

Mgr inż. Katarzyna Mrowiec

**Wykorzystanie profilu metabolitów surowicy w ocenie
ryzyka zachorowania na raka piersi**

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem

Prof. dr hab. Piotra Widłaka

w Centrum Badań Translacyjnych

i Biologii Molekularnej Nowotworów

im. Profesora Mieczysława Chorażego

Praca zrealizowana w ramach grantu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki
„Wykorzystanie profilu metabolitów surowicy w ocenie ryzyka zachorowania na raka piersi”
(Projekt 2019/34/H/NZ7/00503)

GLIWICE 2024

Pracę tę dedykuję mojej ukochanej Mamie oraz wspaniałemu inż. Wiesławowi Wąsikowi,
którzy od zawsze we mnie wierzyli i motywowali do ciągłej nauki i rozwoju.

Dziękuję Wam z całego serca.

Składam serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi,
Panu Prof. dr hab. Piotrowi Widłakowi
za wszelką pomoc oraz cenne uwagi/rady udzielone w trakcie
realizacji niniejszego projektu doktorskiego.

Dziękuję również całemu zespołowi projektu SEMPRA, a w szczególności
dr inż. Karolowi Jelonkowi, dr Agacie Kurczyk oraz Lucynie Ponge,
za okazane wsparcie (nie tylko merytoryczne) i niewątpliwą pomoc
na wszystkich etapach prowadzonych badań.

Spis treści

Streszczenie w języku polskim	7
Streszczenie w języku angielskim	9
Spis najczęściej używanych skrótów	11
1. Wstęp	13
1.1. Rak piersi (rak gruczołu sutkowego)	13
1.1.1. Klasyfikacja nowotworów piersi: typy histologiczne i molekularne	14
1.1.2. Czynniki ryzyka	16
1.1.3. Epidemiologia raka piersi	17
1.1.4. Badania przesiewowe i wczesna detekcja	18
1.1.5. Markery molekularne	19
1.2. Metabolity jako markery raka piersi	21
1.2.1. Metabolizm komórki nowotworowej – cechy charakterystyczne	22
1.2.1.1. Regulacja metabolizmu nowotworów przez onkogenne szlaki sygnałowe	22
1.2.1.2. Metabolizm glukozy	23
1.2.1.3. Metabolizm glutaminy	25
1.2.1.4. Metabolizm lipidów	25
1.2.1.5. Metabolizm REDOX	26
1.2.2. Metabolomika jako część biologii systemów	28
1.2.3. Wysokoprzepustowe metody analizy metabolitów	29
1.2.3.1. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego	30
1.2.3.2. Spektrometria mas	30
1.2.4. Metabolity obecne w krwi jako źródło biomarkerów nowotworowych	33
1.2.5. Metaboliczne markery ryzyka raka piersi	34
2. Cel pracy	38
3. Metodyka	40

3.1. Materiał kliniczny wykorzystany w badaniach	40
3.1.1. Próbkki krwi zbierane w badaniu populacyjnym HUNT2	40
3.1.2. Próbkki krwi pacjentek z nowotworami	42
3.2. Analiza profilu metabolitów w próbkach surowicy	44
3.2.1. Przygotowanie próbek do analizy	44
3.2.2. Ilościowa analiza metodą spektrometrii mas	46
3.3. Czynności mające wpływ na stabilności układu pomiarowego i jakość danych	46
3.4. Analiza statystyczna i bioinformatyczna.....	49
3.4.1. Przygotowanie danych	49
3.4.2. Analiza statystyczna różnic między porównywanymi grupami	50
3.4.2.1. Analiza statystyczna różnic między grupami kobiet z badania populacyjnego HUNT2	50
3.4.2.2. Analiza statystyczna różnic między grupami pacjentek z nowotworami	51
3.4.3. Analiza bioinformatyczna szlaków metabolicznych.....	52
4. Wyniki.....	53
4.1. Wpływ stabilności układu pomiarowego na jakość otrzymanych danych	53
4.2. Identyfikacja cech metabolomu surowicy mających związek z ryzykiem raka piersi... 58	
4.2.1. Identyfikacja metabolitów, których stężenie w surowicy różni się u osób, które rozwinęły nowotwór (HR, high risk) i osób, które pozostały zdrowe w okresie obserwacji (LR, low risk).....	58
4.2.2. Określenie wpływu wieku na stężenie metabolitów we krwi uczestniczek	61
4.2.3. Identyfikacja metabolitów odróżniających podgrupy osób w różnym wieku, które rozwinęły nowotwór w różnym czasie od pobrania materiału	66
4.2.4. Identyfikacja szlaków metabolicznych związanych z podwyższonym ryzykiem rozwoju raka piersi.....	73
4.3. Identyfikacja cech metabolomu surowicy charakterystycznych dla raka piersi	74

4.3.1. Identyfikacja metabolitów, których stężenie w surowicy różni się u pacjentek z rakiem piersi i kobiet zdrowych.....	74
4.3.2. Identyfikacja szlaków metabolicznych związanych z rozwojem raka piersi	76
4.3.3. Identyfikacja metabolitów, których stężenie w surowicy odróżnia kobiety zdrowe i pacjentki z różnymi typami nowotworów litych	77
4.3.4. Identyfikacja szlaków metabolicznych związanych z „uniwersalną” sygnaturą nowotworową	82
5. Dyskusja	83
5.1. Stabilność układu pomiarowego i jakość danych	83
5.2. Metabolomiczna sygnatura ryzyka raka piersi	86
5.3. Metabolomiczna sygnatura raka piersi	92
5.4. Metaboliczna sygnatura czterech nowotworów litych	96
5.5. Podsumowanie	98
6. Wnioski	99
7. Bibliografia.....	100

Streszczenie w języku polskim

Co roku na świecie 2 miliony kobiet zapada na raka piersi, który jest przyczyną zgonu co trzeciej z nich. Ponieważ najważniejszą przyczyną wysokiej śmiertelności tego nowotworu jest zbyt późna diagnoza, w licznych krajach wprowadzone zostały badania przesiewowe, oparte przede wszystkim o nie zawsze skuteczne metody obrazowe. W związku z tym poszukuje się nowych sposobów umożliwiających wiarygodną detekcję zmian zachodzących w organizmie na jak najwcześniejszym etapie rozwoju nowotworu. Źródło potencjalnych biomarkerów raka piersi stanowią składniki płynów ustrojowych, w tym zróżnicowana grupa metabolitów. Co istotne, metabolom krwi odzwierciedla wszystkie procesy biologiczne biegnące w organizmie będąc niezastąpionym źródłem informacji o jego aktualnym stanie.

Przedmiotem niniejszej dysertacji było scharakteryzowanie metabolicznego profilu surowicy krwi kobiet ze zwiększonym ryzykiem raka piersi oraz sygnatury specyficznej dla pacjentek z rozpoznanym rakiem piersi. W analizach wykorzystano materiał zebrany od zdrowych uczestniczek norweskiego badania populacyjnego prowadzonego w latach 1995-1997 w regionie Trøndelag (badanie HUNT2), u części których zdiagnozowano raka w trakcie 15-letniego okresu obserwacji, oraz próbki kobiet chorych na raka i zdrowych wolontariuszek pochodzące ze zbioru Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów. Profil metabolitów surowicy analizowano ilościowo metodą spektrometrii mas przy pomocy komercyjnego zestawu Absolute IDQ p400 HR, który pozwala na detekcję ponad 400 metabolitów i grup izomerycznych lipidów.

W wyniku realizacji badania uzyskano szereg interesujących poznawczo wyników. Zauważono, że wiek dawców stanowi istotny czynnik zmieniający stężenia metabolitów, w związku czym badania należy prowadzić na grupach charakteryzujących się niewielkim rozrzutem wieku zapewniając podobną strukturę wieku porównywanych grup. Stwierdzono, że obniżone stężenie lipidów i aminokwasów w surowicy jest związane z podwyższonym ryzykiem raka piersi w grupie zdrowych kobiet, jednak brak uniwersalnego wzoru zmian (wspólnego dla różnych grup wiekowych) i niewielka moc statystyczna różnic nie pozwalają na zaproponowanie metabolicznej sygnatury ryzyka. Wykazano, że obniżony poziom większości aminokwasów (z wyjątkiem Arg i Gln), ceramidów, glicerydów i lizofosfatydylocholin, oraz zwiększone stężenie heksoz i acylokarnityn to cechy charakterystyczne metabolomu surowicy pacjentek z rakiem piersi. Ponadto stwierdzono, że zestaw metabolitów odróżniających osoby zdrowe od pacjentek z rakiem piersi zawierał

cząsteczki wchodzące w skład hipotetycznej uniwersalnej sygnatury raka charakterystycznej dla wielu nowotworów litych.

Streszczenie w języku angielskim

Every year, over 2 million women around the world develop breast cancer, which is the cause of death in a third of them. Since the most important cause of the high mortality rate of this cancer is late diagnosis, screening tests have been introduced in many countries based primarily on imaging methods that have several weaknesses regarding diagnostic precision. Therefore, new methods are being sought to enable reliable detection of changes occurring in the body at the earliest possible stage of cancer development. The source of potential breast cancer biomarkers are components of body fluids, including a diverse group of metabolites. The composition and concentration of these small molecules present in the blood integrate information about all biological processes, thus reflecting the current state of the body.

The subject of this dissertation was to characterize the metabolic profile of blood serum in women at increased risk of breast cancer and the signature specific to patients diagnosed with breast cancer. The analyses used material collected from healthy participants of the Norwegian population-based study conducted in 1995-1997 in the Trøndelag region (HUNT2 study), some of whom were diagnosed with cancer during the 15-year observation period, and samples of women with cancer and healthy volunteers from the collection Center for Translational Research and Molecular Biology of Cancer. The serum metabolite profile was quantitatively analyzed by mass spectrometry using the commercial Absolute IDQ p400 HR kit, which allows the detection of over 400 metabolites and isomeric groups of lipids.

As a result of the study, several interesting results were obtained. It was noticed that the age of donors is an important factor in changing the concentration of metabolites, therefore research should be conducted on groups with a small age range, ensuring a similar age structure of the compared groups. It was found that reduced serum lipid and amino acid concentrations are associated with an increased risk of breast cancer in a group of healthy women, but the lack of a universal pattern of changes (common to different age groups) and the low statistical power of the differences do not allow the proposal of a metabolic risk signature. It has been shown that reduced levels of most amino acids (except Arg and Gln), ceramides, glycerides, and lysophosphatidylcholines, as well as increased concentrations of hexoses and acylcarnitines are characteristic features of the serum metabolome of breast cancer patients. Additionally, it was found that the set of metabolites that distinguished

healthy people from breast cancer patients included molecules that were part of the hypothetical universal cancer signature characteristic of many solid tumors.

Spis najczęściej używanych skrótów

AA (ang. *amino acids*) - aminokwasy

AC (ang. *acylcarnitines*) - acylokarnityny

ACN – acetonitryl

ATP (ang. *adenosine triphosphate*) - adenozy-5'-trifosforan

BA (ang. *biogenic amines*) - aminy biogenne

BC (ang. *breast cancer*) - rak piersi

CE (ang. *cholesterol esters*) - estry cholesterolu

Cer (ang. *ceramides*) - ceramidy

cps (ang. *counts per seconds*) – zliczenia na sekundę

CV (ang. *co-efficient of variation*) – współczynnik zmienności

DG (ang. *diglycerides*) – diglicerydy

DNA (ang. *deoxyribonucleic acid*) - kwas deoksyrybonukleinowy

ESI (ang. *Electrospray ionisation*) - jonizacja przez elektrorozpylanie

FA (ang. *formic acid*) - kwas mrówkowy

FDA (ang. *Food and Drug Administration*) – Agencja Żywności i Leków

GC (ang. *gas chromatography*) – chromatografia gazowa

HR (ang. *high risk*) – wysokie ryzyko

LC (ang. *liquid chromatography*) – chromatografia cieczowa

LOD (ang. *limit of detection*) - najniższe stężenie, które można wiarygodnie wykryć za pomocą danej metody

LPC (ang. *lysophosphatidylcholines*) – lizofosfatydylocholiny

LR (ang. *low risk*) – niskie ryzyko

MS (ang. *mass spectrometry*) – spektrometria mas

NMR (ang. *nuclear magnetic resonance spectroscopy*) - spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego

PC (ang. *phosphatidylcholines*) - fosfatydylocholiny

PCA (ang. *principal component analysis*) - analiza głównych składowych

QC (ang. *quality control*) – kontrola jakości

RNA (ang. *ribonucleic acid*) - kwas rybonukleinowy

ROS (ang. *reactive oxygen species*) – reaktywne formy tlenu

S.D. (ang. *standard deviation*) - odchylenie standardowe

SM (ang. *sphingomyelins*) – sfingomieliney

TCA (ang. *tricarboxylic acid cycle*) - cykl kwasów trikarboksylowych, cykl kwasu cytrynowego

TG (ang. *triglycerides*) – triglicerydy

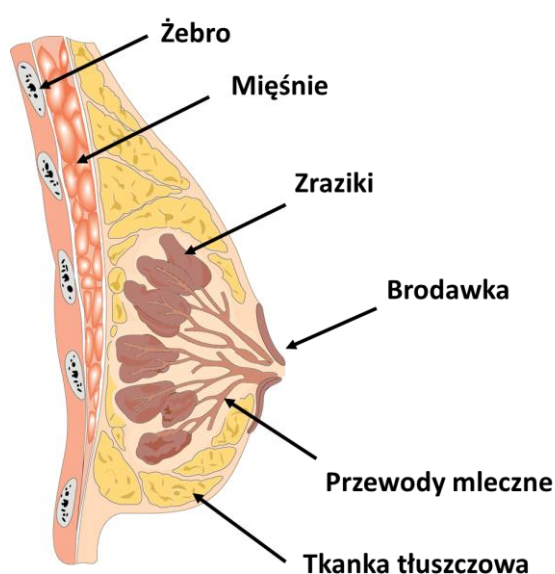
TNBC (ang. *triple-negative breast cancer*) – potrójnie ujemny rak piersi

TNM (ang. *Tumour, Node, Metastasis*) - klasyfikacja stopnia zaawansowania nowotworów

1. Wstęp

1.1. Rak piersi (rak gruczołu sutkowego)

Rak gruczołu sutkowego, zwany częściej rakiem piersi (ang. *breast cancer*; dalej w skrócie BC), to choroba początkowo rozwijająca się w obrębie gruczołu sutkowego, powstająca w wyniku niekontrolowanych podziałów komórkowych budujących go komórek. Rodzaj BC zależny jest od części piersi, w której doszło do zainicjowania procesu nowotworzenia. W budowie tego gruczołu u kobiet wyróżnia się trzy główne części: produkujące mleko zraziki, przewody mlekowe oraz otaczającą je tkankę łączną wraz z tłuszczem (patrz Rysunek 1).



