

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Tomasz Kluz

**Badania proteomiczne
raka endometrium**

Poznań 2018

Tytuł angielski
Proteomic studies on endometrial cancer

Recenzent
Prof. dr hab. Marek Spaczyński

Skład komputerowy
Beata Łakomiak

Korekta
Barbara Błazejczak

Projekt okładki
Bartłomiej Wąsiel

Copyright © by Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu,
Poznań 2018
Copyright © by Tomasz Kluz, 2018

ISBN 978-83-7597-332-7

WYDAWNICTWO NAUKOWE UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU
60-812 Poznań, ul. Bukowska 70
www.wydawnictwo.ump.edu.pl

Ark. wyd. 6,5. Ark. druk. 11,3.
Format B5. Zam. nr 37/18.
Druk ukończono w marcu 2018.

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	5
1. WSTĘP	9
1.1. Proteomika i metabolomika	11
1.1.1. Metody stosowane w badaniach proteomicznych	13
1.1.2. Zastosowanie badań proteomicznych w praktyce klinicznej	17
1.2. Rak błony śluzowej trzonu macicy	18
1.2.1. Czynniki ryzyka	18
1.2.2. Patogeneza i histologia	19
1.2.3. Typy genomyczne	21
1.2.4. Klasyfikacja kliniczna	22
1.2.5. Biomarkery	24
1.2.6. Leczenie	25
1.2.7. Rokowanie	25
1.2.8. Genetyczne markery rozsiewu	26
1.2.9. Badania proteomiczne	26
1.3. Biomarkery angiogenezy	28
2. CEL BADAŃ	33
3. MATERIAŁ I METODYKA	34
3.1. Materiał	34
3.1.1. Grupa badana	34
3.1.2. Grupa kontrolna	34
3.2. Metodyka	35
3.2.1. Wykaz odczynników	35
3.2.2. Profilowanie peptydowo-białkowe z wykorzystaniem spektrometrii MALDI-TOF-MS	36
3.2.3. Identyfikacja peptydów dokonana w technice nLC-MALDI-TOF/TOF-MS/MS	39
3.2.4. Oznaczanie panelu markerów białkowych w surowicy z wykorzystaniem metody separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej	40
4. WYNIKI	42
4.1. Profilowanie peptydowo-białkowe z wykorzystaniem spektrometrii MALDI-TOF-MS	42
4.2. Identyfikacja peptydów dokonana w technice nLC-MALDI-TOF/TOF-MS/MS	46
4.3. Oznaczanie panelu markerów białkowych w surowicy z wykorzystaniem metody separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej	64

5. DYSKUSJA	89
6. WNIOSKI	103
7. BIBLIOGRAFIA	104
8. ANEKS	123
9. STRESZCZENIE	130
10. SUMMARY	134

WYKAZ SKRÓTÓW

ANXA2	– ang. <i>annexin A2</i> – aneksyna A2
AUC	– ang. <i>area under the ROC curve</i> – pola pod krzywą ROC
BMI	– ang. <i>body mass index</i> – indeks masy ciała
COX-2	– ang. <i>cyclooxygenase-2</i> – cyklooksygenaza-2
DNA	– ang. <i>deoxyribonucleic acid</i> – kwas dezoksyrybonukleinowy
EC	– ang. <i>endometrial cancer</i> – rak endometrium
EGFR	– ang. <i>epidermal growth factor receptor</i> – receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu
EIC	– ang. <i>endometrial intraepithelial carcinoma</i> – wewnątrz nabłonkowy rak endometrium
EIN	– ang. <i>endometrium intraepithelial neoplasia</i> – wewnątrz nabłonkowa neoplazja endometrium
ESI	– ang. <i>electrospray</i> – elektrorozpylanie
Fas	– antygen Fas (ang. sFas – <i>soluble Fas</i>)
FDA	– ang. Food and Drug Administration – Agencja Żywności i Leków
FGF-basic, FGF2	– ang. <i>basic fibroblast growth factor</i> – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów
FIGO	– fr. Fédération internationale de gynécologie et d'obstétrique, ang. The International Federation of Gynecology and Obstetrics – Międzynarodowa Federacja Ginekologów i Położników
Fit-1	– ang. <i>fms-like tyrosine kinase</i> – receptor dla VEGF
FST	– ang. <i>follistatin</i> – folistatyna
GA	– ang. <i>genetic algorithm</i> – algorytm genetyczny
G-CSF	– ang. <i>granulocyte colony stimulating factor</i> – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów
HCCA	– ang. <i>α-cyano-4hydroxycinnamic acid</i> – kwas α-cyano-4-hydroksycynamonowy
HE4	– ang. <i>human epididymis protein 4</i> – podfrakcja 4 ludzkiego białka z komórek nabłonkowych jądra
HER2	– ang. <i>human epidermal receptor 2</i> – receptor ludzkiego nabłonkowego czynnika wzrostu
HGF	– ang. <i>hepatocyte growth factor</i> – czynnik wzrostu hepatocytów
HIF	– ang. <i>hypoxia induced factor</i> – czynnik indukowany hipoksją

HPLC	– ang. <i>high performance liquid chromatograph</i> – wysoko sprawny chromatograf cieczowy typu nLC
KDR	– ang. <i>kinase insert domain receptor</i> – receptor dla VEGF
L1CAM	– ang. <i>L1 cell adhesion molecule</i> – neuronalna cząsteczka adhezyjna L1
LIFT	– technologię optyki jonowej (nazwa własna) można zamiennie nazywać trybem MS/MS lub metodą MS/MS
MALDI	– ang. <i>matrix assisted laser desorption ionisation</i> – jonizacja przez desorpcję laserem przy udziale matrycy
MALDI-TOF	– ang. <i>matrix assisted laser desorption ionisation</i> – jonizacja przez desorpcję laserem przy udziale matrycy z użyciem analizatora czasu przelotu (ang. <i>time of flight</i>)
MAPK	– ang. <i>mitogen-activated protein kinase</i> – kinazy aktywowane mitogenami
MCSF1	– ang. <i>macrophage colony-stimulating factor 1</i> – czynnik stymulujący kolonię makrofagów 1
mRNA	– ang. <i>messenger RNA</i> – przekaźnikowy RNA
MS	– ang. <i>mass spectroscopy</i> – spektroskopia mas
MSI	– ang. <i>microsatellite instability</i> – niestabilność mikrosatelitarna
MSMCO	– ang. <i>matrix suppression mass cut off</i> – supresja matrycy
m/z	– stosunek masy do ładunku
NCI	– ang. National Cancer Institute – Narodowy Instytut Raka – dział amerykańskiej rządowej agencji National Institutes of Health
OPN	– ang. <i>osteopontin</i> – osteopontyna
PCA	– ang. <i>principal component analysis</i> – analiza głównych składowych
PDGF-AB/BB	– ang. <i>platelet-derived growth factor AB and BB</i> – płytkopochodny czynnik wzrostu – heterodimer zbudowany z łańcucha A i łańcucha B / homodimer zbudowany z dwóch łańcuchów B
PECAM-1	– ang. <i>platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i> – płytkowo-śródbłonkowe białko adhezyjne 1
PGF	– ang. <i>placenta growth factor</i> – łożyskowy czynnik wzrostu
PI3K/Akt	– ang. <i>phosphoinositide 3-kinase</i> – kinaza fosfatidyloinozytolu
PIE	– ang. <i>pulsed ion extraction</i> – pulsacyjna ekstrakcja jonów
PLS-DA	– ang. <i>partial least squares-discriminant analysis</i> – regresja metodą cząstkowych najmniejszych kwadratów
POLE	– grupa polimerazy DNA ϵ (akronim)
PRL	– prolaktyna
QC	– ang. <i>quick classifier</i> – szybki klasyfikator
RNA	– ang. <i>ribonucleic acid</i> – kwas rybonukleinowy
ROC	– ang. <i>receiver operating characteristic</i> – krzywa oceny jakości klasyfikatora

SCF – ang. *stem cell factor* – czynnik komórek macierzystych

sEGFR – ang. *soluble epidermal growth factor receptor* – rozpuszczalny receptor naskórkowego czynnika wzrostu

SELDI-TOF-MS – ang. *surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry* – spektrometria mas z jonizacją laserową wzmocnioną powierzchniowo i z detektorem czasu przelotu

sHER2/neu – ang. *soluble human epidermal growth factor receptor 2* – rozpuszczalny receptor kinazy tyrozynowej erb-2

SIBLING – ang. *small integrin binding ligand N-linked glycoprotein* – rodzina niekolagenowych białek

sIL-6Ra – ang. *soluble form of the IL-6* – rozpuszczalny receptor α interleukiny 6

SNN – ang. *supervised neural network* – nadzorowana sieć neuronowa

SPE – ang. *solid phase extraction* – technika ekstrakcji do fazy stałej

STAT – ang. *signal transducer and activator of transcription* – wewnętrzne komórkowe czynniki transkrypcji

sTie-2 – ang. *soluble angiopoetin receptor* – rozpuszczalny receptor dla angiopoetyny

sVEGFR-1 – ang. *soluble vascular endothelial growth factor receptor-1* – rozpuszczalny receptor 1 naczyńniowo-śródnabłonkowego czynnika wzrostu

sVEGFR-2 – ang. *soluble vascular endothelial growth factor receptor-2* – rozpuszczalny receptor 2 naczyńniowo-śródnabłonkowego czynnika wzrostu

TCGA – ang. „The Cancer Genome Atlas” – „Atlas genomu raka”

TFA – ang. *trifluoroacetic acid* – kwas trifluorooctowy

TGF- β – ang. *transforming growth factor β* – transformujący czynnik wzrostu beta

Th – thomson – jednostka stosunku masy do ładunku

TOF – ang. *time of flight* – analizator czasu przelotu

VEGF – ang. *soluble vascular endothelial growth factor* – rozpuszczalny czynnik wzrostu śródnabłonka naczyń

VIP – ang. *variable importance in projection* – ranking wartości

α -sIL-6Ra – podjednostka α rozpuszczalnego receptora interleukiny 6 (ang. *soluble interleukin 6 receptor*)

1. WSTĘP

Zwalczanie nowotworów złośliwych jest dziś głównym wyzwaniem medycyny. Każdy nieleczony nowotwór w końcu doprowadza do śmierci organizmu, w którym się rozwija. Do zwalczania nowotworów stosujemy trzy metody terapeutyczne; są to: chirurgia, radioterapia i chemioterapia. Chirurgia korzysta z coraz bardziej precyzyjnego sprzętu, opracowywane są nowe metody śródoperacyjnej lokalizacji i weryfikacji ognisk nowotworu oraz doskonalona jest małoinwazyjna technika operacji. Radioterapia także opiera się na precyzyjnym planowaniu wspomaganym przez nowoczesne obrazowanie, co pozwala zwiększać precyzję napromieniania. Leczenie systemowe, czyli chemioterapia, uszkadza tkankę guza, ale także zdrowe tkanki organizmu. Od co najmniej 30 lat nie zanotowano znaczącego postępu w leczeniu systemowym nowotworów złośliwych. Niedawno wprowadzono leczenie celowane oparte na przeciwciałach skierowanych przeciwko markerom molekularnym guza. Jednak i ono charakteryzuje się nie- zbyt dużą skutecznością i obciążone jest szeregiem działań niepożądanych.

Wymienione trzy metody leczenia są stosowane od wielu lat i w zasadzie nie doprowadziły do jakiegokolwiek przełomu w zwalczaniu raka. Przyczyna tego leży w dużej heterogeniczności guzów nowotworowych. Każdy nowotwór ma inną, charakterystyczną dla siebie biologię. Także każdy ludzki organizm jest inny, czyli może w różny sposób reagować na rozwijający się guz. Wiele nowotworów, które znacznie różnią się w zakresie inicjacji rozwoju, obrazu i przebiegu klinicznego, jest obecnie leczonych w ten sam sposób. Sprzyja temu uznawany i stosowany od wielu lat narządowy, anatomiczny system klasyfikacji nowotworów złośliwych. Leczymy raka szyjki macicy, raka błony śluzowej trzonu macicy czy raka jajnika, a te nowotwory, mimo że dotyczą tych samych lokalizacji i narządów, są heterogeniczne; inaczej powstają i odmiennie się rozwijają. Raczej nie spodziewamy się, że powstanie lek leczący wszystkie nowotwory złośliwe, choć w tym celu czynione są olbrzymie nakłady. Wydaje się, że kluczem do zwalczania nowotworów złośliwych będzie lepsze i całościowe poznanie molekularnej biologii każdego rodzaju raka oraz interakcji powstającego nowotworu z organizmem, w którym się rozwija. Z pewnością wysiłki w zwalczaniu raka wiążą się z onkologią spersonalizowaną opartą na osiągnięciach biotechnologii, genetyki, genomiki i profilowania genetycznego oraz profilowania białkowego, czyli proteomiki.

Nowotwór złośliwy powstaje wskutek zaburzeń podstawowego mechanizmu życia komórki, czyli zaburzeń w cyklu komórkowym. Zaburzenia są wynikiem nie-

prawidłowej informacji genetycznej płynącej z jądra do cytoplazmy, czego skutkiem jest produkcja nieprawidłowych białek lub jej brak, co uniemożliwia dalszy prawidłowy przebieg życiowy komórki. Komórka przestaje odpowiadać na sygnały warunkujące jej fizjologiczne działanie, zyskuje zdolność niekontrolowanego dzielenia się oraz zdolność do unikania apoptozy. Procesami tymi rządzi nieprawidłowa informacja genetyczna, której następstwem jest brak (zmniejszona ekspresja) lub nadmierna produkcja (nadekspresja) prawidłowych lub nieprawidłowych białek w komórce.

1.1. PROTEOMIKA I METABOLOMIKA

Termin: proteomika został po raz pierwszy użyty przez Marca Wilkinsa w 1994 roku [1]. Pierwowzorem semantycznym dla tego terminu była genomika, a więc nauka badająca zespół genów, czyli genom danego organizmu. Proteomika jest dziedziną biologii molekularnej, która w połączeniu z bioinformatyką zajmuje się badaniem proteomu, czyli identyfikacją, poznaniem struktury, funkcji oraz oddziaływań białek, jakie są zakodowane w genomie. Wszystkie komórki organizmu człowieka mają wspólny genom, jednak różne jego fragmenty ulegają ekspresji w różnych komórkach i narządach oraz w różnych okresach życia. Wątroba i macica mają w komórkach takie samo DNA, jednak ich budowa i funkcje różnią się między sobą i każdy z tych narządów posiada inny proteom, który zmienia się w różnych okresach życia. Pierwszym etapem warunkującym powstanie białka jest przepisanie właściwego kodu genetycznego z DNA na mRNA. Przekaznikowy mRNA przenika do cytoplazmy komórki i tam na rybosomach jest syntezowany biopolimer, czyli łańcuch aminokwasów. Dojrzały mRNA zawiera informacje tylko z części kodującej danego genu, czyli z eksonów. Części niekodujące, introny, są wycinane w procesie dojrzewania RNA. Możliwość alternatywnego składowania eksonów z DNA warunkuje już na tym etapie możliwość powstania różnych wersji mRNA, a dalej – powstania łańcuchów peptydowych o różnym składzie aminokwasów. Wiele tak zsyntetyzowanych łańcuchów proteinowych ulega dalszym modyfikacjom, uzyskując swoją strukturę przestrzenną. Część z nich dołącza do łańcucha aminokwasowego inne grupy chemiczne, tworząc chromoproteiny, lipoproteiny, fosfoproteiny, glikoproteiny, metaloproteiny i nukleoproteiny.

Białka syntetyzowane u człowieka podlegają nieustannym zmianom pod wpływem interakcji wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych oraz środowiskowych. Ekspresja białek w komórkach ulega zmianom także w zależności od fazy cyklu komórkowego. Każda tkanka, również nowotworowa, ma swój własny, ale także zmienny pakiet protein, czyli proteom.

Pierwszym krokiem do poznania ludzkich białek było odczytanie sekwencji zasad genomu ludzkiego [2]. W 2001 roku opublikowano 90% sekwencji ludzkiego DNA, a w 2003 roku ogłoszono, że zsekwencjonowano już 99%. Wydawało się wtedy, że poznanie białek kodowanych przez geny jest kwestią krótkiego czasu. Tak się jednak nie stało. Człowiek posiada około 20 230 genów, natomiast nadal nieznaną jest liczba białek kodowanych przez te geny [3, 4]. Według cytowanego powyżej źródła dotychczas zarejestrowano ponad 161 000 ludzkich białek, z czego ponad 23% nie ma przypisanej sobie funkcji. Prawdopodobnie liczba

białek u człowieka jest znacznie większa (szacuje się, że sięga nawet 600 000), jednak ze względu na złożone i być może osobniczo zróżnicowane procesy posttranslacyjne trudno jest określić tę ilość, nawet w przybliżeniu. Proteom jest jednostką dynamiczną, mogącą zmieniać się w czasie i nie jest prostym przełożeniem ekspresji genów na białka.

Jednoczesna identyfikacja wielu białek z pojedynczej próbki biologicznej w celu znalezienia protein stanowiących wzorzec dla tkanek zdrowych i choroby oraz uczynienie z niego markerów to zadanie rozwijającej się proteomiki. Ustalenie ekspresji białek w stanie fizjologicznym jest kluczowe dla zbudowania mapy proteomu ludzkiego. Odchylenia od stanu fizjologicznego, czyli biomarkery choroby, są poszukiwane ze względu na swą potencjalną przydatność do konstrukcji leków w terapiach spersonalizowanych. Ocenia się, że białka charakterystyczne i powstające w nowotworze występują w surowicy w stężeniu 10 milionów razy mniejszym w porównaniu do białek wydzielanych przez normalne komórki [3].

Pojęcie: metabolom jest jeszcze szersze niż proteom. Metabolom stanowi ogół metabolitów obecnych w organizmie, narządzie, tkance lub komórce. Metabolom jest jednostką dynamiczną, a stężenia metabolitów podlegają znacznie większym zmianom w czasie życia organizmu w porównaniu do stężeń białek. Metabolomika jest najbardziej związana z fenotypem i od niego zależna. Efekty badań zarówno białek, jak i metabolitów obecnych w tkankach lub/i płynach są w centrum uwagi badaczy poszukujących biomarkerów chorób nowotworowych [5, 6].

Pojęcie: biomarker funkcjonuje w medycynie od wielu lat. Zgodnie z definicją amerykańskiej agencji FDA (ang. Food and Drug Administration) biomarkerem może być dowolna substancja, której stężenie można zmierzyć w sposób obiektywny oraz powtarzalny i pomiar ten można zaimplementować do oceny przebiegu procesów fizjologicznych lub patologicznych w organizmie [7]. Podobnie zdefiniowany został przez amerykańską instytucję rządową National Institutes of Health termin: biomarker; biomarker jest cechą charakterystyczną, obiektywnie mierzalną, wykorzystywaną jako wskaźnik normalnych procesów biologicznych, procesów patologicznych, jak również farmakologicznej odpowiedzi na procesy terapeutyczne [8]. Biomarkerem może być cecha lub wiele cech występujących wspólnie w materiale biologicznym, takich jak: gen, produkt genu, hormon, metabolit lub profil genów, profile białek, hormonów czy metabolitów, które wskazują na rozwój choroby lub monitorują proces terapeutyczny [7]. Biomarkery wykorzystywane w onkologii można podzielić na trzy grupy: diagnostyczne, prognostyczne oraz farmakodynamiczne. Biomarkery diagnostyczne

wskazują na proces chorobowy toczący się w organizmie. Biomarkery prognostyczne lub predykcyjne informują o spodziewanym wyniku przebiegu choroby lub leczenia. Mogą też być pomocne w stratyfikacji chorych do spersonalizowanego leczenia. Markery farmakodynamiczne związane są z ustalaniem dawek leków i korelacją dawki z wynikami leczenia [7, 9]. Aminokwasy i inne związki małopcząsteczkowe, peptydy i białka, które bada proteomika, mogą pełnić funkcję biomarkerów procesów nowotworowych.

1.1.1. METODY STOSOWANE W BADANIACH PROTEOMICZNYCH

Badania proteomiczne obejmują procedury jednoczesnego oczyszczania i separacji związków wchodzących w skład wieloskładnikowych próbek materiału biologicznego, a następnie ich identyfikację i interpretację w celu wyselekcjonowania potencjalnych biomarkerów, których przydatność powinna być zweryfikowana i zwalidowana. Badania proteomiczne umożliwiają szybką identyfikację różnic pomiędzy profilami białkowymi w różnych próbkach.

We współczesnej proteomice można wyróżnić trzy podstawowe procedury analityczne: *bottom-up*, *shotgun* oraz *top-down*. Najpopularniejsza strategia – *bottom-up* – opiera się na rozdzieleniu mieszaniny białek za pomocą elektroforezy dwuwymiarowej. Strategia ta jest jednak mało powtarzalna i czasochłonna. W związku z tym zastępowana jest często przez strategię *shotgun*, w której wstępnie trawi się wszystkie białka w próbce, a otrzymaną mieszaninę peptydów rozdziela za pomocą chromatografii cieczowej. Następnie przeprowadza się ich identyfikację za pomocą technik spektrometrii mas. Ostatnia strategia – *top-down* – polega na fragmentacji całych białek i nie wymaga ich wcześniejszego trawienia. Wymienione trzy techniki wzajemnie się łączą i uzupełniają [10].

Podstawą innego podziału jest zastosowanie metod badania białek: metod żelowych lub nieżelowych. W technologii żelowej rozdział białek następuje na żelu poliakrylamidowym poprzez elektroforezę. Uzyskuje się wzór białek na podstawie ich masy lub/i pH. Dalsze sekwencjonowanie pozwala uzyskać informacje o budowie badanego białka. W technikach nieżelowych wykorzystuje się chromatografię i spektrometrię mas. O wyborze metody stosowanej w badaniach białek decyduje wiele parametrów, takich jak: poziom ich ekspresji i modyfikacji, lokalizacja wewnątrz komórek, a także złożoność ich mieszanin [11].

Obecnie największe znaczenie w ocenie mieszanin białek, jaką jest np. ludzka surowica, zyskuje spektroskopia mas (MS) [12]. Jest ona wykorzystywana łącznie

z powyżej wymienionymi metodami lub samodzielnie w zależności od oczekiwanego efektu. Metoda nie identyfikuje protein, jeżeli poprzez identyfikację rozumie się strukturę i funkcję proteiny. Widmo masowe uzyskane w spektroskopie jest wynikiem generacji programu komputerowego, ale białka, które uległy fizycznemu rozdzielaniu w spektroskopie, można poddać dalej sekwencjonowaniu, co w połączeniu z danymi z bibliotek bioinformatycznych może pozwolić zidentyfikować łańcuch proteinowy.

Teoretycznie możliwe jest odnalezienie sekwencji danego białka z matrycy DNA. Istnieją oprogramowania służące temu celowi, ale nie jest to dokładna metoda. Identyfikacja białka jest także możliwa dzięki zastosowaniu metod immunologicznych, które są jednak bardzo mało wydajne; zwykle w ten sposób udaje się zidentyfikować pojedyncze proteiny. Metody te opierają się na reakcji antygen – przeciwciała, czyli warunkiem powodzenia takiego badania jest wytworzenie przeciwciała, które łączy się z białkiem. Możliwe jest też wytworzenie przeciwciała dla nieznanego białka, korzystając tylko z matrycy DNA. Jednak takie przeciwciała może nie być w pełni swoiste dla danego szukanego antygeny.

Bazy danych bioinformatycznych są tworzone na międzynarodowych serwerach i uzupełniane przez naukowców z całego świata. Bazy sekwencji domen mogą także dostarczyć informacji dotyczących spodziewanej funkcji danego białka. Analizy identyfikacyjne protein obejmują również ich przestrzenne konfiguracje – dokonuje się tego za pomocą krystalografii rentgenowskiej i spektroskopii rezonansu magnetycznego. Najtrudniejszym elementem badań białek jest określenie ich struktury czwartorzędowej, czyli badania glikozylacji czy fosforylacji. Szczególnie określenie miejsc przyłączenia grup cukrowych oraz ich wzajemnych konfiguracji jest niezmiernie trudne i w zasadzie obecnie nie ma wydajnej metody służącej temu celowi. Wszystkie wspomniane metody badania białek są możliwe przy współdziałaniu informatycznym, a bioinformatyka jest ich integralną częścią.

Rozwój proteomiki nie byłby możliwy bez wydajnej metody, jaką jest spektrometria masowa. Jej historia sięga początków XX wieku. Pierwszy spektrometr, a właściwie analizator wiązki jonów, został zbudowany przez Josepha Johna Thomsona w 1911 roku na Uniwersytecie Cambridge. Obecnie wykorzystywana technologia rozwinęła się w latach 80. i 90. XX wieku, zastępując powszechnie stosowane do tego czasu w badaniach białek elektroforezę, ultrawiórowanie czy chromatografię – metody, które nie pozwalały na jednoczasową ocenę mieszanin zawierających kilkanaście czy kilkaset tysięcy białek i były mało czułe.

Spektroskopy mas znane były znacznie wcześniej, ale ich ograniczeniem w użyciu do badania proteomu był brak odpowiednich i powtarzalnych metod

jonizacji badanych mieszanin białek. Za opracowanie metody jonizacji przez desorpcję laserem przy udziale matrycy – MALDI (ang. *matrix assisted laser desorption ionisation*) – oraz za opracowanie wykorzystania elektrorozpylania – ESI (ang. *electrospray*) – w procesie jonizacji przyznano w 2002 roku Nagrodę Nobla. Otrzymali ją Koichi Tanaka i John Fenn.

Zasada działania spektroskopii mas jest oparta na pomiarze stosunku masy do ładunku elektrycznego danego jonu. Spektroskop odchyła strumień jonów w polu magnetycznym lub elektrycznym. Budowa wszystkich spektroskopów oparta jest na tych samych zasadach. Urządzenie musi posiadać jonizator, w którym następuje jonizacja badanej próbki. Jonizator jest najważniejszym elementem urządzenia, ciągle udoskonalanym. Drugim elementem jest analizator, w którym w próżni pod wpływem pola magnetycznego lub elektrycznego zachodzi rozdział jonów w zależności od ich masy. Trzecim – detektor, który te jony zlicza. Wynikiem analizy jest widmo masowe. Jest to wykres (przykłady są zamieszczone w części „Wyniki”), gdzie na osi poziomej są wykazane wartości masy do ładunku, a na osi pionowej podano liczbę zarejestrowanych jonów. Jednostką stosunku masy do ładunku jest 1 thomson, gdzie 1 Th = 1 dalton. Zliczanie jonów jest bardzo proste, jeśli założy się, że jedna cząstka białka zostanie zjonizowana jednokrotnie – przez przyłączenie elektronu lub protonu. Takie zjawisko jest bardzo pożądane, ponieważ pozwala na dokładne zliczanie jonów, ale jednocześnie powoduje konieczność używania analizatorów o bardzo dużych zakresach, odpowiednich zarówno dla bardzo małych cząstek białka, jak i dla tych, których masa wynosi kilkaset tysięcy daltonów. Kilkakrotna jonizacja badanych białek powoduje, że ich masy zostaną podzielone przez ilość niesionych jonów i należy znać tę ilość, ale analizator może mieć mniejszy zakres.

W badaniach proteomicznych próbek biologicznych, które zawierają bardzo liczne proteiny, najbardziej istotną i pożądaną cechą jonizacji jest wybór takiej metody, która nie powoduje ich fragmentacji białek. Wykorzystuje się w tym celu elektrorozpylenie lub technikę desorpcji laserowej z udziałem matrycy – MALDI. Metoda ESI polega na wprowadzeniu do jonizatora mieszaniny białek w roztworze wody oraz lotnego rozpuszczalnika w postaci aerozolu. Po zjonizowaniu próbki wysokim napięciem prądu następuje w komorze analizatora, w próżni, odparowanie rozpuszczalników i finalnie zostaje pojedyncza cząstka białka z wielokrotnym ładunkiem elektrycznym. Liczba przyłączonych protonów zależy od liczby zasadowych aminokwasów w próbce. W technice MALDI białko jest jonizowane światłem laserowym (fotony) na matrycy. Matrycami są małe cząstki organiczne – pochodne kwasu cynamonowego (np. kwas sinapinowy, kwas cyjanohydroksycynamonowy), które są wzbudzone fotonami i przekazują część energii cząsteczkom białka. Białko może przyłączyć proton (H^+) lub małe

kationy (K^+ , Na^+). W zależności od przyłączonego protonu lub kationu badane białko ma różną masę cząsteczkową i analizując widmo, należy wziąć to pod uwagę [11]. Analiza widma zanieczyszczonego jest trudniejsza do interpretacji. Także analizatory są różnego typu; w badaniach proteomicznych najczęściej stosowany jest analizator czasu przelotu – TOF (ang. *time of flight*). Czas przelotu jest zależny od prędkości jonu, a ta – uzależniona od jego masy. Detektory w różny sposób rejestrują i zliczają sygnały elektryczne zjonizowanych substancji badanych. Uzyskanie widma wymaga obróbki informatycznej. Stosuje się algorytmy wygenerowane na podstawie wcześniejszej kalibracji detektorów.

Spektroskopia mas to technika, która pozwala oceniać skład skomplikowanych mieszanin zawierających tysiące białek, ale też jest w stanie wykryć nawet śladowe ilości danego białka w zadanej mieszaninie. Jeśli znany jest ładunek jonu, spektroskopia pozwala na obliczenie masy cząsteczki z dokładnością do pojedynczych atomów. Informuje także o liczbie jonów obecnych w próbce, czyli pośrednio informuje o stężeniu danego białka. Niestety, nie identyfikuje struktury białka. Jeśli znamy masę cząsteczkową danego białka, to łatwo można określić jego ilość w stosunku do innych białek, czyli określić wzajemne proporcje. Jeśli masa cząsteczkowa nie jest znana, można zastosować sekwencjonowanie i zidentyfikować dane białko. Wykorzystuje się do tego celu dane zawarte w bibliotekach proteomicznych. Znamy wiele uzyskanych w ten sposób protein, jednak ich funkcja w organizmie jest często nieznana.

Uzyskanie rozdziału mieszaniny białek na spektrometrze pozwala poddać je dalszej analizie w celu ustalenia ich składu aminokwasowego. Po trawieniu, najczęściej trypsyną (rozrywa wiązanie po lizynie i argininie), fragmenty poddawane są dalszej analizie w spektrometrze i korzystając z bibliotek, łatwo można ustalić sekwencję aminokwasów [12]. Istnieją również urządzenia z podwójnym analizatorem, które jednocześnie analizują skład białkowy i aminokwasowy.

Spektroskopia mas ma również wiele wad, a ściślej mówiąc, są z nią związane liczne problemy metodyczne, których nie udało się dotychczas rozwiązać. Brak jednolitej standaryzacji metod pomiędzy laboratoriami uniemożliwia bezpośrednie porównanie wyników. Nie udało się także opracować dobrej metody usuwania z surowicy znanych, dużych białek, takich jak albuminy i globuliny, które stanowią ponad połowę wszystkich białek surowicy. Wiadomo też, że obecność albumin może fałszować wynik badania, ponieważ niektóre małe proteiny są transportowane, czyli połączone z albuminami. Kolejnym problemem jest analiza widma. Każda analiza spektrometryczna zawiera bardzo duże ilości danych, których zbadanie wymaga stosowania wysoko zaawansowanych metod matematycznych. Metodyki analityczne widma również nie są wystandaryzowane.

Podstawową zaletą metody jest szybkość analizy, wysoka czułość oraz niski koszt pojedynczego oznaczenia (oprócz kwasu cynamonowego nie wymaga żadnych odczynników).

1.1.2. ZASTOSOWANIE BADAŃ PROTEOMICZNYCH W PRAKTYCE KLINICZNEJ

Cele badań proteomicznych to odkrycie proteomu człowieka oraz odkrycie różnic pomiędzy proteomem fizjologicznym i proteomem związanym z chorobą, badanie związków pomiędzy proteomicznym stanem zdrowia i choroby, a także poznawanie reakcji proteomu na stosowane leczenie. Pierwsze publikacje sugerujące możliwość zastosowania analizy proteomicznej do spersonalizowanego leczenia datują się na rok 1998 [13]. Pierwsze doświadczenia, w których analizowano proteom komórek „wykrojonych” z tkanki metodą mikrodysekcji laserowej i potem rozdzielono elektroforetycznie, przeprowadzono w 1999 roku [14]. Także w 1999 roku opublikowano opis metody spektroskopii mas (MALDI-TOF) wraz z oprogramowaniem jako metody mogącej służyć do identyfikacji białek [15]. Pierwszą identyfikację białek charakterystycznych dla nowotworu złośliwego przeprowadzoną za pomocą spektroskopu mas opisano w 1999 roku dla linii komórkowej raka wątroby [16]. W badaniu zasugerowano przydatność badań proteomicznych do stworzenia „odcisku palca” (ang. *fingerprint*) nowotworu złośliwego. Jak wiadomo, nie udało się tego osiągnąć do dnia dzisiejszego. W proteomice klinicznej takie możliwości pojawią się, jeśli zostaną zbadane i sklasyfikowane białka obecne w dużo bardziej dostępnych, także seryjnym ocenom, surowicy, osoczu czy nawet moczu (peptydy, aminokwasy) osób zdrowych i chorych. Czasopismo „Proteomics”, które upowszechnia kolejne osiągnięcia proteomiki, rozpoczęło działalność w 2001 roku. Pierwsze doniesienie o wykorzystaniu spektroskopii masowej do różnicowania białek dwóch linii komórkowych nowotworu kobiecych narządów płciowych – raka jajnika – ukazało się właśnie w przywołanym wyżej czasopiśmie [17].

1.2. RAK BŁONY ŚLUZOWEJ TRZONU MACICY

Nowotwór ten występuje także pod nazwą: rak endometrium (EC) (łac. *carcinoma endometrii*, ang. *endometrial carcinoma*). Jest to najczęściej rozpoznawany nowotwór narządów płciowych u kobiet w krajach rozwiniętych i drugi (po raku szyjki macicy) w krajach rozwijających się [18, 19]. W Polsce w 2015 roku odnotowano 6242 zachorowania i 1688 zgonów (27%) [20]. Ilość zachorowań rosła od wielu lat na całym świecie. To zjawisko jest związane przede wszystkim z rosnącą długością życia kobiet. Klasycznie wyróżnia się dwa typy raka endometrium [21]:

- o typ I – dotyczy około 80% chorych, histologicznie jest to rak endometrialny (*carcinoma endometrioides, adenocarcinoma endometrioides*) w I lub II stopniu złośliwości (G1, G2), wykazujący ekspresję receptorów estrogenowych, poprzedzany często przez rozrost gruczołowy endometrium z atypią; rokowanie dla chorych jest dobre [22];
- o typ II – dotyczy 20% chorych, o endometrialnej lub nieendometrialnej histologii (*carcinoma: serosum, clear cell, mucinosum, squamosum, transitional cell, mesonephroides, undifferentiated*), o wysokiej złośliwości (G3), raczej nie wykazuje ekspresji receptora estrogenowego, brak jest zdefiniowanych stanów przedrakowych, rokowanie jest znacznie gorsze w porównaniu do typu I [22].

1.2.1. CZYNNIKI RYZYKA

Podstawowym czynnikiem ryzyka raka typu I jest długotrwała ekspozycja na endogenne lub egzogenne estrogeny bez równoważącego działania gestagenów. Do czynników ryzyka zaliczamy także: otyłość, długotrwałe zaburzenia hormonalne, brak przeżytych ciąż, cukrzycę i nadciśnienie. Otyłość jest najsilniejszym czynnikiem ryzyka zachorowania [23]. Patomechanizm związany jest z endogennym hiperestrogenizmem spowodowanym przez konwersję androstendionu do estronu oraz aromatyzację androgenów do estradiolu, które zachodzą w adipocytach. Każde zwiększenie BMI (ang. *body mass index*) o 5 kg/m² powoduje statystycznie zwiększenie ryzyka o ponad połowę (RR = 1,59) [24]. Podobny patomechanizm dotyczy endogennych zaburzeń hormonalnych, które doprowadzają do względnego hiperestrogenizmu. Należą tutaj głównie cykle

anowulacyjne, które występują zarówno w zespole policystycznych jajników, jak i przy wczesnym rozpoczęciu i późnym zakończeniu miesiączkowania. Także długotrwałe stosowanie tamoksifenu zwiększa ryzyko zachorowania, nawet po zaprzestaniu jego przyjmowania [25]. Cukrzyca typu II jest niezależnym czynnikiem ryzyka, bez względu na współistnienie z otyłością. Także nadciśnienie stanowi samodzielny czynnik ryzyka, choć współistniejąca otyłość je zwiększa. Znana jest też dziedziczna predyspozycja do zachorowania na raka endometrium, jaką jest zespół Lyncha. U kobiet z dziedzicznymi autosomalnymi, dominującymi mutacjami w genach naprawy DNA rak błony śluzowej trzonu macicy to najczęściej po raku jelita grubego występujący nowotwór. Ocenia się, że chore z zespołem Lyncha stanowią od 2 do 5% wszystkich chorych na raka endometrium [26]. Sugeruje się, że także nosicielki mutacji w genach BRCA są w grupie zwiększonego ryzyka zachorowania na raka endometrium (RR = 2,65) [27]. Dotyczy to nie tylko kobiet chorych na raka piersi leczonych tamoksifenem. Nadmierne spożywanie alkoholu zwiększa ryzyko zachorowania. Czynniki protekcyjnymi są: używanie antykoncepcji hormonalnej (dwuskładnikowej lub progestagennej), ciąża przeżyta w późniejszym wieku, długotrwałe karmienie piersią, palenie papierosów oraz aktywność fizyczna [28, 29]. Na raka typu I chorują przede wszystkim kobiety po menopauzie, chociaż spotyka się go też u kobiet młodszych, głównie otyłych, z zaburzeniami cyklu miesiączkowego (cykle anowulacyjne).

Chore z typem II raka endometrium stanowią od 10 do 20% przypadków tej choroby, ale powoduje ona 40% zgonów wśród chorych [30]. Rak surowiczy w 70%, a rak jasnokomórkowy w 50% są rozpoznawane w stopniu FIGO III i IV [31]. Czynniki ryzyka rozwoju raka typu II nie są już tak jednoznacznie poznane, jak w przypadku raka typu I, choć niektóre są wspólne. W dużym badaniu norweskim wykazano, że wiek kobiet chorych na oba typy jest podobny (65 lat), otyłość to też czynnik ryzyka dla typu II, choć w mniejszym stopniu [32]. Sugeruje się, że istnieje związek pomiędzy rakiem surowiczym i nosicielstwem mutacji w BRCA, ale nie wykazano wpływu przyjmowania tamoksifenu na rozwój raka typu II [33].

1.2.2. PATOGENEZA I HISTOLOGIA

Jak wspomniano, rak endometrialny (*carcinoma endometrioides*) powstaje wskutek hiperstymulacji estrogennej. Stanowi 75–80% rozpoznawanych przypadków raka błony śluzowej trzonu macicy. Może być poprzedzony przez stan przedrakowy, jakim jest rozrost gruczołowy [34]. Większość raków endometrial-

nych wykazuje ekspresję receptorów estrogenowych i progesteronowych. Zgodnie z klasyfikacją FIGO, biorąc pod uwagę atypię jądrową oraz architekturę guza, wyróżnia się trzy stopnie złośliwości raka:

- G1 – mniej niż 5% tkanki wykazuje utkanie lite,
- G2 – 6–50% wykazuje lite utkanie,
- G3 – ponad 50% guza jest lite [34].

