

## *1. Wstęp i cel projektu*

Stan przedrzucawkowy (PE-preeclampsia) jest zespołem objawów chorobowych pojawiającym się u 3-7% kobiet ciężarnych. PE jest jedną z głównych przyczyn śmierci matki oraz noworodka. Metody, umożliwiające wczesną diagnostykę PE wraz z odpowiednią opieką przedporodową, mogłyby sprawić, że większość kobiet cierpiących na PE zdołałaby urodzić zdrowe dziecko. Niestety, nie zostały w pełni poznane przyczyny PE, a współczesne metody diagnostyczne nie są dostatecznie czułe, aby umożliwić diagnozę tej choroby na etapie bezobjawowym. Wiadomo, że PE związana jest z uszkodzeniem podocytów, co w konsekwencji prowadzi do uszkodzenia nerek. Obecnie uważa się, że wykrycie podocytów w moczu (podocytourii) może być użyteczną metodą, pozwalającą na wczesną diagnostykę, a także umożliwiającą prognozowanie dalszego rozwoju choroby.

W ostatnich latach opracowaliśmy nowatorską analityczną metodę pozwalającą na ponad 100-krotne obniżenie granic wykrywalności biomarkerów peptydowych metodami tandemowej spektrometrii mas (LC-MS/MS) poprzez derywatyzację za pomocą znaczników jonizacyjnych. Głównym celem niniejszego projektu jest praktyczne zastosowanie tej metody derywatywacji peptydów do ultraczułego oznaczania markerów PE w moczu. Wzrost czułości powinien umożliwić wykrywanie markerów PE w niewielkiej ilości moczu pobranego od pacjentki, będącej jeszcze przed etapem objawowym. Planujemy również zastosowanie wzmacniaczy jonizacyjnych znakowanych trwałymi izotopami do badań proteomicznych białek występujących w moczu dla wczesnej i późnej preeklampsji. Pozwoli to przetestować możliwość zastosowania opracowanych przez nas odczynników do wczesnej diagnostyki PE i wskazać nowe markery PE. Projekt jest interdyscyplinarny i będzie realizowany w ramach współpracy naukowej pracowników Ośrodka Badawczo-Rozwojowego, Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu i Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego.

## *2. Metodologia badań*

Próbki moczu pobrane od pacjentek z grupy wysokiego ryzyka PE zostaną odwirowane, a otrzymany osad będzie poddany trypsynizacji. Peptydy otrzymane w wyniku proteolizy zostaną poddane derywatywacji za pomocą trójpodstawionych soli piryliowych, aby umożliwić ich selektywną detekcję oraz sekwencjonowanie z wykorzystaniem tandemowej spektrometrii mas sprzężonej z chromatografem cieczowym. Przetestujemy również inne wzmacniacze jonizacji zaprojektowane w naszym zespole. Przeprowadzimy identyfikację modyfikowanych biomarkerów PE za pomocą spektrometrii mas, a ich skład chemiczny zostanie dodatkowo potwierdzony przez syntezę derywatyzowanych peptydów. Dokonamy również wyboru peptydu, który będzie pełnił rolę wewnętrznego wzorca i otrzymamy jego pochodną ze znacznikiem jonizacyjnym znakowanym izotopowo. Ten związek będzie wykorzystany jako wzorzec wewnętrzny w analizie ilościowej, w celu określenia granic wykrywalności biomarkerów w metodzie LC-MS/MS. Zastosujemy również derywatyzację w badaniach proteomicznych hydrolizatów białkowych pochodzących z próbek moczu pobranych od tej samej pacjentki w różnych fazach PE. Próbki pochodzące od ok. 50 pacjentek z grupy wysokiego ryzyka zostaną zebrane w różnym czasie. Odwirowany osad będzie poddany trypsynizacji i przechowywany w temperaturze -80 °C do dalszych badań. Spośród próbek, te, które pochodzą od pacjentek, u których rozwinęła się PE, będą wykorzystane w dalszych badaniach, a pozostałe posłużą jako grupa kontrolna. Jako kontrolę pozytywną wykorzystamy rekombinowaną podocynę. Peptydy izolowane z próbek pobranych w różnych stadiach PE będą derywatyzowane solami piryliowymi zawierającymi różne kombinacje stabilnych izotopów, np. peptydy wyizolowane z próbek moczu pobranych na wczesnym, średnim, późnym i bardzo późnym stadium PE zostaną wyznakowane za pomocą soli 2,4,6-trifenylopiryliowych o naturalnym składzie izotopowym, a także zawierających odpowiednio 5, 10 i 15 atomów deuteru. Derywatyzowane próbki zostaną połączone i względne różnice w stężeniu podocyny będą wyznaczone techniką LC-ESI-MS/MS z wykorzystaniem metody rozcieńczeń izotopowych.

## *3. Wpływ spodziewanych rezultatów na rozwój nauki, cywilizacji, społeczeństw*

Oczekujemy, że wyniki naszych badań poszerzą wiedzę na temat biomarkerów PE. Spodziewamy się, że proponowana metoda doprowadzi do 100-krotnego obniżenia granic wykrywalności biomarkerów, co umożliwi diagnozę PE już na etapie bezobjawowym. Mamy też nadzieję, że analiza proteomiczna białek obecnych w moczu pozwoli na wykrycie nowych biomarkerów PE. Wyniki naszych badań przyczynią się do udoskonalenia diagnostyki PE, co umożliwi wcześniejsze rozpoczęcie leczenia kobiet cierpiących na PE, zwiększając tym samym przeżywalność noworodków i matek.