Rysunek 1 Schemat anatomiczny piersi u kobiet – widok z boku [zmodyfikowane na podstawie: PNGWing.com, (American Cancer Society, 2021)].

Rozwój nowotworu (tzw. kancerogeneza) jest złożonym i wieloetapowym procesem. Od ponad 50 lat w biologii dominuje dogmat, że proces ten inicjowany jest poprzez mutację (tj.: zmianę genetyczną) powstałą w obrębie jednej z czterech klas genów:

- a) genach odpowiedzialnych za naprawę DNA, czyli tzw. integralność genomu,
- b) protoonkogenach mających udział w stymulacji wzrostu komórki,
- c) genach supresorowych, które biorą udział w hamowaniu namnażania komórek,
- d) genach regulujących apoptozę - jeden z rodzajów śmierci komórek.

Nagromadzenie zmian w DNA powoduje, że komórka staje się niewrażliwa na sygnały kontrolujące jej wzrost i śmierć, a także nabywa zdolność „ucieczki” przed układem odpornościowym. Nowo wykształcone cechy pozwalają komórce progenitorowej

i jej potomnym na dalszy niekontrolowany, nieprawidłowy i autonomiczny podział i rozwój (Centers for Disease Control and Prevention, 2022) (Domagała, 2007).

1.1.1. Klasyfikacja nowotworów piersi: typy histologiczne i molekularne

Rak piersi jest heterogenną chorobą zarówno pod względem klinicznym jak i molekularnym, stąd też jego klasyfikacja uwzględnia różne cechy takie jak morfologia, obecność receptorów czy profil genetyczny. Obserwacja różnych rokowań u chorych na ten sam typ nowotworu i identyfikacja narastającej postaci różnych wariantów morfologicznych raka piersi doprowadziła do dyskusji na temat jego klasyfikacji. Obecnie klasyfikacja opublikowana przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) wyróżnia ponad 20 głównych typów BC.

Jednym z najistotniejszych pod względem klinicznym jest podział typów raka piersi uwzględniający zdolność do naciekania przez zmiany nowotworowe sąsiednich bądź odległych tkanek, rozróżniający grupę raków przedinwazyjnych (tzw. *in situ*) i inwazyjnych. Nowotwory piersi *in situ* ograniczają się do raka zrazikowego (tzw. *LCIS- Lobular Carcinoma In Situ*) oraz do częściej występujących zmian w obrębie przewodów mlecznych, tj. raka przewodowego (tzw. *DCIS- Ductal Carcinoma In Situ*). W przypadku raków naciekających – czyli rozprzestrzeniających się do zdrowej tkanki wyróżniamy podobnie jak poprzednio zmiany zrazikowe i przewodowe (stanowiące odpowiednio: 5-15% i 70-80% przypadków), oraz rzadziej występujące guzy brodawkowate czy śluzowate.

Wraz z postępem medycyny molekularnej mająca niewątpliwą wartość prognostyczną klasyfikacja histologiczna stała się niewystarczająca. Do podziału nowotworów piersi wprowadzono cztery podtypy molekularne (patrz Tabela 1) oparte na obecności receptorów: estrogenu (ER), progesteronu (PR) oraz receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (HER2). Analiza immunohistochemiczna czynników molekularnych stała się podstawą wyboru terapii i znalazła zastosowanie w prognozowaniu odpowiedzi pacjentów na leczenie (Houghton i Hankinson 2021) (Malhotra i inni 2010) (Orrantia-Borunda i inni 2022).

Tabela 1 Charakterystyka podtypów raka piersi [przetłumaczono z (Orrantia-Borunda i inni, 2022)].

Podtyp	Luminalny A	Luminalny B	HER2	TNBC
Procent zachorowań	50	15	20	15
Ekspresja receptora ER	Tak	Tak	Niektóre przypadki	Nie
Ekspresja receptora PR	Tak	Niektóre przypadki	Niektóre przypadki	Nie
Ekspresja receptora HER2	Nie	Nie	Tak	Nie
Ekspresja mi-RNA	<i>Let-7f, Let-7c, miR-10, miR-29a, miR-181a, miR-223, miR-652</i>	<i>miR155, miR-93, miR-18a, miR-135b, miR-718, miR-4516, miR-210, miR-125b-5p</i>	<i>miR-150, miR-142-3p</i>	<i>miR-153, miR-10b, miR-26a, miR146a</i>
Ki67	Niektóre przypadki	Niektóre przypadki	Wysoki	Wysoki
Mutacje	Brak	BRCA2	p53	p53 i BRCA1
Rokowanie	Dobre	Pośrednie	Pośrednie/Złe	Złe

TNBC- potrójnie ujemny rak piersi (ang. *triple-negative breast cancer*)

W przypadku nowotworu każdego typu najczęściej stosowanym i podstawowym w praktyce klinicznej sposobem klasyfikacji jest system TNM (ang. *Tumour, Node, Metastasis*) Amerykańskiego Wspólnego Komitetu ds. Raka (AJCC). TNM tworzy ujednolicony, tzw. wspólny język onkologów. Obowiązująca ósma wersja została przyjęta w styczniu 2018, a jego pierwowzór zaproponowany przez Pierre'a Denoix datuje się na lata 40 XX wieku. Podział ten bierze pod uwagę trzy najważniejsze cechy:

- T - cechy guza pierwotnego - głównie wielkość, rzadziej stosunek do otaczających struktur,
- N - cechy regionalnych węzłów chłonnych – liczba i/lub lokalizacja zajętych węzłów chłonnych,
- M – obecność lub brak przerzutów odległych.

Na podstawie prognozy przeżycia uwzględniającej skalę TNM ustalany jest stopień klinicznego zaawansowania choroby (tzw. *clinical stage*), wahający się w skali od 0 do IV, wykorzystywany w ocenie rokowania i stanowiący podstawę do wyboru sposobu leczenia. Najwcześniejsze stadium raka, w którym choroba obejmuje tylko przewody lub zraziki piersi nazywane jest stadium 0 (raki nieinwazyjne). W tym przypadku guz jest usuwany na drodze operacji, a wskaźnik przeżycia pacjentów wynosi 100%. Stopień zaawansowania wzrasta

wraz ze zwiększaniem i rozprzestrzenianiem się guza, jednocześnie wiążąc się z pogorszeniem prognoz. Poniżej umieszczono graficzny schemat obrazujący etapy rozwoju raka piersi, ich klasyfikację, wraz z 5-letnim wskaźnikiem przeżycia pacjentów.

					
Zaawansowanie	Stopień 0	Stopień I	Stopień II	Stopień III	Stopień IV
Wielkość guza	Bardzo mały (w obrębie gruczołu)	<2 cm	2-5 cm	>5 cm	Dowolna
Przerzuty do węzłów chłonnych	Brak	Brak	Tak (w 1 do 3 węzłach)	Tak (w powyżej 3 węzłach)	Tak
Przerzuty do narządów odległych	Brak	Brak	Brak	Brak	Tak (np.: kości, płuca)
5-letni wskaźnik przeżycia	100%	99%	90%	ok 70%	Ponad 25%

Rysunek 2 Stopnie zaawansowania (ang. staging) raka piersi wraz z przykładowym 5-letnim wskaźnikiem przeżycia dla Wielkiej Brytanii [zmodyfikowane na podstawie (Haele, 2022), (Cancer Research UK, 2023) (American College of Surgeons, 2023)]

1.1.2. Czynniki ryzyka

Dokładne przyczyny pojawienia się nowotworu piersi w dalszym ciągu stanowią niewiadomą dla biologów i lekarzy. Rozwój BC przypisuje się wielokrotnej ekspozycji na znane czynniki ryzyka w ciągu całego życia. W wyniku długoletnich obserwacji poznano wiele z nich i zebrano w listę złożoną z siedmiu grup:

- demograficzne - w tej grupie znajdziemy dwa z najważniejszych, czyli płeć żeńską i rosnący wiek, co więcej BC występuje częściej u białych kobiet w porównaniu do pań o innym kolorze skóry,
- związane z rozrodem: wczesna pierwsza miesiączka i późna menopauza, mała liczba potomstwa i późny wiek pierwszego porodu lub jego brak, brak lub krótki okres karmienia piersią,
- dziedziczne: nosicielstwo mutacji w genach m.in.: *BRCA1* i *BRCA2*, rak piersi w wywiadzie rodzinnym,
- hormonalne: stosowanie antykoncepcji, a w okresie po-menopauzalnym hormonalnej terapii zastępczej, przyjmowanie leków stymulujących owulację,

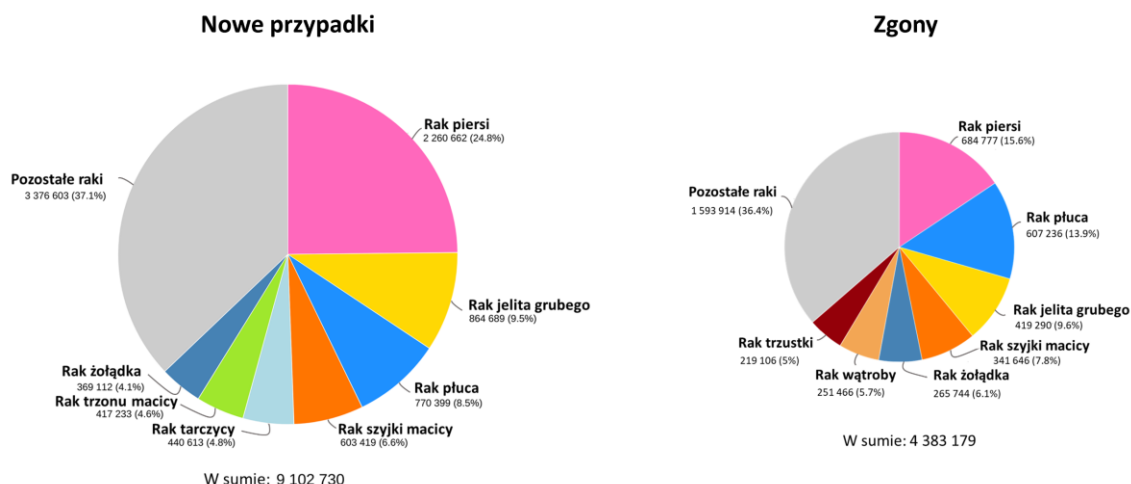
- e. związane z budową piersi tj.: posiadanie tzw. „gęstych piersi” (czyli takich, w których tkanka gruczołowa stanowi większą część niż tłuszczowa), rozpoznanie łagodnych chorób rozrostowych piersi w przeszłości,
- f. dotyczące stylu życia: palenie papierosów, spożywanie alkoholu, nadwaga i otyłość, zła dieta, brak aktywności fizycznej,
- g. inne takie jak narażenie na promieniowanie jonizujące, szczególnie w okolicy klatki piersiowej.

Narażenie na zdarzenie ze znanej listy czynników zwiększonego ryzyka stwierdza się jedynie u około 20% chorych. Warto więc mieć na uwadze, że ekspozycja nie jest równoważna z przyszłą diagnozą, a jej brak nie daje pewności nie zachorowania na nowotwór piersi. Poznanie i badanie nowych, możliwych przyczyn i czynników ryzyka związanych z rakiem piersi pozwoli na ograniczanie ilości nowych przypadków poprzez odpowiednią zmianę trybu życia i prowadzenia akcji edukacyjno-profilaktycznych. Co więcej takie działania sprzyjają też szybszej i lepszej diagnozie, zwiększając procent wyleczonych pacjentek (Houghton i inni, 2021) (Admoun i inni, 2022) (Łukasiewicz i inni, 2021) (Momenimovahed i inni, 2019) .

1.1.3. Epidemiologia raka piersi

Zgodnie ze statystykami opublikowanymi przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem - IARC (Rysunek 3) rak piersi (BC) to obecnie najczęściej diagnozowany oraz stanowiący najczęstszą przyczynę zgonów z powodu nowotworów u kobiet na całym świecie. W 2020 roku BC rozpoznano u co czwartej pacjentki onkologicznej (2 miliony nowych przypadków) i stanowił przyczynę śmierci około 685 000 osób (16% wszystkich zgonów związanych z nowotworami kobiet). Wysuwane przez epidemiologów prognozy na najbliższe 20 lat wskazują na dalszy wzrost obu wskaźników o nawet 50%, szczególnie w krajach o niskim wskaźniku rozwoju społecznego (HDI - ang. *Human Development Index*) (Arnold i inni 2022). Długość przeżycia chorych na BC uwarunkowana jest w dużym stopniu stopniem zaawansowania w momencie rozpoznania. W przypadku guza wcześniej wykrytego i zlokalizowanego w miejscu, w którym proces nowotworzenia się rozpoczął (stadium I i II) 5-letni wskaźnik przeżycia wynosi 90% (National Cancer Institute 2022). Niestety pomimo coraz częstszego wprowadzania programów profilaktycznych w dalszym ciągu jedynie ok. 64% przypadków zostaje zdiagnozowanych na tym etapie. W związku z tym poszukuje się nowych

markerów, które będą charakteryzować się większą czułością i specyficznością, a ponadto umożliwią diagnozę na jak najwcześniejszym etapie BC.



Rysunek 3 Statystyki nowotworów wśród kobiet całego świata w roku 2020 [zmodyfikowane na podstawie: (Sung i inni, 2021)].

1.1.4. Badania przesiewowe i wczesna detekcja

Jak już wcześniej wspomniano efektywność leczenia oraz szanse na przeżycie zależą od zaawansowania choroby w momencie rozpoznania raka piersi, w związku z czym wdrażane są programy mające na celu wczesne wykrycie tego nowotworu.

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) zatwierdziła dwie powiązane ze sobą strategie:

- wczesną diagnostykę - czyli rozpoznanie objawowego raka we wczesnym stadium,
- badania przesiewowe – skierowane do kobiet pozornie zdrowych, bez objawów klinicznych raka piersi.

Obecnie w badaniach przesiewowych stosuje się trzy metody/procedury: mammografię, kliniczne badanie piersi (ang. *clinical breast exam* - CBE) oraz samobadanie piersi (ang. *breast self-examination* - BSE).

