

Abstrakt

Primárnym cieľom predkladanej práce je izolácia a analýza exozómov z moču z hľadiska ich významu ako zdroja potenciálnych molekulárnych markerov v onkológii, čo je dôležité pre skupinu nádorových ochorení s vysokým rizikom rekurencie. Do tejto skupiny patrí aj rakovina močového mechúra, ktorá je najčastejším typom karcinómu urologického systému. Doteraz však nebol identifikovaný spoľahlivý marker, ktorý by dokázal odlíšiť pacientov s karcinómom močového mechúra (BC) od pacientov s benígnou hematúriou (HEM) a zdravých jedincov (CTRL). V literatúre publikované markery často vykazujú vysoké falošne pozitívne výsledky, ktoré môžu byť spôsobené najmä často sa vyskytujúcou hematúriou aj v benígnych prípadoch. Moč predstavuje vhodný zdroj na diagnostiku BC vďaka jeho neinvazívnemu odberu a priamemu kontaktu moču s bunkami urologických nádorov. Súčasne, moč obsahuje extracelulárne vezikuly (exozómy), ktoré majú podobné zloženie ako bunky, z ktorých boli vylúčené. Sú bohaté na proteíny, preto proteomická analýza exozómov môže poskytnúť platformu na objavenie biomarkerov a vytvoriť neinvazívny nástroj na diagnostiku rôznych chorôb vrátane BC. Naša práca sa zaoberala optimalizáciou protokolu na izoláciu močových exozómov na základe ultrafiltrácie a vylučovacej chromatografie podľa veľkosti s cieľom odlíšenia pacientov s BC na základe ich proteomickej analýzy. Následná úprava vzorky pred podrobením na hmotnostnej spektrometrii (MS) bola vykonaná využitím paramagnetických mikročastíc. Charakterizácia exozómov prebehla pomocou western blotu, analýzy sledovania nanočastíc a skenovacej elektrónovej mikroskopii. Na základe label-free LC-MS/MS bola vykonaná proteomická analýza vzoriek močových exozómov. Pomocou bioinformatických nástrojov sa skúmali zmenené proteíny so zameraním na BC. Výsledky štúdie vykazovali významné rozdiely v identifikovaných exozomálnych proteínoch medzi BC skupinou a kontrolnými skupinami. Naše zistenia ukazujú najviac zmenenú expresiu proteínov FSCN1 a apolipoproteínov medzi BC a CTRL skupinou a HEXB, AKR1C2, XRCC5 proteínov, ktoré boli významne zmenené pri porovnaní BC pacientov či už so zdravými jedincami, alebo s HEM pacientami. Viacrozmerná analýza sPLS-DA odhalila súbory biomarkerov, na základe ktorých odlišila BC pacientov voči zdravým jedincom alebo pacientom s benígnou hematúriou. Proteomické profilovanie exozómov by mohlo prispieť k odhaleniu biomarkerov, a tým k zlepšeniu diferenciálnej diagnostiky BC.

Kľúčové slová: izolácia exozómov z moču, proteomická analýza, diagnostika, rakovina močového mechúra