

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY



Małgorzata Artymowicz

**ZASTOSOWANIE PODEJŚCIA CELOWANEJ ANALIZY
METABOLOMICZNEJ W PROSPEKTYWNEJ OCENIE
ILOŚCIOWYCH ZMIAN PROFILI NUKLEOZYDÓW
PRZED I PO RESEKCJI GUZA PĘCZERZA MOCZOWEGO**

Praca wykonana
w Zakładzie Farmakodynamiki
Katedry Biofarmacji i Farmakodynamiki
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor pracy: dr hab. Danuta Siluk, prof. uczelni
Promotor pomocniczy: dr n. farm. Wiktoria Struck-Lewicka

Gdańsk 2023

Praca doktorska finansowana była ze środków:

- Narodowego Centrum Nauki, grant PRELUDIUM nr 2018/29/N/NZ7/02299;
- Zadania badawczego młodych naukowców nr 01-0361/08-502;
- Projektu POWR.03.02.00-00-I026/17-00 współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014–2020

Streszczenie

Modyfikowane nukleozydy i deoksynukleozydy stanowią produkty przemian zachodzących w obrębie kwasu rybonukleinowego (ang. *ribonucleic acid*, RNA) oraz kwasu deoksyrybonukleinowego (ang. *deoxyribonucleic acid*, DNA). W przeciwieństwie do niemodyfikowanych analogów, nie mogą być powtórnie wykorzystywane do syntezy nowych cząsteczek RNA i DNA, a jedynie są wydalane w formie niezmienionej z moczem. Ich podwyższony poziom w matrycach biologicznych może świadczyć o wyższym tempie przemian RNA i DNA, a co za tym idzie toczącym się zaburzeniem patofizjologicznym w organizmie. Opracowano wiele metod oznaczania modyfikowanych nukleozydów i deoksynukleozydów w matrycach biologicznych, głównie w próbkach moczu. Wciąż brakuje jednak metod umożliwiających ich jednoczesną izolację oraz oznaczanie w matrycach biologicznych.

Rak pęcherza moczowego (ang. *bladder cancer*, BCa) jest dziesiątym pod względem częstości występowania typem nowotworu wśród ludzi na świecie. Badania nad rakiem pęcherza moczowego były często podejmowane w analizach metabolomicznych. Najczęściej stanowiły badania retrospektywne, opierające się na porównaniu profili metabolicznych pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem pęcherza moczowego względem grup kontrolnych. Rzadziej przeprowadzano badania prospektywne, uwzględniające długotrwałą obserwację pacjentów po zabiegu wycięcia guza pęcherza moczowego w celu oznaczenia związków, które potencjalnie wskazywałyby na nawrót choroby.

Celem niniejszej pracy było opracowanie i zwalidowanie ilościowej metody oznaczania 11 wybranych modyfikowanych nukleozydów i deoksynukleozydów (9 modyfikowanych nukleozydów: pseudourydyny, urydyny, N3-metylourydyny, inozyny, N2-metyloguanozyny, N2,N2-dimetyloguanozyny, N6-metyloadnozyny, 2-metylotioadenozyny, 5-metylotioadenozyny i 2 modyfikowanych deoksynukleozydów: 2-deoksyguanozyny, 8-hydrokso-2-deoksyguanozyny) w próbkach moczu u pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem pęcherza moczowego, będących przed i po zabiegu wycięcia guza pęcherza moczowego. W ramach pracy doktorskiej zostały opracowane dwie metody przygotowania próbek moczu. Pierwsza metoda umożliwiała jednoczesną ekstrakcję modyfikowanych nukleozydów i deokynukleozydów z moczu w oparciu o technikę ekstrakcji do fazy stałej (ang. *solid phase extraction*, SPE), z zastosowaniem złoża fenyloboranowo-kationowymiennego (Bond Elut PBA 200 mg/PCX 60mg, Agilent Technologies, Waldbronn, Niemcy). Metoda ta została opracowana z wykorzystaniem