Programy badań przesiewowych oparte o mammografię stanowią tzw. złoty standard w krajach rozwiniętych, co spowodowało niewątpliwy spadek śmiertelności wywołany BC. Metoda ta jest prosta i charakteryzuje się czułością na poziomie 75-85% oraz swoistością ok.90%. Pomimo wysokich wartości wskaźników, mammografia jest techniką obrazową, której wyniki odczytywane są w subiektywny, zależny od doświadczenia radiologa sposób. Ponadto, aby guz był widoczny na obrazie musi posiadać odpowiednią wielkość (ok. 15 mm), co oznacza, że małe, rozlane guzy nie zostaną wykryte. Wraz ze wzrostem gęstości piersi czułość

mammografii spada do 46-55%, a liczba wyników fałszywie dodatnich wzrasta. Mammograficzne badania przesiewowe wymagają stosowania aparatów o wysokiej jakości, tak aby uzyskać jak najdokładniejszy wynik przy jak najmniejszym narażeniu kobiety na promieniowanie. W ostatnich latach toczy się dyskusja na temat stosunku korzyści do szkód stosowania mammografii jako metody wczesnej detekcji BC. Szczególna uwaga poświęcana jest grupie wiekowej kobiet poniżej 50 roku życia, w obrębie której wykrywana jest największa ilość nowych przypadków raka piersi w krajach o niskich i średnich dochodach (LMC- ang. *low and middle income countries*). Korzystny wpływ przesiewowego klinicznego badania piersi (CBE) na śmiertelność z powodu raka piersi nie został nadal w pełni ustalony, aczkolwiek m.in. w Indiach i Egipcie prowadzi się w tym celu międzynarodowe badania kliniczne (Coleman, 2017) (Ginsburg i inni, 2020) (Corbex i inni, 2012) (Levenson, 2007) (Albeshan i inni, 2020). CBE jest metodą, którą można stosować w przypadku kobiet nieobjętych programami przesiewowymi ze względu na wiek (tj. kobiet w wieku 30-39 lat), a które stanowią dużą część populacji w tych krajach. Na podstawie wcześniejszych badań wykazano, że czułość dla tej techniki jako narzędzia do wczesnej detekcji waha się między 40% a 69%.

Dzisiejsze metody stosowane w badaniach przesiewowych posiadają liczne wady, a ich możliwość zastosowania jest zależna od wielu czynników. Wczesne wykrywanie BC wymaga procedury mało inwazyjnej, niezależnej od przeprowadzającego badanie, która będzie w stanie wykryć nowotwór niezależnie od jego objętości, a ponadto wykluczy zmiany nienowotworowe w tym samym narządzie i pozostałych tkankach. Istnieje więc realna potrzeba opracowania testu prostego, taniego, wykonywanego w oparciu o łatwo dostępny materiał np.: krew, sprawdzającego kombinację elementów tworzących specyficzny wzór – sygnaturę, który wskazuje na obecność choroby bez względu na jej zawansowanie czy wiek i budowę piersi pacjentki (Levenson, 2007).

1.1.5. Markery molekularne

Detekcja nowotworu opiera się na pomiarach/obserwacjach cech określanych mianem biomarkerów, których stan i/lub ilość jest związana z ryzykiem, wystąpieniem lub zaawansowaniem choroby. Markery nowotworowe stanowią rozległą i zróżnicowaną grupę cząsteczek: kwasów nukleinowych, białek, metabolitów, a także całych komórek nowotworowych krążących we krwi (CTCs). Biomarkery mogą być wydzielane zarówno przez

komórki nowotworowe jak i przez komórki prawidłowe w wyniku reakcji organizmu na rozwój guza (Mishra i inni, 2010) (Levenson, 2007) (Walaszczyk i inni, 2019). Na podstawie odpowiednich biomarkerów można dokonać oceny ryzyka, zdiagnozować chorobę w na wczesnym etapie, dopasować leczenie, a także monitorować nawrót choroby.

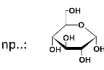
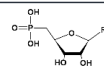
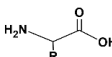
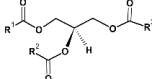
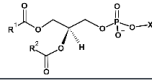
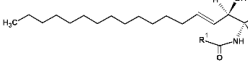
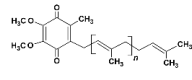
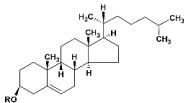
Dotychczas najlepiej poznane markery raka piersi (m.in. status ER, PR, HER2 czy Ki67), stosowane są w diagnostyce, umożliwiając prognozowanie i dobór odpowiedniego leczenia. W badaniach przesiewowych istotne jest, aby marker mógł być oznaczany w materiale łatwo dostępnym, w tani i powtarzalny sposób - w tym przypadku alternatywę stanowią cząsteczki obecne we krwi. Niestety do tej pory nie opracowano biomarkerów raka piersi, które można by stosować w przesiewowych badaniach populacyjnych. Znane od dawna mutacje genów *BRCA1* i *BRCA2* służą do genetycznych badań przesiewowych kobiet z obecnością raka piersi bądź jajnika w historii rodzinnej. Ponadto uważa się, że mutacje w obu tych genach odpowiadają tylko za około 15-25% przypadków dziedzicznych nowotworów. Inne, klasyczne markery obecne we krwi: mucyny (np.: antygen nowotworowy 15-3 (CA 15-3)), czy antygen karcynoembrionalny (CEA) są wskaźnikami progresji choroby nowotworowej i służą do monitorowania odpowiedzi na leczenie oraz wykrywania możliwej wznowy.

Rozwój technologii i wprowadzenie do laboratoriów metod takich jak sekwencjonowanie nowej generacji, hybrydyzacja *in situ*, RT-qPCR czy spektrometria mas pozwalają na dalsze poszukiwanie cząsteczek specyficznych dla ryzyka i wczesnych/ bezobjawowych etapów nowotworu piersi. W literaturze można znaleźć doniesienia o potencjalnej wartości biomarkerowej mikroRNA (np.: miR-10b, miR-125b, miR145), zmian w metylacji DNA, wolno krążącego DNA, pęcherzyków zewnątrz komórkowych czy krążących komórek nowotworowych. Ponadto coraz większą uwagę poświęca się badaniu całych paneli zmian/molekuł w celu znalezienia sygnatur charakterystycznych dla konkretnego stanu organizmu. Niemniej jednak obecne we krwi, potencjalne biomarkery, mogące znaleźć zastosowanie w badaniach przesiewowych BC nadal znajdują się we wczesnych, przedklinicznych fazach rozwoju (Loke i inni, 2017) (Duffy i inni, 2015) (Beňačka i inni, 2022) (Levenson, 2007).

1.2. Metabolity jako markery raka piersi

W 1998 roku za sprawą Stevena Olivera w literaturze naukowej po raz pierwszy pojawił się termin metabolom, który dziś rozumiany jest jako zbiór wszystkich metabolitów w badanej próbce. Metabolity to złożona grupa związków o masie molekularnej nieprzekraczającej 1500 Da, obejmująca substraty i/lub produkty pośrednie reakcji anabolicznych i katabolicznych. Częsteczki te są zróżnicowane zarówno pod względem przynależności do klasy chemicznej (patrz Tabela 2), właściwości fizyko-chemicznych (np.: polarności), zakresu stężeń w jakim występują w organizmie (Ren i inni 2018) (Dettmer, Aronov i Hammock 2006) (Subramani i inni 2022) (Gomase i inni 2008). Ponadto w ich podziale można uwzględnić pochodzenie. Związki naturalnie syntezowane wewnątrz organizmu na wskutek aktywności enzymatycznej zalicza się do klasy metabolitów endogennych. Z kolei wszystkie substancje, które dostarczane są do organizmu w formie pożywienia, leków, toksyn czy zanieczyszczeń tworzą grupę metabolitów egzogennych (Au, 2018).

Tabela 2 Grupy metabolitów endogennych występujących we krwi człowieka. Tabela na podstawie: (Quehenberger i inni, 2010) (Wang i inni, 2019).

Metabolity		
Związki hydrofilowe i polarne	Węglowodany	np.: 
	Nukleotydy	 R: adenina, tymina, cytozyna, guanina
	Aminokwasy	
	Aminy biogenne	
Związki hydrofobowe i niepolarne	Acyle tłuszczowe	
	Glicerolipidy	
	Glicerofosfolipidy	
	Sfingolipidy	
	Lipidy prenolowe	
	Lipidy sterolowe	

1.2.1. Metabolizm komórki nowotworowej – cechy charakterystyczne

Ciągły podział i wzrost komórek nowotworowych wiąże się ze zwiększeniem zapotrzebowania na energię oraz substancje odżywcze i budulcowe. Nic więc dziwnego, że metabolizm komórkowy ulega przeprogramowaniu, tak aby nawet w ubogim środowisku zapewnić nieustanny rozwój komórki nowotworowej.

1.2.1.1. Regulacja metabolizmu nowotworów przez onkogenne szlaki sygnałowe

Mutacje w obrębie onkogenów i genów supresorowych nowotworów umożliwiają progresję nowotworu poprzez:

- bezpośredni lub pośredni wpływ na ekspresję i aktywność enzymów,
- zwiększenie wychwyty składników odżywczych,
- aktywację metabolizmu anabolicznego.

Najczęściej ulegającymi zmianie onkogenami w ludzkich nowotworach (w ok. 30% nowotworów) są geny z rodziny RAS (*HRAS*, *KRAS* i *NRAS*). Kodowane przez nie białka pełnią rolę molekularnych przełączników aktywowanych poprzez czynniki wzrostu (np. EGF) kontrolujące wzrost i podział komórek. Zmiany w sekwencjach genów RAS powodują ich trwałą aktywację, prowadząc do niekontrolowanego wzrostu i rozwoju nowotworu (Upreti i inni, 2020). Ponadto w komórkach nowotworowych utrzymywany jest wysoki poziom indukcji ścieżki PI3K-AKT-mTOR, osiągany przy minimalnej zależności od zewnętrznej stymulacji czynnikami wzrostu. W rezultacie dochodzi do wzmożonego wychwyty glukozy, a następnie jej metabolizmu na drodze glikolizy. Co więcej, aktywacja PI3K-AKT-mTOR wspiera biosyntezę nukleotydów i lipidów, stanowiących niezbędne cząsteczki w nieskończonych podziałach komórkowych. Innym przykładem hiperaktywowanych genów jest *MYC*. Białko MYC odgrywa ważną rolę w progresji cyklu komórkowego. Stanowi również wspólny punkt licznych szlaków sygnałowych (RAS, mTOR czy Wnt/ β -katenina), przez co jest związane z metabolizmem glukozy, glutaminy oraz kwasów tłuszczowych. Ponadto, poprzez regulację ekspresji enzymów LDH i MCT1 wspomaga regenerację NAD⁺, umożliwiającego utrzymanie niezwykle ważnej dla nowotworów zdolności glikolitycznej.

Gen kodujący białko p53 jest najczęściej zmutowanym supresorem we wszystkich ludzkich nowotworach. Czynn timeranskrypcyjny p53 ulega aktywacji w odpowiedzi na uszkodzenie DNA

bądź brak składników odżywczych decydując o skierowaniu komórki na drogę śmierci apoptotycznej bądź naprawy i adaptacji. Z punktu widzenia zmian metabolicznych, utrata funkcji p53 powoduje przekierowanie metabolizmu komórkowego w stronę procesów anabolicznych i indukcji glikolizy (Chae i inni, 2022) (DeBerardinis i inni, 2016) (Park i inni, 2020) (Martínez- Reyes i inni, 2021) (Brunner i inni, 2021).

Tempo proliferacji komórek nowotworowych w większości przypadków przekracza szybkość powstawania nowych naczyń krwionośnych, w związku z czym guz rozwija się w środowisku o niskiej zawartości tlenu (tzw. hipoksja - zawartość O_2 rzędu 0-2%). Niski poziom tlenu powoduje aktywację szlaku sygnałowego regulowanego przez czynnik transkrypcyjny HIF-1 (ang. *hypoxia-inducible factor-1*) uruchamiając odpowiedzi adaptacyjne komórki do niedotlenienia i beztlenowej syntezy ATP. Jedną z konsekwencji jest zwiększony transport glukozy i faworyzowanie jej metabolizmu na drodze glikolizy, przy jednoczesnym tłumieniu szlaku fosforylacji oksydacyjnej. Co więcej, poprzez indukcję ekspresji czynników wzrostu, HIF-1 nasila tworzenie nowych naczyń krwionośnych i erytropoezy, dzięki czemu zwiększa dopływ tlenu i składników odżywczych (Zhang i inni, 2018) (Lee i inni, 2019)

1.2.1.2. Metabolizm glukozy

Pobieranie dużej ilości składników odżywczych, takich jak glukoza czy glutamina i późniejszy ich metabolizm wspiera podstawowe procesy komórkowe. Poprzez dostarczanie energii i prekursorów biosyntezy procesy te zapewniają składniki niezbędne do dalszej proliferacji i przeżycia komórek.

Kluczowym sposobem dostarczania węgla w komórkach nowotworowych jest zwiększony wychwyt glukozy i hiperaktywacja jej metabolizmu na drodze glikolizy (nawet w obecności wystarczającej ilości tlenu i w pełni funkcjonujących mitochondriów), tzw. efekt Warburga. W procesie glikolizy jedna cząsteczka glukozy jest metabolizowana do dwóch cząsteczek pirogronianu, z jednoczesną produkcją dwóch cząsteczek ATP i dwóch zredukowanych cząsteczek NADH. W komórkach prawidłowych pirogronian w obecności tlenu, na drodze fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS) ulega utlenieniu do CO_2 i H_2O , z równoczesnym wytwarzaniem ok. 36 cząsteczek ATP. Jednakże komórki nowotworowe faworyzują przekształcanie większości pirogronianu w mleczan nawet w warunkach tlenowych. Wybór mniej wydajnej, lecz znacznie szybszej glikolizy, umożliwia komórkom szybszą i większą produkcję ATP w porównaniu z utlenianiem poprzez OXPHOS. Oprócz generowania nośników

energii, zwiększony udział glikolizy w metabolizmie glukozy zapewnia komórce dostęp do prekursorów i związków niezbędnych do biosyntezy makrocząsteczek (aminokwasów, nukleotydów, lipidów). Obecna w cytoplazmie glukoza stanowi nie tylko substrat w reakcji glikolizy. Posiada również kluczowe znaczenie w szlaku pentozofosforanowym (PPP), szlaku syntezy heksozaminy (HBP) oraz szlaku biosyntezy seryny.

W szlaku metabolicznym PPP (równoległym do glikolizy) substratem jest glukoza-6-fosforan (G6P), pochodna glukozy bardzo powszechna w komórkach. W fazie oksydacyjnej PPP, G6P przekształcany jest do rybulozo-5-fosforanu (Ru5P) z wytworzeniem NADPH. W kolejnym etapie - w fazie nieoksydacyjnej, Ru5P ulega izomeryzacji, w skutek której powstaje rybozo-5-fosforan (R5P). Szlak PPP stanowi główne źródło NADPH w komórce przez co odgrywa główną rolę w utrzymaniu homeostazy redoks i stanowi ochronę komórki przed stresem oksydacyjnym. Ponadto R5P będący końcowym produktem ścieżki jest niezbędny do syntezy kwasów nukleinowych (Chae i Hong 2022) (Finley 2023) (Lin i inni 2020).

