



**GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
Z ODDZIAŁEM MEDYCZYNY LABORATORYJNEJ**

Natalia Miękus

**Optymalizacja metod bioanalitycznych podczas oceny
potencjalnych biomarkerów nowotworów pochodzenia
neuroendokrynnego**

**Praca doktorska wykonana
w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego**

**Promotor pracy:
prof. dr hab. Tomasz Bączek**

Gdańsk 2015

Lepiej chyba pójść choćby kawałek dobrą drogą, niż zajść daleko, lecz źle.

Platon (427-347 p.n.e.)

SPIS TREŚCI

Spis treści.....	3
Spis publikacji, w których wykorzystano wyniki pracy doktorskiej	6
Streszczenie	7
<i>Abstract</i>	12
Skróty używane w tekście	16
I. Wstęp	20
1. Choroby nowotworowe jako jedne z najgroźniejszych chorób cywilizacyjnych	21
1.1. Problematyka chorób nowotworowych pochodzenia neuroendokrynnego u dorosłych i dzieci.....	21
2. Wybór strategii odkrywania potencjalnych, nowych biomarkerów	23
2.1. Poszukiwanie biomarkerów wśród substancji o charakterze białkowym – proteomika kliniczna	23
2.2. Fosfoproteom jako bogaty rezerwuar potencjalnych, nowych biomarkerów	24
2.3. Poszukiwanie nowych biomarkerów o budowie innej niż białka – analiza związków małowcząsteczkowych	26
3. Przygotowanie próbek biologicznych do analizy.....	27
3.1. Rodzaje próbek biologicznych	27
3.2. Schemat eksperymentu ukierunkowanego na poszukiwania nowych, potencjalnych biomarkerów chorób nowotworowych.....	27
3.3. Metody izolacji badanych związków z matrycy biologicznej.....	28
3.3.1. Ekstrakcja do fazy stałej (ang. <i>solid-phase extraction</i> , SPE)	28
3.3.2. Ekstrakcja ciecz-ciecz (ang. <i>liquid-liquid extraction</i> , LLE)	30
3.3.3. Inne metody izolacji	31
3.4. Metody wzbogacania analizowanych związków w materiale biologicznym ze szczególnym uwzględnieniem fosfoproteomiki	32
3.5. Analiza ilościowa	35
3.5.1. Znakowanie izotopowe w analizie proteomicznej	36
3.5.2. Analiza ilościowa nie wykorzystująca znakowania izotopowego	40
4. Popularne metody rozdzielania i detekcji składników próbki używane w celu poszukiwania potencjalnych, nowych biomarkerów	41
4.1. Jednokierunkowa elektroforeza żelowa w żelu poliakrylamidowym (ang. <i>one-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis</i> , 1D-PAGE)	41
4.2. Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (ang. <i>liquid chromatography-mass spectrometry</i> , LC-MS).....	42

4.3. Elektroforeza kapilarna sprzężona z detektorem spektrofotometrycznym UV/VIS (ang. <i>capillary electrophoresis coupled with UV/VIS detector, CE-UV/VIS</i>)	47
II. Cel pracy	48
III. Metodyka	51
1. Analiza proteomiczna guzów neuroendokrynych w celu oceny i poszukiwania potencjalnych, nowych, białkowych biomarkerów dla ich wczesnej detekcji	52
1.1. Odczynniki i aparatura.....	52
1.2. Grupa badana i kontrolna.....	53
1.3. Przygotowanie pierwotnych hodowli komórkowych guzów neuroendokrynych do badań proteomicznych oraz próbek kontrolnych	53
1.4. Wytrącanie i zagęszczanie białek do analizy	56
1.5. Rozdzielanie białek z zastosowaniem techniki 1D-PAGE	56
1.6. Trawienie białek i analiza za pomocą techniki LC-MS/MS	57
2. Fosfoproteomika w nowotworach endokrynych trzustki	59
2.1. Odczynniki i aparatura.....	59
2.1. Przygotowanie próbek wzorcowych do analizy LC-MS/MS	60
2.1.1. Redukcja, alkilacja i trawienie białek.....	60
2.1.2. Znakowanie stabilnymi izotopami (reduktywna aminacja).....	60
2.1.3. Wzbogacanie frakcji fosfobiałkowej.....	60
2.2. Pochodzenie próbek biologicznych użytych do analiz.....	63
2.2.1. Metoda wywoływania ostrego zapalenia trzustki na modelach zwierzęcych.....	63
2.2.2. Ekstrakcja białek z próbek tkanek mysiej trzustki oraz późniejsze ich trawienie.....	63
2.2.3. Zastosowanie zoptymalizowanego protokołu znakowania izotopowego dla próbek biologicznych	64
2.2.4. Analiza LC-MS/MS	66
2.2.5. Klasyfikacja białek ze względu na funkcje	67
3. Optymalizacja metody micelarnej elektrokinetycznej chromatografii podczas analizy związków małowcząsteczkowych (amin biogennych) z moczu pacjentów z guzami litymi pochodzenia neuroendokrynego wieku dziecięcego.....	68
3.1. Odczynniki, aparatura i parametry rozdzielania elektroforetycznego	68
3.2. Przygotowanie roztworów wzorcowych	69
3.3. Materiał badany i jego przygotowanie do analizy.....	69
3.3.1. Przygotowanie próbek moczu	70
3.4. Walidacja metody micelarnej elektrokinetycznej chromatografii kapilarnej z detekcją spektrofotometryczną (MEKC-UV/VIS)	70
IV. Wyniki i dyskusja	71

1. Analiza proteomiczna guzów neuroendokrynych z zastosowaniem techniki 1D-PAGE oraz LC-MS/MS.....	72
2. Porównawcza analiza fosfoproteomiczna zdrowych tkanek mysich z tymi, w których wywołano ostre zapalenie trzustki	77
2.1. Optymalizacja reduktywnej aminacji	78
2.2. Optymalizacja etapu wzbogacania fosfoproteomu.....	81
2.3. Próbkki biologiczne	85
3. Analiza związków małowcząsteczkowych (amin biogennych) w próbkach biologicznych nowotworów pochodzenia neuroendokrynego z użyciem techniki MEKC-UV/VIS	88
3.1. Optymalizacja metody rozdzielania amin biogennych z użyciem micelarnej elektrokinetycznej chromatografii z detekcją UV/VIS (MEKC-UV/VIS)	90
3.1.1. Opracowanie optymalnego składu buforu separacyjnego.....	90
3.1.2. Optymalizacja składu próbki do analizy	95
3.1.3. Ustalenie parametrów aparaturowych	96
3.1.3.1. Parametry kapilary	96
3.1.3.2. Długość fali UV/VIS	96
3.2. Optymalizacja przygotowania próbek do analizy.....	97
3.3. Walidacja metody analitycznej.....	98
3.4. Zastosowanie opracowanej metody MEKC-UV/VIS podczas analizy próbek biologicznych	102
V. Wnioski.....	107
VI. Literatura.....	111
Podziękowania.....	121

Spis publikacji, w których wykorzystano wyniki pracy doktorskiej

- [1] N. Miękus, T. Bączek, Phosphoproteomics as a promising tool for broadening the analysis of clinical samples and for the fight against cancer disease, *Current Pharmaceutical Analysis*, 10 (2014) 223-229.
- [2] N. Miękus, A. Plenis, P. Kowalski, I. Olędzka, K. Orlikowska, T. Bączek, The evaluation of serotonin and 5-hydroxyindole-3-acetic acid levels in serum and urine samples from patients with neuroendocrine tumors, *Journal of Molecular Biomarkers and Diagnosis*, 5 (2014) 120.
- [3] N. Miękus, I. Olędzka, A. Plenis, Z. Woźniak, A. Lewczuk, P. Koszałka, B. Seroczyńska, T. Bączek, Gel electrophoretic separation of proteins from cultured neuroendocrine tumor cell lines, *Molecular Medicine Reports*, 11 (2015) 1407-1415.
- [4] N. Miękus, P. Kowalski, I. Olędzka, A. Plenis, E. Bień, A. Miękus, M. Krawczyk, E. Adamkiewicz-Drożyńska, T. Bączek, Cyclodextrin-modified MEKC method for quantification of selected acidic metabolites of catecholamines in the presence of various biogenic amines. Application to diagnosis of neuroblastoma, *Journal of Chromatography B*, w druku.

STRESZCZENIE

Niepełne informacje na temat przyczyn wystąpienia choroby oraz cząsteczek, które mogą brać udział w jej rozwoju sprawiają, że coraz więcej schorzeń przyjmuje rangę chorób cywilizacyjnych. W tej grupie choroby nowotworowe należą do jednych z najniebezpieczniejszych plag dzisiejszych czasów. Szczególnie ważna jest analiza zaburzonej w procesie kancerogenezy homeostazy w wydzielaniu związków mało- lub wielkocząsteczkowych, ponieważ zdobycie wiedzy o nieprawidłowo wydzielanych cząsteczkach w czasie choroby – wytypowanie biomarkerów chorób nowotworowych – w znacznym stopniu przyczyniłoby się do usprawnienia narzędzi do wczesnej diagnozy nowotworów, monitorowania przebiegu czy ustalania optymalnego, spersonalizowanego schematu leczenia pacjentów. Obecnie coraz więcej badań porusza niezmiernie istotne zagadnienia związane z usprawnianiem technik bioanalitycznych służących do analizy próbek biologicznych pochodzących od chorych cierpiących na nowotwory. Wymagają one wciąż intensywnej pracy i optymalizacji, aby sprostać oczekiwaniom dzisiejszych czasów, gdzie prostota wykonania, niskie koszty i krótki czas potrzebny na przeprowadzenie analizy, znajdują się w czołówce wymagań, którym powinny sprostać dostępne metody bioanalityczne.

Zagadnienia poruszane w prezentowanej pracy doktorskiej zmierzają właśnie do opracowania nowych lub ulepszenia już istniejących metod bioanalitycznych, które zapewniłyby szybką, bezbłędną i precyzyjną analizę związków mało- i wielkocząsteczkowych z materiałów biologicznych, które to związki mogłyby pretendować do roli nowych, potencjalnych biomarkerów wybranych chorób nowotworowych pochodzenia neuroendokrynnego.

W prezentowanej pracy korzystano z trzech technik umożliwiających poszukiwanie biomarkerów w materiałach biologicznych. I tak, pierwszym narzędziem była elektroforeza żelowa w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (1D-PAGE) sprzężona z tandemową spektrometrią mas (MS/MS). Porównawczą analizą całkowitego składu białkowego (proteomu) objęto grupę rzadkich nowotworów – guzów neuroendokrynnych (ang. *neuroendocrine tumor*, NET). Optymalizowaniu poddano każdy etap platformy technologicznej – od przygotowania próbki do analizy 1D-PAGE, poprzez dobranie odpowiedniego stężenia poliakrylamidu w żelu, wybranie odpowiednio czulej metody barwienia, aż do detekcji z użyciem spektrometrii mas. Zoptymalizowana procedura analizy proteomicznej pozwoliła na wyłonienie potencjalnych kandydatów na biomarkery guzów NET. Co więcej, otworzyła nowe możliwości w kierunku określania fenotypu guza NET (odpowiednio wydzielającego i niewydzielającego), przez co może przyczynić się do postępu

terapii spersonalizowanej. Opracowana platforma technologiczna sprawdzona została podczas analizy jakościowej próbek guzów NET. Interesujące profile białkowe uzyskano dla wydzielających guzów NET trzustki. Dlatego też, druga część doktoratu skoncentrowała się właśnie na nowotworach obejmujących trzustkę.

Badania proteomiczne stanowią bardzo szeroką dyscyplinę, dążącą do analizy wszystkich białek obecnych w badanym materiale. Dlatego też, często białka istotne klinicznie – które zwykle występują w niskim stężeniu w próbce – są „zasłaniane” przez te bardziej stężone. Dlatego druga część prac doktorskiej zawęziła pole poszukiwania biomarkerów nowotworów trzustki pochodzenia neuroendokrynnego do bogatego w potencjalnie istotne klinicznie cząsteczki podzbioru, jakim jest fosfoproteom. Za uwzględnieniem tej ważnej modyfikacji potranslacyjnej jako istotnej w nowotworach trzustki pochodzenia neuroendokrynnego, przemawiał dobrze udokumentowany fakt, że zaburzenia szlaków sygnalizacyjnych angażujących fosfobiałka stanowią jedną z możliwych przyczyn rozwoju nowotworów trzustki. Analizą objęto trudny do badań materiał, z uwagi na skomplikowaną procedurę izolacji analitów z matrycy biologicznej, a mianowicie tkankę. Badania przeprowadzone w drugiej części pracy doktorskiej miały na celu wyłonienie potencjalnych, nowych biomarkerów ostrego zapalenia trzustki, który to czynnik w dużej mierze może przyczyniać się do rozwoju nowotworów pochodzenia neuroendokrynnego tego narządu. Porównawcza, ilościowa analiza fosfoproteomiczna, wykorzystująca technikę LC-MS/MS, została przeprowadzona dla tkanek otrzymanych od zdrowych myszy lub takich, u których wywołano ostre zapalenie trzustki. Dzięki specjalistycznym bazom danych, posegregowano otrzymane fosfobiałka ze względu na ich funkcje. Dowiedziono, że istnieją różnice w aktywności specyficznych kinaz w czasie ostrego zapalenia trzustki w porównaniu do ich aktywności w tkankach zdrowych.

Z uwagi na fakt, że guzy wywodzące się z komórek cewy nerwowej (nowotwory pochodzenia neuroendokrynnego), mogą wydzielać różne substancje, nie tylko o strukturze białkowej czy fosfobiałkowej, ale również małowcząsteczkowej (jak na przykład aminy biogenne), trzecia część pracy doktorskiej skoncentrowała się na opracowaniu metody opartej na technice micelarnej elektrokinetycznej chromatografii z detektorem UV/VIS z matrycą diodową (MEKC-UV/VIS) i zastosowanie jej do analizy panelu biomarkerów – związków małowcząsteczkowych – w łatwo dostępnych płynach ustrojowych człowieka. Temat został podjęty po przestudiowaniu literatury pod kątem dostępności i użytku dotychczas stosowanych biomarkerów z łatwo dostępnych płynów ustrojowych (mocz, surowica), które umożliwiają wczesną diagnozę wielu schorzeń, w tym chorób nowotworowych pochodzenia

neuroendokrynnego. Obecnie brak wystarczająco czułego i specyficznego, pojedynczego biomarkera, aby bezbłędnie wykryć proces patologiczny toczący się w organizmie. Dlatego też prezentowane w pracy doktorskiej eksperymenty, skupiały się na optymalizacji metody MEKC do jednoczesnej analizy siedmiu wybranych związków z grupy amin biogennych (adrenalina, noradrenalina, dopamina, lewodopa, L-tyrozyna, L-tryptofan, serotonina) oraz ich trzech ważnych metabolitów [kwas homowanilinowy (HVA), kwas wanilinomigdałowy (VMA) oraz kwas dihydroksyfenylooctowy (DOPAC)] z moczu. Opracowano wystarczająco czułą i specyficzną metodę MEKC-UV/VIS, która pozwoliła na analizę dziesięciu wybranych związków w krótkim czasie z uzyskaniem limitów detekcji poniżej 1 µg/mL. Zoptymalizowana i zwalidowana metoda została następnie z powodzeniem zastosowana do ilościowej analizy porównawczej wydzielenia HVA, VMA oraz DOPAC w 24-godzinnej zbiorce moczu osób zdrowych z poziomami uzyskanymi w czasie analizy próbek moczu pacjentów ze zdiagnozowanymi guzami litymi wieku dziecięcego pochodzenia neuroendokrynnego, takimi jak nerwiak zarodkowy współczulny (łac. *neuroblastoma*, NB; ang. *neuroblastoma*) oraz z barwnikowym neuroektodermalnym nowotworem wieku dziecięcego (ang. *melanotic neuroectodermal tumor of infancy*, MNTI) i nowotworem podścieliskowym przewodu pokarmowego (ang. *gastrointestinal stromal tumor*, GIST).

We wszystkich częściach pracy doktorskiej stosowano różnorodne specjalistyczne techniki przygotowania materiału do analizy (ekstrakcja do fazy stałej, ekstrakcja ciecz-ciecz, wzbogacanie analitów w matrycy, oczyszczanie próbki przed właściwą analizą), rozdzielania składników próbki (przy użyciu jednokierunkowej elektroforezy żelowej w żelu poliakrylamidowym lub wysokosprawnej chromatografii cieczowej czy micelarnej elektrokinetycznej chromatografii) oraz detekcji analitów (tandemowa spektrometria mas, detektor spektrofotometryczny). Każdy z etapów analizy poddano szczegółowej optymalizacji, której najważniejsze etapy opisano w prezentowanej pracy.

Badanie zaburzonej homeostazy w wydzielaniu specyficznych białek, fosfobiałek czy związków o innej budowie (takich jak związki małowcząsteczkowe z grupy amin biogennych) podczas kancerogenezy pozwoliło na wytypowanie nowych, potencjalnych cząsteczek, których dalsza, pogłębiona analiza może okazać się pomocna w weryfikacji ich przydatności jako przypuszczalnych biomarkerów badanych typów nowotworów i schorzeń. Biomarkery te mogą być dalej użyteczne w wykryciu lub monitorowaniu przebiegu choroby albo ułatwić spersonalizowanie terapii dla pacjentów.

Zarówno badania nad białkami i fosfobiałkami, jak również nad związkami z grupy amin biogennych, potwierdziły również hipotezę, że pojedyncze cząsteczki, typowane jako

biomarkery, często cechują się niewystarczającą specyficnością i czułością. Optymalnym wyjściem jest więc śledzenie zmian w wydzielaniu wielu cząsteczek (stosowanie panelu biomarkerów) do oceny stanu patofizjologicznego organizmu, szczególnie jeżeli chodzi o szybką i trafną diagnozę chorób nowotworowych pochodzenia neuroendokrynnego.

ABSTRACT

Nowadays, the knowledge on the system biology of many diseases is still not sufficient. That leads to increased number of identified cancers and gives to them the status of civilization disease. The unbalanced secretion of small and large molecules during carcinogenesis should be deeply studied since those compounds could be typed as potential, new cancer biomarkers for early detection and monitoring of the disease. Still, there is a need to develop novel or to improve already existed bioanalytical methods for detection of those compounds in biological fluids obtained from patients suffering from cancer.

Therefore, the main aim of presented doctoral thesis was to develop and optimize bioanalytical methods for precise, fast and unbiased analysis of new, potential neuroendocrine neoplasm biomarkers. To achieve the main goal, three approaches for the biomarkers searching were used.

First of all, proteomics tools were applied to study differentially secreted proteins by a group of rare neuroendocrine tumors (NET). Each of the step from experimental workflow for the analysis of the supernatants from tumor cell cultures was optimized. The set of experiments composed of one-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (1D-PAGE) separation and with tandem mass spectrometry (MS/MS) detection were applied to analyze the supernatants from above NET cell cultures. Samples were obtained from patients suffering from phenotypically different NET. Owing to the optimized experimental workflow, the division of analyzed samples into two groups – tumor and control samples – was achieved. Moreover, the samples were divided taking into account the phenotype of the cancer (if it was able or unable to secrete specific compounds to surrounding environment). Interesting proteins' profile was obtained for the secreting NET of pancreas, therefore, second part of the doctoral thesis was focused on the pancreatic tumors.

Due to the fact, that proteomic study is a large scale approach, the second part of the doctoral thesis was focused on the rich in potential cancer biomarkers subproteome – phosphoproteome. This part consisted of qualitative and quantitative analysis of the phosphoproteomes extracted from the mice pancreas tissues. Phosphoproteomics was chosen since phosphorylation is the most common post-translational modification of the proteins and could have a strong influence on the biological functions of proteins. Moreover, it is documented that development of pancreatic cancer of neuroendocrine origin involves disturbance in phosphoproteins' signaling pathways. For the purpose of this study, the sophisticated bioanalytical tools were optimized: started from the optimization of the extraction of the proteins from the biological material, through the implementation of the most appropriate phosphopeptides' enrichment strategy, sample clean-up and labeling for

quantification and finishing with the phosphoproteins' mass spectrometric detection and database searching. Further, optimized protocol was successfully applied to analyze the real samples derived from mice tissues. Animals were healthy or with induced pancreatitis, which is believed to be strongly related to pancreatic cancer of neuroendocrine origin development. Several differentially regulated kinases during the inflammation were listed and their role in the cell biology was described using Gene Ontology database. It was revealed that some of the kinases are hyperactive or hypoactive during pancreatitis and the study about their role in pancreas cancer development is now continued.

Due to the fact that cancers originated from neural tube (neuroendocrine tumors) could secrete not only proteins and phosphoproteins but also small molecules (for example biogenic amines), the third part of the thesis aimed to optimize the method based on micellar electrokinetic chromatography (MEKC) with spectrophotometric detection (UV/VIS) for the analysis of small molecules (biogenic amines) from urine. Nowadays, running the analysis of only one biomarker of the disease [for example for homovanillic acid (HVA) or vanillylmandelic acid (VMA)] alone is not sufficient to confirm the disease or to monitor its progression and always several other tests – often more invasive and not easily accessible – should be performed. Therefore, in the last presented part of the thesis, the aim was to optimize and validate MEKC method for simultaneous analysis of ten most relevant compounds from the group of biogenic amines or their metabolites [adrenalin, noradrenalin, dopamine, tryptophan, levodopa, tyrosine, serotonin, homovanillic acid (HVA), vanillylmandelic acid (VMA) and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)]. Various physicochemical properties of studied analytes made the task complicated but, in here, satisfactory separation of ten small molecules was achieved. Moreover, the elaborated MEKC-UV/VIS method allowed their detection in biological samples at concentration below 1 µg/mL. Optimized and validated method was applied to analyze the 24-hour urine samples obtained from patients suffering from solid neoplasms of childhood and infancy of neuroendocrine origin – neuroblastoma (NB), and other tumors such as melanotic neuroectodermal tumor of infancy (MNTI) and gastrointestinal stromal tumor (GIST). The comparison of HVA, VMA and DOPAC concentrations in healthy urine with the concentration in NB, MNTI, GIST patients' urine samples was made.

The data obtained during the optimization of commonly used strategies for biomarker study (proteomics, phosphoproteomics and small molecules study) confirmed that there are many not described yet compounds secreted during the pathological stage of the organism that could be detected while analyzing them from the easy accessible body fluids, tissues or from

cell cultures. The use of optimized experimental platforms allowed to develop new biomarker searching strategies or to improve already existed approaches. That could be the next step towards personalized medicine. Moreover, diagnosis of the early stage of the cancers of neuroendocrine origin could be beneficial for the clinicians. Last but not the least, the hypothesis of the thesis was proven, since it came out that one biomarker is sometimes not sensitive enough to detect or monitor cancer. Preferably, panels of biomarkers for neuroendocrine neoplasms should be monitored to correctly reflect the on-going pathology within the organism.

Skróty używane w tekście

A – *adrenalin*; adrenalina

ACN – *acetonitrile*; acetonitryl

ACX – *strong anion exchange*; wymienniki jonowe anionowe

AUC – *area under the curve*; pole powierzchni pod krzywą

BA – *biogenic amines*; aminy biogenne

BGE – *background electrolyte*; bufor separacyjny

boraks – *sodium tetraborate decahydrate*; dziesięciowodny czteroboran sodu

BSA – *bovine serum albumin*; albumina surowicy bydłęcej

CAD – *collisionally activated dissociation*; fragmentacja aktywowana kolizyjnie

α -CD – *alpha-cyclodextrin*; alfacyklodekstryna

CE – *capillary electrophoresis*; elektroforeza kapilarna

CH₂O, CD₂O, ¹³CD₂O – izotopy formaldehydu zawierające odpowiednio ¹²C i ¹H, deuter (D) lub ¹³C i deuter

CID – *collisionally induced dissociation*; fragmentacja indukowana kolizyjnie

CNIO – Spanish National Cancer Research Centre; Hiszpańskie Narodowe Centrum Badań nad Rakiem

DA – *dopamine*; dopamina

DAD – *diode array detector*; detektor UV/VIS z matrycą diodową

DDA – *data dependent analysis*; analiza zależna od danych

2,5-DHB – *2,5-dihydroxybenzoic acid*; kwas 2,5-dihydrobenzoesowy

3,4-DHBA – *3,4-dihydroxybenzoic acid*; kwas 3,4-dihydroksybenoesowy

DMSO – *dimethyl sulfoxide*; dimetylosulfotlenek

DOPAC – *3,4-dihydroxyphenylacetic acid*; kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy

1D-PAGE – *one-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*; jednokierunkowa elektroforeza żelowa w żelu poliakrylamidowym

2D-PAGE – *two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*; dwukierunkowa elektroforeza żelowa w żelu poliakrylamidowym

DTT – *dithiothreitol*; ditiotreitól

ECD – *electron capture dissociation*; rozpad z wychwytem elektronów

EGF – *epidermal growth factor*; czynnik wzrostu naskórka

EIA – *enzymatic immunoassay*; enzymatyczne testy immunologiczne

eIF4E – *eukaryotic translation initiation factor 4E*; eukariotyczny czynnik inicjujący translację 4E

EOF – *electroosmotic flow*; objętościowy przepływ cieczy w kapilarze pod wpływem pola elektrycznego

ESI – *electrospray*; jonizacja przez rozpylanie w polu elektrycznym

FA – *formic acid*; kwas mrówkowy

FASP – *filter aided sample preparation*; przygotowanie próbki wspomagane filtracją

FDA – *Food and Drug Administration*; Agencja Żywności i Leków

FBS – *fetal bovine serum*; płodowa surowica bydłęca

GC – *gas chromatography*; chromatografia gazowa

GEP-NET – *gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor*; guz neuroendokryny układu żołądkowo-jelitowego-trzustkowego

GIST – *gastrointestinal stromal tumor*; nowotwór podścieliskowy przewodu pokarmowego

GO – *gene ontology*; projekt bioinformatyczny, zawiera całą dotychczasową wiedzę o genach

GUMed – Gdański Uniwersytet Medyczny

HCl – *hydrochloric acid*; kwas chlorowodorowy

hEGF – *human epidermal growth factor*; ludzki nabłonkowy czynnik wzrostu

HEPES – *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*; kwas 2-[4-(2-hydroksyetylo)piperaz-1-ynoetanosulfonowy

5-HIAA – *5-hydroxyindoleacetic acid*; kwas 5-hydroksyindoloocetowy

5-HT – *serotonin*; serotonina

5-HTP – *5-hydroxytryptophan*; 5-hydroksytryptofan

HUGO – *Human Genome Project*; Projekt poznania ludzkiego genomu

HUPO – *Human Proteome Organization*; Organizacja proteomu człowieka

HVA – *homovanilic acid*; kwas homowanilinowy

IAA – *iodoacetamide*; iodoacetamid

IARC – *The International Agency for Research on Cancer*; Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem

ICAT – *isotope coded affinity tags*; metoda znakowania białek aminokwasami z wbudowanym izotopem

ICH – *International Conference on Harmonization*; Międzynarodowa Konferencja ds. Harmonizacji

IgG – *immunoglobulin G*; immunoglobulina G

IMAC – *immobilized metal affinity chromatography*; chromatografia z matrycą z unieruchomionymi jonami metali

IS – *internal standard*; wzorzec wewnętrzny

iTRAQ – *isobaric tags for relative and absolute quantification*; znaczniki izobaryczne w celu względnej i bezwzględnej analizy ilościowej

KCl – *potassium chloride*; chlorek potasu

KO – *knock-out*; myszy z delecją w genie/genach; organizmy modyfikowane genetycznie

LC-MS – *liquid chromatography-mass spectrometry*; wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrem mas

LC-MS/MS – *liquid chromatography-tandem mass spectrometry*; chromatografia cieczowa sprzężona z tandemowym spektrometrem mas

L-DOPA – *levodopa*; lewodopa

LLE – *liquid-liquid extraction*; ekstrakcja ciecz-ciecz

LLME – *liquid-liquid microextraction*; mikro-ekstrakcja ciecz-ciecz

LOD – *limit of determination*; granica wykrywalności

LOQ – *limit of quantification*; granica oznaczalności

LTQ – *linear trap quadropole*; kwadropolowa liniowa pułapka jonowa

L-Tryp – *L-tryptophan*; L-tryptofan

L-Tyr – *L-tyrosine*; L-tyrozyna

med. – *medium*; pożywka

MEKC – *micellar electrokinetic chromatography*; micelarna elektrokinetyczna chromatografia

MIP – *molecularly imprinted polymers*; polimery z nadrukiem cząsteczkowym

Mnk1 – *mitogen-activated protein kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 1*; kinaza białkowa aktywowana mitogenami 1

MNTI – *melanotic neuroectodermal tumor of infancy*; neuroektodermalny nowotwór wieku dziecięcego

MRI – *magnetic resonance imaging*; rezonans magnetyczny

MS/MS – *tandem mass spectrometry*; tandemowy spektrometr mas

MW – *molecular weight*; masa cząsteczkowa

NA – *noradrenalin*; noradrenalina

NaCl – *sodium chloride*; chlorek sodu

NaBH₃CN, NaBD₃CN – izotopy cyjanoborowodoru sodowego zawierające odpowiednio wodór lub deuter

Na₂HPO₄ – *disodium phosphate*; wodorofosforan sodu
NaH₂PO₄ – *monosodium phosphate*; dwuwodorofosforan sodu,
NaOH – *sodium hydroxide*; wodorotlenek sodu
NB – *neuroblastoma*; nerwiak zarodkowy współczulny
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*; Narodowe Centrum Informacji Biotechnologicznej
NET – *neuroendocrine tumors*; guzy neuroendokrynne
NET sup. FBS – Próbki NET supernatant z dodatkiem FBS
NET sup. bez FBS – Próbki NET supernatant bez dodatku FBS
NET med. FBS – NET pożywka zawierająca FBS
NET med. bez FBS – NET pożywka bezsurowicza
NT – *not treated*; nie leczony
PET – *positron emission tomography*; pozytronowa tomografia emisyjna
pK_a – miara mocy kwasu; ujemny logarytm dziesiętny ze stałej dysocjacji kwasu
PTMs – *post-translational modifications*; modyfikacje potranslacyjne
RP – *reversed phase*; odwrócony układ faz
SC – *spectra counting*; zliczanie widm fragmentacyjnych MS/MS
SCX – *strong cation exchange*; wymienniki jonowe kationowe
SDS – *sodium dodecyl sulfate*; dodecylosiarczan sodu
SILAC – *stable isotope labeling by amino acids in cell cultures*; znakowanie izotopowe aminokwasów w hodowlach komórkowych
SPE – *solid-phase extraction*; ekstrakcja do fazy stałej
SPME – *solid-phase microextraction*; mikroekstrakcja do fazy stałej
sup. – *supernatant*; roztwór z nad hodowli komórkowych
TEAB – *tetraethylammonium bromide*; bromek trietyloaminy
TFA – *trifluoroacetic acid*; kwas trifluorooctowy
TIC – *total ion chromatogram*; chromatogram całkowitego prądu jonowego
TiO₂ – *titanium dioxide*; tlenek tytanu (IV)
TLC – *thin layer chromatography*; chromatografia cienkowarstwowa
TNBC – *triple-negative breast cancer*; potrójnie negatywny rak piersi
UV/VIS – *ultraviolet-visible*; zakres światła widzialnego i bliskiego ultrafioletu
VMA – *vanillylmandelic acid*; kwas wanilinomigdałowy
WT – *wild type*; myszy dzikiego typu; typowa, reprezentatywna, zdrowa forma organizmu

I. WSTĘP

1. Choroby nowotworowe jako jedne z najgroźniejszych chorób cywilizacyjnych

Mimo znacznego postępu, poczynionego w kierunku zrozumienia podstaw molekularnych najgroźniejszych chorób cywilizacyjnych, takich jak choroby nowotworowe, wciąż wiedza o ich patogenezie i rozwoju jest niewystarczająca. Z danych Międzynarodowej Agencji ds. Badań nad Rakiem (ang. *The International Agency for Research on Cancer, IARC*) z 2012 roku odnotowano 14,1 mln nowych zachorowań na nowotwory, zaś 8,2 mln pacjentów zmarło z powodu choroby nowotworowej. Dane te są tym bardziej niepokojące, gdy weźmie się pod uwagę statystyki poprzednich lat. Przykładowo, w roku 2008 zarejestrowano 12,7 mln nowych przypadków, zaś śmiertelne okazało się 7,6 mln zachorowań [1].

Do najczęściej spotykanych nowotworów należą te rozwijające się w płucach, piersiach oraz jelicie grubym, a najwyższą śmiertelnością charakteryzują się nowotwory płuc, wątroby oraz żołądka. Odnotowanie większej zapadalności na chorobę nowotworową jest spowodowane w dużym stopniu globalnym wydłużeniem długości życia, stąd też starzeniem się społeczeństwa. Rozwój technik diagnostycznych, a także wzrost świadomości społeczeństwa, również przyczynił się do wzrostu wykrywalności tej groźnej choroby cywilizacyjnej XXI wieku. Niemniej wciąż większość diagnoz wykonywana jest zbyt późno.

Te niepokojące dane skłaniają badaczy do zwielokrotnienia starań w kierunku lepszego zrozumienia biologii nowotworów, co przyczyniłoby się do polepszenia efektywności wykrywania, monitorowania przebiegu i leczenia choroby, a co za tym idzie – polepszenia rokowań pacjentów.

1.1. Problematyka chorób nowotworowych pochodzenia neuroendokrynnego u dorosłych i dzieci

W dzisiejszych czasach pojawia się trend zgłębiania tematów, w których przeważają znaki zapytania. I tak, firmy farmaceutyczne zaczynają zlecać badania kliniczne nad nowymi lekami już nie dla schorzeń typu: cukrzyca czy nadciśnienie tętnicze, ale właśnie w obrębie chorób nowotworowych. Naukowcy zaś badają preferencyjnie rzadkie nowotwory, których diagnoza jest niezmiernie kłopotliwa dla klinicystów z powodu niecharakterystycznych objawów guza. Najczęściej guzy rzadkie wykrywane są już w stadium wysokiego zaawansowania; często dopiero pośmiertnie.

Do takich właśnie guzów należą nowotwory neuroendokrynnego (ang. *neuroendocrine tumors*, NET). Stanowią one heterogenną grupę nowotworów ze wspólnym pochodzeniem z komórek rozlanego układu neuroendokrynnego. Wykrywalność szacuje się na 30 przypadków

na 1 000 000 mieszkańców [2]. Mogą rozwijać się niemal we wszystkich częściach ciała, niemniej uwaga klinicyistów skierowana jest w stronę żołądkowo-jelitowo-trzustkowych guzów neuroendokrynych (ang. *gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor*, GEP-NET) [2,3]. Stanowią one 70% wszystkich guzów NET, niemniej obserwowany jest wzrost ich występowania, a z uwagi na niecharakterystyczne objawy kliniczne oraz zróżnicowany przebieg rozwoju guza, są one prawdziwym problemem dla klinicyistów [2-4]. Ich diagnoza we wczesnym stadium jest bardzo trudna; większość identyfikacji następuje w terminalnym stadium rozwoju nowotworu lub już pośmiertnie. Guzy neuroendokryne to guzy pochodzenia nabłonkowego wywodzące się z pierwotnej neuroektodermi [5]. Fenotypowo różnicuje się je pod względem zdolności do produkcji i wydzielania substancji biologicznie czynnych. Szereg z wydzielanych przez te guzy substancji został już zidentyfikowany (np. gastryna, serotonina, wazoaktywny peptyd jelitowy), a ich efekty biologiczne są dobrze udokumentowane. Część z nich (np. chromogranina A) ma udowodnione znaczenie diagnostyczne jako marker progresji choroby [2,6]. Guzy neuroendokryne są zdolne również do nabywania oraz tracenia zdolności do wydzielania substancji czynnych w trakcie trwania choroby, najprawdopodobniej z powodu zmian zachodzących w komórkach nowotworu wraz z przerzutowaniem. Nie wiadomo jednak, jakie procesy biologiczne odpowiadają za aktywność wydzielniczą guzów neuroendokrynych, ani też jakie cząsteczki mają kluczową rolę jako przełączniki molekularne włączające wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne odpowiedzialne za aktywację wydzielania. Tak zróżnicowany charakter guzów NET, niespecyficzne objawy kliniczne oraz zbyt późna wykrywalność spowodowały nacisk na rozwój metod dodatkowych, pomocnych we wczesnej diagnostyce i monitorowaniu rozwoju guza. Szczególnie uwaga naukowców w ostatnich latach nakierowana jest na obszar nowotworów neuroendokrynych trzustki u dorosłych, gdyż są one – obok rakowiaków – jednymi z najczęstszych z guzów NET [3]. Spośród nowotworów neuroendokrynych trzustki można wyróżnić nieczynne i czynne hormonalnie. Pierwsze z nich stanowią większość – bo aż 60% wszystkich guzów NET trzustki. Są niezmiernie kłopotliwe do wykrycia z uwagi na brak manifestacji objawów nadmiernego wydzielania substancji biologicznie czynnych. Z tego względu wykrywane są najczęściej w późnym stadium zaawansowania choroby. Z czynnych hormonalnie guzów NET trzustki najczęstsze to *insulinoma* i *gastrinoma*. Szczególną złośliwością (ocenianą na 40-80%) cechuje się *gastrinoma*, gdyż w momencie rozpoznania tego rodzaju guza, stwierdza się już przerzuty do wątroby i węzłów chłonnych u wielu chorych [2]. Spośród innych, ważnych nowotworów NET, ale występujących u dzieci, można wymienić takie jak nerwiak zarodkowy współczulny, zwany (z łaciny) też jako

neuroblastoma (NB). Jest to jeden z najczęstszych guzów litych okresu dziecięcego, szczególnie wśród dzieci do piątego roku życia [7,8]. Jego obraz kliniczny, dynamika rozwoju i stopień nasilenia objawów jest często zróżnicowany. Obecnie wykonywane testy diagnostyczne są niespecyficzne, trudnodostępne albo ich wykonanie trwa bardzo długo, przez co traci się cenny czas pacjenta. Tak ważne jest więc ulepszenie testów diagnostycznych lub stworzenie nowych, bardziej specyficznych metod pozwalających na wczesne wykrycie i badanie przebiegu tego typu nowotworu [9].

2. Wybór strategii odkrywania potencjalnych, nowych biomarkerów

Biomarkery nowotworowe to bezinwazyjne – gdyż badaniu poddawane są zwykle łatwo dostępne płyny ustrojowe pacjentów (mocz, surowica) – a więc optymalne dla klinicystów, narzędzie umożliwiające wczesne wykrycie toczącego się procesu nowotworowego. Ponadto biomarkery są przydatne dla celów prognostycznych, monitorowania rozwoju choroby, czy do oceny skuteczności zastosowanej terapii [10,11].

Idealny biomarker musi być bezpieczny i prosty do mierzenia w łatwo dostępnych płynach ustrojowych pacjentów. Co więcej, powinien być wysoce specyficzny, co w przypadku licznych chorób, w tym guzów NET, nie zostało dotychczas osiągnięte [12,13]. Dlatego tak ważny jest wybór strategii służącej do wykrycia nowych, potencjalnych biomarkerów procesu chorobowego.

Obecnie istotne są poszukiwania nowych biomarkerów wśród substancji o strukturze białkowej. Zajmują one znaczącą pozycję, gdyż wiele znanych markerów – między innymi Her2/neu w diagnostyce raka piersi, α -fetoproteina dla neuroblastomy, czy też Ca125 dla raka jajników oraz PSA w diagnostyce raka prostaty – ma właśnie strukturę białkową [14-17].

Drugą chętnie badaną grupą są związki małowczątkowe, jak na przykład kwas homowanilinowy oraz 5-hydroksyindolooctowy jako biomarkery skłonności samobójczych czy niektórych guzów NET, albo pochodne cholesterolu – sterydy – jako biomarkery różnicujące guzy nadnerczy np. raka kory nadnerczy od gruczolaka kory nadnerczy [18,19].

2.1. Poszukiwanie biomarkerów wśród substancji o charakterze białkowym – proteomika kliniczna

Proteomika kliniczna to dziedzina wiedzy badająca całościowy skład białkowy (proteom) organizmu, tkanki czy innego badanego materiału biologicznego pochodzenia klinicznego. Cieszy się ona rosnącym zainteresowaniem wśród naukowców poszukujących nowych biomarkerów chorób nowotworowych, gdyż zgłębienie wiedzy o białkach – ich lokalizacji,

budowie, wzajemnych interakcjach, funkcjach, jak również ich modyfikacjach potranslacyjnych (ang. *post-translational modifications*, PTMs) – dostarcza szerokiej informacji o udziale białek w procesach fizjologicznych, jak i patofizjologicznych zachodzących w organizmie [20,21]. Optymalizacja metod bioanalitycznych, narzędzi informatycznych oraz ulepszone metody przetwarzania danych spowodowały, że w obszarze chorób nowotworowych proteomika zaczęła odnosić sukcesy, zarówno na etapie diagnozy, monitorowania, jak też ustalania terapii spersonalizowanej dla pacjentów z chorobami nowotworowymi [22].

Niemniej proteom podlega ciągłym, dynamicznym zmianom, więc identyfikacja białek o znaczeniu klinicznym w wieloskładnikowych materiałach pochodzenia biologicznego, jakimi są płyny ustrojowe pacjentów (ślina, surowica, mocz), fragmenty tkanek czy pierwotne hodowle komórkowe – sprawia trudności [23]. Dlatego obecnie wdrażana jest równolegle metoda zawężania pola poszukiwań biomarkerów do grup białek, które cechują się potwierdzoną istotnością kliniczną [24].

2.2. Fosfoproteom jako bogaty rezerwuuar potencjalnych, nowych biomarkerów

Wśród 300 modyfikacji potranslacyjnych białek opisanych w literaturze, fosforylacja zajmuje niezmiernie ważną pozycję [25]. Jest to modyfikacja najlepiej zbadana i bardzo szeroko scharakteryzowana. Dowiedziono, że około 30% białek komórkowych ulega fosforylacji w komórce podczas jej życia. Modyfikacja ta wpływa na wiele ważnych procesów regulacyjnych w komórce, gdyż ma swój udział w metabolizmie, podziale, przekazywaniu sygnałów oraz utrzymaniu homeostazy w komórce. Kinazy sprawują funkcję kontrolną nad fosforylacją. Są to enzymy zdolne do przyłączania grupy fosforanowej, głównie do trzech aminokwasów w sekwencji białka: seryny, treoniny i tyrozyny [26]. Odwrotnie do kinaz działają fosfatazy. Zaburzona między tymi enzymami równowaga może przyczyniać się do inicjacji procesu kancerogenezy [27]. Analiza porównawcza fosfobiałek w stanie patofizjologicznym organizmu do tych obecnych w warunkach fizjologicznych, może umożliwić wykrycie charakterystycznych dla procesu chorobowego fosfobiałek, pomocnych w diagnostyce lub nadzorowaniu przebiegu choroby, czy też stanowiących nowy cel działania chemioterapeutyku [28].

