# Streszczenie

Rak płuca jest główną przyczyną zgonów związanych z chorobami nowotworowymi na świecie, zarówno wśród mężczyzn jak i kobiet. Z powodu różnych typów raka płuc umiera ponad 1 milion osób rocznie. Niedrobnokomórkowy rak płuca (ang. non-small cel lung cancer - NSCLC) stanowi około 80% wszystkich przypadków raka płuca. Najczęstszymi podtypami histologicznymi NSCLC są gruczolakorak (ang. adenocarcinoma - ADC), rak płaskonabłonkowy (ang. squemous cel carcinoma - SCC) i rak wielkokomórkowy (ang. large cell carcinoma - LCC). Wśród nich podtypy ADC i SCC stanowią około 85% wszystkich przypadków. W ciągu ostatniej dekady podjęto znaczące wysiłki na rzecz identyfikacji i walidacji nowych kandydatów na biomarkery białkowe i drobnocząsteczkowe.

Badania omiczne stanowią istotną część badań nad odkryciem potencjalnych biomarkerów z zakresu białek oraz metabolitów, służących nie tylko określenia podtypu NSCLC lecz także do wykrywania i monitorowania rozwoju tego nowotworu zwłaszcza we wczesnym stadium zaawansowania. Spośród nowoczesnych narzędzi analitycznych dostępnych w diagnostyce chorób nowotworowych największe nadzieje dają techniki oparte na spektrometrii mas takie jak proteomika i metabolomika. Proteomika to wielkoskalowa analiza ekspresji białek wchodzących w skład proteomu. Proteom jest zestawem białek produkowanych przez organizm, lub występującym w danym systemie biologicznym. Natomiast metabolomika to wielkoskalowe badania jak największej ilości drobnych cząsteczek biologicznych, takich jak aminokwasy, kwasy organiczne, kwasy tłuszczowe, lipidy, acylkarnityny i inne. Zakładała ilościowy pomiar zmian w poziomie drobnych cząsteczek (metabolitów) w organizmie wywołanych zamianami fizjologicznymi, czynnikiem patologicznym lub modyfikacjami genetycznymi.

Celem badań była analiza ekspresji białek oraz metabolitów z użyciem wielkoskalowych technik proteomicznych i metabolomicznych opartych na spektrometrii mas, w celu wskazania znaczących cech różnicujących poszczególne podtypy NSCLC, co może poszerzyć wiedzę na temat biologii tego nowotworu. Ponadto wielkoskalowe dane omiczne mogą wskazać nowe aspekty fizjologiczne i biologiczne nowotworu, co umożliwi głębszą charakterystykę podtypów NSCLC zwłaszcza we wczesnym stadium zaawansowania, a także pogłębi w przyszłości możliwości diagnostyczne.

Grupę badaną stanowiło 99 pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca (72 mężczyzn i 27 kobiet) w wieku średnio 64,5±8,5 lat z wcześniej określonym histopatologiczne podtypem NSCLC. Analizy metabolomiczne przeprowadzono na próbkach od wszystkich pacjentów. Natomiast z grupy 99 pacjentów wyłoniono podgrupę 45 pacjentów (31 mężczyzn i 14 kobiet) w celu przeprowadzenia analiz proteomicznych.

Analizy proteomiczne zostały przeprowadzone na wyizolowanym białku, które zostało poddane trawieniu proteolitycznemu metodą iFASP. Uzyskane peptydy zostały poddane znakowaniu za pomocą znaczników izobarycznych TMT, a następnie procedurze frakcjonowania. Frakcje peptydów zostały rozdzielone za pomocą chromatografii cieczowej o przepływach nano i poddane analizie za pomocą spektrometru masowego typu Orbitrap. Identyfikacja białek została przeprowadzona w oparciu biblioteki sekwencji FASTA za pomocą oprogramowania PEAKS X pro. Analizę szlaków biochemicznych oraz możliwych interakcji białek w obrębie poszczególnych porównań wykonano za pomocą oprogramowania Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Natomiast metabolity zostały wyekstrahowane z próbek tkanki za pomocą metanolu, a następnie poddane rozdziałowi chromatograficznemu dwoma metodami (odwróconych faz oraz cieczowych oddziaływań hydrofilowych) i detekcji za pomocą detektora mas typu QTOF. Metabolity zostały poddane identyfikacji na podstawie uzyskanych charakterystycznych widm fragmentacyjnych i porównane z widmami dostępnymi w bazach danych. Analizę szlaków biochemicznych przeprowadzono za pomocą IPA i MetaboAnalyst 4.5.