Szlak HBP, który prowadzi do syntezy cukru nukleotydowego UDP-GlcNAc (difosforan urydyny N-acetyloglukozaminowy), również wykorzystuje G6P jako substrat. UDP-GlcNAc wykorzystywany jest do O-GlcNAcytacji grup hydroksylowych reszt seryny i/lub treoniny - czyli jednej z modyfikacji potranslacyjnej białek biorących udział w reakcji na stres oraz wykrywaniu i integracji informacji o dostępności składników odżywczych. Wykazano, że zwiększona aktywacja HBP oraz wzrost O-GlcNAcytacji są związane z wieloma rodzajami nowotworów, w tym m.in. z rakiem piersi (Gu i inni 2010) (Chae i Hong 2022).

Szlak biosyntezy seryny wykorzystuje jako substrat 3-fosfoglicerynian (3-PG), metabolit pośredni glikolizy. 3-PG to cząsteczka, która w wyniku licznych reakcji enzymatycznych (m.in. z udziałem dehydrogenazy fosfoglicerynianowej, PHGDH) metabolizowana jest do seryny i glicyny. W komórkach nowotworowych (szczególnie raka piersi) gen odpowiedzialny produkcję PHGDH (enzymu ograniczającego szybkość pierwszego etapu szlaku) ulega amplifikacji, a jego ekspresja jest podwyższona. Zarówno seryna jak i glicyna pełnią rolę prekursorów w innych ścieżkach metabolicznych np.: metabolizmie metioniny czy kwasu foliowego, które poprzez dostarczanie jednostki 1C (grup metylowych) są kluczowe w syntezie nukleotydów, aminokwasów, poliamin czy fosfolipidów. Ponadto ketoglutaran (α -KG), będący produktem ubocznym procesu, stanowi półprodukt cyklu kwasów trikarboksylowych (TCA)

odpowiedzialnego za produkcję ATP (Park, Pyun i Park 2020) (Chae i Hong 2022) (Possemato i inni 2011) (Pavlova i Thompson 2016) (Lin i inni 2020).

1.2.1.3. Metabolizm glutaminy

Inną unikalną cechą metabolicznego przeprogramowania w komórce nowotworowej jest wysokie uzależnienie od glutaminy. Proliferyjce komórki nowotworowe intensywnie wychwytyją glutaminę i metabolizują ją na drodze glutaminolizy. Katabolizm glutaminy poprzez deaminację do glutaminianu, a następnie jego wykorzystaniu jako substrat dla transaminaz i włączeniu do szlaku biosyntezy wytwarzania NEAA (ang. non-essential amino acid solution, np. asparaginianu i alaniny) powoduje, że stanowi ona źródło azotu w biosyntezie aminokwasów i nukleotydów. Z kolei przekształcenie glutaminianu przez dehydrogenazę glutaminianową w α -KG i włączanie w cykl TCA sprawia, że glutamina służy jako donor węgla w syntezie kwasów tłuszczowych, jednocześnie kompensując mniejszy udział glukozy w cyklu. Ponadto część pozostałego w cytoplazmie glutaminianu może zostać wykorzystana w syntezie glutationu, co wspiera produkcję przeciwutleniaczy i wspomaga przeżycie komórek w warunkach stresu oksydacyjnego (Park, Pyun i Park 2020) (Yang, Venneti i Nagrath 2017) (Li i inni 2016) (De Vitto, Pérez-Valencia i Radosevich 2015) (Wang i inni 2020)

1.2.1.4. Metabolizm lipidów

Szybkie tempo proliferacji wiąże się ze wzmożoną syntezą błony komórkowej. Jej głównym składnikiem budulcowym są lipidy, czyli szeroka grupa związków organicznych, których podstawowym członem są kwasy tłuszczowe (FA, ang. fatty acids). W przeciwieństwie do komórek prawidłowych, u których FA uzyskiwane są poprzez wychwyt egzogeny, w komórkach nowotworowych 95% kwasów tłuszczowych jest syntezowanych *de novo* (nawet w obecności egzogenywnych źródeł). Substratem w reakcji syntezy FA jest cytoplazmatyczny acetylo-CoA, uzyskiwany z cytrynianu lub octanu. Acetylo-CoA w kolejnym etapie ulega karboksylacji i kondensacji do 16-węglowego palmitynianu (nasycony kwas tłuszczowy). Łańcuch tłuszczowy tego związku może być wydłużany i/lub desaturowany w celu syntezy FA o różnej długości i stopniu nasycenia. W dalszej kolejności, podczas estyfikacji wolnych FA powstają hydrofobowe ogony fosfo- i sfingolipidów, które stanowią wraz z cholesterolem elementy błon biologicznych.

Wolne kwasy tłuszczowe pełnią nie tylko rolę składników budulcowych. Nadmiar FA przekształcany jest w trójglicerydy (TG) i estry cholesterolu (CE), które w komórce magazynowane są w formie lipidowych kropeł (LD- ang. lipid droplets) stanowiących zapas energii. W okresach braku dostępu do substancji odżywczych, kwasy tłuszczowe z LD utleniane są na drodze β -oksydacji (FAO- ang. fatty acid oxydation), prowadząc do wytworzenia energii w postaci ATP. Co więcej lipidy takie jak diacylglicerol, kwas fosfatydowy czy arachidonowy stanowią wtórne, bioaktywne przekazniki wpływające na aktywację RAS, PI3K i innych ścieżek sygnalizacyjnych odpowiedzialnych za promowanie kancerogenezy (Chae i Hong 2022) (Park, Pyun i Park 2020) (Tang i inni 2020) (Chen i Huang 2019) (Bian i inni 2020).

1.2.1.5. Metabolizm REDOX

Zmienione ścieżki metaboliczne wspierające proliferację i przeżycie komórek nowotworowych wiążą się z licznymi reakcjami redukcji i utleniania, a co za tym idzie generowania reaktywnych form tlenu (ROS) i stresem oksydacyjnym. ROS, czyli rodniki zawierające tlen, posiadają niesparowane elektrony walencyjne lub niestabilne wiązanie, których obecność powoduje, że cząsteczki te są wysoce reaktywne. Dobrze znanymi przykładami ROS są: ponadtlenek (O_2^-), rodnik hydroksylowy ($HO\bullet$) oraz nadttlenek wodoru (H_2O_2). ROS są generowane przez mitochondria jako produkt uboczny aktywności łańcucha transportu elektronów, a także przez oksydazy NADPH (NOX) jako zamierzony produkt reakcji enzymatycznej.

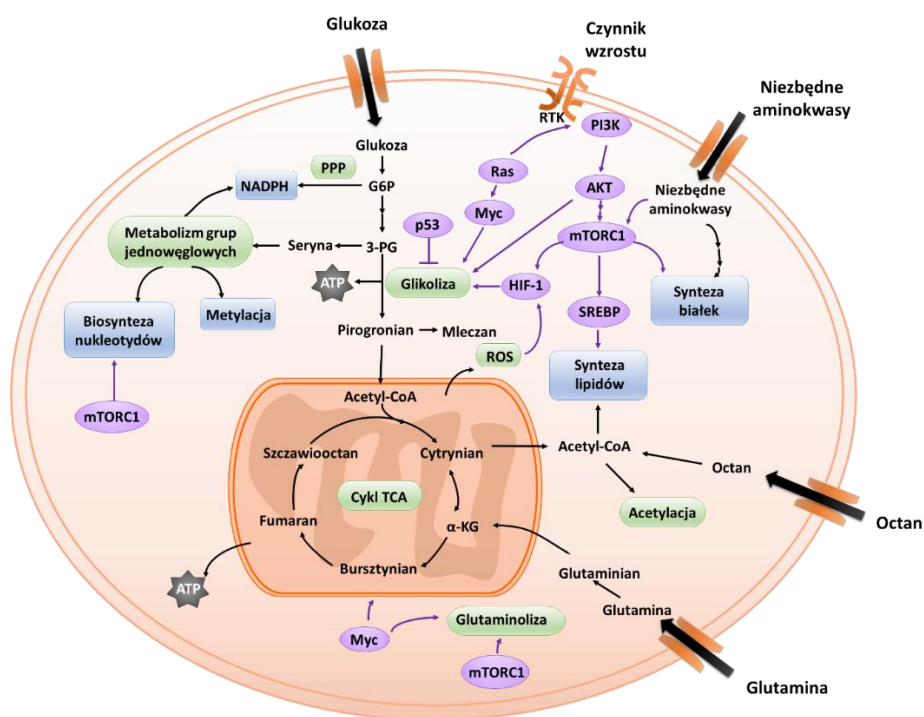
Zwiększone tempo produkcji ROS w komórkach nowotworowych wynika zarówno ze zmian onkogennych jak i wpływu mikrośrodowiska guza. Ze względu na szybki, niekontrolowany podział i wzrost komórek, w obrębie guza powstaje niezorganizowana masa komórek, a proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych jest utrudniony. Niedostateczne ukrwienie powoduje niedotlenienie i aktywację czynnika HIF-1 indukującego ekspresję NOX4 (jednej z oksydaz NADPH). Zwiększona ilość ROS w wyniku wyższego poziomu NOX stymuluje szlak sygnałowy PI3K/AKT oraz MAPK/ERK wspierając jeszcze szybszą proliferację komórek.

Poprzez udział w modyfikacji oksydacyjnej białek (m.in.: kinaz czy fosfataz) ROS o niskim poziomie pełnią funkcje cząsteczek sygnałowych, promujących przeżycie, podział i adaptację komórek do stresu metabolicznego. Jednakże ich utleniająca natura i ich nagromadzenie powoduje, że są szkodliwe dla komórki. Duży poziom reaktywnych form tlenu wywołuje

peroksydację lipidów, utlenianie białek, nieodwracalne uszkodzenie mitochondriów i niewystarczające wytwarzanie ATP, a ostatecznie doprowadza do śmierci komórek.

W związku z tym komórki nowotworowe muszą zrównoważyć wewnątrzkomórkowy poziom ROS, zwiększając swoje zdolności przeciwutleniające. Aby utrzymać homeostazę redox w komórkach nowotworowych poziomy enzymów przeciwutleniających oraz procesy metaboliczne, w których produkowany jest NADPH np.: PPP (wymagany w licznych mechanizmach obronnych) ulegają zwiększeniu (De Santis i inni 2018) (Park, Pyun i Park 2020) (Chae i Hong 2022) (Zhao i inni 2019) (DeBerardinis i Chandel 2016) (Brunner i Finley, SnapShot: Cancer metabolism 2021). Całość zmian powyżej opisanych przedstawiono w formie schematu na Rysunku 4.

Aby przetrwać, komórki nowotworowe przystosowały wiele mechanizmów, które często występują jednocześnie i nie wykluczają się wzajemnie. Pomimo licznie prowadzonych badań, przeprogramowanie metaboliczne komórek nowotworowych nadal pozostaje dalekie od pełnego scharakteryzowania. Dalsze próby lepszego poznania i zrozumienia zmian metabolicznych i stojących za nimi zmian molekularnych związanych z kancerogenezą stanowią kluczowe znaczenie w poszukiwaniu nowych sposobów szybkiej diagnostyki i profilaktyki nowotworów (Danzi i inni 2023).



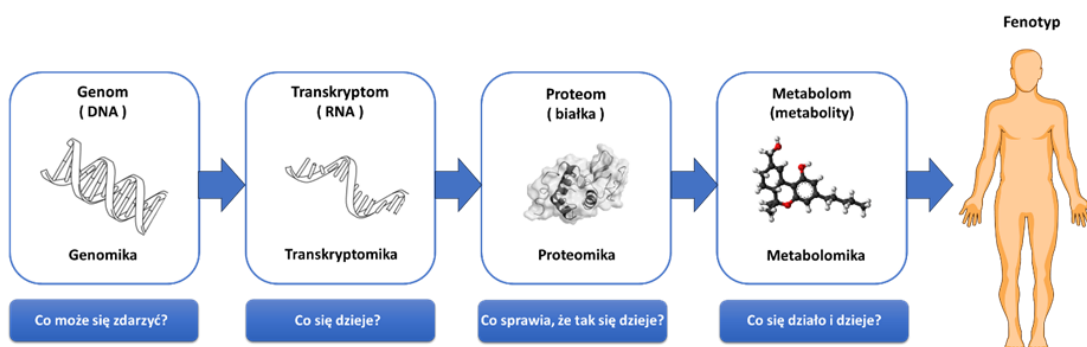
Rysunek 4 Szlaki sygnałowe biorące udział w regulacji metabolizmu nowotworu. ROS- reaktywne formy tlenu; PPP- szlak pentozofosforanowy; G6P- glukoza-6-fosforan; 3-PG- 3-fosfoglicerynian; ATP- adenozyno-5'-trifosforan; mTORC1-kompleks mTOR 1; α-KG, α-ketoglutaran; RTK-receptorowa kinaza tyrozynowa. [zmodyfikowane na podstawie: (DeBerardinis i inni, 2016)].

1.2.2. Metabolomika jako część biologii systemów

Zgodnie z centralnym dogmatem biologii molekularnej (Rysunek 5) zawarta w DNA informacja na temat organizmu (genom) w procesie transkrypcji przepisana zostaje na RNA (transkryptom). Kodujące sekwencje peptydowe RNA w trakcie translacji zostają przetłumaczone na kolejność aminokwasów w białkach, których aktywność prowadzi do powstania licznych metabolitów. Wiedza o metabolomie - końcowym efekcie powyższej kaskady, integruje informacje o wszystkich procesach biologicznych, jednocześnie zapewniając dynamiczny portret aktualnego stanu i fenotypu organizmu.

Analizą ilościową i jakościową metabolitów w próbkach biologicznych (tkankach, płynach ustrojowych itp.) i ich zmianą w odpowiedzi na bodźce fizjologiczne i patofizjologiczne zajmuje się metabolomika. Poprzez badanie interakcji szerokiej gamy cząsteczek i tworzonych przez nich sieci, nauka ta idealnie wpisuje się w założenia biologii systemów. Metabolomika uzupełnia „starsze” -omiki, umożliwiając badanie zmian i właściwości, których nie można bezpośrednio ocenić za pomocą genomiki czy proteomiki. Analiza profili metabolicznych i zrozumieniu ich funkcji w systemach biologicznych pogłębia wiedzę na temat złożonych procesów, predyspozycji i mechanizmów chorób czy rozwoju medycyny spersonalizowanej. Ogrom danych otrzymywany w rezultacie tego rodzaju analiz pozwala na tworzenie repozytoriów i przybliża nas do opracowania modeli matematycznych coraz bardziej złożonych sieci.

Metabolomika poprzez jednoczesną analizę zestawu metabolitów tworzących sieć w sposób holistyczny umożliwia zrozumienie mechanizmów biologicznych. Badając zbiór produktów końcowych ekspresji genów stanowi źródło najbardziej funkcjonalnych informacji o organizmie, a wrażliwość metabolomu na szeroki zakres czynników czyni ją nauką mającą zastosowanie w wielu obszarach nauk medycznych (Nicholson i inni, 2008) (Kosmidis i inni, 2014) (McCartney i inni, 2018) (Beger, 2013) (Araújo i inni, 2021) (Gomase i inni, 2008) (Schmidt i inni, 2021).