Klasyfikacja ta nie uwzględnia obecności lub nieobecności inwazji do naczyń krwionośnych lub/i limfatycznych, które mogą pojawić się w stopniu G1 i I stopniu zaawansowania wg FIGO. Występowanie komórek nowotworowych w naczyniach może świadczyć o obecności przerzutów. W tkance raka endometrialnego zidentyfikowano liczne zaburzenia genetyczne. Inaktywacja genu *PTEN* jest prawdopodobnie pierwszym zdarzeniem genetycznym, które może zapoczątkować karcinogenezę w endometrium [35]. Świadczy o tym brak ekspresji *PTEN* w komórkach wewnątrz nabłonkowej neoplazji endometrium (EIN – ang. *endometrium intraepithelial neoplasia*) oraz w komórkach rozrostu z atypią [36]. Inne zmiany genetyczne obejmują mutacje w genach *KRAS*, *ARID1A*, *PIK3CA* i *CTNNB1* oraz niestabilność mikrosatelitarną. Niestabilność mikrosatelitarna dotyczy około jednej trzeciej raków endometrialnych i jest spowodowana inaktywacją (poprzez hipermetylację) genu *MLH1*. Jest szczególnie widoczna w zespole Lyncha [37]. Mutacje *P53* w raku endometrialnym spotykane są rzadko i występują prawie zawsze tylko w rakach G3 [38].

Rak śluzowy endometrium (*carcinoma mucinosum*) zostaje rozpoznany, gdy ponad 50% komórek nowotworu stanowią komórki wydzielające śluz [34]. Stwierdza się go rzadko. W raku śluzowym często rozpoznaje się zmutowany gen *KRAS*. Raki endometrialne i śluzowe zaliczamy do typu I raka endometrium, większość z nich zostaje wyleczona.

Raki typu II, do których zaliczamy raka surowiczego (*carcinoma serosum*), jasnokomórkowego (*carcinoma clarocellulare*) oraz mięsakoraka (*carcinosarcoma*), charakteryzują się inną patogenezą, obrazem klinicznym i rokowaniem. Nie powstają one na skutek estrogennej hiperstymulacji i w związku z tym nie wykazują ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych [39].

Rak surowiczy stanowi 10% raków błony śluzowej trzonu macicy [34]. Biologia tego nowotworu jest różna w porównaniu do raka endometrialnego. Występuje u starszych kobiet w atroficznym endometrium. Stanem przedrakowym dla raka surowiczego jest rak wewnątrz nabłonkowy (EIC – ang. *endometrial intraepithelial carcinoma*), w którym obserwuje się mutacje genu *P53* [40]. Rak surowiczy endometrium może być obecny w błonie śluzowej macicy, ale także może występować pod postacią wielu guzów obecnych na otrzewnej, podobnie jak rak jajnika [41]. Guzy surowicze naciekają mięśniówkę macicy wielogniskowo

i szybko rozprzestrzeniają się drogą naczyń chłonnych i krwionośnych. Atypia komórkowa jest wyraźnie widoczna. Tkanka guza wykazuje silny potencjał proliferacyjny, indeks Ki67 jest wysoki. W badaniach immunohistochemicznych rak surowiczy wykazuje nadekspresję białka P53, wysoki stopień aneuploidii, zmiany w białku P16 oraz amplifikację receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu 2 (HER2 – ang. *human epidermal receptor 2*) [41–43].

Rak jasnokomórkowy stanowi mniej niż 5% wszystkich raków błony śluzowej macicy [34]. Opisano stan przedrakowy, podobnie jak w raku surowiczym. W badaniach immunohistochemicznych często nie wykazuje ekspresji receptorów estrogenowych oraz progesteronowych. Mutacje P53 są spotykane rzadziej niż w raku surowiczym [44]. Może wykazywać ekspresję napsyny A, która jest dobrym czynnikiem różnicującym tę formę raka endometrium. Rokowanie nie jest pomyślne.

Mięsakorak stanowi mniej niż 5% raków endometrium. Najczęściej występuje pod postacią polipa wypełniającego całą jamę macicy. Posiada złośliwą komponentę nabłonkową oraz podścieliskową. Jego biologia jest słabo poznana. Jest złośliwym nowotworem o złej prognozie.

Raki: mieszany (*mixed*), niezróżnicowane (*undifferentiatum*), neuroendokrynny występują w endometrium sporadycznie.

1.2.3. TYPY GENOMICZNE

Na podstawie danych z „The Cancer Genome Atlas” (TCGA) raki endometrium zakwalifikowano do czterech dużych genomicznych grup [38]. Badania, które umożliwiły wyodrębnienie wymienionych typów genomicznych, przeprowadził zespół Goebel i wsp. Zbadano 373 guzy złośliwe endometrium o różnej histologii [45].

Grupa polimerazy DNA ϵ (akronim: **POLE**) – **wysoko zmutowana**; polimeraza DNA ϵ (zwana polimerazą korektorską) zajmuje się syntezą nici wiodącej oraz odpowiada za sprawdzanie poprawności syntezy DNA i jej naprawę w przypadku stwierdzenia nieprawidłowości. DNA ϵ posiada aktywność egzonukleazy 3'–5'. Do tej grupy genomicznej należą raki endometrialne z dużą liczbą mutacji w domenie tej egzonukleazy, czego skutkiem jest brak możliwości korekty nieprawidłowej syntezy DNA. Mutacje w tej grupie są odpowiedzialne za około 6,6% wysoko zróżnicowanych raków endometrialnych i ponad 17% raków nisko zróżnicowanych [46]. Nowotwory należące do tej grupy występują u kobiet poniżej 60. roku życia; prognoza nie jest ustalona.

Grupa niestabilności mikrosatelitarnej (MSI) o wysokim indeksie mutacji.

W tej grupie mutacje występują w 21 genach, co prowadzi do zaburzeń w szlakach molekularnych RTK/RAS/ β -katenina (69,5%) oraz PIK3CA/PIK3R1-PTEN (95%). Bardzo często występuje także metylacja promotora genu *MLH1*, co prowadzi do zmniejszenia lub zahamowania jego ekspresji. Zmiany genetyczne stwierdzone w tej grupie są odpowiedzialne za 28,6% wysoko zróżnicowanych raków endometrialnych i 54,3% nisko zróżnicowanych. Mutacja genu *KRAS* była obserwowana u 35% guzów w tej grupie.

Grupa stabilności mikrosatelitarnej o niskim indeksie mutacji. Mutacje występują w 16 różnych genach. Najczęściej obserwuje się zaburzenia w szlaku molekularnym kinazy PI3K (92% badanych guzów), ale także częste są zmiany szlaku RTK/RAS/ β -kateniny (83%) i mutacje somatyczne w genie *CTNNB1* (52%). Do grupy tej należą przede wszystkim raki endometrialne wysoko zróżnicowane (60%). Rak endometrialny G3 stanowi tylko 8,7%, rak surowiczy – 2,3%, a 25% należy do raków mieszanych.

Grupa wysokiej liczby kopii – grupa surowicza. Do grupy należą raki z mutacjami somatycznymi w postaci duplikacji segmentów genomu i bardzo często mutacją genu supresyjnego P53 (90% guzów). Obserwuje się też amplifikację onkogenów *MYC* i *ERBB2*. Taki genotyp występuje u 97,7% raków surowiczych, u 75% mieszanych, u 19,6% endometrialnych G3 i tylko u 5% raków G1 [38].

Badania genomu raków endometrium dostarczyły wielu nowych informacji, jednak nie wiadomo, czy opisane wyżej mutacje są odpowiedzialne za brak produkcji danych białek, czy może produkowane jest białko нефункционалне.

1.2.4. KLASYFIKACJA KLINICZNA

Ideą każdej klasyfikacji nowotworu złośliwego było stworzenie takiego systemu, w którym odpowiednio postawiony stopień kliniczny wskazywałby na zaawansowanie choroby, określałby sposób leczenia oraz prognozę dla pacjenta. Klasyfikacja raka endometrium jest klasyfikacją FIGO (ang. Federation of Gynecology and Obstetrics) i przedstawia się następująco [34]:

Stopień I*		Nowotwór ściśle ograniczony do trzonu macicy
	IA*	Brak nacieku lub głębokość nacieku obejmuje <50% mięśniówki
	IB*	Naciek obejmuje ≥50% mięśniówki
Stopień II*		Nowotwór nacieka podścielisko szyjki macicy, ale nie wychodzi poza macicę**
Stopień III		Lokalne i/lub regionalne naciekanie
	IIIA	Rak nacieka surowicówkę macicy i/lub przydatki
	IIIB	Przerzuty do pochwy i/lub przymacic
	IIIC	Przerzuty do węzłów miednicy i/lub węzłów okołoaortalnych
	IIIC1*	Zajęte węzły chłonne miednicy
	IIIC2*	Zajęte węzły chłonne okołoaortalne z zajętymi lub nie węzłami chłonnymi miednicy
Stopień IV		Naciek pęcherza moczowego i/lub śluzówki odbytnicy, i/lub odległe przerzuty
	IVA	Naciek pęcherza moczowego i/lub śluzówki odbytnicy
	IVB	Przerzuty odległe, obejmujące przerzuty do narządów jamy brzusznej i/lub węzłów chłonnych pachwinowych

Dodatni wynik cytologii otrzewnowej nie zmienia klasyfikacji, powinien być jednak odnotowany

* Stopnie zróżnicowania histologicznego G1, G2, G3

** Naciekanie jedynie gruczołów szyjkowych powinno być klasyfikowane jako stopień I

Jest to klasyfikacja niedoskonała, nieoddająca w pełni całego spektrum obrazów klinicznych obserwowanych u chorych. Wiele chorych z rakiem nisko zaawansowanym wykazuje szybki rozsiew choroby. Niestety, nie potrafimy wyróżnić tej grupy i w klasyfikacji FIGO jest ona umiejscowiona w stopniu I. Diagnostyka wstępna może potwierdzić dwa elementy choroby, a mianowicie rodzaj histologiczny raka oraz stopień złośliwości (G), choć ten ostatni nie zawsze jest możliwy do określenia z wyskrobin z jamy macicy. Klasyfikacja FIGO jest klasyfikacją kliniczno-chirurgiczną. Niektóre jej składowe można potwierdzić badaniem klinicznym chorej: widoczne zajęcie szyjki macicy, nacieki w przymaciczach, jednak pełna kwalifikacja jest możliwa dopiero po badaniu histologicznym preparatu pooperacyjnego.

1.2.5. BIOMARKERY

Rak endometrium jest rozpoznawany u ponad 80% kobiet we wczesnym stadium zaawansowania, ponieważ pierwszym jego objawem jest nagle występujące krwawienie. U znacznej odsetka kobiet, szczególnie tych z zarośniętym z jakiegoś powodu kanałem szyjki macicy, krwawienie nie występuje i wczesne rozpoznanie nowotworu jest niemożliwe. Poszukiwania markerów biochemicznych raka endometrium rozwijały się równoległe z poszukiwaniami markerów innych nowotworów. Wiele różnych związków zostało zidentyfikowanych, lecz żaden z nich nie osiągnął wystarczającej czułości i swoistości, aby mógł być powszechnie wykorzystywany w praktyce klinicznej.

Antygen CA 125 osiąga czułość od 11 do 43% i jego stężenie jest proporcjonalne do wielkości guza, czyli stopnia zaawansowania, podobnie jak w raku jajnika. W rakach nisko zaawansowanych stężenie CA 125 jest prawidłowe. Najwyższe wartości zaobserwowano u chorych z chorobą rozsianą [47–49]. Oznaczanie stężenia CA 125 nie jest powszechnie stosowane w wykrywaniu raka endometrium ze względu na niewystarczającą czułość.

Kolejnym markerem, od niedawna obecnym w praktyce klinicznej, jest HE4 (ang. *human epididymis protein 4*) [50]. W I stopniu zaawansowania wg FIGO czułość HE4 jest o 17% wyższa w porównaniu do czułości CA 125. Podjęto także próby zastosowania tego białka do stratyfikacji ryzyka chorych na EC, szczególnie w celu wyróżnienia podgrupy wysokiego ryzyka z grupy obecnie klasyfikowanej jako grupa o niskim ryzyku. Wyróżnienie takiej grupy jest szczególnie istotne w aspekcie wskazań do limfadenektomii w czasie zabiegu operacyjnego i dalszego leczenia uzupełniającego [50].

Analizowano także użyteczność innych substancji mogących stać się markerami EC. Antygen CA 72-4 był podwyższony w surowicy u 22–32% chorych. Stężenie było wyższe w przypadkach głębokiego naciekania mięśniówki, obecności przerzutów do przydatków, naciekania przestrzeni naczyniowych oraz obecności przerzutów do węzłów chłonnych, czyli w chorobie rozsianej [51].

Badano także stężenie antygenu Fas (sFas – ang. *soluble Fas*) i stwierdzono znamiennie wyższe stężenia u pacjentek z zaawansowaną chorobą [52].

Korelacje ze stopniem zaawansowania i rozsiewem nowotworu wykazano także, badając stężenie MCSF1 (ang. *macrophage colony-stimulating factor 1*) [53]. Wyższe stężenia wiązały się ze złą prognozą u 25–73% chorych.

Żaden z tych biomarkerów nie jest jednak powszechnie używany w praktyce klinicznej ze względu na niedoskonałą czułość i swoistość.

1.2.6. LECZENIE

Leczenie EC polega na wycięciu macicy z przydatkami oraz wykonaniu w wybranych przypadkach limfadenektomii. Brak jest konsensusu w zakresie wskazań do limfadenektomii. Większość kobiet z rakiem ograniczonym do macicy ma bardzo dobre rokowanie i wykonywanie u nich limfadenektomii związane jest z generowaniem powikłań, a nie przynosi korzyści terapeutycznych [54]. Jednak w tej grupie – chorych z rakami nisko zaawansowanymi – są też kobiety (około 5%), u których w momencie rozpoznania istnieją przerzuty w węzłach chłonnych, co wskazuje na rozsiew choroby i w zasadzie leczenie operacyjne nie wyleczy choroby. Nie ma obecnie narzędzi biologicznych ani fizycznych, aby wyróżnić tę grupę chorych przed przystąpieniem do leczenia chirurgicznego. Badania obrazowe są niewystarczająco czułe i także na ich podstawie nie można wskazać chorych z przerzutami do węzłów. Zatem poszukiwania nowych markerów choroby rozsianej są kluczowym zadaniem w ginekologii onkologicznej. Lepsza kwalifikacja do leczenia pozwoliłaby, być może, osiągnąć wyższe wyniki 5-letnich przeżyć.

Leczenie operacyjne w raku nisko zaawansowanym z niewielką inwazją miometrium jest postępowaniem radykalnym i nie wymaga uzupełniającego napromieniania. Głęboka inwazja mięśnia macicy, nacieki w szyjce lub/i przymaciach, niski stopień zróżnicowania guza kwalifikują się do uzupełniającego leczenia radioterapią. W przypadku rozsiewu choroby zalecane są chemioterapia oraz hormonoterapia (w przypadkach raków receptorowo dodatnich).

1.2.7. ROKOWANIE

Rokowanie u chorych na EC zależy od wielu czynników: rodzaju histologicznego, stopnia złośliwości G, głębokości naciekania miometrium oraz obecności lub braku rozsiewu choroby poza macicę [55]. Jednak, jak wskazano wyżej, żadna z tych cech w pełni nie odpowiada za ostateczne rokowanie. Badania z ostatnich lat skupiają się na poszukiwaniu innych cech markerowych, które mogłyby dostarczyć danych do postawienia jednoznacznej prognozy co do przebiegu choroby. W 2010 roku wykazano, że surowicze stężenie amyloidu A, białka ostrej fazy, które jest produkowane przez komórki raka endometrium G3, może być czynnikiem prognostycznym EC [56]. Potencjalne jego zastosowanie w diagnostyce przedoperacyjnej oraz w monitorowaniu leczenia może wskazać chore ze złym rokowaniem. Badano także kombinację i wzajemne korelacje markerów

CA 125, CA 15-3 oraz CA 19-9. Ich wyższe stężenia wiązały się z gorszym rokowaniem [57]. W prognozowaniu nawrotów wykazano przydatność cząstki adhezyjnej L1 (L1 CAM – ang. *cell adhesion molecule*). Czulość markera w predykcji nawrotów wynosiła 92%, a w predykcji zgonu z powodu EC – 89% [58].

Powyższe substancje nie są jednak wykorzystywane w powszechnej praktyce klinicznej. Nadal poszukuje się markerów, które byłyby zdolne wyróżnić źle rokujące chore z grona kobiet z rakami rzeczywiście nisko zaawansowanymi oraz wskazać przed leczeniem operacyjnym pacjentki z rozsiewem choroby.

1.2.8. GENETYCZNE MARKERY ROZSIEWU

Powstawanie przerzutów jest skomplikowanym, rozłożonym w czasie procesem, w którym bierze udział wiele genów i białek. Obserwuje się intensywną proliferację komórek, utratę ich adhezyjności, migrację poprzez macierz międzykomórkową do naczyń chłonnych lub/i krwionośnych i w końcu kolonizację węzłów chłonnych bądź odległych organów. Uważa się, że ekspresja genów mających kluczowe znaczenie w powstawaniu przerzutów jest obecna w każdej komórce nowotworowej [59]. Zdefiniowano ekspresję siedemnastu genów, które świadczą o gotowości guzów litych do tworzenia przerzutów; ekspresja ośmiu z nich jest znacznie niższa, a dziewięć ulega nadekspresji. Uważa się, że wzajemne powiązania pomiędzy białkami będącymi produktami tych siedemnastu genów są niezbędne, aby doszło do uwolnienia komórki z guza i jej wędrówki w odległe miejsce. Cztery z genów o zmniejszonej ekspresji to geny biorące udział w procesach translacji. Fizjologicznie są odpowiedzialne za raportowanie prawidłowości procesów amplifikacji oraz hamowanie translacji genów biorących udział w proliferacji guza. Zaobserwowano także nadekspresję genu sekuryny, którego białko jest niezbędne w rozdziale chromatyn przy podziale komórki. Także nadekspresja COX-2 (cyklooksygenaza-2) odgrywa dużą rolę w powstawaniu przerzutów. Inhibitor tej cyklooksygenazy hamował proliferację oraz inwazję linii komórkowych EC [60].

1.2.9. BADANIA PROTEOMICZNE

Dotychczas opublikowano kilka artykułów, w których przedstawiono wyniki poszukiwań proteomicznego biomarkera EC [43, 60–64]. Jednak żaden z nich nie został dostatecznie zwalidowany, aby mógł być wykorzystany w praktyce klinicznej [65].

W 2014 roku wykazano, że proteina ANXA 2 może stanowić biomarker nawrotu raka błony śluzowej trzonu macicy [66]. Ustalono korelację *in vitro* i *in vivo* (na modelu mysim) pomiędzy ekspresją ANXA 2 a istniejącym potencjałem do powstawania przerzutów. Wykazano także w badaniu linii komórkowej EC, że istnieje związek czynnika transkrypcyjnego ERM/ETV 5 z inwazją nowotworu w miometrium. Poprzez wpływ ERM/ETV 5 na metaloproteinazę-2 komórki nabierają zdolności do migracji do mięśnia macicy [61]. Prowadzono również badania nad składem aminokwasowym próbek surowicy chorych na EC. Wykazano, że indeks aminokwasowy może być przydatny w przedoperacyjnej ocenie [67]. W badaniach Casado-Vela za pomocą techniki MALDI-TOF udało się uzyskać wzór 802 różnych protein charakterystycznych dla płynu pobranego ze zdrowego endometrium [68].

Badania te stanowią istotny krok naprzód w poznawaniu procesu karcinogenezy raka błony śluzowej endometrium. Jednak były prowadzone na liniach komórkowych lub w bardzo małych grupach chorych i autorzy zgodnie stwierdzają, że na obecnym etapie niemożliwe jest rekomendowanie markerów o wartości klinicznej.

1.3. BIOMARKERY ANGIOGENEZY

Neoangiogeneza, czyli tworzenie nowych naczyń w powstającym guzie nowotworowym, jest kluczowym procesem dla przeżycia tego guza. Umożliwia zaopatrzenie nowotworu w tlen oraz niezbędne do przeżycia mikro- i makroelementy. Uważa się, że potencjał tworzenia nowych naczyń w guzie determinuje powstawanie przerzutów [69, 70]. W warunkach fizjologicznych angiogeneza odbywa się w niewielu tkankach dorosłego organizmu, w macicy, jajnikach i tkankach uszkodzonych. W tworzenie się naczyń zaangażowanych jest wiele białek pro- i antyangiogennych [71]. Ich równowaga warunkuje wygasanie angiogenezy w warunkach fizjologicznych, gdy nie zachodzą procesy naprawcze w organizmie. Z procesem tym związana jest obecność różnorodnych czynników stymulujących wzrost guza. Są to białka, których rola w kancerogenezie jest coraz lepiej poznana i wiele z nich jest typowanych na biomarkery chorób nowotworowych. W tej grupie wymienić można następujące białka: rozpuszczalny receptor naskórkowego czynnika wzrostu, zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów, czynnik wzrostu hepatocytów, osteopontyna, płytkopochodny czynnik wzrostu, płytkowo-śródbłonkowe białko adhezyjne 1, czynnik komórek macierzystych oraz rozpuszczalne receptory 1 i 2 naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu [72].

Rozpuszczalny receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu (sEGFR – ang. *soluble epidermal growth factor receptor*) jest protoonkogenem i stanowi rozpuszczalny fragment zewnątrzkomórkowej domeny EGFR. Wykrywany jest w surowicy krwi chorych na wiele nowotworów [73]. Rodzina EGFR poprzez cztery homologiczne receptory kinazy tyrozynowej bierze udział w aktywacji szlaków molekularnych EGFR/ErbB1 (HER1), ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3) oraz ErbB4 (HER4) [74]. Znanych jest kilka izoform EGFR, które powstają na drodze alternatywnego splajsingu, prawdopodobnie o różnej roli biologicznej [75]. Mutacje prowadzące do nadekspresji lub zwiększonej aktywności EGFR mogą wpływać na rozwój nowotworu, a identyfikacja EGFR jako onkogenu doprowadziła do opracowania wielu leków przeciwnowotworowych skierowanych przeciwko temu receptorowi, zwanych inhibitorami EGFR [76, 77]. Jego rola w karcinogenezie nie jest do końca zdefiniowana. Uważa się, że może być uwalniany przez komórki guza do krwi lub przeciwnie, może odgrywać protekcyjną rolę w szlaku EGFR [78–80]. Rozpuszczalny fragment EGFR o masie 110 kDa jest obecny we krwi, ponieważ odłącza się od macierzystego błonowego białka o masie 170 kDa.

Stężenie EGFR w surowicy jest u zdrowych kobiet odwrotnie proporcjonalne do wieku [81]. Brak doniesień o jego ekspresji w raku endometrium.

Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (FGF-basic, FGF2 – ang. *basic fibroblast growth factor*) należy do rodziny ponad dwudziestu czynników wzrostu, które są aktywowane poprzez cztery receptory kinazy tyrozynowej. Interakcje liganda FGF z receptorem są modulowane przez heparynę lub proteoglikany. Fosforylacja prowadzi do uczynnienia szlaków molekularnych RAS-MAPK, PI3K-AKT, PLCy i STAT. FGF kontroluje procesy proliferacji, inwazji, powstawania przerzutów oraz angiogenezy [82, 83].

Osteopontyna (OPN – ang. *osteopontin*) jest glikoproteiną macierzy zewnątrzkomórkowej biorącą udział w procesach adhezji komórkowej, chemotaksji, angiogenezy oraz jest czynnikiem antyapoptotycznym [84]. Składa się z około 300 reszt aminokwasowych. Jest chemokiną należącą do rodziny SIBLING (ang. *small integrin binding ligand N-linked glycoprotein*). Na powierzchni komórek OPN wiąże się z izoformami CD44 oraz receptorami integrynowymi [85, 86]. Odgrywa także kluczową rolę w regulacji populacji macierzystych komórek hematopoetycznych, będąc głównym regulatorem ich cyklu komórkowego [87, 88]. Jej stężenie zwiększa się w ostrych i przewlekłych stanach zapalnych. Białko to bierze udział w powstawaniu kamieni nerkowych, w regulacji odpowiedzi immunologicznej na alergeny, wpływa również na progresję zmian miażdżycowych. Badania wskazują, że osteopontyna bierze udział w progresji nowotworów i że może pełnić funkcję biomarkera w prognozowaniu przebiegu różnych nowotworów i monitorowaniu ich leczenia [89, 90].

Prolaktyna jest hormonem peptydowym zbudowanym ze 198 aminokwasów o masie 23 kDa. Razem z hormonem wzrostu, laktogenem łożyskowym oraz proliferyną i białkiem zależnym od proliferyny, działając endokrynnie i parakrynnie, modeluje tworzenie nowych naczyń w warunkach fizjologicznych i w nowotworzeniu. W krążeniu jest spotykanych pięć podstawowych izoform prolaktyny [91]. Każda z nich wykazuje inne działanie w procesie angiogenezy. Działa stymulująco lub hamująco na różnych etapach formowania i remodelowania tworzących się naczyń: na etapie proliferacji komórek śródbłonna, ich migracji oraz apoptozy. Jej działanie jest mocno zależne od lokalnych warunków tkankowych i nie zostało dogłębnie poznane ze względu na odmienne zachowanie izoform prolaktyny w warunkach *in vitro* i *in vivo* [92].

Rozpuszczalny czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF – ang. *soluble vascular endothelial growth factor*) był jednym z pierwszych odkrytych czynników wzrostu [93]. W warunkach fizjologicznych bierze udział w rozwoju zarodkowym, formowaniu kości, jest czynnikiem niezbędnym w hematopoezie oraz w procesie gojenia się ran [94–96]. Rodzina czynników VEGF liczy sześć białek:

VEGF-A (pierwszy odkryty, nazywany też VEGF), łożyskowy czynnik wzrostu (ang. PGF – *placenta growth factor*), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E (kodowany przez wirusa) oraz VEGF-F (obecny w jadzie węży). Ekspresja VEGF-A powoduje zwiększenie proliferacji i migracji komórek endotelium, zwiększa aktywność zewnątrzkomórkowych metaloproteinaz, działa chemotaktycznie w stosunku do makrofagów i granulocytów oraz poprzez bezpośrednie działanie na tlenek azotu rozszerza naczynia [97]. Ekspresja VEGF-D jest odpowiedzialna za limfoangiogenezę. Znanych jest wiele izoform VEGF różniących się długością łańcucha aminokwasowego powstających w wyniku alternatywnego składowania jednego genu zbudowanego z ośmiu egzonów [98]. Wyróżnia się dwie grupy powstałych w ten sposób protein, które w zależności od położenia ostatniego egzonu działają proangiogenicznie lub antyangiogenicznie. Wszystkie powyższe czynniki wzrostu mają w swej budowie białkowej unikalny motyw węzła cystynowego. Podobną konfigurację posiadają inne czynniki wzrostu, co warunkuje przyłączanie do tej samej domeny receptora błonowego [99]. Wszystkie białka z rodziny ulegają fosforylacji, przyłączając się do receptorów kinaz tyrozynowych. Znanych jest kilka receptorów dla VEGF: *fms-like tyrosine kinase (flt-1)*, neuropilina 1, neuropilina 2 oraz KDR (ang. *kinase insert domain receptor*) [100, 101]. Synteza VEGF jest też stymulowana przez hipoksję, gdzie czynnik indukowany hipoksją (HIF – ang. *hypoxia induced factor*) jest czynnikiem transkrypcyjnym [102, 103]. Niedotlenienie i nadekspresja HIF stymulują uwalnianie VEGF. Nadekspresja ufosforylowanego receptora VEGF jest obserwowana prawie we wszystkich nowotworach złośliwych i jest związana z progresją guzów [104]. Terapie biologiczne oparte na przeciwciałach przeciwko VEGF są stosowane w leczeniu między innymi raka jajnika, jelita grubego oraz szyjki macicy.

Czynniki wzrostu płytek AB i homodimer BB (PDGF-AB/BB – ang. *platelet-derived growth factor AB and BB*) należy do rodziny czynników wzrostu, które biorą udział w angiogenzie. PDGF BB jest homodimerem z motywem węzła cystynowego, co pozwala mu na przyłączanie się do tego samego receptora co VEGF. Synteza PDGF następuje na skutek stymulacji przez trombinę, ale także wpływ mają hipoksja lub inne czynniki wzrostu albo chemokiny [105]. PDGF przyspiesza podział fibroblastów poprzez wpływ na cykl komórkowy i pominięcie fazy G1. Wśród innych czynników wzrostu PDGF wyróżnia się wpływem na migrację komórek, co jest istotnym elementem procesu powstawania przerzutów [106].

Folistatyna (FST – ang. *follicle-stimulating factor*) jest glikoproteiną. Znane są trzy jej izoformy o różnej długości łańcucha aminokwasowego: FST 288, FST 300 i FST 315. Łańcuch aminokwasowy, podobnie jak inne czynniki wzrostu, tworzy przestrzenny motyw węzła cystynowego [107]. Poprzez interakcję z czynnikami wzrostu rodziny TGFβ jest czynnikiem biorącym udział w powstawaniu guzów nowotworowych, tworzeniu

przerzutów oraz związanej z tym angiogenezie [108]. FST jest częścią układu aktywiny – folistatyna. Odgrywa rolę funkcjonalnego antagonisty aktywiny i razem, lokalnie, kontrolują wzrost i różnicowanie się komórek oraz apoptozę w różnych tkankach [109]. W komórkach endotelium FST działa w sposób autokryny, uwalniając komórki spod wpływu aktywiny, która hamuje ich proliferację. Nadekspresja FST jest czynnikiem wzrostu pobudzającym wzrost nowych naczyń [110].

Antygen Her2/neu (HER2 – ang. *human epidermal growth factor receptor 2*) jest receptorem naskórkowego czynnika wzrostu i należy do rodziny czterech receptorów czynników wzrostu łączących się z domeną kinazy tyrozynowej. Her2 tworzy często dimery z innymi receptorami z tej grupy, co prowadzi do autofosforylacji i połączenia z domeną cytoplazmatyczną kinazy tyrozynowej. To zaś inicjuje szlaki molekularne kinazy MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinase*), PI3K/Akt (ang. *phosphoinositide 3-kinase*), fosfolipazy 3, kinazy proteinowej c oraz STAT (ang. *signal transducer and activator of transcription*) [111]. Łatwej dimeryzacji ulegają też zmutowane receptory. Punktowa mutacja pod postacią zamiany waliny na kwas glutaminowy powoduje bezpośrednie łączenie się dimeru z domeną transbłonową, co aktywuje w sposób ciągły szlaki odpowiedzialne za rozwój szybko proliferujących nowotworów [112]. Możliwość aktywacji wielu szlaków czyni z Her2/neu jeden z podstawowych przekaźników w neogenezie. Amplifikacja Her2/neu została najlepiej zbadana w raku piersi, gdzie nadekspresja związana jest ze złym rokowaniem [113, 114].

Podjednostka α rozpuszczalnego receptora interleukiny 6 (s-IL-6Ra – ang. *soluble interleukin 6 receptor α*) w połączeniu z interleukiną 6 bierze udział w mediacji procesów zapalnych oraz w proliferacji i różnicowaniu się komórek. Receptor po połączeniu się z IL-6 tworzy homodimer wchodzący w reakcję z kinazą tyrozynową i aktywuje w ten sposób czynniki transkrypcyjne STAT1 i STAT3. Rozpuszczalny receptor IL-6 stanowi zewnątrzkomórkową domenę receptora i powstaje przez jego proteolityczne odcięcie (izoforma PC-sIL-6R) lub przez alternatywny splicing (izoforma DS-sIL-6R). Wykazano, że połączenie sIL-6R z ligandem powoduje w komórkach efekt przeciwny do IL-6. Stężenie podjednostki α sIL-6R było dotychczas badane w niewielu nowotworach. Jest podwyższone w raku piersi i szpiczaku. W raku trzustki stężenie nie różni się od tego u osób zdrowych [115].

Rozpuszczalny receptor kinazy tyrozynowej dla angiopoetyny (sTIE-2) wykazuje ekspresję w komórkach endotelium oraz komórkach progenitorowych szpiku [116]. Angiopoetyny są czynnikami wzrostu odpowiedzialnymi za neowaskularyzację. Sygnał przyłączenia angiopoetyny 1 do domeny receptora sTIE-2 powoduje uruchomienie szlaków molekularnych odpowiedzialnych na integralność komórek śródbłonna z komórkami periendotelialnymi [117]. Z kolei angio-

poetyna 2 blokuje transdukcję sygnału, co prowadzi do rozpadu wiązań angio-poetyny 1 z s-TIE2, w wyniku czego dochodzi do destabilizacji komórek endotelium i ich podatności na czynniki mitogenne, głównie czynniki wzrostu. To z kolei warunkuje rozpoczęcie procesu neoangiogenezy [118]. Stężenia angiopeoty 2 i s-TIE1 są czynnikami prognostycznymi w ostrej białaczkę szpikowej (AML – ang. *acute myelosis leucemia*) [119].

Leptyna jest fizjologicznie produkowana w adipocytach, ale jej ekspresję wykrywa się także w wielu innych komórkach, także w komórkach nowotworowych. Białko liczy 167 aminokwasów [120]. Połączenie leptyny z jej receptorami (Ob-Ra do Ob-Rf, powstają na skutek alternatywnego splajsingu) aktywuje szlak molekularny odpowiedzialny za transkrypcję (JAK/STAT), który z kolei powoduje aktywację kinazy fosfatydyloinozytolu (PI3K), który odpowiada za promocję proliferacji komórek, ich migrację i inwazję [121, 122]. Uruchomienie szlaków PI3K/AKT oraz ERK1/2 zwiększa ekspresję białek antyapoptotycznych (np. XIAP), promuje ekspresję czynników angiogenetycznych (VEGF) oraz indukuje ekspresję czynnika hipoksji (HIF-1a), co powoduje proliferację, migrację oraz nieograniczone przeżycie komórek nowotworowych [123, 124]. Potwierdzono rolę leptyny w nowotworzeniu w raku jelita grubego, raku endometrium, raku piersi, tarczycy, wątroby i, prawdopodobnie, także w innych nowotworach.

Płytkowo-śródłonkowe białko adhezyjne 1 (PECAM-1 – ang. *platelet endothelial cell adhesion molecule-1*) jest glikoproteiną błonową, której ekspresja została potwierdzona w komórkach endotelium, trombocytach oraz leukocytach. Jego rola polega na wiązaniu ze sobą komórek śródłonka. Jest zaangażowane w migrację leukocytów, angiogenezę i aktywację integrzyn.

Czynnik komórek macierzystych (SCF – ang. *stem cell factor*) jest cytokiną hemopoetyczną, która może występować jako białko transbłonowe lub rozpuszczalne [125, 126]. Pełni ważną funkcję w proliferacji i przeżyciu pluripotencjalnych komórek prekursorowych. Głównym źródłem SCF jest szpik kostny.

Czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów (G-CSF – ang. *granulocyte colony stimulating factor*) jest hemopoetycznym czynnikiem wzrostu. Jest glikoproteiną stymulującą szpik kostny do produkcji granulocytów i komórek macierzystych [127]. Oprócz swojej roli w systemie krwiotwórczym G-CSF działa również na komórki nerwowe jako czynnik neurotroficzny. Rekombinowana forma G-CSF jest wykorzystywana w leczeniu i profilaktyce gorączki neutropenicznej.

Czynnik wzrostu hepatocytów (HGF – ang. *hepatocyte growth factor*) jest białkiem regulującym wzrost komórek, ruchliwość komórek i morfogenezę. Ta wielofunkcyjna cytokina bierze udział w procesach angiogenezy, karcinogenezy i regeneracji tkanek. Przyczynia się do progresji nowotworu w wielu różnych tkankach, a także do powstawania przerzutów nowotworowych [128, 129].

2. CEL BADAŃ

Celem badań było zastosowanie nowoczesnej i złożonej strategii analityczno-bioinformatycznej w analizie białek endogennych w surowicy w poszukiwaniu biomarkerów o wartości diagnostycznej i różnicującej u chorych na raka endometrium.

Cel realizowano poprzez:

- 1) badanie proteomiczne surowicy chorych na raka endometrialnego endometrium; celem badania było poszukiwanie profilu peptydowego charakteryzującego chorobę w zakresie mas od 1000 do 10 000 Da;
- 2) identyfikację znalezionych peptydów, dokonaną na podstawie bibliotek proteomicznych;
- 3) ocenę stężeń białek biorących udział w procesach angiogenezy w surowicy chorych na raka endometrium;
- 4) korelację cechy klinicznej stopnia złośliwości nowotworu chorych na raka endometrium z ekspresją białek zaangażowanych w proces angiogenezy.

3. MATERIAŁ I METODYKA

3.1. MATERIAŁ

3.1.1. GRUPA BADANA

Do badania włączono surowice pobrane od 176 chorych na nowotwór złośliwy macicy leczonych w Klinice Ginekologii i Położnictwa Klinicznego Szpitala Wojewódzkiego nr 1 im. Fryderyka Chopina w Rzeszowie w latach 2016–2017. Średni wiek chorych wynosił 64 lata. Krew pobierano od chorych z uzyskanym na drodze biopsji przed leczeniem operacyjnym rozpoznaniem raka endometrium. Kryterium włączenia do badania stanowiło rozpoznanie raka endometrialnego endometrium (EC). Surowice ponumerowano kolejno od 1 do 176. W profilowaniu białkowo-peptydowym wykorzystano 125 surowic, resztę odrzucono, ponieważ po wstępnym przygotowaniu próbki nie nadawały się do dalszych analiz. Do badania panelu markerów angiogenezy ze 125 próbek wybrano kolejno 25 próbek raka endometrialnego G1, 25 próbek raka G2 i 24 próbki raka G3. Tabela zawierająca opis próbek wykorzystanych w badaniu znajduje się w „Aneksie” rozprawy.

3.1.2. GRUPA KONTROLNA

Pobrano surowice od 45 pacjentek po menopauzie operowanych z powodu nietrzymania moczu oraz zaburzeń statyki narządów płciowych. Żadna z nich nie miała w wywiadzie choroby nowotworowej. Średni wiek kobiet z grupy kontrolnej wynosił 66,4 roku.

Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Okręgowej Izby Lekarskiej w Rzeszowie nr 90/B/2016.

3.2. METODYKA

Badania wykonano w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Ze względu na stosowanie w badaniach różnych metod każdą opisano osobno.

3.2.1. WYKAZ ODCZYNNIKÓW

1) Profilowanie białkowo-peptydowe:

- o matryca – kwas α -cyano-4-hydroksycynamonowy (Bruker Daltonics, Niemcy),
- o mieszanina wzorców do kalibracji: Peptide Calibration Standard oraz Protein Calibration Standard I (Bruker Daltonics, Niemcy),
- o kwas trifluorooctowy (Sigma Aldrich, USA),
- o diwodorofosforan amonu (Sigma Aldrich, USA),
- o acetonitryl (J.T. Baker, USA),
- o izopropanol (J.T. Baker, USA).

2) Identyfikacja wybranych sygnałów m/z:

- o matryca – kwas α -cyano-4-hydroksycynamonowy (Bruker Daltonics, Niemcy),
- o mieszanina wzorców do kalibracji: Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics, Niemcy),
- o kwas trifluorooctowy (Sigma Aldrich, USA),
- o diwodorofosforan amonu (Sigma Aldrich, USA),
- o acetonitryl (J.T. Baker, USA),
- o izopropanol (J.T. Baker, USA).