Analizy proteomiczne wczesnego stadium wskazały na potencjalną aktywację szlaków LXR, GP6 oraz CDK5 w porównaniu podtypu SCC i ADC. Natomiast w porównaniu podtypów ADC i LCC (wczesne stadium) charakteryzuje się potencjalną aktywacją szlaku odpowiedzi na niesfałdowane białka, glikolizy, glukoneogenezy oraz aktywacja białek sirtuin w podtypie ADC. Analiza metabolomiczne porównująca wczesne stadium SCC i ADC wykazało, że metabolity: kreatynina, kreatynina, ksantyna i dihydrotymina są podwyższone w SCC, podczas gdy metabolity należące do kwasów tłuszczowych, karnityny, glicerofosfolipidy, lizoglicerofosfolipidy, aminy, aminokwasy lub amidy są podwyższone w ADC. Na uwagę zasługuje także grupa glicerofosfo-(N-acylo)-etanoloaminy (GP-NAE) różnicujących wczesne stadium SCC od ADC. Metabolity różnicujące wczesne stadium zaawansowania SCC od ADC uczestniczą w wielu procesach biochemicznych takich jak: cykl Krebsa, cykl mocznikowy, łańcuch oddechowy czy degradacja lipidów. Zaawansowane stadium charakteryzuje się potencjalną aktywacja szlaku LXR, GP6 oraz EIF2, a wzrost ekspresji białek odpowiedzialnych

za przebudowę nabłonkowych połączeń przylegających w podtypie SCC w odniesieniu do ADC. Porównując podtyp ADC do LCC w zaawansowanym stadium wskazuje na potencjalną aktywację szlaku LXR oraz wzrost ekspresji białek odpowiedzialnych za powstanie odpowiedzi zapalnej oraz reakcją ostrej fazy w podtypie ADC. Natomiast potencjalna aktywność szlaku glikolizy w podtypie ADC uległa zahamowaniu w stosunku do LCC. Podtyp LCC w zaawansowanym stadium charakteryzuje się wzrostem aktywności szlaku sygnałowego białek sirtuin oraz hamowaniem aktywności szlaku GP6 i szlaku odpowiedzi na niesfałdowane białka w stosunku do podtypu SCC. Metabolity różnicujące zaawansowane stadium trzech podtypów charakteryzuje się zmianami poziomów w grupie karnityn, aminokwasów, lipidów i kwasów tłuszczowych. Największe różnice w poziomie metabolitów obserwujemy pomiędzy podtypem SCC względem LCC oraz ADC względem LCC, gdzie w każdym porównaniu podtyp LCC charakteryzował się obniżonym poziomem metabolitów. Natomiast porównując poszczególne podtypy NSCLC z tkanką kontrolną obradujemy zwiększenie aktywności potencjalnych szlaków biochemicznych wraz ze wzrostem stadium zaawansowania nowotworu.

Uzyskane wyniki wskazują na zaburzenia w procesach odpowiedzialnych za gospodarkę lipidami, węglowodanami, odpowiedzi na niesfałdowane białka co świadczy o dużym stresie oksydacyjnym zachodzącym w retukulum endoplasmatyczym. Analizy wskazują także na dysfunkcję procesów odpowiedzialnych za proces translacji i transkrypcji, a także glikolizy i glukoneogenezy we wczesnym stadium NSCLC. Natomiast w zaawansowanym stadium NSCLC wyniki wskazują na zwieszenie aktywności procesów zachodzących we wczesnym stadium zaawansowania nowotworu. Zaawansowanie stadium charakteryzuje się także zwiększeniem  odpowiedzi zapalnej oraz reakcją ostrej fazy, a także odpowiedzą na przebudowę nabłonkowych połączeń przylegających.