

Streszczenie

Nowotwory prostaty są obecnie drugim najczęściej występującym typem nowotworu wśród mężczyzn na świecie. Jednym z największych wyzwań jest właściwa diagnostyka i stratyfikacja ryzyka, ponieważ obecnie stosowane metody, oparte na badaniu poziomu PSA nie dają zadowalających wyników. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (ang. Extracellular Vesicles - EVs) to błoniaste pęcherzyki wielkości nanometrów, uwalniane przez wszystkie typy komórek. Jedną z ich najciekawszych cech jest zdolność przenoszenia różnej klasy cząsteczek (białka, DNA, RNA, metabolity, lipidy). Ponieważ udowodniono, że ładunek zawarty wewnątrz EVs może być z powodzeniem analizowany pomimo ich niewielkiego rozmiaru, są one potencjalnie interesującym materiałem do diagnostyki nowotworów prostaty.

Celem niniejszej pracy było porównanie wybranych metod oczyszczania małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (ang. Small Extracellular Vesicles – sEVs) z surowicy i moczu pacjentów z zdiagnozowanymi nowotworami prostaty, w celu doboru metody do dalszych badań nad diagnostycznym potencjałem tych cząsteczek. Kolejnym celem była analiza markerów powierzchniowych i profilu miRNA średniej wielkości EVs (ang. Medium-sized Extracellular Vesicles - mEV) pod kątem możliwości rozróżnienia pacjentów zaklasyfikowanych do aktywnego nadzoru od pacjentów nie kwalifikujących się do aktywnego nadzoru, ze względu na zbyt agresywną charakterystykę nowotworu na podstawie uzyskanego w skali Gleasona wyniku analiz histopatologicznych.

Do badania włączono 39 pacjentów z nowotworami prostaty. Spośród nich 15 pacjentów zakwalifikowano do badania dotyczącego porównania metod oczyszczania sEVs, a 24 pacjentów włączono do analizy potencjału diagnostycznego pochodzących z osocza mEVs do oceny ryzyka w strategii aktywnego nadzoru. W ramach porównania metod oczyszczania sEV przeanalizowano następujące metody: wytrącanie, chromatografię wykluczania rozmiaru i separację immunomagnetyczną. W celu analizy potencjału diagnostycznego mEVs do stratyfikacji ryzyka agresywności nowotworów prostaty, przeprowadzono analizę markerów powierzchniowych za pomocą nano-cytometrii przepływowej oraz sprawdzono profil miRNA mEVs.

Surowica krwi obwodowej i mocz pacjentów z rakiem prostaty przy użyciu odpowiednich metod oczyszczania mogą stanowić łatwo dostępne źródła pęcherzyków sEVs.

Porównywane metody oczyszczania sEVs: wytrącanie, chromatografia wykluczania rozmiaru i separacja immunomagnetyczna w różny sposób wpływają na wielkość sEVs, zanieczyszczenie białkami i obecność tetraspanin. Chromatografia wykluczania rozmiaru daje najlepsze wyniki w przypadku zanieczyszczeń białkowego, zarówno z surowicy krwi obwodowej, jak i moczu w porównaniu z innymi metodami. Precypitacja nie jest optymalną metodą oczyszczania sEVs z surowicy krwi obwodowej, ponieważ znacznie zwiększa rozmiar uzyskiwanych sEVs oraz skutkuje najwyższym stężeniem zanieczyszczeń białkowych w porównaniu z innymi metodami. Przy doborze metody oczyszczania sEVs należy kierować się wybranym źródłem pęcherzyków sEVs oraz dalszymi planowanymi analizami. Osocze krwi obwodowej pacjentów z rakiem prostaty może być źródłem pęcherzyków mEVs PSMA+ wydzielanych przez komórki gruczołu krokowego, do dalszych celów badawczych. Cytometryczna analiza nanoFlow markerów powierzchniowych mEVs w osoczu krwi obwodowej i profilowanie miRNA zapewnia nową, potencjalnie lepszą, nieinwazyjną alternatywę dla pomiarów PSA w celu stratyfikacji ryzyka progresji raka prostaty podczas aktywnego nadzoru. Wśród analizowanych potencjalnych markerów stosunek PSMA+/PSMA+CD9+ oraz zwiększona zawartość miR-99a-5p, miR-125b-5p, miR-145-5p i miR365a-3p dały najbardziej obiecujące wyniki, które wymagają potwierdzenia na większej grupie pacjentów.