Fosfoproteom jest szeroko badany dla wielu nowotworów (Tabela 1) [29]. Fosfoproteomika to poddziedzina proteomiki zajmująca się badaniem tego subproteomu. Jednak fosforylacja, jak i inne modyfikacje potranslacyjne, nie jest kodowana przez geny. Dodatkowo, modyfikacja ta ma charakter dynamiczny, odwracalny, charakteryzuje się niską

stechiometrią, a fosfobiałka występują w niedużych stężeniach, co więcej – jedno białko może ulegać fosforylacji w licznych miejscach swojej sekwencji. Dlatego też niezmiernie istotnym zadaniem jest ulepszanie metod identyfikacji ufosforylowanych białek, szczególnie gdy dąży się do wykonania analizy porównawczej fosfoproteomu w materiale pochodzenia klinicznego zarówno w prawidłowym, jak i chorobowym stanie. Wybór odpowiedniej techniki wzbogacania frakcji fosfobiałek, jej rozdzielenia od białek nieufosforylowanych, które znajdują się w istotnie wyższym stężeniu w próbce, selekcja najbardziej wydajnej metody fragmentacji w spektrometrze mas, jak również użycie algorytmów dedykowanych analizie danych eksperymentalnych, to główne zadania, przed którymi stają naukowcy badający fosfoproteom.

Tabela 1. Fosfoproteomika i jej zastosowanie w walce z chorobami nowotworowymi – przykłady. Na podstawie [28].

Rodzaj nowotworu	Znaczenie fosfoproteomiki
Potrójnie negatywny rak piersi (ang. <i>triple-negative breast cancer</i> , TNBC) [30]	Opracowanie terapii celowanej z użyciem inhibitora proteazy ADAM-17
Rak piersi, GIST [31,32]	Ustalenie przyczyn oporności na leki, poszukiwanie bardziej skutecznych terapii
Rak płuc, glejak wielopostaciowy, GIST [33-36]	Nowe cele leków przeciwnowotworowych
Białaczka [37]	Rozwój nowych leków z grupy inhibitorów kinaz
Ludzkie guzy nabłonkowe [38]	Nowe możliwości terapeutyczne związane z poszukiwaniem białek podobnych do naskórkowego czynnika wzrostu (ang. <i>epidermal growth factor</i> , EGF)
Nowotwory krwi (chłoniak, szpiczak mnogi) [39,40]	Odkrycie zaburzeń fosforylacji związanych z uwrażliwieniem lub opornością na leczenie inhibitorami kinaz pacjentów z wybranymi typami nowotworów, zwiększenie wydajności terapii spersonalizowanej

2.3. Poszukiwanie nowych biomarkerów o budowie innej niż białka – analiza związków małowcząsteczkowych

Wśród często badanych pod kątem przydatności klinicznej związków znajdują się nie tylko białka, ale również mniejsze cząsteczki, jak np. aminokwasy, aminy biogenne. Zwykle zróżnicowane właściwości fizykochemiczne badanych cząsteczek, szeroki zakres mas, sprawiają, że niezbędne jest zawężenie pola poszukiwań – jak to miało miejsce w przypadku badania tylko jednego podzbioru białek, fosfoproteomu – do określonej grupy wcześniej wybranych związków małowcząsteczkowych, na przykład poszukując nowych, potencjalnych biomarkerów wśród amin biogennych (ang. *biogenic amines*, BA). Aminy biogenne biorą udział w wielu ważnych procesach w organizmie, takich jak na przykład kontrola proliferacji czy przekazywanie sygnałów międzykomórkowych (neuroprzekaźniki: noradrenalina, dopamina, serotonina). Zainteresowanie aminami biogennymi znacznie wzrosło, gdy dowiedziono ich ważnej roli w patogenezie i progresji nie tylko chorób nowotworowych, ale też innych chorób cywilizacyjnych, takich jak na przykład choroby neurodegeneracyjne (choroba Alzheimera, choroba Parkinsona), depresja lub alergia [41-43]. Określenie stężenia amin biogennych w płynach ustrojowych może być więc używane jako potencjalny wskaźnik dla wczesnej detekcji lub monitorowania progresji choroby, albo ustalania rokowań zastosowanej terapii.

Szczególnie ważne jest opracowanie nowych, szybszych i bardziej wydajnych metod służących do analizy jakościowej i ilościowej amin biogennych w płynach ustrojowych pacjentów chorych na rzadkie lub trudne do wykrycia typy nowotworów. Podwyższone stężenie amin biogennych lub ich metabolitów w płynach ustrojowych świadczyć może np. o obecności neuroblastomy lub guza chromochłonnego nadnerczy. Szybka i trafna diagnoza, szczególnie w pediatrii, stanowi podstawę prawidłowej terapii. Istotne jest wczesne i poprawne wykrycie guzów zdolnych do wydzielania amin biogennych i różnicowanie ich od guzów hormonalnie nieczynnych, ponieważ od typu guza zależy dalsze postępowanie terapeutyczne [44-46].

W celu przeprowadzania dogłębnej analizy wpływu procesu chorobotwórczego na komórkę, międzykomórkowe szlaki sygnalizacyjne, czy też zmienione wydzielanie określonych substancji (białkowych lub małowcząsteczkowych) należy jednak wcześniej zawsze dokonać wyboru metody umożliwiającej odpowiednie przygotowania próbki do analizy.

3. Przygotowanie próbek biologicznych do analizy

3.1. Rodzaje próbek biologicznych

Rodzaj materiału biologicznego poddawanego analizie determinuje wybór sposobu przygotowania próbki. Należy go określić na samym początku postępowania analitycznego, a ułatwić wybór może dobre skonstruowanie jasnej i zrozumiałej hipotezy badawczej. Celem głównym badania może być analiza porównawcza całościowego składu białkowego zdrowych i chorych komórek, czy też analiza porównawcza związków małowcząsteczkowych, których wydzielanie jest zaburzone w czasie choroby. Cel może stanowić również zdobycie szczegółowych informacji na temat wybranych grup związków chemicznych (na przykład białek) i ich zachowania w czasie choroby lub szerzej – analiza skomplikowanych procesów międzykomórkowych lub szlaków sygnalizacyjnych, w celu pozyskania wiedzy o biologicznych czy molekularnych podłożach danego procesu.

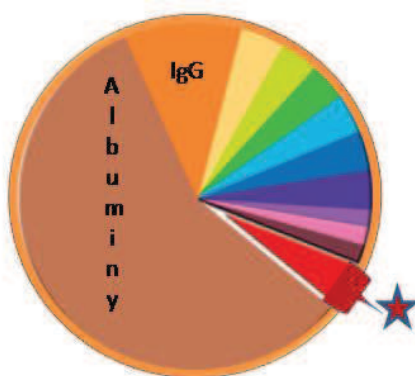
Biorąc powyższe rozważania pod uwagę, za optymalny materiał do analizy uważa się taki, który stanowi potencjalnie najlepsze, najbardziej zasobne źródło związków chemicznych potwierdzających lub odrzucających hipotezę badania, przy jednoczesnym nieskomplikowanym procesie jego pozyskiwania. I tak, dla poszukiwań nowych, potencjalnych biomarkerów chorób nowotworowych, najlepszym materiałem analitycznym są łatwo dostępne płyny ustrojowe człowieka. Należą do nich: surowica lub osocze krwi, mocz, ślina, a z mniej dostępnych, ale również możliwych do przebadania – płyn mózgowo-rdzeniowy. Badane mogą być również sekretomy znad pierwotnych hodowli komórek nowotworowych. Obecnie preferowane jest badanie moczu i krwi (osocza, surowicy) jako łatwo dostępnych płynów ustrojowych człowieka [46-48].

Mając sformułowaną hipotezę badania, po wyborze materiału analitycznego można przejść do izolacji wybranych grup związków z matrycy biologicznej, w celu ich dalszej analizy pod kątem przydatności jako nowe, potencjalne biomarkery chorób.

3.2. Schemat eksperymentu ukierunkowanego na poszukiwania nowych, potencjalnych biomarkerów chorób nowotworowych

Po uzyskaniu zgody odpowiedniej komisji bioetycznej, zapoznaniu pacjenta z celem badania i wyrażeniu przez niego zgody na udział w badaniu, można przystąpić do pobrania materiału od uczestników badania. Dokładna znajomość właściwości fizykochemicznych badanych związków (wrażliwości na światło, temperaturę) pozwoli uniknąć błędów już na tym ważnym etapie eksperymentu.

Potencjalne biomarkery występują w badanej próbce najczęściej w bardzo niewielkim stężeniu, dlatego najważniejsza jest ich izolacja od innych składników próbki. Na przykład w surowicy i osoczu krwi, najbardziej stężonymi białkami są albuminy i immunoglobuliny (ang. *immunoglobulins*, Ig), głównie IgG (Rycina 1) [20]. Najlepiej, gdy zostaną one usunięte przed analizą, gdyż ich stężenie znacznie przewyższa stężenie białek o mniejszych masach cząsteczkowych, które stanowią potencjalny rezerwuuar nowych biomarkerów, a których stężenie w próbach biologicznych jest często bardzo niskie (rzędu pikomoli) [49].



Rycina 1. Białka istotnie klinicznie (oznaczone gwiazdką) zajmują znikomą część całościowego zestawu białek osocza; na podstawie [24].

3.3. Metody izolacji badanych związków z matrycy biologicznej

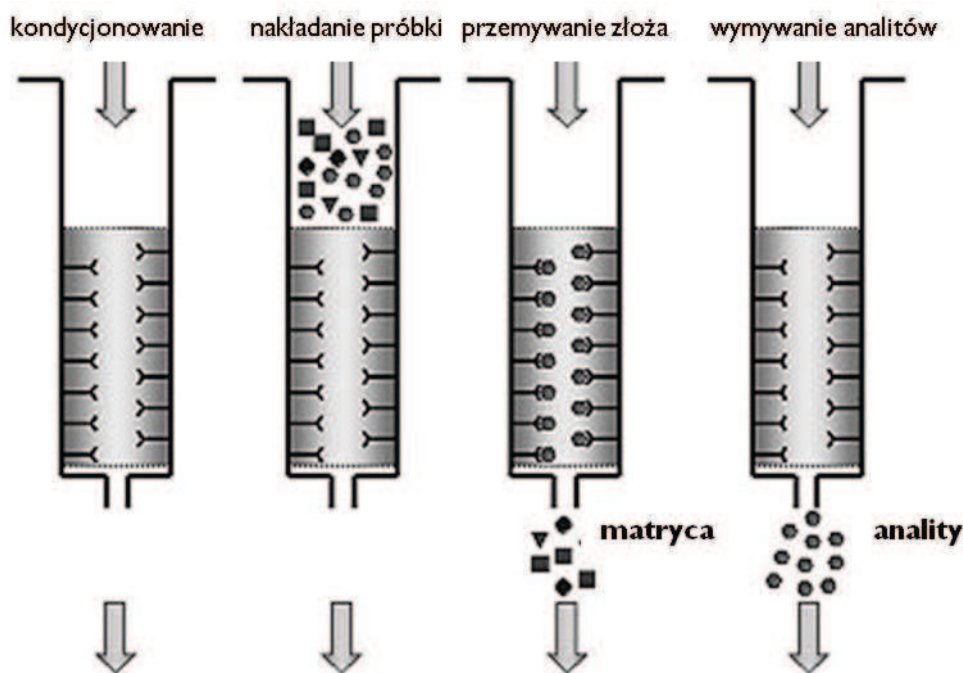
Izolacja lub też ekstrakcja wybranych cząsteczek z matrycy biologicznej jest etapem stwarzającym duże trudności. Dla każdego bowiem rodzaju cząsteczek, które stanowią cel badania – białek w analizie proteomicznej, czy związków małocząsteczkowych – należy rozpatrywać inne metody izolacji. Nierzadko konieczne jest użycie kilku etapów izolacji. Co za tym idzie, spodziewać się należy znacznego wydłużenia całkowitego czasu trwania analizy, jak również większych strat w materiale badanym [50].

Izolacja badanych związków ma na celu nie tylko wyodrębnienie badanych cząsteczek spośród wielu innych, nie stanowiących celu analizy, składników mieszaniny, ale również oczyszczenie próbki z zanieczyszczeń, które w dużym stopniu wpływają na wyniki analizy, a często zupełnie ją uniemożliwiają [51].

3.3.1. Ekstrakcja do fazy stałej (ang. *solid-phase extraction*, SPE)

Ekstrakcja do fazy stałej SPE to jedna z najchętniej stosowanych obecnie technik izolacji analitów z matrycy biologicznej. Polega ona na użyciu kolumnienek wypełnionych odpowiednią fazą stacjonarną, mającą powinowactwo do analizowanych substancji. Dzięki

temu, po nałożeniu próbki na wcześniej kondycjonowaną kolumnę, zanieczyszczenia są usuwane, zaś analizowane substancje – zatrzymywane są na złożu. Następnie, stosując odpowiedni eluent, anality wymywa się ze złoża, co umożliwia ich dalszą identyfikację, na przykład z zastosowaniem spektrometrii mas (Rycina 2) [52].



Rycina 2. Schemat oczyszczania i ekstrakcji analitów z próbki z zastosowaniem techniki SPE.

Dużą zaletą techniki SPE jest jednoczesne zateżenie o badane związki oraz oczyszczenie materiału z soli, detergentów i innych zanieczyszczeń. Tak otrzymana próbka biologiczna jest czysta, a substancje analizowane wolne są od innych, uniemożliwiających dalszą ich identyfikację.

Co więcej, jest to prężnie rozwijająca się technika. Dotychczas stosowane wypełnienia kolumn złożone z węgla C18, wymienników jonowych – kationowych (ang. *strong cation exchange*, SCX) oraz anionowych (ang. *strong anion exchange*, ACX), materiałów wypełniających wchodzących w oddziaływanie hydrofobowe z analitami, zastępowane są przez ich modyfikacje [bardziej złożone matryce, które działają na zasadzie oddziaływań jonowych i hydrofobowych jednocześnie albo złoża skomponowane z wykorzystaniem polimerów z tzw. nadrukiem cząsteczkowym (ang. *molecularly imprinted polymers*, MIP)]. Zmiany w strukturze złożeń przyczyniły się do uzyskania przez technikę SPE statusu techniki ekstrakcji o bardzo szerokim zakresie wykorzystania. Analizowane związki są bowiem

selektywnie zatrzymywane na złożu, co pozwala na otrzymywanie próbek o wysokim stopniu czystości.

Niewątpliwą zaletą techniki SPE jest możliwość jej zautomatyzowania poprzez połączenie *on-line* z chromatografią cieczową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas LC-MS/MS (ang. *liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, LC-MS/MS). W tak skonstruowanym układzie mamy do czynienia z dwiema kolumnami chromatograficznymi – przedkolumną i kolumną analityczną. Przedkolumna jest wypełniona złożem SPE i pozwala na zagęszczenie i oczyszczenie próbki przed jej dotarciem do kolumny analitycznej. Zapobiega to szybkiej eksploatacji kolumny chromatograficznej, jednak ilość sorbentu na przedkolumnie (zwykle 20-100 mg) jest znacznie mniejsza niż w kolumnie SPE pracującej w systemie *off-line* (tutaj mamy do czynienia z wypełnieniami 50-2000 mg). Anality są więc słabiej zatrzymywane na przedkolumnie w systemie *on-line* [53]. Wciąż niemniej i tak dąży się do wprowadzenia ulepszeń w systemach *on-line*, gdyż takie połączenia znacznie skracają czas analizy oraz zmniejszają straty materiału badanego. Jedną z technik, których rozwój pozwolił na zmniejszenie niektórych ograniczeń bezpośredniego połączenia SPE-LC-MS/MS, jest mikroekstrakcja do fazy stałej (ang. *solid-phase microextraction*, SPME). Użycie tej metody umożliwia zagęszczanie, odsalanie i rozdzielenie zarówno próbek ciekłych, jak i gazowych w bardzo małych objętościach. Dużą zaletą SPME jest ograniczenie zużycia często toksycznych i drogich rozpuszczalników oraz mała powierzchnia adsorpcyjna [54,55].

3.3.2. Ekstrakcja ciecz-ciecz (ang. *liquid-liquid extraction*, LLE)

Ekstrakcja LLE należy do jednych z najstarszych metod wzbogacania i izolacji związków słabo lotnych z próbek wody. Opiera się na zjawisku podziału analitu pomiędzy dwie oddzielone od siebie, ale pozostające w kontakcie ciecze, najczęściej roztwór wodny i rozpuszczalnik organiczny. Proces ten podlega prawu podziału Nernsta. Niestety, niezbędnym wymogiem LLE jest obecność dużych ilości rozpuszczalnika organicznego, co komplikuje analizę pod względem kosztów i naraża operatora na uciążliwy dla zdrowia kontakt z nierzadko toksycznymi roztworami. Co więcej, proces ekstrakcji z użyciem techniki LLE jest czasochłonny.

Dzięki syntezie coraz bardziej selektywnych i wysoce wydajnych wypełnień kolumn SPE, technika ekstrakcji ciecz-ciecz zaczyna być wybierana coraz rzadziej. Przeglądając ostatnio publikowane prace naukowe, można zauważyć trend odchodzenia od LLE jako głównej techniki izolacji analitu – czy to peptydów, leków lub innych związków małowcząsteczkowych z próbki biologicznej – na rzecz ekstrakcji do fazy stałej SPE [55].

Wraz z rozwojem wiedzy i technologii, rozpoczęto adaptację techniki LLE do zmieniających się trendów z dążeniem do minimalizacji zużycia próbki, jak również rozpuszczalników. Analogicznie do ulepszenia SPE, jakim jest technika SPME, również tutaj wprowadzono zminiaturyzowaną wersję LLE – mikro-ekstrakcję ciecz-ciecz (ang. *liquid-liquid microextraction*, LLME). LLME wymaga jedynie mikrolitrowych ilości rozpuszczalników, aby wyizolować analit z próbki wodnej [56,57].

Dzięki rozwojowi technologii coraz więcej technik izolacji analitów ze skomplikowanych materiałów biologicznych jest dostępnych na rynku. Niemniej powstałe ulepszenia często są niewystarczające, aby z dużą wydajnością wyizolować związki ze złożonej matrycy biologicznej. Czasem wymagane jest wypróbowanie wielu technik i ich modyfikacji, wypracowanie odpowiedniego składu rozpuszczalników, zanim wybierze się odpowiednią technikę izolacji dla badanego analitu. Często niezbędne jest zastosowanie starszych, mało wydajnych technik izolacyjnych, gdyż dla niektórych związków – szczególnie o niejednorodnej charakterystyce fizykochemicznej – nowsze metody nie zostały jeszcze w pełni zoptymalizowane.

3.3.3. Inne metody izolacji

Do metod starszych, obecnie często stosowanych przed właściwą izolacją SPE lub LLE, należy precypitacja białek [58,59]. Głównie podczas analizy związków małowcząsteczkowych lub peptydów i ewentualnie mniejszych białek, w pierwszym etapie należy usunąć z materiału badanego białka występujące w największym stężeniu. Można zastosować komercyjnie dostępne zestawy laboratoryjne, których działanie opiera się na zjawisku chromatografii powinowactwa, a więc umożliwia wybiórcze usuwanie niektórych białek, na przykład albumin i immunoglobulin, z krwi. Nie dysponując takimi zestawami, zastosować można klasyczną precypitację białek za pomocą acetonu, kwasu trichlorooctowego, metanolu, acetonitrylu lub innych rozpuszczalników organicznych. Po odwirowaniu precypitatu, matryca jest wolna od białek, które pozostają w osadzie. Roztwór nad osadu jest następnie filtrowany – optymalnie przez filtry 0,22 μm – i może być bezpośrednio analizowany.

Wirowanie i ultrawirowanie z zastosowaniem membran o różnej przepuszczalności, pozwala również w pierwszym etapie na usunięcie organelli komórkowych (jeżeli analizie poddawane są homogenizowane komórki) oraz soli i niektórych detergentów.

W proteomice wstępne etapy izolacji, opisane powyżej, służą do przygotowania próbki przed właściwym rozdzielaniem za pomocą np. elektroforezy żelowej jedno- lub dwukierunkowej. Niezbędne zastosowanie jednoczesne kilku metod wstępnego

przygotowania próbki w eksperymentach proteomicznych wiąże się z dużą złożonością matrycy biologicznej, obecnością istotnych klinicznie białek w niewielkim stężeniu w próbce oraz wrażliwością spektrometru mas na nawet niewielkie ilości soli i zanieczyszczeń obecnych w próbce. Po izolacji białek otrzymuje się mieszaninę wielu, często tysięcy białek, których analiza i identyfikacja przebiega z zastosowaniem spektrometrii mas.

Dzięki usprawnieniu metod przygotowania próbek do analizy, rozwojowi narzędzi bioinformatycznych, proteomika zyskuje coraz większe znaczenie w walce z chorobami nowotworowymi. W analizie proteomicznej, jak również w analizie związków małocząsteczkowych, duży sukces odniosłoby opracowanie standardowych procedur postępowania dla każdej próbki biologicznej. Zadanie to wciąż stanowi duże wyzwanie dla naukowców, a metody przygotowania próbek do analizy rozwijają się prężnie, szczególnie w kierunku ulepszania istniejących już metod izolacji. Nowości te mają na celu skrócenie czasu analizy, uzyskanie próbki o najwyższym stopniu czystości, sprawienie, aby wyniki eksperymentów były jak najbardziej powtarzalne i odtwarzalne, a co za tym idzie, poprawienie jakości ostatecznego rezultatu eksperymentu, z nadzieją, że starania te zaowocują udoskonaleniem technik służących do bezinwazyjnej diagnostyki chorób nowotworowych.

3.4. Metody wzbogacania analizowanych związków w materiale biologicznym ze szczególnym uwzględnieniem fosfoproteomiki

Często metody stosowane do izolacji analitów z matrycy biologicznej służą również wzbogaceniu próbki w wybrane związki. Taką zaletą charakteryzują się techniki SPE czy SPME. Łącząc dwa etapy eksperymentu przy użyciu jednej metody, zyskiwany jest czas, a straty materiału biologicznego są mniejsze. Z tego względu wspomniane techniki cieszą się dużym zainteresowaniem i bardzo chętnie są używane do przygotowania i zagęszczenia próbki biologicznej.

Ideą procesu wzbogacania w SPE jest zatrzymanie wybranych analitów z próbki biologicznej na materiale adsorbującym, a następnie ich desorpcja. Tak otrzymany roztwór jest bogatszy, niż próbka wyjściowa, w analizowane związki i jego dalsza analiza – zwykle chromatograficzna – jest w pełni możliwa [60].

Starszą, niemniej bardzo łatwą do zastosowania, metodą wzbogacenia próbki jest jej odparowanie, po wstępnym odsoleniu i izolacji, a następnie jej rozpuszczenie w mniejszej ilości rozpuszczalnika. Metoda ta rzadko jest stosowana samodzielnie, często używana jest łącznie z innymi technikami np. z SPE lub LLE.

Niezmiernie ważnym etapem w fosfoproteomice jest wzbogacenie frakcji fosfobiałkowej. Jest to spowodowane występowaniem fosfopeptydów w materiale badanym w dużo niższych stężeniach niż peptydów, które nie uległy fosforylacji. Co więcej, trudności stwarza też detekcja z użyciem spektrometrii mas fosfopeptydów, gdyż nastąpić może nakładanie się sygnału dla fosfopeptydu w obecności peptydów niefosforylowanych, a grupa fosforanowa wykazuje labilność podczas fragmentacji indukowanej kolizyjnie (ang. *collisionally induced dissociation*; CID zwana też CAD – ang. *collisionally activated dissociation*), która jest aktualnie standardowo stosowaną metodą fragmentacji. Dlatego też, identyfikacja fosfopeptydów i miejsc fosforylacji jest skomplikowanym procesem [28]. Pomimo wspomnianych utrudnień, badania fosfoproteomiczne są z powodzeniem kontynuowane dzięki rozwojowi zaawansowanych metod wstępnego wzbogacania frakcji fosfopeptydowej [61]. Metody wzbogacania frakcji fosfobiałek, dzięki rozwojowi zarówno metod analitycznych, jak i bioinformatycznych, są liczne i wiele z nich używanych jest w nowoczesnej fosfoproteomice [62]. Wśród najważniejszych można wymienić: immunoprecypitację czy konwersję chemiczną fosfopeptydów, wzbogacanie za pomocą chromatografii, jak na przykład chromatografii oddziaływań hydrofilowych, chromatografii jonowej, chromatografii powinowactwa z unieruchomionymi jonami metali (ang. *immobilized metal affinity chromatography*, IMAC) [63] lub tlenkami metali np. dwutlenkiem tytanu (TiO_2) [64], albo połączenie ostatnich dwóch technik (ang. *sequential elution from IMAC*, SIMAC) [65]. Obecnie najczęściej stosowane są metody korzystające z matryc chromatograficznych zdolnych do selektywnego wiązania reszt fosforanowych, jak na przykład złoża z unieruchomionymi jonami metali – IMAC oraz z tlenkiem tytanu (IV) – TiO_2 [24].

Wzbogacanie fosfoproteomu z użyciem IMAC oparte jest na silnym oddziaływaniu między pozytywnie naładowanymi jonami metali znajdującymi się w matrycy np. galu – Ga (III), żelaza – Fe (III), cyrkonu – Zr (IV) lub glinu – Al (III) z grupą fosforanową w fosfopeptydzie, obdarzoną ładunkiem ujemnym. Niestety białka o charakterze kwaśnym również posiadają ładunek ujemny i mogą się przyłączać do matrycy IMAC. W czasie odzysku peptydów przyłączonych do matrycy uzyskuje się eluent, który powinien zawierać tylko fosfopeptydy, ale często tak nie jest. Opisana powyżej technika wzbogacania jest więc wciąż ulepszana i modyfikowana tak, aby zwiększyć jej selektywność, przy jednoczesnej redukcji strat materiału badanego. Wysoka ilość wiązań niespecyficznych IMAC stwarza najwięcej problemów, gdy matryca ta używana jest do wzbogacania fosfopeptydów z bardzo skomplikowanych mieszanin. A takimi próbkami dysponujemy, gdy badamy łatwo dostępne

płyny ustrojowe człowieka, jak to ma miejsce w badaniach nastawionych na zdobywanie wiedzy o fosfobiałkach, których nieprawidłowe wydzielanie obserwuje się w procesie kancerogenezy.

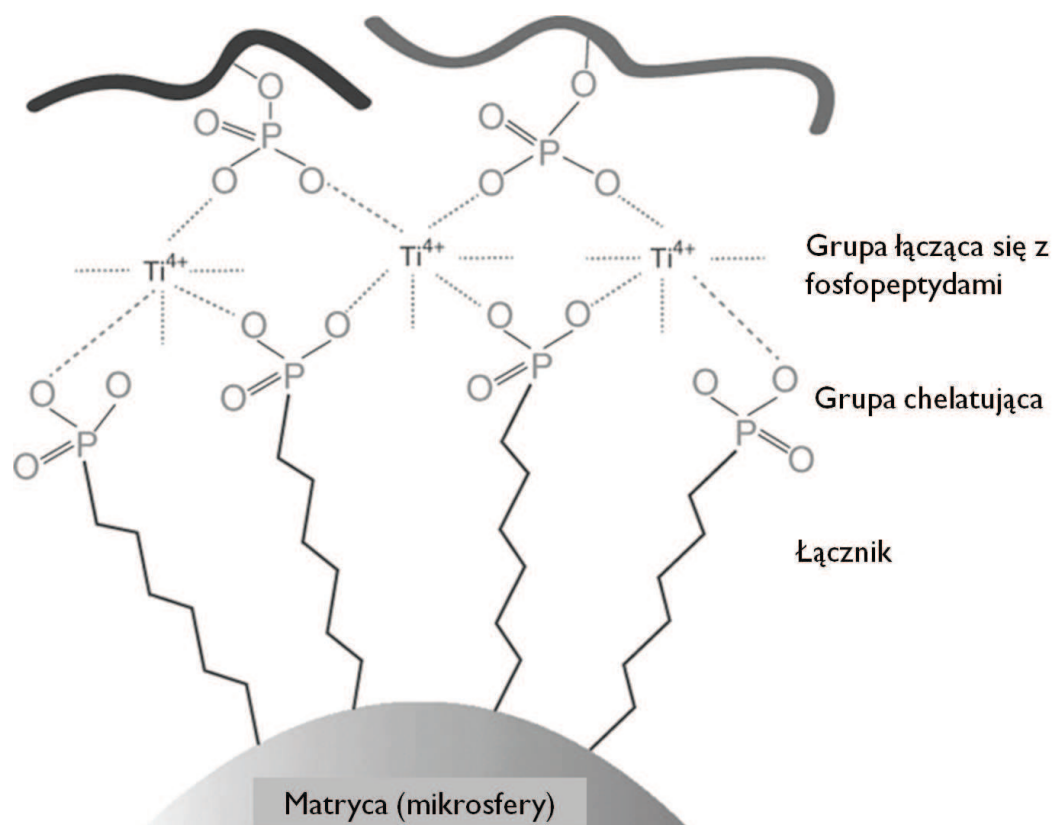
Następnym wyraźnym ograniczeniem IMAC jest względnie niska wytrzymałość tej techniki względem detergentów i soli znajdujących się w próbce, przez co należy wykonać dodatkowe oczyszczanie próbki (na przykład za pomocą ekstrakcji do fazy stałej z użyciem kolumn C18 i następnie prefrakcjonowanie przy użyciu chromatografii jonowej) przed wzbogacaniem fosfopeptydów za jej pomocą. Niezbędne wprowadzenie jeszcze jednego lub dwóch etapów eksperymentu prowadzi do zwiększenia strat badanego materiału i wydłużenia czasu przygotowania próbki do analizy [66]. Zachodzi zatem konieczność używania większej ilości materiału początkowego w przypadku, gdy wybrano do wzbogacenia fosfopeptydów technikę IMAC. Często w badaniach fosfoproteomicznych dysponuje się bardzo małą ilością materiału badanego, a pobranie większej próbki jest zwykle czasochłonne i problematyczne (hodowle komórkowe, płyny ustrojowe pacjentów), dlatego preferuje się stosowanie tych technik, które wykorzystują jak najmniejszą ilość próbki niezbędnej dla całościowej analizy [67].

Zastosowanie matrycy z TiO_2 jest obiecującą alternatywą dla matrycy IMAC. Spowodowane jest to wyższą tolerancją TiO_2 względem zanieczyszczeń obecnych w próbce i jej wysoką selektywnością. Dodatkowo, nie trzeba dysponować dużą ilością próbki w celu wzbogacenia fosfopeptydów. Problem wiązań niespecyficznych z kwaśnymi peptydami jest tu pomijany poprzez zastosowanie roztworu z dodatkiem kwasu 2,5-dihydroksybenzoesowego (2,5-DHB), który ma zdolność usuwania z próbki nieufosforylowanych peptydów, oraz kwasu trifluorooctowego (TFA) podczas nakładania próbki na matrycę TiO_2 . Niemniej należy rozpatrzyć również kompatybilność tych substancji z dalszą analizą LC-MS/MS; powszechnie dodawany 2,5-DHB jest bowiem substancją zanieczyszczającą zarówno system chromatograficzny, jak i źródło jonów spektrometru mas. Idealnym rozwiązaniem okazuje się zastosowanie kwasu glikolowego albo kwasu mlekowego jako odpowiedników 2,5-DHB, które podnoszą selektywność matrycy TiO_2 względem fosfopeptydów, co więcej – są kompatybilne z dalszymi etapami analizy.

Używanie TiO_2 jest jednak również obarczone wadami. Otóż tlenek tytanu (IV) obdarzony jest bardzo silnym powinowactwem do peptydów wielokrotnie ufosforylowanych, co utrudnia ich późniejszy odzysk z matrycy.

Podsumowując, obie chętnie używane w fosfoproteomice techniki obarczone są wadami. Ostatnio skoncentrowano się więc na poszukiwaniu matrycy, która posiadałaby zalety TiO_2

oraz IMAC, ale pozbawiona była ich wad. Dzięki nowym technologiom stworzono matrycę składającą się z IMAC z chelatowo przyłączonymi jonami tytanu (IV) Ti^{4+} ($Ti^{4+}/IMAC$) [68]. Rycina 3 przedstawia schemat budowy takiej matrycy, z uwzględnieniem miejsca połączenia jej z peptydami (łącznik z jonów tytanu). Z uwagi na swoją wysoką odporność na sole i detergenty, wysoką specyficzną względem fosfopeptydów (jak w przypadku TiO_2), nieskomplikowaną procedurę eksperymentalną, zapewnienie lepszego odzysku wielofosforylowanych peptydów, w porównaniu do TiO_2 , podobny odzysk jednofosforylowanych peptydów i oczywiście zdolność do wzbogacenia próbki z niewielkiej ilości materiału początkowego, metoda ta może znacząco przyczynić się do rozwoju badań fosfoproteomicznych.



Rycina 3. Budowa mikrosfery, której podstawą jest matryca z unieruchomionymi jonami metalami IMAC, do której, poprzez resztę fosforanową, przyłączone są chelatowo jony tytanu (Ti^{4+}) mające powinowactwo do fosfopeptydów. Na podstawie [68].

3.5. Analiza ilościowa

Celem analizy ilościowej jest określenie stężenia analitów zidentyfikowanych wcześniej za pomocą analizy jakościowej. Bazując na wynikach uzyskanych dzięki analizie ilościowej, można prześledzić zmiany stężenia badanych związków w stanie patofizjologicznym, jak i fizjologicznym organizmu, czy też przed i po zaistnieniu badanego zjawiska (jak na przykład

przed leczeniem i po leczeniu). Dlatego też w dzisiejszych czasach niezmiernie ważny jest rozwój metod analizy ilościowej, gdyż mogą one uzupełnić posiadaną informację także w obszarze nowych biomarkerów wielu chorób [69].

Analiza ilościowa w proteomice dodatkowo dostarcza informacji o molekularnych funkcjach białek i ich interakcjach; zdobywana jest wiedza o molekularnym podłożu wielu procesów toczących się w organizmie. Szlaki sygnalizacyjne mogą być interpretowane na poziomie białek i wiele metod ilościowych bazujących na wykorzystaniu spektrometrii mas zostało opracowanych dla ilościowego określenia wszystkich białek w próbce lub tylko wybranych podzbiorów białek, np. fosfoproteomu (ilościowa analiza fosfoproteomiczna).

Analiza ilościowa nie jest jednak możliwa bez skorzystania z zaawansowanych technologii analitycznych. Najczęściej stosowanymi metodami niezbędnymi do uzyskania danych ilościowych ze spektrometru mas, jest używanie wzorców wewnętrznych, którymi w sytuacji idealnej są znakowane izotopowo (np. deuterem) odpowiedniki związków badanych. Można też użyć znaczników izotopowych, które nie mają budowy analizowanych substancji, co jest szczególnie pomocne w czasie analizy próbki o nieznanym składzie. Wykorzystywane są też metody nie korzystające ze znaczników izotopowych. Wszystkie wymienione podejścia wymagają dużej wiedzy oraz zastosowania odpowiednich narzędzi statystycznych i chemometrycznych, podczas interpretacji wyników.

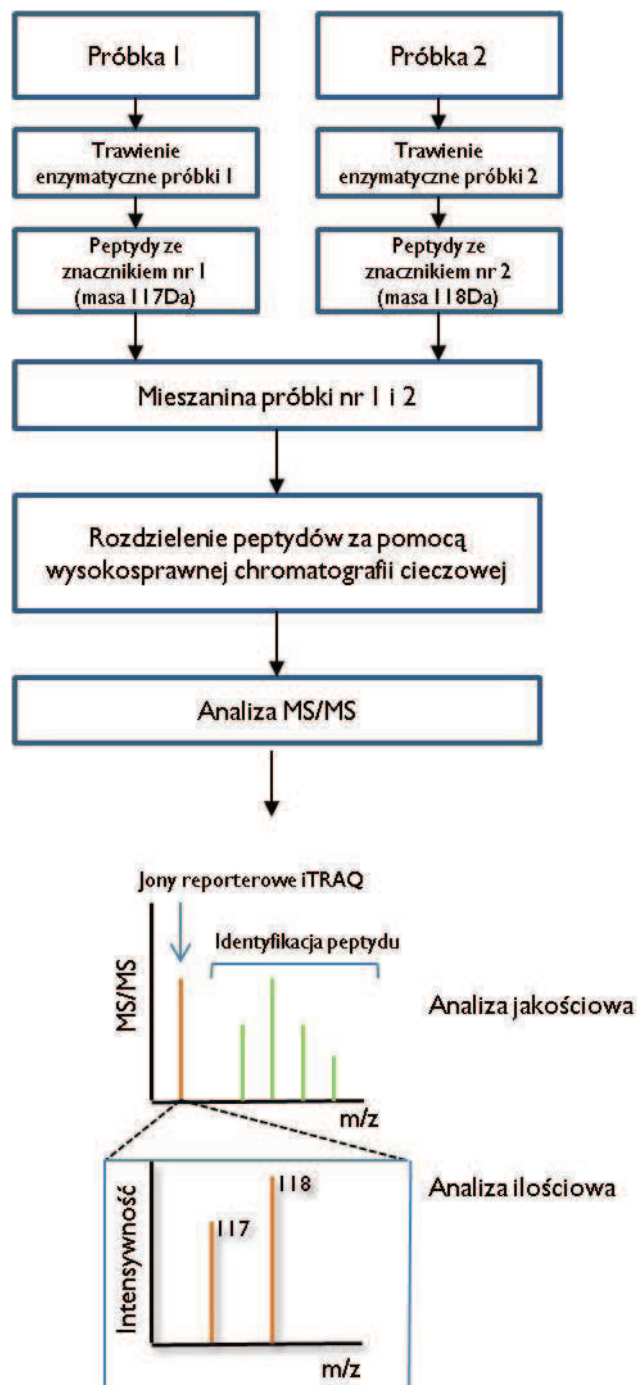
3.5.1. Znakowanie izotopowe w analizie proteomicznej

Obecnie techniki korzystające ze spektrometrii mas ze znakowaniem stabilnymi izotopami zyskały na popularności. Spektrometria mas jest powszechnie używana do ilościowej analizy związków małowcząsteczkowych. Używane są na przykład znakowane izotopowo analogi badanych związków i dodawane są w określonej ilości do próbki przeznaczonej do analizy. Jest to niezbędne, gdyż spektrometria mas *per se* nie jest techniką służącą do analizy ilościowej, ze względu na duże różnice w odpowiedzi detektora, różne stopnie jonizacji badanych związków i inne czynniki. Niemniej jednak obserwowane zależności ilościowe dla analogów izotopowych okazały się bardzo wiarygodne, gdyż nie ma między nimi a ich nieznakowanymi odpowiednikami różnic chemicznych i są one analizowane podczas jednego eksperymentu [70].

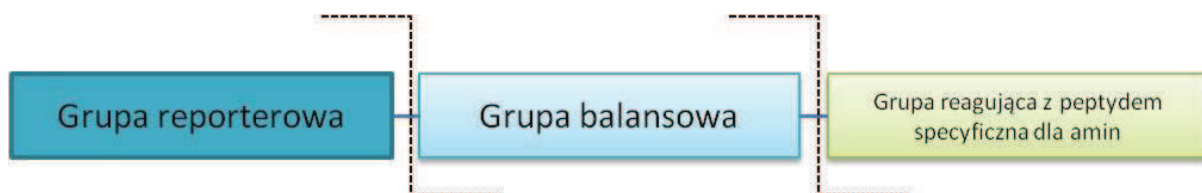
Włączenie znacznika izotopowego do związku może być przeprowadzone *in vivo*. Mówimy wtedy np. o znakowaniu izotopowym aminokwasów w hodowlach komórkowych (ang. *stable isotope labeling by amino acids in cell cultures*, SILAC) [70]. Dużo częściej stosuje się jednak znakowanie *in vitro*, a do najbardziej popularnych metod należą:

znakowanie grup aminowych przy użyciu znaczników izobarycznych w celu względnej i bezwzględnej analizy ilościowej (ang. *isobaric tags for relative and absolute quantification*, iTRAQ) [71,72], znakowanie za pomocą reduktywnej aminacji stosując izotopy formaldehydu i cyjanoborowodoru sodowego (ang. *dimethyl labeling*) [73,74] czy też znakowanie białek aminokwasami z wbudowanym izotopem (ang. *isotope-coded affinity tag*, ICAT) [75].

W przypadku zastosowania techniki iTRAQ, znacznik izotopowy jest dołączany do końca N peptydów uzyskanych podczas trawienia enzymatycznego białek w próbce i do wolnych grup aminowych tych peptydów. Dużą zaletą tej metody jest możliwość analizy nawet do ośmiu próbek w jednym eksperymencie – różne próbki są znakowane ośmioma różnymi znacznikami, mieszane, a następnie analizowany jest skład ilościowy peptydów w każdej z próbek. Rycina 4 przedstawia schemat eksperymentu, którego celem jest ilościowa analiza proteomiczna dwóch próbek – pochodzącej z organizmu zdrowego (próbka 1) oraz chorego (próbka 2). Peptydy powstałe po trawieniu enzymatycznym białek z próbki są znakowane dwoma różniącymi się masą znacznikami iTRAQ (117 Da lub 118 Da), po czym obie próbki są mieszane i następnie jednocześnie rozdzielane są składniki mieszaniny za pomocą techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej, a analizy dokonuje się z użyciem tandemowej spektrometrii mas (MS/MS). Każdy ze znaczników w metodzie iTRAQ składa się z grupy reporterowej, balansowej i reagującej z peptydem (Rycina 5). Grupa reporterowa posiada różne masy (od 113 do 121 Da, z pominięciem 120 Da) i ulega odszczepieniu od szkieletu peptydów podczas fragmentacji w spektrometrze mas, a masy jonów reporterowych są możliwe do zarejestrowania na widmie masowym. Sygnał intensywności tych fragmentów (Rycina 4) służy do względnej, ilościowej analizy peptydów, które te fragmenty reprezentują. Podsumowując, dzięki znakowaniu iTRAQ otrzymuje się pośrednio informację o stężeniu danych peptydów, i dalej – białek – w nawet ośmiu różnych próbkach w czasie jednej analizy.