3) Oznaczanie panelu białek procesu angiogenezy:

- o zestaw Bio-Plex Pro Human Cancer Biomarker Panel 1 (16-plex) (Bio-Rad, USA) zawierający następujące odczynniki: wzorce oznaczanych białek, roztwór kulek magnetycznych, biotynylowane przeciwciała, koniugat streptoawidyny i fikoerytryny, roztwory do rozcieńczania: wzorców, próbek, przeciwciał; bufony do analizy i przepłukiwania płytki, kontrole zawierające białka w wysokim oraz niskim stężeniu,
- o zestaw do kalibracji czytnika płytek MAGPIX Calibration Kit (Bio-Rad, USA),
- o zestaw do potwierdzenia poprawnej kalibracji czytnika płytek MAGPIX Performance Verification Kit (Bio-Rad, USA) zawierający następujące odczynniki: roztwory mikrosfer MAGPIX Verifier, MAGPIX Fluidics 1 oraz 2.

3.2.2. PROFILOWANIE PEPTYDOWO-BIAŁKOWE Z WYKORZYSTANIEM SPEKTROMETRII MALDI-TOF-MS

Oczyszczanie i zagęszczanie próbek surowicy krwi techniką SPE C18

Próbki surowicy krwi pochodzące od pacjentek ze zdiagnozowanym EC (grupa badana) i od osób zdrowych (grupa kontrolna) zostały zatężone i oczyszczone przy zastosowaniu techniki ekstrakcji do fazy stałej (SPE – ang. *solid phase extraction*) z wykorzystaniem końcówek do pipet typu ZipTip (Millipore, MA) i wypełnione złożem C18. Złoże to kondycjonowano poprzez dwukrotne przepłukanie końcówki ZipTip, w pierwszej kolejności 100% acetonitrylem oraz następnie 0,1% roztworem kwasu trifluorooctowego (TFA). Próbki surowicy krwi przed procedurą oczyszczania zostały rozcieńczone 0,1% roztworem kwasu trifluorooctowego w wodzie w stosunku 1:5, a następnie wprowadzane na złożo C18 poprzez dziesięciokrotne przepuszczenie roztworu przez końcówkę ZipTip. Kolejno złożo przemyto, wykorzystując 0,1% roztwór kwasu trifluorooctowego w wodzie. Zaadsorbowaną frakcję peptydów eluowano za pomocą 4 μ l 50% roztworu acetonitrylu, trzykrotnie przepuszczając roztwór przez złożo.

Przygotowanie matrycy kwasu α -cyjano-4-hydroksycynamonowego do analizy MALDI-TOF-MS

Przygotowano roztwór HCCA o stężeniu 0,7 mg/ml, który pełnił funkcję matrycy do profilowania MALDI-TOF-MS surowicy krwi. W tym celu odważono 0,7 mg kwasu α -cyjano-4-hydroksycynamonowego i rozpuszczono w 1 ml roztworu zawierającego: 85% acetonitrylu, 1 mM diwodorofosforanu amonu oraz 0,1% kwasu trifluorooctowego.

Przygotowanie próbek do analizy MALDI-TOF-MS

Białka i peptydy zostały naniesione na płytkę AnchorChip Standard 800 μ m (Bruker Daltonics, Brema, Niemcy); wykorzystano procedurę zwaną techniką suchej kropli. W tym celu 1 μ l eluatu (frakcji peptydów pochodzących z próbki oczyszczonej techniką ZipTip) nanoszono za pomocą pipety automatycznej na płytkę w trzech powtórzeniach i pozostawiano do wyschnięcia. Kolejno dodawano do nich 1 μ l roztworu matrycy. Po wyschnięciu płytkę umieszczano w spektrometrze mas i poddano analizie.

Analiza MALDI-TOF-MS

Do analizy profilowania białek i peptydów wykorzystano technikę spektrometrii mas typu MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Brema, Niemcy). Spektrometr mas tego typu składa się ze źródła jonów typu MALDI, analizatora mas typu TOF oraz detektora. Spektrometr UltrafleXtreme wyposażony jest w laser 2 kHz w trybie TOF. Profilowanie protein przeprowadzono w zakresie mas od 1000 do 10 000 Da w trybie liniowym oraz dodatkowej jonizacji. Parametry spektrometru mas były następujące: napięcie w źródle jonów 1 (ang. *ion source 1*) – 25,09 kV; napięcie w źródle jonów 2 (ang. *ion source 2*) – 23,79 kV; napięcie na soczewce – 6,40 kV; pulsacyjna ekstrakcja jonów (PIE – ang. *pulsed ion extraction*) – 260 ns; supresja matrycy (MSMCO – ang. *matrix suppression mass cut off*) – m/z 700 Da. Dla każdego spotu na płytce AnchorChip sumowano wyniki z 2000 strzałów lasera. Do generowania widm i ich bezpośredniej obróbki oraz analizy użyto oprogramowania FlexControl 3.4, FlexAnalysis 3.4 oraz ClinPro Tools 3.0 (Bruker Daltonics). Do kalibracji zewnętrznej spektrometru mas wykorzystano mieszaninę wzorców białek i peptydów w zakresie mas od 1000 do 10 000 Da (mieszanina została przygotowana poprzez rozpuszczenie wzorców peptydów do kalibracji oraz wzorców białek do kalibracji w stosunku 1:5, Bruker Daltonics). Średnie odchylenie masy nie było większe niż 100 ppm.

Statystyczna analiza danych

W celu otrzymania listy pików wraz z intensywnościami dla widma każdej analizowanej próbki surowicy przeprowadzono wstępną obróbkę profili peptydowych z wykorzystaniem programu MALDIquant 1.10 [130]. Ze względu na to, że każdą próbkę analizowano z wykorzystaniem spektrometrii mas trzykrotnie, użyto funkcji grupującej w celu uzyskania jednego średniego powtórzenia dla danej próbki. Aby osiągnąć stabilizację wariancji, wyciągnięto pierwiastek kwadratowy z intensywności w pojedynczych widmach. Widma zostały także wygładzone z wykorzystaniem algorytmu Savitzky'ego-Golaya. Korekcja linii bazowej została wykonana przy użyciu algorytmu TopHat. Intensywności we wszystkich widmach zostały następnie znormalizowane z wykorzystaniem mediany intensywności. Do dalszych analiz jako piki potraktowano zmienne, dla których stosunek sygnału do szumu (S/N) był powyżej 5. Piki powiązane z tą samą masą zostały wyrównane za pomocą regresji statystycznej. Otrzymane widma poddano analizie statystycznej w programie chemometrycznym ClinProTools 3.0 (Bruker Daltonics, Brema, Niemcy). Widma analizowano w zakresie mas od 1 do 10 kDa.

Ze wstępnie przygotowanych widm obliczono całkowite średnie widma dla poszczególnych grup. Pozwoliło to na poprawienie stosunku sygnału do szumu. Na pojedynczych widmach piki o małej intensywności mogą zostać pominięte, jednak są one obecne w całościowych profilach powstałych po obliczeniu średnich. Różnice w intensywnościach pików obliczono, używając jednozmiennych analiz statystycznych: t-testu lub testu Wilcoxon, w zależności od rozkładu zmiennych. Za statystycznie istotnie różnicujące przyjęto te piki, dla których wartości p są mniejsze od 0,05. Wszystkie wartości p zostały również skorygowane przez wewnętrzny algorytm Benjaminiego-Hochberga. Dla wszystkich pików obliczono krzywe ROC (ang. *receiver operating characteristic*) w celu graficznego przedstawienia zależności pomiędzy czułością a specyficznoscią danego pików. Pola pod krzywą ROC (AUC – ang. *area under the ROC curve*) pozwoliły na porównanie zdolności dyskryminacyjnej badanych peptydów. W celu stworzenia modeli dyskryminacyjnych użyto trzech algorytmów matematycznych: algorytmu genetycznego (GA – ang. *genetic algorithm*), nadzorowanej sieci neuronowej (SNN – ang. *supervised neural network*) oraz szybkiego klasyfikatora (QC – ang. *quick classifier*). Przed analizą próbki losowo podzielono na zbiory uczące i testowe. Do budowy modeli wykorzystano zbiory uczące, które składały się z 33 próbek pobranych od grupy kontrolnej (73,3% liczebności grupy kontrolnej) oraz 93 próbek pobranych od grupy badanej (74,4% liczebności grupy badanej). Pozostałe próbki (13 od grupy kontrolnej oraz 32 od grupy badanej) stanowiły zbiory testowe wykorzystane później do walidacji zewnętrznej. Algorytmy pozwoliły na otrzymanie grup pików charakteryzujących się największą zdolnością dyskryminacyjną. Dla modeli obliczono dwa parametry: zdolność rozpoznawania oraz walidację krzyżową. Najwyższe wyniki uzyskano dla GA, z tego względu obliczono dla niego wartości czułości i specyficznosci, stosując walidację zewnętrzną. Peptydy, które zostały wytypowane jako najbardziej istotne w różnicowaniu pomiędzy grupą kontrolną a badaną, poddano następnie, mającym na celu ich identyfikację, analizom.

Lista próbek wykorzystanych w profilowaniu peptydowo-białkowym

Próbki pobrane od grupy kontrolnej

Zbiór uczący: 10, 14, 19, 21, 22, 32, 36, 46, 47, 57, 59, 69, 75, 76, 82, 89, 90, 111, 112, 113, 118, 130, 136, 141, 143, 145, 157, 158, 160, 162, 165, 167, 171.

Zbiór testowy: 18, 20, 28, 45, 54, 77, 120, 125, 155, 161, 166, 174.

Próbki pobrane od grupy badanej (chore na raka endometrium)

Zbiór uczący: 2, 3, 5, 7, 8, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 21, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 38, 40, 42, 43, 45, 46, 48, 49, 50, 54, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 63, 64,

66, 67, 68, 69, 71, 72, 73, 76, 77, 80, 83, 85, 86, 87, 89, 90, 91, 93, 94, 95, 96, 97, 99, 100, 102, 103, 104, 106, 108, 109, 110, 111, 113, 114, 115, 116, 118, 119, 121, 122, 124, 125, 127, 129, 131, 134, 137, 138, 139, 141, 144.

Zbiór testowy: 1, 4, 9, 10, 15, 22, 25, 32, 37, 39, 41, 44, 47, 51, 62, 65, 70, 74, 84, 88, 98, 101, 105, 107, 112, 117, 120, 123, 126, 132, 135, 143.

3.2.3. IDENTYFIKACJA PEPTYDÓW DOKONANA W TECHNICIE NLC-MALDI-TOF/TOF-MS/MS

Przygotowanie próbki do analizy

Próbki surowicy krwi pochodzące od pacjentek z EC zostały zatężone i oczyszczone przy zastosowaniu techniki ekstrakcji do fazy stałej (SPE) z wykorzystaniem końcówek do pipet typu C18 ZipTip (Millipore, MA). Zebrane eluaty połączyły i poddano analizie identyfikacji w technice nLC-MALDI-TOF/TOF-MS/MS.

Rozdział peptydów w chromatografii ciekowej

Do rozdzielania chromatograficznego wykorzystano wysoko sprawny chromatograf ciekowy typu nLC (HPLC – ang. *high performance liquid chromatograph*) nano-flow HPLC system EASY-nano LC II (Bruker Daltonics, Brema, Niemcy) w połączeniu z kolektorem frakcji Proteineer-fc II (Bruker Daltonics). Czas analizy wynosił 96 minut. Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na kolumnie chromatograficznej Thermo Scientific Acclaim PepMap 100 column C18 (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, USA) (3 μm , 100 \AA , 75 $\mu\text{m} \times 150 \text{ mm}$). Przepływ faz ruchomych wynosił 300 nl/min. Fazami ruchomymi był roztwór wodny (faza A) oraz 90% acetonitrylu (faza B), obie z dodatkiem 0,05% kwasu trifluorooctowego. Rozdział chromatograficzny przebiegał przy zastosowaniu elucji gradientowej 2–50% roztworu B. Objętość nastrzyku wynosiła 10 μl . Frakcje opuszczające kolumnę trafiały do kolektora frakcji i po wymieszaniu z matrycą zostały naniesione na płytkę typu AnchorChip Standard 800 μm (Bruker Daltonics). Do kontroli rozdzielania chromatograficznego użyto oprogramowania HyStar 3.2 (Bruker Daltonics). Łącznie zebrano 384 frakcje analizowanej próbki, które kolejno wymieszano z roztworem matrycy kwasu α -cyjano-4-hydroksycynamonowego (HCCA). Roztwór matrycy przygotowano poprzez wymieszanie następujących roztworów: 748 μl roztworu acetonitrylu w stosunku 95:5 (v/v) acetonitryl: 0,1% TFA, 36 μl nasyconej matrycy HCCA w roztworze 90:10 (v/v) acetonitryl: 0,1% TFA, 8 μl 10% TFA oraz 8 μl 100 mM diwodorofosforanu amonu.

Analiza MALDI-TOF/TOF-MS/MS

Do identyfikacji wybranych peptydów wykorzystano technikę tandemowej spektrometrii mas typu MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Brema, Niemcy) wyposażonej w laser SmartBeam II (Bruker Daltonics). Parametry spektrometru mas były następujące: napięcie w źródle jonów 1 (ang. *ion source 1*) – 25,00 kV; napięcie w źródle jonów 2 (ang. *ion source 2*) – 22,50 kV; napięcie na soczewce (ang. *lens*) – 7,90 kV; reflektor (ang. *reflector*) – 26,45 kV; reflektor 2 (ang. *reflector 2*) – 13,40 kV; pulsacyjna ekstrakcja jonów (ang. *pulsed ion extraction*) – 120 ns; supresja matrycy (ang. *matrix suppression mass cut off*) – m/z 700 Da. Jony peptydów rejestrowano w wysoko rozdzielczym zakresie mas od 700 do 4000 Da w trybie dodatniej jonizacji. Do kalibracji zewnętrznej spektrometru mas użyto zestawu standardów Peptide Calibration Standard (Bruker Daltonics). Do automatycznej analizy MS i utworzenia listy zarejestrowanych jonów prekursorowych wykorzystano oprogramowanie WARP-LC (Bruker Daltonics). Kolejno wybrane peptydy poddano analizie MS/MS. Parametry spektrometru mas w metodzie LIFT były następujące: napięcie w źródle jonów 1 (ang. *ion source 1*) – 7,50 kV; napięcie w źródle jonów 2 (ang. *ion source 2*) – 6,75 kV; napięcie na soczewce (ang. *lens*) – 3,50 kV; reflektor (ang. *reflector*) – 29,50 kV; reflektor 2 (ang. *reflector 2*) – 14,00 kV; Lift 1 – 19 kV; Lift 2 – 3,15; pulsacyjna ekstrakcja jonów – 80 ns. Kontrola instrumentu, analiza i przetwarzanie danych zostały przeprowadzone przy użyciu następujących programów: FlexControl 3.4, FlexAnalysis 3.4 i BioTools 3.2 (Bruker Daltonics). Widma MS/MS zostały poddane identyfikacji na podstawie białkowej bazy danych SwissProt z wyszukiwarką Mascot 2.4.1 (Matrix Science, Londyn, Wielka Brytania). Ogólne parametry wyszukiwania były następujące: gatunek *Homo sapiens*, brak enzymu, tolerancja masy dla jonu prekursorowego (ang. *peptide precursor mass tolerance*) – 50 ppm; tolerancja masy fragmentów (ang. *fragment mass tolerance*) – 0,7 Da; ładunek – +1; masa monoizotopowa.

3.2.4. OZNACZANIE PANELU MARKERÓW BIAŁKOWYCH W SUROWICY Z WYKORZYSTANIEM METODY SEPARACJI MAGNETYCZNEJ I CYTOMETRII PRZEPŁYWOWEJ

Markery procesu angiogenezy (sEGFR, FGF-basic, follistatin, G-CSF, HGF, sHER2/neu, sIL-6Ra, leptin, osteopontin, PECAM-1, PDGF-AB/BB, prolactin, SCF,

sTIE-2, sVEGFR-1, sVEGFR-2) zostały oznaczone jednocześnie w próbkach surowicy za pomocą testu immunologicznego Bio-Plex Pro Human Cancer Biomarker Panel 1 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) według instrukcji producenta. Kit zawiera 96-dołkową płytkę, potrzebne reagenty (bufory do przygotowania próbek, roztwór do przemywania płytki, kulki magnetyczne, streptoawidynę, odpowiednie przeciwciała, fikoerytrynę), standardy do przygotowania krzywej kalibracyjnej oraz kontrole jakości o niskim i wysokim stężeniu badanych markerów. Jeśli chodzi o metodykę, głównie wykorzystywane są znakowane kolorami kulki magnetyczne połączone ze specyficznymi przeciwciałami, które reagują z białkami obecnymi w próbkach, standardach oraz kontrolach jakości (każda próbka zajmuje osobny dołek na płytce). Po procedurze przemywania płytki – co pozwala na pozbycie się niezwiązanych cząsteczek – do kulek magnetycznych dodawane są biotynylowane przeciwciała, niezbędne do detekcji. Końcowy kompleks umożliwiający analizę otrzymuje się poprzez dodanie koniugatu streptoawidyny i fikoerytryny. Stężenia białek proangiogennych wyznaczane są w cytometrze przepływowym Bio-Plex 200 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), który identyfikuje i mierzy każdy stworzony kompleks na podstawie fluorescencji oraz kolorów kulek magnetycznych. Krzywa kalibracyjna została obliczona na podstawie standardów dostarczonych przez producenta, a stężenia podano w pikogramach na mililitr (pg/ml). Dane otrzymano z wykorzystaniem programu Bio-Plex Manager 6.0. Przed analizą cytometr został skalibrowany oraz zweryfikowany – użyto do tego odpowiednich roztworów kalibracyjnych i weryfikacyjnych producenta (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Dwa dołki zawierały jedynie bufory używane do przygotowania próbek, które były analizowane jako próby ślepe. Procedura została zweryfikowana przez oznaczenie kontroli jakości w wysokim i niskim stężeniu oznaczanych markerów. Parametry walidacji, takie jak precyzja, czułość, zakres oznaczanych stężeń, liniowość, zostały zbadane przez producenta na ludzkiej surowicy.

Lista próbek przeanalizowanych z wykorzystaniem techniki separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej (74 próbki, w tym 25 próbek z cechą G1, 25 próbek z cechą G2 oraz 24 próbki z cechą G3): 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 57, 59, 60, 61, 62, 65, 67, 72, 76, 77, 79, 83, 85, 88, 89, 90, 92, 93, 98, 99, 105, 108, 112, 113, 116, 126, 129, 137, 138, 140.

Te same, pobrane z grupy kontrolnej surowice, których użyto do badań spektroskopowych, stanowiły materiał porównawczy.

4. WYNIKI

4.1. PROFILOWANIE PEPTYDOWO-BIAŁKOWE Z WYKORZYSTANIEM SPEKTROMETRII MALDI-TOF-MS

Badanie polegało na zastosowaniu strategii profilowania białkowo-peptydowego do analizy próbek surowicy pochodzących od pacjentek z rakiem endometrialnym ($n = 125$) oraz zdrowych kobiet ($n = 45$). Próbki zostały oczyszczone oraz zagęszczone z wykorzystaniem ekstrakcji do fazy stałej. Następnie analizowano je za pomocą spektrometru mas typu MALDI-TOF w zakresie mas od 1 do 10 kDa. Masy te odpowiadają jednokrotnie naładowanym zjonizowanym peptydom $[M+H]^+$. Kalibracja zewnętrzna została wykonana z wykorzystaniem mieszaniny wzorców mieszczących się w zakresie mas 1–10 kDa: od 1047,189 Da (angiotensyna II) do 8565,764 Da (ubikwityna 1). Średnie odchylenie mas wzorców w stosunku do mas referencyjnych wynosiło poniżej 100 ppm. Uzyskane widma poddano analizie statystycznej w programie ClinProTools. Zastosowana metoda pozwoliła na wykrycie 147 pików. Otrzymane dane zostały poddane jednoznacznikowej analizie statystycznej (t-test/test Wilcoxona oraz krzywa ROC). Panele składające się z wielu czynników mają zazwyczaj większą moc dyskryminacyjną niż pojedyncze markery. Z tego względu zastosowano trzy algorytmy matematyczne (GA, SNN, QC), które umożliwiły otrzymanie modeli dyskryminacyjnych opierających się na najbardziej różnicujących pikach. Do tego celu wykorzystano zbiór uczący z losowo wybranymi próbkami. Modele stworzone na podstawie GA i SNN posiadają dwa wspólne piki 1450,19 oraz 3278,79. Wartości m/z wytypowane jako najbardziej różnicujące dla poszczególnych modeli przedstawiono w **tabeli 1**.

Tabela 1. Wartości m/z wytypowane algorytmami matematycznymi jako najbardziej różnicujące dla poszczególnych modeli

QC	SNN	GA
5633,60	3214,51	1450,19
5752,87	3284,3	3302,16
	1450,19	1229,32
	1277,43	3278,79
	1779,29	1466,88
	2116,08	4268,50
	3278,79	1505,09
	2972,31	1364,55
	2453,26	7806,35
	1584,81	1020,99
	2661,01	
	2683,15	
	1568,56	
	1245,03	

Różnice między modelami wynikają z różnych mechanizmów liczenia poszczególnych algorytmów. GA opiera się w dużej mierze na ewolucji występującej w naturze. Rozdział pomiędzy badanymi grupami uzyskuje się przez odrzucanie najmniej dopasowanych kombinacji. W ten sposób GA wybiera takie piki, które najbardziej się różnią na profilach przyporządkowanych do poszczególnych grup. SNN wybiera natomiast najbardziej charakterystyczne widma i traktuje je jako prototyp próbki w danej grupie. QC tworzy modele diagnostyczne na bazie

porównywania średnich ważonych intensywności pików. Dla stworzonych modeli obliczono dwa parametry: walidację krzyżową oraz zdolność rozpoznawania, co pozwoliło na ocenę mocy dyskryminacyjnej modeli (**Tabela 2**).

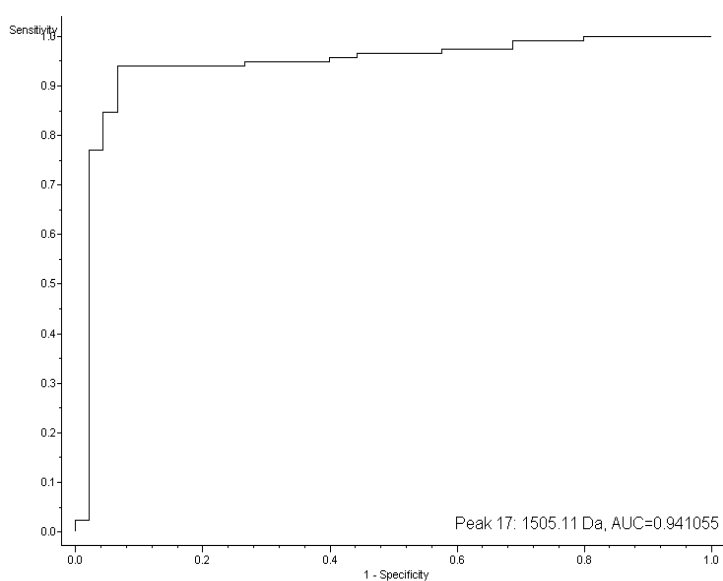
Tabela 2. Wartości parametrów zdolności rozpoznawania i walidacji krzyżowej oraz walidacji zewnętrznej (czułość i swoistość) dla trzech modeli diagnostycznych obliczonych na podstawie algorytmów QC, SNN i GA

	QC	SNN	GA
Zdolność rozpoznawania	89,88%	98,48%	98,81%
Walidacja krzyżowa	88,10%	89,12%	94,26%
Czułość	-	-	98,70%
Specyficzność	-	-	94,30%

Najwyższe wartości uzyskano dla algorytmu GA (walidacja krzyżowa: 94,26%, zdolność rozpoznawania: 98,81%). Ze względu na to, że modele uzyskują zazwyczaj lepsze wyniki, jeśli bazują na grupie próbek, na podstawie których zostały stworzone, do walidacji zewnętrznej użyto niezależnej grupy próbek – zbioru testowego. Obliczono takie parametry jak czułość oraz swoistość. Czuość pozwala określić odsetek osób, które zostały dobrze przyporządkowane do grupy z badanym schorzeniem, natomiast swoistość pokazuje, jaki odsetek osób zdrowych został przydzielony do grupy zdrowych. Dla modelu obliczonego na podstawie GA czułość wynosi 98,70%, a swoistość – 94,30%. Ten wieloczynnikowy panel składa się z dziesięciu wybranych wartości m/z: 1450,19, 3302,16, 1229,32, 3278,79, 1466,88, 4268,50, 1505,09, 1364,55, 7806,35, 1020,99. Biorąc pod uwagę wyniki testu jednoczynnikowego, jedynie pik 4268,50 ma wartość p powyżej 0,05, nie jest więc statystycznie istotny. Pole pod krzywą ROC, AUC dla siedmiu czynników ma wartość powyżej 0,89 (1450,19, 1229,32, 1466,88, 4268,50, 1505,09, 1364,55, 7806,35). Wartości p oraz AUC dla modelu GA przedstawiono w **tabeli 3**. **Rycina 1** obrazuje krzywą ROC dla najwyższej wartości AUC 0,941 dla m/z 1505,09 Da.

Tabela 3. Wartości p oraz pola pod krzywą ROC (AUC) dla pików wytypowanych do identyfikacji przez algorytm GA

m/z	p-value	AUC
1450,19	<0,001	0,930
3302,16	<0,001	0,526
1229,32	<0,001	0,900
3278,79	<0,001	0,541
1466,88	<0,001	0,921
4268,50	0,083	0,890
1505,09	<0,001	0,941
1364,55	<0,001	0,922
7806,35	<0,001	0,936
1020,99	0,006	0,644



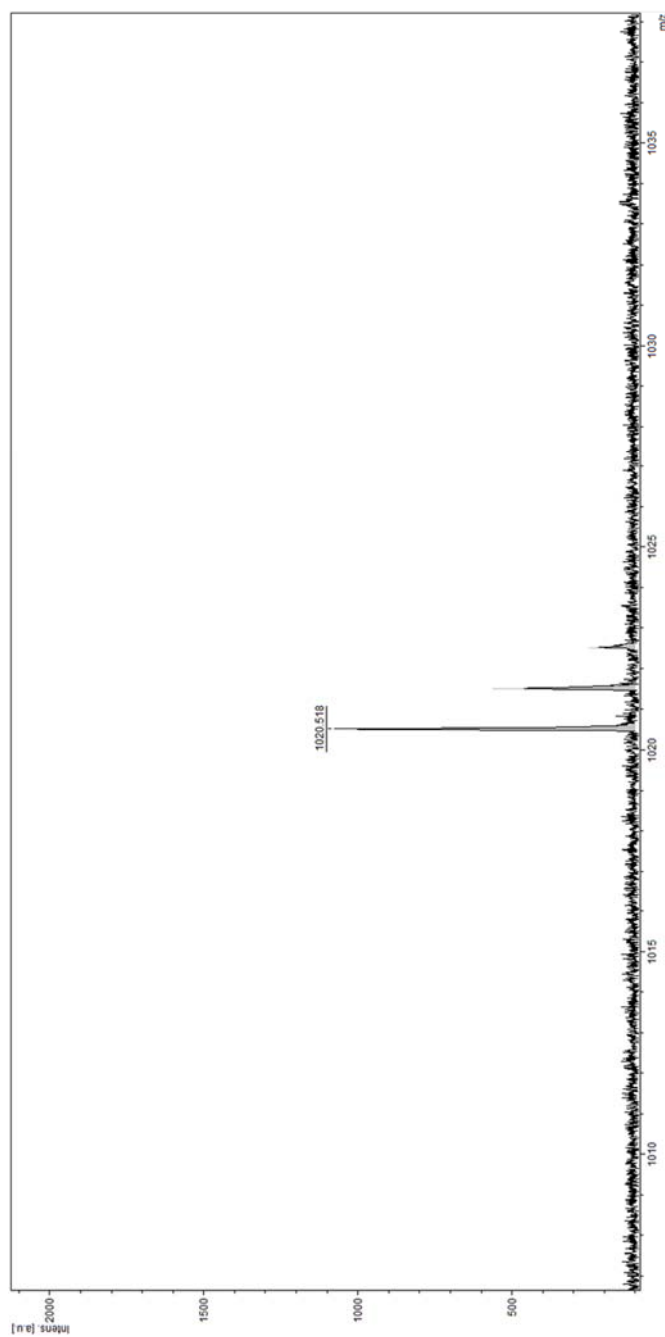
Rycina 1. Krzywa ROC zbudowana na podstawie intensywności pików o masie 1505,09 Da, o polu pod krzywą AUC = 0,941055

Wytypowane piki o masach: 1450,19, 3302,16, 1229,32, 3278,79, 1466,88, 4268,50, 1505,09, 1364,55, 7806,35, 1020,99 Da zostały poddane dalszej analizie proteomicznej w celu ich identyfikacji.

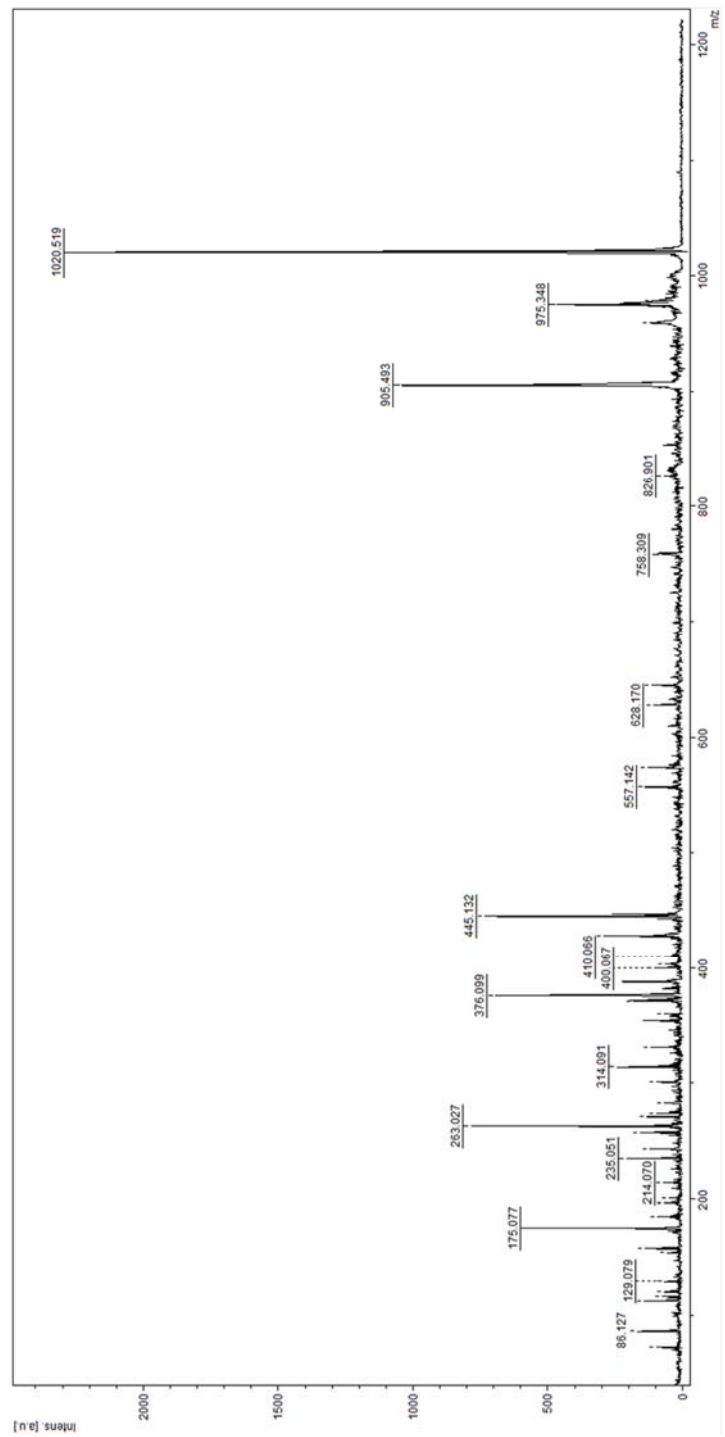
4.2. IDENTYFIKACJA PEPTYDÓW DOKONANA W TECHNICIE NLC-MALDI-TOF/TOF-MS/MS

Wybrane sygnały m/z przez algorytm GA, który charakteryzował się najwyższymi parametrami dyskryminacyjnymi w doniesieniu do badanych grup (piki: 1450,19, 3302,16, 1229,32, 3278,79, 1466,88, 4268,50, 1505,09, 1364,55, 7806,35, 1020,99), zostały poddane dalszemu procesowi identyfikacji w technice nLC-MALDI-TOF/TOF-MS/MS. W celu utworzenia listy monoizotopowych mas peptydów każdą frakcję poddano analizie MS w trybie z reflektorem w zakresie mas od 700 do 4500 Da. Zarejestrowano następujące sygnały m/z: 1020,518 (**Rycina 2**), 1206,586 (**Rycina 6**) oraz 1465,644 (**Rycina 10**), które pozwoliły na identyfikację białka *fibrinogen alpha chain* (FIBA_HUMAN.). Analiza MS/MS jonu prekursorowego: m/z 1020,518 pozwoliła na identyfikację sekwencji aminokwasowej DFLAEGGGVR (**Ryciny 3–5**), m/z 1206,586 – na identyfikację sekwencji EGDFLAEGGGVR (**Ryciny 7–9**) oraz m/z 1465,644 – na identyfikację sekwencji aminokwasowej DSGEGDFLAEGGGVR (**Ryciny 11–13**).

Analiza sygnału m/z 1020,518 [M+H]⁺



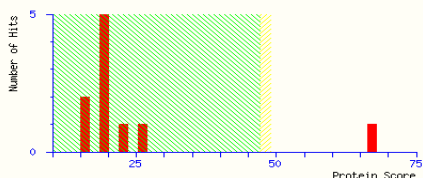
Rycina 2. Widmo MS sygnału m/z 1020,518 w zakresie mas od 700 do 3500 Da w trybie dodatniej jonizacji



Rycina 3. Widmo MS/MS fragmentów sygnału 1020,518 w trybie LIFT

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Individual ions scores > 47 indicate peptides with significant homology.
 Individual ions scores > 49 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Peptide Summary Report

Format As	Peptide Summary	Help
Significance threshold p<	0.05	Max. number of hits
Standard scoring	<input checked="" type="radio"/> MudPIT scoring <input type="radio"/> Ions score or expect cut-off	0
Show pop-ups	<input checked="" type="radio"/> Suppress pop-ups <input type="radio"/> Sort unassigned	Decreasing Score
		Require bold red <input type="checkbox"/>

Overview Table

Click on column header to jump to entry in results list.
 Move mouse over any indicator to highlight identical peptides.
 Click on an indicator to see details of individual match.
 Use check boxes to select sub-set of queries for new search.