Rysunek 5 Schemat przedstawiający centralny dogmat biologii molekularnej z uwzględnieniem omik badających poszczególne rodzaje cząsteczek. [zmodyfikowane na podstawie: (Araújo i inni, 2021)]

1.2.3. Wysokoprzepustowe metody analizy metabolitów

Zróznicowanie chemiczne metabolitów powoduje brak jednej, uniwersalnej metody ich analizy. W celu poznania metabolomu równolegle stosuje się kilka uzupełniających się technik, a dwie główne z nich to spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR, ang. *nuclear magnetic resonance*) oraz spektrometria mas (MS, ang. *mass spectrometry*). W zależności od rodzaju badanych związków MS może być stosowany jako samodzielna technika, bądź też w połączeniu z chromatografią lub elektroforezą kapilarną, które umożliwiają rozdział skomplikowanej mieszaniny na prostsze składowe (Castelli i inni, 2021).

Mówiąc o metodach analizy należy również wspomnieć o różnych podejściach badawczych stosowanych w metabolomice. Wyróżnia się dwa typy analiz:

- niecelowaną, czyli tzw. metaboliczny odcisk palca, której zadaniem jest wykrycie jak największej ilości związków w próbce, a stężenia poszczególnych metabolitów podawane są w ujęciu półilościowym. Podejście to pozwala na wstępną selekcję potencjalnych cząsteczek wskazujących na zmianę zachodzącą w organizmie,
- celowaną, inaczej nazywaną profilowaniem metabolicznym, obejmującą badanie konkretnych związków, należących do tej samej klasy chemicznej np.: aminokwasy lub biorących udział w jednym szlaku biochemicznym np. cykl Krebsa. Podejście to pozwala na określenie zmian ilościowych bądź zależności między poziomami metabolitów związanych z działaniem czynników zewnętrznych lub zmianami patologicznymi. Znajduje zastosowanie m.in. w walidacji biomarkerów znalezionych w podczas analiz niecelowanych (Castelli i inni, 2021) (Metabolomika – współczesny trend badawczy w medycynie i farmacji, 2018) .

1.2.3.1. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego

Podstawą metody NMR jest wykorzystanie naturalnych właściwości magnetycznych jąder atomowych. w polu magnetycznym oddziaływanie spinów magnetycznych jąder różnych atomów prowadzi do generowania sygnałów. w rezultacie otrzymuje się charakterystyczne profile absorpcji rezonansowej metabolitów – widma NMR, przedstawiające intensywność sygnałów w funkcji natężenia pola magnetycznego (Dona i inni, 2016) .

Analizę NMR można wykonać dla dowolnego jądra aktywnego spinowo (najczęściej używane są ^1H i ^{13}C). Superpozycja widm wszystkich wykrywalnych metabolitów sprawia, że metoda obejmuje szeroki zakres związków w pomiarze, jest nieselektywna i dostarcza wielu informacji na temat struktury chemicznej związków i otoczenia. Ponadto niewątpliwymi zaletami są: wysoka powtarzalność, wydajność i przepustowość oraz minimalne wymagania dotyczące przygotowania próbek, a w związku z tym nieniszczący charakter metody. Profile uzyskane przy użyciu NMR są wysoce wiarygodne, praktycznie niezależne od aparatu pomiarowego, czy operatora. Co ważne technika umożliwia przełożenie odkryć *in vitro* do zastosowań klinicznych. Pomimo wielu zalet tej techniki, złożony skład płynów biologicznych stanowi w dalszym ciągu wyzwanie dla analizy widm NMR. Widma ^1H -NMR są wrażliwe na obecność jonów, zmiany pH, a także temperatury. Spektroskopia NMR obecnie oferuje ograniczoną rozdzielczość i stosunkowo niską czułość. Co więcej koszty zakupu i utrzymania sprzętu są wysokie (Cheung i inni, 2019) (Kosmides i inni, 2014) (Serkova i inni, 2009) (Gowda i inni, 2015) (Mielko i inni, 2021).

1.2.3.2. Spektrometria mas

Spektrometria mas (MS) umożliwia poznanie masy naładowanych cząsteczek obecnych w próbce, na podstawie stosunku masy do ładunku elektrycznego poszczególnych jonów - tzw. stosunek m/z . Metoda składa się z trzech głównych etapów: 1) przekształcenia analitów w jony w fazie gazowej (np. poprzez elektrorozpylanie – ESI czy jonizację elektronami - EI), 2) rozdzielenia jonów zgodnie ze stosunkiem m/z w analizatorze (np. typu Orbitrap lub czasu przelotu - ToF), 3) generowania sygnału elektrycznego proporcjonalnego do liczby jonów rejestrowanych przez detektor. W zależności od przedmiotu badania, przed analizą spektrometryczną próbki wymagają przygotowania m.in. poprzez wykonanie ekstrakcji bądź

derywatyzacji. Procedury te nie są obojętne dla próbek i z powodu utraty części metabolitów lub wprowadzenie nieodwracalnych zmian do ich struktury, wykluczających wykorzystanie próbki do innych analiz.

Płyny ustrojowe takie jak krew czy mocz, stanowiące typowy przedmiot analiz w badaniach biomedycznych, to mieszaniny złożone. Dlatego bezpośrednio przed wprowadzeniem próbki do źródła spektrometru dodaje się etap rozdzielania (frakcjonowania) analitów. Jak wcześniej wspomniano w tym celu stosowane są głównie metody chromatograficzne, których dobór zależy od właściwości związków takich jak hydrofobowość, wielkość i polarność. We wszystkich typach chromatografii wykorzystywana jest zdolność do różnego podziału mieszaniny między fazę ruchomą i stacjonarną układu. W przypadku badań metabolomicznych faza stacjonarna występuje zazwyczaj w formie upakowanej kolumny ze złożem, a faza mobilna zależy od wybranego rodzaju metody.

W separacji metabolitów dominująca stała się chromatografia cieczowa (LC ang. *liquid chromatography*) – tzn. rodzaj, w którym fazę ruchomą stanowi ciecz. Dzięki możliwości zastosowania szerokiej gamy kolumn oraz eluentów metoda umożliwia rozdział związków należących do wielu klas chemicznych, charakteryzujących się zarówno wysoką jak i niską polarnością. Wyboru obu faz dokonuje się na podstawie cząsteczek stanowiących obiekt badania. W przypadku stosowania kolumn polarnych i rozpuszczalnika o wyższej polarności niż jej wypełnienie mówi się o tzw. chromatografii cieczowej w normalnej fazie (NPLC). Natomiast gdy faza stacjonarna jest niepolarna, a eluent charakteryzuje się jeszcze niższą polarnością metodę określa się mianem chromatografii cieczowej z odwróconą fazą (RPLC). Połączenie chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas (LC-MS) ma wiele zalet. Oprócz umożliwiania analizy substancji termolabilnych, nielotnych i o różnym stopniu polarności, do wykonania pomiaru potrzebna jest próbka niewielkich rozmiarów, a jej przygotowanie jest stosunkowo proste. Warto jednak pamiętać także o wadach techniki takich jak: brak zdolności do pomiaru związków organicznych, które nie tworzą adduktów jonów molekularnych czy wysokich kosztach analiz (Liu i inni, 2017) (Zhang i inni, 2019) (Lopes i inni, 2017) (Ren i inni, 2018). Ponadto LC-MS cechuje niższa powtarzalność w porównaniu do chromatografii gazowej (GC).

GC stanowi najbardziej dojrzałą technologię chromatograficzną, którą stosuje się w analizach substancji lotnych i związków stabilnych termicznie. Rozdzielenie cząsteczek następuje w wyniku interakcji chemicznej między kapilarną kolumną, pokrytą wewnątrz cienką warstwą polimerowej fazy stacjonarnej i substancji (w postaci pary) w strumieniu gazu nośnego (fazy ruchomej). Połączenie tego złożonego mechanizmu separacji wraz ze spektrometrią mas zapewnia wysoką czułość, rozdzielczość i selektywność. GC-MS jest stosunkowo tanim sposobem badania związków organicznych. Dodatkowo identyfikację metabolitów ułatwia istnienie uniwersalnych baz danych np.: FIEHN i wspomagających analiz danych oprogramowań typu *open source*. Główną wadą metody jest dodatkowy etap derywatyzacji – przygotowania próbki zawierającej nielotne metabolity. Procedura ta jest czasochłonna, może wprowadzać artefakty i zmiany oraz ma niską przepustowość (Lopes i inni, 2017) (Zhang i inni, 2019) (Shulaev, 2006).

Połączenie chromatografii ze spektrometrią mas umożliwia wprowadzenie do spektrometru cząsteczek jedna po drugiej. Ułatwia to identyfikację związków i powoduje wzbogacenie wyników analiz o dodatkowe informacje. Uzyskane w rezultacie dane są jednak skomplikowane, wymagające dużej mocy obliczeniowej komputera i dobrego zaplecza bioinformatycznego. Oczywiście istnieje także możliwość bezpośredniego nastrzyku próbki do źródła. Jej niewątpliwą zaletą jest krótki czas wykonania analizy oraz niższe koszty w porównaniu do technik z zastosowaniem chromatografii. Należy jednak pamiętać, że to rozwiązanie zagrożone jest efektem supresji jonów, co jest równoznaczne z utratą dużej ilości wiedzy o składowych mieszaniny.

Analizy oparte o spektrometrię mas są zdecydowanie bardziej złożone i wolniejsze niż te z użyciem NMR. Jednak ze względu na większą czułość, MS umożliwia pomiar ilościowy szerszego zakresu związków, wykrywając związki będące poniżej progu detekcji NMR. Niestety ograniczona odtwarzalność oraz brak uniwersalnych protokołów i standaryzacji danych powodują, że wyniki profilowania metabolitów przy użyciu spektrometrii mas nie są w pełni porównywalne, a przeprowadzone dotychczas analizy nie pozwalają na scharakteryzowanie unikalnych sygnatur dla np.: konkretnych chorób (Günther, 2015) (Castelli i inni, 2021).

1.2.4. Metabolity obecne w krwi jako źródło biomarkerów nowotworowych

Krew od ponad 80 lat stanowi obiekt licznych badań analitycznych. Swoją popularność zawdzięcza niewątpliwie dużej dostępności, ale co najważniejsze integracji informacji o całym organizmie i procesach w nim zachodzących. Przepływając przez wszystkie tkanki ciała, krew tworzy swego rodzaju autostradę dla cząsteczek wydalanych czy wydzielanych w odpowiedzi na potrzeby i zmiany fizjologiczne organizmu, jednocześnie zapewniając „podgląd” metabolizmu. Rozwój technologii w ostatnich latach spowodował, że coraz częściej badane są wzorce cząstek – profile, związane z rozwojem chorób, dietą, aktywnością fizyczną i innymi czynnikami połączonymi ze stylem życia człowieka.

Według informacji zawartych w największej ogólnodostępnej bazie metabolitów człowieka - Human Metabolome Database (HMDB), ilość związków niskocząsteczkowych obecnie oznaczonych w krwi wynosi 17,5 tysiąca. Zgodnie z schematem umieszczonym poniżej (Rysunek 6) większość metabolomu ludzkiej krwi (ok. 88%) stanowią lipidy i cząsteczki lipidopodobne pełniące role zależne od ugrupowań obecnych w ich strukturze. Pozostałe 12% obejmuje bardzo zróżnicowane metabolity nielipidowe, do których należą m.in.: nukleotydy, aminokwasy czy kwasy organiczne. Zakres stężeń cząsteczek organicznych przynależnych do obu grup obejmuje od kilku pikomoli (np.: glicerofosfolipidy) po milimole w przypadku cholesterolu.



Rysunek 6 Metabolity obecne we krwi człowieka [zmodyfikowane na podstawie: (Kiseleva i inni, 2021)].

W metabolomice materiałem do badań związków obecnych w krwi jest najczęściej surowica lub osocze. Główna różnica pomiędzy tymi dwoma mieszaninami to obecność białek krzepnięcia i fibrynogenu. Surowica otrzymywana jest podczas krzepnięcia krwi pełnej. Z kolei osocze izoluje się przez wirowanie pełnej krwi z dodatkiem antykoagulantu, który zapobiega jej krzepnięciu. Z biochemicznego punktu widzenia oprócz subtelnych różnic np.: w poziomach eikozanoidów oba płyny są niemal identyczne. Jednak pomimo dowodów na niewielkie różnice między surowicą i osoczem, w dalszym ciągu istnieją spory, która forma jest lepsza do wykonywania analiz metabolomicznych (Chetwynd i inni, 2017) (Kiseleva i inni, 2021) (Psychogios i inni, 2011).

1.2.5. Metaboliczne markery ryzyka raka piersi

Badania genomu powiązały zmiany genetyczne (mutacje) z ryzykiem wystąpienia chorób nowotworowych tylko w niewielkiej części przypadków. Tak więc zagadnienie predyspozycji do chorób, w tym chorób nowotworowych, kryje wiele zagadek. Z pomocą w tej kwestii przychodzi metabolomika, która bierze pod lupę różnice w aktywności metabolicznej komórek nowotworowych i prawidłowych, chcąc zidentyfikować określone cząsteczki, ulegające rozregulowaniu w trakcie kancerogenezy. Wiedza na temat metabolitów obecnych w płynach biologicznych np.: krwi, które odzwierciedlają rozwój nowotworu jest w dalszym ciągu na bardzo wczesnym etapie. Aby zidentyfikować metaboliczne czynniki ryzyka wymagany jest dostęp do materiału przed-diagnostycznego, pochodzącego z dużych badań populacyjnych, a następnie przeanalizowanie profili metabolicznych poszczególnych osób i skorelowanie zaobserwowanych zmian z rozwojem choroby (Danzi i inni, 2023) (Haince i inni, 2022).

W kontekście poznania metabolicznej sygnatury ryzyka raka piersi dotychczas przeprowadzono 10 badań, które podsumowano w Tabeli 3. W przytoczonych pracach, w celu przeanalizowania profili metabolicznych najczęściej stosowano technikę spektrometrii mas (8 badań), jednakże ilość ocenianych cząsteczek różniła się pomiędzy eksperymentami. Warto zauważyć również różnice w liczebności, wieku i pochodzeniu (a co za tym idzie różnej diecie i stylu życia) pomiędzy grupami badanych pań.

Pomimo, iż od pierwszej próby scharakteryzowania metabolicznej sygnatury ryzyka raka piersi minęła niemal dekada, naukowcy w dalszym ciągu nie znaleźli jednego, uniwersalnego wzoru zmian widocznych we krwi kobiet. Niemniej jednak część cząsteczek wykazuje podobny

trend zmian pomiędzy badaniami wykonanymi przez różne grupy eksperymentatorów i na niezależnych kohortach pacjentek.