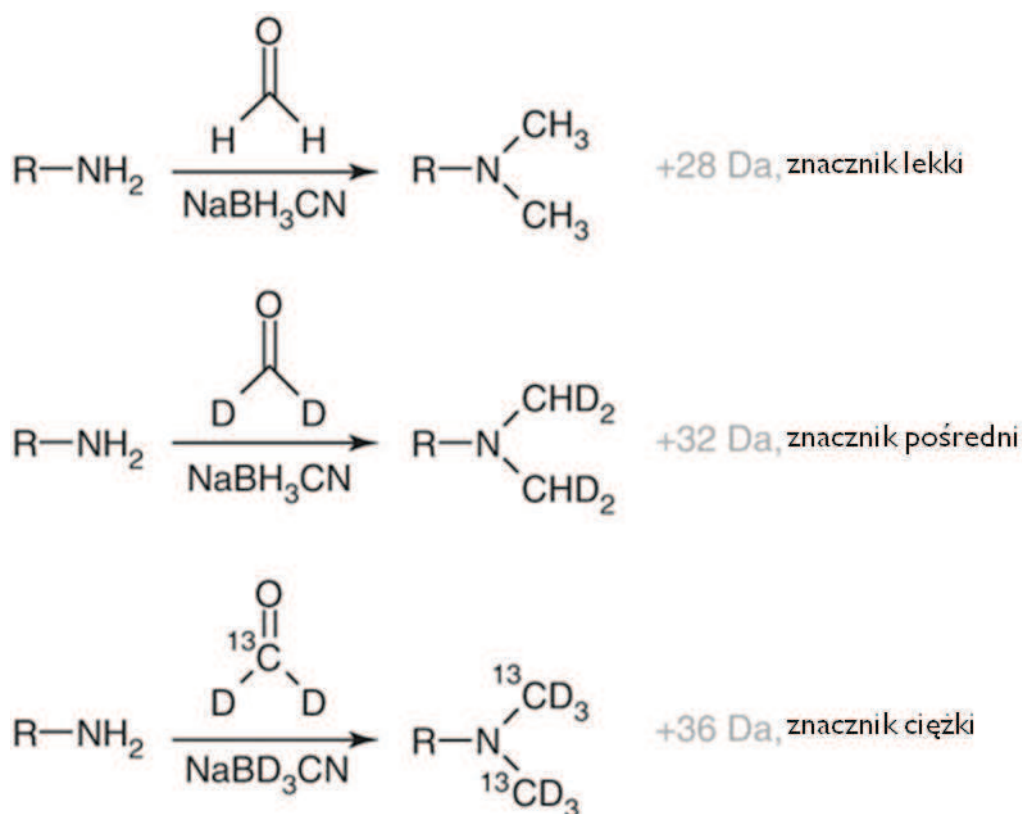


Rycina 4. Schematyczne przedstawienie analizy ilościowej dwóch próbek z zastosowaniem znaczników stabilnych izotopów iTRAQ i analizy LC-MS/MS.



Rycina 5. Schemat budowy znacznika izotopowego iTRAQ z zaznaczeniem przerywanymi liniami miejsc, które ulegają rozerwaniu w spektrometrze mas, uwalniając części znaczników o odpowiednich masach (grupę reporterową), które umożliwiają analizę ilościową peptydów w próbkach. Na podstawie [76].

Ciekawą metodą względnej ilościowej analizy proteomicznej jest użycie znakowania amin pierwszorzędowych (z peptydów) przy użyciu izotopów formaldehydu (CH_2O , CD_2O , $^{13}\text{CD}_2\text{O}$) i cyjanoborowodoru sodowego (NaBH_3CN , NaBD_3CN) (Rycina 6). Technika ta nosi nazwę reduktywnej aminacji i polega na przyłączeniu do peptydów znaczników: lekkiego, pośredniego i ciężkiego, różniących się masami cząsteczkowymi – dzięki czemu można analizować w jednej analizie LC-MS/MS do 3 różnych próbek. Jest to względna ilościowa analiza, gdyż porównujemy skład białkowy (fosfobiałkowy) próbki klinicznej przed chorobą i w trakcie choroby (po zadziałaniu czynnika), czy też pozyskanej ze zdrowego i patologicznie zmienionego materiału biologicznego. Do głównych udoskonaleń tej techniki, w porównaniu do iTRAQ, można zaliczyć: redukcję kosztów odczynników, możliwość przeprowadzenia jednoczesnego odsalania i oczyszczanie próbki w trakcie znakowania (jeśli korzysta się z przystosowanych do znakowania kolumnienek SPE) – całkowity czas potrzebny do przygotowania próbek do analizy znacznie się skraca [74].



Rycina 6. Schemat przyłączania do amin pierwszorzędowych (do końca N peptydu) znacznika lekkiego, pośredniego lub ciężkiego przy użyciu odpowiednich izotopów formaldehydu (CH_2O , CD_2O , $^{13}\text{CD}_2\text{O}$) i cyjanoborowodoru sodowego (NaBH_3CN , NaBD_3CN). Na podstawie [77].

3.5.2. Analiza ilościowa nie wykorzystująca znakowania izotopowego

Analiza ilościowa z wykorzystaniem znakowania stabilnymi izotopami, uważana jest za metodę najlepiej odzwierciedlającą realne stężenie białek w badanej próbce. Niemniej technika ta wymaga specjalistycznych narzędzi bioinformatycznych oraz zakupu drogich, często toksycznych, odczynników. Co więcej, znaczniki izotopowe czasem nie są kompatybilne z dalszą detekcją składników próbek przy pomocy spektrometrii mas [78].

Dawniej analizę ilościową bez znakowania izotopowego przeprowadzano wykorzystując technikę dwukierunkowej elektroforezy żelowej (ang. *two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*, 2D-PAGE), gdzie intensywność zabarwienia białek na żelu określała ich ilość. Obecnie zaczęto unikać stosowania czasochłonnego i toksycznego żelu poliakrylamidowego na rzecz analizy ilościowej opartej na zasadzie zliczania widm fragmentacyjnych MS/MS (ang. *spectra counting*, SC) lub też oceny wielkości pola powierzchni pod pikami obrazującymi poszczególne peptydy (ang. *area under the curve*, AUC) [78-80]. Dzięki zastosowaniu takiej analizy, określenie stężenia wielu białek w próbce podczas jednej analizy, stało się możliwe.

W przypadku użycia innego detektora niż spektrometr mas, na przykład detektora spektrofotometrycznego pracującego w zakresie światła widzialnego i bliskiego ultrafioletu (ang. *ultraviolet-visible*, UV/VIS), zastosowanie wzorca wewnętrznego lub zewnętrznego umożliwia przeprowadzenie analizy ilościowej [81]. Stosując pierwszą metodę, jako wzorzec wewnętrzny używa się substancję, która nie występuje w próbce, a której pik na chromatogramie jest usytuowany w pobliżu pików oznaczanych składników mieszaniny, jednak z nimi nie ingeruje. Dokładnie odmierzoną ilość wzorca dodaje się do ściśle znanej ilości próbki. Dane na temat zawartości badanych związków w próbce uzyskuje się przy użyciu odpowiednich algorytmów matematycznych, przez porównanie absorbancji światła w zakresie UV/VIS przez znaną ilość wzorca wewnętrznego, z absorbancją badanych analitów.

Druga metoda – wzorca zewnętrznego – polega na wyznaczeniu zależności pomiędzy powierzchniami pików dla każdej z oznaczanych substancji i ich stężeniem. W tym celu przygotowuje się roztwory kalibracyjne, tzn. roztwory substancji oznaczanej albo mieszaniny analizowanych substancji w kilku różnych stężeniach. Po wprowadzeniu ich na kolumnę, na podstawie uzyskanych chromatogramów, wyznacza się krzywą kalibracyjną. Następnie wprowadzana jest do kolumny badana próbka, a uzyskane powierzchnie pików substancji oznaczanych w nieznannej próbce, umożliwiają oznaczenie ich zawartości [82].

4. Popularne metody rozdzielania i detekcji składników próbki używane w celu poszukiwania potencjalnych, nowych biomarkerów

Poszukiwanie nowych biomarkerów w próbkach pochodzenia biologicznego sprawia wiele trudności, głównie ze względu na złożoność badanych matryc biologicznych. Rozdzielenie i detekcja składowych skomplikowanej mieszaniny jest równie istotna, jak odpowiednie przygotowanie próbki do analizy omawiane wcześniej. Zastosowanie połączeń dwóch lub więcej zaawansowanych technik analitycznych, umożliwia często zdobycie wielu kluczowych informacji – zarówno jakościowych, jak i ilościowych – o badanych związkach w próbkach.

4.1. Jednokierunkowa elektroforeza żelowa w żelu poliakrylamidowym (ang. one-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, 1D-PAGE)

Dawne trendy w analizie prowadzonej dla wysoce skomplikowanych mieszanin białek (proteomika, fosfoproteomika), szczególnie w podejściu „*top down*”, ale również „*bottom up*” (w tym drugim przypadku po trawieniu enzymatycznym), skłaniały do wstępnego prefrakcjonowania mieszanin za pomocą jednokierunkowej elektroforezy żelowej, 1D-PAGE albo – jeszcze częściej – dwukierunkowej elektroforezy żelowej, 2D-PAGE [83]. Rozdzielone białka były następnie wybarwiane na żelu standardowymi preparatami (np. Coomassie Brilliant Blue albo jonami srebra). Najczęstszą metodą wybarwiania żelu jest umieszczenie go w roztworze Coomassie Brilliant Blue; granica wykrywalności jest tutaj jednak wysoka, gdyż barwnik ten umożliwia wykrycie około 10-100 µg białka w próbce. Użycie zaś barwników, których podstawą są sole srebra, umożliwia uzyskanie wyższej czułości i pozwala na wykrycie nanogramowych ilości białek. Niemniej technika ta wymaga dodatkowych etapów barwienia i dokładnej kontroli każdego z etapów procesu, czego nie trzeba wykonywać przy barwieniu Coomassie Brilliant Blue [84].

1D-PAGE to często używana technika pozwalająca na określenie masy cząsteczkowej (ang. *molecular weight*, MW) białek w warunkach denaturujących [83]. W technice tej mamy do czynienia z rozdzieleniem białek zgodnie z ich zdolnością do poruszania się po przyłożeniu określonego natężenia do systemu elektroforetycznego. Dzięki dodatkowi dodecylsulfianu sodu (SDS) do roztworu podczas przygotowania próbki oraz wysokiej temperatury inkubacji, następuje denaturacja białek i zniszczenie ich struktury drugorzędowej i wyższych. Ponadto, SDS oplaścza białka, proporcjonalnie do ich masy cząsteczkowej i dzięki temu uzyskują one jednakowy ładunek ujemny, a ich rozdzielanie za pomocą 1D-PAGE zależy tylko od masy cząsteczkowej białka.

Procedura 1D-PAGE należy do względnie łatwych i trwa kilka godzin. Obecnie najczęściej używanym rodzajem żelu jest żel poliakrylamidowy. Jest on obojętny chemicznie, a dodatkowo, odpowiednio dobrane warunki przygotowania żelu pozwalają na modyfikację wielkości jego porów.

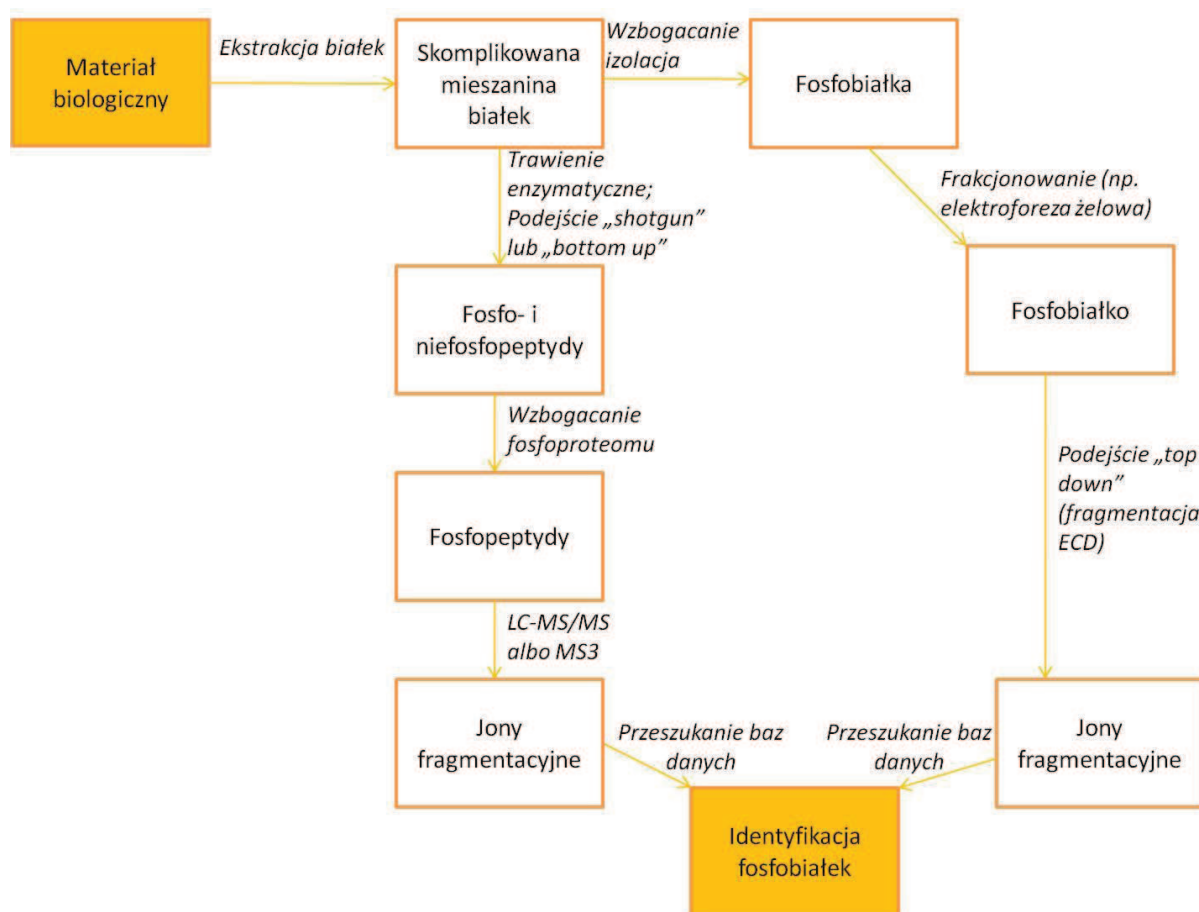
Technika 2D-PAGE opiera się na dwóch ortogonalnych metodach rozdzielania. W pierwszym wymiarze białka rozdzielane są na podstawie ich punktów izoelektrycznych. W drugim wymiarze białka są dalej rozdzielane na podstawie ich mobilności elektroforetycznej zależnej od masy cząsteczkowej białka, przy użyciu żeli SDS-PAGE. Następujące potem wybarwienie żeli (jak to miało miejsce w przypadku 1D-PAGE), pozwala na wizualizację i ilościowe określenie poszczególnych białek [85].

Obecnie techniki żelowe stosowane są rzadziej, lecz i tak można zaobserwować ich rozwój. Ich znamienym plusem jest dostępność w niemal każdym laboratorium analitycznym. Detekcja białka po rozdzieleniu i wybarwieniu na żelu, prowadzona jest jednak później przy użyciu spektrometru mas, a analiza ta wymaga niezmiernie czasochłonnego przygotowania, gdyż często odczynniki stosowane do wybarwiania żelu w celu wizualizacji białek, nie są kompatybilne z detektorem MS. Co więcej, używane w czasie procesu sole, barwniki i inne odczynniki, muszą być dokładnie usunięte przed wprowadzeniem próbki do spektrometru mas.

4.2. Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (ang. liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)

Wysoka specyficzność i czułość techniki LC-MS sprawiła, że stała się ona szeroko stosowana w celu identyfikacji cząsteczek o istotnym znaczeniu biologicznym (np. biomarkerów) w płynach ustrojowych pacjentów [87]. Technika ta umożliwia początkowe frakcjonowanie próbki na mniej skomplikowane podzbiory, które porcjami docierają do detektora MS [22]. Próbka docierająca do detektora MS musi bowiem przejść długą drogę z kolumny LC, poprzez komory spektrometru mas, a każdy z etapów służy dostarczeniu jak najmniej skomplikowanej, bogatej tylko w istotne dla badania anality, próbki do detektora. Obecnie, w czasie jednej analizy przy użyciu tandemowego detektora mas (MS/MS), można zidentyfikować pojedyncze cząsteczki, nawet z bardzo skomplikowanych mieszanin. Przykładowy schemat eksperymentu fosfoproteomicznego, dążącego do analizy wszystkich ufosforylowanych białek w badanej próbce, został przedstawiony na Rycinie 7. Po ekstrakcji białek z materiału biologicznego (np. krwi, osocza), skomplikowaną mieszaninę białek poddaje się trawieniu enzymatycznemu i oczyszczaniu (podejście nazwane w proteomice

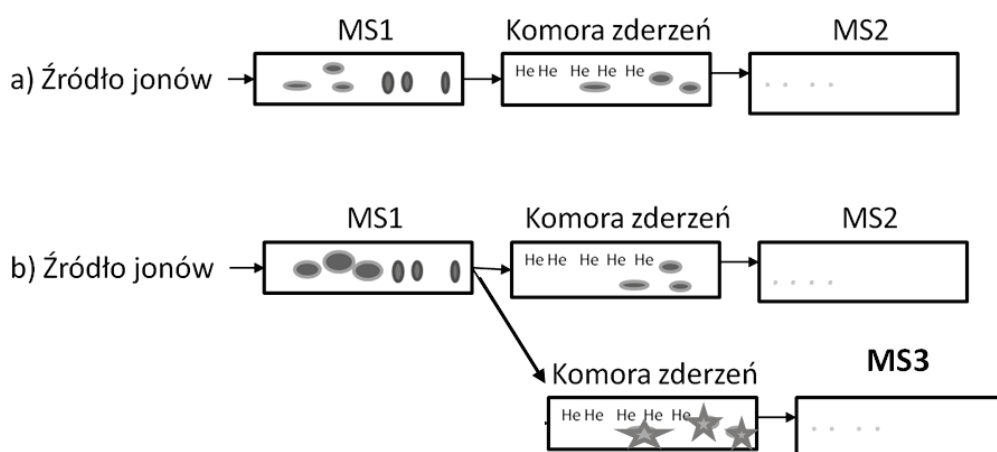
„shotgun” – jeśli trawienie odbywa się w roztworze, lub „bottom up” – jeśli przed trawieniem używane jest rozdzielanie białek na żelu poliakrylamidowym) [88,89], a otrzymane peptydy, po wzbogaceniu frakcji ufosforylowanych peptydów, izolowane i frakcjonowane są za pomocą techniki chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas (LC-MS/MS). Jony fragmentacyjne powstające w spektrometrze mas, służą do identyfikacji fosfobiałek obecnych w badanym materiale. Jest to możliwe dzięki zderzeniom protonowanych peptydów z jonami gazu obojętnego, najczęściej helu, azotu lub argonu. Podczas fragmentacji indukowanej kolizyjnie – CID – fosfopeptydów, otrzymuje się widma zwykle zdominowane przez pik pochodzący z utraty grupy obojętnej o masie 98 Da (strata H_3PO_4) lub o masie 80 Da (oderwanie HPO_3) niższej niż masa jonu macierzystego (prekursorowego).



Rycina 7. Uproszczony schemat analizy fosfobiałek za pomocą rozdzielania przy użyciu chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas. Legenda: ECD – rozpad poprzez wychwytywanie elektronu, LC-MS/MS – chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas; MS3 – fragmentacja wieloetapowa (trój etapowa). Na podstawie [24].

Z uwagi na fakt, że piki jonów fragmentacyjnych służące do zobrazowania sekwencji aminokwasowej peptydu, są najczęściej słabo zaznaczone, można wykorzystać wieloetapową fragmentację fosfopeptydu, zwaną MS3 (MS/MS/MS). W MS3 poprzez fragmentację jonu powstającego podczas odczepienia grupy fosforanowej, uwidaczniają się strukturalne jony peptydu i sekwencja białka zostaje odtworzona. Wstępne przemiatanie służy określeniu masy i ładunku jonu prekursorowego (widmo mas, MS1), następnie analizator mas jest ponownie napełniany jonami peptydów i następuje izolacja jonu macierzystego wybranego do fragmentacji (MS/MS, MS2). Uzyskane tak widmo może być zdominowane przez utratę jonu obojętnego. Z tego względu następny etap obejmuje ponowne zapełnienie pułapki jonowej i jon macierzysty jest izolowany, a następnie fragmentowany, a w drugiej kolejności izolowany i fragmentowany jest jon utraty grupy fosforanowej (MS/MS/MS, MS3) (Rycina 8). Przy zastosowaniu odpowiednich metod znakowania izotopowego lub stosując analizę *label free*, możliwa jest również analiza ilościowa zidentyfikowanych białek.

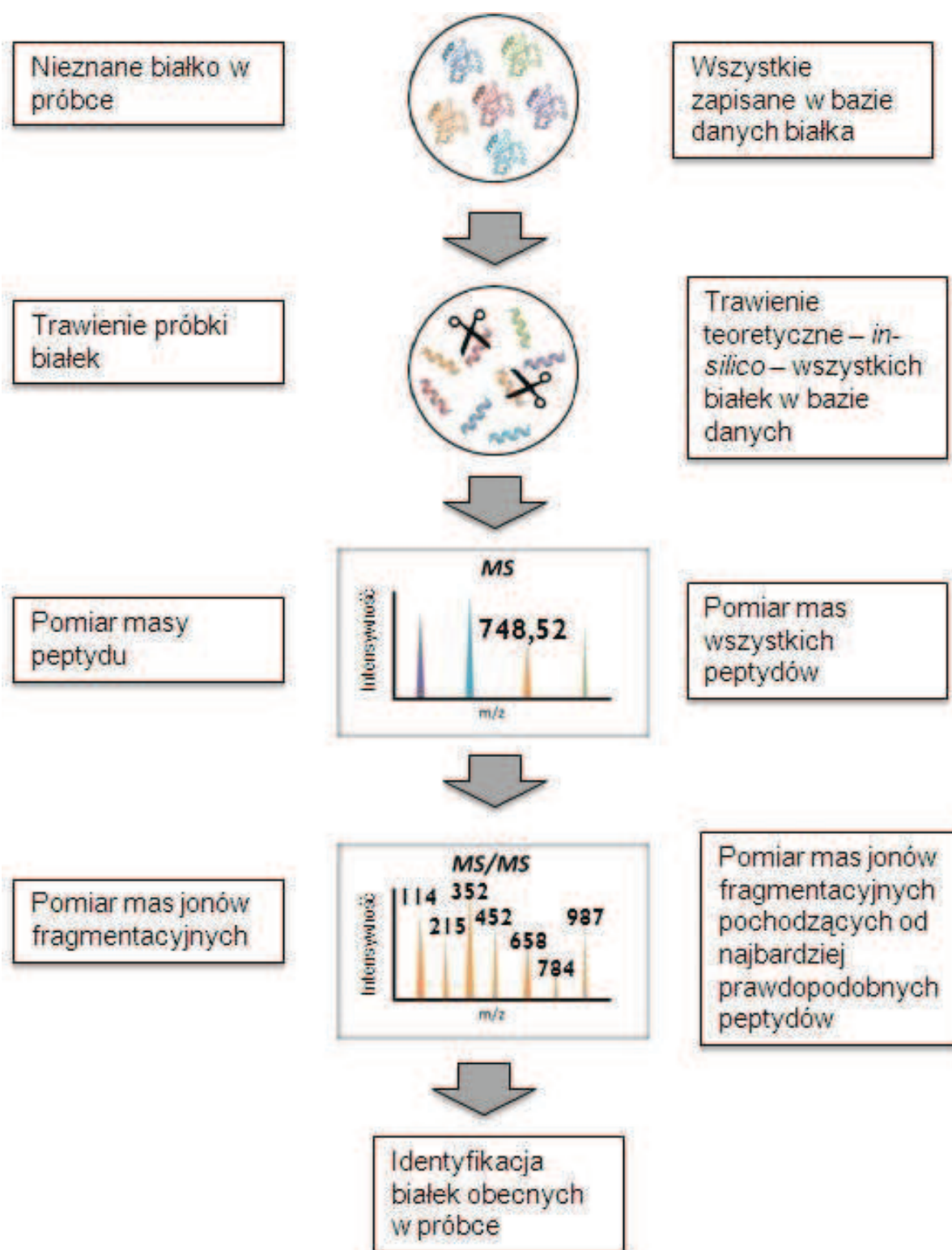
Kolejnym podejściem w proteomice, jak również w fosfoproteomice, jest tzw. podejście „*top down*”, które analizuje białka w całości, bez uprzedniego ich trawienia [89] (Rycina 7). Używana jest do ich analizy również technika LC-MS/MS, niemniej fragmentacja – w odróżnieniu od podejścia „*bottom up*” – w spektrometrze mas następuje poprzez rozpad z wychwytem elektronów (ang. *electron capture dissociation*, ECD) [90]. ECD polega na skierowaniu wiązki elektronów o niskiej energii do komory, w której utrzymywane są jony. Jony (naładowane dodatnio) wychwytyują elektrony, co powoduje ich fragmentację. Kolejnym etapem w podejściu „*top down*” jest identyfikacja fosfobiałek, na podstawie jonów fragmentacyjnych, jak to miało miejsce w technice *bottom up* (Rycina 7).



Rycina 8. Schemat trybu pracy spektrometru mas MS/MS (a) oraz MS3 (b). Legenda: He – hel, ○ jony analizowanych substancji, ☆ jony grupy fosforanowej. Na podstawie [24].

Identyfikacji białek dokonuje się zwykle poprzez porównanie otrzymanych eksperymentalnie fragmentów peptydów z tymi znajdującymi się w bogatych bazach danych zawierających wszystkie możliwe teoretycznie peptydy powstałe w czasie fragmentacji odpowiadającym im białek [91,92]. Przeszukiwania baz danych dokonuje się z użyciem odpowiednich oprogramowań, takich jak na przykład Mascot Sequest czy X!Tandem [93]. Mascot należy do jednych z najczęściej używanych programów do identyfikacji peptydów powstałych po trawieniu proteolitycznym białek (czyli jak to ma miejsce w podejściu „shotgun” oraz „bottom up”). Zasadę działania najkrócej można zobrazować Ryciną 9. Mascot dokonuje teoretycznego trawienia – tzw. *in silico* – wszystkich białek z wybranej bazy danych [na przykład z bazy danych Narodowego Centrum Informacji Biotechnologicznej (ang. *National Center for Biotechnology Information*, NCBI)] dokładnie według procedury użytej w danym eksperymencie, wyszukując wśród wszystkich sekwencji jonów te o masach zbliżonych do jonów otrzymanych eksperymentalnie. Następnie symulowane jest teoretyczne widmo fragmentacji peptydu i porównywane są wyniki z zarejestrowanym widmem MS/MS. Algorytm bierze pod uwagę jony „b” i „y” jeśli – tak jak w prezentowanym, przykładowym badaniu na Rycinie 9 – widma te uzyskano korzystając z fragmentacji CID [94,95]. Ważne jest również „nauczenie” Mascota, jak przebiegał eksperyment w laboratorium, aby takie same warunki trawienia i detekcji można było zaimplementować w programie, w celu przeprowadzenia teoretycznej symulacji.

Na podstawie otrzymanych widm masowych z zastosowaniem opisanych narzędzi bioinformatycznych, możliwa jest identyfikacja wszystkich białek obecnych w badanej próbce.



Rycina 9. Schemat identyfikacji białek w próbce na podstawie przeszukiwania baz danych. Fragmentacja wykonana dla przykładowego peptydu o masie 748,52 Da, który rozpada się na przykładowe jony fragmentacyjne (zilustrowane w części MS/MS), dzięki czemu możliwa jest identyfikacja białek w badanej próbce.

4.3. Elektroforeza kapilarna sprzężona z detektorem spektrofotometrycznym UV/VIS (ang. capillary electrophoresis coupled with UV/VIS detector, CE-UV/VIS)

Elektroforeza kapilarna (CE) należy do wysokosprawnych, rozdzielczych technik analitycznych. Od czasu jej opracowania w latach 60-tych, jest uważana za technikę komplementarną do chromatografii cieczowej ze względu na łatwość stosowania i wysoką zdolność rozdzielczą. Ponadto, wymaga małej objętości próbki oraz odczynników tak, aby przeprowadzić rozdzielenie i identyfikację badanych związków z materiału biologicznego.

Termin elektroforeza można zdefiniować jako ruch cząsteczek obdarzonych ładunkiem pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego. W CE mamy do czynienia jeszcze z drugim zjawiskiem fizycznym – elektroosmozą, czyli objętościowym przepływem cieczy w kapilarze pod wpływem pola elektrycznego (ang. *electroosmotic flow*, EOF). U podstaw rozdzielania elektroforetycznego leży różnica w prędkościach migracji cząsteczek obdarzonych ładunkiem w polu elektrycznym. Rozdzielanie składników próbki odbywa się w buforze podstawowym (zwanym również buforem separacyjnym), którego skład i pH można zmienić tak, aby poprawić rozdzielczość i selektywność metody. Możliwe jest też zastosowanie różnych modyfikacji CE, które pozwalają na użycie tej techniki dla szerszej grupy związków. Wśród bardzo chętnie stosowanych odmian CE znajduje się micelarna elektrokinetyczna chromatografia (ang. *micellar electrokinetic chromatography*, MEKC) [96]. Dzięki zastosowaniu surfaktantów, takich jak na przykład dodecylosiarczan sodu (SDS), w MEKC można rozdzielić nawet te cząsteczki, które nie posiadają ładunku elektrycznego – czego podczas podstawowej elektroforezy nie sposób było dokonać. Migracja determinowana jest tu głównie hydrofobowością analitów i stopniem powinowactwa do miceli. Dzięki prężnemu rozwojowi CE i pojawianiu się nowych odmian techniki (jak np. MEKC), umożliwiających analizę szerokiego spektrum związków, takich jak aminokwasy, białka, jony metali, substancje lecznicze, produkty naturalne, jest to technika chętnie stosowana w celu poszukiwania nowych biomarkerów chorób [97,98].

II. CEL PRACY

Celem nadrzędnym rozprawy doktorskiej była optymalizacja zaawansowanych metod bioanalitycznych podczas poszukiwania i oceny potencjalnych, nowych biomarkerów wybranych nowotworów pochodzenia neuroendokrynnego u dorosłych i dzieci.

W pierwszym etapie badań przeprowadzono analizę proteomiczną białek wydzielanych przez komórki rzadkiego typu nowotworu – guzów neuroendokrynnych (NET) – celem oceny możliwości identyfikacji potencjalnych, nowych biomarkerów ich wczesnej detekcji. Dodatkowo uwzględniono dwa rodzaje fenotypów guzów neuroendokrynnych (wydzielający lub niewydzielający określone, białkowe substancje biologicznie aktywne na zewnątrz komórek guza). Podjęto próbę wytypowania tych białek, celem weryfikacji możliwości zakwalifikowania nowotworu pod kątem danego fenotypu. Wykorzystano zoptymalizowaną metodę bioanalityczną bazującą na technice jednokierunkowej elektroforezy żelowej (1D-PAGE) oraz technikach sprzężonych: chromatografii cieczowej i tandemowej spektrometrii mas (LC-MS/MS). Następnie została ona zastosowana do analizy próbek, które stanowił roztwór znad pierwotnych hodowli komórek guzów neuroendokrynnych pobranych uprzednio śródoperacyjnie od pacjentów. Ciekawe profile białkowe uzyskano dla nowotworu neuroendokrynnego trzustki, i właśnie to zestawienie białek analizowano pod kątem identyfikacji potencjalnych biomarkerów białkowych nieprawidłowo wydzielanych w czynnym guzie neuroendokrynnym trzustki.

Druga część pracy obejmowała optymalizację metody jakościowej i ilościowej analizy fosfoproteomicznej podczas badania fosfobiałek zaangażowanych w powstawanie ostrego stanu zapalnego trzustki na przykładzie modelu zwierzęcego myszy (C57BL/6). Stan zapalny to istotny czynnik także z punktu widzenia patogenezы nowotworów trzustki. Jednakże wciąż brakuje bardziej szczegółowych informacji odnośnie białek i fosfobiałek zaangażowanych w rozwój nowotworów trzustki. Podjęto się próby optymalizacji metody bioanalitycznej opartej na technikach chromatografii cieczowej i tandemowej spektrometrii mas (LC-MS/MS) w celu ilościowej analizy fosforylowanych białek ekstrahowanych z tkanki mysiej trzustki. W szczególności skoncentrowano się na usprawnieniu tych etapów eksperymentu, które dotyczyły analizy fosfoproteomicznej (w porównaniu ze standardową analizą proteomiczną). Podjęto się próby wyboru najwłaściwszej, dla wybranego materiału biologicznego, metody ekstrakcji fosfobiałek, wzbogacania frakcji fosfobiałkowej, znakowania izotopowego fosfopeptydów podczas ich względnej analizy ilościowej oraz selekcji odpowiednich narzędzi bioinformatycznych podczas analizy otrzymanych widm mas i widm fragmentacyjnych, służących do ostatecznej identyfikacji fosfobiałek obecnych w próbkach.

W trzeciej części badań skoncentrowano się na optymalizacji metody analizy biomarkerów małowcząsteczkowych (wybranych amin biogennych i ich metabolitów) u dzieci z neuroblastomą (NB), neuroektodermalnym nowotworem wieku dziecięcego (MNTI) lub nowotworem podścieliskowym przewodu pokarmowego (GIST). Opracowano odpowiednio czułą i specyficzną metodę identyfikacji dziesięciu wybranych związków z grupy amin biogennych i ich metabolitów przy użyciu techniki micelarnej elektrokinetycznej chromatografii z detekcją z zastosowaniem detektora UV/VIS z matrycą diodową (MEKC-UV/VIS). Usprawniono także metodę ekstrakcji analitów z matryc biologicznych (metodę ekstrakcji typu ciecz-ciecz). Po optymalizacji i zwalidowaniu metody, została ona zastosowana podczas oznaczania dodatkowo trzech metabolitów amin biogennych – kwasu homowanilinowego (HVA), kwasu wanilinomigdałowego (VMA) oraz kwasu dihydroksyfenylooctowego (DOPAC) – ekstrahowanych z moczu pacjentów z neuroblastomą, neuroektodermalnym nowotworem wieku dziecięcego lub nowotworem podścieliskowym przewodu pokarmowego.

Zoptymalizowane metody analizy biomarkerów (białkowych i niebiałkowych) były przedyskutowane pod kątem ich przydatności diagnostycznej.

III. METODYKA

1. Analiza proteomiczna guzów neuroendokrynych w celu oceny i poszukiwania potencjalnych, nowych, białkowych biomarkerów dla ich wczesnej detekcji

1.1. Odczynniki i aparatura

Pożywkę RPMI-1640 z L-glutaminą, płodową surowicę bydlęcą (FBS) zakupiono w CytoGen (Princeton, NJ, USA). Wzorce masowe białek do SDS-PAGE, wysokiej czystości mocznik, dodecylosiarczan sodu (SDS), β -merkaptoetanol, Dodeca™ Silver Stain Kit oraz Coomassie Brilliant Blue G-250 pozyskano z Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Wodę dejonizowaną otrzymano za pomocą aparatu do oczyszczania wody Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, USA). Natomiast Calbiochem® ProteoExtract Albumin/Immunoglobulin (IgG) removal kit – zestaw do usuwania albumin i immunoglobulin – został zakupiony w Merck (Darmstadt, Niemcy). Odczynniki do redukcji i trawienia białek w żelu: jodoacetamid (IAA), ditiotretitol (DTT), pozyskano z Fluka (St. Louis, MO, USA), a trypsynę (Sequencing Grade Modified Trypsin) z Promega (Madison, USA). Penicylinę, streptomycynę, insulinę, transferynę, selenek sodu, pirogronianu sodu, ludzki nabłonkowy czynnik wzrostu, trójiodotyroninę, hydrokortyzon, wodorowęglan amonu, kwas octowy, metanol (MeOH), kwas trifluorooctowy (TFA), acetonitryl (ACN), kwas mrówkowy (FA), kwas solny (HCl) zakupiono w Sigma (St. Louis, MO, USA).

Do hodowli komórek użyto nylonowych sterylnych sitek (BD Biosciences Becton, Warszawa, Polska) i płytek komórkowych (Sarstedt, Niemcy). Do liczenia komórek w hodowlach użyto hemocytometru Neubauera zakupionego w firmie Brand (Wertheim, Niemcy). Użyto aparatu do elektroforezy – Mini-PROTEAN® 3 Cell apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), a skanowanie żeli przeprowadzono przy użyciu HP Scanjet G3010 Photo Scanner (Hewlett-Packard, Boise, USA). Analizę i detekcję białek dokonano z zastosowaniem chromatografu cieczowego sprzężonego z tandemowym spektrometrem mas (LC-MS/MS): nanoACQUITY Ultra Performance LC® system (Waters, Milford, MA, USA), połączonego ze spektrometrem mas Orbitrap Velos Pro (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Wszystkie próbki przechowywane były w probówkach typu Eppendorf (Hamburg, Niemcy). Do analizy danych ze spektrometru mas korzystano z algorytmu Mascot (Mascot Daemon v. 2.3.0, Mascot Server v. 2.4.0), przy użyciu oprogramowania Mascot Distiller (wersja 2.3; MatrixScience, Londyn, Wielka Brytania).

1.2. Grupa badana i kontrolna

Analiza proteomiczna guzów neuroendokrynych (NET) obejmowała badanie roztworów znad pierwotnych hodowli komórkowych komórek otrzymanych od 11 pacjentów ze zdiagnozowanymi guzami NET. Pacjenci zostali zakwalifikowani do badania na podstawie przedoperacyjnego obrazu klinicznego (badanie podmiotowe, przedmiotowe, badania obrazowe i laboratoryjne). Rozpoznanie wstępne zostało postawione w Katedrze i Klinice Endokrynologii i Chorób Wewnętrznych GUMed. Pacjenci wyrazili świadomą zgodę na udział w badaniu. Protokół badania został zatwierdzony przez Niezależną Komisję Bioetyczną GUMed (NKEBN/25/2010). Hodowla pierwotnych linii komórkowych, jak również przygotowanie próbek kontrolnych odbyła się w Zakładzie Biologii Komórki Katedry Biotechnologii Medycznej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (MWB UG-GUMed).

1.3. Przygotowanie pierwotnych hodowli komórkowych guzów neuroendokrynych do badań proteomicznych oraz próbek kontrolnych

W warunkach sterylnych, izolowano fragmenty guzów NET w czasie zabiegów operacyjnych przeprowadzanych w Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej i Klinice Chirurgii Ogólnej, Endokrynologicznej i Transplantacyjnej GUMed. Tkanekę guza umieszczoną w pożywce RPMI-1640 z L-glutaminą, antybiotykami (penicylina – 100 U/mL, streptomycyna – 0,1 mg/mL), bez dodatku płodowej surowicy bydlęcej (ang. *fetal bovine serum*, FBS) (nazywanej dalej pożywką podstawową) w temperaturze pokojowej transportowano do Zakładu Biologii Komórki. Przed dalszą obróbką, fragmenty inkubowano przez 20 min w pożywce podstawowej z dodatkiem wysokiego stężenia antybiotyków przeciwbakteryjnych (penicylina – 1000 U/mL, streptomycyna – 1 mg/mL). Kolejno, umieszczono próbki guza na szalkach Petriego (92 mm średnicy). Usuwano tłuszcz i okalające próbkę guza tkanki łączne i cięto tak oczyszczone fragmenty guza skalpelem na jak najmniejsze fragmenty. Przecierano rozdrobniony materiał przez oczka (średnica 100 μ m) nylonowego sterylnego sitka do probówki 50 mL. Sitko jednocześnie przemywano pożywką podstawową, po czym odwirowano uzyskaną zawiesinę komórkową przez 5 min (1 000 g, 25°C), a komórki poddano szokowi osmotycznemu w celu hemolizy erytrocytów. Wirowanie wykonano powtórnie stosując te same parametry. Następnie zawieszono osad komórkowy w pożywce pełnej (pożywka podstawowa uzupełniona 10% FBS) lub pożywce pełnej bezsurowiczej. Pożywkę pełną bezsurowiczą uzupełniono o suplementy: ITS Liquid Media Supplement (10 μ g/mL insuliny, 5,5 μ g/mL transferyny oraz 29 nM selenku sodu), 1 mM pirogronianu sodu,

10 ng/mL ludzkiego nabłonkowego czynnika wzrostu, 0,1 nM trójiodotyroniny, 50 nM hydrokortyzonu oraz 100 U penicyliny i 100 µg/mL streptomycyny. Podane stężenia są stężeniami końcowymi w pożywce.

Policzono komórki przy użyciu hemocytometru Neubauera, rozdzielono do dołków 24-dółkowej płytki w ilości 8×10^5 komórek (800 tysięcy) na jeden dołek w 1 mL pożywki (ta sama procedura dla obu typów pożywek). Do pustych dołków dodawano obie czyste pożywki, bez komórek nowotworowych, w celu uzyskania próbki kontrolnej tła białkowego wynikającego z dodatków będących częścią składową pożywek (FBS lub suplementy) i ich rozkładowi pod wpływem inkubacji w 37°C.

Ostatecznie, przeprowadzono 72-godziną inkubację próbek w inkubatorze CO₂ w 37°C i zebrano roztwory z nad hodowli (supernatanty), po czym odwirowano (1 000 g, 10 min) i przeniesiono do ampulek odpornych na niskie temperatury. Probówki opisano zgodnie z miejscem i sposobem hodowli. Podzielono próbki na dwie grupy: próbki NET supernatant z FBS (**NET sup. FBS**) albo supernatant bezsurowiczy (**NET sup. bez FBS**). Osobno zebrano czyste pożywki, odwirowano je (1 000 g, 10 min) i przeniesiono do ampulek, po czym odpowiednio opisano: NET pożywka FBS (**NET med. FBS**) oraz NET pożywka bezsurowicza (**NET med. bez FBS**).

W Tabeli 2 przedstawiono listę wszystkich próbek analizowanych podczas badania.

Tabela 2. Typy NET, których analizę przeprowadzono w ramach eksperymentu. Legenda: sup. – supernatant, med. – pożywka (ang. *medium*), FBS – płodowa surowica bydlęca. Na podstawie [84].

TYP NET	LOKALIZACJA	PRÓBKA NET	PRÓBKA KONTROLNA
Niewydzielający, nieczynny	Rakowiak płuc	NET 1 sup. FBS	NET 1 med. FBS
Niewydzielający, nieczynny	Rakowiak płuc	NET 2 sup. FBS	NET 2 med. FBS
Wydzielający, czynny	Pierwotny rakowiak trzustki	NET 3.1 sup. FBS	-
Wydzielający, czynny	Przerzut do węzłów chłonnych	NET 3.2 sup. FBS	-
Niewydzielający, nieczynny	Rakowiak płuc	NET 4 sup. bez FBS	NET 4 med. bez FBS
Niewydzielający, nieczynny	Pierwotny rakowiak żołądka	NET 5 sup. bez FBS	NET 5 med. bez FBS
Niewydzielający, nieczynny	Atypowy rakowiak płuc	NET 6a sup. FBS	NET 6.1 med. FBS
Niewydzielający, nieczynny	Atypowy rakowiak płuc	NET 6b sup. bez FBS	NET 6.2. med. bez FBS
Niewydzielający, nieczynny	Rakowiak żołądka	NET 7 sup. bez FBS	NET 7 med. bez FBS
Niewydzielający, czynny	Rakowiak płuc	NET 8 sup. bez FBS	NET 8 med. bez FBS
Niewydzielający, nieczynny	Rakowiak płuc	NET 9 sup. bez FBS	NET 9 med. bez FBS
Niewydzielający, nieczynny	Rakowiak trzustki	NET 10 sup. bez FBS	NET 10 med. bez FBS
Niewydzielający, nieczynny	Rakowiak trzustki	NET 11 sup. bez FBS	NET 11 med. bez FBS

1.4. Wytrącanie i zagęszczanie białek do analizy

Początkowo dla próbek z dodatkiem FBS, zarówno badanych jak i kontrolnych, usuwano albuminy za pomocą zestawu laboratoryjnego *ProteoExtract Albumin/IgG Removal Kit*. Protokół na tym etapie eksperymentu instruował, aby pobrać każdorazowo 150 μ L próbki i dodać do niej 450 μ L buforu wiążącego, dostarczonego wraz z zestawem. Tak rozcieńczoną próbkę przenoszono na kolumnę typu SPE, której wypełnienie stanowiła matryca wybiórczo wiążąca najbardziej stężone białka osocza (głównie albuminę i immunoglobulinę G). Kolumna została wcześniej kondycjonowana, zgodnie z procedurą dostarczoną z zestawem do usuwania albumin. Filtrat zebrano do osobnej próbówki. Następnie kolumnę przemywano dwukrotnie 200 μ L buforu wiążącego i połączono eluat razem z pierwotnie zebrany filtrat. Ostatecznie objętość tak przygotowanej próbki wynosiła 1 mL.