Mouse over:

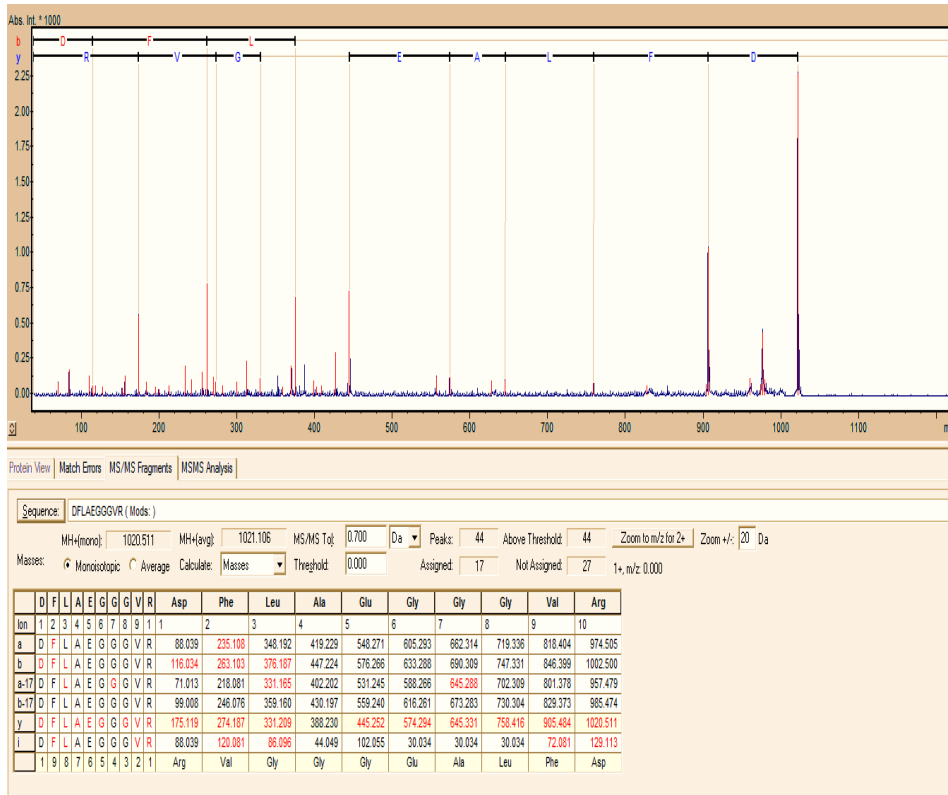
Hit: 1
 1020.5181 (1+)

Error tolerant

1. [FIBA_HUMAN](#) Mass: 94914 Score: 67 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)
 Fibrinogen alpha chain OS=Homo sapiens GN=FGA PE=1 SV=2
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

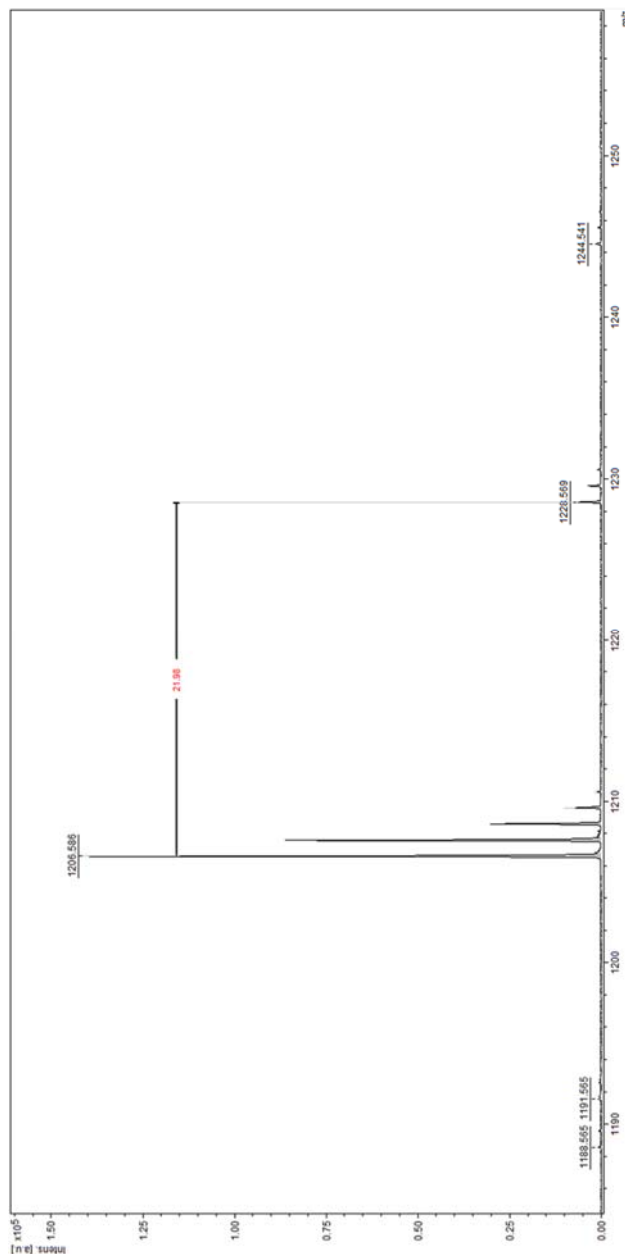
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
1	1020.5181	1019.5109	1019.5036	7.10	0	71	0.00039	1	U	G-DFLAEGGGVR.G

Rycina 4. Wynik identyfikacji dokonanej na podstawie białkowej bazy danych SwissProt z wyszukiwarką Mascot. Wysoka wartość parametru score równa 73 oraz p-value mniejsze niż 0,05 dla rozpoznanej sekwencji aminokwasowej potwierdzają prawidłową identyfikację białka *fibrinogen alpha chain*



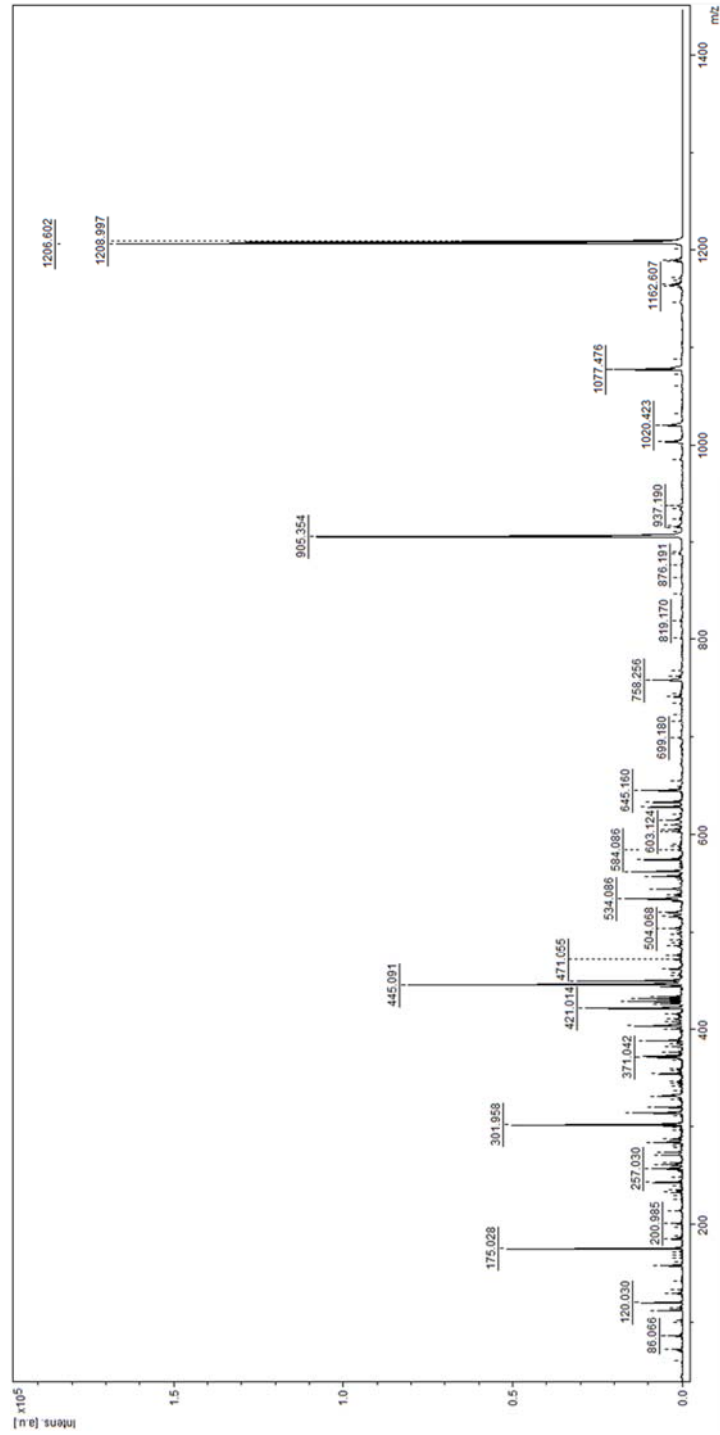
Rycina 5. Analiza widma MS/MS sygnału m/z 1020,518 w programie BioTools przedstawia rozpoznanie fragmentów serii jonów typu b- oraz y-, które pozwoliły na identyfikację następującej sekwencji aminokwasowej: DFLAEGGGVR

Analiza sygnału m/z 1228,569 [M+Na]⁺



Rycina 6. Widmo MS sygnału m/z 1228,569 oraz sygnału m/z 1206,586 w zakresie mas od 700 do 3500 Da w trybie dodatniej jonizacji

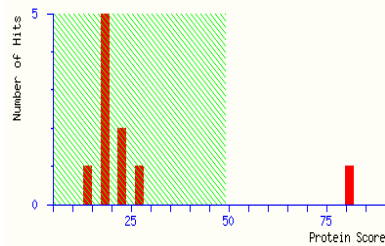
Wytypowany na podstawie analizy statystycznej przez algorytm GA sygnał m/z 1228,569 przedstawia addukt sodowy sygnału m/z 1206,586. W związku z tym do dalszej analizy MS/MS wytypowano sygnał m/z 1206,586.



Rycina 7. Widmo MS/MS fragmentów sygnału m/z 1206,586 w trybie LIFT

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 49 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Peptide Summary Report

Format As	Peptide Summary	Help
Significance threshold p<	0.05	Max. number of hits
Standard scoring	<input checked="" type="radio"/> MudPIT scoring	Ions score or expect cut-off
Show pop-ups	<input checked="" type="radio"/> Suppress pop-ups	Sort unassigned
		Decreasing Score
		Require bold red

Overview Table

Click on column header to jump to entry in results list.
 Move mouse over any indicator to highlight identical peptides.
 Click on an indicator to see details of individual match.
 Use check boxes to select sub-set of queries for new search.

Mouse over:

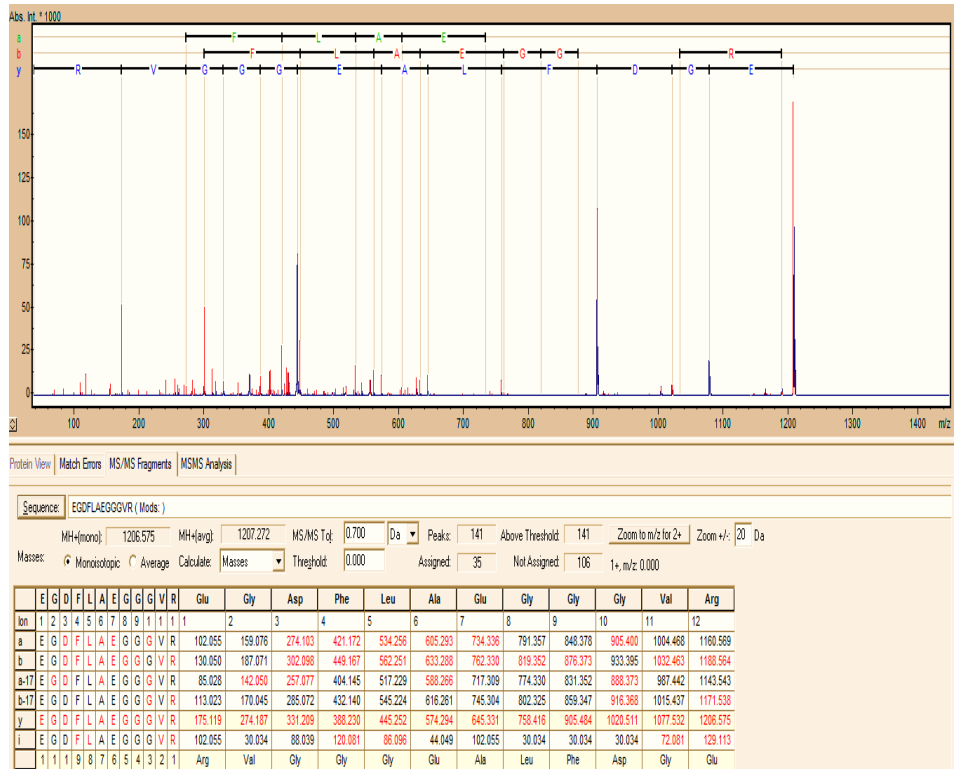
Hit: [1](#)
 [1206.5859](#) (I+)

Select All Select None Search Selected Error tolerant Archive Report

1. [FIBA_HUMAN](#) Mass: 94914 Score: 81 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)
 Fibrinogen alpha chain OS=Homo sapiens GN=FGA PE=1 SV=2
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

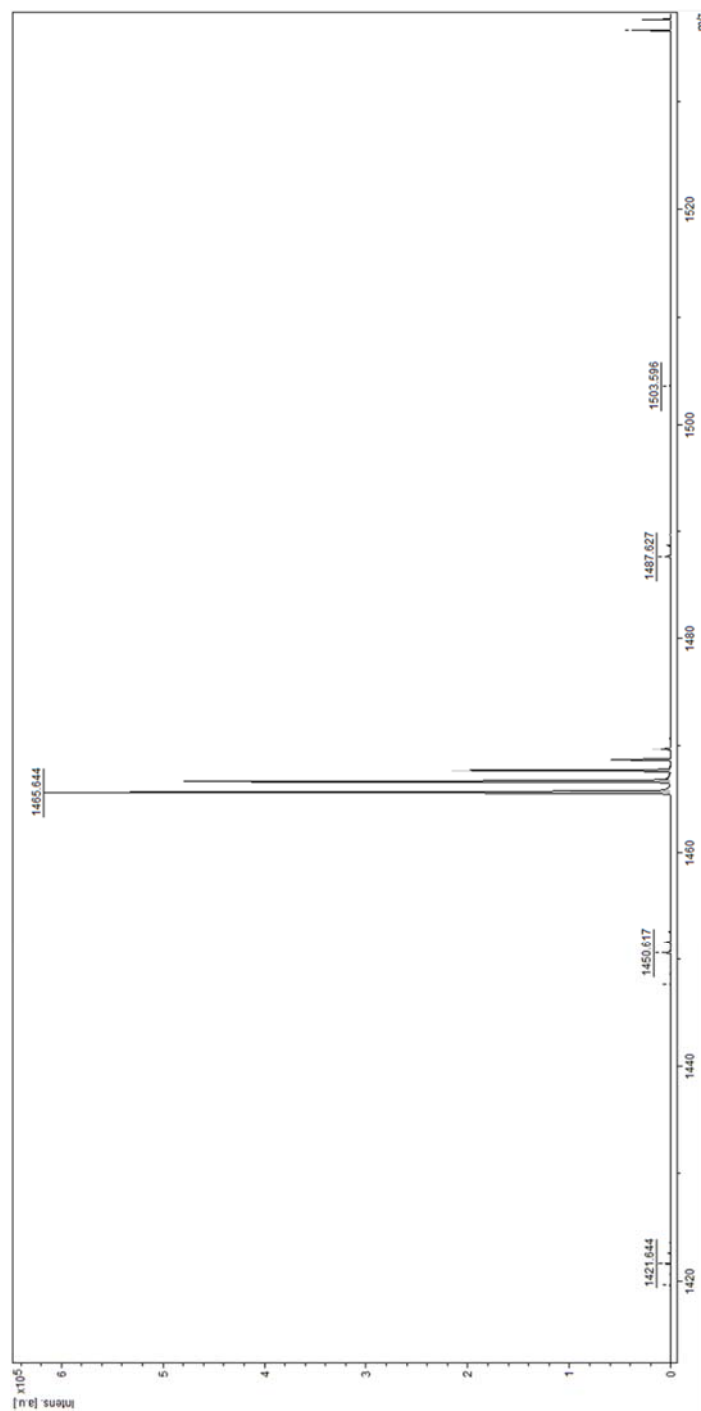
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
1	1206.5859	1205.5786	1205.5677	9.07	0	88	7e-006	1	U	G.EGDFLAEGGGVR.G

Rycina 8. Wynik identyfikacji dokonanej na podstawie białkowej bazy danych SwissProt z wyszukiwarką Mascot. Wysoka wartość parametru score równa 88 oraz p-value mniejsze niż 0,05 dla rozpoznanej sekwencji aminokwasowej potwierdzają prawidłową identyfikację białka *fibrinogen alpha chain*

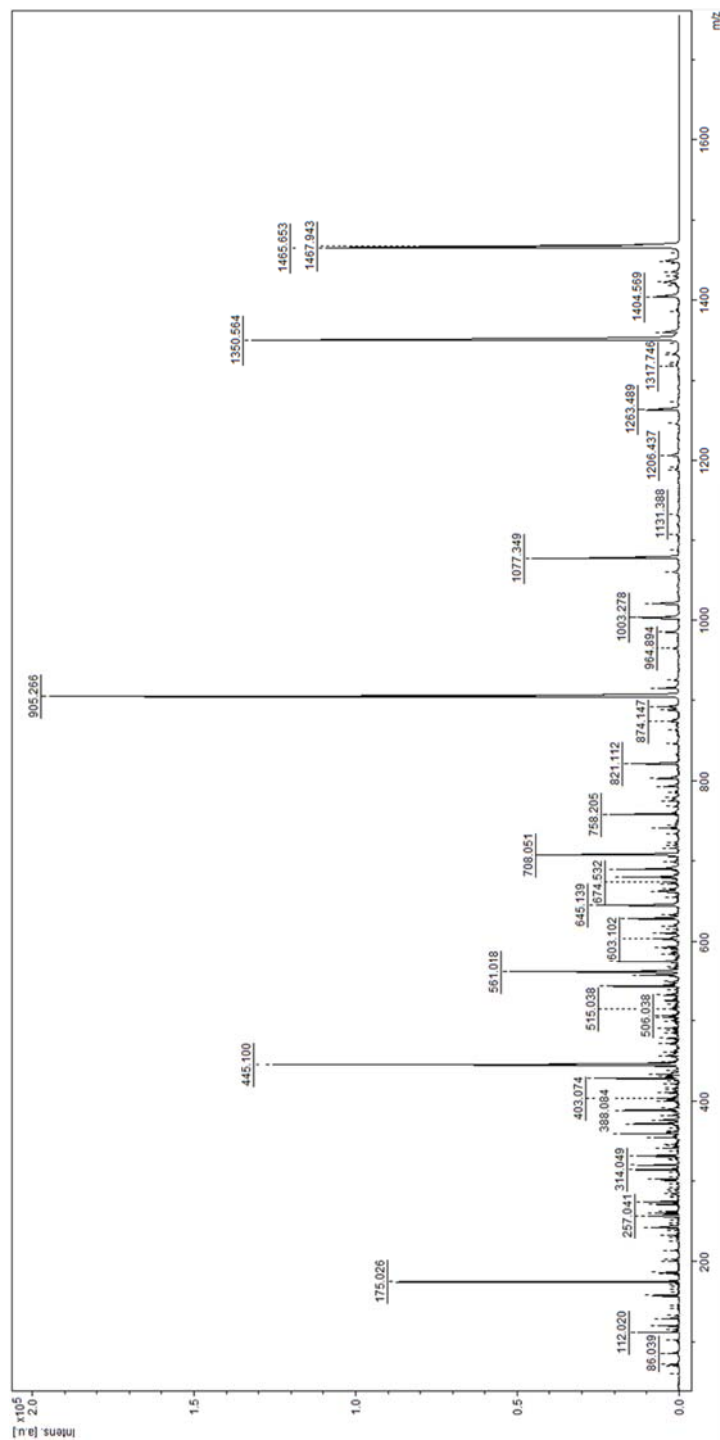


Rycina 9. Analiza widma MS/MS sygnału m/z 1206,586 w programie BioTools przedstawia rozpoznanie fragmentów serii jonów typu b-, a- oraz y-, które pozwoliły na identyfikację następującej sekwencji aminokwasowej: EGDFLAEGGGVR

Analiza sygnału m/z 1465,644 [M+H]⁺



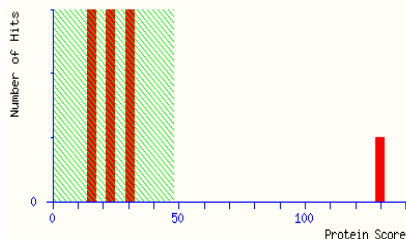
Rycina 10. Widmo MS sygnału m/z 1465,644 w zakresie mas od 700 do 3500 Da w trybie dodatniej jonizacji



Rycina 11. Widmo MS/MS fragmentów sygnału 1465,644 w trybie LIFT

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 48 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Peptide Summary Report

Format As	Peptide Summary	Help
Significance threshold p<	0.05	Max. number of hits
Standard scoring	<input checked="" type="radio"/> MudPIT scoring	Ions score or expect cut-off
Show pop-ups	<input checked="" type="radio"/> Suppress pop-ups	Sort unassigned
		Decreasing Score
		Require bold red

Overview Table

Click on column header to jump to entry in results list.
 Move mouse over any indicator to highlight identical peptides.
 Click on an indicator to see details of individual match.
 Use check boxes to select sub-set of queries for new search.

Mouse over:

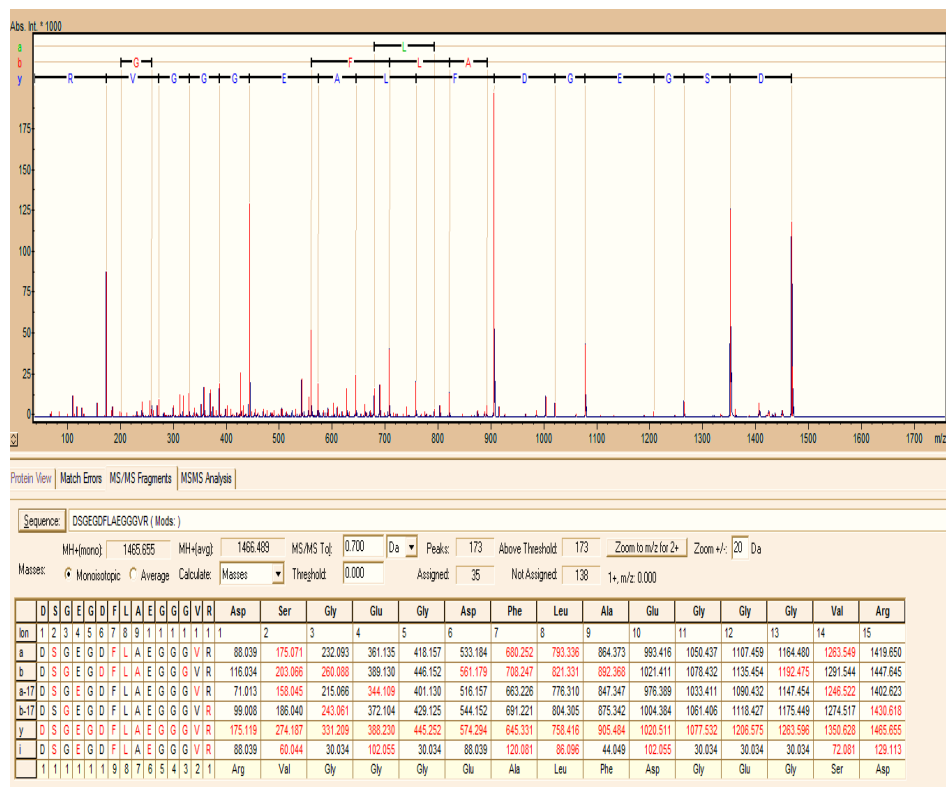
Hit: [1](#)
 [1465.6440](#) (1+)

Error tolerant

- [FIBA HUMAN](#) Mass: 94914 Score: 130 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)
 Fibrinogen alpha chain OS=Homo sapiens GN=FGA PE=1 SV=2
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

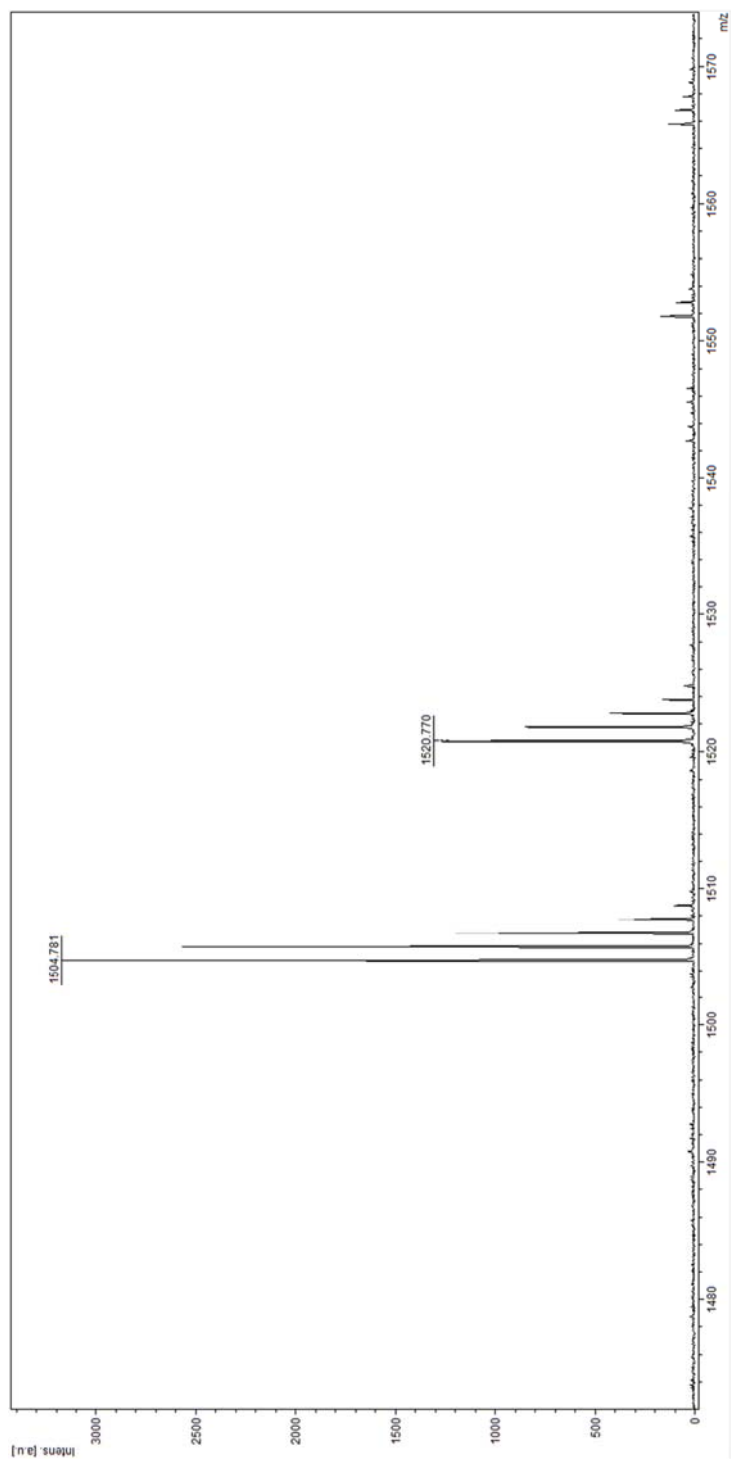
Query	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
1	1465.6440	1464.6367	1464.6481	-7.80	0	137	7.3e-011	1	U	A.DSGEGDFLAEGGGVR.G

Rycina 12. Wynik identyfikacji dokonanej na podstawie białkowej bazy SwissProt z wyszukiwarką Mascot. Wysoka wartość parametru score równa 137 oraz p-value mniejsze niż 0,05 dla rozpoznanej sekwencji aminokwasowej potwierdzają prawidłową identyfikację białka *fibrinogen alpha chain*

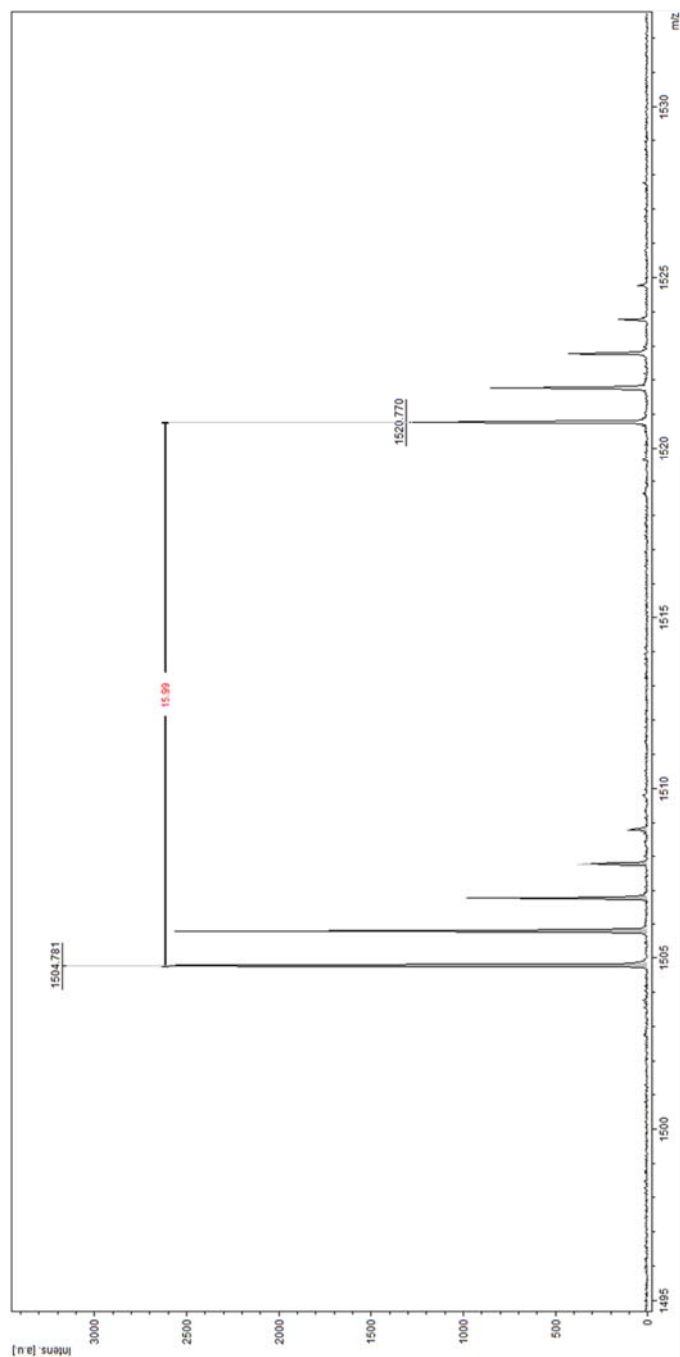


Rycina 13. Analiza widma MS/MS sygnału m/z 1465,644 w programie BioTools przedstawia rozpoznanie fragmentów serii jonów typu b- oraz y-, które pozwoliły na identyfikację następującej sekwencji aminokwasowej: DSGEGDFLAEGGGVR

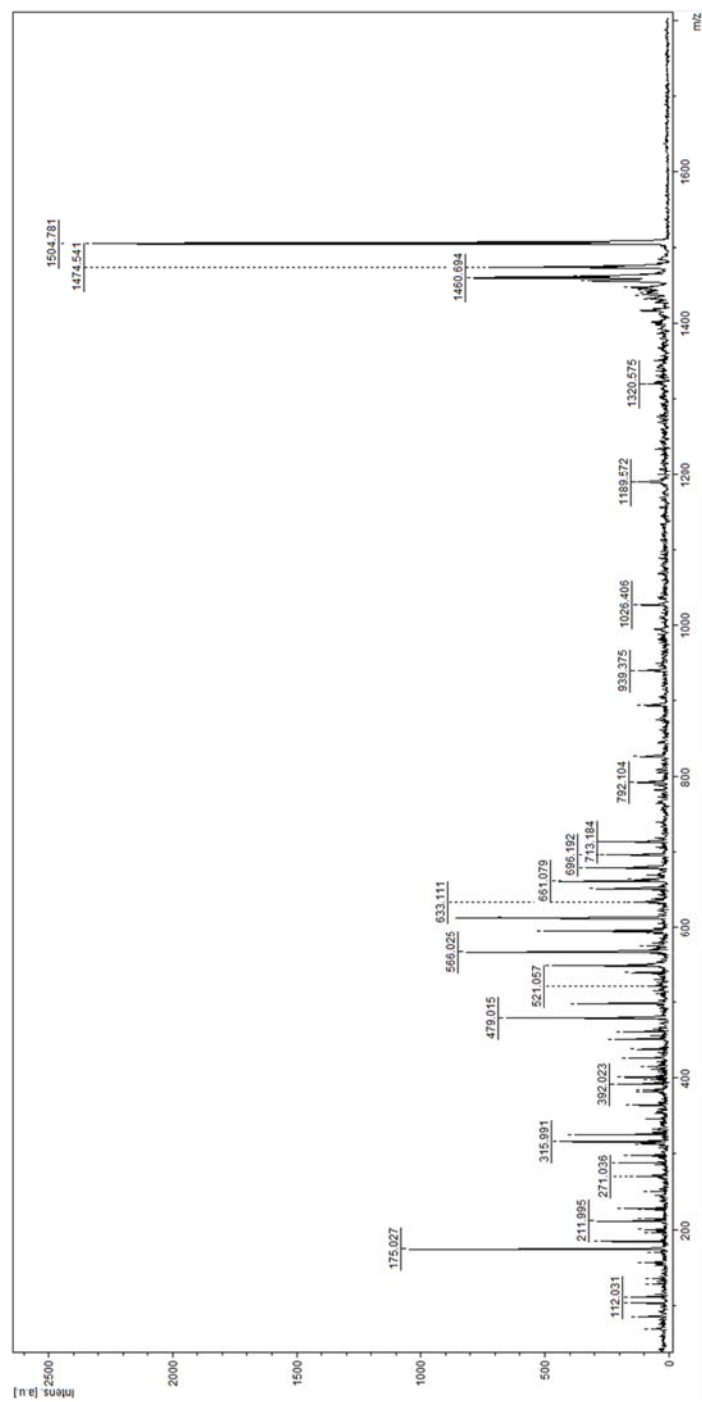
Ponadto analiza fragmentacyjna prekursora m/z 1504,781 pozwoliła wyznaczyć sekwencję peptydu SPMYSIITPNILR, który został zidentyfikowany jako białko komplement C3 (CO3_HUMAN Complement C3) (**Ryciny 14–18**). Prekursor m/z 1504,781 ulega dodatkowo procesowi oksydacji jako zmiennej modyfikacji (**Rycina 15**).



Rycina 14. Widmo MS sygnału m/z 1504,781 w zakresie mas od 700 do 3500 Da w trybie dodatniej jonizacji



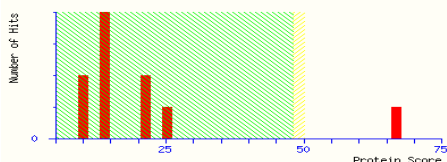
Rycina 15. Widmo MS sygnału m/z 1504,781 w zakresie mas od 700 do 3500 Da w trybie dodatniej jonizacji. Sygnał m/z 1504,781 ulega oksydacji jako zmiennej modyfikacji [+16 Da]



Rycina 16. Widmo MS/MS fragmentów sygnału 1504,781 w trybie LIFT

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 48 indicate peptides with significant homology. Individual ions scores > 50 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Peptide Summary Report

Format As	Peptide Summary	Help
Significance threshold p<	0.05	Max. number of hits
Standard scoring	<input checked="" type="radio"/> MudPIT scoring	Ions score or expect cut-off
Show pop-ups	<input checked="" type="radio"/> Suppress pop-ups	Sort unassigned
		Decreasing Score
		Require bold red

Overview Table

Click on column header to jump to entry in results list.
 Move mouse over any indicator to highlight identical peptides.
 Click on an indicator to see details of individual match.
 Use check boxes to select sub-set of queries for new search.

Mouse over:

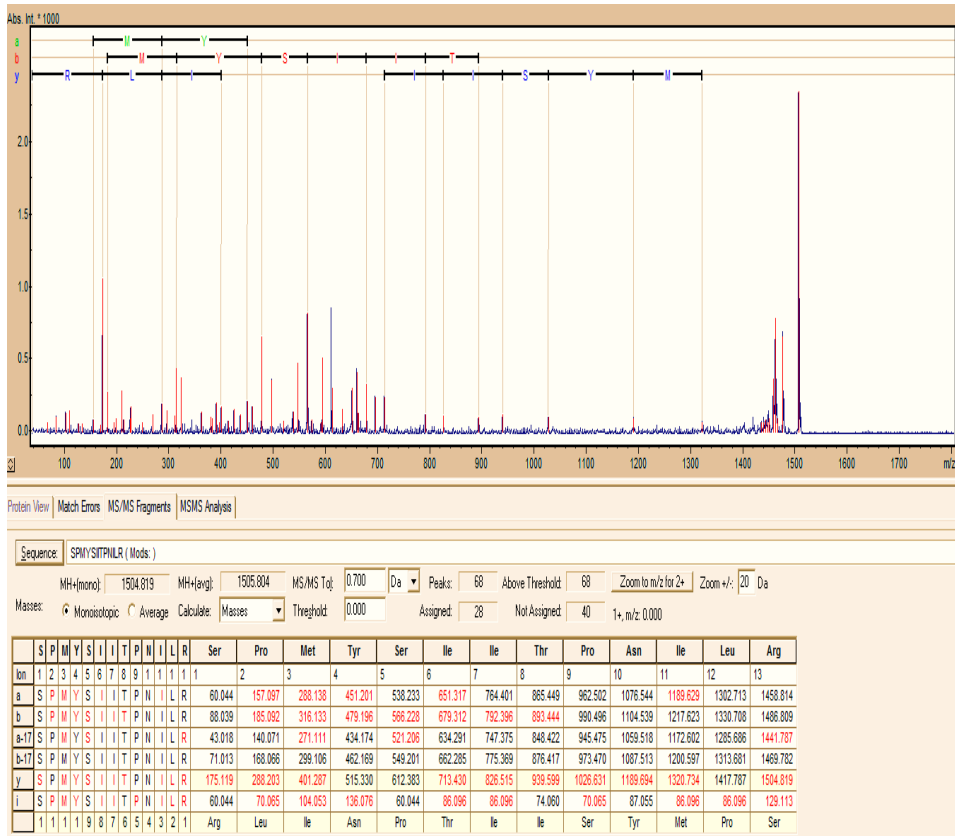
Hit: 1
 1504.7808 (1+)

Error tolerant

1. [COS_HUMAN](#) Mass: 187030 Score: 67 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)
 Complement C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
1	1504.7808	1503.7735	1503.8119	-25.52	0	76	0.00014	1	U	G.SPMYSITTPNILR.L

Rycina 17. Wynik identyfikacji dokonanej na podstawie białkowej bazy danych SwissProt z wyszukiwarką Mascot. Wysoka wartość parametru score równa 76 oraz p-value mniejsze niż 0,05 dla rozpoznanej sekwencji aminokwasowej potwierdzają prawidłową identyfikację białka komplement C3



Rycina 18. Analiza widma MS/MS sygnału m/z 1504,781 w programie BioTools przedstawia rozpoznanie fragmentów serii jonów typu b- oraz y-, które pozwoliły na identyfikację następującej sekwencji aminokwasowej SPMYSITPNILR

4.3. OZNACZANIE PANELU MARKERÓW BIAŁKOWYCH W SUROWICY Z WYKORZYSTANIEM METODY SEPARACJI MAGNETYCZNEJ I CYTOMETRII PRZEPŁYWOWEJ

Przy wykorzystaniu techniki separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej oznaczono stężenia 16 białek z panelu markerów nowotworowych w próbkach surowicy. Wszystkie białka zostały wykryte i oznaczone w 71 przeanalizowanych próbkach, a ich stężenia mieściły się w zakresie metody. W przypadku trzech próbek surowicy (o numerach: 17 – cecha G2, 18 – cecha G1, 65 – cecha G1) stężenia większości białek znalazły się poniżej zakresu metody, w związku z czym te próbki zostały wykluczone z dalszych analiz statystycznych.

Tabele 4a i 4b przedstawiają oznaczone stężenia wszystkich białek we wszystkich próbkach surowicy wykorzystanych do analiz statystycznych.