Wraz z rozwojem metabolomiki dowiadujemy się o kolejnych, kluczowych czynnikach, które należy uwzględnić już na etapie projektowania eksperymentu, tak aby można powiedzieć, że znaleziona sygnatura jest uniwersalna dla kobiet żyjących na całym świecie, bez względu na wiek czy styl życia. A zatem istotne jest dalsze, szczegółowe analizowanie profili metabolicznych obecnych we krwi kobiet i poszukiwanie wzorca reprezentatywnego dla ogólnoustrojowej dysregulacji metabolicznej predysponującej do rozwoju nowotworu piersi.

Tabela 3 Podsumowanie potencjalnych, metabolicznych markerów ryzyka raka piersi obecnych w surowicy/ osoczu krwi.

Sygnatura metaboliczna zwiększonego ryzyka raka piersi	Ilość analizowanych metabolitów	Technika analityczna	Rodzaj materiału biologicznego	Wielkość grupy badanej	Wiek [lata] ± S.D.	Odnosnik literaturowy
PC-O(30:0)↑ LPC (m.in.: LPC(18:0))↓	180	FIA-MS/MS LC-MS/MS	osocze przed- diagnostyczne	362 przypadków BC	51,4±7,8	(Kühn i inni, 2016)
γ-CEHC ↑,FA (10:0)↑ γ-tokoferol↑, monosiarczan 4-androstenu-3b,17b-diolu↑	617	GC-MS/MS LC-MS/MS	surowica przed- diagnostyczna	621 przypadków BC 621 kontroli	64±5,3	(Playdon i inni, 2017)
16α-OH-DHEA-S↑ 3-metyloglutarylokarnityna↑	617	LC-MS/MS	surowica przed- diagnostyczna	621 przypadków BC 621 kontroli	55–74	(Moore i inni, 2018)
Val↑, Lys↑, Arg↑, Gln↑, kreatyna↑, kreatynina↑, glukoza↑, lipoproteiny↓, lipidy↓, glikoproteiny↓, aceton↓, pochodne glicerolu↓, lipidy nienasycone ↓		NMR	osocze	206 przypadków BC 396 kontroli	BC:49,3±6,0 Ctr: 49,1±6,1	(Lécuyer i inni, 2018)
Leu↑, PGJ2↑, PGE2↑, GLA↑, FA(20:4n6) ↓	57	LC-MS/MS	surowica	84 przypadków BC 88 kontroli	BC: 45,7±0,86 Ctr: 43,4±0,74	(Yoo i inni, 2018)
Arg↓, Asn↓, PC-O(36:3)↓,PC(C36:3)↓, PC-O(34:2)↓, PC-O(36:2)↓, PC-O(38:2)↓, AC C2↑	147	FIA-MS/MS LC-MS/MS	osocze	1624 przypadków BC 1624 kontroli	BC: 52,5±8,0 Ctr: 52,5±7,9	(His i inni, 2019)
X-24293 ↑, Cys ↑, GPC(16:0/16:1) ↑, 2-palmitoleoilo-GPC (16:1) ↑, 1-palmitoilo- 2-oleoilo-GPC (16:01) ↑, 16α-OH-DHEA-S ↑, C19H30O5S ↑, C19H32O6S ↑, C19H30O8S2 ↑, szczawian ↓, X-13729 ↓, 3-hydroksybutyrylokarnityna,1-(1-enyl- oleoyl)-GPE (P-18:1) ↓, treonian 1-(1-enylo-	1275	LC-MS/MS	surowica przed- diagnostyczna	782 przypadków BC 782 kontroli	68± 6	(Moore i inni, 2021)

palmitoilo)-2-linoleoilu ↓ , linolenoilokarnityna (C18:2), linolenoilokarnityna (C18:3) ↓ , 1-(1-enyl-stearoyl)-GPE (P-18:0) ↓ , X-16944 ↓ , X-18921 ↓ , X-11478 ↓ , X-21319 ↓ , siarczan 4-allilofenolu ↓ , 3,4-metylenoheptanoilokarnityna						
kwasy dimetyloguanidynowalerianowy ↓ , kwasy 2-aminohipurykowe ↓ , piperyna ↓ , PE ↑ , Asn ↑	259	LC-MS/MS	osocze	1057 przypadków BC 1057 kontroli	BC: 44,7±4,5 Ctr: 44,8± 4,4	(Zeleznik i inni, 2021)
Żadne pojedyncze metabolity nie były istotnie związane z ryzykiem raka piersi. TAG z <3 wiązaniami podwójnymi ↑ (BC<10 i BC≥10), TAG z ≥3 wiązaniami podwójnymi ↓ (BC<10), CE ↓ (BC≥10)	307	LC-MS/MS	osocze przed- diagnostyczne	939 przypadków BC ≥10 lat 592 przypadków BC <10 lat 939 i 592 kontroli	BC≥10: 55,5±6,9 Ctr: 55,6 ±6,9 BC<10: 66,4±6,9 Ctr: 66,5±6,8	(Brantley i inni, 2022)
VLDL-2 ↓ , VLDL-3 ↓ , VLDL-4 ↓ , ApoB ↓ (BC<51 r.ż.), cholesterol ↓ (BC<51 r.ż.), fosfolipidy ↓ (BC<51 r.ż.)	28 metabolitów i 112 frakcji lipoprotein	NMR	surowica przed- diagnostyczna	1199 przypadków BC 1199 kontroli	BC: 52,7±14,1 Ctr: 52,7±14,2	(Debik i inni, 2022)

FIA-MS/MS –spektrometria mas z bezpośrednim nastrzykiem; LC-MS/MS -chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas; GC-MS/MS -chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas; PC -fosfatydylocholina; LPC- lizofosfatydylocholina; GPC -glicerofosfatydylocholina; PE – fosfatydyloetanoloaminy; FA- kwas tłuszczowy; GPE -glicerofosfoetanoloamina; 16α-OH-DHEA-S -siarczan 16α-hydroksydehydroepiandrosteronu; Arg -arginina; Asn -asparagina; Cys- cysteina; Gln -glutamina; Leu -leucyna; Lys -lizyna; Val -walina; TAG -triacyloglicerole; VLDL - lipoproteina o bardzo niskiej gęstości; ApoB -apolipoproteina B; ↓- obniżony poziom; ↑- podwyższony poziom w grupie podwyższonego ryzyka.

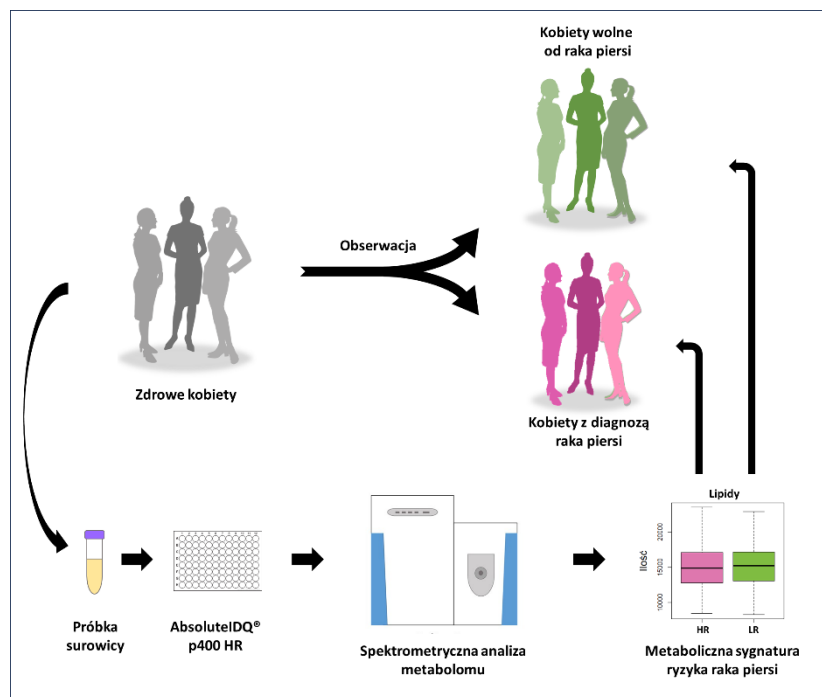
2. Cel pracy

Rak piersi stanowi najczęściej rozpoznawany typ nowotworu i jest najczęstszą przyczyną śmierci związaną z chorobą nowotworową wśród kobiet na całym świecie. Wysoka śmiertelność wynika między innymi z późnej diagnozy tej choroby. Obecnie złoty standard w badaniach przesiewowych umożliwiającym wczesne wykrycie choroby stanowi mammografia, która jednak nie zawsze jest skuteczna. W związku z tym istnieje realna potrzeba znalezienia nowych, możliwie mało kosztownych sposobów detekcji BC, które umożliwią diagnozę na jak najwcześniejszym etapie choroby lub będą informować o zwiększonym ryzyku jego wystąpienia. Niezwykle ważne jest aby metoda ta znalazła zastosowanie u kobiet bez względu na ich wiek i budowę piersi, a jej wyniki były niezależne od subiektywnej oceny człowieka. Rozwijająca się intensywnie w ostatnich czasach metabolomika stwarza nowe możliwości poszukiwań biomarkerów poprzez badanie metabolomu - zbioru cząsteczek niezwykle czułego na wszelkie zmiany zachodzące w organizmie. W niniejszej pracy postawiono hipotezę, że we krwi kobiet możliwa jest detekcja metabolitów, których swoisty zestaw wskazywałby na zwiększone ryzyko wystąpienia nowotworu piersi bądź też umożliwiał jego detekcję na wczesnym bezobjawowym etapie choroby.

Głównym celem badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej było scharakteryzowanie sygnatury metabolicznej surowicy krwi związanej z ryzykiem raka piersi. Ponadto, podjęto próbę określenia cech profilu metabolicznego surowicy charakterystycznego dla pacjentek z rakiem piersi.

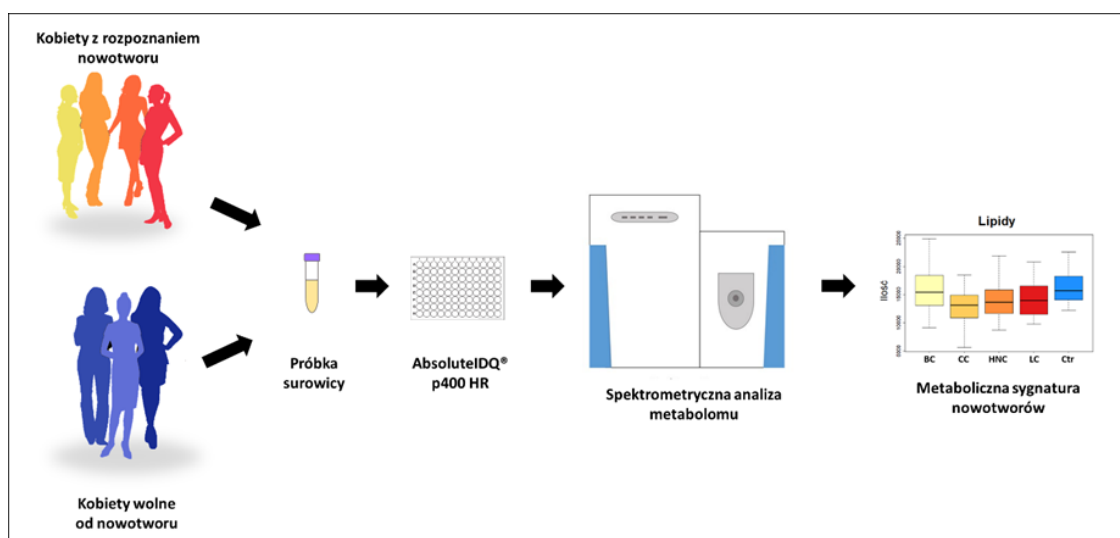
Dla uzyskania głównego celu projektu zrealizowano szereg zadań szczegółowych, do których należały:

- analiza profilu metabolitów obecnych w surowicy krwi uczestniczek norweskiego badania populacyjnego HUNT2, z których u części zdiagnozowano raka piersi w trakcie obserwacji trwającej od momentu włączenia do badania (schemat badania na Rysunku 7),



Rysunek 7 Schemat metodyki zastosowanej w celu scharakteryzowania metabolicznej sygnatury ryzyka zachorowania na raka piersi.

- porównanie profilu metabolitów obecnych w surowicy kobiet ze zdiagnozowanym nowotworem piersi (od których próbki pobrano przed rozpoczęciem leczenia onkologicznego) i kobiet wolnych od choroby nowotworowej, oraz
- porównanie profilu metabolitów obecnych w surowicy kobiet ze zdiagnozowanymi czterema typami nowotworów łitych, tj.: piersi, jelita grubego, regionu głowy i szyi oraz płuca (schemat badania na Rysunku 8).



Rysunek 8 Schemat metodyki zastosowanej w celu scharakteryzowania metabolicznej sygnatury nowotworu piersi i innych guzów łitych widocznych w obrazie klinicznym.

3. Metodyka

3.1. Materiał kliniczny wykorzystany w badaniach

W ramach rozprawy doktorskiej wykonano ilościową analizę metabolitów obecnych w próbkach pochodzących z dwóch źródeł. W badaniach, których celem było scharakteryzowanie metabolicznej sygnatury związanej z ryzykiem raka piersi wykorzystano próbki zebrane w ramach norweskiego badania populacyjnego HUNT2 (n=906). W badaniach, których celem było określenie cech metabolomu surowicy charakterystycznych dla raka piersi i innych nowotworów litych wykorzystano próbki zebrane do wcześniejszych badań prowadzonych w gliwickim oddziale Narodowego Instytutu Onkologii. Cały wykorzystany materiał biologiczny pochodził od osób, które świadomie i dobrowolnie zgodziły się na jego wykorzystanie w badaniach naukowych, a projekty zostały zatwierdzone przez odpowiednie Komisje Bioetyczne. W przypadku materiału zebranego w badaniu HUNT2 był to *Ethics Committee of Central Norway* (REK numbers #1995/8395 i #2017/2231). W przypadku materiału zebranego na potrzeby projektów realizowanych w Narodowym Instytucie Onkologii była to *Komisja Bioetyczna przy Centrum Onkologii* (nr zgody KB/493-53/10 oraz KB/430-84/20).

3.1.1. Próbkę krwi zbierane w badaniu populacyjnym HUNT2

Główny zestaw próbek, dla których wykonano pomiary stanowił materiał od osób zdrowych, zebrany latach 1995-1997 w ramach norweskiego badania populacyjnego w regionie Trøndelag (HUNT2) (Krokstad i inni, 2013). Badanie to objęło około 65 000 osób. Po otrzymaniu krwi wyizolowano surowicę, którą zamrożono i przechowywano w temperaturze -80°C. W 2019 roku dzięki analizie danych z Norweskiego Rejestru Nowotworów zidentyfikowano 1208 kobiet, u których podczas 22-letniego okresu obserwacji rozwinął się rak piersi (średni czas między donacją a diagnozą wynosił 11,7 lat). Dla każdego przypadku z rakiem piersi (High Risk; HR), losowo dopasowano próbkę pochodzącą od uczestniczki, która pozostała wolna od BC przez cały okres obserwacji (Low Risk; LR). Kryterium dopasowania stanowił wiek w momencie włączenia do badania HUNT2 (Debik i inni, 2022).