Kolejnym etapem przygotowania próbki do analizy było jej zagęszczenie – procedurę zagęszczenia wykonano zarówno dla próbek badanych, jak i kontrolnych bezsurowiczych oraz tych z FBS. Każdą próbkę poddano działaniu roztworu do oczyszczania, zagęszczania i odsalania [skład roztworu: aceton/metanol z dodatkiem 1 mM HCl 1:1 (v/v)]. Cztery części roztworu do oczyszczania dodano do jednej części próbki. Po wytrząsaniu oraz inkubacji w temp. -20°C przez 1 godz., próbkę odwirowano w temp. 4°C (15 000 g, 15 min). Powstały supernatant oddzielono i odparowano na łaźni wodnej (45°C) pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie, rozpuszczono białkowy osad w 60 μ L wody dejonizowanej. Tak przygotowaną, zagęszczoną próbkę przeniesiono do czystej próbówki typu Eppendorf i zamrożono w temperaturze -20°C do czasu analizy.

1.5. Rozdzielanie białek z zastosowaniem techniki 1D-PAGE

Do rozdzielania białek ze skomplikowanej mieszaniny, otrzymanej w poprzednich etapach, zastosowano technikę 1D-PAGE. W tym celu do każdej próbki dodano buforu o składzie: Tris-HCl (pH 8,6), 2% dodecylosiarczan sodu (SDS), 40% glicerol, β -merkaptobetanol oraz 0,02% bromofenol. Osobno przygotowano również standardową mieszaninę białek, tak aby sprawdzić ciągłość procesu elektroforetycznego, ciągłość migracji białek i intensywność ich wybarwienia. W tym celu do roztworu standardowego dodano buforu w stosunku 1:1 (v/v).

Próbki testowe, kontrolne oraz standardową mieszaninę białek, umieszczono następnie na łaźni wodnej o temp. 100°C na 3 min, a następnie odwirowano (14 000 g, 10 min). Dodatek glicerolu do próbki podniósł jej ciężar właściwy i ułatwił naniesienie próbek na rynienki utworzone w żelu, podczas gdy bromofenol – barwnik o niebieskim zabarwieniu – umożliwił

obserwację poprawnego naniesienia próbki do rynienki żelu. Ostatecznie, 15 μ L każdej próbki nałożono na żel, po czym przyłożono na żel napięcie elektryczne o mocy 200 V i pozostawiono na 1 godz.

Do przeprowadzenia procesu elektroforetycznego użyto trzech różnych stężeń poliakrylamidu w żelu, aby uzyskać najlepsze rozdzielenie białek w próbkach supernatantów. Testowano poliakrylamid o stężeniu 5, 12 lub 15% w żelu. Najlepszy wgląd w całościowy skład białkowy próbek guzów i kontrolnych uzyskano, gdy stężenie poliakrylamidu w żelu wynosiło 12%. Natomiast skład buforu elektrodowego był stały; składał się on z 2,5 mM Tris, 0,192 M glicyny oraz 0,1% SDS.

Po zakończonym procesie elektroforetycznym, żełe wyjęto z aparatu do elektroforezy i wybarwiano rozdzielone białka za pomocą różnych barwników. Wypróbowano dwa najczęściej stosowane sposoby barwienia – z użyciem Coomassie Brilliant Blue i soli srebra.

W przypadku używania Coomassie Brilliant Blue, żełe wybarwiono 1% roztworem Coomassie Brilliant Blue G-250 przez 1 godz. zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta, a następnie odbarwiano roztworem zawierającym 10% etanolu oraz 10% kwasu octowego. Natomiast podczas drugiej procedury barwienia, postępowano dokładnie z instrukcją dostarczoną razem z zestawem do barwienia solami srebra. Kolejno: żełe utrwalano w dostarczonym przez producenta roztworze (30 min), przełożono do drugiego roztworu, gdzie zwiększano ich podatność na barwienie (30 min), przemywano trzykrotnie wodą dejonizowaną (5 min), barwiono solami srebra (20 min), przemywano wodą (1 min), wywoływano (10-30 min) oraz przemywano wodą dejonizowaną (10 min). Ostatecznie, wybrano metodę barwienia solami srebra za optymalną dla analizowanych próbek białkowych, gdyż umożliwiała ona uzyskanie wyższych granic wykrywalności. Z żeli barwione srebrem wycinano wyselekcjonowane frakcje białek, następnie przeprowadzono ich trawienie enzymatyczne i poddano analizie LC-MS/MS.

1.6. Trawienie białek i analiza za pomocą techniki LC-MS/MS

Analiza z użyciem spektrometru mas została wykonana w Laboratorium Spektrometrii Mas w Zakładzie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Przed analizą LC-MS/MS, kawałki żelu, po wycięciu prążków odpowiadających poszczególnym białkom, poddano trawieniu trypsyną według standardowej procedury. Procedura ta obejmowała: redukcję białek (30 min, 56°C) za pomocą 100 mM ditiotretolu, ich alkilację poprzez inkubację w ciemnym miejscu z jodoacetamidem (40 min), i ostateczne trawienie białek trypsyną. Do tego celu użyto roztworu trypsyny o stężeniu 10 ng/mL, przygotowanego

uprzednio przez rozpuszczenie enzymu w 25 mM wodorowęglanie amonu. Stosunek enzymu do białek wynosił 1:50. Trawienie prowadzono przez 12 godz. w temperaturze 37°C. Następnego dnia zakończono inkubację i wymyło peptydy z żelu za pomocą 0,1% wodnego roztworu TFA oraz 2% ACN. Otrzymane próbki wprowadzono do układu LC zawierającego przedkolumnę chromatograficzną pracującą w układzie faz odwróconych (RP-18). Zasadniczego rozdzielania mieszaniny dokonano na kolumnie nano-HPLC (średnica wewnętrzna 75 µm), również pracującej w odwróconym układzie faz (RP-18). Fazę ruchomą stanowiła faza A: woda z dodatkiem 0,1% FA i faza B: ACN. Użyto elucji gradientowej: 0-30% ACN. Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 250 nL/min. Wylot kolumny nanoLC został połączony ze spektrometrem mas poprzez źródło jonów typu jonizacji przez rozpylanie w polu elektrycznym (ang. *electrospray*, ESI). Instrument ustawiono na tryb dynamicznego przeskoku z trybu pracy MS do trybu MS/MS, dzięki czemu możliwa była rejestracja widm mas MS1 pozwalających na wyznaczenie masy peptydu oraz widm jonów fragmentacyjnych umożliwiających identyfikację obserwowanego peptydu. Fragmentacja pięciu najbardziej intensywnych jonów z każdego chromatogramu całkowitego prądu jonowego (TIC) dokonywała się w komorze kolizyjnej z wykorzystaniem niskoenergetycznej dysocjacji indukowanej zderzeniami – CID. Minimalną intensywność sygnału poddanego fragmentacji ustawiono na 10 000 zliczeń. Dane uzyskane ze spektrometru mas poddano analizie z wykorzystaniem zaawansowanych narzędzi bioinformatycznych. W prezentowanym badaniu użyto algorytmu Mascot, aby przeszukać bazę danych NCBI [zawierającą 17 351 384 sekwencji białek (5 948 435 699 fragmentów peptydowych)] celem identyfikacji białek w badanych próbkach. Podczas wyszukiwania zastosowano użyte do przeprowadzenia eksperymentu parametry, tak więc: trypsynę ustawiono jako enzym proteolityczny, tolerancję dokładności masy peptydów ustawiono na ± 40 ppm, zaś tolerancję dokładności mas fragmentów na $\pm 0,8$ Da. Pod uwagę wzięto masę monoizotopową białka z dopuszczeniem jednego miejsca, w którym nie odnotowano aktywności proteolitycznej trypsyny. Wśród stałych modyfikacji potranslacyjnych białek wybrano alkilację cysteiny i karbamidometylację, zaś oksydację metioniny wybrano jako modyfikację zmienną.

2. Fosfoproteomika w nowotworach endokrynych trzustki

2.1. Odczynniki i aparatura

Albumina surowicy bydłowej (BSA), IAA, α -kazeina, β -kazeina, bromek trietyloaminy (TEAB), kwas mrówkowy (FA), kwas trifluorooctowy (TFA), chlorek potasu (KCl), chlorek sodu (NaCl), amoniak, izotopy formaldehydu (CH_2O , CD_2O , $^{13}\text{CD}_2\text{O}$) oraz cyjanoborowodoru (NaBH_3CN , NaBD_3CN), kwas 2,5-dihydrobenzoesowy (2,5-DHB), kwas glikolowy, ceruleina, dimetylosulfotlenek (DMSO), tiomocznik, kwas 2-[4-(2-hydroksyetylo)(piperaz-1-yno)etanosulfonowy (HEPES), N-oktyloglukozyd i kwas octowy zostały nabyte w firmie Sigma (St. Louis, MO, USA). Wodorofosforan sodu (Na_2HPO_4), dwuwodorofosforan sodu (NaH_2PO_4) i mocznik zakupiono w firmie Merck (Darmstadt, Niemcy), jodoacetamid (IAA) i ditiotreitol (DDT) we Fluka (St. Louis, MO, USA), a trypsynę (Sequencing Grade Modified Trypsin) w Promega (Madison, USA). Inhibitory proteaz (Mini Complete) i fosfataz zakupiono w Roche Diagnostics (Barcelona, Hiszpania). Nukleaza zakupiona została w firmie Novagen (Darmstadt, Niemcy). Wszystkie odczynniki cechowały się stopniem czystości na potrzeby analityczne i zostały użyte bez dalszego oczyszczenia.

Homogenizacji białek dokonano z użyciem Precelys24 homogenizer (Bertin Technologies, Francja). W badaniu używano łaźni ultradźwiękowej (Bransonics, Danbury, CT, USA) oraz wirówki Eppendorf (Hamburg, Niemcy). Również z firmy Eppendorf (Hamburg, Niemcy) zakupiono probówki, które wykorzystywano w badaniach. Woda dejonizowana została uzyskana dzięki aparaturze Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Filtry do wirowania (Microcon 30) pozyskano z Merck (Darmstadt, Niemcy). Kolumny do znakowania typu SPE (SepPack C18) zostały pozyskane z Waters (Milford, MA, USA). Analizy zostały przeprowadzone z użyciem tandemowego spektrometru mas z analizatorem kwadropolowym (Q) i liniową pułapką jonową wraz z detektorem typu Orbitrap (ang. *Linear Trap Quadrupole (LTQ)-Orbitrap*) (Thermo Fisher Scientific, Waltman, MA, USA) z jonizacją przez nanorozpylenie w polu elektrycznym jako źródło jonów (nanoESI) (ProxeonBiosystem, Odense, Dania) sprzężonego z chromatografem cieczowym pracującym w odwróconym układzie faz i z użyciem nanoprzepływu fazy ruchomej (nanoRP-LC) (Eksigent, AB SCIEX Hiszpania). Titansphere Phos-TiO Kit (matrycę złożoną z tlenku tytanu, TiO_2) zakupiono w GL Sciences (Tokio, Japonia), a matrycę Ti^{4+} /IMAC uzyskano dzięki współpracy z Laboratorium Spektrometrii Mas mieszczącym się w Utrecht University (Holandia).

2.1. Przygotowanie próbek wzorcowych do analizy LC-MS/MS

2.1.1. Redukcja, alkilacja i trawienie białek

Do trawienia ProtMix (mieszanina białek standardowych – BSA wraz z α - i β -kazeiną w stosunku BSA:kazeina 3:1) zastosowano procedurę trawienia białek wspomaganą filtracją (ang. *filter aided sample preparation*, FASP). Próbkę białek (100 μ g) poddano procesowi redukcji przy użyciu 10 mM DTT (37°C, 1 godz.), alkilacji poprzez inkubację w ciemnym miejscu z IAA (40 min), po czym nałożono na wierzchołek filtra do wirowania o objętości 500 μ L, razem z 360 μ L 8 M mocznika i 100 mM TEAB o pH 8. Nadmiar odczynników do redukcji, alkilacji, nadmiar soli i związków powierzchniowo czynnych, usunięto poprzez wirowanie z użyciem 400 μ L 8 M mocznika w TEAB. Po zredukowaniu stężenia mocznika do 1 M, poprzez dodatek TEAB, białka trawiono przez 12 godz. w 25°C trypsyną w stosunku enzym:białka 1:50. W celu zatrzymania trawienia dodawano następnego dnia 50 μ L TFA. Strawione peptydy wymywano z filtrów poprzez wirowanie z 50 μ L 5 M KCl, aby nie dopuścić do niespecyficznego wiązania między materiałem filtrów a peptydami. Strawione próbki były przechowywane w -20°C do czasu analizy.

2.1.2. Znakowanie stabilnymi izotopami (reduktywna aminacja)

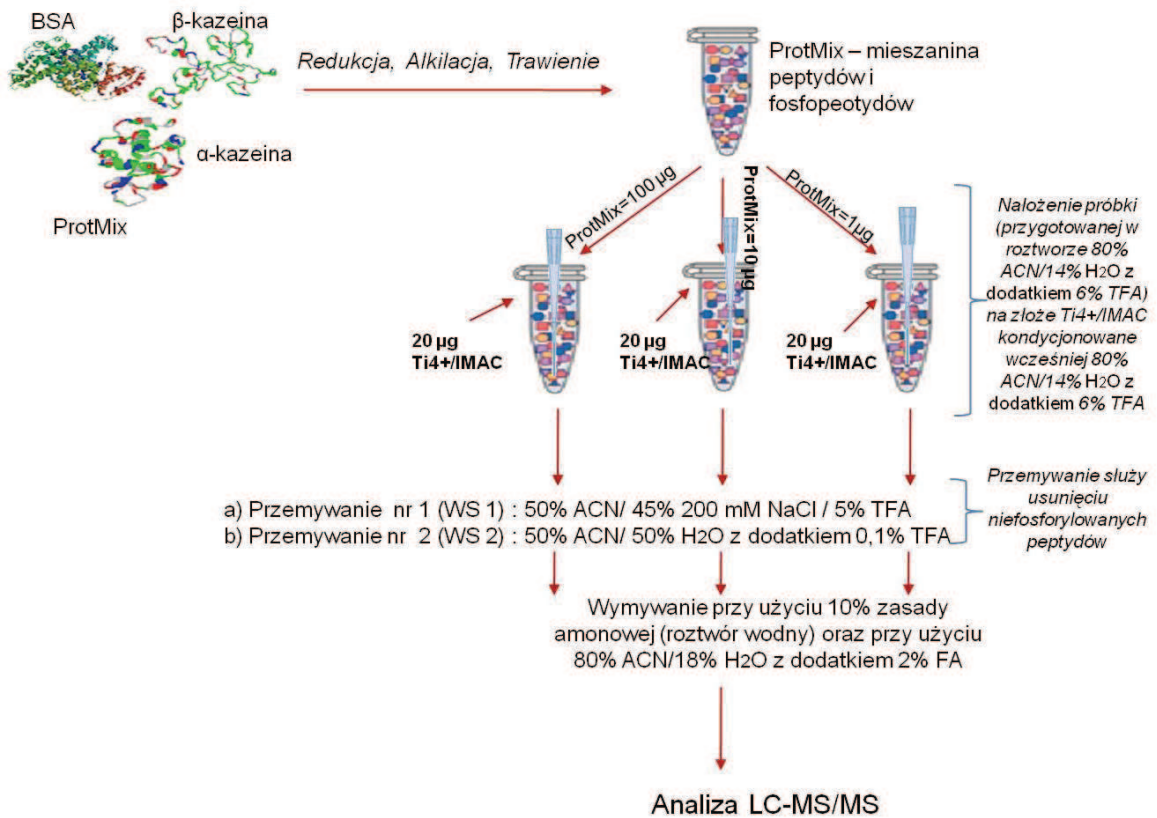
W prezentowanym badaniu podjęto się optymalizacji protokołu znakowania zaprezentowanego przez Boershema i współpracowników [77]. Zmodyfikowany protokół zastosowano do znakowania standardowej mieszaniny białek (ProtMix), aby następnie zastosować wypracowany schemat eksperymentalny do znakowania izotopowego ekstraktów tkankowych mysich trzustek. Dokładna procedura przygotowania próbek biologicznych do analizy ilościowej, przedstawiona jest w podrozdziale 2.2.3. Znacznikiem lekkim, pośrednim i ciężkim znakowano trzy takie same próbki ProtMix, tak aby wynik eksperymentu potwierdził kompletność znakowania wszystkich peptydów spodziewanych w próbkach, a następnie łączono je w stosunku 1:1:1 albo 1:5:10 (peptydy znakowane znacznikiem lekkim:peptydy znakowane znacznikiem pośrednim:peptydy znakowane znacznikiem ciężkim).

2.1.3. Wzbogacanie frakcji fosfobiałkowej

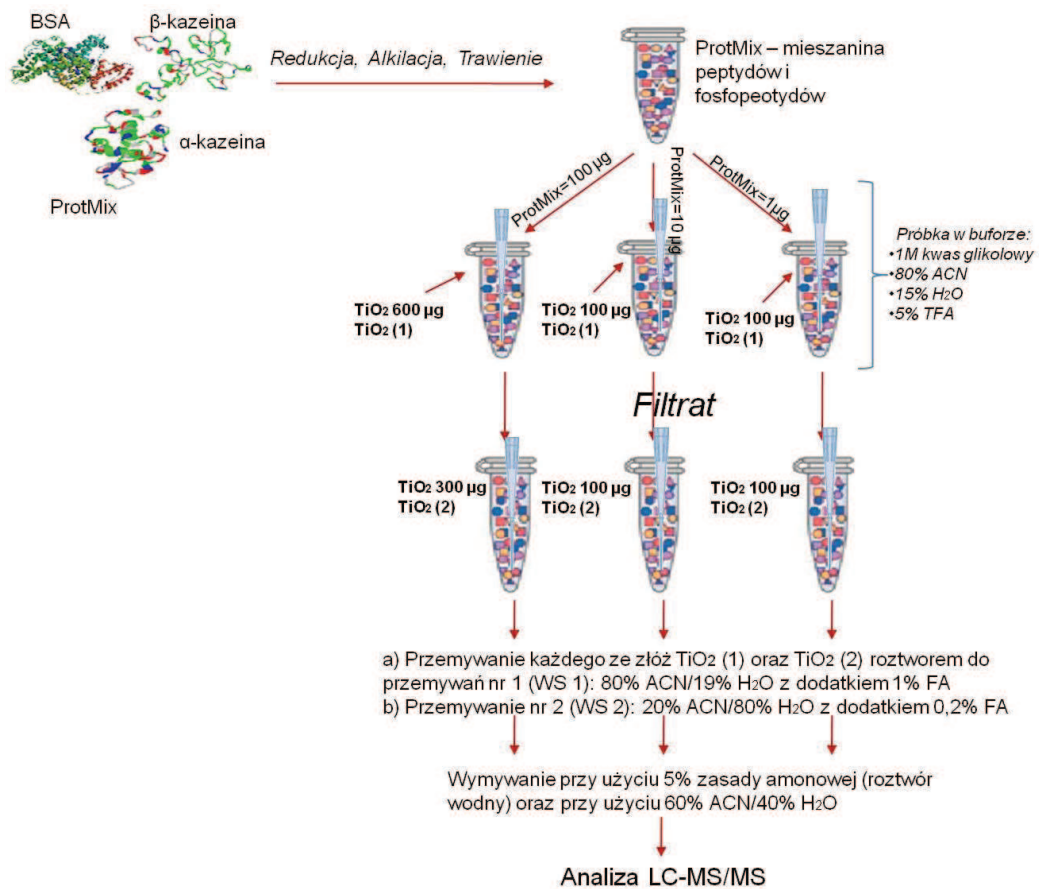
Optymalizacja tego etapu eksperymentu fosfoproteomicznego należała do najważniejszych, gdyż postanowiono zastosować nowo syntezowaną matrycę złożoną z chelatowo związanych jonów tytanu z matrycą z unieruchomionymi jonami metalami (Ti⁴⁺/IMAC). Do wzbogacenia próbki mieszaniny białek ProtMix zastosowano protokół Zhou

i współpracowników [68], do którego wprowadzono kilka zmian (Rycina 10). W pierwszym etapie, eksperyment zakładał dodanie na wcześniej kondycjonowaną 80% ACN/14% H₂O z dodatkiem 6% TFA matrycę, 100, 10 lub 1 µg wcześniej strawionej próbki ProtMix w roztworze złożonym z 80% ACN/14% H₂O z dodatkiem 6% TFA. Po wytrząsaniu (15 min) i wirowaniu (3 000 g, 5 min, 20°C) złożę przemywano mieszaniną o składzie: 50% ACN/45% 200 mM wodnego roztworu chlorku sodu/5% TFA, wirowano (4 500 g, 15 min, 20°C) i przemywano z użyciem 50% ACN/50% H₂O z dodatkiem 0,1% TFA. Następnie roztwory znad osadu po przemyciu odrzucano, i z matrycy wymywano fosfopeptydy przy użyciu 0,5 mL 10% zasady amonowej (roztwór wodny) oraz 0,5 mL 80% ACN/18% H₂O z dodatkiem 2% FA. Eluenty połączono i analizowano za pomocą techniki LC-MS/MS.

Dodatkowo, wydajność Ti⁴⁺/IMAC została porównana z dotychczas stosowaną w laboratorium proteomicznym Hiszpańskiego Narodowego Centrum Badań nad Rakiem (CNIO) techniką zagęszczania, a mianowicie z matrycą złożoną z tlenku tytanu (TiO₂). Zastosowano w tym celu modyfikację standardowej procedury wzbogacania przedstawioną przez Palmisano i współpracowników [99]. Nowością użytą w prezentowanym badaniu było podwójne zagęszczanie frakcji fosfopeptydowej przy użyciu złoża TiO₂ (Rycina 11). Wzbogaceni, jak w przypadku poprzedniego złoża, poddano 1, 10 albo 100 µg strawionej próbki ProtMix. Protokół zakładał nałożenie próbki mieszaniny białek ProtMix (przygotowanej w buforze złożonym z: 1 M kwasu glikolowego, 80% ACN, 15 % H₂O z dodatkiem 5% TFA) na 600 µg (dla próbki białek 100 µg) lub 100 µg (dla próbek białek 10 i 1 µg) złożę, odwirowanie (3 000 g, 5 min, 20°C) i przeniesienie filtratu na drugie złożę TiO₂ (ze zmniejszoną zawartością TiO₂ do odpowiednio: 300 µg dla próbki 100 µg ProtMix oraz 100 µg dla próbek 1 i 10 µg ProtMix), odwirowanie (3 000 g, 5 min, 20°C) i odrzucenie roztworu znad osadu. Następnie przemyto oba złoża dwukrotnie, stosując za pierwszym razem mieszaninę 80% ACN/19% H₂O z dodatkiem 1% TFA, zaś za drugim razem: 20% ACN/80% H₂O z dodatkiem 0,2% TFA. Za każdym razem wirowano próbkę (4 500 g, 15 min, 20°C) i odrzucano roztwór znad osadu. Po ostatnim przemywaniu, fosfopeptydy zatrzymane na matrycy wymywano poprzez zastosowanie 0,5 mL 5% zasady amonowej (roztwór wodny) oraz 0,5 mL 60% ACN/40% H₂O. Eluaty połączono i analizowano za pomocą techniki LC-MS/MS. Peptydy wymywano z kolumny z zastosowaniem 45-min programu elucji gradientowej (skład fazy ruchomej A: 2% ACN/98% H₂O z dodatkiem 0,1% FA, zaś fazy ruchomej B: 100% ACN z dodatkiem 0,1% FA) z przepływem fazy ruchomej 200 nL/min. Pozostałe parametry analizy zostały przedstawione w podrozdziale 2.2.4.



Rycina 10. Schemat zagęszczania próbki ProtMix z użyciem matrycy Ti⁴⁺/IMAC.



Rycina 11. Schemat zagęszczania próbki ProtMix z użyciem matrycy TiO₂.

2.2. Pochodzenie próbek biologicznych użytych do analiz

Mysz (łac. *Mus musculus*) jest najczęściej używanym do badań modelem zwierzęcym, z uwagi na dużą homologię genetyczną z człowiekiem [100,101]. W badaniu użyto szczepu mysiego C57BL/6 (n = 12). Jest to szczep wsobny obejmujący grupę zwierząt charakteryzujących się jednorodnością genetyczną i homozygotycznością. Ich genom jest w całości scharakteryzowany. Szczepy uzyskano dzięki współpracy z laboratoriami Hiszpańskiego Narodowego Centrum Badań nad Rakiem w Madrycie oraz współpracy z Profesorem Christopherem Proudem z Uniwersytetu w Southampton (Wielka Brytania). Trzustki pochodziły od sześciu 10-tygodniowych myszy C57BL/6 dzikiego typu Mnk1 (ang. *wild type*, WT) oraz sześciu 10-tygodniowych myszy C57BL/6 modyfikowanych genetycznie, które pozbawione były genu kodującego kinazę aktywowaną mitogenami, Mnk1 (ang. *knock-out*, KO).

Myszy były karmione i utrzymywane w wolnych od patogenów warunkach. Wszystkie eksperymenty zatwierdziła Komisja Etyczna do Spraw Zwierząt pracująca w instytucie w Madrycie (*Instituto de Salud Carlos III*), po czym przeprowadzono je według zaleceń przedstawionych przez *International Guiding Principles for Biomedical Research involving Animals*, wypracowanym przez *Council for International Organizations of Medical Sciences*.

2.2.1. Metoda wywoływania ostrego zapalenia trzustki na modelach zwierzęcych

Ostre zapalenie trzustki u myszy WT i KO wywoływano poprzez dootrzewnowe podawanie ceruleiny (analogu cholecystokininy) w roztworze soli fizjologicznej, ponieważ model ten jest powszechnie stosowanym sposobem badania ostrego zapalenia trzustki u ludzi na modelach zwierzęcych [102,103]. Mysiom kontrolnym podawano czysty roztwór soli fizjologicznej. Ostre zapalenie trzustki wywołano przez codzienne (całkowity czas trwania = 8 godz.) zastrzyki dootrzewnowe ceruleiny (50 µg/kg masy myszy), po czym uśmiercono zwierzęta poprzez przerwanie ciągłości kręgów szyjnych. Zwierzęta uśmiercono albo przed podaniem leku [te osobniki oznaczono jako „nie leczone” (ang. *not treated*, NT), czyli odpowiednio: WT NT, KO NT] albo po 8 godz. od pierwszego wstrzyknięcia (oznaczenie próbek: WT 8h, KO 8h). Trzustkę natychmiast oddzielano od reszty ciała, zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu analizy.

2.2.2. Ekstrakcja białek z próbek tkanek mysiej trzustki oraz późniejsze ich trawienie

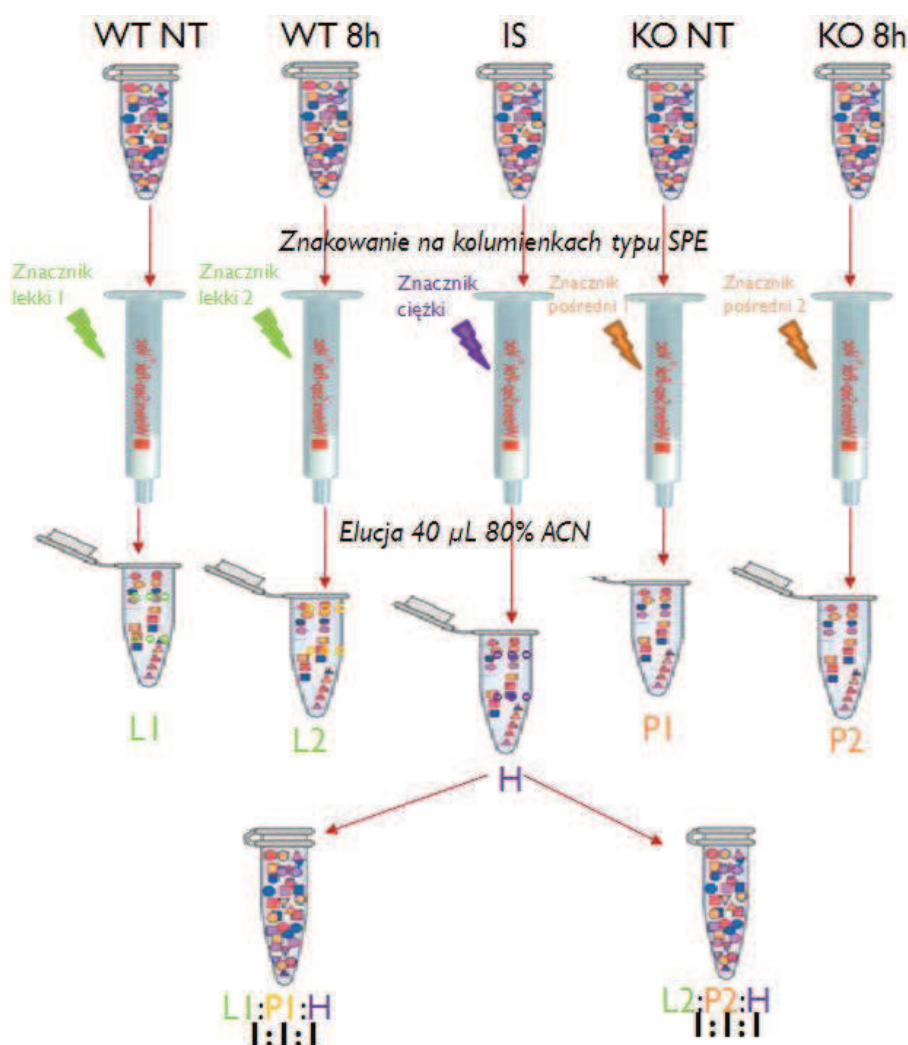
W celu ekstrakcji białek z tkanek trzustki do każdej ze zważonych uprzednio tkanek (około 0,2 g) dodano 850 µL buforu do lizy komórek złożonego z 7 M mocznika, 2 M

tiomocznika, 1% N-oktyloglukozydu, 10 mM DTT, 100 mM HEPES o pH 8,0 oraz z inhibitorów fosfataz i proteaz oraz 0,1% nukleazy. Ekstrahowano białka przy użyciu homogenizatora. Następnie próbkę poddano działaniu ultradźwięków przez 10 min na łaźni ultradźwiękowej i odwirowano (1 400 g, 15 min, 4°C). Zebrano odwirowany roztwór z nad osadu, a wyekstrahowane białka poddano redukcji, alkilacji i trawieniu enzymatycznemu z zastosowaniem trypsyny (według procedury opisanej w podrozdziale 2.1.1.). Należało jednak uwzględnić dezaktywację trypsyny w roztworze o dużym stężeniu mocznika [104]. Dlatego też, przed standardowym trawieniem, rozcieńczono próbki za pomocą TEAB do stężenia mocznika w próbce 1 M.

2.2.3. Zastosowanie zoptymalizowanego protokołu znakowania izotopowego dla próbek biologicznych

Peptydy uzyskane z tkanek trzustki, poddano procedurze znakowania według metody zoptymalizowanej wcześniej na wzorcach. Próbki nie traktowane ceruleiną: WT NT oraz KO NT znakowano odpowiednio znacznikiem lekkim 1 (L1) i pośrednim 1 (I1), zaś WT 8h i KO 8h odpowiednio znacznikiem: lekkim 2 (L2) oraz pośrednim 2 (I2) (Rycina 12). Znacznikiem ciężkim znakowano wzorzec wewnętrzny (ang. *Internal standard*, IS), który sporządzono poprzez połączenie wszystkich (WT 8h, WT NT, KO 8h, KO NT) próbek w ilości 0,5 mg. Próbki odparowano do sucha poprzez wirowanie pod ciśnieniem (w temperaturze 25°C), następnie rozpuszczono w 500 µL 0,1% FA (IS rozpuszczono w 1000 µL 0,1% FA, gdyż ilość białek w próbce była dwa razy większa od ilości białek w próbkach pozostałych). Następnie, do każdej próbki dodano też 2 µL DMSO w celu lepszego rozpuszczenia wszystkich peptydów i przeprowadzono znakowanie izotopowe na kolumnkach SPE, według protokołu zaprezentowanego przez Boersema i współpracowników [77]. Kolumnki SPE (SepPack typu C18) przemywano 1 mL 100% ACN, po czym kondycjonowano poprzez dwukrotne przemycie buforem A (skład buforu A: 0,5% (v/v) kwas octowy). Następnie nanoszono próbki na kolumny do SPE (użyto pięciu kolumn typu SepPack dla pięciu próbek: IS, WT 8h, WT NT, KO 8h, KO NT). Próbki przemywano 2 mL buforu A, po czym znakowano używając 5-krotnie 1 mL odpowiednio przygotowanego odczynnika do znakowania [znacznik lekki uzyskano przez zmieszanie 4 mL 50 mM buforu fosforanowego o pH 7,5 (złożonego z odpowiedniej ilości wodorofosforanu sodu i dwuwodorofosforanu sodu), 500 µL 600 mM NaBH₃CN oraz 500 µL 4% formaldehydu; znacznik pośredni: 4 mL 50 mM buforu fosforanowego o pH 7,5, 500 µL 600 mM NaBH₃CN oraz 500 µL 4% D-formaldehydu; znacznik ciężki: 4 mL 50 mM buforu fosforanowego o pH 7,5, 500 µL, 600

mM NaBH₃CN oraz 500 μL 4% D-¹³C-formaldehydu]. Nadmiar odczynnika do znakowania usuwano poprzez przemywanie kolumniek 2 mL buforu A. Następnie znakowane peptydy wmywano z kolumniek do osobnych probówek typu Eppendorf, z zastosowaniem 40 μL 60% ACN. 5 μL próbek WT 8h, KO 8h, IS (znakowanych odpowiednio L2:I2:H) połączono w stosunku 1:1:1 (v/v/v). Również z próbek pochodzących z tkanek nietraktowanych ceruleiną (WT NT, WT NT, IS) pobrano 5 μL roztworu i połączono w takim samym stosunku (L1:I1:H). Próbki rozcieńczono do 300 μL za pomocą 0,1% FA (końcowe stężenie białek wynosiło 0,1 μg/mL). Następnie wprowadzano 10 μL mieszaniny na kolumnę LC sprzężoną *on-line* z detektorem mas LTQ-Orbitrap w celu weryfikacji kompletności procesu znakowania. Użyto parametrów rozdzielania i detekcji LC-MS/MS według schematu opisanego w podrozdziale 2.2.4. Po potwierdzeniu kompletności znakowania próbki wzbogacano według procedur opisanych w podrozdziale 2.1.3., a następnie analizowano za pomocą techniki LC-MS/MS.



Rycina 12. Schemat znakowania izotopowego i późniejszego wykorzystania odpowiednich próbek.

2.2.4. Analiza LC-MS/MS

Peptydy rozdzielano przy użyciu techniki chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (typu nanoRP-LC) sprzężonej *on-line* ze spektrometrem mas (typu LTQ-Orbitrap ze źródłem jonów typu nanoESI). Próbkę z oznaczanymi peptydami przed wprowadzeniem na kolumnę analityczną RP C18 3 μm , 200 x 0,075 mm, kondycjonowano przez 10 min [szybkość przepływu buforu próbki (0,1% FA) 2,5 $\mu\text{L}/\text{min}$] z użyciem przedkolumny (Prot Trap Column, ReproSil C18-AQ, 5 μm , 0,3 x 10 mm). Użycie przedkolumny miało na celu oczyszczenie próbki z zanieczyszczeń, które mogą powodować zmniejszenie wydajności jonizacji w źródle jonów. Peptydy wymywano z kolumny z zastosowaniem 120-min programu elucji gradientowej (skład fazy ruchomej A: 2% ACN/98% H₂O z dodatkiem 0,1% FA, zaś fazy ruchomej B: 100% ACN z dodatkiem 0,1% FA) z przepływem fazy ruchomej 200 nL/min. Program elucji został przedstawiony w Tabeli 3. Następnie peptydy wprowadzono do spektrometru mas, przy użyciu jonizacji przez rozpylenie w polu elektrycznym. Napięcie nanoESI utrzymywano na stałym poziomie 1,4 kV, a temperatura gazu suszącego wynosiła 325°C. Rejestrowano widma mas [graficzne reprezentacje masy rejestrowanych jonów do ich ładunku (m/z)] z zastosowaniem akwizycji zależnej od danych (ang. *data dependent analysis*, DDA) z automatycznym przełączaniem pomiędzy skanami MS oraz MS/MS, wykorzystując do fragmentacji 20 najbardziej intensywnych jonów w próbce. Oznaczenia przeprowadzono w trybie przemiatania w zakresie 350-1500 m/z . Fragmentacji peptydów dokonano używając komory kolizyjnej, w której dochodzi do zderzeń jonów oznaczanych peptydów z cząsteczkami gazu obojętnego (CID), a fragmenty jonów analizowano w liniowej pułapce jonowej (LTQ). Minimalną intensywność sygnału poddanego fragmentacji ustawiono na 10 000 zliczeń. Dane uzyskane ze spektrometru mas poddano analizie z wykorzystaniem zaawansowanych narzędzi bioinformatycznych. Użyto oprogramowania Mascot z optymalizowanymi parametrami umożliwiającymi prześledzenie zmian w masach peptydów wywołanych znakowaniem izotopowym (przyrost masy wywołany zastosowaniem znaczników) oraz uwzględniając dodatkowe ustawienia programu podczas oznaczania fosfopeptydów.

Tabela 3. Program 120-min elucji gradientowej użytej w badaniach fosfoproteomicznych; %A – zawartość (%) fazy ruchomej A (skład: 2% ACN/98% H₂O z dodatkiem 0,1% FA) oraz %B – zawartość % fazy ruchomej B (skład: 100% ACN z dodatkiem 0,1% FA).

CZAS (min)	% A	% B
0	98	2
2	94	6
7	92,4	7,6
17	91,6	8,4
27	90	10
37	88,2	11,8
47	86,3	13,7
57	84,1	15,9
67	81,6	18,4
77	78,9	21,1
87	56,6	24,4
97	70,7	29,3
102	66,7	33,3
103	65	35
103,5	2	98
113,4	2	98
114	98	2
120	98	2

2.2.5. Klasyfikacja białek ze względu na funkcje

Klasyfikacji białek ze względu na ich funkcję dokonano korzystając z narzędzia dostępnego na stronie <http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>, które dostarcza informacji na temat funkcji i wzajemnych interakcji białek, dzięki znajomości kodujących je genów. Prowadzenie złożonej analizy genomiczno-proteomicznej – jak wykonano w prezentowanym badaniu – było możliwe po zarejestrowaniu się na serwerze. Następnie, należało określić organizm objęty badaniem (mysz domowa, *Mus musculus*), odznaczyć listę białek uzyskaną po zastosowaniu algorytmu Mascot, a następnie zinterpretować listę grup białek pod kątem ontologii genów, GO (ang. *gene ontology*) [105]. GO to narzędzie bioinformatyczne opisujące sposób funkcjonowania komórek – właściwości ich genów i produktów w kontekście komórkowym. W prezentowanym badaniu wybrano analizę GO, ponieważ dzięki niej uzyskano dokładne informacje na temat białek, ich funkcji i wzajemnych zależności.

3. Optymalizacja metody micelarnej elektrokinetycznej chromatografii podczas analizy związków małowcząsteczkowych (amin biogennych) z moczu pacjentów z guzami litymi pochodzenia neuroendokrynnego wieku dziecięcego

3.1. Odczynniki, aparatura i parametry rozdzielania elektroforetycznego

Wszystkie używane w badaniu anality: L-tyrozyna (L-Tyr), L-tryptofan (L-Tryp), lewodopa (L-DOPA), serotonina (5-HT), adrenalina (A), noradrenalina (NA), dopamina (DA), kwas dihydroksyfenylooctowy (DOPAC), kwas homowanilinowy (HVA), kwas wanilinomigdałowy (VMA) i kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy (3,4-DHBA) użyty jako wzorzec wewnętrzny, zostały pozyskane z firmy Sigma (St. Louis, MO, USA). Odczynniki służące do przygotowania próbek i buforu do elektroforezy takie jak: kwas fosforowy, wodorotlenek sodu (NaOH), kwas chlorowodorowy (HCl), dziesięciowodny czteroboran sodu (boraks), octan etylu, eter dietylowy, chlorek sodu (NaCl) zakupiono w POCh (Gliwice, Polska). Alfacyklodekstryna (α -CD), dodecylsulfan sodu (SDS), acetonitryl i metanol pozyskano z firmy Merck (Darmstadt, Niemcy). Wszystkie używane reagenty posiadały czystość analityczną i nie były dodatkowo oczyszczane przed ich zastosowaniem. Woda dejonizowana pozyskana była przy użyciu urządzenia Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). W badaniach używano probówek typu Eppendorf (Hamburg, Niemcy).

Rozdzielenie amin biogennych i ich metabolitów przeprowadzono za pomocą aparatu do elektroforezy kapilarnej (P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis System, Beckman, Fullerton, CA, USA) wyposażonego w automatyczny dozownik próbki, detektor UV/VIS z matrycą diodową (DAD) oraz urządzenie do utrzymywania stałej temperatury kapilary. Aparat obsługiwano przy użyciu programu 32 Karat 8.0 (Beckman, Fullerton, CA, USA). Analizy przeprowadzono przy normalnej polaryzacji elektrod. Parametry techniczne użyte w metodzie micelarnej elektrokinetycznej chromatografii (MEKC) były następujące: niemodyfikowana kapilara krzemionkowa (75 μ m średnica wewnętrzna \times 60,20 cm długość); $\lambda = 200$ nm; dozowanie 5 s (0,5 psi), przyłożone napięcie 25 kV; temperatura kapilary 25(\pm 0,1) $^{\circ}$ C. Pomiędzy każdą analizą kapilarę przemywano stosując 0,2 M NaOH (1 min) oraz wodę dejonizowaną (1 min), aby zachować jak największą powtarzalność analiz. Zoptymalizowany bufor separacyjny (ang. *background electrolite*, BGE) składał się z: 10 mM boraksu, 30 mM SDS, 15% MeOH oraz 25 mM α -CD, a pH doprowadzono do wartości 9,36 przy użyciu 1 N NaOH. Identyfikację pików wykonano przez wzbogacanie próbki moczu wzorcowymi roztworami oznaczanych substancji. Analiza statystyczna została przeprowadzona przy pomocy oprogramowania Statistica 9.0 (StatSoft Tulsa, OK, USA).