Tabela 4a. Oznaczone stężenia białek [pg/ml] z panelu markerów nowotworowych w surowicy pacjentek z rakiem endometrium (n = 71)

Próbka	Cecha G	sEGFR	FGF-basic	Follistatin	G-CSF	sHER2/neu	HGF	sIL-6Ra	Leptin
2	3	17016,4	255,62	509,7	108,91	4186,54	1705,11	15792,8	13032,8
4	1	13552,08	244,49	863,84	113,06	1975,84	8087,96	19594,05	5049,43
5	1	17047,4	251,6	716,52	115,82	4175,47	1539,21	15526,14	16742,08
7	2	6305,67	132,61	406,26	40,87	1900,4	877,13	6725,84	2286,11
8	2	6532,39	172,73	335,17	69,7	1845,26	1182,35	7061,96	9352,39
9	2	17193,44	220,25	770,01	85,23	3389,05	1411,68	18521,29	20732,12
10	1	12704,65	278,05	579,93	114,44	3379,71	3030,98	12832,58	16570,47
11	1	14866,46	243,47	617,41	99,9	3884,19	1600,45	12479,64	24486,6
12	2	21923,04	255,62	905,84	99,2	4538,99	1661,71	14191,46	21395,81
14	1	17591,05	264,52	596,23	115,82	3944,67	1825,15	14226,5	29497,57
19	3	17042,97	342,63	714,9	122,7	4339,99	2398,03	14100	19445,81
20	2	19634,77	240,38	757,05	107,53	3683,93	1707,66	10447,93	2721,07

21	3	21789,42	237,26	737,6	103,37	4680,72	1871,14	17064,73	11575,08
23	1	19355,51	264,52	1009,1	118,57	3650,62	1733,2	14876,53	8612,94
24	1	9647,8	206,99	398,01	149,33	1803,41	1126,35	10570,69	3600,35
25	2	19110,8	243,47	808,86	99,2	3919,24	1733,2	18855,34	34351,28
26	1	11412,37	197,88	802,39	79,61	2153,67	1365,79	9493,95	10295,16
27	2	12955,86	237,26	829,89	93,63	2844,49	1687,24	14791,27	16149,51
28	2	12809,77	243,47	1189,51	105,45	4005,39	3641,88	16680,01	8547,7
29	2	18181,25	262,56	695,43	105,45	3579,47	2131,9	13286,48	3982,64
30	2	19407,91	259,6	886,46	133,66	5616,7	1666,81	13240,77	7060,96
31	1	14380,2	265,5	499,88	104,76	2719	1518,8	14318,34	8934,46
32	1	18422,89	236,22	1298,94	85,23	3652,99	1465,23	12484,72	4547,94
33	2	13901,18	215,88	427,66	82,42	3499,83	1536,65	17863,73	10875,47
34	1	18348,24	211,46	540,76	93,63	4015,13	1432,08	14353,53	14565,93
35	1	6083,02	177,67	351,75	93,63	1752,31	894,91	6626,63	7390,59
36	1	18804,43	237,26	503,15	81,02	3352,89	1600,45	14930,27	32578,21
37	2	4182,7	237,26	724,63	45,99	1622,84	889,83	6171,13	4191,42
38	1	13124,56	278,05	636,93	126,81	3035,92	1421,88	16024,53	10598,75
39	2	17299,57	264,52	719,77	105,45	3543,43	1947,81	12586,59	15854,22
40	2	17303,99	239,34	1928,56	103,37	3858,87	1814,93	17984,32	2765,72
41	2	19224,46	267,45	687,31	115,13	3834,78	1947,81	17856,21	14477,82
45	1	15261,39	245,52	504,79	111,68	2447,73	1465,23	17139,84	5346,3
46	1	18839,47	253,61	421,08	116,5	3817,95	1325,01	11454,22	8287,95
47	2	5963,9	161,3	424,37	39,4	2125,84	877,13	6603,89	3110,18
49	3	13543	251,6	537,5	107,53	3912,59	2137,02	19537,32	30873,24
50	1	16101,41	233,08	799,15	111,68	3580,65	1687,24	11974,61	12295,67
51	1	2818,37	48,31	122,92	17,43	713,23	296,86	2791,72	859,9
52	2	3414,11	53,42	160,05	23,23	554,8	396,28	2586,13	3165,3

53	1	1512,08	64,15	187,64	25,67	845,22	630,23	7288,07	2392,93
54	3	3367,58	53,42	173,05	18,84	702,97	303,86	3539,45	3821,93
55	1	2835,74	70,7	146,21	37,16	719,85	434,58	4492,68	4536,14
57	2	3336,9	56,68	245,02	19,2	843,76	456,29	3650,92	2028,43
59	3	3917,15	64,4	106,92	26,71	934,56	393,73	4040,8	5910,73
60	1	1170,17	36,32	51,18	8,37	413,06	145,71	1062,99	1187,13
61	3	2277,22	50,9	99,92	20,25	576,81	295,59	3743,96	2227,03
62	1	3390,29	53,97	111,85	21,66	683,24	352,92	2848,88	4623,73
67	2	3552,17	63,65	155,17	19,2	599,78	396,92	2262,44	1340,32
72	3	3357,36	51,75	128,24	19,2	797,96	384,8	2533,29	2190,87
76	2	2906,24	60,87	156,79	23,41	570,72	402,66	2310,41	132,74
77	3	2592,66	54,79	149,47	22,71	601,96	336,35	3829,01	488,52
79	3	3281,14	69,27	124,97	28,61	852,96	393,73	4219,97	5483,14
83	3	2224,98	67,83	169,8	33,07	1006,37	501,01	2155,13	3589,21
85	3	1993,01	67,35	104,45	12,41	308,46	249,78	2512,1	1213,02
88	2	2681,33	67,35	138,87	25,15	847,41	513,79	3085,05	11338,02
89	3	4870,53	80,26	311,06	42,92	1379,48	378,42	5168,81	1504,78
90	2	3511,49	58,01	114,72	24,97	943,09	349,1	4032,57	2254,24
92	2	1494,7	46,54	47,8	8,74	349,49	158,38	1031,8	870,75
93	3	4797,37	59,84	117,18	24,45	863,65	363,12	3025,86	5245,53
98	2	2795,19	52,87	175,48	23,06	720,84	294,32	2030,37	1378,94
99	3	3104,06	45,94	126,2	19,2	824,7	412,87	2789,9	428,36
105	3	4176,52	52,87	152,32	16,71	980,72	277,77	3043,13	2896,45
108	3	3833,27	52,87	157,61	22,71	1019,64	356,11	4222,9	1536,38
112	3	4386,73	58,27	251,47	24,28	1513,47	536,81	3695,07	4749,31
113	3	2734,84	70,46	217,58	26,54	845,8	409,68	2290,28	4164,56
116	3	1991,8	63,9	95,38	14,57	590,93	234,53	1785,01	1735,6

126	3	2443,74	55,6	238,16	28,26	573,7	356,11	2764,53	330,41
129	3	3232,12	65,39	170,2	27,92	1074,13	530,42	4625,73	5383,51
137	3	2729,03	60,09	144,58	27,23	693,72	365,03	3866,44	4348,75
138	1	4412,1	49,18	91,25	16,36	875,4	377,15	2219,82	6512,41
140	3	5454,9	53,42	120,87	21,66	1247,2	433,3	4977,7	6511,02

Tabela 4b. Oznaczone stężenia białek [pg/ml] z panelu markerów nowotworowych w surowicy pacjentek z rakiem endometrium (n = 71)

Próbka G	Cecha	Osteopon- tin	PDGF-AB/BB	PECAM-1	Prolactin	SCF	sTIE-2	sVEGFR-1	sVEGFR-2
2	3	43774,77	3990,85	4101,47	132686,4	225,31	5534,77	1170,69	2889,86
4	1	45141,4	3037,01	4181,14	76730,68	282,62	7107,88	1090,5	2530,42
5	1	35575,66	3651,9	3299,53	129982,26	226,59	6557,25	1050,37	2577,62
7	2	21358,32	868	1855,86	17151,47	105,2	2835,91	248,79	1173,98
8	2	21270,99	1471,96	2360,93	16227,75	134,46	2804,17	438,64	1169,35
9	2	44052,2	3974,87	3904,39	90475,09	212,98	5673,86	824	2088,1
10	1	65449,28	4320,66	4295,31	53723,99	236,39	5465,27	1255,77	1708,96
11	1	35498,83	2109,36	3913,42	79826,54	221,48	7065,83	949,89	1938,09
12	2	38263,25	2531,2	4373,75	98332,84	210	5720,25	929,77	2502,11
14	1	59658,5	3681,12	3840,95	143330	207,03	8692,49	859,29	3089,18
19	3	60559,9	3371,18	4092,58	56159,8	256,9	4822,62	1430,59	2814,05
20	2	34985,81	11115,53	3967,47	104685,32	222,76	4813,39	889,51	2511,55
21	3	66399,56	2593,91	3895,35	93117,23	238,1	7959,84	1200,73	1989,62
23	1	46173,63	3751,23	4233,96	148116,22	243,22	5757,37	1290,77	2388,98
24	1	56712,33	2615,27	2338,99	21092,89	178,23	2699,97	717,97	1331,74
25	2	42189,41	2776	3694,51	82768,23	240,23	5432,84	1540,26	2092,79
26	1	19180,71	2430,09	2966,41	45411,17	139,07	3249,53	844,17	1517,78
27	2	38899,96	3952,17	3376,06	77814,44	237,67	3957,91	959,95	1863,2

28	2	51849,84	4066,17	3886,3	150256,76	240,66	6496,68	1525,31	2709,94
29	2	43418,35	6060,2	3877,24	69470,34	193,03	5887,35	1120,59	3136,71
30	2	40575,66	3612,08	3639,06	122195,46	214,25	7220,04	1005,18	2535,14
31	1	46587,12	4426,43	3299,53	60970,47	184,15	4527,63	1230,76	1863,2
32	1	46715,35	2270,8	3489,66	91544,76	199,82	5238,43	929,77	1919,36
33	2	44055,85	3341,11	3376,06	61080,52	192,19	5929,15	1150,65	2520,98
34	1	42150,05	2338,41	3804,53	85997,06	210,85	5534,77	596,4	1741,65
35	1	17531,37	934,19	2415,42	28569,56	107,28	1795,47	191,86	979,6
36	1	66219,23	1425,48	3904,39	62574,76	306,28	4951,86	949,89	1713,63
37	2	53583,45	902,54	1782,63	32563,34	103,11	2019,32	248,79	629,32
38	1	52019,05	4184,52	3886,3	119807,46	205,76	6394,22	1055,39	2116,26
39	2	66673,31	4512,56	4198,77	98875,38	165,14	5840,92	1270,77	2106,87
40	2	64501,49	1988,66	4572,08	150477,73	238,95	7472,62	949,89	1610,98
41	2	50933,61	4183,27	4606,28	75854,47	240,66	6091,79	894,54	2417,25
45	1	47215,07	5209,45	3731,31	178687,49	192,19	3172,12	753,34	1169,35
46	1	76180,45	4515,79	4110,34	97182,5	211,28	6771,73	748,29	2247,8
47	2	25286,26	512,79	2022,19	19679,05	116,04	3226,76	320,87	974,98
49	3	70677,93	2530,14	3527,23	142218,9	286,91	4656,61	1220,75	1592,33
50	1	52378,84	5618,37	4021,25	219057,17	195,58	7313,56	909,65	1769,68
51	1	12083,85	384,14	670,22	32427,81	38,55	1578,77	95,6	387,6
52	2	7220,08	1273,9	721,49	30562,25	37,29	1499,71	136,4	325,97
53	1	19059,03	891,04	1520,46	8660,63	146,5	2197,82	315,19	1001,65
54	3	6268,44	696,04	696,04	20453,16	38,02	732,8	258,83	365,48
55	1	10627,12	975,96	951,13	17689,02	67,22	1258,75	219,86	496,23
57	2	8411,93	788,39	872,42	19925,1	62,83	2692,35	75,08	429,58
59	3	5505,56	776,94	834,47	20106,82	52,71	1698,76	273,88	590,18

60	1	4373,3	138,86	417,57	4776,56	22,24	566,62	7,23	168,82
61	3	5247,55	758,41	766,45	15713,32	42,13	976,87	176,96	330,61
62	1	8525,48	527,72	683,18	13375,57	47,41	987,18	247,53	351,52
67	2	18011,19	799,45	761,51	30276,98	51,01	1300,36	156,71	499,75
72	3	10607,38	1348,96	841,63	14893,75	35,29	1027,32	277,64	492,72
76	2	13027,97	1018,4	726,54	22372,46	42,66	1108,89	260,08	407,41
77	3	14682,04	520,29	805,58	11593,62	45,83	1511,33	137,67	486,86
79	3	10821,95	1034,88	955,69	51081,16	63,9	929,94	219,86	454,11
83	3	12580,85	1007,57	791	7928,42	50,38	963,13	332,69	268,02
85	3	11268,69	824,62	584,75	9513,91	33,3	1224,11	219,86	207,97
88	2	12645,09	1248,89	991,87	21755,99	58,14	1335,06	347,67	355,01
89	3	13372,21	2644,67	1357,21	32230,92	72,59	1907,95	218,6	1245,7
90	2	11636,42	664,13	800,73	22123,7	51,01	797,58	312,69	445,93
92	2	5291,23	236,48	388,64	1820,06	21,83	828,33	32,34	263,4
93	3	11721,34	474,54	1123,71	7640,51	55,48	1757,12	197,17	578,41
98	2	4425,73	520,54	822,48	9667,83	32,04	1237,97	87,92	445,93
99	3	15601,29	530,12	810,43	28074,18	24,53	986,04	171,9	417,9
105	3	15099,41	711,89	766,45	17885,19	39,6	1304,98	194,65	569
108	3	14763,67	852,08	829,68	11107,45	50,8	900,22	161,78	465,8
112	3	19103,65	890,3	1225,52	15735,97	63,48	2486,58	223,64	765,17
113	3	11698,66	604,38	930,53	13085,18	53,35	974,58	347,67	414,41
116	3	6318,44	356,72	771,38	4514,76	34,56	1212,58	82,79	277,28
126	3	8295,54	1317,82	744,1	15122,51	43,4	911,65	166,84	377,12
129	3	11591,27	1170,88	881,81	48092,43	52,18	1725,6	312,69	534,93
137	3	10682,87	1112,54	746,6	11776,87	36,87	981,46	263,85	358,5
138	1	9533,25	644,75	1045,28	1450,48	43,4	647,84	173,17	559,6
140	3	10405,55	623,42	895,83	3184,1	51,01	2048,61	182,02	612,56

Z kolei **tabele 5–8** przedstawiają średnie, mediany, zakresy oraz odchylenia standardowe stężeń oznaczonych białek w próbkach surowicy odpowiednio dla wszystkich pacjentek z rakiem endometrium oraz z podziałem na trzy grupy pacjentek: cecha G1 (n = 23), cecha G2 (n = 24) oraz cecha G3 (n = 24).

Tabela 5. Statystyki opisowe (średnie, mediany, wartości minimalne i maksymalne oraz odchylenia standardowe) dla stężeń białek [pg/ml] oznaczonych w próbkach surowicy pobranych od wszystkich pacjentek z rakiem endometrium bez podziału na grupy (n = 71)

Białko	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Odch. stand.
sEGFR	9344,54	5963,9	1170,17	21923	6891,96
FGF-basic	152,27	161,3	36,32	342,6	94,77
Follistatin	439,45	351,75	47,8	1928,6	356,05
G-CSF	63,06	42,92	8,37	149,3	42,71
sHER2/neu	2131,54	1752,31	308,46	5616,7	1470,28
HGF	1136,13	877,13	145,71	8088	1126,93
sIL-6Ra	8715,39	6626,63	1031,8	19594,1	6004,28
Leptin	8148,76	5049,43	132,74	34351,3	8156,59
Osteopontin	29636,69	19180,71	4373,3	76180,5	21152,47
PDGF-AB/BB	2158,38	1317,82	138,86	11115,5	1882
PECAM-1	2275,7	1855,86	388,64	4606,3	1488,99
Prolactin	55370,62	32230,92	1450,48	219057,2	50710,5
SCF	130,76	107,28	21,83	306,3	87,82
sTIE-2	3394,24	2692,35	566,62	8692,5	2386,82
sVEGFR-1	586,66	332,69	7,23	1540,3	447,17
sVEGFR-2	1265,97	1001,65	168,82	3136,7	900,64

Tabela 6. Statystyki opisowe (średnie, mediany, wartości minimalne i maksymalne oraz odchylenia standardowe) dla stężeń białek [pg/ml] oznaczonych w próbkach surowicy pobranych od pacjentek z rakiem endometrium i cechą G1 (n = 23)

Białko	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Odch. stand.
sEGFR	11812,25	13552,08	1170,17	19355,5	6390,09
FGF-basic	191,85	236,22	36,32	278,1	87,46
Follistatin	515,26	504,79	51,18	1298,9	318,01
G-CSF	85,14	99,9	8,37	149,3	41,97
sHER2/neu	2504,01	2719	413,06	4175,5	1302,74
HGF	1537,28	1432,08	145,71	8088	1570,29
sIL-6Ra	10852,65	12479,64	1062,99	19594,1	5292,33
Leptin	10413,59	8287,95	859,9	32578,2	8609,43
Osteopontin	38025,6	45141,4	4373,3	76180,5	21292,86
PDGF-AB/BB	2612,28	2430,09	138,86	5618,4	1671
PECAM-1	2913,93	3489,66	417,57	4295,3	1346,7
Prolactin	74825,44	62574,76	1450,48	219057,2	59482,25
SCF	170,14	195,58	22,24	306,3	80,16
sTIE-2	4327,49	4951,86	566,62	8692,5	2489,79
sVEGFR-1	716,64	844,17	7,23	1290,8	403,57
sVEGFR-2	1546,47	1713,63	168,82	3089,2	798,46

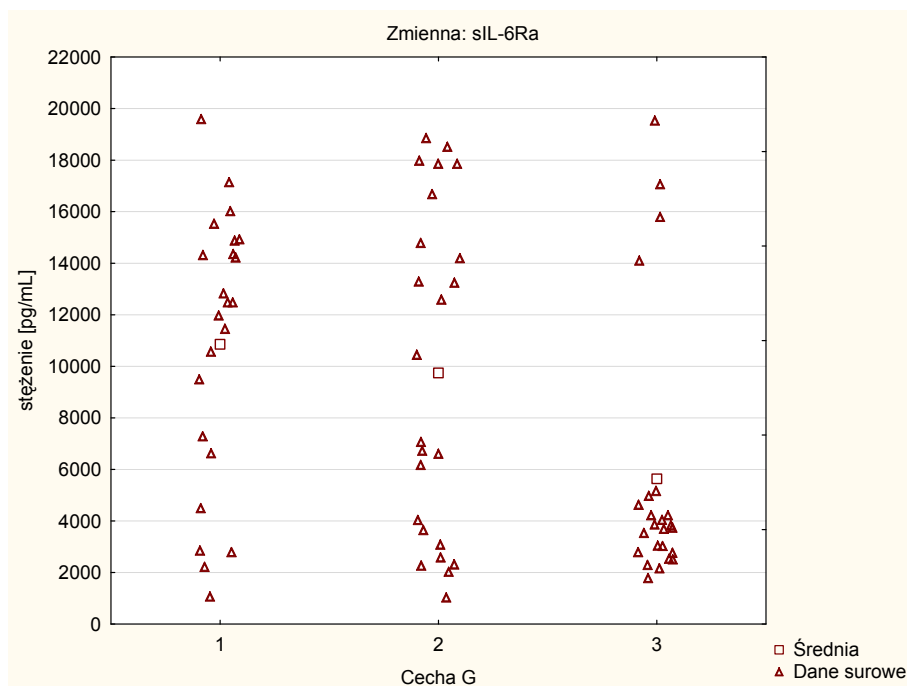
Tabela 7. Statystyki opisowe (średnie, mediany, wartości minimalne i maksymalne oraz odchylenia standardowe) dla stężeń białek [pg/ml] oznaczonych w próbkach surowicy pobranych od pacjentek z rakiem endometrium i cechą G2 (n = 24)

Białko	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Odch. stand.
sEGFR	10650,95	9671,08	1494,7	21923	7265,07
FGF-basic	171,38	218,07	46,54	267,5	88,4
Follistatin	570,45	557,49	47,8	1928,6	431,34
G-CSF	66,61	76,06	8,74	133,7	39,91
sHER2/neu	2468,27	2485,17	349,49	5616,7	1557,91
HGF	1236,81	1297,02	158,38	3641,9	822,21
sIL-6Ra	9744,08	8754,95	1031,8	18855,3	6383,74
Leptin	8348,47	4087,03	132,74	34351,3	8497,94
Osteopontin	31773,64	36624,53	4425,73	66673,3	19147,35
PDGF-AB/BB	2600,8	1730,31	236,48	11115,5	2434,18
PECAM-1	2565,8	2868,5	388,64	4606,3	1515,39
Prolactin	59433,86	46821,93	1820,06	150477,7	45202,51
SCF	142,67	149,8	21,83	240,7	82,24
sTIE-2	3842,63	3592,34	797,58	7472,6	2260,75
sVEGFR-1	655,27	631,32	32,34	1540,3	480,97
sVEGFR-2	1467,34	1392,48	263,4	3136,7	963,23

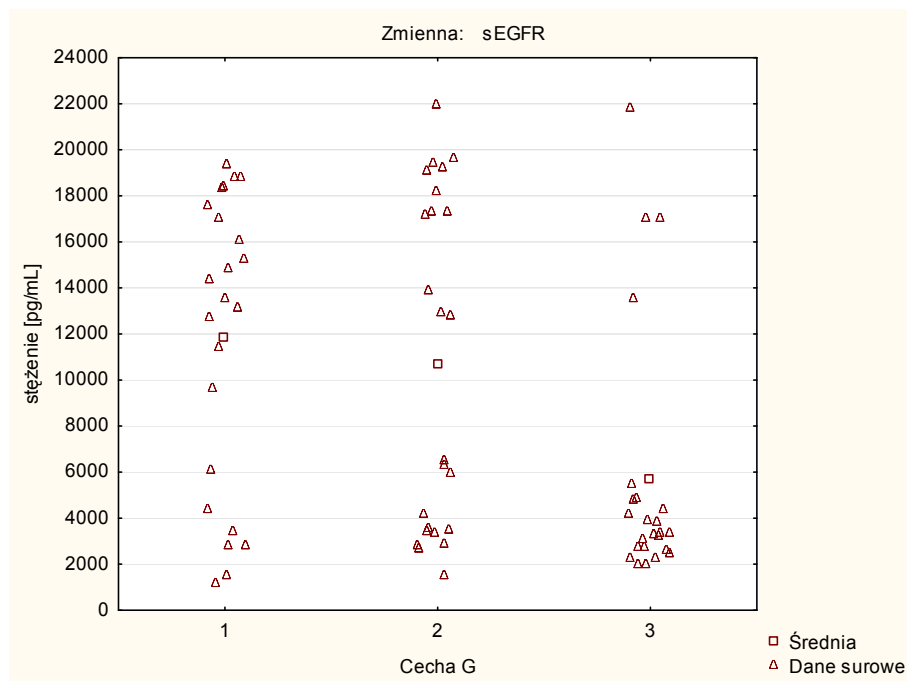
Tabela 8. Statystyki opisowe (średnie, mediany, wartości minimalne i maksymalne oraz odchylenia standardowe) dla stężeń białek [pg/ml] oznaczonych w próbkach surowicy pobranych od pacjentek z rakiem endometrium i cechą G3 (n = 24)

Białko	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Odch. stand.
sEGFR	5673,24	3362,47	1991,8	21789,4	5548,72
FGF-basic	95,24	62	45,94	342,6	82,84
Follistatin	235,8	154,97	95,38	737,6	190
G-CSF	38,37	25,5	12,41	122,7	33,73
sHER2/neu	1437,88	899,11	308,46	4680,7	1330,26
HGF	651,01	389,27	234,53	2398	642,97
sIL-6Ra	5638,5	3786,49	1785,01	19537,3	5160,16
Leptin	5778,59	3993,25	330,41	30873,2	6952,34
Osteopontin	19460,36	11710	5247,55	70677,9	19448,41
PDGF-AB/BB	1280,96	871,19	356,72	3990,9	984,96
PECAM-1	1373,98	838,05	584,75	4101,5	1171,71
Prolactin	32663,19	15724,65	3184,1	142218,9	38277,08
SCF	81,11	50,91	24,53	286,9	79,32
sTIE-2	2051,48	1264,55	732,8	7959,8	1826,4
sVEGFR-1	393,49	221,75	82,79	1430,6	400,88
sVEGFR-2	795,77	489,79	207,97	2889,9	761,19

Ryciny 19 i 20 przedstawiają rozrzut danych surowych dla dwóch przykładowych białek dla próbek pobranych od pacjentek z rakiem endometrium z podziałem na trzy grupy: cecha G1 (n = 23), cecha G2 (n = 24) oraz cecha G3 (n = 24).



Rycina 19. Rozrzut danych surowych dla białka sIL-6Ra dla próbek pobranych od pacjentek z rakiem endometrium z podziałem na trzy grupy: cecha G1 (n = 23), cecha G2 (n = 24) oraz cecha G3 (n = 24)



Rycina 20. Rozrzut danych surowych dla białka sEGFR dla próbek pobranych od pacjentek z rakiem endometrium z podziałem na trzy grupy: cecha G1 (n = 23), cecha G2 (n = 24) oraz cecha G3 (n = 24)

Na rycinach można zauważyć, że stężenia w grupie z cechą G3 były niższe w porównaniu do stężeń w pozostałych grupach. We wszystkich grupach raka endometrium G1, G2 i G3 stężenia białek były niższe w porównaniu z grupą kontrolną z wyjątkiem FGF-basic w grupach G1 i G2, G-CSF w grupie G1, osteopontyny w grupie G1 oraz prolaktyny we wszystkich trzech grupach (**Tabela 9**).

Tabela 9. Mediany stężeń markerów dla cech G1, G2 i G3 i grupy kontrolnej

Białko	Stężenia bezwzględne – mediany (pg/ml)			
	G1	G2	G3	Grupa kontrolna
sEGFR	13552,08	9671,08	3362,47	22009,43
FGF-basic	236,22	218,07	62	189,85
Follistatin	504,79	557,49	154,97	629,53
G-CSF	99,9	76,06	25,5	87,51
sHER2/neu	2719	2485,17	899,11	4428,57
HGF	1432,08	1297,02	389,27	1444,71
sIL-6Ra	12479,64	8754,95	3786,49	17929,81
Leptin	8287,95	4087,03	3993,25	12370,69
Osteopontin	45141,4	36624,53	11710	38185,47
PDGF-AB/BB	2430,09	1730,31	871,19	4007,5
PECAM-1	4389,66	2868,5	838,05	4981,73
Prolactin	62574,76	46821,93	15724,65	8799,15
SCF	195,58	149,8	50,91	208,57
sTIE-2	4951,86	3592,34	1264,55	7886,31
sVEGFR-1	844,17	631,32	82,79	292,56
sVEGRF-2	1713,63	1392,48	489,79	3520,94

Wyniki otrzymane przy wykorzystaniu techniki separacji magnetycznej i cytometrii przepływownej poddano następnie statystycznej analizie danych. Celem analizy statystycznej było porównanie poziomów stężeń oznaczonych białek pomiędzy surowicami pobranymi od pacjentek z rakiem endometrium o różnych wartościach cechy G oraz pomiędzy próbkami uzyskanymi od pacjentek z rakiem endometrium a materiałem z grupy kontrolnej ($n = 48$). Przeprowadzono analizy statystyczne, zarówno jednozmiennowe, jak też wielozmiennowe. Do wykonania analiz wykorzystano program STATISTICA 12 (Statsoft, Polska) oraz platformę MetaboAnalyst 3.0 (www.metaboanalyst.ca). We wszystkich przeprowadzonych analizach statystycznych za istotną statystycznie została przyjęta wartość $p \leq 0,05$.

Analizy jednozmiennowe polegały na porównaniu stężeń poszczególnych zmiennych (białek) pomiędzy próbkami pobranymi od pacjentek z rakiem endometrium a próbkami uzyskanymi z grupy kontrolnej oraz pomiędzy próbkami pobranymi od pacjentek z poszczególnymi wartościami cechy G a próbkami uzyskanymi z grupy kontrolnej. W pierwszej kolejności sprawdzona została normalność rozkładu analizowanych białek w surowicy przy wykorzystaniu testu W Shapiro-Wilka. Ponieważ rozkład stężeń białek nie spełniał założeń o normalności rozkładu, wyniki poddano następnie analizie statystycznej z użyciem nieparametrycznego testu U Manna-Whitneya. W przypadku porównania pomiędzy próbkami pobranymi od wszystkich pacjentek z rakiem endometrium a surowicami pozyskanymi od kobiet z grupy kontrolnej okazało się, że stężenia 14 spośród 16 białek różniły się istotnie statystycznie (**Tabela 9**).

Tabela 10. Wyniki testu U Manna-Whitneya dla porównania poziomów stężeń białek pomiędzy próbkami pobranymi od wszystkimi pacjentek z rakiem endometrium (n = 71) a próbkami pozyskanymi od kobiet z grupy kontrolnej (n = 48). Kolorem czerwonym zaznaczone zostały zmienne, których stężenia różniły się istotnie statystycznie między analizowanymi grupami

Białko	p
sEGFR	>0,000001
FGF-basic	0,631635
Follistatin	0,001461
G-CSF	0,010478
sHER2/neu	>0,000001
HGF	0,007758
sIL-6Ra	>0,000001
Leptin	0,067520
Osteopontin	0,033045
PDGF-AB/BB	0,000001
PECAM-1	>0,000001
Prolactin	>0,000001
SCF	0,000116
sTIE-2	>0,000001
sVEGFR-1	0,009391
sVEGFR-2	>0,000001

Tabela 11. Wyniki testu U Manna-Whitneya dla porównania poziomów stężeń białek pomiędzy próbkami pobranymi od pacjentek z rakiem endometrium z cechą G1 (n = 23) a próbkami pozyskanymi od kobiet z grupy kontrolnej (n = 48). Kolorem czerwonym zaznaczone zostały zmienne, których stężenia różniły się istotnie statystycznie między analizowanymi grupami

Białko	p
sEGFR	>0,000001
FGF-basic	0,029177
Follistatin	0,207879
G-CSF	0,526842
sHER2/neu	0,000036
HGF	0,662699
sIL-6Ra	0,000622
Leptin	0,897348
Osteopontin	0,763394
PDGF-AB/BB	0,010051
PECAM-1	0,000001
Prolactin	>0,000001
SCF	0,221497
sTIE-2	0,000006
sVEGFR-1	0,000192
sVEGFR-2	>0,000001

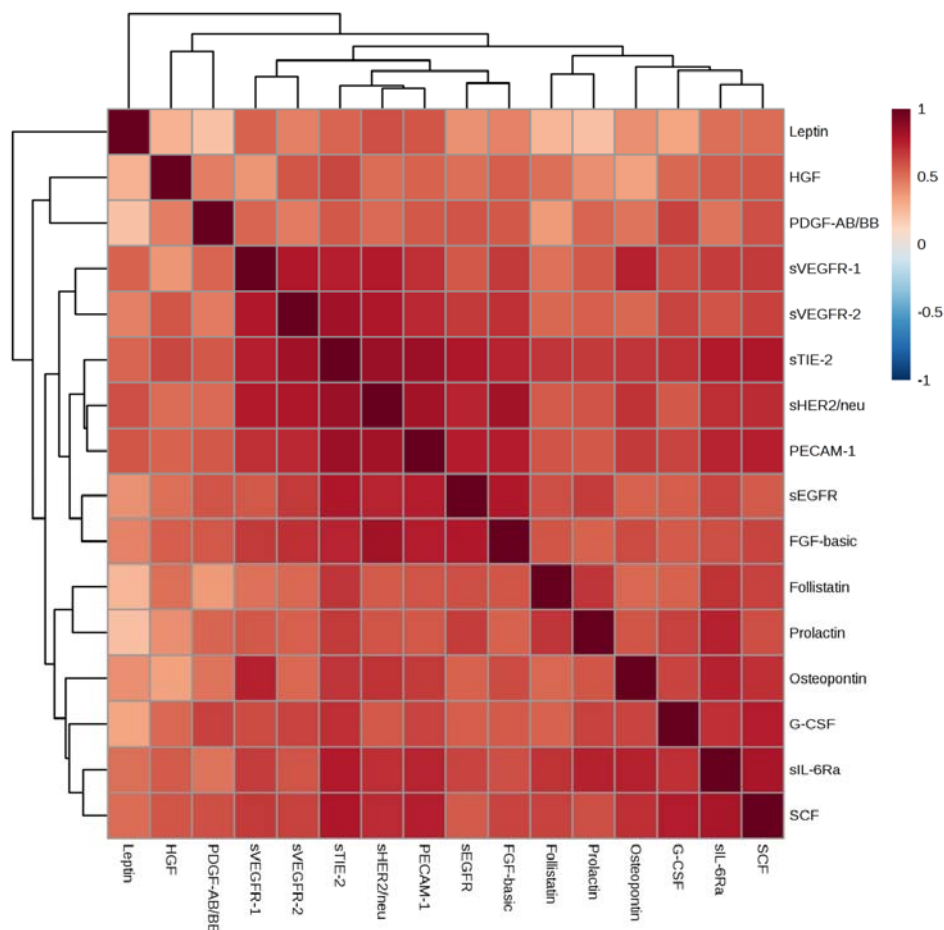
Tabela 12. Wyniki testu U Manna-Whitneya dla porównania poziomów stężeń białek pomiędzy próbkami pobranymi od pacjentek z rakiem endometrium z cechą G2 (n = 24) a próbkami pozyskanymi od kobiet z grupy kontrolnej (n = 48). Kolorem czerwonym zaznaczone zostały zmienne, których stężenia różniły się istotnie statystycznie między analizowanymi grupami

Białko	p
sEGFR	>0,000001
FGF-basic	0,499693
Follistatin	0,469857
G-CSF	0,124741
sHER2/neu	0,000079
HGF	0,244141
sIL-6Ra	0,000842
Leptin	0,178993
Osteopontin	0,354564
PDGF-AB/BB	0,003629
PECAM-1	>0,000001
Prolactin	>0,000001
SCF	0,013633
sTIE-2	0,000001
sVEGFR-1	0,006572
sVEGFR-2	>0,000001

Tabela 13. Wyniki testu U Manna-Whitneya dla porównania poziomów stężeń białek pomiędzy próbkami pobranymi od pacjentek z rakiem endometrium z cechą G3 (n = 24) a próbkami pozyskanymi od kobiet z grupy kontrolnej (n = 48). Kolorem czerwonym zaznaczone zostały zmienne, których stężenia różniły się istotnie statystycznie między analizowanymi grupami

Białko	p
sEGFR	>0,000001
FGF-basic	0,000111
Follistatin	>0,000001
G-CSF	0,000002
sHER2/neu	>0,000001
HGF	0,000020
sIL-6Ra	0,000002
Leptin	0,004906
Osteopontin	0,000048
PDGF-AB/BB	>0,000001
PECAM-1	>0,000001
Prolactin	0,000025
SCF	0,000001
sTIE-2	>0,000001
sVEGFR-1	0,538399
sVEGFR-2	>0,000001

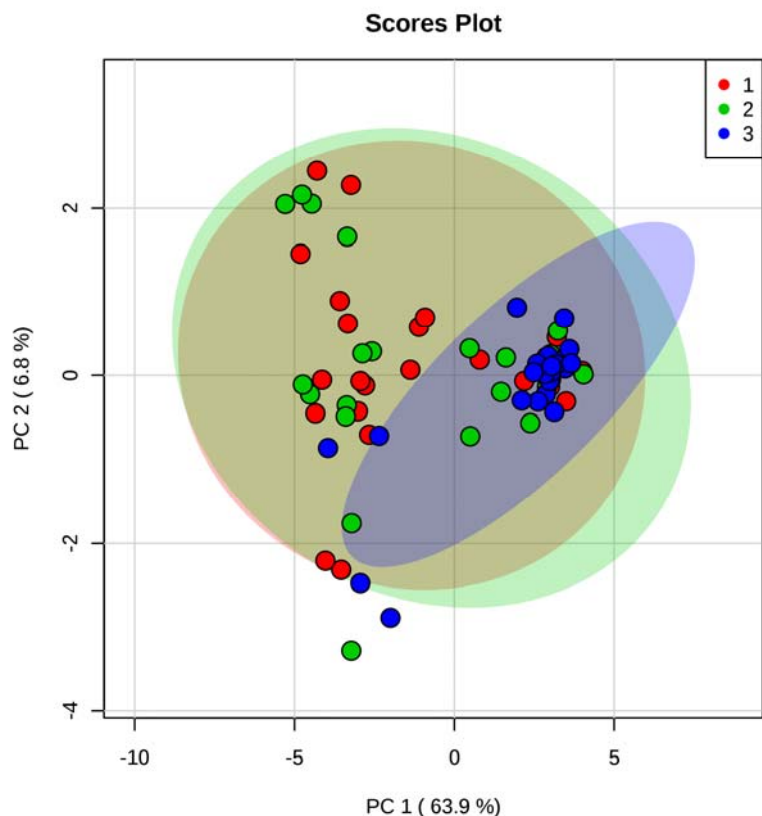
Stężenia białek otrzymane dla próbek pobranych od pacjentek z rakiem endometrium poddano analizie korelacji, której wynik przedstawiony jest na **rycynie 21**. Analiza korelacji pozwala określić, czy dane dwie zmienne są ze sobą skorelowane i w jakim stopniu.



Rycina 21. Analiza korelacji (grupa badana). Kolor czerwony oznacza zmienne skorelowane dodatnio. Im bardziej intensywny kolor, tym korelacja danych zmiennych jest większa

Analizę wielozmiennową przeprowadzono w celu porównania pełnych profili białek z panelu markerów nowotworowych pomiędzy różnymi grupami pacjentek. Wykonane zostały analizy: PCA (ang. *principal component analysis* – analiza głównych składowych) oraz PLS-DA (ang. *partial least squares-discriminant analysis*). W pierwszej kolejności wykonana została wstępna obróbka danych, która polegała na przeprowadzeniu skalowania zmiennych (autoskalowanie) w celu umożliwienia porównywania zmiennych między sobą.

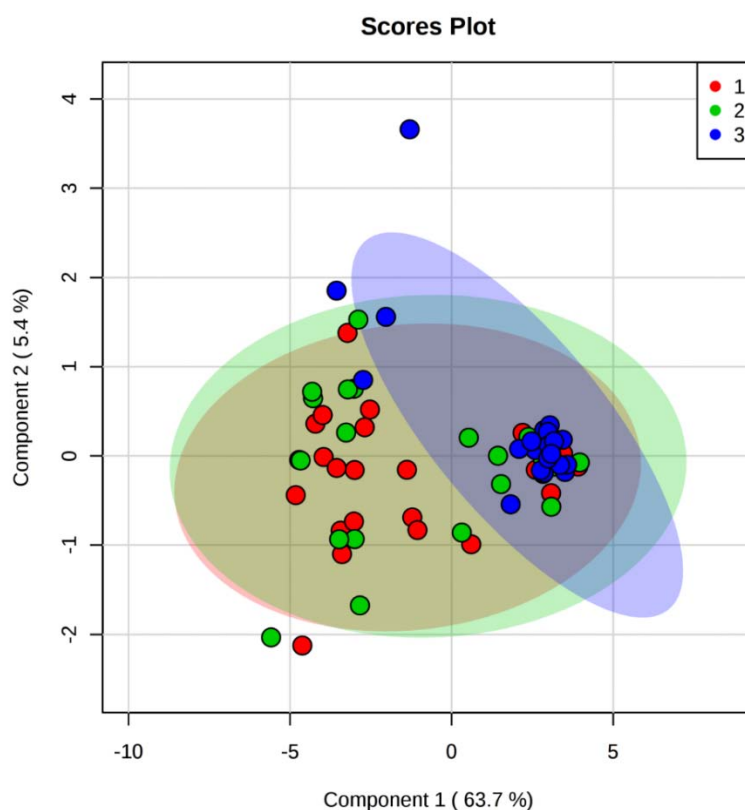
Przeprowadzono najpierw analizy dla próbek pobranych od pacjentek z rakiem endometrium w zależności od cechy G. Wynik PCA przedstawia **rycina 22**.



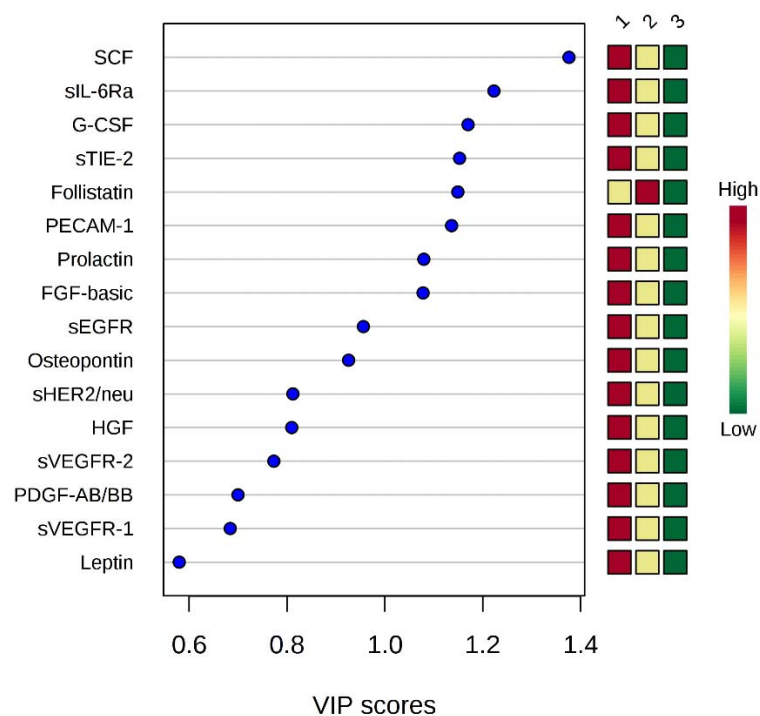
Rycina 22. Wykres wektorów odległości pierwszej głównej składowej względem drugiej głównej składowej otrzymany w PCA przeprowadzonej dla próbek pobranych od pacjentek z rakiem endometrium z podziałem na grupy w zależności od cechy G. Wartości w nawiasach odpowiadają procentowi wyjaśnianej zmienności przez poszczególne główne składowe

Można na niej zauważyć, że nie zaobserwowano żadnego grupowania się próbek pobranych od pacjentek z cechą G1 oraz G2, natomiast w wyraźny sposób grupuje się większość próbek od pacjentek z cechą G3; 20 spośród 24 próbek z tej grupy tworzy wyraźne skupienie, co świadczy o tym, że profile białek dla cechy G3 charakteryzują się dużym wzajemnym podobieństwem. Jednocześnie należy zauważyć, że w tym samym miejscu na wykresie lokuje się kilka punktów odpowiadających próbkom pobranym od pacjentek z cechą G1 oraz G2. Ponadto

bardzo wysoki procent wyjaśnianej zmienności przez pierwszą główną składową (PC1 – 63,9%) świadczy o tym, że próbki skupione po prawej stronie ryciny znacząco różnią się profilem białkowym od pozostałych próbek, a cecha G nie jest tym parametrem, który całkowicie i jednoznacznie odpowiada za zauważone grupowanie. Otrzymane wyniki dla pełnych profili białek są zbieżne z wynikami statystyk opisowych (**Ryciny 19 i 20**). Wynik PLS-DA przedstawia **rycina 23** i jest on podobny do wyniku PCA dla tego samego zbioru danych. Ranking wartości VIP (ang. *variable importance in projection*) dla PLS-DA przedstawiono na **rycinie 24**. Szereguje on białka zgodnie z ich wkładem do separacji grup. Im większa wartość VIP, tym większe jest znaczenie danego białka w modelu statystycznym.



