

Streszczenie

Rzeczywisty rozwój technologiczny aparatury, technik przygotowania próbek oraz metod obliczeniowych stosowanych w proteomice opartej na spektrometrii mas pozwala na adaptację wykorzystywanej metodyki do badanego zagadnienia. Celem badań przedstawionych w niniejszej rozprawie było opracowanie proteomicznej metodyki ilościowej odpowiedniej do oceny jakości oocytów na podstawie zmian w proteomie ludzkiego płynu pęcherzykowego kobiet przechodzących procedurę zapłodnienia pozaustrojowego. Znacząca liczba przeprowadzonych do tej pory prac badawczych, wykonanych z użyciem różnorodnych strategii dotyczyła proteomu ludzkiego płynu pęcherzykowego, jednak do procedur leczenia niepłodności nie wprowadzono żadnych sprecyzowanych markerów białkowych. Wielowymiarowe dane uzyskane w wyniku przeprowadzenia szeroko zakrojonego badania klinicznego za pomocą dostatecznie dogłębnej analizy ilościowej i odpowiedniego doboru metod statystycznych mogłyby wskazać nowe markery jakości oocytów. Do tego zadania, w serii badań przedstawionych w trzech opublikowanych pracach opracowano, zoptymalizowano i przetestowano dwa odrębne zestawy metod proteomiki ilościowej bez znakowania. Pierwszy z nich, nazwany Triple Quad-TOF został zaprojektowany tak, aby planowane analizy mogły zostać przeprowadzone szybko i z użyciem niskich kosztów/zasobów. Jednocześnie pokrycie proteomu zostało poszerzone za pomocą metody SWATH-MS pozwalającej na zastosowanie wielu strategii frakcjonowania w budowaniu biblioteki widm bez utraty dokładności pomiaru ilościowego. Drugi opracowany zestaw metod, nazwany Quad-Orbitrap zapewniał dogłębną i czułą analizę w każdym pojedynczym pomiarze przy większym nakładzie czasu i zasobów. Stężenia bezwzględne wszystkich analizowanych białek obliczono przy użyciu metody Total Protein Approach. Przydatność obu zestawów metod została sprawdzona w przeprowadzonych na małą skalę badaniach na próbkach klinicznych, które to badania wskazały potencjalne biomarkery dojrzałości oocytów oraz kompetencji w zakresie rozwoju do stadium blastocysty. Informacje uzyskane w trakcie wszystkich przeprowadzonych eksperymentów dają nowy wgląd w obraz proteomu i peptydomu płynu pęcherzykowego. Dobra zgodność wyników uzyskanych w obu zestawach metod pozwala dobrać odpowiednią metodologię przyszłego badania klinicznego według konkretnego celu planowanych badań i dostępnego zaplecza sprzętowego i materiałowego.