podejścia planowania doświadczeń (ang. *Design of Experiments*, DoE). Druga metoda dotyczyła przygotowania próbek z pominięciem techniki SPE, obejmująca etap wirowania, 9-krotnego rozcieńczenia próbek moczu z wytrąceniem potencjalnych związków balastowych z zastosowaniem mieszaniny metanol:woda (1:1, v/v), odparowania oraz rozpuszczenia suchej pozostałości. Zaobserwowano, iż obie procedury przygotowania próbek charakteryzowały się podobnymi wartościami odzysku, jednak metoda z pominięciem techniki SPE znacznie upraszczała i skracała czas przygotowania próbek moczu. W związku z tym ta procedura została wybrana do dalszych etapów projektu. Oznaczenia analityczne przeprowadzono z zastosowaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas z jonizacją poprzez rozpylanie w polu elektrycznym oraz analizatorem typu potrójny kwadrupol (ang. *high performance liquid chromatography-electrospray ionization-triple quadrupole mass spectrometry*, HPLC-ESI-QqQ/MS). Oznaczenia przeprowadzono w jonizacji dodatkowo, w trybie dynamicznego monitorowania wybranych reakcji następczych (ang. *dynamic multiple reaction monitoring*, dMRM). Metoda ilościowego oznaczania została poddana procesowi walidacji w oparciu o wytyczne Europejskiej Agencji Leków (ang. *European Medicines Agency*, EMA) a także Amerykańskiej Agencji Żywności i Leków (ang. *U.S. Food and Drug Administration*, FDA) w aspekcie selektywności, liniowości, precyzji w ciągu dnia oraz między dniami, dokładności, efektu matrycy, odzysku oraz stabilności (w temperaturze pokojowej, w automatycznym podajniku próbek oraz poprzez test zamrażania i rozmrażania). Zwaliowaną metodę zastosowano następnie do analizy 133 próbek moczu pobranych od 53 pacjentów z rakiem pęcherza moczowego będących 24 godziny przed zabiegiem przezcewkowej resekcji guza pęcherza moczowego (ang. *transurethral resection of bladder tumour*, TURBT) (n=53), a następnie 24 godziny (n=50), 2 tygodnie (n=10), 3 (n= 8), 6 (n=7), 9 (n=3) i 12 (n=2) miesięcy po operacji. Uzyskane dane przeanalizowano przy użyciu liniowego modelu efektów mieszanych (ang. *linear mixed model*, LMM). Celem analizy danych było sprawdzenie, czy zmiany stężeń nukleozydów w moczu w czasie są skorelowane z resekcją guza pęcherza moczowego. Uzyskane wyniki wskazały, że stężenie 2-metylotioadenozyny spada a inozyny rośnie w czasie 24 godzin po zabiegu w porównaniu do stanu przed operacją. Przy czym w późniejszych punktach czasowych stężenia obu metabolitów wracają do poziomu sprzed operacji. Realizowane badanie wpisuje się w koncepcję monitorowania badań długofalowych (ang. *longitudinal study*)

i zawiera przykłady podejść badawczych możliwych do dalszego zaimplementowania w badaniach bioanalityczno-statystycznych.

Abstract

Modified nucleosides and deoxynucleosides are products of changes within ribonucleic acid (RNA) and deoxyribonucleic acid (DNA). Unlike unmodified analogs, they cannot be reused for the synthesis of new RNA and DNA molecules, nor are they metabolized, but are excreted unchanged in the urine. Their increased level in biological matrices may indicate a higher rate of RNA and DNA turnovers, and thus an ongoing pathophysiological disorder in the body. Many methods have been developed for the determination of modified nucleosides and deoxynucleosides in biological matrices, mainly from urine samples. However, there is still lack of methods that would enable their simultaneous isolation and determination in biological matrices.

Bladder cancer (BCa) is the tenth most common type of cancer in the world. Bladder cancer research has often been undertaken in metabolomic analyses. Most often, they were retrospective studies, based on the comparison of metabolic profiles of patients diagnosed with bladder cancer in relation to control groups. Less frequently, prospective studies have been conducted, involving the long-term observation of patients after bladder tumor resection, in order to identify compounds that would potentially indicate recurrence of the disease.

The aim of this work was to develop and validate a quantitative method for the determination of 11 selected modified nucleosides and deoxynucleosides (9 modified nucleosides: pseudouridine, uridine, N3-methyluridine, inosine, N2-methylguanosine, N2,N2-dimethylguanosine, N6-methyladenosine, 2-methylthioadenosine, 5 - methylthioadenosine and 2 modified deoxynucleosides: 2-deoxyguanosine, 8-hydroxy-2-deoxyguanosine) in urine samples collected from patients diagnosed with bladder cancer before and after bladder tumor resection. Two methods of urine sample preparation were developed. The first method enabled the simultaneous extraction of modified nucleosides and deoxynucleosides from urine based on the solid phase extraction (SPE) technique using a phenylborate-cation exchange resin (Bond Elut PBA 200 mg/PCX 60mg, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). This method was developed using the Design of Experiments (DoE) approach. The second method concerned the preparation of samples without the SPE technique, including the step of centrifugation, 9-fold dilution of urine

samples with the precipitation of potential ballast compounds using a mixture of methanol: water (1:1, v/v), evaporation and dissolution of the dry residue. It was observed that both sample preparation procedures were characterized by similar recovery values, however, the method without the SPE technique significantly simplified and shortened the time of urine sample preparation. Therefore, this procedure was chosen for further stages of the project. Analytical determinations were carried out using the technique of high-performance liquid chromatography coupled with a triple quadrupole mass spectrometry with electrospray ionization (HPLC-ESI-QqQ/MS). Assays were performed using positive ionization in dynamic multiple reaction monitoring (dMRM) mode. The quantification method has been validated against European Medicines Agency (EMA) and US Food and Drug Administration (FDA) for selectivity, linearity, intra-day and inter-day precision, accuracy, matrix effect, recovery, and stability (at room temperature, in an autosampler, and by freeze-thaw test). The validated method was then used to analyze 133 urine samples from 53 bladder cancer patients being 24 hours before transurethral resection of bladder tumor (TURBT) (n=53) and 24 hours (n=50), 2 weeks (n=10), 3 (n=8), 6 (n=7), 9 (n=3) and 12 (n=2) months after the surgery. The obtained data were analyzed using a linear mixed effects model (LMM). The aim of the data analysis was to check whether changes in urinary nucleoside concentrations over time are correlated with bladder tumor resection. The obtained results showed that the concentration of 2-methylthioadenosine decreases and inosine increases within 24 hours after surgery compared to the state before surgery. However, at later time points, the concentrations of both metabolites return to pre-operative levels. The conducted study is part of the concept of longitudinal studies and contains examples of research approaches that can be further implemented in bioanalytical and statistical studies.