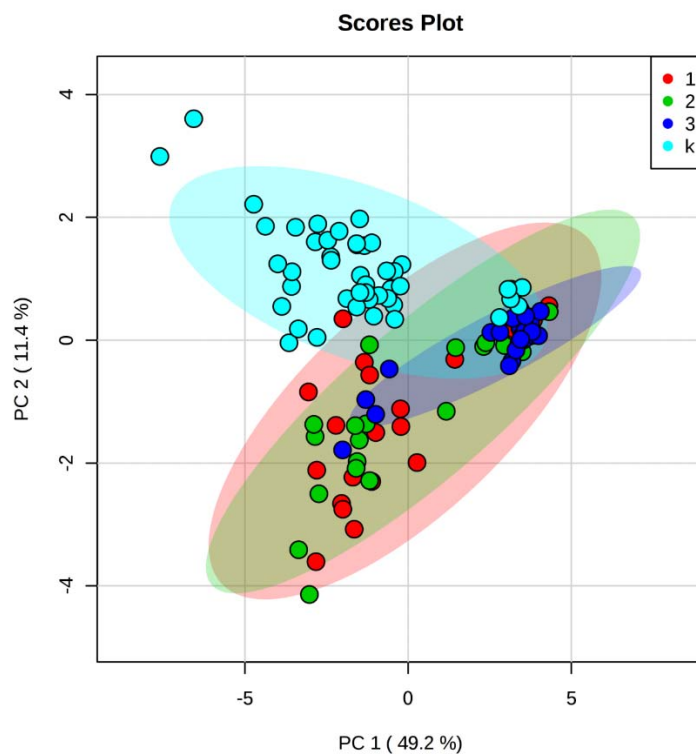
Rycina 23. Wykres wektorów odległości pierwszej składowej względem drugiej składowej otrzymany w PLS-DA przeprowadzonej dla próbek pobranych od pacjentek z rakiem endometrium z podziałem na grupy w zależności od cechy G. Wartości w nawiasach odpowiadają procentowi wyjaśnianej zmienności przez poszczególne składowe



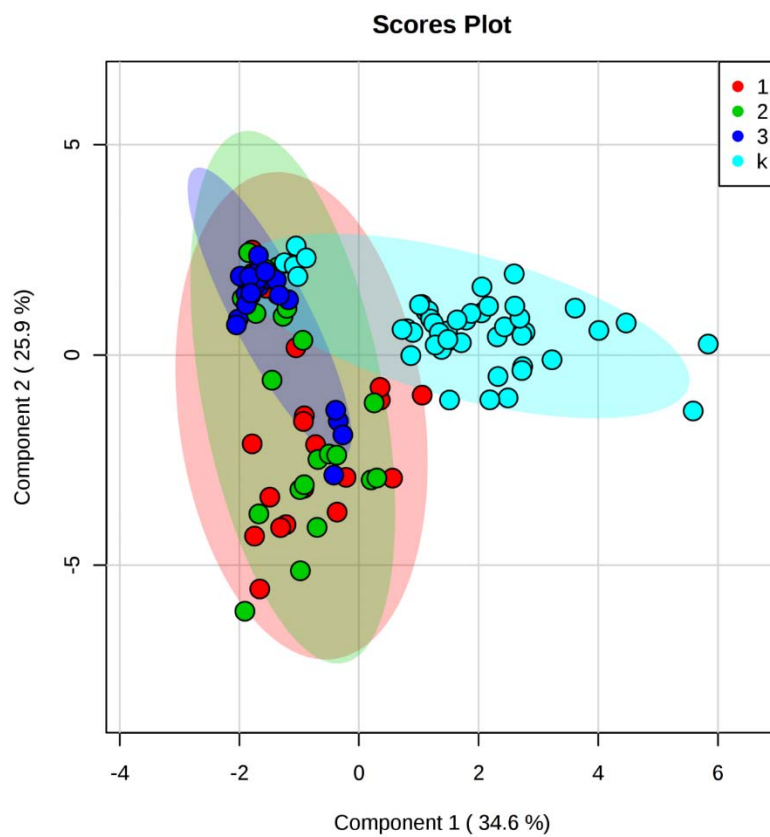
Rycina 24. Ranking wartości VIP dla PLS-DA przeprowadzonej dla próbek pobranych od pacjentek z rakiem endometrium z podziałem na grupy w zależności od cechy G. Kolorowe pola po prawej stronie wskazują na to, jak kształtują się średnie poziomy odpowiedniego białka w danej grupie

Następnie przeprowadzono analizy dla próbek pobranych od pacjentek z rakiem endometrium w zależności od cechy G oraz dodatkowo dla próbek pozyskanych od kobiet z grupy kontrolnej. Wynik PCA przedstawia **rycina 25**. Można na niej zauważyć, że większość punktów odpowiadających próbkom otrzymanym z grupy kontrolnej koncentruje się w lewej górnej części wykresu, natomiast kilka próbek z tej grupy znajduje się w obrębie skupienia po prawej stronie wykresu, obejmującego głównie próbki pobrane od pacjentek z cechą G3. Niemniej jednak druga główna składowa (PC2 – 11,4%) oddziela niemalże wszystkie próbki pozyskane z grupy kontrolnej od próbek pobranych od pacjentek z ra-

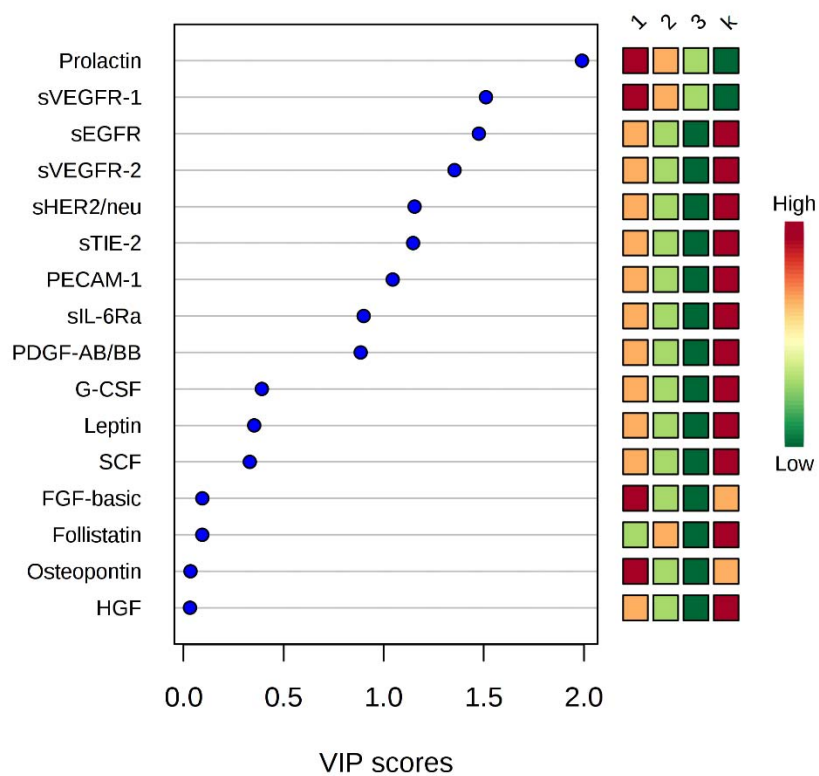
kiem. Wynik PLS-DA przedstawia **rycina 26** i jest on stosunkowo podobny do wyniku PCA dla tego samego zbioru danych, jednakże w tym przypadku oddzielenie grupy kontrolnej od grupy z rakiem przez pierwszą i drugą składową nie jest tak wyraźne. Ranking wartości VIP dla PLS-DA przedstawiono na **rycinie 27**.



Rycina 25. Wykres wektorów odległości pierwszej głównej składowej względem drugiej głównej składowej otrzymany w PCA przeprowadzonej dla próbek pobranych od pacjentek z rakiem endometrium z podziałem na grupy w zależności od cechy G oraz dla próbek pochodzących od kobiet z grupy kontrolnej. Wartości w nawiasach odpowiadają procentowi wyjaśnianej zmienności przez poszczególne główne składowe



Rycina 26. Wykres wektorów odległości pierwszej składowej względem drugiej składowej otrzymany w PLS-DA przeprowadzonej dla próbek pobranych od pacjentek z rakiem endometrium z podziałem na grupy w zależności od cechy G oraz dla próbek pochodzących od kobiet z grupy kontrolnej. Wartości w nawiasach odpowiadają procentowi wyjaśnianej zmienności przez poszczególne składowe



Rycina 27. Ranking wartości VIP dla b PLS-DA przeprowadzonej dla próbek pobranych od pacjentek z rakiem endometrium z podziałem na grupy w zależności od cechy G oraz dla próbek pochodzących od kobiet z grupy kontrolnej. Kolorowe pola po prawej stronie wskazują na to, jak kształtują się średnie poziomy odpowiedniego białka w danej grupie

5. DYSKUSJA

Rak endometrium jest najczęściej rozpoznawanym nowotworem narządów płciowych u kobiet w krajach rozwiniętych. Zachorowalność będzie rosła ze względu na zwiększanie się długości życia oraz tendencję do otyłości w zindustrializowanych społeczeństwach. Mimo że rokowanie u chorych z rakiem endometrium jest znacznie lepsze niż u innych chorych na nowotwory złośliwe narządów płciowych, nadal istnieje kilka dotychczas nierozwiązanych problemów związanych z zachorowaniami na EC. Problemem pierwszym jest wykrywanie, a właściwie brak wczesnego wykrywania raka u kobiet niemających objawów klinicznych. Zwykle nowotwór jest względnie szybko rozpoznawany, ponieważ objawy kliniczne w postaci krwawień z macicy u kobiet już niemiesiączkujących są trudne do przeoczenia. Jednak u części chorych na raka endometrium krwawienia nie występują. W tych przypadkach wykrycie choroby jest utrudnione, czego skutkiem może być ukryty rozwój nowotworu i rozpoznanie go już w fazie rozsiewu.

Od wielu lat implementuje się do oceny endometrium badania ultrasonograficzne wykonane za pomocą sondy dopochwowej. W opublikowanej niedawno metaanalizie przeprowadzonej na podstawie zebranych ponad trzydziestu publikacji dostępnych w ogólnodostępnych medycznych bazach danych stwierdzono, że ocena grubości endometrium w badaniu ultrasonograficznym u niekrwawiących kobiet po menopauzie nie jest adekwatną metodą do wykrywania raka oraz stanu przedrakowego – hiperplazji endometrium z atypią [131]. Nieznane są także surowicze markery, które można by oznaczać rutynowo z surowicy krwi, a które zdolne byłyby wskazać tę grupę bezobjawowych chorych.

Problem pozostaje nierozwiązany i badanie proteomu kobiet zdrowych i chorych może w przyszłości przyczynić się do zidentyfikowania istnienia ukrytej choroby. Także identyfikacja białek towarzyszących wczesnym postaciom choroby, czyli stworzenie bazy biomarkerów molekularnych wykrywanych w surowicy lub – jeszcze lepiej – w moczu, może znaleźć zastosowanie jako test skringowy w wykrywaniu raka błony śluzowej macicy.

Innym, dotychczas nierozwiązany problemem jest stratyfikacja chorych przed planowanym leczeniem. U kobiet, u których nowotwór jest ograniczony do błony śluzowej macicy, rokowanie jest bardzo pomyślne. Prawie wszystkie zostają trwale wyleczone. Jednak wśród tej grupy istnieje podgrupa chorych (około 10%), dotychczas niezidentyfikowana, u których obserwuje się szybki na-

wrót choroby [132]. Ani klasyfikacja klinicznego zaawansowania raka endometrium według FIGO, ani ocena gradingu nie pozwalają na wyodrębnienie chorych z rakiem nisko zaawansowanym i dużym ryzykiem szybkiego nawrotu [133]. Identyfikacja tych chorych jest pilną potrzebą i może pozwolić na wprowadzenie innego leczenia niż dotychczas rutynowo stosowane. Wydaje się, że właśnie badania genomiczne i proteomiczne będą przydatne dla wyróżnienia tej grupy [134]. Obecnie nie jest znany także biomarker, surowiczy czy tkankowy, na podstawie którego można by zidentyfikować agresywną postać raka endometrium [135].

Technologie proteomiczne oparte na spektroskopii masowej są wykorzystywane w onkologii od niedawna. Ich niewątpliwą zaletą jest możliwość wykrycia i jednocześnie identyfikacji względnie niewielkich ilości białek obecnych w surowicy lub moczu chorych na nowotwór złośliwy. Poprzez porównanie z proteomami osób zdrowych proces ten pozwala na ustalenie wzoru biomarkerów związanego z daną chorobą, w przypadku badań będących tematem rozprawy – raka endometrium [12]. Guz nowotworowy, szczególnie w początkach swego wzrostu, jest mały, niewidoczny dla oka i badań obrazowych. Nie wiadomo, czy profil białek produkowanych przez jego komórki jest w dużej mierze taki sam jak w raku dużym, zaawansowanym klinicznie. Wykrycie niewielkich stężeń białek charakterystycznych dla nowotworu może mieć kluczowe znaczenie dla chorego, jeśli chodzi o leczenie i rokowania. Ułomnością powszechnie stosowanych w praktyce klinicznej badań surowicznych markerów jest niska czułość tych metod. Uważa się, że stężenie białek produkowanych przez komórki nowotworowe we wczesnym stadium rozwoju nowotworu może być nawet 10 milionów razy mniejsze w porównaniu do białek produkowanych przez zdrowe komórki. Wykrywanie i identyfikacja tych niewielkich ilości w surowicy chorego, która zawiera tysiące innych białek w znacznie większym stężeniu, jest współczesnym wyzwaniem biologii [136].

Założeniem podjętych doświadczeń było dokonanie analizy proteomicznej surowicy krwi w poszukiwaniu biomarkerów raka endometrialnego endometrium. Zastosowano nowoczesną i złożoną strategię analityczno-bioinformatyczną w analizie związków endogennych w surowicy w poszukiwaniu biomarkerów o wartości diagnostycznej, mających znaczenie w raku endometrium. Do przeprowadzenia badań zastosowano nowoczesną platformę analityczną, wykorzystującą metody spektrometrii mas (MALDI-TOF-MS, nLC-MALDI-TOF/TOF-MS/MS) oraz zintegrowane testy immunologiczne. Opierający się na powyższych technikach nowatorski model poszukiwania biomarkerów wsparty został zaawansowaną analizą bioinformatyczną. W momencie opracowywania tego manuskryptu baza PubMed nie zawierała publikacji badań wykorzystujących

przedstawioną w pracy metodykę zastosowaną w celu poznawania biologii raka endometrium.

Do niedawna korzystano przede wszystkim z technik opartych na analizie składów proteomicznych dokonywanej dzięki zastosowaniu technik żelowych oraz chromatograficznych. Te metody pozwalają na dokładną analizę białek surowicy, jednak mają pewne ograniczenia. Elektroforeza na żelu poliakrylamidowym jest badaniem długotrwałym i niemożliwe jest zidentyfikowanie wielu protein jednocześnie. Jeszcze do niedawna do identyfikacji tych białek konieczne było ich sekwencjonowanie. Obecnie, gdy dostępność spektroskopów masowych jest znacznie większa, identyfikacja może przebiegać znacznie szybciej. Chromatografia płynna o wysokiej rozdzielczości pozwala na jednoczesną ocenę wielu peptydów, choć do ich dalszej identyfikacji zwykle wykorzystuje się także spektroskop masowy, jak to zrobiono w badaniu. Identyfikacja białek lub peptydów odbywa się na podstawie danych zawartych w bibliotekach proteomicznych. Ponieważ zwykle w przygotowaniu do badania chromatografem białka zostają pocięte na mniejsze fragmenty (wykonują to enzymy proteolityczne), finalnie otrzymuje się mieszaninę różnych łańcuchów aminokwasów, z których należy zrekonstruować całe białko. Metoda ta nazywana jest „od dołu do góry” (ang. *bottom-up*). Metoda niejako przeciwna, kiedy identyfikujemy całe łańcuchy białkowe, nazywana jest „z góry do dołu” (ang. *top-down*). Aby złożyć uzyskane fragmenty w całość odpowiadającą białku, korzysta się z bibliotek proteomicznych [137]. Mając na uwadze, jak wiele białek produkowanych jest przez organizm zarówno zdrowy, jak i chory, w którym mogą się rozwijać guzy o różnej lokalizacji narządowej i w związku z tym o różnej histogenezie, nie zawsze jest możliwe zrekonstruowanie całego białka. Po prostu może nie być go jeszcze w bibliotece proteomicznej lub jego zidentyfikowana sekwencja aminokwasowa, szczególnie jeśli jest krótka, może być przyporządkowana do więcej niż jednego białka. Biblioteki proteomiczne są tworzone nieustannie. Każde zidentyfikowane białko lub sekwencja peptydowa zostają tam umieszczone, co pozwala kolejnym badaczom na analizę wyników MS.

Technologie oparte na elektroforezie na żelu poliakrylamidowym oraz chromatografii cieczowej były i są wykorzystywane w analizie białek kobiet chorych na raka endometrium. W badaniu przeprowadzonym przez Alonso-Alconada i wsp. zidentyfikowano i zwalidowano aneksynę A2 (ANXA2) jako biomarker nawrotu raka endometrium [66]. Badania prowadzono w pierwszym etapie w tradycyjny sposób za pomocą elektroforezy żelowej, a następnie dokonano identyfikacji za pomocą chromatografii. Na modelu mysim ustalono, że zwiększona ekspresja ANXA2 koreluje ze zwiększonym potencjałem dawania przerzutów. Z kolei Monge analizował rolę czynnika transkrypcyjnego ERM/ETV5 w procesie

inwazji miometrium w badaniach *in vitro* (linia Hec-1A). Czynniki transkrypcyjne ERM/ETV5 bierze udział w szlakach molekularnych regulujących ekspresję aktywny, TGF β oraz progesteronu. Ponadto ERM/ETV5 zmniejsza aktywność reduktazy Hep27, która jest czynnikiem antyapoptotycznym w procesie indukcji apoptozy przez stres oksydacyjny. Stwierdzono, że nadekspresja czynnika transkrypcyjnego poprzez metaloproteinazę-2 związana jest ze zwiększoną zdolnością do migracji i inwazji badanych komórek [61]. Autorzy sugerują, że badania ekspresji ERM/ETV5 raka endometrium w materiale pooperacyjnym mogą stać się czynnikiem predykcyjnym złośliwości nowotworu. Ihata i wsp. analizowali stężenie aminokwasów w surowicy krwi chorych, wykorzystując chromatografię [67]. U chorych na raka endometrium czułość i swoistość profilu aminokwasowego porównano ze stężeniem CA 125. Przy tej samej czułości obu markerów uzyskano znacznie większą swoistość dla profilu aminokwasowego. Jednak należy zauważyć, że stężenie CA 125 nie jest swoistym markerem dla EC.

Ciekawe w aspekcie rozwoju testu skryningowego dla raka endometrium doniesienie opublikowano w 2016 roku [138]. Blendi i wsp. zastosowali techniki badań proteomicznych do wykrywania markerów raka endometrium w aspiracie z macicy. Za pomocą elektroforezy żelowej sprzężonej ze spektroskopią mas wykazano, że aspiraty kobiet chorych na raka zawierały białko ABRACL, mutazę fosfoglicerową 2, łańcuch beta fibrynogenu oraz aneksynę A3, których nie znaleziono w aspiratach kobiet zdrowych. W celu weryfikacji wyników posłużono się także techniką western blot, gdzie ostatecznie potwierdzono, że tylko dwa białka, ABRACL oraz mutaza, były obecne wyłącznie w raku endometrium. Zaproponowano przeprowadzenie dalszych badań z wykorzystaniem aspiratów jako metody łatwo dostępnej i mało inwazyjnej. Należy jednak stwierdzić, że u pozbawionych klinicznych objawów toczącego się raka błony śluzowej trzonu macicy kobiet, u których najczęściej dochodzi do zarośnięcia ujścia ze wnętrznego szyjki macicy, wykonanie takiego badania jest niemożliwe.

Zastosowana strategia analityczno-bioinformatyczna potwierdziła, że analiza białek, peptydów oraz metabolitów w surowicy krwi chorych jest nowoczesnym, obiecującym narzędziem w ginekologii onkologicznej. Otrzymane wyniki dowodzą, że istnieje korelacja pomiędzy stanem biologicznym pacjenta a jego statusem proteomicznym i metabolomicznym. Zastosowane techniki analityczne oraz ich wyniki mogą być dalej wykorzystane do stratyfikacji chorych na raka endometrium, czego implikacją powinno być spersonalizowane leczenie.

Przeszukując dostępne bazy danych (PubMed, Scopus, UpToDate, Cochrane Library) przy użyciu haseł wywołujących: „endometrial carcinoma” i „MALDI/TOF”, „MALDI/TOF/TOF” lub „MALDI imaging”, uzyskano pięć trafień. Żadne z badań

nie było przeprowadzone z użyciem surowicy krwi chorych. Analizowano ekspresję białek w tkankach raka. Yang i wsp. zbadali za pomocą techniki SELDI-TOF-MS (ang. *surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry* – spektrometria mas z jonizacją laserową wzmocnioną powierzchniowo i z detektorem czasu przelotu) tkanki raka endometrium, tkanki rozrostów bez atypii oraz rozrostów endometrium z atypią. Wyodrębniono białko chaperoninę 10, które było charakterystyczne dla tkanek EC. SELDI-TOF-MS stanowi alternatywę techniki MALDI-TOF-MS. W technice SELDI-TOF-MS próbki nanosi się na płytkę o zmodyfikowanej powierzchni, wykazującej powinowactwo biochemiczne do określonej klasy związków [139]. Pozostałe cztery publikacje omawiały ogólnie zagadnienia związane z metodami profilowania białkowego, również w raku endometrium. Wyniki wyszukiwania pozwalają sądzić, że przeprowadzone i przedstawione w rozprawie badania są unikalne w skali światowej.

W ramach badań otrzymano profile peptydowe analizowanych próbek surowicy przy użyciu techniki MALDI-TOF-MS w zakresie mas od 1000 do 10 000 Da. Przeprowadzone porównanie profili peptydowych surowicy kobiet zdrowych oraz kobiet chorych na raka endometrium wykazało, że ekspresja części peptydów jest inna w obu grupach. Udowodniono zatem, że rak endometrium wywołuje w organizmie zmiany na poziomie proteomicznym.

Analizy statystyczne wykorzystujące intensywności pików peptydów otrzymane w wyniku profilowania peptydowego wykazały statystycznie istotne różnice pomiędzy próbkami pobranymi od kobiet chorych i zdrowych dotyczące dziesięciu wartości m/z. Były to: 1450,19, 3302,16, 1229,32, 3278,79, 1466,88, 4268,50, 1505,09, 1364,55, 7806,35, 1020,99. Profilowanie białek i peptydów dostarcza informacji na temat biomolekuł o określonych wartościach m/z różniących grupy; pojedynczo lub jako cały panel biomolekuły te mogą być wykorzystane do klasyfikacji próbek. Kolejnym krokiem jest identyfikacja biomarkerów diagnostycznych lub prognostycznych odpowiadających określonym różniącym pikom na widmach MS. Pozwala to odnieść do dostępnego piśmiennictwa naukowego zidentyfikowane białko i ocenić jego zaangażowanie w patomechanizm jednostki chorobowej, a także przeprowadzić walidację przy użyciu np. testu ELISA [140].

W przeprowadzonym profilowaniu peptydowym na podstawie pików o wartościach m/z 1020,518 oraz 1206,586 i 1465,644 wykazano między próbkami pozyskanymi od kobiet chorych i kobiet zdrowych istotne statystycznie różnice dotyczące tych pików. Sekwencję aminokwasową DFLAEGGGVR zidentyfikowano na podstawie danych z biblioteki jako łańcuch α fibrynogenu (FIBA_HUMAN Protein). Fibrynogen jest białkiem biorącym udział w tworzeniu skrzepu krwi oraz w procesie agregacji płytek krwi [141]. W analizach proteomicznych

wykazano, że łańcuchy fibrynogenu są obecne jako biomarkery w raku urotelialnym, raku jajnika i raku żołądka oraz dróg żółciowych [142–145]. Sugeruje się ponadto, że fibrynogen lub jego fragmenty znalezione w surowicy krwi osób chorych na nowotwór złośliwy mogą nie być wynikiem nadprodukcji fibrynogenu przez komórki wątroby, tylko mogą stanowić bezpośredni produkt egzoproteaz specyficznych dla komórek raka. Wykazano, że aktywność egzopeptydaz w powiązaniu z procesami wykrzepiania toczącymi się w organizmie może prowadzić do pojawiania się w surowicy fragmentów fibrynogenu [146, 147].

Kolejnym peptydem różnicującym grupę badaną z rakiem endometrium z grupą kontrolną było białko układu dopełniacza C3 (CO3_HUMAN Complement C3). Został on zidentyfikowany na podstawie piku m/z 1504,781 odpowiadającej sekwencji aminokwasowej SPMYSIITPNILR. Białko to odgrywa podstawową rolę w aktywacji układu dopełniacza, który jest systemem regulującym wrodzoną odpowiedź immunologiczną oraz odpowiada za reakcje zapalne. Rozwijający się nowotwór jest wynikiem szeregu mutacji oraz zdarzeń epigenetycznych, które powodują, że komórka nowotworowa zaczyna różnić się morfologicznie i funkcjonalnie, na przykład poprzez produkcję antygenów związanych z guzem, od komórek zdrowych. Te zmiany powodują, że komórki złośliwe są rozpoznawane przez układ immunologiczny. W ten sposób organizm usiłuje się bronić przed dalszą inwazją [148].

Białka układu dopełniacza były przedmiotem badań u chorych na nowotwory złośliwe już wiele lat temu. Wykazano, że komórki nowotworowe aktywują układ dopełniacza, co z kolei powoduje podjęcie przez organizm próby wyeliminowania częściowo antygenowo obcych komórek raka [149, 150]. Jednak aktywacja dopełniacza w procesie nowotworowym może także pełnić funkcję promotora w procesie neoangiogenezy, powodować przewlekły proces zapalny lub być czynnikiem immunosupresyjnym. W badaniu na zmodyfikowanych myszach pozbawionych białka C3 wykazano, porównując te zwierzęta do myszy niezmodyfikowanych, zahamowanie wzrostu guzów nowotworowych. Zasugerowano zatem, że C3 może odgrywać rolę promotora wzrostu guzów u myszy [151, 152]. Aktywowanie układu dopełniacza przez komórki nowotworowe obserwowano zarówno w badaniach *in vitro*, jak i w płynach fizjologicznych pobieranych od osób chorych na nowotwór [151, 153, 154]. Wykazano także, że wysoka ekspresja białek układu dopełniacza jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym u chorych na raka prostaty i jelita grubego [155, 156]. U chorych na raka płuca wykryto wyższe stężenia białek układu dopełniacza w surowicy krwi [157]. W badaniach za pomocą techniki MALDI-TOF-MS w niedrobnokomórkowym raku płuca także zidentyfikowano komplement C3 jako białko sygnowane pro-

cesu nowotworowego [158]. Również w raku jajnika w przeprowadzonych techniką MALDI-TOF-MS badaniach z surowicy krwi chorych zdefiniowano białko C3 układu dopełniacza jako białko sygnowane [159]. Autorzy sugerują, że dalsze badania mogą wskazać właśnie to białko jako uniwersalny marker procesu nowotworowego. Podkreśla się również, że nadekspresja C3 może odpowiadać za reakcje zapalne i immunologiczne obserwowane w zespołach paraneoplastycznych, czyli może być wczesnym objawem raka [160].

Wykazana w przeprowadzonych badaniach nadekspresja białka C3 potwierdza wcześniejsze doniesienia o możliwości zastosowania białka C3 jako markera chorób nowotworowych. Oczywiście konieczne są dalsze badania w celu zwalidowania jego stężeń wskazujących na toczący się proces nowotworowy.

Jak już wspomniano, biomarkerem nie musi być pojedyncze białko. W zasadzie, oprócz podjednostki beta gonadotropiny kosmówkowej w raku kosmówki, nie udało się dotychczas wyodrębnić pojedynczego białka, które mogłoby pełnić funkcję odpowiednio czułego i swoistego markera nowotworu złośliwego. Dlatego próbuje się implementować całe panele markerowe do wykrywania, ale także monitorowania chorób nowotworowych. Taki panel może stanowić proteomiczny lub metabolomiczny „odcisk palca”, swoisty dla danego nowotworu. Modele klasyfikacyjne i dyskryminacyjne zbudowane przy użyciu wielu zmiennych cechują się wysoką czułością i wysoką swoistością, co wykazano w rozprawie.

Badaniem wielomarkerowym była jednoczesna ocena stężeń czynników biologicznych o udokumentowanym udziale w procesach angiogenezy. Angiogeneza jest podstawowym procesem biologicznym niezbędnym do rozwoju nowotworu. Poszukiwania markerów tego procesu trwają od dawna, a możliwość ich wykorzystania w klinice w diagnostyce i leczeniu jest szeroko dyskutowana [161–164].

Przeprowadzone w ramach badań zaprezentowanych w rozprawie oznaczenia wykorzystujące stężenia oznaczonych białek w surowicy uczestniczących w procesie angiogenezy wykazały, że w próbkach pobranych od wszystkich chorych z EC i próbkach pozyskanych od kobiet zdrowych stężenia 14 spośród 16 białek różniły się istotnie statystycznie. Białkami tymi były: sEGRF, folistatyna, G-CSF, sHER2/neu, HGF, sIL-6Ra, osteopontyna, PDGF-AB/BB, PECA-1, prolaktyna, SCF, sTIE-2, sVEGR-1 i sVEGR-2. Jednak mediany bezwzględnych stężeń sEGRF, folistatyny, sHER2/neu, HGF, sIL-6Ra, leptyny, PDGF-AB/BB, PECA-1, SCF, sTIE-2, sVEGR-1 i sVEGR-2 u kobiet z rakiem endometrium były niższe niż w populacji kobiet zdrowych. Natomiast tylko stężenie prolaktyny było istotnie wyższe u chorych na raka endometrium we wszystkich trzech grupach zróżnicowania histologicznego: G1, G2 i G3, a różnice były istotne statystycznie.

W grupie kontrolnej i w grupie z rakiem endometrialnym G1 zaobserwowano istotnie różniące obie grupy stężenie zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (FGF-basic) oraz czynnika wzrostu granulocytów (G-CSF). W niższych stopniach zróżnicowania nowotworu nie zanotowano istotności statystycznej pomiędzy stężeniami FGF-basic w próbkach pobranych od kobiet z grupy badanej i z grupy kontrolnej, mimo że bezwzględne stężenia były również podwyższone. Wśród tych białek należy poszukiwać markerów raka endometrium.

W tradycyjnym ujęciu surowicznych markerów oczekuje się, że stężenia białek mogących służyć jako biomarkery powinny być podwyższone, czyli łatwe do zwerifikowania i porównania z wyliczonym zakresem norm dla populacji zdrowej. Większość białek z panelu Bio-Plex nie spełnia tego warunku. Należy także zwrócić uwagę, że stężenia minimalne i maksymalne oznaczonych biomarkerów w poszczególnych przypadkach raka endometrium różnią się nawet kilkukrotnie. Może to oczywiście zależeć od wielkości guza, czyli ilości komórek nowotworowych zdolnych produkować dane białka. Jednak nawet w przypadku prolaktyny, której stężenie różniło się istotnie statystycznie i było wyższe niż w grupie kontrolnej w każdym stopniu zróżnicowania guza, wartości minimalne poszczególnych przypadków raka mieszczą się w granicach normy dla zdrowej populacji kobiet po menopauzie. Prolaktynę już wcześniej badano i sugerowano jej wartość jako markera u chorych na raka endometrium oraz raka jajnika. Opisano ponad 300 różnych procesów biologicznych, które odbywają się z udziałem prolaktyny, w działaniu zarówno endokrynnym, jak i parakrynnym, jako cytokiny [165]. Poza przysadką, PRL jest wydzielana w wielu innych narządach, np. w komórkach foliularnych jajnika, w komórkach podścieliska endometrium i w limfocytach krwi obwodowej. Synteza pozaprzysadkowa odbywa się z udziałem innego promotora niż w przysadce, choć sekwencje aminokwasowe są takie same [166, 167]. W surowicy spotyka się różne izoformy PRL, co związane jest z potranslacyjną fosforylacją i glikozylacją oraz z tworzeniem makromolekuł poprzez wzajemne wiązanie się cząsteczek prolaktyny oraz wiązanie z IgG. Cząsteczka prolaktyny tworzy motyw węzła cystynowego, charakterystyczny dla wielu czynników wzrostu. Prolaktyna łączy się ze swoim receptorem w szlaku molekularnym kinaz tyrozynowych Jak2, Fyn i Tec, fosfatazy SHP-2, guaninowego czynnika Vav i białka supresorowego sygnału SOCS [168]. Aktywuje także mitogenny szlak kinazy proteinowej MAPK, czego wynikiem jest działanie proliferacyjne PRL [169]. Wiele lat temu wykazano, że hiperprolaktynemia jest związana z powstawaniem guzów nowotworowych w gruczole piersiowym [170].

Po raz pierwszy o podwyższonych surowicznych stężeniach prolaktyny w raku endometrium pisali Yurkovetsky i wsp. w 2009 roku. Zbadano 64 surowicze białka, które mogły służyć jako biomarkery raka endometrium [171]. Prolaktyna

okazała się markerem o czułości wynoszącej 98,3% i swoistości 98%, najwyższej wśród wszystkich badanych białek. Jednak, mimo upływu prawie dekady, prolaktyna nie weszła na stałe do panelu markerów raka endometrium.

Fizjologicznym inhibitorem PRL jest dopamina. W dużym retrospektywnym badaniu wykazano, że przyjmowanie leków antypsychotycznych mających działanie antagonistyczne w stosunku do dopaminy spowodowało wzrost zachorowań na raka piersi o 16%. Zachorowalność była najwyższa w grupie przyjmującej lek od dawna oraz wzrastała wraz z kumulacją dawki [172]. W prospektywnym badaniu „Nurse Health Study” zaobserwowano dodatnią korelację zachorowalności na raka piersi z podwyższonym surowiczym stężeniem prolaktyny [173, 174]. W badaniu Levina i wsp. stwierdzono, że surowicze stężenia prolaktyny u chorych z rakiem endometrium i rakiem jajnika były znamienne statystycznie wyższe w porównaniu do kobiet z niezłośliwymi guzami, a także że stężenie PRL nie było zależne od stopnia zaawansowania nowotworu, ale malało wraz ze wzrostem złośliwości guza (G) [175]. W prezentowanych w tej rozprawie badaniach również wykazano malejące stężenia prolaktyny w guzach mało zróżnicowanych. Co więcej, podwyższone stężenia PRL obserwowano także u osób z rodzin o dużej agregacji zachorowań na raka jajnika. W przywołanej wyżej pracy badano transkrypty PRL obecne w tkankach zdrowych (przysadka, jajnik, endometrium) oraz tkankach raka jajnika i endometrium. Użyto startera proksymalnego dla PRL pochodzenia przysadkowego i startera dystalnego dla PRL pochodzącej spoza przysadki. Uzyskano ciekawe wyniki. W tkance przysadki obserwowano przeważającą ekspresję transkryptu proksymalnego z niewielką domieszką transkryptu dystalnego. W prawidłowej tkance endometrium obecne były oba transkrypty, natomiast już w prawidłowym endometrium, ale przylegającym do ogniska raka, uzyskano ekspresję głównie transkryptu dystalnego. W tkankach raka endometrium i raka jajnika obecny był przysadkowy, fizjologiczny transkrypt proksymalny. Zauważono jednak w tych tkankach wzrost aktywności receptora prolaktynowego. Autorzy zaobserwowali również, że w hodowli komórkowej prolaktyna ma negatywny wpływ na proces apoptozy indukowanej cisplatiną. Z kolei w doświadczeniu z pochodzącymi z nabłonka jajnika (NOE) oraz endometrium komórkami, które poddano długotrwałemu działaniu prolaktyny, zaobserwowano proliferację komórek oraz szybkie tworzenie klonów. Dodanie do kultury białka o działaniu anty-Ras w znacznym stopniu zahamowało ten efekt.

Wnioski z przeprowadzonych przez Levina i wsp. badań są niezwykle ciekawe. Po pierwsze dowodzą, że prolaktyna jako białko nie jest jednorodną cząsteczką. Różna ekspresja transkryptów proksymalnych i dystalnych sugeruje, że w procesie karcinogenezy bierze udział „inna” cząsteczka prolaktyny niż ta, którą

znamy jako hormon przysadkowy. Ta różnorodność może być wynikiem, jak już wspomniano, modyfikacji potranslacyjnych, głównie glikozylacji. Nie są do końca poznane glikoformy prolaktyny, ale nie oznacza to, że nie mogą istnieć. Wykazano, że 20% prolaktyny produkowanej w przysadce ulega glikozylacji [176].

Podobnie dzieje się w przypadku drugiego filogenetycznie starego hormonu, jakim jest gonadotropina kosmówkowa. Istnieje wiele izoform gonadotropiny kosmówkowej, różnie uglikowanych, a biologiczna funkcja wielu z nich nie jest znana. We wszystkich nowotworach złośliwych wykazano obecność hCG, ale jest to hCG o innej strukturze cząsteczki niż ta, którą oznaczamy w ciąży [177].

W przedstawionych w pierwszej części rozprawy badaniach spektroskopią mas nie wykryto sekwencji charakterystycznych dla prolaktyny w badanych zakresach mas. Oznacza to, że w procesach związanych z karcinogenezą nie biorą udziału metabolity lub fragmenty prolaktyny mieszczące się w masie do 10 000 daltonów. Świadczy to o tym, że jednak cała cząstka prolaktyny jest konieczna w karcinogenezie (masa 23 kDa, 26 kDa – glikozylowana). W tej sytuacji, mając na uwadze duże zakresy surowiczych stężeń prolaktyny i przyjmując, że prolaktyna jest konieczna w procesie karcinogenezy raka endometrium, należy założyć, że albo kluczową rolę odgrywa ekspresja jej receptora (PRLR), albo prolaktyna poprzez swój receptor zapoczątkowuje i modeluje transformację nowotworową, ale nie bierze już udziału w dalszych etapach rozwoju guza.

