiată de moleculele linoleil-carnitina** (11) și MG(20:3/0:0/0:0), (13)
- Acidul hipuric și guanozina (1) cresc semnificativ la CO, dar nu și la grupul CB
- Pregnenolon sulfatul (2) scade semnificativ la CO cât și la CB, comparativ cu M și H
- **Derivații carnitinelor cresc în toate cazurile la CO și CB**

CONCLUZII

1. După o aliniere manuală (Excel) a valorilor m/z în funcție de timpul de retenție, s-au identificat acele molecule care au avut peak-uri majore și repetabile la mai multe probe, cu arii superioare. Astfel au fost filtrate, din totaluri de peste 150 de molecule per probă, un număr de 23 molecule și apoi în final 14 molecule care au fost identificate prin baza de date HMDB.
2. A fost efectuată apoi analiza metabolomică **țintită (PCA, PCR, Cluster Analysis)**, pe cele 14 molecule identificate între cele patru grupuri M, H, CB și CO. Și s-a calculat media valorilor ariilor pentru fiecare din cele 14 molecule, pe fiecare grup de pacienți, reprezentând dinamica de creștere individuală a concentrației acestora, de la pacienții H, **la CB și CO, comparativ cu martorii.**
3. Moleculele acid hipuric, guanozina, acid N-fenilacetilpiroglutamic, S-3 oxodecanoil cisteamina, butenil carnitina, serotonina, acidul mevaloninc și acidul D-2-hidroxi-glutaric cresc semnificativ **și pot constitui buni candidați de a fi considerați biomarkeri reali de identificare a evoluției de la Hiperplazie la cancer de prostată.**
4. Pentru a evidenția un proces patologic, începând cu hiperplazia, considerăm că evoluția moleculelor Pregnenolon sulfat, Alfa-N-fenilacetil-L-glutamin și dihidrocortizol și tetrahidrocortizoneste de urmărit în continuare.
5. Evoluția gradată de la hiperplazie la CB **și mai ales CO poate fi evidențiată de moleculele linoleil-carnitina** (11) și MG(18:3/0:0/0:0), MG(0:0/18:3/0:0), prostaglandina D2, E2 (12).

Moleculele: acid hipuric, guanozina, acid N-fenilacetilpiroglutamic, S-3 oxodecanoil cisteamina, butenil carnitina, serotonina, acidul mevaloninc și acidul D-2-hidroxi-glutaric **cresc semnificativ și pot constitui buni candidați de a fi considerați biomarkeri reali de identificare a evoluției de la Hiperplazie la cancer de prostată.** Pentru a evidenția un proces patologic, începând cu hiperplazia, sunt utile datele privind evoluția moleculelor Pregnenolon sulfat, Alfa-N-fenilacetil-L-glutamin și dihidrocortizol și tetrahidrocortizon. Evoluția gradată de la hiperplazie la CB și mai ales CO poate fi evidențiată de moleculele linoleil-carnitina (11) și MG(18:3/0:0/0:0), MG(0:0/18:3/0:0), prostaglandina D2, E2 (12).

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

Pentru prima dată în România s-a realizat un studiu preliminar de metabolomică neintitacancerului de prostată și de identificare a unor biomarkeri-

candidat, în corelație cu antigenul PSA, și cu aplicabilitate practică în clinica oncologică.

Metodologia aplicată în cele trei studii include protocoale originale și/sau adaptate după metode internațional standardizate, atât la partea de pre-procesare a probelor, cât și la analiza LC-MS și interpretarea statistică a datelor.

În concluzie, apreciem că rezultatele obținute pot constitui un punct important de plecare în realizarea unei baze de date, pentru identificarea biomarkerilor specifici cancerului de prostată, prima de acest fel în România.