W ramach rozprawy doktorskiej z powyższego zbioru wyłoniono 15 podgrup przypadków, u których BC zdiagnozowano od roku do 15 lat po włączeniu do badania w rocznych

przedziałach czasowych. Do każdej podgrupy wylosowano po 30 bądź 31 przypadków HR wraz z dopasowanymi wcześniej przypadkami LR. Łącznie pomiar metabolitów wykonano dla zestawu 906 próbek: 453 przypadków z rozpoznaniem raka piersi (HR) i 453 wolnych od raka piersi (LR) w trakcie całego okresu obserwacji (min. 22 lata). Pełną charakterystykę próbek zakwalifikowanych do analizy zamieszczono w Tabeli 4.

Tabela 4 Charakterystyka kohorty biorącej udział w badaniu HUNT2 – dotyczącym raka piersi.

Zmienna	Grupa z rozpoznaniem BC w trakcie badania (n = 453)	Grupa kontrolna (n = 453)	P- wartość ^a
Przyjęte oznaczenie	HR	LR	
Wiek w trakcie oddania próbki (lata); średnia [S.D.]	55,7 [13,9]	55,7 [14,0]	0,97
Wiek pierwszej miesiączki (lata)	13,5 [1,4]	13,4 [1,4]	0,64
Brak informacji	16 (3,5%)	37 (8,2%)	
Ilość ciąż donoszonych (n)			0,004*
0	44 (9,7%)	30 (6,6%)	
1	47 (10,4%)	44 (9,7%)	
2	158 (34,9%)	143 (31,6%)	
3	125 (27,6%)	123 (27,2%)	
≥ 4	78 (17,2%)	106 (23,4%)	
Brak informacji	1 (0,2%)	7 (1,5%)	
Wiek pierwszej donoszonej ciąży (lata)	24,0 [4,6]	23,5 [4,0]	0,09
Brak informacji	47 (10,4%)	41 (9,1%)	
Wiek ostatniej donoszonej ciąży (lata)	30,7 [5,1]	30,9 [5,0]	0,55
Brak informacji	88 (19,4%)	84 (18,5%)	
Obecność nowotworu u matki (n)	63 (13,9%)	55 (12,1%)	0,43
Zastępcza terapia hormonalna^b (n)			0,004*
Systemowa	75 (16,6%)	38 (8,4%)	
Miejscowa	14 (3,1%)	8 (1,8%)	
Wcześniej stosowana	25 (5,5%)	31 (6,8%)	
Nie stosowana	248 (54,7%)	267 (58,9%)	
Brak informacji	91 (20,9%)	109 (24,1%)	
Wiek menopauzy ^c (lata)	48,2 [5,3]	47,0 [5,6]	0,14
Brak informacji	355 (78,4%)	352 (77,7%)	
Usunięcie części lub jednego jajnika (n)			0,27
Tak	19 (4,2%)	11 (2,4%)	
Nie	74 (16,3%)	64 (14,1%)	
Nie wiem / Brak informacji	340 (79,5%)	378 (83,4%)	
Usunięcie obu jajników (n)			1
Tak	15 (3,3%)	13 (2,9%)	
Nie	147 (32,4%)	132 (29,1%)	
Nie wiem / Brak informacji	291 (64,2%)	308 (68,0%)	

Czas od ostatniego posiłku podczas pobierania krwi			0,62
< 3 h	311 (68,7%)	308 (68,0%)	
3-6 h	118 (26,0%)	307 (26,0%)	
> 6 h	21 (4,6%)	26 (5,7%)	
Nie znana	3 (0,7%)	4 (0,9%)	
Spożycie alkoholu podczas rekrutacji (częst./miesiąc)	1,89	1,4	0,008*
Nie znana	49 (10,8%)	48 (10,6%)	
Wzrost (cm)	164,0 [6,5]	163,3 [6,7]	0,07
Brak informacji	2 (0,4%)	3 (0,7%)	
Waga (kg)	72,5 [12,8]	71,0 [12,4]	0,08
Brak informacji	4 (0,9%)	3 (0,7%)	
BMI (kg/m²)	27,0 [4,8]	26,7 [4,6]	0,29
Brak informacji	4 (0,9%)	3 (0,7%)	
Obwód talii (cm)	83,2 [11,9]	83,0 [11,3]	0,77
Brak informacji	2 (0,4%)	1 (0,2%)	
Obwód bioder (cm)	103,6 [9,7]	103,0 [9,0]	0,37
Brak informacji	2 (0,4%)	1 (0,2%)	
WHR	0,80 [0,06]	0,80 [0,06]	0,55
Brak informacji	2 (0,4%)	1 (0,2%)	
Palacz (n)			0,20
Tak	131 (28,9%)	116 (25,6%)	
Nie	290 (64,0%)	312 (68,9%)	
Brak informacji	32 (7,1%)	25 (5,5%)	
Ilość lekkiej aktywności fizycznej w ciągu ostatnich 12 miesięcy w h/tydzień (n)			0,83
0	40 (8,8%)	32 (7,1%)	
< 1	69 (15,2%)	63 (13,9%)	
1 – 2	135 (29,8%)	136 (30,0%)	
> 3	126 (27,8%)	124 (27,4%)	
Brak informacji	83 (18,3%)	98 (21,6%)	
Ilość intensywnej aktywności fizycznej w ciągu ostatnich 12 miesięcy w h/tydzień (n)			0,69
0	138 (30,5%)	132 (29,1%)	
< 1	66 (14,6%)	55 (12,1%)	
1 - 2	52 (11,5%)	53 (11,7%)	
> 3	22 (4,9%)	15 (3,3%)	
Brak informacji	175 (38,6%)	198 (43,7%)	

SD: odchylenie standardowe (ang. standard deviation) ; BMI: wskaźnik masy ciała (ang. body mass index); WHR: Stosunek talii do bioder (ang. waist-to-hip ratio). Wartości podano jako średnie z odchyleniem standardowym [SD]. a P-wartość dla porównania grup z rozpoznaniem raka piersi i kontrolnej z użyciem testu t-Studenta dla zmiennych ciągłych lub testu Chi-kwadrat Pearsona dla zmiennych kategoriowych; b Obecne stosowanie ogólnoustrojowego estrogenu w postaci tabletek lub plastrów; c Wartości brakujące obejmują kobiety, które nie osiągnęły menopauzy oraz kobiety, które nie udzieliły odpowiedzi;

* Oznacza istotność statystyczną (P-wartość < 0,05)

3.1.2. Próbkę krwi pacjentek z nowotworami

Surowica krwi pacjentek z klinicznym rozpoznaniem raka piersi i innych nowotworów litych oraz kobiet zdrowych (tj. wolontariuszek wolnych od choroby nowotworowej; kontrola

- Ctr) pochodziła ze zbioru Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów; materiał został zebrany w latach 2006-2020 w ramach wcześniejszych badań realizowanych przez zespół prof. Piotra Wiśłaka. W przypadku pacjentek ze zdiagnozowanym nowotworem krwi do badań pobierano przed rozpoczęciem terapii onkologicznej. Z pobranej krwi izolowano surowicę, którą po porcjowaniu przechowywano w temperaturze -80°C do czasu analiz. Charakterystykę grupy kobiet z klinicznie zdiagnozowanym rakiem piersi (BC; n=112) oraz grupy kontrolnej zdrowych kobiet (Ctr; n=95) umieszczono w Tabeli 5.

Tabela 5 Charakterystyka kohorty z klinicznie zdiagnozowanym nowotworem piersi oraz dopasowanej grupy kontrolnej.

Grupa próbek	Kontrola (n = 95)	Rak piersi (n = 112)
Przyjęte oznaczenie	Ctr	BC
Wiek w trakcie oddania próbki (lata); średnia [S.D.]	48,3 [6,5]	49,3 [11,0]
Stadium kliniczne (n)		
I	-	0
II		56
III		49
IV		7

W związku z mniejszą liczebnością dostępnych próbek pochodzących od kobiet z innymi nowotworami litymi oraz chcąc zapewnić podobny rozkład wieku badanych osób w analizach dotyczących sygnatury wspólnej dla nowotworów litych, z grupy kontrolnej i z grupy pacjentek z rakiem piersi wyodrębniono podgrupy 35 osobowe. Charakterystykę próbek uwzględnionych w dalszej analizie przedstawiono w Tabeli 6.

Tabela 6 Charakterystyka grup nowotworów litych oraz podgrup nowotworu piersi i osób zdrowych.

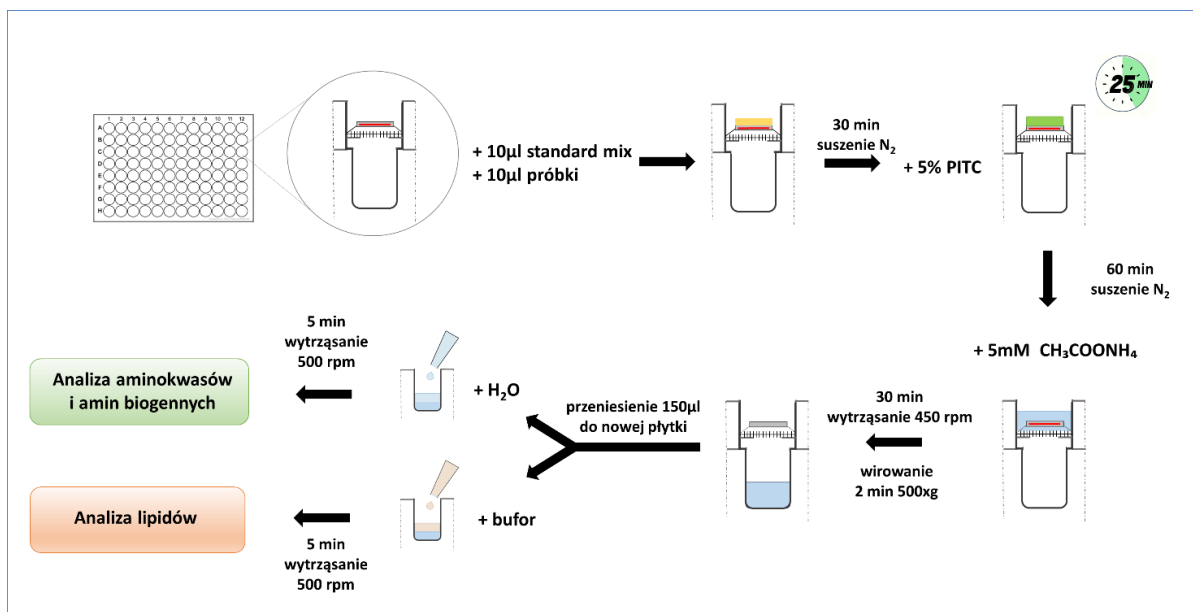
Grupa próbek	Kontrola (n = 35)	Rak piersi (n = 35)	Rak jelita grubego (n = 30)	Rak regionu głowy i szyi (n = 32)	Rak płuca (n = 35)
Przyjęte oznaczenie	Ctr	BC	CC	HC	LC
Wiek w trakcie oddania próbki (lata); średnia [S.D.]	53,7 [3,6]	60,5 [7,4]	64,8 [10,5]	59,4 [11,9]	65,8 [8,8]
Stadium kliniczne (n)					
I	-	0	6	0	9
II		19	11	2	8
III		14	12	9	13
IV		2	1	21	5

3.2. Analiza profilu metabolitów w próbkach surowicy

Ilościową analizę metabolomu surowicy wykonano przy użyciu zestawów Absolute IDQ p400 HR (płytki 96-dołkowe; Biocrates Life Sciences AG, Innsbruck, Austria). Pomiary przeprowadzono stosując technikę spektrometrii mas o wysokiej rozdzielczości (HRMS) w połączeniu z bezpośrednim nastrzykiem próbki lub chromatografią cieczową (LC). Zarejestrowane dane przetworzono, w wyniku czego otrzymano macierze stężeń metabolitów obecnych w badanych próbkach.

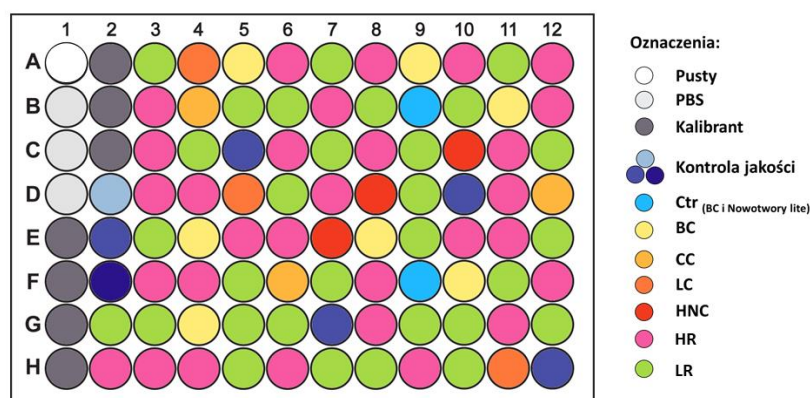
3.2.1. Przygotowanie próbek do analizy

Płytki 96-dołkowe dostarczone w zestawach Absolute IDQ p400 HR posiadały opracowany przez firmę system filtracyjny w postaci dysku wewnątrz każdego dołka, w którym umieszczona została część znakowanych izotopowo standardów wewnętrznych. Zgodnie z protokołem producenta w pierwszym kroku do każdego dołka naniesiono po 10 µl drugiej części mieszaniny standardów wewnętrznych (rozpuszczonej z dołączonego w zestawie liofilizatu), a następnie po 10 µl próbki surowicy według opracowanego wcześniej schematu. Płytkę suszono w atmosferze azotu do całkowitego wyschnięcia po czym przeprowadzono proces derywatyzacji wykorzystując 5% roztwór fenyloizotiocyanianu w mieszaninie złożonej z pirydyny, etanolu i wody w stosunku 1:1:1 (v/v/v). Wprowadzenie etapu derywatyzacji do procedury pozwala na poprawę właściwości fizyko-chemicznych analitów m.in.: stabilności związków, a ponadto niweluje problemy związane z niską wydajnością jonizacji czy rozdziałem chromatograficznym. Po 25 minutowej inkubacji z reagentem płytkę ponownie suszono w atmosferze azotu, po czym rozpoczęto etap ekstrakcji metabolitów. W tym celu płytkę wytrząsano przez 30 min przy 450 rpm z 5 mM roztworem octanu amonu w metanolu (300 µl/dołek) i zwirowano przez 2 min przy 500 x g. Część eluatu (150 µl) z każdego dołka przeniesiono do nowej płytki i dopełniono 150 µl wody przeznaczonej do pomiarów LC-MS. Do pozostałej części zgodnie z zaleceniem dodano 250 µl roztworu dedykowanego do pomiaru z bezpośrednim nastrzykiem (analiza lipidów) dołączonego do zestawu. W celu połączenia składników obie płytki wytrząsano przez 5 min przy 500 rpm. Otrzymane w niniejszy sposób płytki z ekstraktami metabolitów wykorzystano w analizie spektrometrycznej. Całą procedurę przygotowania płytki przedstawiono na schemacie na Rysunku 9.