3.2. Przygotowanie roztworów wzorcowych

W czasie optymalizacji wszystkich etapów doświadczeń, korzystano z roztworów wzorcowych wybranych amin biogennych i ich metabolitów. Roztwory podstawowe wykonano przez dokładne odważenie 1,0 mg substancji i rozpuszczenie jej w 1 mL MeOH. Tak przygotowane roztwory przechowywano w temp. -20°C i rozmrażano w dniu analizy, aby przygotować z nich odpowiednie wodne rozcieńczenia, które następnie stanowiły roztwory badane. Taki sam sposób zastosowano do przygotowania roztworu wzorca wewnętrznego. Mieszanina wzorców badanych świeżo przygotowywano przed analizą przez pobranie 5 µL każdego z 1 mg/mL roztworu wzorca w MeOH i rozcieńczeniu ich do 1000 µL wodą dejonizowaną. Tak przygotowana mieszanina gotowa była do analizy MEKC-UV/VIS.

3.3. Materiał badany i jego przygotowanie do analizy

24-godzinne zbiórki moczu przeprowadzono u 8 pacjentów (dziewczynek i chłopców w wieku od 6 miesięcy do 13 lat) ze zdiagnozowanymi guzami litymi wieku dziecięcego pochodzenia neuroendokrynnego [nerwiakiem zarodkowym współczulnym (NB)], lub barwnikowym neuroektodermalnym nowotworem wieku dziecięcego (MNTI) czy też nowotworem podścieliskowym przewodu pokarmowego (GIST) w Katedrze i Klinice Pediatrii, Hematologii i Onkologii GUMed, po uzyskaniu zgody Niezależnej Komisji Bioetycznej GUMed (NKBBN/178/2015) i Świadomej Zgody Pacjentów i/lub ich opiekunów prawnych. Odpowiednio zebrano również mocz od siedmiu zdrowych ochotników, dopasowanych wiekiem i płcią do pacjentów. Pacjenci, od których pobierano mocz w ciągu 24 godzin przestrzegali specjalnej diety. Dieta polegała na tym, że 3 dni przed badaniem i w trakcie 24-godzinnej zbiórki moczu pacjenci, jak i zdrowi ochotnicy, zostali pouczeni, aby unikać produktów takich jak kawa (także bezkofeinowa), herbata, czekolada, wanilia, banany, pomarańcze i inne owoce cytrusowe, herbatniki, biszkopty, witamina E, kakao, serki waniliowe. Porcje moczu w trakcie zbiórki całodobowej przechowywane były w chłodzie (temp. ok. 4°C standardowej lodówki), a pojemnik chroniono przed oddziaływaniem światła poprzez owinięcie go folią aluminiową. Porcję moczu (10 mL) przenoszono do specjalnie przygotowanych probówek zabezpieczonych przed dostępem światła, wypełnionych 50 µL 6 M HCl i transportowano w dniu zbiórki do Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej GUMed. Do czasu analizy, próbki moczu pacjentów, jak i zdrowych ochotników badania, przechowywano w temperaturze -80°C.

3.3.1. Przygotowanie próbek moczu

Do ekstrakcji wybranych metabolitów amin biogennych (HVA, VMA, DOPAC) z próbek 24-godzinnej zbiórki moczu używano procedury ekstrakcji ciecz-ciecz. Kolejno, do 1 mL wcześniej zakwaszonego moczu, dodawano 2,5 µg/mL wzorca wewnętrznego (IS) – kwasu 3,4-dihydroksybenzoesowego (3,4-DHBA). Następnie dodawano 0,2 g chlorku sodu i wytrząsano. Gdy osiągnięto pełne rozpuszczenie soli, dodawano 1 mL eteru dietylowego, wytrząsano w temperaturze pokojowej przez 10 min, po czym odwirowano (3 000 g, 10 min, 4°C). Fazę eterową (górną warstwę cieczy, roztwór znad fazy wodnej) przenoszono do czystych probówek typu Eppendorf i odparowywano w temp. 30°C na łaźni wodnej. Odparowaną próbkę rozpuszczano w 500 µL wody, po czym rozdzielano przy użyciu micelarnej elektrokinetycznej chromatografii. Dla każdego uczestnika badania stężenie BAs normalizowano przez uwzględnienie stężenia kreatyniny w moczu. Żaden z uczestników nie wykazywał zaburzonej funkcji nerek.

3.4. Walidacja metody micelarnej elektrokinetycznej chromatografii kapilarnej z detekcją spektrofotometryczną (MEKC-UV/VIS)

Opracowana metoda do analizy wybranych metabolitów amin biogennych w próbkach moczu zwalidowano poprzez określenie jej selektywności, liniowości, granicy wykrywalności (ang. *limit of detection*, LOD), granicy oznaczalności (ang. *limit of quantification*, LOQ), precyzji, dokładności, odzysku i niewrażliwości zgodnie z rekomendacją *International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*.

IV. WYNIKI I DYSKUSJA

1. Analiza proteomiczna guzów neuroendokrynych z zastosowaniem techniki 1D-PAGE oraz LC-MS/MS

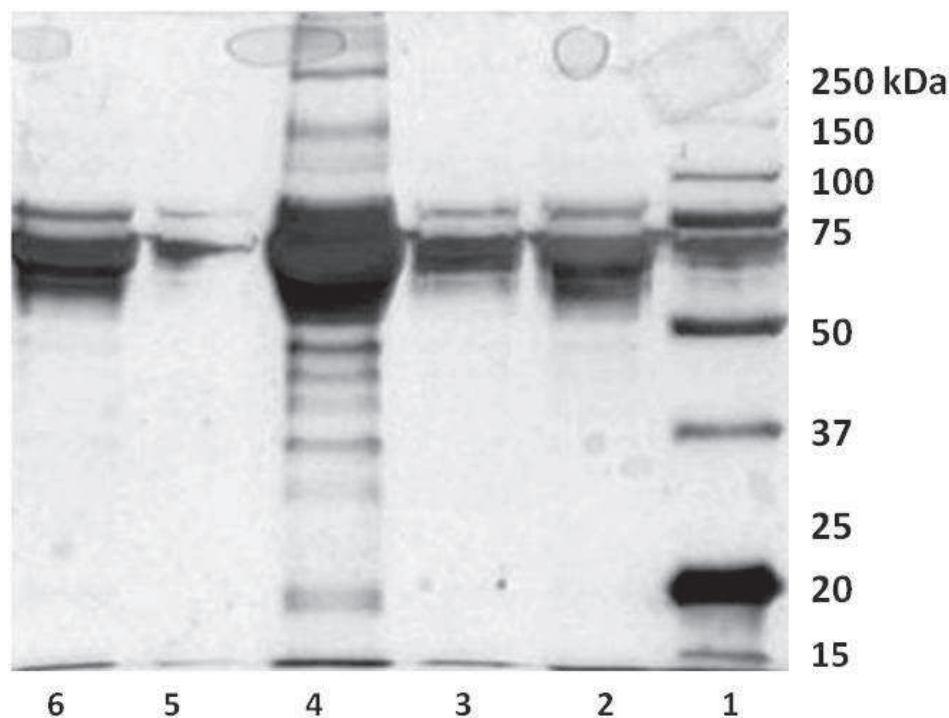
Guzy neuroendokryne (NET) często rozwijają się nie dając żadnych objawów, przez co stanowią wielkie wyzwanie dla klinicystów i zwykle wykrywane są dopiero pośmiertnie. Obecnie istnieją biomarkery tych guzów, jednak często determinują one dopiero obecność guza NET w późnym stadium choroby. Wciąż zatem niezbędne jest kontynuowanie prac nad biomarkerami umożliwiającymi wykrycie guza w jego wczesnym stadium. Niemniej poszukiwania specyficznych cząsteczek wydzielanych tylko w stanie patofizjologicznym, wymagają zastosowania wysoce sprawnych metod bioanalitycznych, gdyż często ich stężenie w badanych płynach ustrojowych jest bardzo niskie. Jedną z technik, którą można użyć do rozdzielania skomplikowanych mieszanin białek jest elektroforeza żelowa.

Obecnie, organizacja HUPO (ang. *Human Proteome Organization*), kontynuując zakończony sukcesem projekt eksplorujący ludzki genom HUGO (ang. *Human Genome Project*), rozpoczęła ogólnoswiatową inicjatywę, której celem głównym jest analiza całego ludzkiego proteomu (<http://www.hupo.org/initiatives/human-proteome-project/>) [106-108]. Dotychczas odkryto i charakteryzowano tylko około 20% wszystkich białek występujących w organizmie człowieka. Jest to spowodowane głównie ograniczeniami używanych metod proteomicznych [109,110]. Uważa się jednak, że istniejące obecnie bazy danych, jak baza używana w poniższym badaniu stworzona przez Narodowe Centrum Informacji Biotechnologicznej (NCBI), są wystarczające, aby ułatwić określenie składu białkowego badanego materiału.

Celem przedstawionego badania było zoptymalizowanie metody opartej na łatwo dostępnej technice jednokierunkowej elektroforezy żelowej (1D-PAGE) podczas rozdzielania białek wydzielanych przez komórki guzów neuroendokrynych (NET). Po wytypowaniu szczególnie interesujących białek, przeprowadzono ich dalszą analizę przy użyciu technik sprzężonych – chromatografii cieczowej i tandemowej spektrometrii mas (LC-MS/MS).


W badaniu użyto próbek guzów NET, dla których dokładnie określono typ (pierwotny albo przerzut), lokalizację (organ) oraz stopień zaawansowania. Do prezentowanych badań proteomicznych użyto próbek roztworów z nad pierwotnych hodowli komórkowych guzów wyizolowanych podczas zabiegu operacyjnego od 11 pacjentów ze zdiagnozowanymi guzami NET. Próbkę kontrolną składały się tylko z pożywki używanej do hodowli komórkowej [84]. Zagęszczenie frakcji białkowej w próbkach badanych i kontrolnych przebiegało w ten sam sposób, a opis procedury został przedstawiony w rozdziale: Metodyka, w sekcji 1.4.

Początkowy etap eksperymentu, czyli uzyskanie pierwotnych hodowli komórkowych guzów NET, podlegał kontroli, uwzględniając odpowiednie warunki takiej hodowli (wilgotność, pH, skład pożywki). Kolejno, dokonano doboru odpowiedniej metody przygotowania próbki, jej oczyszczenia i zatężenia frakcji białkowej i opracowano optymalną metodę jednokierunkowej elektroforezy żelowej poprzez dobór określonego stężenia poliakrylamidu w żelu (12%) oraz substancji używanej do wybarwienia (sole srebra). Zachowanie stałości warunków hodowli, przygotowania i rozdzielania białek, umożliwiło niezafałszowaną analizę porównawczą składu białkowego próbek uzyskanych od pacjentów z fenotypowo różnymi guzami NET (guz wydzielający i niewydzielający). Wykonane analizy faworyzowały używanie do analiz próbek hodowanych na pożywkach wzbogaconych o płodową albuminę bydlęcą (FBS), gdyż właśnie w tych próbkach wyraźnie uwidoczniły się nieprawidłowo wydzielane białka tylko przez guza czynnego (Rycina 13, pasmo 4). Próbki te nie były całkowicie pozbawione albuminy, gdyż dla wszystkich próbek – zarówno kontrolnych (**med. FBS**) jak i badanych (**sup. FBS**) – zaobserwowano wyraźne prążki w zakresie mas 50-75 kDa, które odpowiadały masie cząsteczkowej albuminy (66,5 kDa). Dzięki jednak redukcji ilości albuminy w próbkach, uzyskano również intensywne prążki pochodzące od innych niż albumina białek dla guza o fenotypie wydzielającym (Rycina 13, pasmo 4). Prążki te uwidoczniły się tylko wtedy, gdy zastosowano zestaw laboratoryjny do usuwania albumin i immunoglobulin, a nie były widoczne, w próbkach hodowanych na pożywce z dodatkiem FBS, dla których zestaw nie został zastosowany. Co więcej, prążki te nie były obecne ani w pożywkach (Rycina 13, pasmo 2 i 6), ani w przerzutach tego guza (Rycina 13, pasmo 5), czy też w guzie o fenotypie niewydzielającym (Rycina 13, pasmo 3). Opisane, interesujące profile 1D-PAGE (Rycina 13, Pasma 4) otrzymano dla próbki pochodzącej od pacjenta ze zdiagnozowanym guzem NET trzustki wydzielającym substancje czynne (**NET 3.1 sup. FBS**). W tej bowiem próbce, otrzymano bogatą różnorodność białek w szerokim zakresie MW: od 20 do ponad 250 kDa. Szczególnie pięć białek cechowało się najintensywniejszym zabarwieniem na żelu, co wskazywałoby na ich wysokie stężenie w próbce.



Rycina 13. Proteinogram dla roztworów zbadanych hodowli komórkowych guzów neuroendokrynych i próbek kontrolnych, hodowanych na pożywkę zawierającą płodową surowicę bydlęcą (FBS), otrzymany podczas rozdzielania z zastosowaniem techniki 1D-PAGE. Stężenie poliakrylamidu w żelu wynosiło 12%. Zastosowanym barwnikiem były sole srebra. Przed elektroforezą próbki poddano działaniu odczynnika do strącania białek oraz zastosowano zestaw do usuwania albumin i immunoglobulin. Legenda: Pasma 1 – Wzorce masowe białek w zakresie mas cząsteczkowych (MW) 15-250 kDa, 2 – Próba kontrolna: **NET 2 med. FBS**, 3 – Niewydzielający, nieczynny rakowiak płuc (**NET 2 sup. FBS**), 4 – Wydzielający, czynny rakowiak trzustki (**NET 3.1 sup. FBS**), 5 – Wydzielający, czynny przerzut do węzłów chłonnych rakowiaka trzustki (**NET 3.2 sup. FBS**), 6 – Próba kontrolna: **NET 6 med. FBS**. Na podstawie [84].

Właśnie te dodatkowe białka analizowano dalej z użyciem techniki LC-MS/MS. „Surowe” dane, otrzymane z detektora MS/MS, poddano obróbce za pomocą algorytmu Mascot, a otrzymane masy peptydów przypasowano do bogatej bazy fragmentów peptydowych utworzonej przez NCBI. Analiza LC-MS/MS pozwoliła na identyfikację unikatowych białek pochodzenia ludzkiego (Rycina 14). Najważniejsze z nich to: białko H2A1.2 wyizolowane z prążka nr 2 NET sup. 3.1 (Rycina 14, prążek 2) (GI: 3493529) oraz białko wyizolowane z prążka nr 5 NET sup. 3.1 (Rycina 14, prążek 5) (GI: 298880). Szczególnie istotne wydaje się zidentyfikowanie białka H2A1.2, którego znaczenie – według danych literaturowych – było już badane na przykład dla komórek raka piersi. Otóż, zostało dowiedzione, że nadmierna produkcja białka H2A1.2 promuje proliferację komórek raka piersi w hodowlach komórkowych [111]. Niemniej dotychczas rola białka H2A1.2 w guzach NET trzustki nie została dogłębnie zbadana.



Nazwa próbki	Unikatowy identyfikator białka	Białko
NET 3.1 sup. FBS (prażek 1)	-	-
NET 3.1 sup. FBS (prażek 2)	Gi 3493529	H2A1.2
	Gi 31646	Dehydrogenaza glicerolo-3-fosforanowa
	Gi 4767766	Aneksyna A2 izoforma 2
NET 3.1 sup. FBS (prażek 3)	Gi 3294648	Prekursor katepsyny Z
	Gi 4502101	Aneksyna A1
	Gi 31646	Dehydrogenaza glicerolo-3-fosforanowa
NET 3.1 sup. FBS (prażek 4)	Gi 178866	Prekursor apolipoproteiny J
	Gi 32016	α -tubulina
	Gi 189520	Pro- α -1 kolagen typ V
NET 3.1 sup. FBS (prażek 5)	Gi 180392	Łańcuch α -1 propeptydu
	Gi 170058	Łańcuch α -2 regionu C immunoglobuliny
	Gi 29888	Niescharakteryzowany produkt białkowy
	Gi 33700	Łańcuch lekki immunoglobuliny A
	Gi 29470	Proteoglikan połączony kowalencyjnie z łańcuchem siarczanu heparanu

Rycina 14. Rezultaty analizy LC-MS/MS wybranych białek uzyskanych podczas rozdzielania z użyciem techniki 1D-PAGE roztworu znad pierwotnej hodowli komórkowej czynnego guza trzustki NET 3.1. Kolumna pierwsza obrazuje, który prażek białkowy poddano analizie; w kolumnie drugiej widnieje unikatowy numer GI przydzielony białkom w bazie danych NCBI, a trzecia kolumna przedstawia nazwy zidentyfikowanych białek [84].

Przeprowadzone badania nad białkami wydzielanymi przez guzy neuroendokryne potwierdziły, że użycie jednocześnie trzech technik: jednokierunkowej elektroforezy żelowej, chromatografii ciekłowej i spektrometrii mas, jest pomocne w prowadzeniu szczegółowych analiz proteomicznych. Co więcej, zastosowanie specjalistycznych, zoptymalizowanych metod bazujących na technice chromatografii powinowactwa do usuwania najbardziej stężonych białek próbki, umożliwiło pozyskanie cennych informacji na temat mniej stężonych białek obecnych w próbkach. Informacje zdobyte w pierwszej części eksperymentalnej rozprawy doktorskiej, pozwoliły na wdrożenie do standardowego postępowania analitycznego, nowych etapów przygotowania skomplikowanej próbki do analizy proteomicznej. Ostatecznie, umożliwiły zastosowanie pogłębionych analiz opartych na

technikach 1D-PAGE oraz LC-MS/MS do zaproponowania nowych, potencjalnych biomarkerów guzów NET o fenotypie wydzielającym (białko H2A 1.2) oraz poskutkowały nakierowaniem dalszej uwagi pracy doktorskiej na dokładniejsze poznanie biologii nowotworów trzustki.

2. Porównawcza analiza fosfoproteomiczna zdrowych tkanek mysich z tymi, w których wywołano ostre zapalenie trzustki

Z uwagi na fakt, że interesujące profile białkowe z pierwszej części pracy doktorskiej, otrzymano dla guzów trzustki druga część pracy skupiła się na poszerzeniu wiedzy o procesach zachodzących w trzustce w kontekście kancerogenezy. Aby poprawić prognozy pacjentów cierpiących na raka trzustki pochodzenia neuroendokrynnego, niezbędne jest dokładne poznanie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za rozwój tego typu nowotworu oraz zidentyfikowanie cząsteczek, które mogłyby stanowić nowe, potencjalne biomarkery dla wczesnego jego wykrywania. Zdecydowano się na przeprowadzenie pogłębionej analizy fosfobiałek wydzielanych przez trzustkę w wybranym stanie patofizjologicznym z uwagi na istotne znaczenie fosforylacji w procesie nowotworowym. Ponadto, ostatnie doniesienia potwierdzające efektywność inhibitorów kinaz (np. sunitynibu) w terapii nowotworów neuroendokrynnych trzustki pozwalają przypuszczać, że fosforylacja odgrywa znaczącą rolę w rozwoju nowotworów tego narządu [2]. Uwagę skierowano na jeden z czynników ryzyka rozwoju nowotworu trzustki pochodzenia neuroendokrynnego, a mianowicie na stan zapalny trzustki [112,113].

We wszystkich guzach neuroendokrynnych inicjatorem wewnątrzkomórkowego szlaku jest zmieniony onkogen RET. Onkogen ten aktywuje między innymi szlak związany z białkową kinazą aktywowaną mitogenem [2]. Dlatego też na tym etapie badań skoncentrowano się jako punkt wyjścia na jednej z ważnych cząsteczek biorących udział w sygnalizacji międzykomórkowej w trzustce, mianowicie na kinazie białkowej aktywowanej mitogenami 1 (ang. *mitogen-activated protein kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 1*, Mnk1). Mnk1 to kinaza serynowo-treoninowa, której najlepiej opisanym substratem jest eukariotyczny czynnik inicjujący translację 4E (ang. *eukaryotic translation initiation factor 4E*, eIF4E) [114]. Czynnik ten jest między innymi biomarkerem prognozującym pogorszenie stanu pacjentów z rakiem piersi. Natomiast ufosforylowane białko eIF4E może również stanowić o stadium zaawansowania, progresji raka płuc, żołądka lub jelita grubego [115]. W związku z tym, kinaza Mnk1 jest uważana za potencjalny cel molekularny w terapii przeciwnowotworowej. Przykładowo, w odpowiedzi na zastosowanie inhibitora tej kinazy w hodowlach komórek raka piersi, można zaobserwować zahamowanie proliferacji tych komórek [116].

W ostatnich badaniach odkryto, że ilość Mnk1 w trzustce jest znacznie wyższa niż w innych narządach. Zapalenie trzustki jest czynnikiem ryzyka rozwoju nowotworu u ludzi, a w modelach mysich sprzyja powstawaniu raka trzustki [117]. Mnk1 jest przy tym kinazą

aktywowaną przez stres i ulega silnej fosforylacji w mysiej trzustce przy eksperymentalnie wywołanym stanie zapalnym (na przykład przy użyciu ceruleiny). W związku z powyższym, podjęto się próby określenia, które białka w trzustce ulegają fosforylacji przy współdziałaniu Mnk1 w kontekście stanu zapalnego oraz czy zidentyfikowane białka mogą posłużyć w przyszłości jako potencjalne biomarkery schorzeń trzustki.

W celu porównania fosfoproteomów pochodzących z trzustki zdrowej z tą zmienioną chorobowo, zastosowano fosfoproteomiczną analizę ilościową. Porównywano fosfoproteomolizatów białkowych otrzymanych z trzustki izolowanej z myszy dzikiego typu Mnk1 (WT) oraz myszy z delecją w genie Mnk1 (KO). W celu wywołania ostrego zapalenia trzustki zastosowano model ceruleinowy, gdyż jest on najlepiej scharakteryzowanym i często stosowanym modelem podczas badania tego schorzenia u myszy. Dodatkowo, wybrany model wykazuje podobieństwo do zapalenia trzustki u człowieka [118,119].

Celem eksperymentu było zoptymalizowanie metody analizy fosfoproteomicznej do oceny ilościowej i jakościowej niepoprawnie wydzielanych fosfobiałek podczas ostrego zapalenia trzustki. Badania prowadzono we współpracy z Laboratorium Proteomicznym Hiszpańskiego Narodowego Centrum Badań nad Rakiem podczas stażu naukowego w ramach umowy Offsetowej z Hiszpanią – EADS CASA (*Eurocopter and Airbus Operations*).

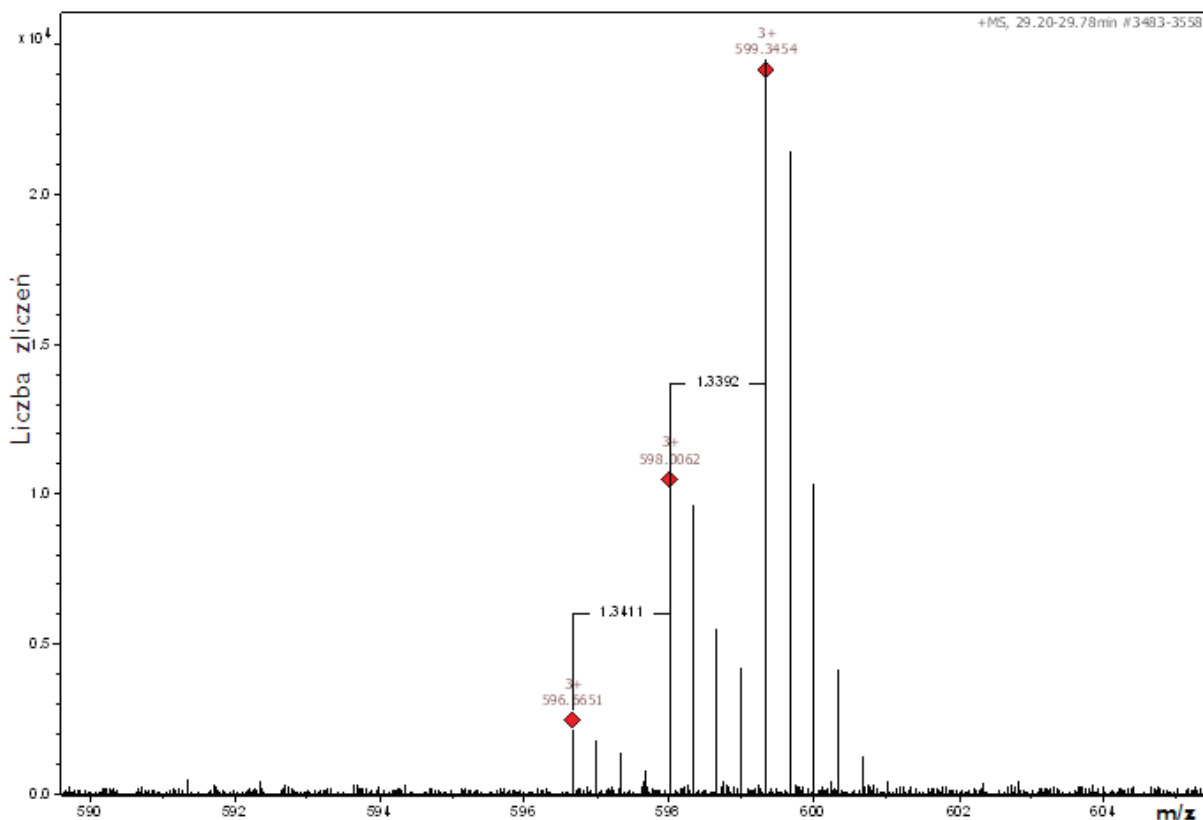
2.1. Optymalizacja reduktywnej aminacji

W badaniu wybrano technikę reduktywnej aminacji, która umożliwiła przeprowadzenie względnej analizy ilościowej badanych białek oraz fosfobiałek. Metodę wybrano z uwagi na fakt, że bufony używane w czasie znakowania są kompatybilne z detektorem mas oraz ze względu na to, że próbka białek jest jednocześnie odsalana i oczyszczana (gdyż etap znakowania odbywa się na kolumnkach działających na zasadzie ekstrakcji do fazy stałej SPE). Dzięki użyciu protokołu znakowania z zastosowaniem kolumnek SPE, próbka była gotowa do bezpośredniego wprowadzenia do LC-MS/MS. Wykazano tym samym, że znakowanie za pomocą reduktywnej aminacji jest korzystne podczas porównawczej ilościowej analizy fosfoproteomicznej próbek biologicznych.

Ważny etap optymalizacji metody reduktywnej aminacji polegał na względnej analizie ilościowej znakowanych peptydów powstałych po strawieniu białkowej próbki wzorców ProtMix (BSA oraz α - i β -kazeina). Zastosowanie protokołu znakowania na wstępie na mieszaninie wzorców, pozwoliło zmniejszyć straty cennego materiału badanego, gdyż wskazało, które momenty eksperymentu są kluczowe dla powodzenia całego badania. Dowiedziano bowiem, że próbkę należy bardzo uważnie i powoli nakładać na kolumnkę

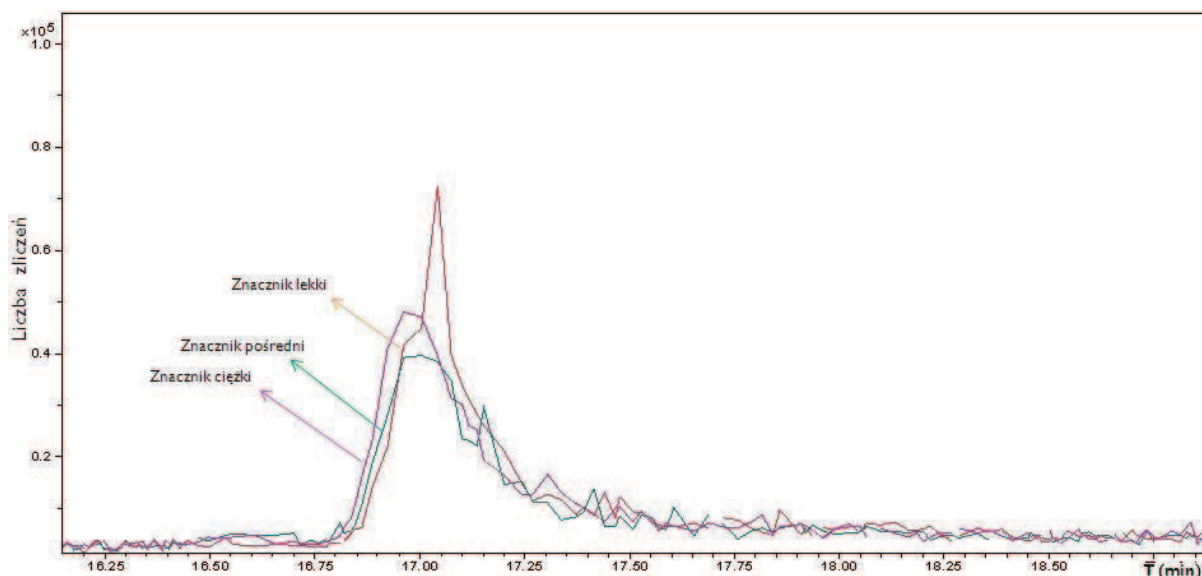
SPE, a następnie wolno (minimum 10 min każdorazowo) przemywać odczynnikami zawierającymi znaczniki izotopowe. Również etap wymywania nadmiaru znacznika należało ściśle kontrolować tak, aby nie dopuścić do zbyt szybkiego usuwania znacznika z kolumnienki, co mogłoby doprowadzić do uzyskania niekompletnego znakowania próbek.

Po zoptymalizowaniu reduktywnej aminacji, uzyskano 100% wydajność znakowania dla każdego peptydu w badanej próbce – zarówno pracując na wzorcowych substancjach, jak również przy przygotowaniu próbek biologicznych. Potwierdzeniem kompletności znakowania było przeszukanie widm masowych próbek ProtMix znakowanych trzema różniącymi się masami znacznikami izotopowymi i przeprowadzenie porównania intensywności sygnałów pochodzących od odpowiednio znakowanych peptydów. Próbki łączono w stosunku 1:5:10, tak więc spodziewano się uzyskać taki właśnie stosunek intensywności sygnałów peptydów. Sygnały peptydów uzyskane podczas znakowania próbki ProtMix znacznikiem lekkim powinny być 5- i 10-krotnie niższe od odpowiednio: sygnałów peptydów ze znacznikiem pośrednim i sygnałów peptydów ze znacznikiem ciężkim. Przykład peptydu pochodzącego z trawienia enzymatycznego α -kazeiny, o sekwencji aminokwasowej HQGLPQEVLNENLLR, masie molekularnej równej 1790,9941 i ładunku +3, przedstawia Rycina 15. Kompletność znakowania potwierdzono porównując intensywności sygnałów otrzymanych od odmiennie znakowanych jonów identyfikacyjnych dla tego peptydu podczas analizy w analizatorze mas typu Orbitrap. Stosunek peptydu znakowanego znacznikiem lekkim do pośredniego i ciężkiego wynosił 1:5:10 (v/v/v), co wskazywało na kompletność procesu znakowania.



Rycina 15. Widmo masowe peptydu pochodzącego ze znakowanych lekkim, pośrednim i ciężkim znacznikiem izotopowym próbek ProtMix w stosunku 1:5:10 (v/v/v). Sekwencja peptydu: HQGLPQEVLNENLLR. Oś rzędnych – liczba zliczeń, oś odciętych – stosunek masy do ładunku (m/z).

W badaniu należało rozpatrzyć tzw. „efekt deuteru”, związany z używaniem do wstępnego rozdzielania próbki techniki chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz. Efekt ten związany jest z występowaniem deuteru w pośrednim i ciężkim znaczniku izotopowym, przez co deuterowane peptydy są bardziej hydrofilowe, niż odpowiadające im peptydy znakowane znacznikiem lekkim, i eluują jako pierwsze z kolumny chromatograficznej. Efekt ten jest tak minimalny, że nie zachodzi konieczność uwzględniania go podczas analiz ilościowych [120,121]. Dane literaturowe potwierdzono poprzez obserwacje otrzymanych chromatogramów, a przykład peptydu o sekwencji aminokwasowej: QNCDQFEK, znakowanego trzema różniącymi się masami znacznikami, przedstawiono na Rycinie 16. Peptyd przedstawiony na Rycinie 16 pochodził z trzech odmiennie znakowanych próbek ProtMix, zmieszanych w stosunku 1:1:1 (v/v/v).



Rycina 16. Chromatogram uzyskany podczas analizy LC-MS/MS dla jednego z peptydów pochodzącego z trawienia BSA (sekwencja aminokwasów: QNCDQFEK), znakowanego znacznikiem lekkim, pośrednim lub ciężkim. Próbkę z różnymi znacznikami zmieszane zostały w stosunku 1:1:1 (v/v/v), aby zobrazować tak zwany “efekt deuteru”. Oś rzędnych – liczba zliczeń, oś odciętych – czas retencji.

2.2. Optymalizacja etapu wzbogacania fosfoproteomu

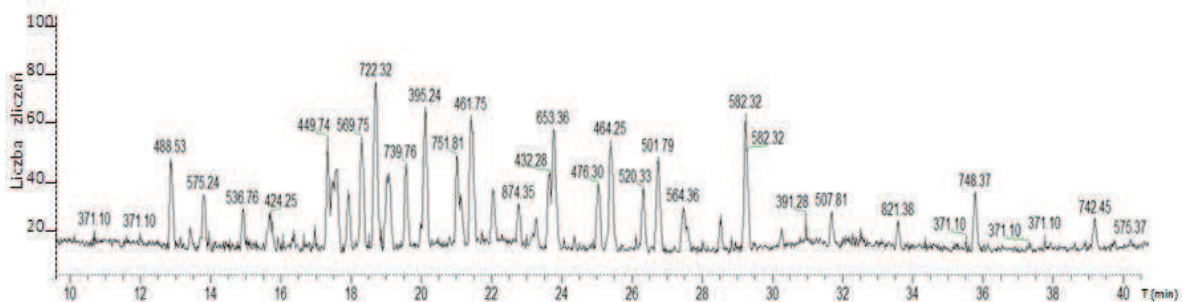
Ze względu na niskie stężenie fosfobiałek w próbkach biologicznych, w porównaniu do białek, które nie ulegają modyfikacji potranslacyjnej, etap wzbogacania fosfoproteomu należy do jednego z najważniejszych w analizie fosfoproteomicznej. Skoncentrowano się na optymalizacji i porównaniu wydajności dwóch technik wzbogacania fosfoproteomu: z użyciem matrycy Ti^{4+} /IMAC lub matrycy złożonej z tlenku tytanu (TiO_2). Posługując się mieszaniną standardowych białek ProtMix, prześledzono różnice w efektywności zagęszczenia próbki podczas zastosowania każdej z technik. Wykazano, że dla potrzeb ilościowej analizy fosfobiałek z próbki białkowej, oba złoża – Ti^{4+} /IMAC oraz TiO_2 – były wystarczająco efektywne, ponieważ fosfopeptydy pochodzące z trawienia α - i β -kazeiny zostały zidentyfikowane. Zweryfikowano obecność 23 spośród 27 oczekiwanych fosfopeptydów (na podstawie badań naukowych Zhou [68] oraz Larsena i współpracowników [122], Tabela 4), tak więc wydajność procesu wyniosła 85%.

Tabela 4. Sekwencje peptydów powstałych z trawienia α - i β -kazeiny

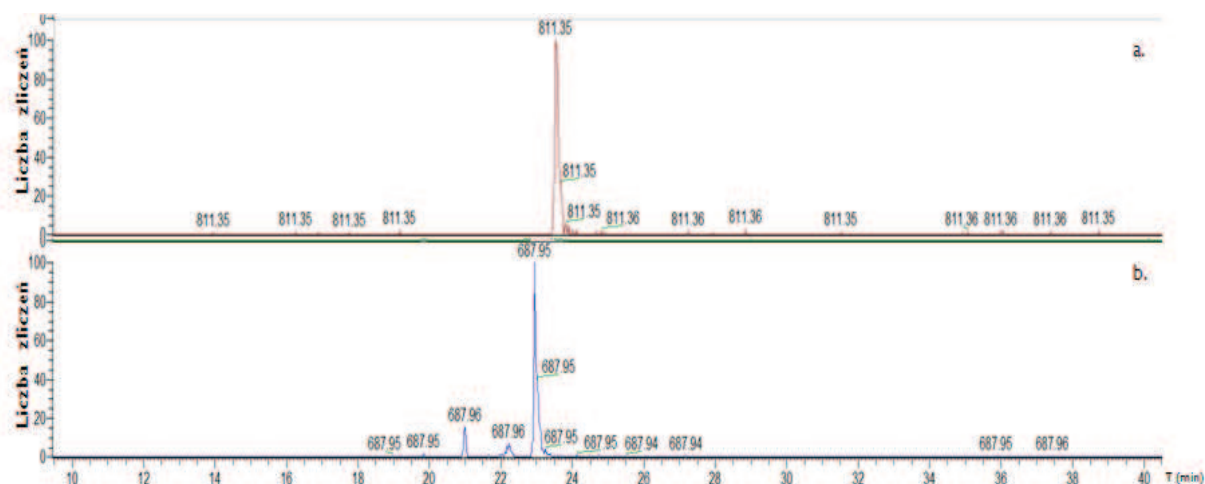
Legenda: Ilość grup P – ilość ufosforylowanych aminokwasów; M+H – masa peptydu po doczepieniu protonu

PEPTYD	ILOŚĆ GRUP P	M+H FOSFOPEPTYDU
TVDME <u>S</u> TEVF	1	1237,50
TVDME <u>T</u> TEVF	1	1254,52
TVDME <u>S</u> TEVFTK	1	1466,61
TVDmE <u>S</u> TEVFTK	1	1482,60
EQL <u>S</u> TSEENSKK	2	1538,59
TVDME <u>S</u> TEVFTKK	1	1594,70
VPQLEIVP <u>N</u> SAEER	1	1660,79
YLGEYLIVP <u>N</u> SAEER	1	1832,83
DIG <u>S</u> ESTEDQAMEDIK	1	1847,69
DIG <u>S</u> ESTEDQAMEDIK	2	1927,89
DIG <u>S</u> ESTEDQAMEDIK	2	1943,89
YKVPQLEIVP <u>N</u> SAEER	1	1951,95
FQ <u>S</u> EEQQQTEDELQDK	1	2061,83
KKYKVPQLEINVP <u>N</u> SAEERL	1	2080,00
NVPGEIV <u>E</u> SL <u>S</u> SEESITR	4	2352,85
IEKFQ <u>S</u> EEQQQTEDELQDK	1	2556,09
NTMEHV <u>S</u> SEESIISQETYSK	4	2618,72
VNEL <u>S</u> KDIGSESTEDQAMEDIK	3	2678,01
<u>Q</u> MEAESISSEEEIVP <u>N</u> SVEQK	5	2703,75
<u>Q</u> MEAESISSEEEIVP <u>N</u> SVEQK	5	2719,91
<u>Q</u> MEAESISSEEEIVP <u>N</u> SVEQK	5	2736,05
KNTMEHV <u>S</u> SEESIISQETYSK	4	2747,10
EKVNEL <u>S</u> KDIGSESTEDQAMEDIKQ	3	2935,15
ELEELNVPGEIV <u>E</u> SL <u>S</u> SEESITR	4	2965,15
NANEEY <u>S</u> IG <u>S</u> SEESAEEVATEEVK	4	3008,01
NANEEY <u>S</u> IG <u>S</u> SEESAEEVATEEVK	5	3087,99
RELEELNVPGEIV <u>E</u> SL <u>S</u> SEESITR	4	3122,27
GRELEELNVPGEIV <u>E</u> SL <u>S</u> SEESITR	4	3179,28

Po uważnym przeszukaniu chromatogramu całkowitego prądu jonowego MS (Rycina 17), wyekstrahowano widma MS/MS fosfopeptydów i dokonano identyfikacji fosfobiałek znajdujących się w próbce (posługując się bazą danych NCBI). Przykładowo, Rycina 18 a, b pokazuje widma MS/MS dla dwóch fosfopeptydów pochodzących od β -kazeiny.

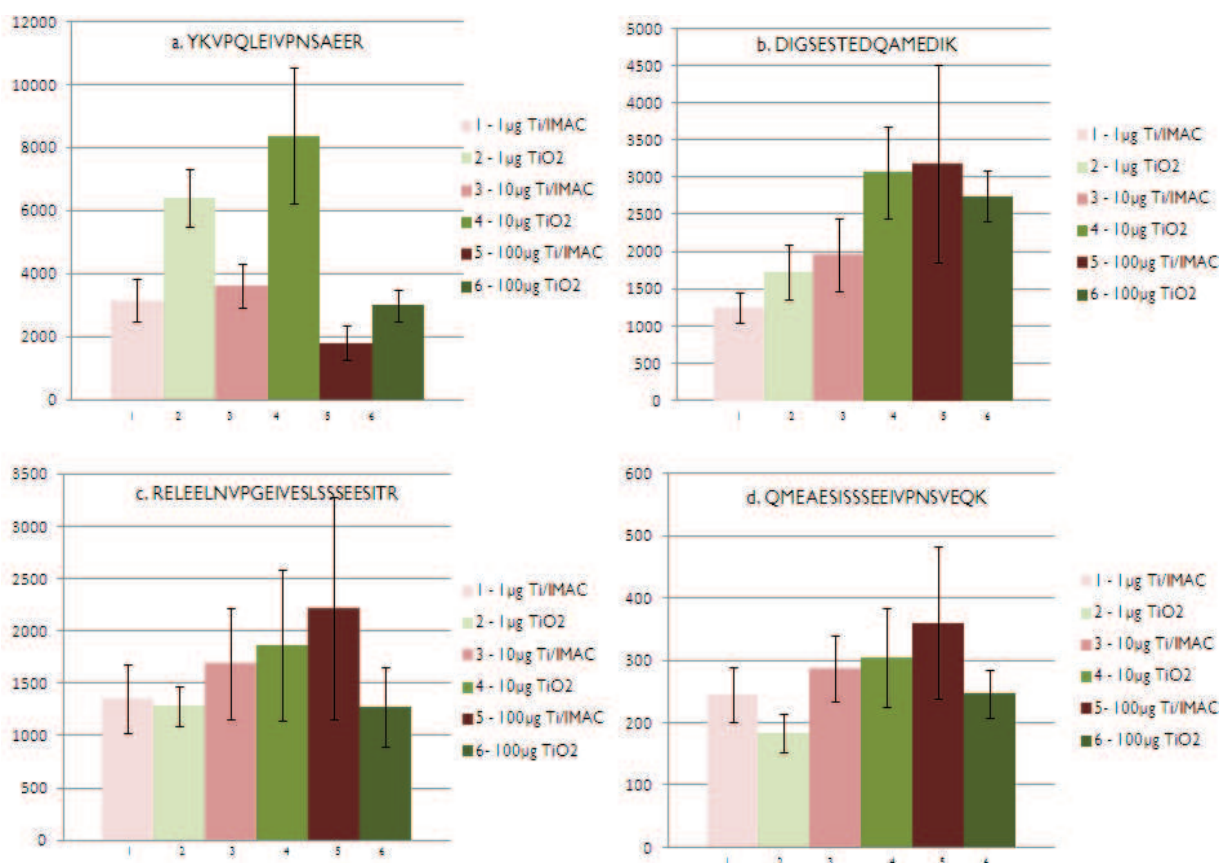


Rycina 17. Chromatogram całkowitego prądu jonowego próbki ProtMix, w której stosunek białek ufosforylowanych do nieufosforylowanych wynosił 3:1. Oś rzędnych – liczba zliczeń, oś odciętych – czas retencji. Całkowity czas analizy wynosił 45 min.