W cytowanej powyżej pracy Levina i wsp. wykazano, że stężenie prolaktyny było wysokie w rozrostach endometrium, które są stanami przedrakowymi raka endometrium. Fakt ten można tłumaczyć właśnie mobilizacją prolaktyny i jej receptora w inicjacji transformacji nowotworowej endometrium. Jednak nie wiadomo, jakie procesy molekularne mogą początkować tę mobilizację, ponieważ nie wszystkie rozrosty, nawet te z atypią komórkową, transformują dalej w raka [178].

Proces karcinogenezy składa się z trzech etapów: inicjacji, promocji i progresji [179]. Pełna transformacja wymaga aktywacji co najmniej dwóch onkogenów, inaktywacji genu supresorowego oraz aktywacji czynników wzrostu. Możliwe jest, jak wykazali Levin i wsp., że prolaktyna wkracza w proces karcinogenezy na etapie aktywacji onkogenu Ras, uruchamiając poprzez swój receptor aktywność licznych czynników wzrostu, co doprowadza do rozwoju raka [175]. Można oczekiwać zatem, że ciągła ekspozycja na prolaktynę tkanki wrażliwej, np. endometrium, może spowodować inicjację karcinogenezy.

Wiadomo także, że aktywacja genu *Ras* prowadzi do stabilizacji aktywności receptora prolaktynowego [180]. Jednak sugeruje się także, że prolaktyna może aktywować bezpośrednio czynniki wzrostu, takie jak insulinowe czynniki wzro-

stu (IGF-I i IGF-II), które bezpośrednią drogą stymulują komórki do produkcji prolaktyny bez konieczności aktywacji Ras [181, 182]. Jednak by w pełni zrozumieć rolę prolaktyny w karcinogenezie, niezbędne są dalsze badania.

Niestety, nie we wszystkich nowotworach taki model działania prolaktyny się potwierdza. W raku piersi stężenie prolaktyny nie jest zależne ani od wielkości guza (stopień zaawansowania), ani od jego złośliwości [183]. W raku prostaty natomiast potwierdzono zależność stężenia PRL od stopnia złośliwości, ale nie od wielkości guza [184].

Prolaktyna, a właściwie jej receptor, wydaje się być dobrym kandydatem do stworzenia terapii celowanej w leczeniu nowotworów, szczególnie tych, w których stwierdza się podwyższone jej stężenia. W 2016 roku opublikowano wyniki badań I fazy u chorych na raka piersi oraz prostaty, którzy wykazywali ekspresję prolaktyny. Podawano im przeciwciała skierowane przeciwko receptorowi prolaktyny. Niestety, nie zaobserwowano żadnego efektu terapeutycznego w badanych grupach [185].

Jak już wspomniano, w przeprowadzonych badaniach stężenia pozostałych białek z panelu 16 biomarkerów były niższe niż w grupie kontrolnej. W związku z tym nie mogą one służyć jako biomarkery raka endometrium. Dane z piśmiennictwa dotyczące tych biomarkerów często znacznie się różnią. Większość doniesień w piśmiennictwie mówi o obniżonych poziomach sEGFR u pacjentów z nowotworami różnych lokalizacji i histologii w porównaniu z osobami zdrowymi. Takie wyniki otrzymali Baron i wsp. [186] w przypadku nabłonkowego raka jajnika, Müller i wsp. [187] w przypadku raka piersi z przerzutami oraz Jantus-Lewintre i wsp. [80] oraz Maramotti i wsp. [77] w przypadku niedrobnokomórkowego raka płuca. Jednakże inne badania, przeprowadzone przez Jacota i wsp. [188], wskazują na brak różnic w stężeniu tego białka między osobami chorymi a zdrowymi w przypadku niedrobnokomórkowego raka płuca. Sasaki i wsp. [189] nie wykazali z kolei różnic w przypadku grasiczaka, a Horała i wsp. – u chorych na raka jajnika [190].

Analizowano także stężenia FGF-basic w surowicy krwi chorych. Nadekspresja FGF jest związana z agresywnym fenotypem nowotworu i była obserwowana w wielu nowotworach złośliwych [191]. W raku pęcherza moczowego obserwowano podwyższone stężenia markera w wysokich stopniach zaawansowania oraz w nawrotach [192]. Podobną korelację z zaawansowaniem nowotworu oraz małym zróżnicowaniem raka wykazano w raku trzustki [193], nerki [194], jądra [195] oraz w glejakach [196]. Doniesienia dotyczące ekspresji sFGF w raku piersi różnią się, choć większość badaczy nie zanotowała korelacji pomiędzy stopniem zaawansowania a stopniem złośliwości nowotworu [197, 198]. W raku endometrium polscy autorzy wykazali za pomocą komercyjnie dostępnych testów

(ELISA) statystycznie znamiennej różnicę pomiędzy typem I i typem II raka endometrium – stężenia FGF-basic u chorych na raka typu II były dwukrotnie wyższe niż u kobiet z rakiem typu I oraz odpowiednio dziesięć i dwadzieścia razy wyższe niż u kobiet zdrowych [199]. Całkowite stężenia zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów były jednak znacznie niższe niż uzyskane w badaniach prezentowanych w rozprawie; wynosiły: 10,7 pg/ml dla raka typu I (endometrialnego) i 20,2 pg/ml dla raka typu II. Stężenia były istotnie wyższe także u chorych z zaawansowanym nowotworem, czego wynikiem były krótsze przeżycia chorych.

W oznaczeniach własnych panelu Bio-Plex stężenia FGF-basic były znamiennej wyższe w porównaniu do próbek uzyskanych od osób zdrowych tylko w próbkach pobranych od chorych z rakiem G1. W grupach G2 i G3 stężenia były niższe niż w grupie kontrolnej. Między badanym materiałem uzyskanym od chorych na raka endometrium a próbkami pobranymi od kobiet zdrowych nie odnotowano statystycznie znamiennej różnicy stężeń FGF-basic, co jest wynikiem odmiennym do wyników opublikowanych przez przywołanych wyżej Dobrzycką i wsp.

Trudno w sposób jednoznaczny odnieść się do tych danych. Można jedynie zasugerować, że być może w grupie z rakiem G1 były chore z agresywną postacią raka, o złym rokowaniu, właśnie te, które wymagają szczególnej uwagi w procesie kwalifikacji do leczenia. Dane z piśmiennictwa sugerują też, że zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów jest odpowiedzialny za zdolność do tworzenia przerzutów i szybki rozwój raka. Jednak rola FGF-basic w procesie karcinogenezy wydaje się być bardziej skomplikowana niż tylko udział w tworzeniu nowych naczyń krwionośnych. Jak wykazały badania, stężenie FGF nie zawsze koreluje z gęstością naczyń krwionośnych w badanej tkance, a jest to marker histologiczny neoangiogenezy [200]. Sugeruje się zatem, że mechanizm zwiększenia potencjału proliferacyjnego oraz metastatycznego może być związany z bezpośrednim mitogennym działaniem FGF na komórki [201]. Wykonane badania, których wyniki zaprezentowano w rozprawie, potwierdzają odwrotną zależność ekspresji FGF-basic od złośliwości nowotworu, mimo że nie uzyskano wyników istotnych statystycznie w grupie kontrolnej oraz w grupie G2. Wraz ze wzrostem złośliwości nowotworu spadało bezwzględne stężenie zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów. Mediana stężenia dla całej grupy raków wynosiła 161,3 pg/ml, w grupie raków G1 – 236,22, G2 – 218,07, a G3 – tylko 62,0 pg/ml. Podobne wyniki uzyskali Faridi i wsp. u chorych na raka piersi [202].

Stężenia folistatyny osiągnęły znamiennej istotną tylko w grupie G3. Wartości bezwzględne były znacznie niższe niż w grupie kontrolnej. W grupach G1 i G2 różnice były nieistotne. U chorych na raka jajnika wykazano, że surowicze stężenia folistatyny oraz CA 125 były znamiennej wyższe w porównaniu do osób zdrowych, a także chorych z niezłośliwymi guzami jajników [203].

Z kolei u chorych z rakiem wątroby wysokie stężenia folistatyny wiązały się z agresywnym przebiegiem procesu nowotworowego oraz złą prognozą [204]. W raku jajnika, żołądka, piersi i płuca wysokie stężenia FST związane są z krótszymi okresami przeżycia chorych [205]. Stwierdzono ponadto, że w raku żołądka stężenia surowicze folistatyny wykazują odwrotną korelację w guzach z przerzutami do węzłów chłonnych – stężenia były niższe niż w grupie kontrolnej [206]. Natomiast obecność licznych przerzutów w rakach nisko zróżnicowanych wiązała się z wyższymi stężeniami aFST. Ta obserwacja jest zbieżna z wynikami badań folistatyny w panelu markerowym; podwyższone stężenia obserwowano tylko w guzach nisko zróżnicowanych G3.

Stężenia wszystkich pozostałych czynników były znamienne niższe u chorych z rakiem endometrium. Nie mogą zatem służyć jako biomarkery tego procesu nowotworowego. Jednak analizując bezwzględne wartości stężeń poszczególnych białek, można zauważyć pewną prawidłowość. Najniższe stężenia zanotowano w grupie raka G3. Raki G1 zaś charakteryzowały się wartościami najwyższymi, ale też różnice pomiędzy wartościami minimalną i maksymalną w tej grupie były bardzo duże. Może to świadczyć o tym, że w tej grupie są chore z rakiem endometrium o odmiennej biologii niż u chorych, u których stężenia markerów były znacząco niższe. Innymi słowy, w tej dobrze rokującej grupie chorych ukryte są, jak wiadomo z praktyki klinicznej, przypadki raka o złej prognozie. Dalsza obserwacja chorych z tej grupy pod kątem pojawienia się nawrotów i 3- lub 5-letnich przeżyć może wyłonić podgrupę, która wymaga specjalnej uwagi i innego, bardziej agresywnego leczenia.

Wiele z badanych surowiczych biomarkerów obecnie jest przedmiotem zainteresowania firm farmaceutycznych poszukujących leków do terapii celowanych. Dysregulacja procesów angiogenezy odgrywa znaczną rolę we wzroście i progresji guza nowotworowego. W ginekologii onkologicznej pierwszym lekiem wprowadzonym do leczenia klinicznego jest bewacyzumab, czyli humanizowane, monoklonalne przeciwciało blokujące działanie VEGF [207]. Przeciwciało to zostało pierwotnie dopuszczone do stosowania, razem z 5-fluorouracylem, w leczeniu raka jelita grubego, a następnie raka piersi, niedrobnokomórkowego raka płuca oraz raka jajnika [208, 209]. Kolejnym przeciwciałem wprowadzonym do leczenia jest aflibercept. Stanowi on złożoną substancję zawierającą rekombinowane białka domen zewnątrzkomórkowych receptorów VEGFR-A, VEGFR-B oraz ludzką immunoglobulinę IgG1. Jego działanie polega na zdolności do łączenia się na zasadzie pułapki z VEGF oraz z fosfatydyloinozytolem [210]. Aflibercept jest obecnie testowany w kilku nowotworach złośliwych [211–213]. Pazopanib jest przeciwciałem aktywnym przeciwko VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, receptorowi PDGF (PDGFR) oraz białku c-kit [214]. Obecnie lek jest zarejestrowany

w leczeniu raka nerki oraz mięsaków tkanek miękkich [215, 216]. Nintedanib, kolejne przeciwciało skierowane przeciwko receptorom VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR-, PDGFR, FGFR-1 i FGFR-3 jest testowane w raku płuca oraz raku jelita grubego [217, 218]. Kolejne przeciwciała znajdują się w fazie badań klinicznych.

Wydaje się, że leczenie celowane, stosowane zresztą zwykle ze standardową chemioterapią, powinno znacząco podnieść progi 5-letnich przeżyć. W praktyce, niestety, tak się nie dzieje. W przypadku najdłużej stosowanego bewacyzumabu w raku jajnika wydłużenie okresów wolnych od nawrotu choroby (PFS – ang. *progression free survival*) wynosi około 6 miesięcy, a odsetek przeżyć 5-letnich nie uległ zmianie [219]. Przeciwciała stosowane w terapiach celowanych mają także wiele działań ubocznych. Jest to zrozumiałe, ponieważ jako terapia systemowa, oprócz niszczenia potencjalnych naczyń w guzie, uniemożliwiają odnowę w tkankach zdrowych. Upośledzają gojenie się ran, mogą być także przyczyną krwotoków.

Podsumowując, można stwierdzić, że do całkowitego poznania i zrozumienia wszystkich zależności w szlakach molekularnych procesu karcinogeny należy przeprowadzić wiele badań i doświadczeń. Każde z nich w jakimś – choćby małym – stopniu zbliża świat badaczy do tego celu. Możliwe, że poznanie proteomów, chociażby zdrowych tkanek, jest zamierzeniem na lata. Ale możliwe też, że nagle pojawi się metoda, która uprości procedury i zgłębimy te zależności w ciągu kilku lat.

6. WNIOSKI

1. Zastosowana strategia analityczno-bioinformatyczna potwierdziła, że analiza białek i peptydów w surowicy krwi chorych jest nowoczesnym, obiecującym narzędziem w ginekologii onkologicznej.
2. Otrzymane wyniki dowodzą, że istnieje korelacja pomiędzy stanem biologicznym pacjenta a jego statusem proteomicznym.
3. Proces karcinogenezy raka endometrium powoduje zmiany w proteomie, które mogą być wykryte u chorych, i mogą być one markerem tego procesu.
4. Zastosowane techniki analityczne oraz ich wyniki mogą być dalej wykorzystane do stratyfikacji chorych na raka endometrium, czego implikacją powinno być spersonalizowane leczenie.
5. Wykazane białka sygnałowe: łańcuch alfa fibrynogenu oraz białko układu dopełniacza C3 są białkami sygnałowymi raka endometrium i mogą stać się przedmiotem dalszych badań w aspekcie oceny ich stężeń w celu stratyfikacji chorych na agresywną postać raka endometrium.
6. Panele wielomarkerowe stanowią swoisty dla danego nowotworu „odcisk palca” i mogą zostać wykorzystane w dalszych badaniach, zarówno proteomicznych, jak i klinicznych.
7. Markerem surowiczego raka endometrialnego błony śluzowej trzonu macicy jest prolaktyna. Należy kontynuować badania, które mogą doprowadzić do wykorzystania wiedzy o tym markerze w konstrukcji leków do terapii celowanej.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Wilkins, M., et al. *Proteome research: Concepts, technology and application*. 2007, Springer.
2. International Human Genome Sequencing Consortium, *Initial sequencing and analysis of the human genome*. *Nature*, 2001. 409: p. 860.
3. Pertea, M. and S.L. Salzberg, *Between a chicken and a grape: estimating the number of human genes*. *Genome Biol*, 2010. 11(5): p. 206.
4. *List of human protein in the Uniprot Human Reference Proteom*. 6 Feb 2018; available from: http://www.uniprot.org/uniprot/?query=*&fil=reviewed%3Ayes+AND+organism%3A%22Homo+sapiens+%28Human%29+%5B9606%5D%22+AND+proteome%3Aup000005640.
5. Spratlin, J.L., N.J. Serkova, and S.G. Eckhardt, *Clinical applications of metabolomics in oncology: a review*. *Clin Cancer Res*, 2009. 15(2): p. 431-40.
6. Taguchi, A. and S.M. Hanash, *Unleashing the power of proteomics to develop blood-based cancer markers*. *Clin Chem*, 2013. 59(1): p. 119-26.
7. *Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework*. *Clin Pharmacol Ther*, 2001. 69(3): p. 89-95.
8. Strimbu, K. and J.A. Tavel, *What are biomarkers?* *Curr Opin HIV AIDS*, 2010. 5(6): p. 463-6.
9. Hajduk, J., J. Matysiak, and Z.J. Kokot, *Challenges in biomarker discovery with MALDI-TOF MS*. *Clin Chim Acta*, 2016. 458: p. 84-98.
10. Tyers, M. and M. Mann, *From genomics to proteomics*. *Nature*, 2003. 422(6928): p. 193-7.
11. Mazurkiewicz, R., *Spektrometria masowa*, in: *Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych*. 2000, WNT.
12. Aebersold, R. and M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics*. *Nature*, 2003. 422(6928): p. 198-207.

13. Osin, P., et al., *Experimental pathology and breast cancer genetics: new technologies*. Recent Results Cancer Res, 1998. 152: p. 35-48.
14. Banks, R.E., et al., *The potential use of laser capture microdissection to selectively obtain distinct populations of cells for proteomic analysis--preliminary findings*. Electrophoresis, 1999. 20(4-5): p. 689-700.
15. Binz, P.A., et al., *A molecular scanner to automate proteomic research and to display proteome images*. Anal Chem, 1999. 71(21): p. 4981-8.
16. Seow, T.K., et al., *Two-dimensional electrophoresis map of the human hepatocellular carcinoma cell line, HCC-M, and identification of the separated proteins by mass spectrometry*. Electrophoresis, 2000. 21(9): p. 1787-813.
17. Wang, H., et al., *Comprehensive proteome analysis of ovarian cancers using liquid phase separation, mass mapping and tandem mass spectrometry: a strategy for identification of candidate cancer biomarkers*. Proteomics, 2004. 4(8): p. 2476-95.
18. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. 61(2): p. 69-90.
19. Torre, L.A., et al., *Global cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2015. 65(2): p. 87-108.
20. Wojciechowska, U. and J. Didkowska. *Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce. Krajowy Rejestr Nowotworów, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie*. 28 Nov 2017; available from: <http://onkologia.org.pl/raporty/>.
21. Bokhman, J.V., *Two pathogenetic types of endometrial carcinoma*. Gynecol Oncol, 1983. 15(1): p. 10-7.
22. Amant, F., et al., *Endometrial cancer*. Lancet, 2005. 366(9484): p. 491-505.
23. Baglietto, L., et al., *Circulating steroid hormone concentrations in postmenopausal women in relation to body size and composition*. Breast Cancer Res Treat, 2009. 115(1): p. 171-9.
24. Renehan, A.G., et al., *Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies*. Lancet, 2008. 371(9612): p. 569-78.

25. Davies, C., et al., *Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials*. Lancet, 2011. 378(9793): p. 771-84.
26. Lancaster, J.M., et al., *Society of Gynecologic Oncologists Education Committee statement on risk assessment for inherited gynecologic cancer predispositions*. Gynecol Oncol, 2007. 107(2): p. 159-62.
27. Thompson, D. and D.F. Easton, *Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers*. J Natl Cancer Inst, 2002. 94(18): p. 1358-65.
28. Setiawan, V.W., et al., *Age at Last Birth in Relation to Risk of Endometrial Cancer: Pooled Analysis in the Epidemiology of Endometrial Cancer Consortium*. Am J Epidemiol, 2012. 176(4): p. 269-78.
29. Jordan, S.J., et al., *Breastfeeding and Endometrial Cancer Risk: An Analysis From the Epidemiology of Endometrial Cancer Consortium*. Obstet Gynecol, 2017. 129(6): p. 1059-67.
30. Moore, K.N. and A.N. Fader, *Uterine papillary serous carcinoma*. Clin Obstet Gynecol, 2011. 54(2): p. 278-91.
31. Slomovitz, B.M., et al., *Uterine papillary serous carcinoma (UPSC): a single institution review of 129 cases*. Gynecol Oncol, 2003. 91(3): p. 463-9.
32. Bjorge, T., et al., *Body size in relation to cancer of the uterine corpus in 1 million Norwegian women*. Int J Cancer, 2007. 120(2): p. 378-83.
33. Liang, S.X., et al., *Personal history of breast cancer as a significant risk factor for endometrial serous carcinoma in women aged 55 years old or younger*. Int J Cancer, 2011. 128(4): p. 763-70.
34. Kurman, R, et al., Editors, *WHO Classification of tumours of the female reproductive organs*. 2014, World Health Organization, p. 126, 150.
35. Murali, R., R.A. Soslow, and B. Weigelt, *Classification of endometrial carcinoma: more than two types*. Lancet Oncol, 2014. 15(7): p. e268-78.
36. Mutter, G.L., et al., *Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers*. J Natl Cancer Inst, 2000. 92(11): p. 924-30.
37. Djordjevic, B. and R.R. Broaddus, *Role of the clinical pathology laboratory in the evaluation of endometrial carcinomas for Lynch syndrome*. Semin Diagn Pathol, 2014. 31(3): p. 195-204.

38. Kandoth, C., et al., *Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma*. Nature, 2013. 497(7447): p. 67-73.
39. Brinton, L.A., et al., *Etiologic heterogeneity in endometrial cancer: evidence from a Gynecologic Oncology Group trial*. Gynecol Oncol, 2013. 129(2): p. 277-84.
40. Ambros, R.A., et al., *Endometrial intraepithelial carcinoma: a distinctive lesion specifically associated with tumors displaying serous differentiation*. Hum Pathol, 1995. 26(11): p. 1260-7.
41. Huang, C.Y., et al., *Impact of management on the prognosis of pure uterine papillary serous cancer – a Taiwanese Gynecologic Oncology Group (TGOG) study*. Gynecol Oncol, 2014. 133(2): p. 221-8.
42. Bansal, N., V. Yendluri, and R.M. Wenham, *The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies*. Cancer Control, 2009. 16(1): p. 8-13.
43. Doll, A., et al., *Novel molecular profiles of endometrial cancer-new light through old windows*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2008. 108(3-5): p. 221-9.
44. Hoang, L.N., et al., *Targeted mutation analysis of endometrial clear cell carcinoma*. Histopathology, 2015. 66(5): p. 664-74.
45. Goebel, E.A., et al., *The evolution of endometrial carcinoma classification through application of immunohistochemistry and molecular diagnostics: past, present and future*. Virchows Arch, 2017.
46. Billingsley, C.C., et al., *Polymerase varepsilon (POLE) mutations in endometrial cancer: clinical outcomes and implications for Lynch syndrome testing*. Cancer, 2015. 121(3): p. 386-94.
47. Powell, J.L., et al., *Preoperative serum CA-125 levels in treating endometrial cancer*. J Reprod Med, 2005. 50(8): p. 585-90.
48. Jhang, H., et al., *CA 125 levels in the preoperative assessment of advanced-stage uterine cancer*. Am J Obstet Gynecol, 2003. 188(5): p. 1195-7.
49. Scambia, G., et al., *Combined use of CA 125 and CA 15-3 in patients with endometrial carcinoma*. Gynecol Oncol, 1994. 54(3): p. 292-7.
50. Brennan, D.J., et al., *Serum HE4 as a prognostic marker in endometrial cancer--a population based study*. Gynecol Oncol, 2014. 132(1): p. 159-65.

51. Hareyama, H., et al., *Serum and tissue measurements of CA72-4 in patients with endometrial carcinoma*. J Clin Pathol, 1996. 49(12): p. 967-70.
52. Konno, R., et al., *Serum soluble fas level as a prognostic factor in patients with gynecological malignancies*. Clin Cancer Res, 2000. 6(9): p. 3576-80.
53. Suzuki, M., et al., *Serum level of macrophage colony-stimulating factor as a marker for gynecologic malignancies*. Oncology, 1995. 52(2): p. 128-33.
54. Frederick, P.J. and J.M. Straughn, Jr., *The role of comprehensive surgical staging in patients with endometrial cancer*. Cancer Control, 2009. 16(1): p. 23-9.
55. Larson, D.M., et al., *Prognostic significance of gross myometrial invasion with endometrial cancer*. Obstet Gynecol, 1996. 88(3): p. 394-8.
56. Cocco, E., et al., *Serum amyloid A: a novel biomarker for endometrial cancer*. Cancer, 2010. 116(4): p. 843-51.
57. Lo, S.S., et al., *Prognostic significance of tumour markers in endometrial cancer*. Tumour Biol, 1997. 18(4): p. 241-9.
58. Zeimet, A.G., et al., *L1CAM in early-stage type I endometrial cancer: results of a large multicenter evaluation*. J Natl Cancer Inst, 2013. 105(15): p. 1142-50.
59. Ramaswamy, S., et al., *A molecular signature of metastasis in primary solid tumors*. Nat Genet, 2003. 33(1): p. 49-54.
60. Yi, Z., C. Jingting, and Z. Yu, *Proteomics reveals protein profile changes in cyclooxygenase-2 inhibitor-treated endometrial cancer cells*. Int J Gynecol Cancer, 2009. 19(3): p. 326-33.
61. Monge, M., et al., *Proteomic approach to ETV5 during endometrial carcinoma invasion reveals a link to oxidative stress*. Carcinogenesis, 2009. 30(8): p. 1288-97.
62. Sharon, D., R. Chen, and M. Snyder, *Systems biology approaches to disease marker discovery*. Dis Markers, 2010. 28(4): p. 209-24.
63. Attarha, S., et al., *Endometrial cancer and application of proteomics*. Exp Oncol, 2011. 33(3): p. 174-7.

64. Attarha, S., et al., *Individualised proteome profiling of human endometrial tumours improves detection of new prognostic markers*. Br J Cancer, 2013. 109(3): p. 704-13.
65. Staff, A.C., et al., *Elevated plasma growth differentiation factor-15 correlates with lymph node metastases and poor survival in endometrial cancer*. Clin Cancer Res, 2011. 17(14): p. 4825-33.
66. Alonso-Alconada, L., et al., *Annexin-A2 as predictor biomarker of recurrent disease in endometrial cancer*. Int J Cancer, 2015. 136(8): p. 1863-73.
67. Ihata, Y., et al., *Amino acid profile index for early detection of endometrial cancer: verification as a novel diagnostic marker*. Int J Clin Oncol, 2014. 19(2): p. 364-72.
68. Casado-Vela, J., et al., *Comprehensive proteomic analysis of human endometrial fluid aspirate*. J Proteome Res, 2009. 8(10): p. 4622-32.
69. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. Nat Med, 2000. 6(4): p. 389-95.
70. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. Nature, 1997. 386(6626): p. 671-4.
71. Winkler, F., *Hostile takeover: how tumours hijack pre-existing vascular environments to thrive*. J Pathol, 2017. 242(3): p. 267-72.
72. *National Cancer Institute Angiogenesis Inhibitors*. 8 Feb 2018; available from: <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy/angiogenesis-inhibitors-fact-sheet>.
73. Baron, A.T., et al., *Clinical implementation of soluble EGFR (sEGFR) as a theragnostic serum biomarker of breast, lung and ovarian cancer*. IDrugs, 2009. 12(5): p. 302-8.
74. Brandt-Rauf, P.W., *The c-erbB transmembrane growth factor receptors as serum biomarkers in human cancer studies*. Mutat Res, 1995. 333(1-2): p. 203-8.
75. Reiter, J.L., et al., *Comparative genomic sequence analysis and isolation of human and mouse alternative EGFR transcripts encoding truncated receptor isoforms*. Genomics, 2001. 71(1): p. 1-20.
76. Zhang, H., et al., *ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies*. J Clin Invest, 2007. 117(8): p. 2051-8.

77. Maramotti, S., et al., *Soluble epidermal growth factor receptor isoforms in non-small cell lung cancer tissue and in blood*. Lung Cancer, 2012. 76(3): p. 332-8.
78. Oh, M.J., et al., *Detection of epidermal growth factor receptor in the serum of patients with cervical carcinoma*. Clin Cancer Res, 2000. 6(12): p. 4760-3.
79. Choi, J.H., et al., *Detection of epidermal growth factor receptor in the serum of gastric carcinoma patients*. Cancer, 1997. 79(10): p. 1879-83.
80. Jantus-Lewintre, E., et al., *Analysis of the prognostic value of soluble epidermal growth factor receptor plasma concentration in advanced non-small-cell lung cancer patients*. Clin Lung Cancer, 2011. 12(5): p. 320-7.
81. Baron, A.T., et al., *A preliminary study of serum concentrations of soluble epidermal growth factor receptor (sErbB1), gonadotropins, and steroid hormones in healthy men and women*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2001. 10(11): p. 1175-85.
82. Ornitz, D.M. and N. Itoh, *The Fibroblast Growth Factor signaling pathway*. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol, 2015. 4(3): p. 215-66.
83. Blaber, M., J. DiSalvo, and K.A. Thomas, *X-ray crystal structure of human acidic fibroblast growth factor*. Biochemistry, 1996. 35(7): p. 2086-94.
84. Wai, P.Y. and P.C. Kuo, *The role of Osteopontin in tumor metastasis*. J Surg Res, 2004. 121(2): p. 228-41.
85. Chakraborty, G., et al., *The multifaceted roles of osteopontin in cell signaling, tumor progression and angiogenesis*. Curr Mol Med, 2006. 6(8): p. 819-30.
86. Furger, K.A., et al., *The functional and clinical roles of osteopontin in cancer and metastasis*. Curr Mol Med, 2001. 1(5): p. 621-32.
87. Stier, S., et al., *Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size*. J Exp Med, 2005. 201(11): p. 1781-91.
88. Katayama, Y., et al., *Integrin alpha4beta7 and its counterreceptor MAdCAM-1 contribute to hematopoietic progenitor recruitment into bone marrow following transplantation*. Blood, 2004. 104(7): p. 2020-6.

89. Thoms, J.W., et al., *Plasma osteopontin as a biomarker of prostate cancer aggression: relationship to risk category and treatment response*. Br J Cancer, 2012. 107(5): p. 840-6.
90. Mrochem, J. and W. Bartnik, *Osteopontin – a new marker in neoplastic diseases*. Contemp Oncol/Współczesna Onkol, 2008. 12(8): p. 349-53.
91. Sinha, Y.N., *Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance*. Endocr Rev, 1995. 16(3): p. 354-69.
92. Corbacho, A.M., G. Martinez De La Escalera, and C. Clapp, *Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis*. J Endocrinol, 2002. 173(2): p. 219-38.
93. Senger, D.R., et al., *Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid*. Science, 1983. 219(4587): p. 983-5.
94. Gerber, H.P., et al., *VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation*. Nat Med, 1999. 5(6): p. 623-8.
95. Ferrara, N., et al., *Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene*. Nature, 1996. 380(6573): p. 439-42.
96. Reichardt, L.F. and K.J. Tomaselli, *Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development*. Annu Rev Neurosci, 1991. 14: p. 531-70.
97. Holmes, K., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition*. Cell Signal, 2007. 19(10): p. 2003-12.
98. Tischer, E., et al., *The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing*. J Biol Chem, 1991. 266(18): p. 11947-54.
99. Robinson, C.J. and S.E. Stringer, *The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors*. J Cell Sci, 2001. 114(Pt 5): p. 853-65.
100. de Vries, C., et al., *The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor*. Science, 1992. 255(5047): p. 989-91.

101. Soker, S., et al., *Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor*. Cell, 1998. 92(6): p. 735-45.
102. Palmer, B.F. and D.J. Clegg, *Oxygen sensing and metabolic homeostasis*. Mol Cell Endocrinol, 2014. 397(1-2): p. 51-8.
103. Larrivee, B. and A. Karsan, *Signaling pathways induced by vascular endothelial growth factor (review)*. Int J Mol Med, 2000. 5(5): p. 447-56.
104. Larcher, F., et al., *Up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse skin carcinogenesis correlates with malignant progression state and activated H-ras expression levels*. Cancer Res, 1996. 56(23): p. 5391-6.
105. Alvarez, R.H., H.M. Kantarjian, and J.E. Cortes, *Biology of platelet-derived growth factor and its involvement in disease*. Mayo Clin Proc, 2006. 81(9): p. 1241-57.
106. Yu, J.C., et al., *Differential requirement of a motif within the carboxyl-terminal domain of alpha-platelet-derived growth factor (alpha PDGF) receptor for PDGF focus forming activity chemotaxis, or growth*. J Biol Chem, 1995. 270(13): p. 7033-6.
107. Phillips, D.J. and D.M. de Kretser, *Follistatin: a multifunctional regulatory protein*. Front Neuroendocrinol, 1998. 19(4): p. 287-322.
108. Shi, L., et al., *Clinical and Therapeutic Implications of Follistatin in Solid Tumours*. Cancer Genomics Proteomics, 2016. 13(6): p. 425-35.
109. de Winter, J.P., et al., *Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors*. Mol Cell Endocrinol, 1996. 116(1): p. 105-14.
110. Kozian, D.H., M. Ziche, and H.G. Augustin, *The activin-binding protein follistatin regulates autocrine endothelial cell activity and induces angiogenesis*. Lab Invest, 1997. 76(2): p. 267-76.
111. Olayioye, M.A., *Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members*. Breast Cancer Res, 2001. 3(6): p. 385-9.

112. Mazieres, J., et al., *Lung cancer that harbors an HER2 mutation: epidemiologic characteristics and therapeutic perspectives*. J Clin Oncol, 2013. 31(16): p. 1997-2003.
113. Tan, M. and D. Yu, *Molecular mechanisms of erbB2-mediated breast cancer chemoresistance*. Adv Exp Med Biol, 2007. 608: p. 119-29.
114. Burstein, H.J., *The distinctive nature of HER2-positive breast cancers*. N Engl J Med, 2005. 353(16): p. 1652-4.
115. Jones, S.A., et al., *The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease*. Faseb J, 2001. 15(1): p. 43-58.
116. Sato, A., et al., *Characterization of TEK receptor tyrosine kinase and its ligands, Angiopoietins, in human hematopoietic progenitor cells*. Int Immunol, 1998. 10(8): p. 1217-27.
117. Witzensbichler, B., et al., *Chemotactic properties of angiopoietin-1 and -2, ligands for the endothelial-specific receptor tyrosine kinase Tie2*. J Biol Chem, 1998. 273(29): p. 18514-21.
118. Tait, C.R. and P.F. Jones, *Angiopoietins in tumours: the angiogenic switch*. J Pathol, 2004. 204(1): p. 1-10.
119. Aref, S., et al., *Soluble angiopoietin-2/sTie2 receptor ratio is an independent prognostic marker in adult acute myeloid leukemia*. Indian J Hematol Blood Transfus, 2009. 25(1): p. 17-22.
120. Friedman, J.M., *A tale of two hormones*. Nat Med, 2010. 16(10): p. 1100-6.
121. Cirillo, D., et al., *Leptin signaling in breast cancer: an overview*. J Cell Biochem, 2008. 105(4): p. 956-64.
122. Hardwick, J.C., et al., *Leptin is a growth factor for colonic epithelial cells*. Gastroenterology, 2001. 121(1): p. 79-90.
123. Franke, T.F., et al., *PI3K/Akt and apoptosis: size matters*. Oncogene, 2003. 22(56): p. 8983-98.
124. Asselin, E., G.B. Mills, and B.K. Tsang, *XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells*. Cancer Res, 2001. 61(5): p. 1862-8.

125. Wiesner, C., et al., *C-kit and its ligand stem cell factor: potential contribution to prostate cancer bone metastasis*. *Neoplasia*, 2008. 10(9): p. 996-1003.
126. Ma, Y., et al., *Synergistic effect of SCF and G-CSF on stem-like properties in prostate cancer cell lines*. *Tumour Biol*, 2012. 33(4): p. 967-78.
127. Dobrenis, K., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor off-target effect on nerve outgrowth promotes prostate cancer development*. *Int J Cancer*, 2015. 136(4): p. 982-8.
128. Hurle, R.A., et al., *Hepatocyte growth factor/scatter factor and prostate cancer: a review*. *Histol Histopathol*, 2005. 20(4): p. 1339-49.
129. Gupta, A., et al., *Predictive value of plasma hepatocyte growth factor/scatter factor levels in patients with clinically localized prostate cancer*. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(22): p. 7385-90.
130. Gibb, S. and K. Strimmer, *MALDIquant: a versatile R package for the analysis of mass spectrometry data*. *Bioinformatics*, 2012. 28(17): p. 2270-1.
131. Breijer, M.C., et al., *Capacity of endometrial thickness measurement to diagnose endometrial carcinoma in asymptomatic postmenopausal women: a systematic review and meta-analysis*. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2012. 40(6): p. 621-9.
132. Mhawech-Fauceglia, P., et al., *Microarray analysis reveals distinct gene expression profiles among different tumor histology, stage and disease outcomes in endometrial adenocarcinoma*. *PLoS One*, 2010. 5(11): p. e15415.
133. Levan, K., et al., *Identification of a gene expression signature for survival prediction in type I endometrial carcinoma*. *Gene Expr*, 2010. 14(6): p. 361-70.
134. Salvesen, H.B., et al., *Integrated genomic profiling of endometrial carcinoma associates aggressive tumors with indicators of PI3 kinase activation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(12): p. 4834-9.
135. Salvesen, H.B., I.S. Haldorsen, and J. Trovik, *Markers for individualised therapy in endometrial carcinoma*. *Lancet Oncol*, 2012. 13(8): p. e353-61.
136. Ong, S.E., *Whole proteomes as internal standards in quantitative proteomics*. *Genome Med*, 2010. 2(7): p. 49.

137. Tran, J.C., et al., *Mapping intact protein isoforms in discovery mode using top-down proteomics*. Nature, 2011. 480(7376): p. 254-8.
138. Ura, B., et al., *A proteomic approach for the identification of biomarkers in endometrial cancer uterine aspirate*. Oncotarget, 2017. 8(65): p. 109536-45.
139. Yang, E.C., et al., *Protein expression profiling of endometrial malignancies reveals a new tumor marker: chaperonin 10*. J Proteome Res, 2004. 3(3): p. 636-43.
140. Wilson, I.D., et al., *HPLC-MS-based methods for the study of metabonomics*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2005. 817(1): p. 67-76.
141. Farrell, D.H., et al., *Role of fibrinogen alpha and gamma chain sites in platelet aggregation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992. 89(22): p. 10729-32.
142. Theodorescu, D., et al., *Discovery and validation of new protein biomarkers for urothelial cancer: a prospective analysis*. Lancet Oncol, 2006. 7(3): p. 230-40.
143. Bergen, H.R., 3rd, et al., *Discovery of ovarian cancer biomarkers in serum using NanoLC electrospray ionization TOF and FT-ICR mass spectrometry*. Dis Markers, 2003. 19(4-5): p. 239-49.
144. Ebert, M.P., et al., *Identification and confirmation of increased fibrinopeptide a serum protein levels in gastric cancer sera by magnet bead assisted MALDI-TOF mass spectrometry*. J Proteome Res, 2006. 5(9): p. 2152-8.
145. Sandanayake, N.S., et al., *Identification of potential serum peptide biomarkers of biliary tract cancer using MALDI MS profiling*. BMC Clin Pathol, 2014. 14(1): p. 7.
146. Villanueva, J., et al., *Differential exoprotease activities confer tumor-specific serum peptidome patterns*. J Clin Invest, 2006. 116(1): p. 271-84.
147. Villanueva, J., et al., *Serum peptidome patterns that distinguish metastatic thyroid carcinoma from cancer-free controls are unbiased by gender and age*. Mol Cell Proteomics, 2006. 5(10): p. 1840-52.
148. Pardoll, D., *Does the immune system see tumors as foreign or self?* Annu Rev Immunol, 2003. 21: p. 807-39.