Rycina 18. Chromatogramy zarejestrowane dla peptydu o sekwencji IEKFsEEQQQTEDELQDK i ładunku +3 (a) oraz dla peptydu o sekwencji FQsEEQQQTEDELQDK i ładunku +3 (b). Oś rzędnych – liczba zliczeń, oś odciętych – czas retencji. Całkowity czas analizy wynosił 45 min.

Satysfakcjonujące wyniki wzbogacenia frakcji fosfobiałkowej uzyskano wówczas, gdy stężenie białek w próbce wyjściowej – poddawanej wzbogacaniu – było wyższe lub równe 10 $\mu\text{g/mL}$ (Rycina 19). Dla mniejszej ilości białek w próbce wyjściowej (1 $\mu\text{g/mL}$) uzyskano nierównomierne wzbogacenie dla poszczególnych fosfopeptydów spodziewanych w próbce. Rycina 19 obrazuje również, że wzbogacanie przy użyciu Ti^{4+} /IMAC pozwoliło na uzyskanie lepszego odzysku wieloufosforylowanych peptydów (Rycina 19 b-d), podczas gdy matryca TiO_2 umożliwiła znaczący odzysk peptydów posiadających jedną resztę fosforanową (Rycina 19a).



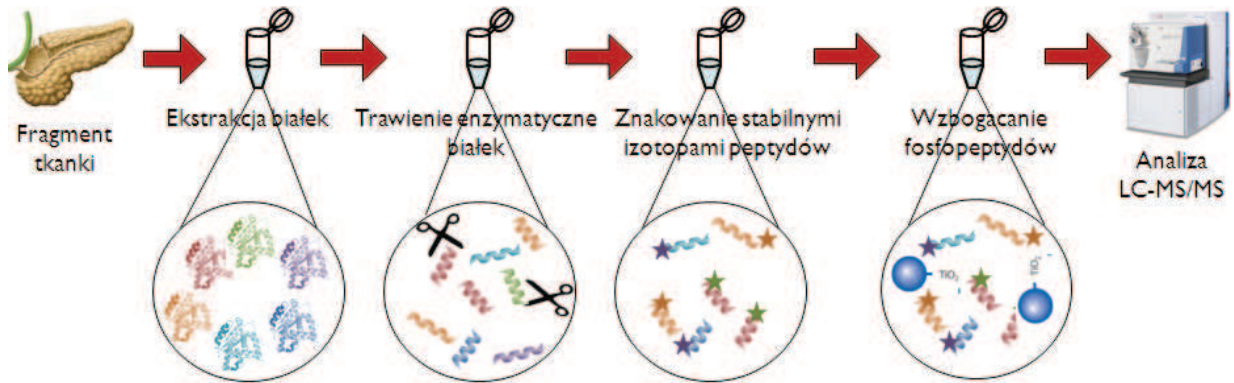
Rycina 19. Porównanie dwóch protokołów wzbogacania frakcji fosfobiałkowej: Ti⁴⁺/IMAC oraz TiO₂. Różne natężenie koloru (od najjaśniejszego do ciemnego) określa różne stężenie wyjściowe białek w zagęszczanej próbce (1 µg, 10 µg albo 100 µg). Przedstawione histogramy obrazują fosfopeptydy z jednym (a), dwoma (b), czterema (c) lub pięcioma (d) ufosforylowanymi aminokwasami w sekwencji.

Ponadto, zwrócono uwagę na ilość złoża Ti⁴⁺/IMAC lub TiO₂ stosowanego na etapie wzbogacania i wykazano, że użyta ilość (w przypadku Ti⁴⁺/IMAC 20 µg – dla 1-100 µg białek, natomiast w przypadku złoża TiO₂ 600 µg – dla 100 µg białek i 100 µg – dla 10 i 1 µg białek) jest wystarczająca do wydajnego zagęszczenia fosfobiałek w skomplikowanej próbce biologicznej. W dalszych etapach przygotowania próbek biologicznych, stosowano 600 µg TiO₂ dla wzbogacania 100 µg mieszaniny peptydów otrzymanych po trawieniu enzymatycznym ekstraktu białkowego z trzustki mysiej.

Kolejnym parametrem optymalizowanym w badaniu była również szybkość wirowania podczas procesu wzbogacania z zastosowaniem złoża TiO₂. Wypracowano optymalne warunki wirowania podczas procesu wzbogacania, jak również podczas przemywania próbki pomiędzy poszczególnymi etapami wzbogacania (gdy zastosowano program podwójnej elucji ze złoża TiO₂). Potwierdzono także, że mieszanina peptydów powinna mieć 20-min kontakt z matrycą do wzbogacania, ale nie powinien on przekroczyć 40 min, gdyż wówczas efektywność połączenia fosfopeptydów z matrycą zmniejszała się.

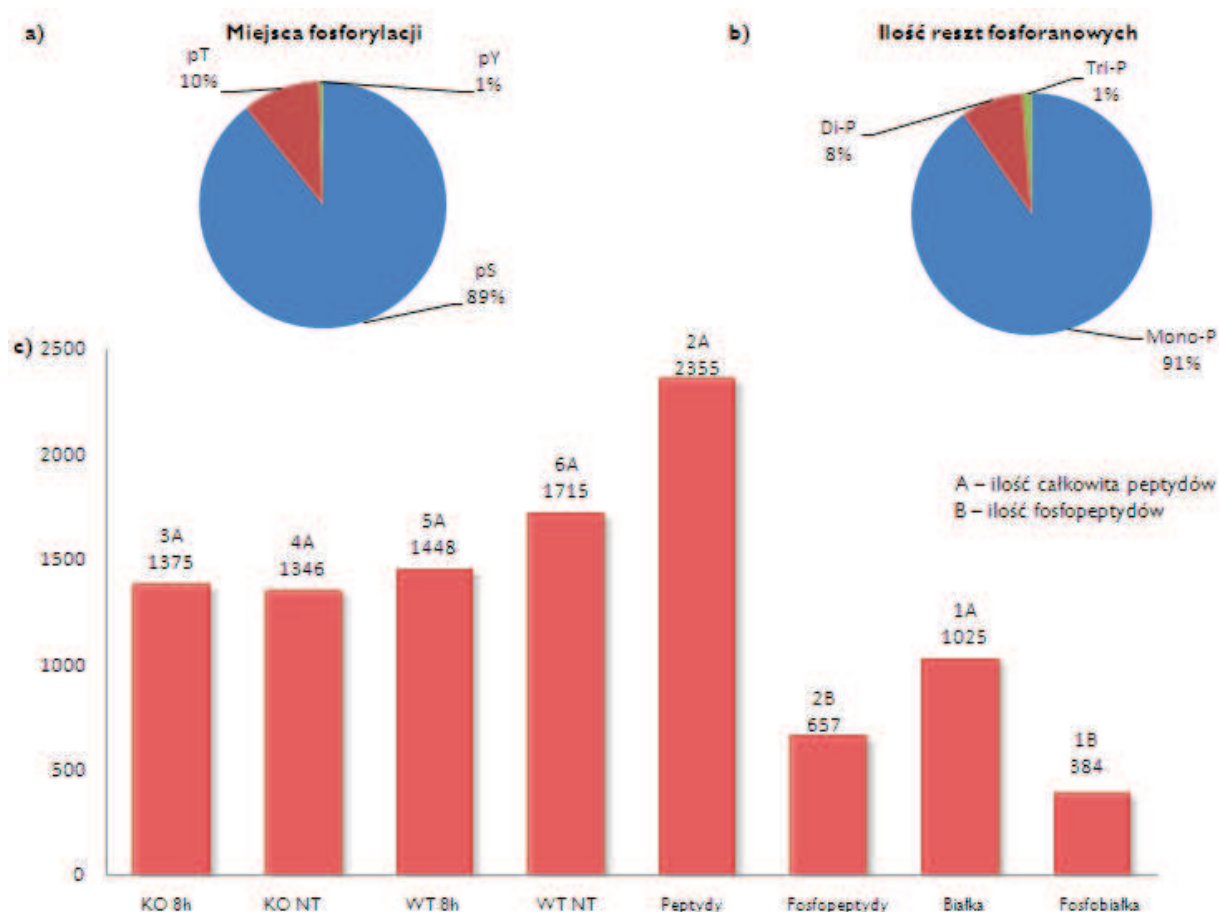
2.3. *Próbki biologiczne*

Ostatecznie zoptymalizowaną metodę zastosowano do ilościowej analizy fosfoproteomów otrzymanych z trzustki mysiej (Rycina 20).



Rycina 20. Schemat eksperymentów podczas jakościowej i ilościowej analizy fosfoproteomicznej.

Przeprowadzona analiza LC-MS/MS próbek biologicznych pozwoliła na identyfikację 2355 peptydów, spośród których 657 było fosforylowanych (Rycina 21). Większość zidentyfikowanych fosfopetydów (91%) posiadała jedną resztę fosforanową (MonoP na Rycinie 21). Dwa miejsca fosforylacji (DiP na Rycinie 21) zidentyfikowano dla 8% peptydów, podczas gdy tylko 1% białek posiadało trzy ufosforylowane aminokwasy (Tri-P na Rycinie 21) w sekwencji. Ustalono, że większość fosforylacji obejmowała serynę (pS) (87% zidentyfikowanych fosfopeptydów), podczas gdy tylko 10% fosforylacji zidentyfikowano dla treoniny (pT) i 1% dla tyrozyny (pY) (Rycina 21).



Rycina 21. a) Fosforylacja na serynie (pS), treoninie (pT) lub tyrozynie (pY);
 b) Ilość mono- (mono-P) i wielofosforylowanych peptydów (Di-P – dwie reszty kwasu fosforowego, Tri-P – trzy reszty fosforanowe);
 c) Ilość zidentyfikowanych peptydów dla próbek KO i WT po i przed zastosowaniem ceruleiny (3A-6A) oraz statystyki dotyczące wszystkich peptydów (2A), fosfopeptydów (2B), białek (1A) i białek zawierających fosfopeptydy (2B).

Wyniki eksperymentów potwierdziły, że wykorzystanie reduktywnej aminacji, połączonej z zagęszczeniem frakcji fosfobiałkowej z udziałem matrycy TiO_2 i ostateczna analiza próbek z użyciem techniki LC-MS/MS, umożliwia ocenę fosfobiałek w mniej skomplikowanych mieszaninach białek (ProtMix) oraz w przypadku bardziej złożonych próbek (ekstrakty z tkanek mysiej trzustki).

Analiza porównawcza fosfoproteomu w próbkach tkanek trzustki myszy, które nie były traktowane ceruleiną z tymi, w których wywołano ostre zapalenie, umożliwiła identyfikację 19 białek potencjalnie fosforylowanych przez kinazę Mnk1 (Tabela 5). Wśród nich wybrano 11 cechujących się największą intensywnością sygnału rejestrowanego przez detektor MS/MS. Wybrane białka należały do różnych grup, niemniej można było wyróżnić trzy grupy wiodące: białka wiążące RNA (6 białek), białka związane z cytoszkieletem (3 białka) oraz grupę białek związanych z aparatem Golgiego (2 białka). Wyniki analizy fosfoproteomiczej pozwoliły na zaproponowanie nowych białek – możliwych celów kinazy Mnk1. Segregacja

białek według grup przy użyciu algorytmu *Gene Ontology* była istotna, gdyż udało się ustalić, że do pierwszej wyszczególnionej grupy białek wiążących RNA należą znane substraty Mnk1 (jak np. eukariotyczny czynnik inicjujący translację, eIF4E). Druga grupa (białka związane z cytoszkieletem) może wskazywać, że Mnk1 może mieć dodatkową funkcję w regulacji cytoszkieletu i transportu enzymów w komórkach trzustki.

Tabela 5. Lista najważniejszych fosfobiałek zidentyfikowanych podczas ilościowej analizy fosfoproteomicznej.

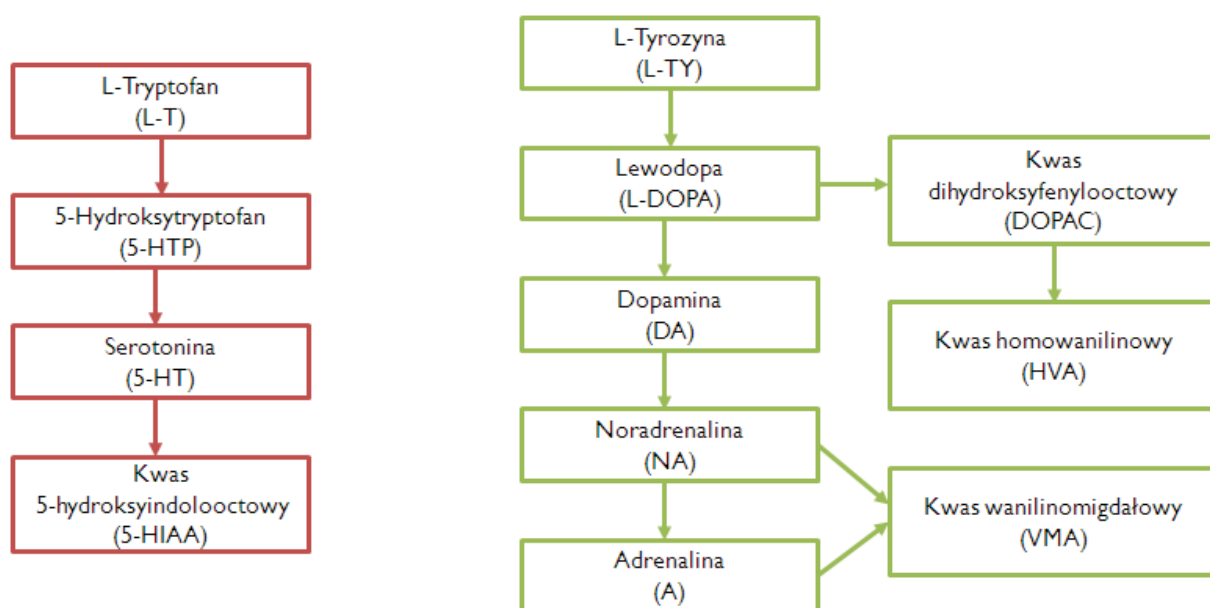
Legenda: klasyfikacja GO – klasyfikacja *Gene Ontology*

Nazwa białka	Grupa białka według klasyfikacji GO	Zidentyfikowany fragment sekwencji aminokwasowej
Sodium-coupled neutral amino acid transporter 3		_GFLQKsPSK_
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	Białko wiążące RNA	_TPATKRFSK_
Coatamer subunit gamma; Coatamer subunit gamma-1	Białko związane z aparatem Golgiego	_SVPLATtPMAEQRPESTATAAVK_
Protein NDRG1	Białko związane z cytoszkieletem	_SHtSEDARLNITPNSGATGNNAGPK_
Zinc finger Ran-binding domain-containing protein 2	Białko wiążące RNA	_EVEDKESEGEEDEDEDLSK_
Tumor protein D52		_NSPTFKsFEEK_
DIS3-like exonuclease 2	Białko wiążące RNA	_RPGLEKAsDEEPED_
Translation initiation factor eIF-2B subunit delta	Białko wiążące RNA	_TELsPRPGAAGRELtQEEK_
RalBP1-associated Eps domain-containing protein 1		_RTSSDHTNPTsPLLVKPSDLSEENK_
Formin-like protein 1	Białko związane z cytoszkieletem	_EAAADTSGREEPPTPKsPPK_
Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	Białko związane z cytoszkieletem	_AEDGAAPsPSSETPKK_
Low density lipoprotein receptor adapter protein 1	Białko związane z aparatem Golgiego	_ANQEGGDVPGtRRDSTPSLK_
Serine/arginine repetitive matrix protein 2	Białko wiążące RNA	_RQPSPQSPR_
Septin-7		_ILEQQNSSRtLEK_
Bcl-2-like protein 13		_sHTGEAAAVRGAK_
40S ribosomal protein S3a	Białko wiążące RNA	_LM(ox)ELHGEGGsSGK_
Protein PRRC2A		_GTsPGSELPPPK_
Hemoglobin subunit alpha		_VLSGEDKsNIK_
NSFL1 cofactor p47		_RRHsGQDVHVVLK_

3. Analiza związków małowcząsteczkowych (amin biogennych) w próbkach biologicznych nowotworów pochodzenia neuroendokrynnego z użyciem techniki MEKC-UV/VIS

Z uwagi na różne właściwości fizykochemiczne, wartości pK_a (wartości pK_a amin biogennych i ich metabolitów znacząco różnią się od siebie np. pK_a 3,6 dla DOPAC oraz pK_a 3,9 dla HVA lub pK_a 10,0 dla 5-HT, pK_a 8,50 dla NA albo pK_a 8,8 dla DA) oraz ich niskie stężenia fizjologiczne w płynach ustrojowych (np. 1-200 ng/mL moczu w przypadku A, 0,99-5 $\mu\text{g/mL}$ moczu dla VMA [123]) analiza amin biogennych i ich metabolitów stanowi wyzwanie analityczne [124,125]. Detekcja ich w materiale pochodzenia biologicznego (mocz, surowica) wymaga opracowania odpowiednio czulej i specyficznej metody analitycznej.

W niniejszym etapie pracy doktorskiej skoncentrowano się na optymalizacji metody analizy wybranych najważniejszych związków z grupy amin biogennych i ich prekursorów (Rycina 22), takich jak: tyrozyna, tryptofan, dopamina, lewodopa, serotonina, adrenalina i noradrenalina oraz ich metabolitów (kwas homowanilinowy, kwas wanilinomigdałowy, kwas dihydroksyfenylooctowy) w próbkach biologicznych z użyciem techniki MEKC-UV/VIS.



Rycina 22. Skrócony szlak przemian amin biogennych w organizmie.

W przebiegu wielu chorób nowotworowych, a w szczególności tych, które wywodzą się z komórek cewy nerwowej (w tym pochodzenia neuroendokrynnego) [2], mogą być wydzielane nadmierne ilości katecholamin (na przykład w przypadku nerwiaka zarodkowego współczulnego czy guza chromochłonnego nadnerczy), albo też indoloaminy (na przykład serotonina w zespole rakowiaka) [126-128]. Określenie stężeń poszczególnych amin w płynach ustrojowych może być używane podczas diagnostyki lub monitorowania tych

rodzajów nowotworów. Obecnie dostępne testy diagnostyczne pozwalają na analizę do 3-4 amin biogennych równocześnie [82,129]. Często jednak testy te są mało specyficzne lub czas ich wykonywania jest długi, a czułość pojedynczych biomakerów (np. DA czy HVA) jest niewystarczająca. Rzadko można spotkać testy służące do określania jednocześnie stężenia większej liczby różnych amin biogennych, a jeszcze rzadziej – wspólnej analizy amin biogennych i ich głównych metabolitów [130]. Istotne jest rozważenie właśnie nie tylko substancji macierzystych, ale również ich metabolitów. Przykładowo można rozpatrywać szlak metaboliczny tryptofanu. Otóż pomiar w moczu kwasu 5-hydroksyindolooctowego (5-HIAA) jest ważnym elementem diagnostycznym guzów NET, a jego fizjologiczne stężenie wynosi $<70 \mu\text{M}/24\text{-godzinną}$ zbiórkę moczu [131]. Jednak, niektórzy pacjenci z zespołem rakowiaka cechują się fizjologicznym poziomem 5-HIAA i w ich przypadku pomiar stężenia serotoniny (5-HT) w płytkach krwi uważa się za diagnostycznie ważniejszy. Z drugiej strony, wiele rakowiaków wywodzących się z przedniej części cewy jelitowej (ang. *foregut*) nie wytwarza aromatycznej dekarboksylazy α -aminokwasów i w związku z tym z małą wydajnością przekształca 5-hydroksytryptofan (5-HTP) do 5-HT. Nie jest możliwa w tych przypadkach obserwacja zwiększonego wydalania 5-HIAA z moczem. Obserwowane jest natomiast u tych pacjentów nadmierne wydzielanie 5-HT, ponieważ komórki nerek także posiadają aromatyczną dekarboksylazę α -aminokwasów. Diagnostyka może tu też obejmować pomiary nadmiernej produkcji 5-HTP do krwi [132].

Wciąż brakuje odpowiednio czułego i specyficznego biomarkera użytego podczas wczesnego i szybkiego wykrywania guzów NET lub nerwiaka zarodkowego współczulnego. Dlatego też, na dzień dzisiejszy rutynowe badania laboratoryjne wspierane są nowoczesnymi, zaawansowanymi technikami diagnostycznymi. Do takich technik należy pozytronowa tomografia emisyjna (ang. *positron emission tomography*, PET) lub obrazowanie z użyciem rezonansu magnetycznego (ang. *magnetic resonance imaging*, MRI) [133,134].

Ponadto, obecnie używane biomarkery rozpatrywanych nowotworów nie są specyficzne. Przykładowo, stężenie kwasu homowanilinowego (HVA) w moczu pozwala na diagnostykę nerwiaka zarodkowego współczulnego [135]. Jednak poziom HVA jest również wykorzystywany w przypadku monitorowania schizofrenii [136]. Podobną sytuację można zaobserwować w przypadku kwasu 5-hydroksyindolooctowego (5-HIAA), który jest głównym metabolitem serotoniny. Jego patologiczne stężenie w moczu jest obecnie uważane za biomarker guzów NET i używany jest podczas diagnostyki rakowiaków, ale głównie tych, które wywodzą się z jelita środkowego (np. dwunastnicy, jelita krętego, okrężnicy) [137]. Obniżony natomiast poziom w płynie mózgowo-rdzeniowym 5-HIAA może służyć do

diagnozowania osób ze skłonnościami samobójczymi [138]. Ponadto, na stężenie 5-HIAA w moczu wpływa dieta (pokarmy bogate w L-tryptofan, takie jak awokado, czekolada lub orzechy), zaś niektóre ksenobiotyki mogą powodować obniżenie poziomu 5-HIAA (kwas acetylosalicylowy, alkohol etylowy, selegilina lub moklobemid) lub jego podwyższenie (efedryna, diazepam, kofeina) [139].

Dlatego też tak ważna jest koncentracja na analizie jakościowej i ilościowej wielu amin biogennych jednocześnie z ich związkami macierzystymi i metabolitami w celu uzyskania wiarygodnej informacji o stanie patofizjologicznym organizmu. Co więcej, takie podejście może pozwolić na uzyskanie informacji na temat stanu zaawansowania choroby albo skuteczności zastosowanej terapii.

Trzecia część pracy doktorskiej skupiła się więc na optymalizacji nowej, zaawansowanej metody bioanalitycznej podczas specyficznej i czulej analizy jakościowej i ilościowej dziesięciu związków z grupy amin biogennych i ich metabolitów w matrycach biologicznych. Do przeprowadzenia rozdzielania składników i detekcji analitów użyto micelną elektrokinetyczną chromatografię (MEKC) wraz z detekcją UV/VIS z detektorem z matrycą diodową (DAD). Optymalizacji poddano warunki rozdzielania elektroforetycznego oraz ekstrakcję analitów z materiału biologicznego. W pierwszej kolejności, zastosowano zoptymalizowaną i zwalidowaną metodę podczas analizy porównawczej wybranych metabolitów amin biogennych w moczu pochodzącym od zdrowych ochotników badania i pacjentów ze zdiagnozowanymi, niewydzielającymi amin biogennych guzami [nowotwór podścieliskowy przewodu pokarmowego (GIST)], którzy stanowili grupę kontrolną, oraz moczu pobranego od pacjentów ze zdiagnozowanymi nowotworami wydzielającymi aminy biogenne: zwojakami zarodkowymi współczulnymi (NB) lub neuroektodermalnym nowotworem wieku dziecięcego (MNTI) (grupa badana).

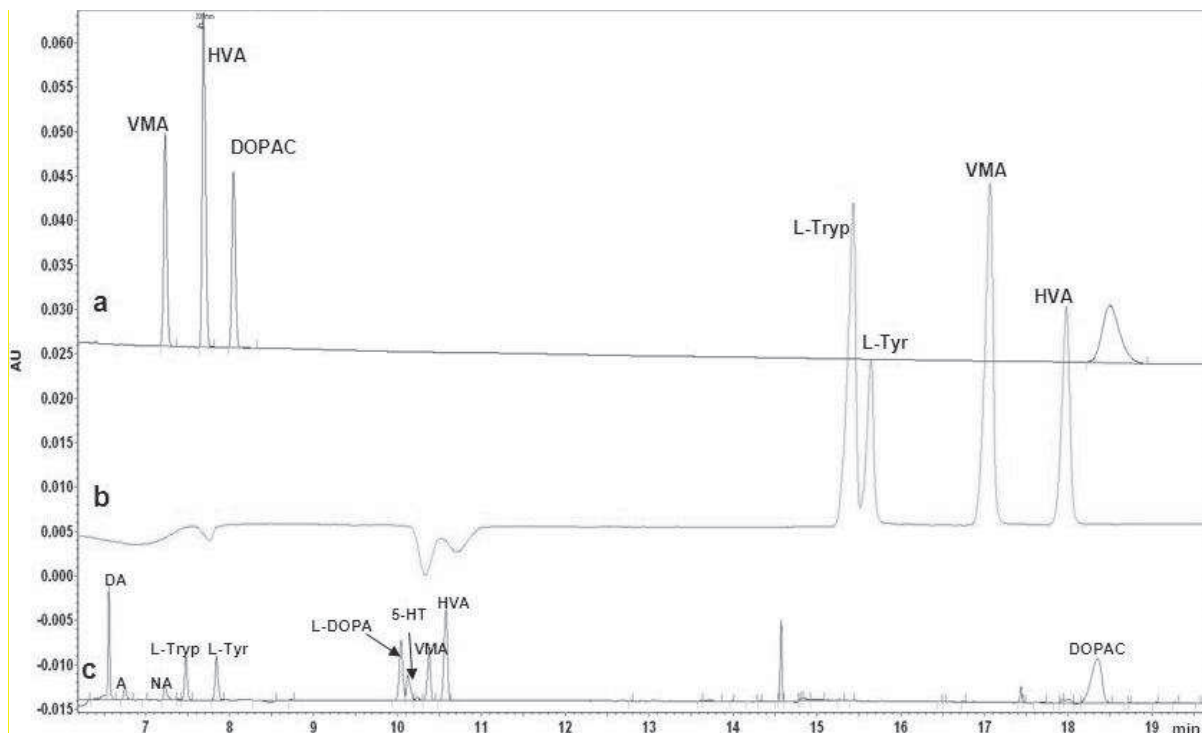
3.1. Optymalizacja metody rozdzielania amin biogennych z użyciem micelarnej elektrokinetycznej chromatografii z detekcją UV/VIS (MEKC-UV/VIS)

3.1.1. Opracowanie optymalnego składu buforu separacyjnego

Skład buforu separacyjnego (ang. *background electrolyte*, BGE), jest jednym z najistotniejszych elementów zapewniających odpowiednie rozdzielanie analitów metodami elektromigracyjnymi. Aby uzyskać optymalne rozdzielanie wszystkich analitów skład buforu należy zoptymalizować uwzględniając pH, jak również dodatek do niego lub brak

modyfikatorów organicznych oraz związków powierzchniowo czynnych (w przypadku realizowania rozdzielania metodą opartą o micelną elektrokinetyczną chromatografię).

W pierwszej kolejności, optymalizacji poddano pH buforu separacyjnego, ponieważ parametr ten ma znaczący wpływ na prędkość przepływu elektroosmotycznego, czyli także na czas migracji analitów, a także na kolejność migracji amin biogennych podczas rozdzielania elektroforetycznego [140]. Odpowiednia wartość pH buforu separacyjnego została dobrana po przestudiowaniu wartości pK_a analizowanych związków. Ustalenie optymalnej wartości pH buforu stanowiło duże wyzwanie, ponieważ wartości pK_a amin biogennych i ich metabolitów znacząco różnią się od siebie. Dlatego też, początkowo przeanalizowano wpływ buforu separacyjnego w szerokim zakresie pH, biorąc pod uwagę dotychczas stosowane i opisane w literaturze elektrolity używane podczas analizy amin biogennych [141-143]. Zaobserwowano, że w warunkach niskiego pH (bufor fosforanowy o pH 2,5) metabolity o charakterze kwaśnym (HVA, VMA, DOPAC) zostały dobrze rozdzielone w czasie 8 min, a intensywności ich sygnałów osiągnęły wysokie wartości (Rycina 23a). Z drugiej strony, niskie pH nie sprzyjało rozdzielaniu amin biogennych o charakterze zasadowym (DA, A, NA, L-Tryp, L-Tyr, L-DOPA, 5-HT). Podwyższenie pH buforu separacyjnego (bufor cytrynianowy pH 6,5) poprawiło rozdzielanie niektórych analitów o charakterze zasadowym (L-Tryp, L-Tyr) obok analitów o charakterze kwaśnym (VMA, HVA), jednak nie pozwoliło na rozdzielanie pozostałych analitów w rozsądnym czasie analizy (kilkanaście minut) (Rycina 23b). Zaobserwowano, że bufor złożony z 10 mM czteroboranu sodowego (bufor boranowy, boraks) doprowadzony do pH 9,36 dzięki dodatkowi 1 M wodorotlenku sodu pozwolił uzyskać dobrą wydajność rozdzielania wszystkich 10 analitów w czasie poniżej 20 min (Rycina 23c). Poprawiono więc rozdzielanie mieszaniny amin biogennych przy pH 9,36, przy czym dla niektórych z nich (L-DOPA, 5-HT) warunki rozdzielania wydawały się wciąż nie w pełni optymalne.



Rycina 23. Elektroferogramy otrzymane podczas rozdzielania 7 amin biogennych i ich 3 metabolitów w różnych warunkach pH buforu separacyjnego.

a – bufor fosforanowy o pH 2,5 (anality o stężeniu 10 µg/mL),

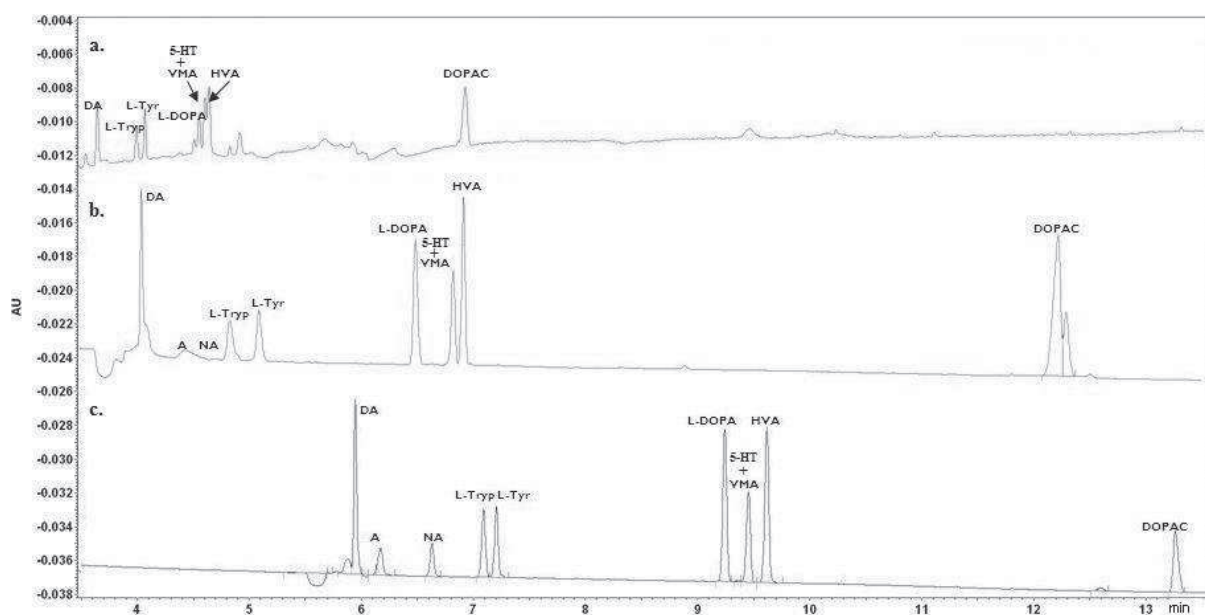
b – bufor cytrynianowy pH 6,5 (anality o stężeniu 10 µg/mL),

c – bufor boranowy o pH 9,36 (anality o stężeniu 5 µg/mL),

Warunki rozdzielania: przykładane napięcie: 25 kV; kapilara: długość 60,2 cm, i.d. 75 µm; długość fali: 200 nm; dozowanie próbek: 5 s (0,5 psi).

Legenda: DA – dopamina, A – adrenalina, NA – noradrenalina, L-Tryp – L-tryptofan, L-Tyr – L-tyrozyna, L-DOPA – lewodopa, 5-HT – serotonina, VMA – kwas wanilinomigdałowy, HVA – kwas homowanilinowy, DOPAC – kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy.

W następnym etapie, na podstawie danych literaturowych, zaproponowano dodatek dodecylsulfanu sodu (SDS) do buforu separacyjnego celem polepszenia rozdzielania niektórych amin biogennych poprzez tworzenie fazy pseudostacjonarnej i jednocześnie poprawienie ich rozpuszczalności [144]. Dodatek SDS miał także na celu zredukowanie oddziaływań analitu z kapilarą i poprawę rozdzielania amin biogennych nie obdarzonych ładunkiem elektrycznym. Przetestowano zróżnicowane stężenia SDS w buforze separacyjnym od 10 µM do 80 µM. Uzyskane wyniki wykazały, że SDS istotnie wpływa na rozdzielczość metody. Stężenie SDS powyżej 80 µM (Rycina 24a) powodowało wzrost ciepła Joule'a i prądu i rozdzielanie było obarczone niestabilnością linii podstawowej. Stężenia niższe (50 µM) (Rycina 24b) pozwoliły na satysfakcjonujące rozdzielanie, chociaż wciąż nie dla wszystkich analitów. Ostatecznie, dodatek 30 µM SDS do buforu separacyjnego (Rycina 24c) został uznany za najbardziej optymalny chociaż wciąż nie zaobserwowano rozdzielania 5-HT i VMA. Dodatkowo, natężenie prądu utrzymywało się na stałym poziomie 40 µA.



Rycina 24. Elektroferogramy otrzymane podczas rozdzielania 7 amin biogennych i ich 3 metabolitów z uwzględnieniem modyfikacji składu dodecylosiarczanu sodu (SDS) w buforze separacyjnym: roztwór dziesięciu analitów wzorcowych; każdy o stężeniu 5 $\mu\text{g/mL}$, przy zachowaniu stałego stężenia boraksu (10 mM) i metanolu [15% (v/v)].

a) 80 mM SDS w buforze separacyjnym;

b) 50 mM SDS w buforze separacyjnym;

c) 30 mM SDS w buforze separacyjnym.

Warunki rozdzielania: przykładane napięcie: 25 kV; kapilara: długość 50,2 cm, i.d. 75 μm ; długość fali: 200 nm; dozowanie próbek: 5 s (0,5 psi).

Legenda: DA – dopamina, A – adrenalina, NA – noradrenalina, L-Tryp – L-tryptofan, L-Tyr – L-tyrozyna, L-DOPA – lewodopa, 5-HT – serotonina, VMA – kwas wanilinomigdałowy, HVA – kwas homowanilinowy, DOPAC – kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy.

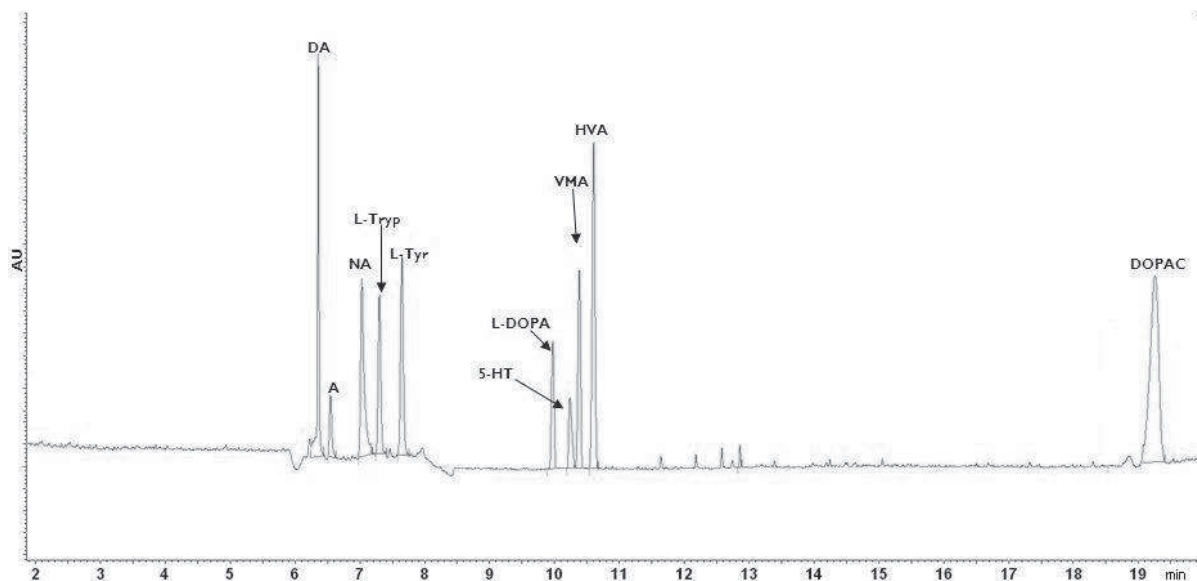
W następnej kolejności przestudiowano dodatek modyfikatora organicznego – metanolu (MeOH) – do buforu separacyjnego, w celu poprawienia rozdzielania amin biogennych. Próby te podjęto z uwagi na fakt, że rozpuszczalniki organiczne mogą ułatwić całkowite rozdzielanie związków o podobnej strukturze chemicznej, podobnych wartościach pK_a , a co za tym idzie – obdarzonych podobną ruchliwością elektroforetyczną. Metanol pozwala na całkowite rozpuszczenie częściowo tylko rozpuszczalnych w buforze separacyjnym analitów, co więcej – wydłuża ich czasy migracji, przez co często dochodzi do poprawienia rozdzielania. Kolejną zaletą jest pozytywny wpływ metanolu na interakcje pomiędzy analitem a micelą, co umożliwia polepszenie rozdzielania związków o charakterze hydrofobowym. Z drugiej strony, należy być ostrożnym podczas dodawania modyfikatorów organicznych do buforu separacyjnego, ponieważ ich zbyt wysokie stężenie może powodować destrukcję miceli w MEKC. W prezentowanym badaniu przeprowadzono test użyteczności dodatku metanolu do buforu podstawowego w stężeniu od 10 do 25% (v/v). Zaobserwowano, że

dodatek MeOH o stężeniu powyżej 20% skutkował spadkiem rozdzielczości i zaburzał sygnały analitów. Najkorzystniejsze rozdzielanie amin biogennych uzyskano po zastosowaniu 15% (v/v) metanolu i 30 mM dodecylsulfianu sodu w buforze separacyjnym (Rycina 24c). W tych warunkach nadal nie było możliwe jednak rozdzielanie serotoniny (5-HT) od VMA. Dlatego też postanowiono sprawdzić wpływ dodatku cyklodekstryn (CDs) do buforu separacyjnego, gdyż mogą one być pomocne w rozdzielaniu związków małowczątkowych, które albo nie są całkowicie rozpuszczalne w wodzie, albo nie zostały inkorporowane do miceli stworzonej przez SDS.

Cyklodekstryny mogą być dodawane do buforów stosowanych w MEKC głównie w celu redukcji oddziaływań SDS-analit, co mogłoby okazać się przydane szczególnie do poprawy rozdzielania tych związków, dla których sam dodatek SDS i MeOH nie wystarczył (jak na przykład wspomniana serotonina). Przetestowano więc α -cyklodekstrynę (α -CD), ponieważ jest to najmniejsza spośród CDs zdolna do tworzenia wiązań kompleksowych ze związkami o niskich masach cząsteczkowych – takich jak na przykład aminy biogenne i ich metabolity.

Rycina 25 obrazuje znaczącą poprawę rozdzielania wszystkich analitów po zastosowaniu dodatku 25 mM α -CD do buforu separacyjnego. W tych warunkach możliwe było rozdzielanie także serotoniny (5-HT), a sygnały adrenaliny (A) i noradrenaliny (NA) zyskały na sile, w porównaniu do warunków bez dodatku cyklodekstryny (Rycina 24c). W obu przypadkach – bez i z dodatkiem α -cyklodekstryny – anality poddane rozdzielaniu ułożyły się w trzy główne grupy: na początku rozdzielaniu uległy związki o charakterze zasadowym (dopamina, adrenalina, noradrenalina, L-tryptofan, L-tyrozyna), następnie lewodopa i serotonina, a na samym końcu metabolity o charakterze kwaśnym (kwas wanilinomigdałowy, kwas homowanilinowy, kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy).

Podsumowując, zoptymalizowany bufor separacyjny składał się z 10 mM boraksu, 30 mM SDS, 15% MeOH oraz 25 mM α -CD i umożliwił uzyskanie wysokiej rozdzielczości podczas jednoczesnej analizy MEKC wszystkich badanych neuroprzekaźników i ich metabolitów. Całkowity czas analizy wynosił 20 min, a natężenie prądu utrzymywało się na stałym poziomie (40 μ A).



Rycina 25. Elektroferogram uzyskany podczas rozdzielania mieszaniny dziesięciu substancji wzorcowych amin biogennych (każda o stężeniu 5 $\mu\text{g/mL}$) z użyciem optymalnego składu buforu separacyjnego: 30 mM SDS, 10 mM boraks, 15% (v/v) MeOH, 25 mM αCD , pH 9,36.

Warunki rozdzielania: przykładane napięcie: 25 kV; kapilara: długość 60,2 cm, i.d. 75 μm ; długość fali: 200 nm; dozowanie próbek: 5 s (0,5 psi).

Legenda: DA – dopamina, A – adrenalina, NA – noradrenalina, L-Tryp – L-tryptofan, L-Tyr – L-tyrozyna, L-DOPA – lewodopa, 5-HT – serotonina, VMA – kwas wanilinomigdałowy, HVA – kwas homowanilinowy, DOPAC – kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy.