149. Pio, R., D. Ajona, and J.D. Lambris, *Complement inhibition in cancer therapy*. Semin Immunol, 2013. 25(1): p. 54-64.
150. Rutkowski, M.J., et al., *Cancer and the complement cascade*. Mol Cancer Res, 2010. 8(11): p. 1453-65.
151. Markiewski, M.M., et al., *Modulation of the antitumor immune response by complement*. Nat Immunol, 2008. 9(11): p. 1225-35.
152. Nunez-Cruz, S., et al., *Genetic and pharmacologic inhibition of complement impairs endothelial cell function and ablates ovarian cancer neovascularization*. Neoplasia, 2012. 14(11): p. 994-1004.
153. Maness, P.F. and A. Orengo, *Serum Complement Levels in Patients with Digestive Tract Carcinomas and Other Neoplastic Diseases*. Oncology, 1977. 34(2): p. 87-9.
154. Ytting, H., et al., *Increased activity of the mannan-binding lectin complement activation pathway in patients with colorectal cancer*. Scand J Gastroenterol, 2004. 39(7): p. 674-9.
155. Watson, N.F., et al., *Expression of the membrane complement regulatory protein CD59 (protectin) is associated with reduced survival in colorectal cancer patients*. Cancer Immunol Immunother, 2006. 55(8): p. 973-80.
156. Xu, C., et al., *Increased CD59 protein expression predicts a PSA relapse in patients after radical prostatectomy*. Prostate, 2005. 62(3): p. 224-32.
157. Corrales, L., et al., *Anaphylatoxin C5a creates a favorable microenvironment for lung cancer progression*. J Immunol, 2012. 189(9): p. 4674-83.
158. Klupczynska, A., et al., *Identification of Serum Peptidome Signatures of Non-Small Cell Lung Cancer*. Int J Mol Sci, 2016. 17(4): p. 410.
159. Swiatly, A., et al., *MALDI-TOF-MS analysis in discovery and identification of serum proteomic patterns of ovarian cancer*. BMC Cancer, 2017. 17(1): p. 472.
160. Lien, Y.H. and L.W. Lai, *Pathogenesis, diagnosis and management of paraneoplastic glomerulonephritis*. Nat Rev Nephrol, 2011. 7(2): p. 85-95.
161. Rahbari, N.N., et al., *Expression and prognostic value of circulating angiogenic cytokines in pancreatic cancer*. BMC Cancer, 2011. 11: p. 286.

162. Mousa, L., M.E. Salem, and S. Mikhail, *Biomarkers of Angiogenesis in Colorectal Cancer*. *Biomark Cancer*, 2015. 7(Suppl 1): p. 13-9.
163. Rykala, J., et al., *Angiogenesis markers quantification in breast cancer and their correlation with clinicopathological prognostic variables*. *Pathol Oncol Res*, 2011. 17(4): p. 809-17.
164. Kodera, Y., et al., *Sunitinib inhibits lymphatic endothelial cell functions and lymph node metastasis in a breast cancer model through inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 3*. *Breast Cancer Res*, 2011. 13(3): p. R66.
165. Goffin, V., et al., *Prolactin: the new biology of an old hormone*. *Annu Rev Physiol*, 2002. 64: p. 47-67.
166. Gerlo, S., et al., *Prolactin in man: a tale of two promoters*. *Bioessays*, 2006. 28(10): p. 1051-5.
167. Takahashi, H., et al., *Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of DNA Complementary to Human Decidual Prolactin mRNA*. *J Biochem*, 1984. 95(5): p. 1491-99.
168. Clevenger, C.V. and J.B. Kline, *Prolactin receptor signal transduction*. *Lupus*, 2001. 10(10): p. 706-18.
169. Pickett, C.A. and A. Gutierrez-Hartmann, *Epidermal growth factor and Ras regulate gene expression in GH4 pituitary cells by separate, antagonistic signal transduction pathways*. *Mol Cell Biol*, 1995. 15(12): 6777-84.
170. Buckley, A.R., C.W. Putnam, and D.H. Russell, *Prolactin as a mammalian mitogen and tumor promoter*. *Adv Enzyme Regul*, 1988. 27: p. 371-91.
171. Yurkovetsky, Z., et al., *Development of multimarker panel for early detection of endometrial cancer. High diagnostic power of prolactin*. *Gynecol Oncol*, 2007. 107(1): p. 58-65.
172. Wang, D.Y., et al., *Relationship of Blood Prolactin Levels and the Risk of Subsequent Breast Cancer*. *Int J Epidemiol*, 1992. 21(2): p. 214-21.
173. Hankinson, S.E., et al., *Plasma Prolactin Levels and Subsequent Risk of Breast Cancer in Postmenopausal Women*. *J Natl Cancer Inst*, 1999. 91(7): p. 629-34.

174. Tworoger, S.S. and S.E. Hankinson, *Prolactin and breast cancer risk*. Cancer Lett, 2006. 243(2): p. 160-9.
175. Levina, V.V., et al., *Biological significance of prolactin in gynecologic cancers*. Cancer Res, 2009. 69(12): p. 5226-33.
176. Lewis, D.A. and B.M. Sherman, *Serotonergic regulation of prolactin and growth hormone secretion in man*. Acta Endocrinol (Copenh), 1985. 110(2): p. 152-7.
177. Andrusiewicz, M., et al., *CGB and GNRH1 expression analysis as a method of tumor cells metastatic spread detection in patients with gynecological malignances*. J Transl Med, 2011. 9: p. 130.
178. Oda, K., et al., *Risk of endometrial cancer in patients with a preoperative diagnosis of atypical endometrial hyperplasia treated with total laparoscopic hysterectomy*. Gynecology and Minimally Invasive Therapy, 2016. 5(2): p. 69-73.
179. Boyd, J.A. and J.C. Barrett, *Genetic and cellular basis of multistep carcinogenesis*. Pharmacol Ther, 1990. 46(3): p. 469-86.
180. Plotnikov, A., et al., *Oncogene-mediated inhibition of glycogen synthase kinase 3 beta impairs degradation of prolactin receptor*. Cancer Res, 2008. 68(5): p. 1354-61.
181. Brisken, C., et al., *IGF-2 is a mediator of prolactin-induced morphogenesis in the breast*. Dev Cell, 2002. 3(6): p. 877-87.
182. Castillo, A., R. Tolon, and A. Aranda, *Insulin-like growth factor-1 stimulates rat prolactin gene expression by a Ras, ETS and phosphatidylinositol 3-kinase dependent mechanism*. Oncogene, 1998. 16(15): 1981-91.
183. Gill, S., et al., *Expression of prolactin receptors in normal, benign, and malignant breast tissue: an immunohistological study*. J Clin Pathol, 2001. 54(12): p. 956-60.
184. Leav, I., et al., *Prolactin Receptor Expression in the Developing Human Prostate and in Hyperplastic, Dysplastic, and Neoplastic Lesions*. Am J Pathol, 1999. 154(3): p. 863-70.

185. Agarwal, N., et al., *Phase I Study of the Prolactin Receptor Antagonist LFA102 in Metastatic Breast and Castration-Resistant Prostate Cancer*. *Oncologist*, 2016. 21(5): p. 535-6.
186. Baron, A.T., et al., *Soluble epidermal growth factor receptor (sEGFR/sErbB1) as a potential risk, screening, and diagnostic serum biomarker of epithelial ovarian cancer*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2003. 12(2): p. 103-13.
187. Muller, V., et al., *Prognostic and predictive impact of soluble epidermal growth factor receptor (sEGFR) protein in the serum of patients treated with chemotherapy for metastatic breast cancer*. *Anticancer Res*, 2006. 26(2b): p. 1479-87.
188. Jacot, W., et al., *Serum EGF-receptor and HER-2 extracellular domains and prognosis of non-small-cell lung cancer*. *Br J Cancer*, 2004. 91(3): p. 430-3.
189. Sasaki, H., et al., *Elevated serum epidermal growth factor receptor level in stage IV thymoma*. *Surg Today*, 2004. 34(5): p. 477-9.
190. Horala, A., et al., *Diagnostic Value of Serum Angiogenesis Markers in Ovarian Cancer Using Multiplex Immunoassay*. *Int J Mol Sci*, 2017. 18(1): p. 123.
191. Akl, M.R., et al., *Molecular and clinical significance of fibroblast growth factor 2 (FGF2 /bFGF) in malignancies of solid and hematological cancers for personalized therapies*. *Oncotarget*, 2016. 7(28): p. 44735-62.
192. Gazzaniga, P., et al., *Detection of basic Fibroblast Growth Factor mRNA in urinary bladder cancer: Correlation with local relapses*. *Int J Oncol*, 1999. 14(6): p. 1123-7.
193. Yamanaka, Y., et al., *Overexpression of Acidic and Basic Fibroblast Growth Factors in Human Pancreatic Cancer Correlates with Advanced Tumor Stage*. *Cancer Res*, 1993. 53(21): p. 5289-96.
194. Rasmuson, T., et al., *Impact of serum basic fibroblast growth factor on prognosis in human renal cell carcinoma*. *Eur J Cancer*. 37(17): p. 2199-203.
195. Aigner, A., et al., *Marked increase of the growth factors pleiotrophin and fibroblast growth factor-2 in serum of testicular cancer patients*. *Ann Oncol*, 2003. 14(10): p. 1525-9.

196. Bian, X., et al., *Correlation of bFGF, FGFR-1 and VEGF expression with vascularity and malignancy of human astrocytomas*. Anal Quant Cytol Histol, 2000. 22(3): p. 267-74.
197. Granato, A.M., et al., *Basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor serum levels in breast cancer patients and healthy women: useful as diagnostic tools?* Breast Cancer Res, 2004. 6(1): p. R38-45.
198. Hsiung, R., et al., *High Basic Fibroblast Growth Factor Levels in Nipple Aspirate Fluid Are Correlated with Breast Cancer*. Cancer J, 2002. 8(4): p. 303-10.
199. Dobrzycka, B., et al., *Pretreatment serum levels of bFGF and VEGF and its clinical significance in endometrial carcinoma*. Gynecol Oncol, 2013. 128(3): p. 454-60.
200. Hoying, J.B. and S.K. Williams, *Effects of basic fibroblast growth factor on human microvessel endothelial cell migration on collagen I correlates inversely with adhesion and is cell density dependent*. J Cell Physiol, 1996. 168(2): p. 294-304.
201. Karajannis, M.A., et al., *Activation of FGFR1beta signaling pathway promotes survival, migration and resistance to chemotherapy in acute myeloid leukemia cells*. Leukemia, 2006. 20(6): p. 979-86.
202. Faridi, A., et al., *Long-term Follow-up and Prognostic Significance of Angiogenic Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) Expression in Patients with Breast Cancer*. Pathol Res Pract, 2002. 198(1): p. 1-5.
203. Ren, P., et al., *High serum levels of follistatin in patients with ovarian cancer*. J Int Med Res, 2012. 40(3): p. 877-86.
204. Tomoda, T., et al., *Prognostic impact of serum follistatin in patients with hepatocellular carcinoma*. J Gastroenterol Hepatol, 2013. 28(8): p. 1391-6.
205. Szasz, A.M., et al., *Cross-validation of survival associated biomarkers in gastric cancer using transcriptomic data of 1,065 patients*. Oncotarget, 2016. 7(31): p. 49322-33.
206. Blank, S., et al., *Angiogenic and growth factors in gastric cancer*. J Surg Res, 2015. 194(2): p. 420-9.

207. Ferrara, N., et al., *Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer*. *Nat Rev Drug Discov*, 2004. 3(5): p. 391-400.
208. de Haas, S., et al., *Genetic variability of VEGF pathway genes in six randomized phase III trials assessing the addition of bevacizumab to standard therapy*. *Angiogenesis*, 2014. 17(4): p. 909-20.
209. Aravantinos, G. and D. Pectasides, *Bevacizumab in combination with chemotherapy for the treatment of advanced ovarian cancer: a systematic review*. *J Ovarian Res*, 2014. 7: p. 57.
210. Partridge, A.H., et al., *Chemotherapy and targeted therapy for women with human epidermal growth factor receptor 2-negative (or unknown) advanced breast cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline*. *J Clin Oncol*, 2014. 32(29): p. 3307-29.
211. Macarulla, T., T. Sauri, and J. Tabernero, *Evaluation of aflibercept in the treatment of metastatic colorectal cancer*. *Expert Opin Biol Ther*, 2014. 14(10): p. 1493-505.
212. Allen, J.W., et al., *Southwest Oncology Group S0802: a randomized, phase II trial of weekly topotecan with and without ziv-aflibercept in patients with platinum-treated small-cell lung cancer*. *J Clin Oncol*, 2014. 32(23): p. 2463-70.
213. Chen, H., et al., *A phase II multicentre study of ziv-aflibercept in combination with cisplatin and pemetrexed in patients with previously untreated advanced/metastatic non-squamous non-small cell lung cancer*. *Br J Cancer*, 2014. 110(3): p. 602-8.
214. Schutz, F.A., T.K. Choueiri, and C.N. Sternberg, *Pazopanib: Clinical development of a potent anti-angiogenic drug*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2011. 77(3): p. 163-71.
215. Bellmunt, J., et al., *SEOM clinical guidelines for the treatment of renal cell carcinoma*. *Clin Transl Oncol*, 2014. 16(12): p. 1043-50.
216. van der Graaf, W.T., et al., *Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial*. *Lancet*, 2012. 379(9829): p. 1879-86.
217. Reck, M., D. Heigener, and N. Reinmuth, *Nintedanib for the treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer*. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2014. 7(5): p. 579-90.

218. Capdevila, J., et al., *What could Nintedanib (BIBF 1120), a triple inhibitor of VEGFR, PDGFR, and FGFR, add to the current treatment options for patients with metastatic colorectal cancer?* Crit Rev Oncol Hematol, 2014. 92(2): p. 83-106.
219. Gadducci, A., N. Lanfredini, and C. Sergiampietri, *Antiangiogenic agents in gynecological cancer: State of art and perspectives of clinical research.* Crit Rev Oncol Hematol, 2015. 96(1): p. 113-28.

8. ANEKS

Tabela 14. Opis próbek wykorzystanych w badaniu

Lp.	Nr próbki	Wiek	FIGO	Rozpoznanie histopatologiczne pooperacyjne	Cecha G
1	2	57	IIC1	rak endometrialny	3
2	4	76	IA	rak endometrialny	1
3	5	63	IA	rak endometrialny	1
4	6	54	II	rak endometrialny	2
5	7	63	II	rak endometrialny	2
6	8	78	IIB	rak endometrialny	2
7	9	69	IIIB	rak endometrialny	2
8	10	64	II	rak endometrialny	1
9	11	67	IA	rak endometrialny	1
10	12	65	IIIA	rak endometrialny	2
11	14	60	IA	rak endometrialny	1
12	15	63	IA	rak endometrialny	2
13	16	80	IA	rak endometrialny	2
14	17	70	IB	rak endometrialny	2
15	18	69	IA	rak endometrialny	1
16	19	64	IB	rak endometrialny	3
17	20	62	IB	rak endometrialny	2

18	21	55	IA	rak endometrialny	3
19	23	74	IIIA	rak endometrialny	1
20	24	72	IIIA	rak endometrialny	1
21	25	66	IA	rak endometrialny	2
22	26	64	IA	rak endometrialny	1
23	27	72	IA	rak endometrialny	2
24	28	63	IB	rak endometrialny	2
25	29	51	IA	rak endometrialny	2
26	30	57	IIIA	rak endometrialny	2
27	31	74	II	rak endometrialny	1
28	32	57	IA	rak endometrialny	1
29	33	60	IA	rak endometrialny	2
30	34	71	IB	rak endometrialny	1
31	35	83	IA	rak endometrialny	1
32	36	79	IA	rak endometrialny	1
33	37	72	IB	rak endometrialny	2
34	38	48	II	rak endometrialny	1
35	39	61	IB	rak endometrialny	2
36	40	63	II	rak endometrialny	2
37	41	69	IB	rak endometrialny	2
38	43	77	II	rak endometrialny	2
39	44	73	IA	rak endometrialny	2

40	45	58	IA	rak endometrialny	1
41	46	56	IA	rak endometrialny	1
42	47	73	IB	rak endometrialny	2
43	49	77	IIIA	rak endometrialny	3
44	50	52	IA	rak endometrialny	1
45	51	56	IVB	rak endometrialny	1
46	52	57	IIIB	rak endometrialny	2
47	53	75	IA	rak endometrialny	1
48	54	65	IB	rak endometrialny	3
49	55	72	IB	rak endometrialny	1
50	56	62	IA	rak endometrialny	1
51	57	64	IA	rak endometrialny	2
52	59	68	IB	rak endometrialny	3
53	60	63	IB	rak endometrialny	1
54	61	77	IA	rak endometrialny	3
55	62	72	IA	rak endometrialny	1
56	65	67	IA	rak endometrialny	1
57	67	70	IA	rak endometrialny	2
58	68	66	IB	rak endometrialny	1
59	69	48	II	rak endometrialny	1
60	71	77	IB	rak endometrialny	1
61	72	67	II	rak endometrialny	3

62	74	53	IA	rak endometrialny	1
63	75	54	IA	rak endometrialny	1
64	76	64	II	rak endometrialny	2
65	77	63	IA	rak endometrialny	3
66	79	66	II	rak endometrialny	3
67	81	63	IA	rak endometrialny	1
68	82	64	IB	rak endometrialny	1
69	83	65	IVB	rak endometrialny	3
70	85	72	IIIB	rak endometrialny	3
71	86	62	IA	rak endometrialny	1
72	87	56	IB	rak endometrialny	1
73	88	64	II	rak endometrialny	2
74	89	50	II	rak endometrialny	3
75	90	70	II	rak endometrialny	2
76	92	72	IIIC	rak endometrialny	2
77	93	43	IB	rak endometrialny	3
78	95	62	IA	rak endometrialny	1
79	96	62	IA	rak endometrialny	1
80	97	62	IA	rak endometrialny	1
81	98	58	II	rak endometrialny	2
82	99	60	IB	rak endometrialny	3
83	100	67	IA	rak endometrialny	1

84	101	66	IA	rak endometrialny	1
85	102	78	IB	rak endometrialny	2
86	103	53	IA	rak endometrialny	1
87	105	49	IA	rak endometrialny	3
88	106	35	IA	rak endometrialny	1
89	107	56	c	rak endometrialny	2
90	108	62	IA	rak endometrialny	3
91	109	63	II	rak endometrialny	1
92	110	78	III	rak endometrialny	1
93	111	68	IA	rak endometrialny	1
94	112	65	IIIB	rak endometrialny	3
95	113	83	II	rak endometrialny	3
96	115	62	IIIB	rak endometrialny	2
97	116	78	IB	rak endometrialny	3
98	117	61	IA	rak endometrialny	1
99	118	55	IVB	rak endometrialny	2
100	119	68	IIIA	rak endometrialny	2
101	120	86	IA	rak endometrialny	2
102	122	57	IA	rak endometrialny	1
103	123	61	IA	rak endometrialny	1
104	124	66	IA	rak endometrialny	1
105	125	59	IA	rak endometrialny	1

106	126	78	IVB	rak endometrialny	3
107	127	68	IB	rak endometrialny	2
108	129	60	IA	rak endometrialny	3
109	130	65	IB	rak endometrialny	2
110	131	57	IA	rak endometrialny	2
111	132	72	IB	rak endometrialny	2
112	134	43	IA	rak endometrialny	1
113	135	73	IIIC	rak endometrialny	2
114	136	59	IA	rak endometrialny	1
115	137	47	IA	rak endometrialny	3
116	138	62	IA	rak endometrialny	1
117	139	61	IA	rak endometrialny	2
118	140	78	IB	rak endometrialny	3
119	141	61	IIIA	rak endometrialny	1
120	142	57	IIIC	rak endometrialny	2
121	143	85	IB	rak endometrialny	2
122	144	53	IA	rak endometrialny	2
123	145	74	IA	rak endometrialny	1
124	148	70	IA	rak endometrialny	1
125	150	41	IA	rak endometrialny	1
126	151	61	IA	rak endometrialny	1
127	152	67	IIIC	rak endometrialny	2
128	153	73	II	rak endometrialny	2

129	154	52	IA	rak endometrialny	1
130	155	67	IB	rak endometrialny	1
131	156	66	IIIB	rak endometrialny	2
132	157	58	IB	rak endometrialny	2
133	158	76	II	rak endometrialny	2
134	159	63	II	rak endometrialny	2
135	160	66	IA	rak endometrialny	2
136	161	62	IA	rak endometrialny	1
137	162	45	II	rak endometrialny	2
138	164	65	IV	rak endometrialny	2
139	165	64	IA	rak endometrialny	2
140	166	61	IA	rak endometrialny	2
141	167	67	IB	rak endometrialny	1
142	168	70	II	rak endometrialny	2
143	169	40	IIA	rak endometrialny	1
144	170	69	IB	rak endometrialny	2
145	171	65	IB	rak endometrialny	3
146	172	64	IA	rak endometrialny	2
147	173	79	IB	rak endometrialny	1
148	174	70	IIA	rak endometrialny	3
149	175	65	IB	rak endometrialny	1
150	176	69	IB	rak endometrialny	2

9. STRESZCZENIE

Zwalczanie nowotworów złośliwych jest dziś głównym wyzwaniem medycyny. Od co najmniej 30 lat nie zanotowano znaczącego postępu w leczeniu systemowym nowotworów złośliwych. Każdy nowotwór ma inną, charakterystyczną dla siebie biologię. Wydaje się, że kluczem do zwalczania nowotworów złośliwych może być lepsze poznanie molekularnej biologii każdego rodzaju raka, także w zakresie interakcji powstającego nowotworu z organizmem, w którym się rozwija.

Proteomika jest dziedziną biologii molekularnej, która w połączeniu z bioinformatyką zajmuje się badaniem proteomu, czyli identyfikacją, poznaniem struktury, funkcji oraz oddziaływań białek, jakie są zakodowane w genomie. Każda tkanka, również nowotworowa, ma swój własny pakiet protein, czyli proteom. Proteom jest jednostką dynamiczną, mogącą zmieniać się w czasie i nie jest prostym przełożeniem ekspresji genów na produkcję białka. Jednoczesna identyfikacja wielu białek z pojedynczej próbki biologicznej w celu znalezienia protein stanowiących wzorzec dla tkanek zdrowych i chorych oraz uczynienie z niego markerów to zadanie rozwijającej się proteomiki. Pojęcie: metabolom jest jeszcze szersze niż proteom. Metabolom stanowi ogół metabolitów obecnych w organizmie, narządzie, tkance lub komórce. Metabolomika jest najbardziej związana z fenotypem i od niego zależna. Efekty badań zarówno białek, jak też metabolitów obecnych w tkankach lub/i płynach są w centrum uwagi badaczy poszukujących biomarkerów chorób nowotworowych.

Badania proteomiczne obejmują procedury jednoczesnego oczyszczania i separacji związków wchodzących w skład wieloskładnikowych próbek materiału biologicznego, a następnie ich identyfikację i interpretację w celu wyselekcjonowania potencjalnych biomarkerów, których przydatność powinna być zweryfikowana i zwalidowana. Obecnie największe znaczenie w ocenie mieszanin białek, jaką jest np. ludzka surowica, zyskuje spektroskopia mas. Spektroskopia mas to technika, która pozwala oceniać skład skomplikowanych mieszanin zawierających tysiące białek, ale też jest w stanie wykryć nawet śladowe ilości danego białka w badanej mieszaninie. Cele badań proteomicznych to odkrycie proteomu człowieka oraz odkrycie różnic pomiędzy proteomem fizjologicznym i proteomem związanym z chorobą, badanie związków pomiędzy proteomicznym stanem zdrowia i choroby, a także poznawanie reakcji proteomu na stosowane leczenie.

Rak endometrium to najczęściej rozpoznawany nowotwór narządów płciowych u kobiet w krajach rozwiniętych i drugi (po raku szyjki macicy) w krajach

rozwijających się. Poszukiwania markerów biochemicznych raka endometrium rozwijały się równolegle z poszukiwaniami markerów innych nowotworów. Badania z ostatnich lat skupiają się na poszukiwaniu innych cech markerowych, które mogłyby dostarczyć danych do postawienia jednoznacznej prognozy co do przebiegu choroby.

Celem tej pracy było zastosowanie nowoczesnej i złożonej strategii analityczno-bioinformatycznej w analizie białek endogennych w surowicy w poszukiwaniu biomarkerów o wartości diagnostycznej i różnicującej u chorych na raka endometrium. Cel pracy realizowano poprzez badanie proteomiczne surowicy chorych na raka endometrialnego endometrium; celem badania było poszukiwanie profilu peptydowego charakteryzującego chorobę w przedziale mas od 1000 do 10 000 Da. Ponadto na podstawie bibliotek proteomicznych dokonano identyfikacji znalezionych peptydów. Przeprowadzono również ocenę stężeń białek biorących udział w procesach angiogenezy w surowicy chorych na raka endometrium i korelację cechy klinicznej stopnia złośliwości nowotworu chorych na ten nowotwór z ekspresją białek zaangażowanych w proces angiogenezy.

Do badania włączono surowice pobrane od 176 chorych na nowotwór złośliwy macicy. Do analizy profilowania białek i peptydów wykorzystano technikę spektrometrii mas typu MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Brema, Niemcy). Markery procesu angiogenezy (sEGFR, FGF-basic, follistatin, G-CSF, HGF, sHER2/neu, sIL-6Ra, leptin, osteopontin, PECAM-1, PDGF-AB/BB, prolactin, SCF, sTIE-2, sVEGFR-1, sVEGFR-2) zostały oznaczone jednocześnie w próbkach surowicy za pomocą testu immunologicznego Bio-Plex Pro Human Cancer Biomarker Panel 1 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) według instrukcji producenta. Wyniki otrzymane przy wykorzystaniu techniki separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej poddano następnie statystycznej analizie danych. Celem analizy statystycznej było porównanie poziomów stężeń oznaczonych białek pomiędzy surowicami pobranymi od pacjentek z rakiem endometrium o różnych wartościach cechy G oraz pomiędzy próbkami uzyskanymi od pacjentek z rakiem endometrium a materiałem z grupy kontrolnej ($n = 48$). Założeniem podjętych doświadczeń było dokonanie analizy proteomicznej surowicy krwi w poszukiwaniu biomarkerów raka endometrialnego endometrium. Przeprowadzone porównanie profili peptydowych surowicy kobiet zdrowych oraz kobiet chorych na raka endometrium wykazało, że ekspresja części peptydów jest inna w obu grupach. Analizy statystyczne wykorzystujące intensywności pików peptydów otrzymane w wyniku profilowania peptydowego wykazały statystycznie istotne różnice pomiędzy próbkami pobranymi od kobiet chorych i zdrowych dotyczące dziesięciu wartości m/z (stosunek masy do ładunku). W przeprowadzonym profilowaniu peptydowym na podstawie pików o wartościach m/z 1020,518 oraz

1206,586 i 1465,644 wykazano między próbkami pozyskanymi od kobiet chorych i kobiet zdrowych istotne statystycznie różnice dotyczące tych pików. Sekwencję aminokwasową DFLAEGGGVR zidentyfikowano na podstawie danych z biblioteki jako łańcuch α fibrynogenu (FIBA_HUMAN Protein). Kolejnym peptydem różnicującym grupę badaną z rakiem endometrium z grupą kontrolną było białko układu dopełniacza C3 (CO3_HUMAN Complement C3). Wykazana w przeprowadzonych badaniach nadekspresja białka C3 potwierdza wcześniejsze doniesienia o możliwości zastosowania białka C3 jako markera chorób nowotworowych. Udowodniono zatem, że rak endometrium wywołuje w organizmie zmiany na poziomie proteomicznym. Biomarkerem nie musi być pojedyncze białko, dlatego próbuje się implementować całe panele markerowe do wykrywania, ale także monitorowania chorób nowotworowych. Taki panel może stanowić proteomiczny lub metabolomiczny „odcisk palca”, swoisty dla danego nowotworu. Badaniem wielomarkerowym była jednoczesna ocena stężeń czynników biologicznych o udokumentowanym udziale w procesach angiogenezy. Przeprowadzone w ramach badań zaprezentowanych w rozprawie oznaczenia wykorzystujące stężenia oznaczonych białek w surowicy uczestniczących w procesie angiogenezy wykazały, że w próbkach pobranych od wszystkich chorych z EC i próbkach pozyskanych od kobiet zdrowych stężenia 14 spośród 16 białek różniły się istotnie statystycznie. Białkami tymi były: sEGRF, foliostatyna, G-CSF, sHER2/neu, HGF, sIL-6Ra, osteopontyna, PDGF-AB/BB, PECA-1, prolaktyna, SCF, sTIE-2, sVEGR-1 i sVEGR-2. Jednak mediany bezwzględnych stężeń sEGRF, foliostatyny, sHER2/neu, HGF, sIL-6Ra, leptyny, PDGF-AB/BB, PECA-1, SCF, sTIE-2, sVEGR-1 i sVEGR-2 u kobiet z rakiem endometrium były niższe niż w populacji kobiet zdrowych. Natomiast tylko stężenie prolaktyny było istotnie wyższe u chorych na raka endometrium we wszystkich trzech grupach różnicowania histologicznego: G1, G2 i G3, a różnice były istotne statystycznie. W grupie kontrolnej i w grupie z rakiem endometrialnym G1 zaobserwowano istotnie różniące obie grupy stężenie zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (FGF-basic) oraz czynnika wzrostu granulocytów (G-CSF). W niższych stopniach różnicowania nowotworu nie zanotowano istotności statystycznej pomiędzy stężeniami FGF-basic w próbkach pobranych od kobiet z grupy badanej i z grupy kontrolnej, mimo że bezwzględne stężenia były również podwyższone. Wykonane badania potwierdzają odwrotną zależność ekspresji FGF-basic od złośliwości nowotworu, mimo że nie uzyskano wyników istotnych statystycznie w porównaniu z grupą zdrowych kobiet oraz w grupie G2. Wraz ze wzrostem złośliwości nowotworu spadało bezwzględne stężenie zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów. Stężenia foliostatyny osiągnęły znamienność statycznie istotną tylko w grupie G3.

Wartości bezwzględne były znacznie niższe niż w grupie kontrolnej. W grupach G1 i G2 różnice były nieistotne.

Zastosowana strategia analityczno-bioinformatyczna potwierdziła, że analiza białek i peptydów w surowicy krwi chorych jest nowoczesnym, obiecującym narzędziem w ginekologii onkologicznej, a otrzymane wyniki dowodzą, że istnieje korelacja pomiędzy stanem biologicznym pacjenta a jego statusem proteomicznym. Proces karcinogenezy raka endometrium powoduje zmiany w proteomie, które mogą być wykryte u chorych, i mogą być one markerem tego procesu, zaś zastosowane techniki analityczne oraz ich wyniki mogą być dalej wykorzystane do stratyfikacji chorych na raka endometrium, czego implikacją powinno być spersonalizowane leczenie. Wykazane białka sygnałowe: łańcuch alfa fibrynogenu oraz białko układu dopełniacza C3 są białkami sygnałowymi raka endometrium i mogą stać się przedmiotem dalszych badań w aspekcie oceny ich stężeń w celu stratyfikacji chorych na agresywną postać raka endometrium. Panele wielomarkerowe stanowią swoisty dla danego nowotworu „odcisk palca” i mogą zostać wykorzystane w dalszych badaniach, zarówno proteomicznych, jak i klinicznych. Markerem surowiczego raka endometrialnego błony śluzowej trzonu macicy jest prolaktyna. Należy kontynuować badania, które mogą doprowadzić do wykorzystania wiedzy o tym markerze w konstrukcji leków do terapii celowanej. Podsumowując, można stwierdzić, że do całkowitego poznania i zrozumienia wszystkich zależności w szlakach molekularnych procesu karcinogenezy należy przeprowadzić wiele badań i doświadczeń. Każde z nich w jakimś – choćby małym – stopniu zbliża świat badaczy do tego celu. Możliwe, że poznanie proteomów, chociażby zdrowych tkanek, jest zamierzeniem na lata. Ale możliwe też, że nagle pojawi się metoda, która uprości procedury i zgłębimy te zależności w ciągu kilku lat.

10. SUMMARY

Combatting of malignant tumours represents today the main challenge for medicine. For at least 30 years no significant progress has been noted in systemic treatment of malignant tumours. Every of them manifests a distinct, typical for it biology. The key for combatting malignant tumours seems to involve better recognition of molecular biology of every tumour, including interaction of the arising tumour with its host.

Proteomics represents a branch of molecular biology which, in association with bioinformatics examines or identifies proteome, structure, function and interactions of proteins coded in the genome. Every tissue, including the neoplastic ones, carries its packet of proteins, the proteome. Proteome is a dynamic unit, which changes in time and cannot be equalled with a simple result of gene transcription. Parallel identification of multiple proteins in a single biological sample, with the aim of identifying proteins representing standard pattern of proteins or a proteome of healthy and pathological tissues or providing markers of the tissue represents the aim of just developing proteomics. The term of metabolom is broader than the proteome: it represents all the metabolites present in an organism, organ, tissue or a cell. Metabolomics is linked particularly and dependent on phenotype. Effects of studies on proteins and metabolites present in tissues and/or fluids remain in the centre of investigators searching for biomarkers of neoplastic diseases.

Proteomic studies involve procedures of parallel purification and separation of compounds composing the multi-component biological material samples, followed by their identification and interpretation in order to select potential biomarkers, the suitability of which should be verified and validated. At present, the most significant in evaluation of protein mixtures such as, e.g., human serum becomes mass spectroscopy, the technique allowing to define composition of complex mixtures of thousands of proteins but capable of detecting even traces of a given protein in the studied mixture. Proteomic studies aim at defining human proteome, at detecting differences between physiological proteome and the proteome linked to a disease, examination of the relationship between proteomic conditions of health and that of disease and identification of proteome reaction to the applied treatment.

Endometrial cancer represents one of the most frequently diagnosed genital tumours in women of developed countries and the second (after cervical cancer) in developing countries. In recent years the search for biochemical markers of

endometrial cancer developed in parallel to searches for other markers which might provide an unequivocal prognosis related to course of the disease.

Present study aimed at establishing a modern and complex analytic-bioinformatic strategy in analysis of endogenous serum proteins, searching for biomarkers identifying peptide profile characterising the disease within the mass range of 1000 to 10 000 Da. Moreover, taking advantage of proteomic libraries the investigated peptides were identified. Also concentration of serum proteins participating in angiogenetic processes was evaluated in sera of endometrial cancer patients. Also the trait of clinical malignancy degree of endometrial cancer in the patients was attempted to be correlated with expression of the proteins engaged in the angiogenesis process.

The studies included sera taken from 176 patients with malignant uterine tumours. The analysis of protein and peptide profiling took advantage of mass spectroscopy technique of MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme type (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Markers of angiogenetic process (sEGFR, FGF-basic, follistatin, G-CSF, HGF, sHER2/neu, sIL-6Ra, leptin, osteopontin, PECAM-1, PDGF-AB/BB, prolactin, SCF, sTIE-2, sVEGFR-1, sVEGFR-2) were estimated in parallel in sera samples using the immunological test of Bio-Plex Pro Human Cancer Biomarker Panel 1 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in line with producer's instruction. Subsequently, the results obtained using magnetic separation and flow cytometry were subjected to statistical analysis, aimed at comparison of concentrations of estimated proteins between sera of patients with endometrial cancer manifesting various values of G trait with material of the control group (n = 48). The undertaken experiments aimed at conducting proteomic analysis of sera in the search for biomarkers of endometrial cancer. The performed comparison of peptide profiles typical for sera of healthy women and women carrying endometrial cancer demonstrated that a proportion of peptide expression was distinct in the two groups. Statistical analyses of peak intensities representing peptides profiling demonstrated statistically significant differences between samples obtained from healthy women and those obtained from ill women involving values of mass/charge. In the conducted peptide profiling involving peaks of mass/charge values of 1020,518, 1206,586 and 1465,644, statistically significant differences were demonstrated between peaks representing samples originating from ill women and those representing healthy women. The amino acid sequence of DFLAEGGGVR was identified on the basis of library data as the chain α of fibrinogen (FIBA_HUMAN Protein). Another peptide differentiating the studied group with endometrial cancer and the control group involved protein C3 (CO3_HUMAN Complement C3). The demonstrated in the studies over-expression of C3 protein confirmed the earlier reports on potential application

of C3 protein as a marker of neoplastic diseases. Thus, endometrial cancer was proven to induce in the body alterations on the proteomic level. A biomarker does not need to involve the entire protein and, accordingly, attempts are made to implement whole marker panels to detect and to monitor neoplastic diseases. Such a panel may represent a proteomic or metabolomic "fingerprint", specific for a given tumour. Here the multi-marker examination included the parallel evaluation of biological factors with documented involvement in angiogenesis. The conducted above presented estimations of concentrations manifested by the estimated serum proteins involved in angiogenesis demonstrated that in samples taken from all patients with EC and in samples obtained from healthy women concentrations of 14 out of 16 proteins differed significantly. The proteins included: sEGFR, folistatin, G-CSF, sHER2/neu, HGF, sIL-6Ra, osteopontin, PDGF-AB/BB, PECA-1, prolactin, SCF, sTIE-2, sVEGR-1 and sVEGR-2. However, median values of absolute concentrations of sEGFR, folistatin, sHER2/neu, HGF, sIL-6Ra, leptin, PDGF-AB/BB, PECA-1, SCF, sTIE-2, sVEGR-1 and sVEGR-2 in women with endometrial cancer were lower than those in populations of healthy women. On the other hand only concentration of prolactin was significantly higher than that in patients with endometrial cancer in all three groups of histological differentiation: G1, G2 and G3, and the differences were statistically significant. The control group and the group with endometrial cancer G1 significantly differ in the concentrations of basic fibroblast growth factor (FGF-basic) and of granulocyte growth factor (G-CSF). At lower grades of tumour differentiation no statistical significance could be noted between concentrations of FGF-basic in samples taken from women of the examined group and those from the control group even if absolute values of concentrations were also elevated. The conducted studies confirmed the inverse relationship between expression of FGF-basic and tumour malignancy even if no statistically significant results were obtained, as compared to the group of healthy women and group G2. Increase in tumour malignancy was accompanied by a decreasing absolute value of basic fibroblast growth factor. Concentrations of folistatin reached a statistical significance only in the G3 group. The absolute values were much lower than those in the control group. In the groups of G1 and G2 the differences were insignificant.

The applied analytical-bioinformatic strategy confirmed that analysis of proteins and peptides in patients' sera is a modern, promising tool in oncological gynaecology while the obtained results prove that there exist a correlation between patient's biological condition and his/her proteomic status. The process of carcinogenesis in endometrial cancer causes changes in proteome, which may be detected in patients and which might represent markers of the process

while the applied analytical techniques and their results may be subsequently used for stratification of patients with endometrial cancer, resulting in a personalized treatment. The demonstrated signature proteins: fibrinogen alpha chain and protein C3 of the complement system represent signature proteins of endometrial cancer, potentially providing subject for further studies: their concentration may help in stratification of patients, identifying those with an aggressive form of the tumour. The multi-marker panels provide a specific for a given tumour "fingerprint" and may be used in further studies, both proteomic and clinical ones. Marker for the serous endometrial cancer in mucosa of uterine corpus involves prolactin. The studies should be continued, which may help in taking advantage of the knowledge on the marker in construction of drugs for targeted therapy. Summing up the above, one may conclude that a full recognition and understanding of all relationships in molecular pathways of carcinogenetic process requires several experiments and studies. Every one of them in some, even if a small degree, brings the investigators to that aim. Recognition of proteomes, even of healthy tissues only, may take years. But it is also possible that suddenly a method will appear which will simplify the procedures and we will understand the relationships within a few years.