3.1.2. Optymalizacja składu próbki do analizy

Bufor, w którym wprowadza się próbkę do kapilary, ma bardzo duży wpływ na rozdzielczość metody elektroforetycznej. Poprzez modyfikację składu próbki przed jej wprowadzeniem do układu CE można uzyskać znaczący wzrost intensywności sygnału i poprawę parametrów analitycznych metody. Przetestowano kilka rodzajów buforów do przygotowania próbki. Początkowo, standardowa mieszanina amin biogennych została rozpuszczona w 2 mM boraksie, 6 mM SDS oraz 3% MeOH (v/v). W tych warunkach jednak rozdzielanie analitów uległo pogorszeniu. Z drugiej strony, jeżeli próbka została przygotowana w mieszaninie składników buforu separacyjnego o niższym stężeniu, nie osiągnięto poprawy rozdzielczości metody MEKC w porównaniu do warunków, w których próbka została rozpuszczona tylko w wodzie. W związku z tym, próbka rozpuszczona tylko w wodzie umożliwiła uzyskanie satysfakcjonującej czułości dla wszystkich objętych badaniem analitów.

3.1.3. Ustalenie parametrów aparaturowych

3.1.3.1. Parametry kapilary

Badano wpływ przyłożonego napięcia na kapilarę i odpowiedniej temperatury procesu na rozdzielczość opracowanej metody MEKC. Aby wybrać odpowiednie napięcie sprawdzano różne jego wartości (pomiędzy 15 a 30 kV). Przykładając wyższe napięcie, czas analizy ulegał skróceniu, a uzyskane piki analitów posiadały bardziej symetryczne kształty. W tych warunkach dochodziło jednak również do niepożądanego wzrostu natężenia prądu oraz wytwarzania ciepła Joule'a. Ostatecznie zastosowano więc napięcie 25 kV w celu zmniejszenia ogrzewania wnętrza kapilary z jednoczesnym zachowaniem satysfakcjonującego rozdzielania analitów i relatywnie krótkiego czasu analizy (20 min).

Dodatkowo, temperatura kapilary była utrzymywana na stałym poziomie 25°C, tak aby zachować stałą lepkość, mobilność elektroforetyczną i czasy migracji analizowanych związków.

Rozdzielanie elektroforetyczne wybranych amin biogennych zostało wykonane przy użyciu kapilar krzemionkowych ze średnicą wewnętrzną (i.d.) równą 75 lub 50 μm i całkowitą długością równą 40,2, 50,2 lub 60,2 cm (długość efektywna wynosiła odpowiednio: 30, 40 lub 50 cm). Najdłuższa kapilara umożliwiła rozdzielanie wszystkich analitów, dlatego też właśnie kapilara o długości 60,2 cm została wybrana do dalszych analiz.

Na podstawie badań dotyczących przygotowania próbki za najkorzystniejszą wybrano kapilarę o i.d. 75 μm , która umożliwiła wprowadzenie większych objętości próbki, z jednoczesnym pozytywnym efektem na obniżenie granic wykrywalności dla analitów objętych badaniem.

3.1.3.2. Długość fali UV/VIS

Z uwagi na fakt, że aminy biogenne posiadają układy chromoforowe w swojej strukturze, możliwa jest ich analiza spektrofotometryczna. Analiza jakościowa amin biogennych przebiegała z wykorzystaniem wcześniej opisanego, zoptymalizowanego buforu separacyjnego, optymalnych parametrów aparaturowych oraz długości fali UV/VIS. Dzięki użyciu detektora DAD zarejestrowano widma próbki w szerokim zakresie fal (od 190 do 300 nm) i zebrano jednocześnie liczne sygnały analitów oraz wytypowano optymalną długość fal (200 nm) umożliwiającą czułą detekcję badanych amin biogennych. Dodatkowo użycie detektora z matrycą diodową umożliwiło prześledzenie czystości pików poprzez nałożenie na

siebie sygnałów poszczególnych analitów przy różnej długości fal i potwierdzenie ich wzajemnego dopasowania.

3.2. Optymalizacja przygotowania próbek do analizy

W następnym etapie badań optymalizowano metodę przygotowania próbek do analizy MEKC, a więc ekstrakcję badanych związków z materiału pochodzenia biologicznego. Pierwszym celem była analiza próbek moczu pacjentów ze zdiagnozowanymi guzami: neuroblastoma (NB) oraz neuroektodermalnym nowotworem wieku dziecięcego (MNTI), dlatego też początkowo badania skoncentrowały się na ekstrakcji metabolitów o charakterze kwaśnym (kwasu homowanilinowego, kwasu wanilinomigdałowego oraz dodatkowo kwasu 3,4-dihydroksyfenylooctowego) z próbek moczu (zbiórka 24-godzinna).

W prezentowanym badaniu, zaproponowano przygotowanie próbek przed analizą MEKC, które składało się wyłącznie z ekstrakcji typu ciecz-ciecz (LLE) bez konieczności uprzedniego przeprowadzenia w pochodne analitów. Dzięki temu czas przygotowania pojedynczej próbki był względnie krótki.

Podczas optymalizacji procedury LLE do ekstrakcji z moczu kwasu homowanilinowego, kwasu wanilinomigdałowego oraz kwasu 3,4-dihydroksyfenylooctowego przetestowano kilka rodzajów rozpuszczalników organicznych. Najbardziej efektywna, cechująca się najwyższymi odzyskami analitów, okazała się ekstrakcja z zastosowaniem eteru dietylowego. Procedura z użyciem tego odczynnika umożliwiła znaczne skrócenie całkowitego czasu potrzebnego na przygotowanie próbki w porównaniu do czasu eksperymentu wykorzystującego octanu etylu (z 1,5 h do 40 min).

Dodatkowo, badano wpływ pH próbki moczu na stabilność analitów. Okazało się, że pH znacząco wpływa na odzysk analitów z matrycy biologicznej i powinno być utrzymywane na poziomie pH 1-2 w czasie procedury LLE. Praca w bardziej zasadowym środowisku (pH powyżej 4), skutkowała niższym odzyskiem odnotowywanym dla kwasu homowanilinowego i kwasu wanilinomigdałowego. Wyniki te były zgodne z danymi literaturowymi dowodzącymi, że odpowiednie warunki kwasowo-zasadowe są krytyczne dla powodzenia ekstrakcji LLE w przypadku metabolitów amin biogennych [144]. Anality te bowiem z powodzeniem ekstrahują się przy użyciu eteru, gdy występują w niezjonizowanej postaci, jak to ma miejsce w $\text{pH} < 3$.

Końcowym etapem procedury przygotowania próbek moczu do analizy MEKC było odparowanie jej do sucha na łaźni wodnej w temp 30°C , i następnie rozpuszczenie w 500 μL wody. Zrezygnowano z odparowywania próbki pod ciśnieniem, z obawy na niską temperaturę

samozapłonu eteru i niższą kontrolę takiego sposobu odparowywania próbki w porównaniu z odparowywaniem rozpuszczalnika na łaźni wodnej. Próbkę rozpuszczano w wodzie, gdyż takie medium pozwoliło na uzyskanie najbardziej satysfakcjonującego obrazu tła próbki biologicznej. Zastosowana procedura nie tylko umożliwiła zadowalającą ekstrakcję wybranych związków z materiału biologicznego przy jak najmniejszym zużyciu toksycznych rozpuszczalników, ale również okazała się łatwa w wykonaniu i powtarzalna w porównaniu do innych opisanych i dotychczas używanych metod ekstrakcji tych związków [145,146].

W celu redukcji błędów oznaczeń wynikających z zastosowanej procedury ekstrakcji oraz w celu normalizacji wyników, użyto wzorca wewnętrznego. Z uwagi na podobną budowę chemiczną, wybrano w tym celu kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy (3,4-DHBA), który nie występuje w moczu zdrowym, jak również patologicznie zmienionym (np. u pacjentów z neuroblastomą). Dodatkowo, wykonano krzywą kalibracyjną dla każdego z analitów.

3.3. Walidacja metody analitycznej

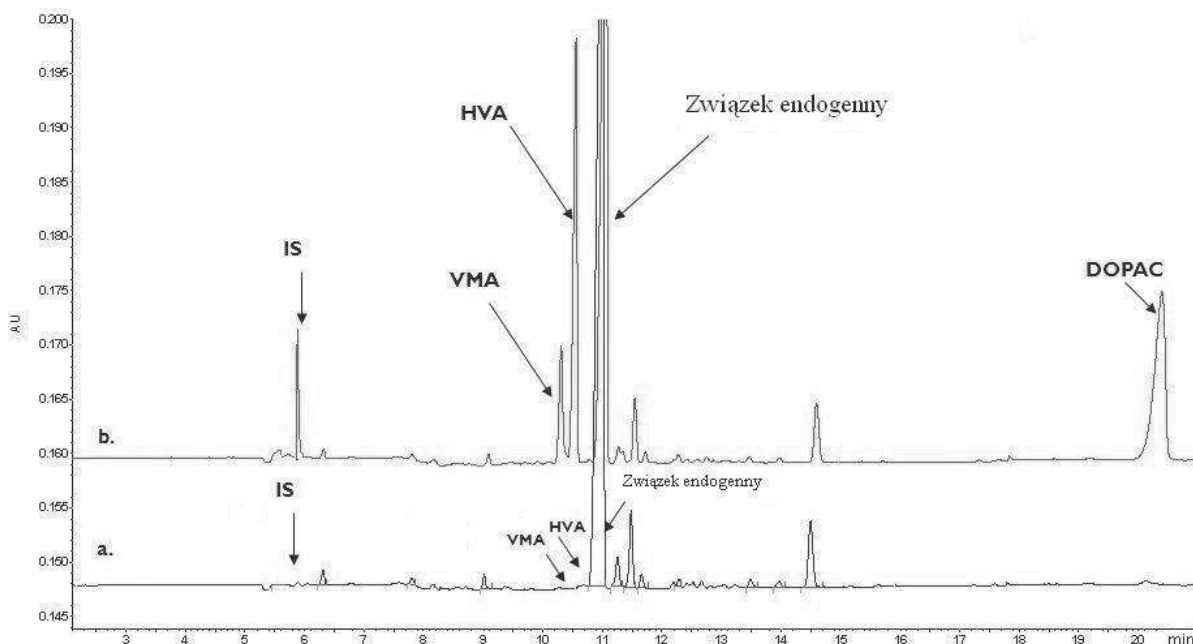
Opracowana metoda elektroforetyczna MEKC została oceniona pod względem selektywności, liniowości, granicy oznaczalności i wykrywalności, dokładności, odzysku i niewrażliwości, zgodnie z wytycznymi Agencji Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) oraz Międzynarodowej Konferencji ds. Harmonizacji (ang. *International Conference on Harmonization*, ICH). Dla każdego z analitów wyznaczono krzywe kalibracyjne, na podstawie których porównano stosunki pól powierzchni analitu do pola powierzchni wzorca wewnętrznego względem stężenia poszczególnych amin biogennych w $\mu\text{g/mL}$, za pomocą modelu regresji liniowej. W tym celu próbki czystego moczu, oczyszczane za pomocą węgla aktywowanego, wzbogacano kwasem homowanilinowym w stężeniu od 0,5 do 100 $\mu\text{g/mL}$ oraz kwasem wanilinomigdałowym i kwasem 3,4-dihydroksyfenylooctowym, każde w stężeniu od 0,5 do 50 $\mu\text{g/mL}$. Następnie, próbki poddano ekstrakcji opisanej w podrozdziale 3.3.1. Dla każdej krzywej wykonano po sześć niezależnych prób zawierających zmienne ilości analitu mieszczące się w całym zakresie stężeń.

Liniowości metody określono na podstawie sześciu niezależnych krzywych kalibracji sporządzonych w tym samym dniu analizy. Współczynniki korelacji (R) wynosiły powyżej 0,9995 dla wszystkich analitów, co potwierdza, że metoda jest liniowa w badanym zakresie stężeń (Tabela 6).

Tabela 6. Podsumowanie parametrów walidacyjnych w zakresie stężeń 0,5-100 µg/mL dla HVA, 0,5-50 µg/mL dla VMA oraz DOPAC uzyskanych po analizie z użyciem zoptymalizowanej metody MEKC ($n = 6$).

Analit	Równanie regresji liniowej		Współczynnik korelacji (R)	LOD [µg/mL]	LOQ [µg/mL]
	Przecięcie z osią x (\pm SD)	Przecięcie z osią y (\pm SD)			
VMA	0,0511 (\pm 0,0005)	0,0452 (\pm 0,0125)	0,9996	0,10	0,50
HVA	0,1410 (\pm 0,0016)	0,0906 (\pm 0,038)	0,9995	0,10	0,50
DOPAC	0,1530 (\pm 0,0009)	-0,0483 (\pm 0,022)	0,9998	0,25	0,50
Powtarzalność					
Analit	Stężenie nominalne [µg/mL]	Stężenie znalezione eksperymentalnie [µg/mL]	Precyzja [RSD%]	Dokładność [%]	
VMA	5,00	4,82	2,73	96,1	
	50,00	50,31	4,24	100,63	
HVA	5,00	4,87	1,3	95,6	
	50,00	50,38	0,6	100,8	
DOPAC	5,00	4,77	1,97	82,1	
	50,00	49,83	3,29	103,7	

Selektywność metody została zweryfikowana poprzez analizę czystego moczu bez dodatku analizowanych substancji oraz próbek moczu z dodanymi analitami tak, aby ocenić, czy nie zachodzą interferencje sygnałów składników matrycy w czasie migracji analizowanych substancji. Przykładowe elektroferogramy czystego (a) i wzbogaconego o badane związki moczu (b) (20 µg/mL HVA oraz 10 µg/mL VMA, DOPAC, 3,4-DHBA), przedstawia Rycina 26. Żaden z endogennych związków obecnych w moczu nie interferuje w czasie migracji z pikami wybranych analitów.



Rycina 26. Elektroferogram przedstawiający próbkę moczu kontrolną (a) oraz próbkę moczu (b) wzbogaconą analizowanymi substancjami (HVA o stężeniu 20 $\mu\text{g/mL}$, VMA, DOPAC, IS o stężeniu 10 $\mu\text{g/mL}$).

Warunki rozdzielania: przykładane napięcie: 25 kV; kapilara: długość 60,2 cm, i.d. 75 μm ; długość fali: 200 nm; dozowanie próbki: 5 s (0,5 psi).

Legenda: VMA – kwas wanilinomigdałowy, HVA – kwas homowanilinowy, DOPAC – kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy, IS – wzorzec wewnętrzny – kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy.

Granica wykrywalności (LOD), została wyznaczona na podstawie sześciu niezależnie wykonanych prób kalibracyjnych jako najniższe mierzone stężenie pików, którego wysokość jest co najmniej trzykrotnie wyższa od szumów linii podstawowej. Granicę wykrywalności dla HVA, VMA określono na poziomie 0,1 $\mu\text{g/mL}$, podczas gdy dla DOPAC na poziomie 0,25 $\mu\text{g/mL}$.

Granica oznaczalności (LOQ), precyzja i dokładność metody zostały wyznaczone na podstawie analizy opartej na sześciu niezależnie wykonanych krzywych kalibracyjnych, przy czym LOQ wyznaczono jako najniższe stężenie, które może być oznaczone z precyzją poniżej 15% (wyrażoną jako względne odchylenie standardowe: RSD%), dokładnością opisaną jako procent stężenia wyjściowego w granicach 80 – 120% oraz stosunkiem sygnału do szumu wyższego niż 10. LOQ wyniosła 0,5 $\mu\text{g/mL}$ dla HVA, VMA i DOPAC, które odpowiada najniższemu stężeniu krzywej kalibracji badanych związków.

Jak wspomniano powyżej, precyzja metody, wyrażona w RSD%, została wyznaczona poprzez przeprowadzenie analizy sześciu niezależnych próbek moczu zawierających anality w zakresie stężeń od 0,5 do 100 $\mu\text{g/mL}$ dla HVA, od 0,5 do 50 $\mu\text{g/mL}$ dla VMA i DOPAC, odpowiednio w czasie jednego dnia (powtarzalność) oraz trzech próbek o stężeniach 0,5, 5 i

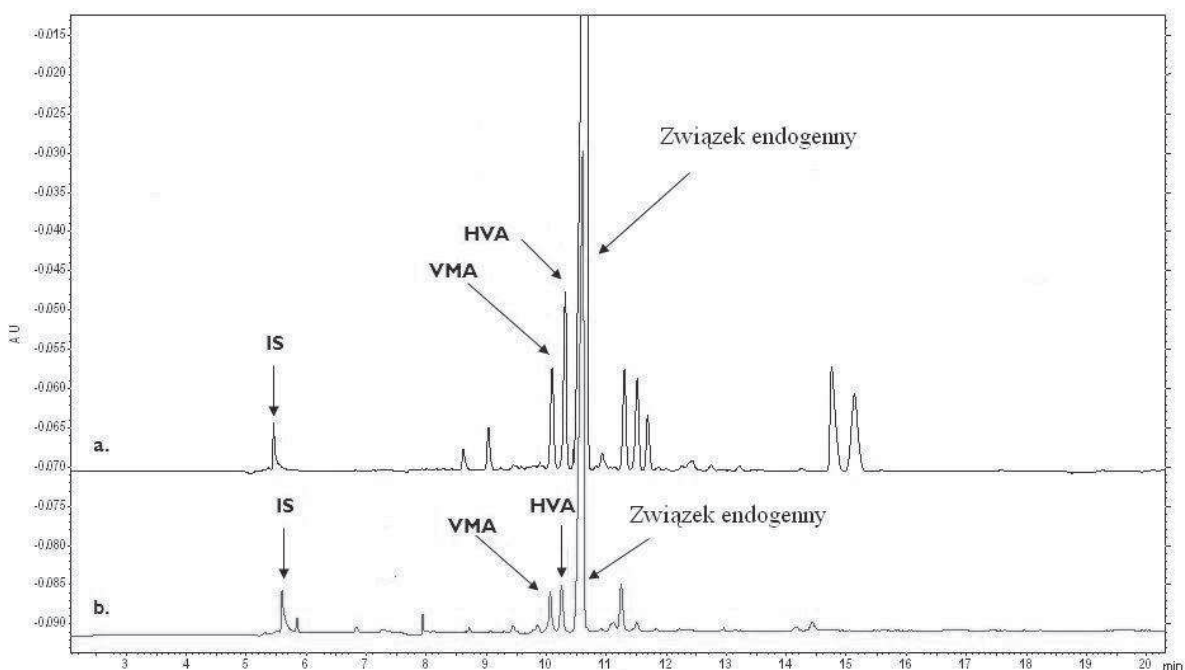
50 µg/mL, które analizowano przez pięć kolejnych dni w czasie jednego miesiąca (odtwarzalność pośrednia). Powtarzalność metody wyniosła 4,24% dla VMA, 1,30% dla HVA oraz 3,29% dla DOPAC, podczas gdy odtwarzalność pośrednia nie przekroczyła 9,90%. Dokładność metody obliczono poprzez porównanie mierzonego i znanego stężenia analizowanych składników [(znaleziona/dodana ilość) x 100%], przy czym wartość tego parametru w cyklu jednodniowym wynosiła od 96,1-100,6% dla VMA, 95,6-100,8% dla HVA oraz 82,1-103,7% dla DOPAC. Dokładność dla wszystkich badanych związków w cyklu kilkudniowym mieściła się w zakresie 81,2-108,8%.

Odzysk każdego z analitów z moczu został wyznaczony na podstawie analizy próbek dla dwóch poziomów stężeń (5 i 50 µg/mL dla HVA, VMA i DOPAC). Dla każdego ze stężeń wykonano po sześć powtórzeń. Średni odzysk dla analizowanych substancji przekraczał 96,1%, podczas gdy odzysk wzorca wewnętrznego (kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy, 3,4-DHBA) wynosił $88,9 \pm 6,5\%$. Otrzymane dane potwierdziły, że zaproponowana metoda ekstrakcji jest odpowiednio czuła dla analizy ilościowej metabolitów amin biogennych w próbkach moczu. Ponadto, każdy z analitów został oznaczony zgodnie z wytycznymi rekomendowanymi przez FDA i ICH, które określają ogólnie obowiązujące kryteria walidacyjne metody bioanalitycznej.

Niewrażliwość metody została zweryfikowana poprzez badanie wpływu drobnych zmian parametrów aparaturowych takich jak: pH buforu separacyjnego, wielkość zastosowanego napięcia oraz temperatura, na wydajność procesu rozdzielania opracowanej metody. Zbadano wpływ niewielkich zmian pH buforu separacyjnego w zakresie 9,26, 9,36 i 9,46 na powtarzalność czasów migracji analitów. Zaobserwowano, że czasy migracji analitów były powtarzalne przy niewielkich zmianach pH buforu i w testowanym zakresie ten parametr nie miał wpływu na wydajność rozdzielania. Utrzymanie stałej temperatury podczas procesu rozdzielania jest szczególnie ważne, ponieważ gwarantuje skuteczną eliminację wpływu ciepła Joula na poszerzanie sygnałów i obniżenie rozdzielczości. Zbadano wpływ niewielkich zmian temperatur (w obrębie 25°C) podczas procesu rozdzielania i stwierdzono, że nie wpłynęły na rozdzielczość i kształt pików. Natomiast zaobserwowano, że niewielkie zmiany napięcia (rzędu 1 kV) spowodowały obniżenie wydajności procesu rozdzielania (zlewanie się niektórych sygnałów pochodzących od analitów). Było to spowodowane analizą jednoczesną wielu związków z grupy amin biogennych, wśród których znajdowały się anality bardzo podobne do siebie pod względem właściwości fizykochemicznych (jak kwas wanilinomigdałowy i kwas homowanilinowy, które różnią się między sobą tylko jedną grupą hydroksylową).

3.4. Zastosowanie opracowanej metody MEKC-UV/VIS podczas analizy próbek biologicznych

Zoptymalizowana metoda MEKC z detekcją UV/VIS, została zastosowana do analizy próbek pochodzenia biologicznego – moczu – pobranych od pacjentów ze zdiagnozowanymi guzami neuroblastoma (NB) oraz pacjenta z neuroektodermalnym nowotworem wieku dziecięcego (MNTI) (grupa badana), jak również od zdrowych ochotników i pacjenta z nowotworem podścieliskowym przewodu pokarmowego (GIST) (próbki kontrolne). Wysoka rozdzielczość i czułość opracowanej metody MEKC umożliwiły oznaczenie stężeń fizjologicznych badanych analitów i ich porównanie ze stężeniami w moczu pacjentów. Rycina 27 przedstawia elektroferogramy zarejestrowane w przypadku próbki moczu pacjenta z neuroblastomą (Rycina 27a) oraz dla próbki moczu zdrowego ochotnika (Rycina 27b).



Rycina 27. Przykładowe elektroferogramy otrzymane po analizie moczu pacjenta z neuroblastomą (a) oraz moczu od zdrowego ochotnika (b). Zarejestrowane stężenia HVA, VMA wynosiły odpowiednio 19 oraz 15 $\mu\text{g/mL}$ dla pacjentów, podczas gdy stężenia HVA i VMA w moczu zdrowych ochotników wynosiły odpowiednio 2 oraz 1 $\mu\text{g/mL}$. IS o stężeniu 2,5 $\mu\text{g/mL}$.

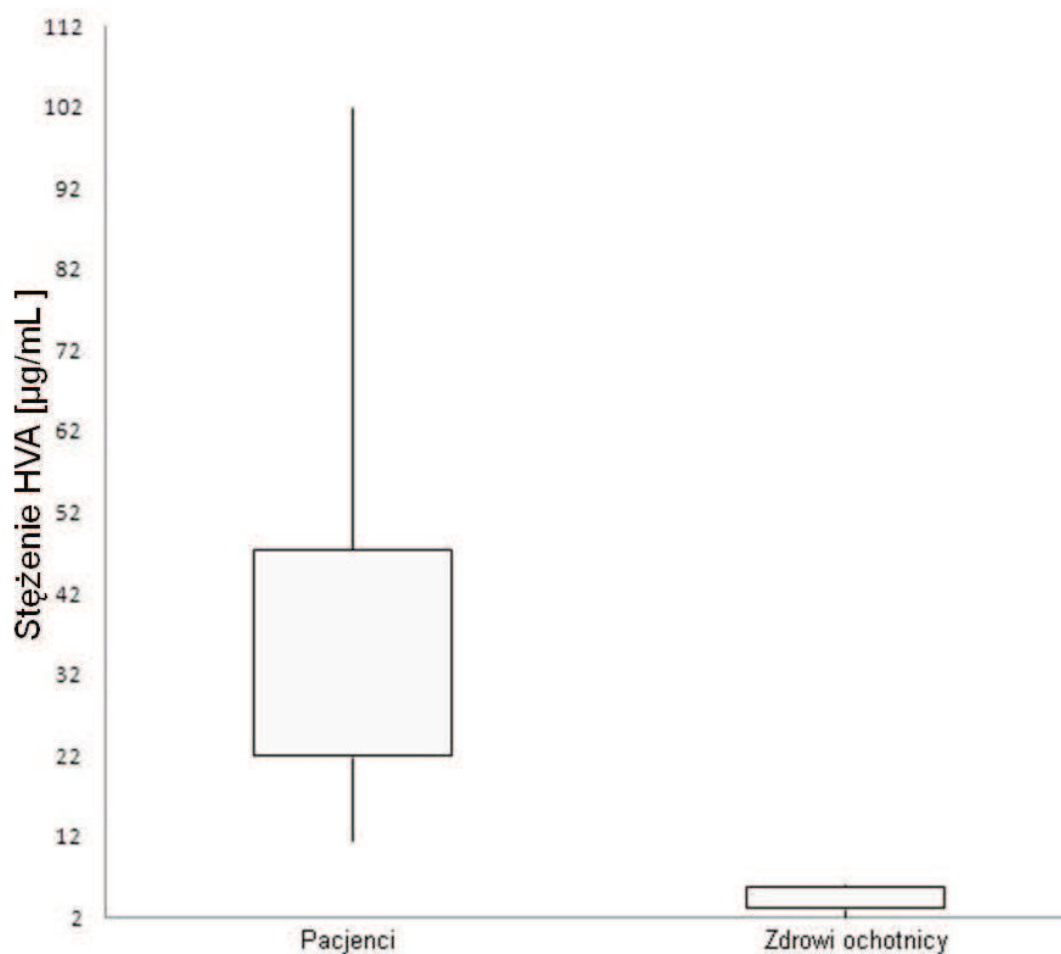
Warunki rozdzielania: przykładane napięcie: 25 kV; kapilara: długość 60,2 cm, i.d. 75 μm ; długość fali: 200 nm; dozowanie próbki: 5 s (0,5 psi).

Legenda: VMA – kwas wanilinomigdałowy, HVA – kwas homowanilinowy, IS – wzorzec wewnętrzny – kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy.

Tabela 7. Stężenia (w $\mu\text{g/mL}$) VMA, HVA i DOPAC dla poszczególnych uczestników badania.
 Legenda: NB – neuroblastoma, MNTI – neuroektodermalny nowotwór wieku dziecięcego, GIST – nowotwór podścieliskowy przewodu pokarmowego, NA – nie oznaczono

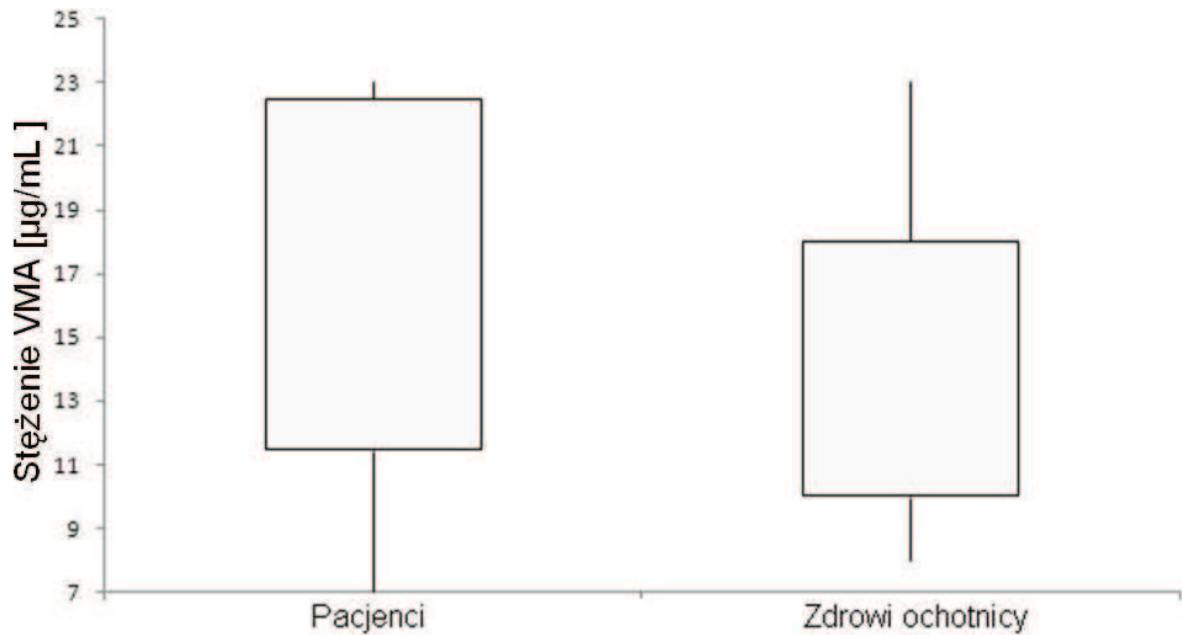
Numer	Rozpoznanie	VMA [$\mu\text{g/mL}$]	HVA [$\mu\text{g/mL}$]	VMA/HVA	DOPAC [$\mu\text{g/mL}$]
1	NB	22,0	19,0	1,16	NA
2	NB	8,0	25,0	0,32	NA
3	NB	15,0	50,0	0,30	NA
4	NB	7,0	102,0	0,07	20,5
5	NB	23,0	11,5	2,00	NA
6	NB	22,0	45,0	0,49	NA
7	MNTI	23,0	30,0	0,76	NA
8	GIST	6,0	2,0	3,00	NA
9	Zdrowy ochotnik	5,1	2,0	2,55	NA
10	Zdrowy ochotnik	12,0	3,8	3,16	NA
11	Zdrowy ochotnik	19,3	6,0	3,22	NA
12	Zdrowy ochotnik	16,7	5,6	2,98	NA
13	Zdrowy ochotnik	12,5	4,0	3,13	NA
14	Zdrowy ochotnik	23,0	6,0	3,83	NA
15	Zdrowy ochotnik	8,0	2,8	2,86	NA

Otrzymane wyniki wskazują (Tabela 7), że stężenie HVA we wszystkich próbkach moczu pacjentów z neuroblastomą oraz u pacjenta z neuroektodermalnym nowotworem wieku dziecięcego, były wyższe niż stężenia określone dla próbek kontrolnych ($n = 7$) i mieściły się w zakresie 19-102 $\mu\text{g/mL}$ (średnia: 40,36 $\mu\text{g/mL}$), podczas gdy dla zdrowych ochotników stężenia HVA były się na poziomie 2-6 $\mu\text{g/mL}$ (średnia: 4,31 $\mu\text{g/mL}$). Dla jednej próbki moczu pacjenta z nowotworem podścieliskowym przewodu pokarmowego (GIST), poziom HVA był bliski poziomowi próbek kontrolnych i wynosił 2 $\mu\text{g/mL}$. Zarejestrowane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi, które wskazują, że w przypadku większości pacjentów z neuroblastomą, poziom HVA w moczu jest znacząco podwyższony [9,147]. Analiza statystyczna przeprowadzona za pomocą parametrycznego testu t-Studenta z oddzielną analizą wariancji potwierdziła, że uzyskane różnice stężeń między grupą kontrolną i badaną, są statystycznie istotne (poziom istotności $p < 0,05$) (Rycina 28). Wybór powyższego testu wynikał z faktu, iż dla porównywanych zmiennych potwierdzono rozkład normalny (test Shapiro-Wilka), ale nie wykazano jednorodności wariancji (wynik testu Lavene'a).



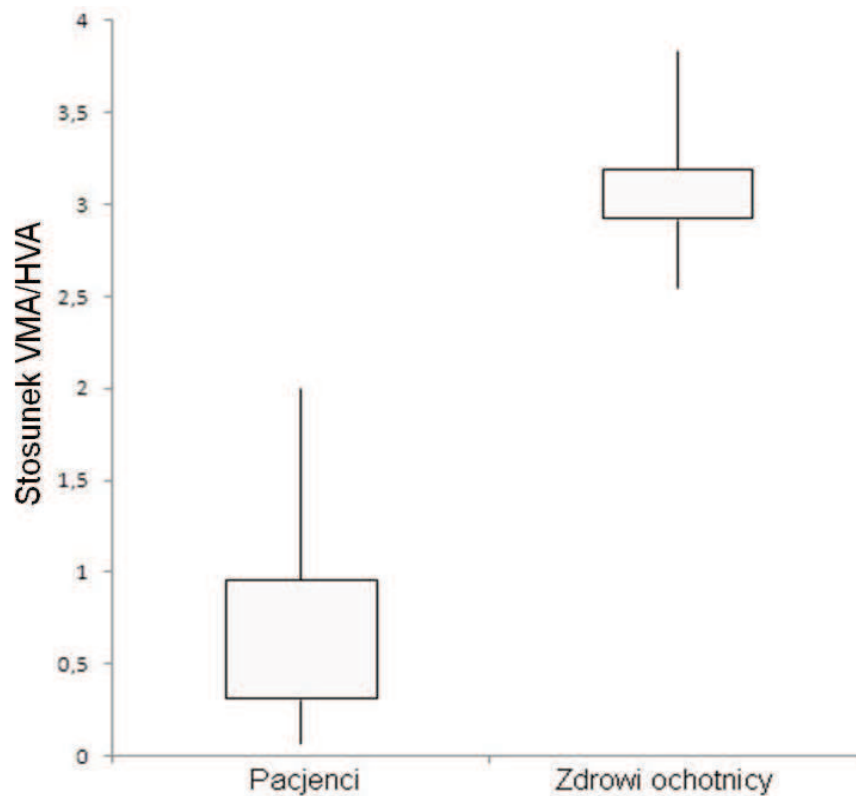
Rycina 28. Średnie stężenia HVA [$\mu\text{g/mL}$] u pacjentów z neuroblastomą ($n = 7$) i zdrowych uczestników ($n = 7$).

Rozważając poziomy VMA w moczu większości pacjentów z neuroblastomą, poziom tego metabolitu był porównywalny (7-23 $\mu\text{g/mL}$, średnia: 17,14 $\mu\text{g/mL}$) w stosunku do próbek kontrolnych (5-23 $\mu\text{g/mL}$, średnia: 14,94). Analiza statystyczna przeprowadzona za pomocą parametrycznego testu t-Studenta [potwierdzono rozkład normalny (test Shapiro-Wilka) oraz wykazano jednorodność wariancji (wynik testu Lavene'a)] wskazała na brak statystycznie istotnych różnic dla średnich stężeń VMA u pacjentów i osób zdrowych (poziom istotności $p < 0,05$) (Rycina 29). W przypadku pacjenta z nowotworem podścieliskowym przewodu pokarmowego (GIST) stężenie VMA w moczu wyniosło 6 $\mu\text{g/mL}$, co potwierdza fakt, że nowotwór ten nie posiada zdolności wydzielania VMA.



Rycina 29. Średnie stężenia VMA [$\mu\text{g/mL}$] u pacjentów z neuroblastomą ($n = 7$) i zdrowych uczestników ($n = 7$).

Z uwagi na szeroki zakres stężeń HVA oznaczanego w 24-godzinnej zbiorce moczu u pacjentów, określono także stosunek VMA do HVA, ponieważ parametr ten odgrywa istotną rolę w diagnozie NB oraz podczas określania spodziewanego czasu przeżycia i prognozy wyleczenia choroby nowotworowej [7]. Uzyskane dane wskazywały, że dla pacjentów stosunek stężeń (w $\mu\text{g/mL}$) VMA/HVA wynosił 0,07-2, podczas gdy dla zdrowych ochotników średni stosunek VMA/HVA wynosił 3,1 (Tabela 7). Powyższa różnica była statystycznie istotna, co zostało potwierdzone za pomocą testu parametrycznego t-Studenta (Rycina 30). Ten niski stosunek VMA/HVA, według danych literaturowych, może świadczyć o złych rokowaniach pacjentów objętych badaniem [9].



Rycina 30. Stosunek stężenia VMA ($[\mu\text{g}/\text{mL}]$) do HVA ($[\mu\text{g}/\text{mL}]$) u pacjentów ($n = 7$) i zdrowych uczestników ($n = 7$).

W moczu jednego z pacjentów z neuroblastomą zarejestrowano podwyższony poziom DOPAC (Tabela 7). Dotychczasowe doniesienia literaturowe obrazowały tylko ewentualnie podwyższony poziom tego metabolitu mierzony w surowicy pacjentów z neuroblastomą [148], jednak do tej pory nie badano stężenia DOPAC w moczu u pacjentów z tym nowotworem. Należałoby więc przeprowadzić dodatkowe analizy zmierzające do zweryfikowania, czy oznaczanie stężenia DOPAC w moczu może pretendować do roli dodatkowego biomarkera w nowotworach takich jak zwojak zarodkowy współczulny.

V. WNIOSKI

W części pierwszej pracy doktorskiej przedstawiono schemat zoptymalizowanej metody opartej na technice 1D-PAGE oraz LC-MS/MS służącej do analizy próbek roztworów z nad pierwotnych hodowli komórkowych pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanymi guzami neuroendokrynnymi (NET). Wykorzystując opracowaną metodologię, dokonano jakościowej, proteomicznej oceny badanych białek pochodzących z próbek stanowiących skomplikowane mieszaniny. Optymalizacji poddano wszystkie etapy eksperymentu proteomicznego – od ekstrakcji i zagęszczania białek, poprzez użycie odpowiedniego stężenia poliakrylamidu w żelu i odczynnika do wybarwienia, aż do zastosowania sprawnych narzędzi bioinformatycznych podczas przetwarzania danych otrzymanych z analizy LC-MS/MS, tak aby otrzymać ostatecznie informacje o proteomie analizowanego materiału. Przeprowadzone badania dowiodły, że analiza proteomu roztworu z nad hodowli komórkowych guzów NET przy użyciu metody opartej na 1D-PAGE oraz LC-MS/MS jest przydatna do identyfikacji potencjalnych, nowych biomarkerów tych guzów. Wyniki badań doprowadziły do wytypowania białek, których rola w patogenezie guzów NET może być przedmiotem dalszych, pogłębionych analiz. Dowiedziono również, że różnicowanie guzów NET pod kątem wydzielania białkowych substancji aktywnych poza komórki guza od tych, które tej zdolności nie posiadają, jest możliwe dzięki zastosowaniu porównawczej analizy proteomicznej. Dodatkowe informacje proteomiczne uzyskano dla neuroendokrynnego guza czynnego trzustki, z tego względu zaproponowano rozszerzenie badań nad szlakami sygnalizacyjnymi zaburzonymi podczas kancerogenezy w trzustce.

W drugiej części pracy doktorskiej skoncentrowano się na uszczegółowieniu badań białkowych. I tak, z uwagi na istotne znaczenie fosforylacji w procesach patofizjologicznych, w tym w rozwoju nowotworu trzustki, przeprowadzono badania nad różnicami w obrębie fosfoproteomów w próbkach pochodzących ze zdrowych i objętych ostrym zapaleniem tkanek mysiej trzustki. Wykazano, że możliwa jest detekcja niewłaściwie wydzielanych fosfobiałek, w tym także w obrębie białek zależnych od kinazy Mnk1, która jest uważana za istotny czynnik biorący udział w szlakach sygnalizacyjnych w obrębie trzustki. Rozpatrując białka zależne od Mnk1, wyróżniono motywy fosfopeptydowe wrażliwe na działanie specyficznych kinaz. Niektóre fosfobiałka występowały w większych stężeniach w próbkach pochodzących z tkanek mysiej trzustki traktowanej ceruleiną. Z drugiej strony, niektóre z białek po potraktowaniu ceruleiną w mniejszym stopniu ulegały fosforylacji. Szczegółowa analiza fosfoproteomiczna była możliwa dzięki zoptymalizowaniu wszystkich etapów eksperymentu: od ekstrakcji białek z tkanek mysiej trzustki, poprzez ich znakowanie stabilnymi izotopami celem przeprowadzenia względnej analizy ilościowej, aż po

wzbogacanie frakcji fosfopeptydowej i analizę tak przygotowanych próbek z użyciem technik sprzężonych LC-MS/MS. Badania przeprowadzone w celu optymalizacji zaawansowanych metod bioanalitycznych, którymi posługuje się fosfoproteomika, przyczyniły się do wykorzystania wypracowanych, optymalnych schematów eksperymentalnych do przeprowadzenia porównawczej analizy ilościowej fosfoproteomów również innych, nie będących tematem pracy doktorskiej, materiałów biologicznych (wycinki tkanek pobrane od pacjentów cierpiących na potrójnie negatywne nowotwory piersi, hodowle komórkowe guzów). Ponadto, stosowanie do znakowania izotopowego zoptymalizowanej metody reduktywnej aminacji zostało na stałe wprowadzone podczas badań różnicujących zdrowe fosfoproteomy od tych patologicznie zmienionych w laboratorium proteomicznym Hiszpańskiego Narodowego Centrum Badań nad Rakiem (CNIO).

Z uwagi na fakt, że nowotwory objęte badaniem w prezentowanej pracy doktorskiej są zdolne nie tylko do wydzielania cząsteczek o strukturze białkowej, ale również związków o innej budowie (w tym amin biogennych), w trzeciej części zoptymalizowano metodę opartą na technice micelarnej elektrokinetycznej chromatografii (MEKC) z detekcją spektrofotometryczną UV/VIS celem jednoczesnego rozdzielania amin biogennych i ich prekursorów (dopaminy, adrenaliny, noradrenaliny, L-tryptofanu, L-tyrozyny, lewodopy, serotoniny) wraz z ich trzema ważnymi metabolitami (kwasem wanilinomigdałowym, kwasem homowanilinowym, kwasem 3,4-dihydroksyfenylooctowym). Optymalizacja rozdzielania analitów była możliwa po wyborze odpowiedniego buforu separacyjnego, który ostatecznie składał się z 10 mM boraksu, 30 mM SDS, 15% MeOH i 25 mM α -cyklodekstryny, o pH 9,36. Metoda MEKC pozwoliła na rozdzielanie dziesięciu ważnych biologicznie związków, które posiadają różne właściwości fizykochemiczne i różne wartości pK_a . Znaczącą poprawę rozdzielania (szczególnie w przypadku serotoniny) oraz poprawę granicy wykrywalności dla niektórych z amin biogennych (adrenaliny i noradrenaliny), uzyskano poprzez dodatek do buforu separacyjnego α -cyklodekstryny. Zaproponowana, oryginalna metoda MEKC została w pierwszej kolejności zastosowana do oznaczeń trzech metabolitów amin biogennych (HVA, VMA, DOPAC) w próbkach moczu pozyskanych od pacjentów ze zdiagnozowaną neuroblastomą lub neuroektodermalnym nowotworem wieku dziecięcego, które są zdolne do wydzielania nadmiernych ilości amin biogennych na zewnątrz komórek guza. Wyniki uzyskane dla grupy badanej oraz kontrolnej (zdrowi ochotnicy oraz pacjenci z nowotworami niewydzielającymi nadmiernych ilości katecholamin) potwierdziły, że wypracowana metoda umożliwia oznaczenie stężeń kwasu wanilinomigdałowego, kwasu homowanilinowego, kwasu 3,4-dihydroksyfenylooctowego w próbkach moczu. Metoda jest

odpowiednio czuła i cechuje się dobrą rozdzielczością dla metabolitów o charakterze kwaśnym. Biorąc pod uwagę, że szybka analiza ilościowa HVA oraz VMA jest istotna w diagnostyce neuroblastomy, optymalizowana metoda MEKC może stanowić pomocne narzędzie w praktyce klinicznej.

Wyniki zebrane w pracy doktorskiej pozwoliły na ocenę potencjalnych, nowych biomarkerów wybranych nowotworów pochodzenia neuroendokrynnego, z użyciem zaawansowanych technik bioanalitycznych i potwierdziły, że pojedyncze cząsteczki, typowane jako biomarkery, często cechują się niewystarczającą specyficnością i czułością. Badania wykonane podczas przygotowywania rozprawy doktorskiej pozwoliły na opracowanie i zoptymalizowanie metod bioanalitycznych, które zapewniły szybką i precyzyjną analizę związków mało- i wielkocząsteczkowych z materiałów biologicznych (hodowle komórkowe, ekstrakty tkankowe, mocz). Dodatkowo, możliwa była optymalizacja metod opartych na technikach takich jak: jednokierunkowa elektroforeza żelowa, chromatografia cieczowa, spektrometria mas i micelarna elektrokinetyczna chromatografia, podczas badania różnic w wydzielaniu białek, fosfobiałek lub związków małowcząsteczkowych (amin biogennych) w stanie fizjologicznym i patofizjologicznym.

VI. LITERATURA

1. J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, F. Bray: Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* 136 (2015) 359-386.
2. B. Kos-Kudła (2010): Guzy neuroendokrynne układu pokarmowego. Gdańsk, *Via Medica*, wydanie I.
3. V. Rosiek, B. Kos-Kudła: Terapie celowane w nowotworach neuroendokrynych. *OnCOReview* 2 (2012) 163-170.
4. J.C. Yao, M. Hassan, A. Phan, C. Dagohoy, C. Leary, J.E. Mares, E.K. Abdalla, J.B. Fleming, J.N. Vauthey, A. Rashid, D.B. Evans: One hundred years after "carcinoid": epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *J. Clin. Oncol.* 26 (2008) 3063-3072.
5. D.S. Klimstra, I.R. Modlin, D. Coppola, R.V. Lloyd, S. Suster: The pathologic classification of neuroendocrine tumors: a review of nomenclature, grading, and staging systems. *Pancreas* 39 (2010) 707-712.
6. F.R. Nobels, D.J. Kwekkeboom, W. Coopmans, C.H. Schoenmakers, J. Lindemans, W.W. De Herder, E.P. Krenning, R. Bouillon, S.W. Lamberts: Chromogranin A as serum marker for neuroendocrine neoplasia: comparison with neuron-specific enolase and the alpha-subunit of glycoprotein hormones. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (1997) 2622-2628.
7. B.H. Kushner: Neuroblastoma: a disease requiring a multitude of imaging studies. *J. Nucl. Med.* 45 (2004) 1172-1188.
8. R. Howman-Giles, P.J. Shaw, R.F. Uren, D.K. Chung: Neuroblastoma and other neuroendocrine tumors. *Semin. Nucl. Med.* 37 (2007) 286-302.
9. V. Strenger, R. Kerbl, H.J. Dornbusch, R. Ladenstein, P.F. Ambros, I.M. Ambros, C. Urban: Diagnostic and prognostic impact of urinary catecholamines in neuroblastoma patients. *Pediatr. Blood Cancer* 48 (2007) 504-509.
10. W. Whiteley, Y. Tian, G.C. Jickling: Blood biomarkers in stroke: research and clinical practice. *Int. J. Stroke* 7 (2012) 435-439.
11. R. Mayeux: Biomarkers: potential uses and limitations. *NeuroRx* 1 (2004) 182-188.
12. Q. Zhu, Y. Chai, Y. Zhuo, R. Yuan: Ultrasensitive simultaneous detection of four biomarkers based on hybridization chain reaction and biotin-streptavidin signal amplification strategy. *Biosens. Bioelectron.* 68C (2014) 42-48.
13. N.I. Parikh, R.S. Vasan: Assessing the clinical utility of biomarkers in medicine. *Biomark. Med.* 1 (2007) 419-436.
14. J.S. Ross, J.A. Fletcher: The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *Oncologist* 3 (1998) 237-252.
15. E.F. Petricoin, A.M. Ardekani, B.A. Hitt, P.J. Levine, V.A. Fusaro, S.M. Steinberg, G.B. Mills, C. Simone, D.A. Fishman, E.C. Kohn, L.A. Liotta: Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 359 (2002) 572-577.
16. G.J. Mizejewski: Biological role of alpha-fetoprotein in cancer: prospects for anticancer therapy. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2 (2002) 709-735.
17. H.J. Luboldt, A. Swoboda, C. Börgermann, P. Fornara, H. Rübber: Clinical usefulness of free PSA in early detection of prostate cancer. *Onkologie* 24 (2001) 33-37.
18. J. Jokinen, A.L. Nordström, P. Nordström: The relationship between CSF HVA/5-HIAA ratio and suicide intent in suicide attempters. *Arch. Suicide Res.* 11 (2007) 187-192.
19. W. Arlt, M. Biehl, A.E. Taylor, S. Hahner, R. Libé, B.A. Hughes, P. Schneider, D.J. Smith, H. Stiekema, N. Krone, E. Porfiri, G. Opocher, J. Bertherat, F. Mantero, B. Allolio, M. Terzolo, P. Nightingale, C.H. Shackleton, X. Bertagna, M. Fassnacht, P.M. Stewart: Urine steroid metabolomics as a biomarker tool for detecting malignancy in adrenal tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96 (2011) 3775-3784.

20. P. Matt, Z. Fu, Q. Fu, J.E. Van Eyk: Biomarker discovery: proteome fractionation and separation in biological samples. *Physiol. Genomics* 33 (2008) 12-17.
21. M. Tian, H. Cheng, Z. Wang, N. Su, Z. Liu, C. Sun, B. Zhen, X. Hong, Y. Xue, P. Xu: Phosphoproteomic Analysis of the Highly-Metastatic Hepatocellular Carcinoma Cell Line, MHCC97-H. *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 4209-4225.
22. T. Bączek, R. Kaliszan: Predictions of peptides' retention times in reversed-phase liquid chromatography as a new supportive tool to improve protein identification in proteomics. *Proteomics* 9 (2009) 835-847.
23. K. Chandramouli, P.Y. Qian: Proteomics: challenges, techniques and possibilities to overcome biological sample complexity. *Hum. Genomics Proteomics* 1 (2009).
24. N. Miękus, T. Bączek: Fosfoproteomika: perspektywa bardziej precyzyjnych badań biomedycznych. *Farm. Pol.* 69 (2013) 716-723.
25. E. López, W.C. Cho: Phosphoproteomics and lung cancer research. *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 12287-12314.
26. H. Johnson, C.E. Eyers: Analysis of post-translational modifications by LC-MS/MS. *Methods Mol. Biol.* 658 (2010) 93-108.
27. P.J. Boersema, S. Mohammed, A.J. Heck: Phosphopeptide fragmentation and analysis by mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 44 (2009) 861-878.
28. N. Miękus, T. Bączek: Phosphoproteomics as a promising tool for broadening the analysis of clinical samples and for the fight against cancer disease. *Curr. Pharm. Anal.* 10 (2014) 223-229.
29. T.E. Thingholm, O.N. Jensen, M.R. Larsen: Analytical strategies for phosphoproteomics. *Proteomics* 9 (2009) 1451-1468.
30. M. Courcelles, C. Frémin, L. Voisin, S. Lemieux, S. Meloche, P. Thibault: Phosphoproteome dynamics reveal novel ERK1/2 MAP kinase substrates with broad spectrum of functions. *Mol. Syst. Biol.* 9 (2013) 669.
31. P.M. McGowan, M. Mullooly, F. Caiazza, S. Sukor, S.F. Madden, A.A. Maguire, A. Pierce, E.W. McDermott, J. Crown, N. O'Donovan, M.J. Duffy: ADAM-17: a novel therapeutic target for triple negative breast cancer. *Ann. Oncol.* 24 (2013) 362-369.
32. M. Oyama, T. Nagashima, T. Suzuki, H. Kozuka-Hata, N. Yumoto, Y. Shiraishi, K. Ikeda, Y. Kuroki, N. Gotoh, T. Ishida, S. Inoue, H. Kitano, M. Okada-Hatakeyama: Integrated quantitative analysis of the phosphoproteome and transcriptome in tamoxifen-resistant breast cancer. *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 818-829.
33. C. Tomasetti, G.D. Demetri, G. Parmigiani: Why tyrosine kinase inhibitor resistance is common in advanced gastrointestinal stromal tumors. *F1000Res.* 2 (2013) 1-7.
34. L.K. Iwai, L.S. Payne, M.T. Luczynski, F. Chang, H. Xu, R.W. Clinton, A. Paul, E.A. Esposito, S. Gridley, B. Leitinger, K.M., P.H. Huang: Phosphoproteomics of collagen receptor networks reveals SHP-2 phosphorylation downstream of wild-type DDR2 and its lung cancer mutants. *Biochem. J.* 454 (2013) 501-513.
35. J. Du, P. Bernasconi, K.R. Clauser, D.R. Mani, S.P. Finn, R. Beroukhim, M. Burns, B. Julian, X.P. Peng, H. Hieronymus, R.L. Maglathlin T.A. Lewis, L.M. Liao, P. Nghiemphu, I.K. Mellingerhoff, D.N. Louis, M. Loda, S.A. Carr, A.L. Kung, T.R. Golub: Bead-based profiling of tyrosine kinase phosphorylation identifies SRC as a potential target for glioblastoma therapy. *Nat. Biotechnol.* 27 (2009) 77-83.
36. C.L. Corless, C.M. Barnett, M.C. Heinrich: Gastrointestinal stromal tumours: origin and molecular oncology. *Nat. Rev. Cancer* 11 (2011) 865-878.
37. E.D. Lagadinou, A. Sach, K. Callahan, R.M. Rossi, S.J. Neering, M. Minhajuddin, J.M. Ashton, S. Pei, V. Grose, K.M. O'Dwyer, J.L. Liesveld, P.S. Brookes, M.W. Becker, C.T. Jordan: BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells. *Cell Stem Cell* 12 (2013) 329-341.

38. Y. Yarden: The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur. J. Cancer* 37 (2001) 3-8.
39. F. Piazza, S. Manni, M. Ruzzene, L.A. Pinna, C. Gurrieri, G. Semenzato: Protein kinase CK2 in hematologic malignancies: reliance on a pivotal cell survival regulator by oncogenic signaling pathways. *Leukemia* 26 (2012) 1174-1179.
40. P. Casado, M.P. Alcolea, F. Iorio, J.C. Rodríguez-Prados, B. Vanhaesebroeck, J. Saez-Rodriguez, S. Joel, P.R. Cutillas: Phosphoproteomics data classify hematological cancer cell lines according to tumor type and sensitivity to kinase inhibitors. *Genome Biol.* 14 (2013) 1-18.
41. M.A. Medina, J.L. Urdiales, C. Rodríguez-Caso, F.J. Ramírez, F. Sánchez-Jiménez: Biogenic amines and polyamines: similar biochemistry for different physiological missions and biomedical applications. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 38 (2003) 23-59.
42. S. Kapur, G. Remington: Serotonin-dopamine interaction and its relevance to schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 153 (1996) 466-476.
43. E. Bajetta, L. Ferrari, A. Martinetti, L. Celio, G. Procopio, S. Artale, N. Zilembo, M. Di Bartolomeo, E. Seregini, E. Bombardieri: Chromogranin A, neuron specific enolase, carcinoembryonic antigen, and hydroxyindole acetic acid evaluation in patients with neuroendocrine tumors. *Cancer* 86 (1999) 858-865.
44. K. Pacak, G. Eisenhofer, H. Ahlman, S.R. Bornstein, A.P. Gimenez-Roqueplo, A.B. Grossman, N. Kimura, M. Mannelli, A.M. McNicol, A.S. Tischler: Pheochromocytoma: recommendations for clinical practice from the First International Symposium. October 2005. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 3 (2007) 92-102.
45. D.H. Thomas, J.D. Taylor, O.S. Barnaby, D.S. Hage: Determination of free catecholamines in urine by tandem affinity/ion-pair chromatography and flow injection analysis. *Clin. Chim. Acta* 398 (2008) 63-69.
46. X. Liu, C. Shao, L. Wei, J. Duan, S. Wu, X. Li, M. Li, W. Sun: An individual urinary proteome analysis in normal human beings to define the minimal sample number to represent the normal urinary proteome. *Proteome Sci.* 10 (2012) 70.
47. N.L. Anderson, N.G. Anderson: The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol. Cell. Proteomics* 1 (2002) 845-867.
48. K. Eichelbaum, M. Winter, M. Berriel Diaz, S. Herzig, J. Krijgsveld: Selective enrichment of newly synthesized proteins for quantitative secretome analysis. *Nat. Biotechnol.* 30 (2012) 984-990.
49. J.N. Adkins, S.M. Varnum, K.J. Auberry, R.J. Moore, N.H. Angell, R.D. Smith, D.L. Springer, J.G. Pounds: Toward a human blood serum proteome: analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* 1 (2002) 947-955.
50. Y. Guo, Z. Fu and J.E. Van Eyk: A proteomic primer for the clinician. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 4 (2007) 9-17.
51. N.Y. Ashri, M. Abdel-Rehim: Sample treatment based on extraction techniques in biological matrices. *Bioanalysis* 3 (2011) 2003-2018.
52. C.W. Huck, G.K. Bonn: Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 51-72.
53. M.C. Hennion: Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 3-54.
54. L. Junting, C. Peng, O. Suzuki: Solid-phase microextraction (SPME) of drugs and poisons from biological samples. *Forensic Sci. Int.* 97 (1998) 93-100.
55. F. Degel: Comparison of new solid-phase extraction methods for chromatographic identification of drugs in clinical toxicological analysis. *Clin. Biochem.* 29 (1996) 529-40.

56. S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen: Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 71 (1999) 2650-2656.
57. M. Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji: Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2342-2357.
58. S. Englard, S. Seifter: Precipitation techniques. *Methods Enzymol.* 182 (1990) 285-300.
59. M. Zellner, W. Winkler, H. Hayden, M. Diestinger, M. Eliassen, B. Gesslbauer, I. Miller, M. Chang, A. Kungl, E. Roth, R. Oehler: Quantitative validation of different protein precipitation methods in proteome analysis of blood platelets. *Electrophoresis* 26 (2005) 2481-2489.
60. E. Baltussen, C.A. Cramers, P.J. Sandra: Sorptive sample preparation -- a review. *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 3-22.
61. L. Beltran, P.R. Cutillas: Advances in phosphopeptide enrichment techniques for phosphoproteomics. *Amino Acids* 43 (2012) 1009-1024.
62. J. Fila, D. Honys: Enrichment techniques employed in phosphoproteomics. *Amino Acids* 43 (2012) 1025-1047.
63. J. Ye, X. Zhang, C. Young, X. Zhao, Q. Hao, L. Cheng, O.N. Jensen: Optimized IMAC-IMAC protocol for phosphopeptide recovery from complex biological samples. *J. Proteome Res.* 9 (2010) 3561-3573.
64. G. Palmisano, B.L. Parker, K. Engholm-Keller, S.E. Lendal, K. Kulej, M. Schulz, V. Schwämmle, M.E. Graham, H. Saxtorph, S.J. Cordwell, M.R. Larsen: A novel method for the simultaneous enrichment, identification, and quantification of phosphopeptides and sialylated glycopeptides applied to a temporal profile of mouse brain development. *Mol. Cell. Proteomics* 11 (2012) 1191-1202.
65. T.E. Thingholm, O.N. Jensen, P.J. Robinson, M.R. Larsen: SIMAC (sequential elution from IMAC), a phosphoproteomics strategy for the rapid separation of monophosphorylated from multiply phosphorylated peptides. *Mol. Cell. Proteomics* 7 (2008) 661-671.
66. J. Villén, S.P. Gygi: The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. *Nat. Protoc.* 3 (2008) 1630-1638.
67. S.S. Jensen, M.R. Larsen: Evaluation of the impact of some experimental procedures on different phosphopeptide enrichment techniques. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 3635-3645.
68. H. Zhou, M. Ye, J. Dong, E. Corradini, A. Cristobal, A.J. Heck, H. Zou, S. Mohammed: Robust phosphoproteome enrichment using monodisperse microsphere-based immobilized titanium (IV) ion affinity chromatography. *Nat. Protoc.* 8 (2013) 461-80.
69. K. Malterud: Qualitative research: standards, challenges, and guidelines. *Lancet* 358 (2001) 483-488.
70. S.E. Ong, B. Blagoev, I. Kratchmarova, D.B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey, M. Mann: Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 1 (2002) 376-386.
71. E. Ernault, E. Gamelin, C. Guette: Improved proteome coverage by using iTRAQ labelling and peptide OFFGEL fractionation. *Proteome Sci.* 6 (2008) 27.
72. S. Wiese, K.A. Reidegeld, H.E. Meyer, B. Warscheid: Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics* 7 (2007) 340-350.
73. C.J. Wu, Y.W. Chen, J.H. Tai, S.H. Chen: Quantitative phosphoproteomics studies using stable isotope dimethyl labeling coupled with IMAC-HILIC-nanoLC-MS/MS for estrogen-induced transcriptional regulation. *J. Proteome Res.* 10 (2011) 1088-1097.
74. D. Kovanich, S. Cappadona, R. Rajmakers, S. Mohammed, A. Scholten, A.J. Heck: Applications of stable isotope dimethyl labeling in quantitative proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 991-1009.

75. J. Shin, H.J. Kim, G. Kim, M. Song, S.J. Woo, S.T. Lee, H. Kim, C. Lee: Discovery of melanotransferrin as a serological marker of colorectal cancer by secretome analysis and quantitative proteomics. *J. Proteome Res.* 13 (2014) 4919-4931.
76. L.R. Zieske: A perspective on the use of iTRAQ reagent technology for protein complex and profiling studies. *J. Exp. Bot.* 57 (2006) 1501-1508.
77. P.J. Boersema, R. Raijmakers, S. Lemeer, S. Mohammed, A.J. Heck: Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Nat. Protoc.* 4 (2009) 484-494.
78. K.A. Neilson, N.A. Ali, S. Muralidharan, M. Mirzaei, M. Mariani, G. Assadourian, A. Lee, S.C. van Sluyter, P.A. Haynes: Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics* 11 (2011) 535-553.
79. T. Rabilloud: The whereabouts of 2D gels in quantitative proteomics. *Methods Mol. Biol.* 893 (2012) 25-35.
80. D.H. Lundgren, S.I. Hwang, L. Wu, D.K. Han: Role of spectral counting in quantitative proteomics. *Expert Rev. Proteomics* 7 (2010) 39-53.
81. K. Kuo, R. Still, S. Cale, I. McDowell: Standardization (external and internal) of HPLC assay for plasma homocysteine. *Clin. Chem.* 43 (1997) 1653-1655.
82. J. Bergquist, A. Sciubisz, A. Kaczor, J. Silberring: Catecholamines and methods for their identification and quantitation in biological tissues and fluids. *J. Neurosci. Methods* 113 (2002) 1-13.
83. H. Wang, S. Hanash: Multi-dimensional liquid phase based separations in proteomics. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 787 (2003) 11-18.
84. N. Miękus, I. Ołędzka, A. Plenis, Z. Woźniak, A. Lewczuk, P. Koszałka, B. Seroczyńska, T. Bączek, Gel electrophoretic separation of proteins from cultured neuroendocrine tumor cell lines. *Mol. Med. Rep.* 11 (2015) 1407-1415.
85. K. Weber, M. Osborn: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 4406-4412.
86. C. May, F. Brosseron, K. Pfeiffer, H.E. Meyer, K. Marcus: Proteome analysis with classical 2D-PAGE. *Methods Mol. Biol.* 893 (2012) 37-46.
87. A. Tessitore, A. Gaggiano, G. Ciccirelli, D. Verzella, D. Capece, M. Fischietti, F. Zazzeroni, E. Alesse: Serum biomarkers identification by mass spectrometry in high-mortality tumors. *Int. J. Proteomics* (2013).
88. W. Cui, H.W. Rohrs, M.L. Gross: Top-down mass spectrometry: recent developments, applications and perspectives. *Analyst* 136 (2011) 3854-3864.
89. K.A. Resing, N.G. Ahn: Proteomics strategies for protein identification. *FEBS Lett.* 579 (2005) 885-889.
90. N.L. Kelleher: Top-down proteomics. *Anal. Chem.* 76 (2004) 197-203.
91. K. Helsens, L. Martens, J. Vandekerckhove, K. Gevaert: MascotDatfile: an open-source library to fully parse and analyse MASCOT MS/MS search results. *Proteomics* 7 (2007) 364-366.
92. A.K. Yadav, D. Kumar, D. Dash: Learning from decoys to improve the sensitivity and specificity of proteomics database search results. *Plos One* 7 (2012).
93. B.M. Balgley, T. Laudeman, L. Yang, T. Song, C.S. Lee: Comparative evaluation of tandem MS search algorithms using a target-decoy search strategy. *Mol. Cell. Proteomics* 6 (2007) 1599-1608.
94. A.M. Falick, W.M. Hines, K.F. Medzihradzky, M.A. Baldwin, B.W. Gibson: Low-mass ions produced from peptides by high-energy collision-induced dissociation in tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 4 (1993) 882-893.
95. J.E. Syka, J.J. Coon, M.J. Schroeder, J. Shabanowitz, D.F. Hunt: Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101 (2004) 9528-9533.

96. N. Miękus, A. Plenis, P. Kowalski, I. Olędzka, K. Orlikowska, T. Bączek: The evaluation of serotonin and 5-hydroxyindole-3-acetic acid levels in serum and urine samples from patients with neuroendocrine tumors. *J. Mol. Biomark. Diagn.*, 5 (2014) 120.
97. H. Sirén, U. Karjalainen: Study of catecholamines in patient urine samples by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 853 (1999) 527-533.
98. R. Bakry, C.W. Huck, M. Najam-ul-Haq, M. Rainer, G.K. Bonn: Recent advances in capillary electrophoresis for biomarker discovery. *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 192-201.
99. G. Palmisano, S.E. Lendal, K. Engholm-Keller, R. Leth-Larsen, B.L. Parker, M.R. Larsen: Selective enrichment of sialic acid-containing glycopeptides using titanium dioxide chromatography with analysis by HILIC and mass spectrometry. *Nat. Protoc.* 5 (2010) 1974-1982.
100. D. Nguyen, T. Xu: The expanding role of mouse genetics for understanding human biology and disease. *Dis. Model Mech.* 1 (2008) 56-66.
101. R.H. Waterston, K. Lindblad-Toh, E. Birney, J. Rogers, J.F. Abril, P. Agarwal, R. Agarwala, R. Ainscough, M. Alexandersson, P. An, S.E. Antonarakis, J. Attwood, R. Baertsch, J. Bailey, K. Barlow, S. Beck, E. Berry, B. Birren, T. Bloom, P. Bork, M. Botcherby, N. Bray, M.R. Brent, D.G. Brown, S.D. Brown, C. Bult, J. Burton, J. Butler, R.D. Campbell, P. Carninci, S. Cawley, F. Chiaromonte, A.T. Chinwalla, D.M. Church, M. Clamp, C. Clee, F.S. Collins, L.L. Cook, R.R. Copley, A. Coulson, O. Couronne, J. Cuff, V. Curwen, T. Cutts, M. Daly, R. David, J. Davies, K.D. Delehaunty, J. Deri, E.T. Dermitzakis, C. Dewey, N.J. Dickens, M. Diekhans, S. Dodge, I. Dubchak, D.M. Dunn, S.R. Eddy, L. Elnitski, R.D. Emes, P. Eswara, E. Eyraas, A. Felsenfeld, G.A. Fewell, P. Fliccek, K. Foley, Frankel WN, Fulton LA, Fulton RS, Furey TS, Gage D, Gibbs RA, Glusman G, Gnerre S, Goldman N, Goodstadt L, Grafham D, Graves TA, Green ED, Gregory S, Guigó R, Guyer M, R.C. Hardison, D. Haussler, Y. Hayashizaki, L.W. Hillier, A. Hinrichs, W. Hlavina, T. Holzer, F. Hsu, A. Hua, T. Hubbard, A. Hunt, I. Jackson, D.B. Jaffe, L.S. Johnson, M. Jones, T.A. Jones, A. Joy, M. Kamal, E.K. Karlsson, D. Karolchik, A. Kasprzyk, J. Kawai, E. Keibler, C. Kells, W.J. Kent, A. Kirby, D.L. Kolbe, I. Korf, R.S. Kucherlapati, E.J. Kulbokas, D. Kulp, T. Landers, J.P. Leger, S. Leonard, I. Letunic, R. Levine, J. Li, M. Li, C. Lloyd, S. Lucas, B. Ma, D.R. Maglott, E.R. Mardis, L. Matthews, E. Mauceli, J.H. Mayer, M. McCarthy, W.R. McCombie, S. McLaren, K. McLay, J.D. McPherson, J. Meldrim, B. Meredith, J.P. Mesirov, W. Miller, T.L. Miner, E. Mongin, K.T. Montgomery, M. Morgan, R. Mott, J.C. Mullikin, D.M. Muzny, W.E. Nash, J.O. Nelson, M.N. Nhan, R. Nicol, Z. Ning, C. Nusbaum, M.J. O'Connor, Y. Okazaki, K. Oliver, E. Overton-Larty, L. Pachter, G. Parra, K.H. Pepin, J. Peterson, P. Pevzner, R. Plumb, C.S. Pohl, A. Poliakov, T.C. Ponce, C.P. Ponting, S. Potter, M. Quail, A. Reymond, B.A. Roe, K.M. Roskin, E.M. Rubin, A.G. Rust, R. Santos, V. Sapojnikov, B. Schultz, J. Schultz, M.S. Schwartz, S. Schwartz, C. Scott, S. Seaman, S. Searle, T. Sharpe, A. Sheridan, R. Shownkeen, S. Sims, J.B. Singer, G. Slater, A. Smit, D.R. Smith, B. Spencer, A. Stabenau, N. Stange-Thomann, C. Sugnet, M. Suyama, G. Tesler, J. Thompson, D. Torrents, E. Trevaskis, J. Tromp, C. Ucla, A. Ureta-Vidal, J.P. Vinson, A.C. Von Niederhausern, C.M. Wade, M. Wall, R.J. Weber, R.B. Weiss, M.C. Wendl, A.P. West, K. Wetterstrand, R. Wheeler, S. Whelan, J. Wierzbowski, D. Willey, S. Williams, R.K. Wilson, E. Winter, K.C. Worley, D. Wyman, S. Yang, S.P. Yang, E.M. Zdobnov, M.C. Zody, E.S. Lander: Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420 (2002) 520-562.
102. P. Ceranowicz, J. Cieszkowski, Z. Warzecha, A. Dembiński: Experimental models of acute pancreatitis. *Postępy Hig. Med. Dosw.* 69 (2015) 264-269.
103. K.H. Su, C. Cuthbertson, C. Christophi: Review of experimental animal models of acute pancreatitis. *HPB(Oxford)* 8 (2006) 264-286.

104. P.V. Sundaram, R. Venkatesh: Retardation of thermal and urea induced inactivation of alpha-chymotrypsin by modification with carbohydrate polymers. *Protein Eng.* 11 (1998) 699-705.
105. J. Dutkowski, M. Kramer, M.A. Surma, R. Balakrishnan, J.M. Cherry, N.J. Krogan, T. Ideker: A gene ontology inferred from molecular networks. *Nat. Biotechnol.* 31 (2013) 38-45.
106. E. López, S.R. Muñoz, J.L. Pascual, L. Madero: Relevant phosphoproteomic and mass spectrometry: approaches useful in clinical research. *Clin. Transl. Med.* 1 (2012) 1-9.
107. G.S. Omenn: THE HUPO Human Plasma Proteome Project. *Proteomics Clin. Appl.* 1 (2007) 769-779.
108. G.S. Omenn: The strategy, organization, and progress of the HUPO Human Proteome Project. *J. Proteomics* 100 (2014) 3-7.
109. G.S. Omenn, D.J. States, M. Adamski, T.W. Blackwell, R. Menon, H. Hermjakob, R. Apweiler, B.B. Haab, R.J. Simpson, J.S. Eddes, E.A. Kapp, R.L. Moritz, D.W. Chan, A.J. Rai, A. Admon, R. Aebersold, J. Eng, W.S. Hancock, S.A. Hefta, H. Meyer, Y.K. Paik, J.S. Yoo, P. Ping, J. Pounds, J. Adkins, X. Qian, R. Wang, V. Wasinger, C.Y. Wu, X. Zhao, R. Zeng, A. Archakov, A. Tsugita, I. Beer, A. Pandey, M. Pisano, P. Andrews, H. Tammen, D.W. Speicher, S.M. Hanash: Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. *Proteomics* 5 (2005) 3226-3245.
110. N.L. Anderson, M. Polanski, R. Pieper, T. Gatlin, R.S. Tirumalai, T.P. Conrads, T.D. Veenstra, J.N. Adkins, J.G. Pounds, R. Fagan, A. Lobley: The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources. *Mol. Cell. Proteomics* 3 (2004) 311-326.
111. X. Li, J. Kuang, Y. Shen, M.M. Majer, C.C. Nelson, K. Parsawar, K.A. Heichman, S.K. Kuwada: The atypical histone macroH2A1.2 interacts with HER-2 protein in cancer cells. *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 23171-23183.
112. B. Farrow, B.M. Evers: Inflammation and the development of pancreatic cancer. *Surg. Oncol.* 10 (2002) 153-169.
113. B. Farrow, Y. Sugiyama, A. Chen, E. Uffort, W. Nealon, B. Mark Evers: Inflammatory mechanisms contributing to pancreatic cancer development. *Ann. Surg.* 239 (2004) 763-771.
114. A.J. Waskiewicz, A. Flynn, C.G. Proud, J.A. Cooper: Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J.* 16 (1997) 1909-1920.
115. S. Fan, S.S. Ramalingam, J. Kauh, Z. Xu, F.R. Khuri, S.Y. Sun: Phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 4 (eIF4E) is elevated in human cancer tissues. *Cancer Biol. Ther.* 8 (2009) 1463-1469.
116. M.J. Wheeler, P.W. Johnson, J.P. Blaydes: The role of MNK proteins and eIF4E phosphorylation in breast cancer cell proliferation and survival. *Cancer Biol. Ther.* 10 (2010) 728-735.
117. J. Cendrowski, V.J. Sánchez-Arévalo Lobo, M. Sendler, A. Salas, J.P. Kühn, X. Molero, R. Fukunaga, J. Mayerle, M.M. Lerch, F.X. Real: Mnk1 is a novel acinar cell-specific kinase required for exocrine pancreatic secretion and response to pancreatitis in mice. *Gut* 64 (2015) 937-947.
118. J. Magaña-Gómez, G. López-Cervantes, A.M. Calderón de la Barca: Caerulein-induced pancreatitis in rats: histological and genetic expression changes from acute phase to recuperation. *World J. Gastroenterol.* 12 (2006) 3999-4003.
119. H. Kim: Cerulein pancreatitis: oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Gut Liver* 2 (2008) 74-80.

120. P.J. Boersema, T.T. Aye, T.A. van Veen, A.J. Heck, S. Mohammed: Triplex protein quantification based on stable isotope labeling by peptide dimethylation applied to cell and tissue lysates. *Proteomics* 8 (2008) 4624-4632.
121. J.L. Hsu, S.Y. Huang, N.H. Chow, S.H. Chen: Stable-isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Anal. Chem.* 75 (2003) 6843-6852.
122. M.R. Larsen, T.E. Thingholm, O.N. Jensen, P. Roepstorff, T.J. Jørgensen: Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Mol. Cell. Proteomics* 4 (2005) 873-886.
123. M. Candito, E. Billaud, M. Chauffert, J.M. Cottet-Emard, D. Desmoulin, J.P. Garnier, J. Greffe, C. Hirth, N. Jacob, F. Millot, A. Nignan, M.C. Patricot, L. Peyrin, P.F. Plouin: Biochemical diagnosis of pheochromocytoma and neuroblastomas. *Ann. Biol. Clin.* 60 (2002) 15-36.
124. J.Y. Hong, N.H. Park, M.S. Oh, H.S. Lee, H. Pyo, J. Hong: Profiling analysis of biogenic amines and their acidic metabolites in mouse brain tissue using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed Life Sci.* 940 (2013) 94-103.
125. R.I. Chirita, C. West, A.L. Finaru, C. Elfakir: Approach to hydrophilic interaction chromatography column selection: application to neurotransmitters analysis. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3091-3104.
126. N. Tohmola, O. Itkonen, T. Sane, H. Markkanen, S. Joenväärä, R. Renkonen, E. Hämäläinen: Analytical and preanalytical validation of a new mass spectrometric serum 5-hydroxyindoleacetic acid assay as neuroendocrine tumor marker. *Clin. Chim. Acta* 428 (2014) 38-43.
127. I.P. Kema, E.G. de Vries, M.J. Slooff, B. Biesma, F.A. Muskiet: Serotonin, catecholamines, histamine, and their metabolites in urine, platelets, and tumor tissue of patients with carcinoid tumors. *Clin. Chem.* 40 (1994) 86-95.
128. M. Hinz, A. Stein, G. Trachte, T. Uncini: Neurotransmitter testing of the urine: a comprehensive analysis. *Open Access J. Urol.* 2 (2010) 177-183.
129. I.P. Kema, W.G. Meijer, G. Meiborg, B. Ooms, P.H. Willemse, E.G. de Vries: Profiling of tryptophan-related plasma indoles in patients with carcinoid tumors by automated, on-line, solid-phase extraction and HPLC with fluorescence detection. *Clin. Chem.* 47 (2001) 1811-1820.
130. M.A. Saracino, G. Gerra, L. Somaini, M. Colombati, M.A. Raggi: Chromatographic analysis of serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid and homovanillic acid in dried blood spots and platelet poor and rich plasma samples. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4808-4814.
131. J. Caslavská, E. Gassmann, W. Thormann: Modification of a tunable UV-visible capillary electrophoresis detector for simultaneous absorbance and fluorescence detection: profiling of body fluids for drugs and endogenous compounds. *J. Chromatogr. A* 709 (1995) 147-156.
132. E. Sofić: Metabolic Turnover of Biogenic Amines In Physiological Fluids: Diagnostic Significances, *Turk. J. Biochem.*, (2007) 120–129.
133. M. van Essen, A. Sundin, E.P. Krenning, D.J. Kwkkeboom: Neuroendocrine tumours: the role of imaging for diagnosis and therapy. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10 (2014) 102-114.
134. M. Biermann, B. Johnsen, H. Sørbye, M. Følling, A. Sundin, T. Bach-Gansmo: Positron emission tomography in neuroendocrine tumours. *Tidsskr. Nor. Laegeforen* 129 (2009) 1474-1477.
135. S. Barco, I. Gennai, G. Reggiardo, B. Galleni, L. Barbagallo, A. Maffia, E. Viscardi, F. De Leonardis, V. Cecinati, S. Sorrentino, A. Garaventa, M. Conte, G. Cangemi: Urinary homovanillic and vanillylmandelic acid in the diagnosis of neuroblastoma: Report from the Italian Cooperative Group for Neuroblastoma. *Clin. Biochem.* 47 (2014) 848-852.

136. M.E. Kelley, J.K. Yao, D.P. van Kammen: Plasma catecholamine metabolites as markers for psychosis and antipsychotic response in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 20 (1999) 603-611.
137. A.N. van der Horst-Schrivers, W.J. Post, I.P. Kema, T.P. Links, P.H. Willemse, A.N. Wymenga, E.G. de Vries: Persistent low urinary excretion of 5-HIAA is a marker for favourable survival during follow-up in patients with disseminated midgut carcinoid tumours. *Eur. J. Cancer* 43 (2007) 2651-2657.
138. M. Asberg: Neurotransmitters and suicidal behavior. The evidence from cerebrospinal fluid studies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 836 (1997) 158-181.
139. M.L. Hallin, K. Mahmoud, A. Viswanath, R. Gama: 'Sweet Dreams', 'Happy Days' and elevated 24-h urine 5-hydroxyindoleacetic acid excretion. *Ann. Clin. Biochem.* 50 (2013) 80-82.
140. H.R. Rabanes, A.M. Guidote, J.P. Quirino: Capillary electrophoresis of natural products: highlights of the last five years (2006-2010). *Electrophoresis* 33 (2012) 180-195.
141. Y.Y. Kao, K.T. Liu, M.F. Huang, T.C. Chiu, H.T. Chang: Analysis of amino acids and biogenic amines in breast cancer cells by capillary electrophoresis using polymer solutions containing sodium dodecyl sulfate. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 582-587.
142. J. Lange, K. Thomas, C. Wittmann: Comparison of a capillary electrophoresis method with high-performance liquid chromatography for the determination of biogenic amines in various food samples. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 779 (2002) 229-239.
143. X. Sun, X. Yang, E. Wang: Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis with pulsed amperometric detection. *J. Chromatogr. A* 1005 (2003) 189-195.
144. M. Tuchman, P.J. Crippin, W. Krivit: Capillary gas-chromatographic determination of urinary homovanillic acid and vanillylmandelic acid. *Clin. Chem.* 29 (1983) 828-831.
145. T. Manickum: Simultaneous analysis of neuroendocrine tumor markers by HPLC-electrochemical detection. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (2009) 4140-4146.
146. M. Monteleone, A. Naccarato, G. Sindona, A. Tagarelli: A reliable and simple method for the assay of neuroendocrine tumor markers in human urine by solid-phase microextraction-gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 759 (2013) 66-73.
147. E. Zambrano, M. Reyes-Múgica: Hormonal activity may predict aggressive behavior in neuroblastoma. *Pediatr. Dev. Pathol.* 5 (2002) 190-199.
148. E. Eldrup, N. Clausen, B. Scherling, K. Schmiegelow: Evaluation of plasma 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and plasma 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) as tumor markers in children with neuroblastoma. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 61 (2001) 479-490.

PODZIĘKOWANIA

Przeprowadzenie badań opisanych w prezentowanej pracy doktorskiej było możliwe dzięki współpracy z krajowymi i zagranicznymi ośrodkami naukowymi oraz placówkami ochrony zdrowia. Dzięki wsparciu merytorycznemu oraz umożliwieniu pracy z użyciem niezbędnych technologii analitycznych, praca doktorska mogła przyjąć wymiar interdyscyplinarny i obejmuje wykorzystanie współczesnych narzędzi bioanalitycznych niezbędnych w poszukiwaniu nowych, potencjalnych biomarkerów chorób nowotworowych.

W szczególności chciałabym podziękować za udzieloną mi pomoc i przekazaną cenną wiedzę oraz wsparcie merytoryczne:

prof. dr. hab. Tomaszowi Bączkowi (kierownikowi Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego);

całemu zespołowi Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z którym przez lata 2011-2015 współpracowałam, a w szczególności:

dr Lucynie Koniecznej, dr Ilonie Olędzkiej, dr Alinie Plenis, dr. Piotrowi Kowalskiemu, dr Kasi Macur, dr. Piotrowi Kawczakowi, dr. Szymonowi Dziombie, mgr. Mariuszowi Belce, mgr. Szymonowi Ulenbergowi;

zespołowi, z którym miałam przyjemność pracować przygotowując część pierwszą pracy doktorskiej, czyli analizę potencjalnych nowych biomarkerów guzów neuroendokrynnych:

dr Patrycji Koszałce (Zakład Biologii Komórki Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego),

dr Annie Lewczuk i dr Zofii Woźniak (Katedra i Klinika Endokrynologii i Chorób Wewnętrznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego)

dr Barbarze Seroczyńskiej (Katedra Analityki Klinicznej, Zakład Medycznej Diagnostyki Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego);

zespołowi Katedry i Kliniki Pediatrii, Hematologii i Onkologii, a w szczególności:

dr hab. Elżbiecie Adamkiewicz-Drożyńskiej, prof. nadzw. GUMEed oraz dr hab. Ewie Bień;

dr. hab. Przemysławowi Kowiańskiemu, prof. nadzw. GUMed (Zakład Anatomii i Neurobiologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego) za udostępnienie próbek do badań,

dzięki którym zdobyłam niezbędne informacje dodatkowe podczas przygotowania niniejszej pracy doktorskiej;

*me gustaria dar las gracias a la unidad de Proteomica (en particular **Dr. Fernando García, Dr. Javier Muñoz, Dr. Maria Pilar Ximénez de Embún, Dr. Nuria Ibarz y Dr. Isabel Ruppen**) por todo lo que me han enseñado durante mi estancia en el CNIO y por todo el apoyo que me dieron en cuanto a la spectromia de masas y la fosfoproteomica. [Chciałabym podziękować grupie Proteomicznej Hiszpańskiego Narodowego Centrum Badań nad Rakiem (w szczególności **Dr. Fernando García, Dr. Javier Muñoz, Dr. Maria Pilar Ximénez de Embún, Dr. Nuria Ibarz** oraz **Dr. Isabel Ruppen**) za pomoc, szkolenie w zakresie proteomiki i fosfoproteomiki i wsparcie udzielone mi podczas rocznego stażu naukowego w Hiszpanii.];*

*ringrazio sentitamente la **Prof. Dr. Ursula Grohmann** e il **Dr. Carmine Vacca** per il supporto che mi hanno dato per la mia crescita professionale nel campo dell'immunofarmacologia. in special modo nella preparazione e nell'analisi di campioni per studi clinici. [Podziękowania należą się również **Prof. Dr. Ursuli Grohmann** y **Dr. Carmine Vacca** za przeszkolenie laboratoryjne podczas stażu naukowego w Perugii, we Włoszech.]*

*Praca doktorska nie mogłaby być również ukończona, gdyby nie bezcenne wsparcie duchowe, którego udzielili mi **Rodzice, Rodzeństwo, cała Rodzina, Maciek** oraz **Przyjaciele**. Ich wsparcie na wszystkich etapach przygotowywania pracy doktorskiej (również edytorskie), umożliwiło mi spokojne podejmowanie coraz to nowych wyzwań naukowych.*

Realizacja praca doktorskiej była dodatkowo wsparta:

- 1. Stypendium „Innodoktorant” przyznanego w roku 2014 w ramach Priorytetu VIII Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Działanie 8.2, Poddziałanie 8.2.2 „Regionalne Strategie Innowacji”, finansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, budżetu państwa oraz budżetów samorządów województw,*
- 2. Umowę Offsetową z Hiszpanią – EADS CASA (Eurocopter and Airbus Operations),*
- 3. Środki Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW) przyznanego na podstawie decyzji nr MNiSW-DS-6002-4693-23/WA/12 z dnia 12 lipca 2012 r. na lata 2012-2017 Gdańskiemu Uniwersytetowi Medycznemu.*