Rysunek 9 Schemat procedury przygotowania płytki pomiarowej. PITC- fenyloizotiocyanian

Mając na uwadze, że analiza tak dużej liczby próbek ($n=1216$) wiąże się z możliwym pojawieniem efektu paczki (ang. *batch effect*), przygotowanie próbek rozpoczęto od losowego ich rozmieszczenia na 16 płytkach pomiarowych, tak aby ilość próbek z danej podgrupy była podobna na każdej z mierzonych płytek (ostatnia płytka zawierała jedynie część dobranej w późniejszym czasie puli próbek kontrolnych). Każda płytka oprócz miejsc przeznaczonych na badane próbki zawierała miejsce na wzorce kalibracyjne (w siedmiu poziomach stężeń) oraz kontrole jakości (ustandaryzowana próbka surowicy ludzkiej), służące do weryfikacji m.in.: dokładności i swoistości pomiarów. Ponadto w celu oznaczenia poziomu szumów, tłumienia jonów oraz granicy wykrywalności w trzy początkowe dołki nanoszony był bufor PBS. Przykładowy schemat płytki zamieszczono na Rysunku 10.



Rysunek 10 Przykładowy schemat ułożenia próbek na jednej z płytek pomiarowych. Kolorami zaznaczono dołki z naniesionymi: PBS, kalibrantami, kontrolami jakości i poszczególnymi grupami próbek oddanymi przez kobiety z rozpoznanymi różnymi typami nowotworów oraz od nich wolnymi, zebranymi w Norwegii i Polsce. PBS -sól fizjologiczna buforowana fosforanami; Ctr - próbki od kobiet, które pozostały wolne od raka; BC -próbki od kobiet, z rozpoznaniem rakiem piersi; CC - próbki od kobiet, z rozpoznaniem rakiem jelita grubego; LC - próbki od kobiet, z rozpoznaniem rakiem płuca; HNC - próbki od kobiet,

z rozpoznany rakiem regionu głowy i szyi; HR - próbki kobiet z kohorty norweskiej, u których w okresie obserwacji zdiagnozowano rak piersi; LR - próbki kobiet z kohorty norweskiej, które pozostały wolne od raka;

3.2.2. Ilościowa analiza metodą spektrometrii mas

Zestaw Absolute IDQ p400 HR umożliwiał analizę ilościową 408 metabolitów bądź grup izomerów, zaliczanych do jedenastu klas związków chemicznych. Pomiary składały się z dwóch części opisanych w rozdziale 3.2.1:

- a. oznaczenia 21 aminokwasów i 21 amin biogennych przy zastosowaniu spektrometrii mas sprzężonej z chromatografią cieczową,
- b. oceny części lipidowej (55 acykarnityn, 18 diglicerydów, 42 triglicerydów, 24 lizofosfatydylocholin, 172 fosfatydylocholin, 31 sfingomielin, 9 ceramidów, 14 estrów cholesterolu) oraz heksozy w technice MS z bezpośrednim nastrzykiem próbki do źródła jonów (tj.: bez wcześniejszego rozdziału chromatograficznego próbki).

Wszystkie analizy zostały z użyciem systemu złożonego ze spektrometru Orbitrap Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) oraz chromatografu cieczowego 1290 Infinity UHPLC (Agilent Santa Clara, USA), kontrolowanego przez oprogramowanie Xcalibur 4.1. Rozdział aminokwasów i amin biogennych przeprowadzono w układzie odwróconych faz na kolumnie Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (3,5 μ m) 3,0 x 100 mm w 6 minutowym gradiencie z fazami ruchomymi gdzie: fazę A stanowiła r-r 0,2% FA w wodzie czystości LC-MS, a fazę B 0,2% FA w acetonitrylu czystości LC-MS.

Otrzymane widma i chromatogramy przetworzono za pomocą oprogramowania Xcalibur 4.1 i MetIDQ DB110-2976 (Biocrates Life Sciences, Innsbruck, Austria) dedykowanego przez producenta zestawu, uzyskując wartości stężenia w μ M poszczególnych metabolitów obecnych w konkretnych próbkach.

3.3. Czynnności mające wpływ na stabilności układu pomiarowego i jakość danych

W celu zminimalizowania ryzyka utraty jakości i wydajności pomiarów spowodowanego zanieczyszczeniem przyrządów pomiarowych przed rozpoczęciem analiz zaplanowano schemat czyszczenia poszczególnych elementów układu pomiarowego. Przed przystąpieniem

do jakichkolwiek analiz zarówno chromatograf jak i spektrometr mas został poddany sprawdzeniu i czyszczeniu przez dedykowany zespół serwisowy. Fazy ruchome przygotowywano na świeżo przed analizą próbek na danej płytce. Ponadto oprócz rutynowego płukania w trakcie pomiarów wszystkich 16 płytek pomiarowych oraz płytki startowej, za pomocą 100% metanolu czyszczono stożek (ang. *Ion Sweep Cone*) oraz źródło jonów (ang. *Ion Max source*) spektrometru mas każdorazowo po zakończonych analizach dla jednej płytki (LC+FIA). Dodatkowo do czyszczenia stożka używano proszku do czyszczenia źródła jonów w MS opartego na tlenku glinu (RESTEK, nr kat.: 22685) w celu dokładnego usunięcia osadu osadzonego na jego powierzchni. Układ soczewek (ang. *s-lens*) czyszczono wraz z wymianą kapilary na nową (ang. *Ion Transfer Capillary*) co 3 płytki pomiarowe. W razie wystąpienia problemów związanych z niestabilnością aerozolu bądź spadkiem intensywności sygnałów w trakcie analiz schemat czyszczenia był modyfikowany. Co więcej w razie braku możliwości ustawienia stabilnego rozpylania aerozolu (na etapie testów sprawności układu) igłę źródła jonów (ang. *Electrospray Needle*) intensywnie płukano, bądź w razie potrzeby wymieniano na nową.

Jedną z procedur diagnostycznych (wskazujących na potrzebę serwisowania bądź czyszczenia spektrometru), a także zapewniającą powtarzalność analiz i pewność, że wykryta masa jonu jest zgodna z jego rzeczywistą masą była kalibracja mas. Operację tę przeprowadzano po każdym czyszczeniu oraz dzień przed przygotowaniem każdej płytki pomiarowej. Kalibrację wykonywano poprzez wprowadzenie wzorca Thermo Scientific™ Pierce™ LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution (Thermo Scientific, nr kat.: PI88323), o znanych wartościach m/z pików widocznych w jego widmie masowym, a następnie dokonaniu korekt, tak aby wskazywane masy zgadzały się z znanymi wcześniej wartościami.

Co więcej przed przystąpieniem do ekstrakcji metabolitów z próbek surowicy (tj. przygotowania płytki pomiarowej) każdorazowo wykonywano test sprawności układu (ang. *system suitability test - SST*). W tym celu wykorzystano dołączone do zestawu, w formie liofilizatów dwie mieszaniny testowe (odpowiednio jedna dla części z LC i druga dla pomiaru z bezpośrednim nastrzykiem próbki). Po ich wcześniejszym rozpuszczeniu, wykonano po trzy oznaczenia spektrometryczne dla każdej z mieszanin oraz tzw. próbki ślepej (ang. *blank*) zawierającej jedynie rozpuszczalnik stosowany w pomiarze, po czym na podstawie uzyskanych chromatogramów w programie Xcalibur 4.1 sprawdzano czy układ spełnia kryteria sprawności.

W przypadku pomiarów z wykorzystaniem LC zwracano uwagę na 5 parametrów informujących o poprawności rozdziału na kolumnie chromatograficznej oraz o czułości układu-spektrometru:

1. brak jakichkolwiek pików na chromatogramach otrzymanych dla próbek ślepych,
2. stabilne czasy retencji dla wszystkich jonów analizowanych w mieszaninie testowej we wszystkich trzech powtórzeniach (maksymalna tolerowana zmiana $\pm 0,02$ min),
3. brak widocznego poszerzenia i podziału pików dla jonów o m/z 114, 261 i 310,
4. dobra separacja pików dla ADMA i SDMA,
5. intensywność pików wzorca dla jonu o m/z 743 powinna wynosić co najmniej $2,0 \times 10^6$ cps.

Najbardziej limitującym wskaźnikiem zmian w pracy układu w przypadku tej analizy było kryterium dotyczące intensywności pików dla składowej wzorca z m/z równym 743.

W części lipidowej testu (FIA, nastrzyk bezpośredni) sprawdzano trzy kryteria. Dwa z nich dotyczyły minimalnej intensywności sygnałów od analizowanych jonów, a trzecie zabraniało analizy przy widocznych podziałach i tzw. ogonach pików dla mieszaniny testowej. W trakcie wykonanej analizy najbardziej rygorystycznym wymaganiem było osiągnięcie i utrzymanie intensywności sygnału na poziomie co najmniej $1,0 \times 10^6$ cps dla jonu z wzorca o m/z równym 428.

Wszystkie odstępstwa od wyznaczonych kryteriów obserwowane na etapie testów powodowały zatrzymanie procedury, próbę zlokalizowania przyczyny i możliwe rozwiązanie problemu. W przypadku niniejszej analizy niezwykle ważna była obserwacja intensywności sygnałów i dostosowywanie napięcia (U [kV]) rozpylania jonów (ang. *spray voltage*) ($U \in < 3; 4 > \text{kV}$), pozwalającego na poprawę czułości MS i zapewnienie jednakowych warunków podczas analiz wszystkich 17 płytek.

Ponadto dodatkowym etapem kontroli stabilności układu pomiarowego było sprawdzenie zmian (bądź ich brak) czasów retencji, kształtów i separacji pików chromatograficznych w pomiarach próbek pięciu kontroli jakości w obrębie płytki, w momencie zakończenia pomiarów LC każdej z płytek pomiarowych. W sytuacji spostrzeżenia wszelkich różnic i nieprawidłowości lokalizowano możliwą przyczynę i powtarzano analizę dotyczącą aminokwasów i amin biogennych (stabilność wyekstrahowanych cząsteczek na płytce LC

wynosiła 2 dni); miało to wpływ na opóźnienie w oznaczeniu lipidów (analiza tej części możliwa była w ciągu 7 dni od przygotowania próbek na płytce FIA).

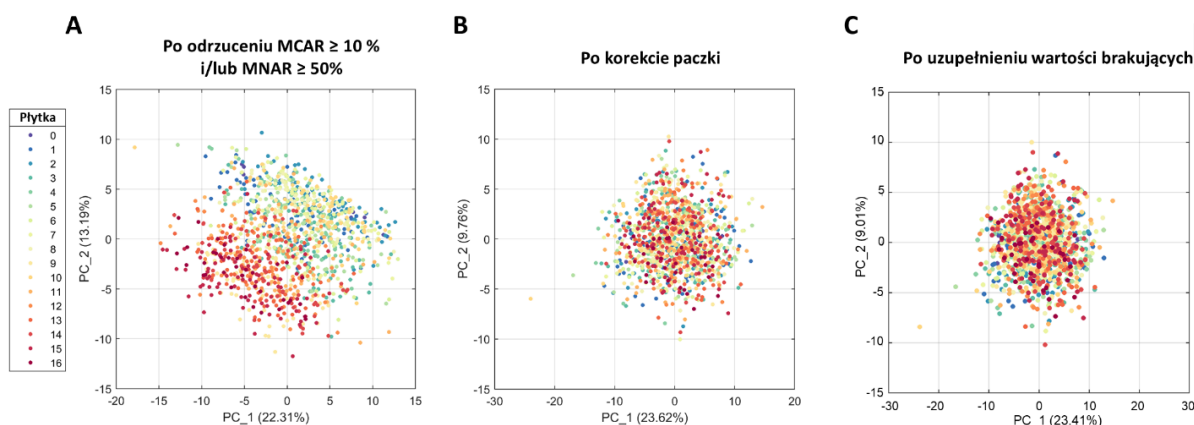
3.4. Analiza statystyczna i bioinformatyczna

3.4.1. Przygotowanie danych

Analizę danych rozpoczęto od detekcji wartości brakujących. W niniejszym zbiorze danych założono istnienie dwóch przyczyn utraty wartości pomiarowych: losową (ang. *missing completely at random*, MCAR) – wynikającą z błędu pomiaru standardu wewnętrznego oraz nie losową (ang. *missing not at random*, MNAR) - gdzie wartość zero została przypisana ze względu na poziom metabolitu poniżej progu detekcji (LOD). Metabolity, dla których MCAR wykryto w $\geq 10\%$ próbek i/lub MNAR wykryto w $\geq 50\%$ próbek odrzucono z dalszej analizy ilościowej ($n = 105$); związki te zakwalifikowano do analizy binarnej (jest/nie ma). Dane dotyczące pozostałych związków zakwalifikowanych do analizy ilościowej poddano dalszej korekcie.

W celu ujednolicenia zakresów zmiennych i uzyskania symetrycznych rozkładów dane ilościowe poddano transformacji logarytmicznej ($\log_2(x+1)$), a następnie wykorzystując empiryczną metodę Bayesa skorygowano tzw. efekt paczki. Podczas korekty założono, że próbki mierzone przy użyciu jednej 96-dołkowej płytki reprezentują jedną paczkę. W kolejnym kroku przystąpiono do uzupełnienia wartości brakujących. Wartości brakujące o charakterze MNAR zostały uzupełnione liczbami losowymi z rozkładu normalnego przyciętego do zakresu od 0 do mediany wartości LOD wyznaczonych dla 17 płytek (16 pomiarowych i jednej startowej oznaczanej jako 0). Z kolei wartości o charakterze MCAR uzupełniono posługując się metodą k-najbliższych sąsiadów (ranking sąsiedztwa ustalono w obrębie każdej z 7 grup „klinicznych” próbek osobno, a wartość brakującą uzupełniono wartością średnią poziomu danego metabolitu dla 3 najbardziej podobnych próbek). Opisane wyżej czynności, tj. usunięcie efektu paczki i uzupełnienie brakujących wartości, zostały wykonane przez Panią dr inż. Agatę Kurczyk. Rysunek 11 przedstawia strukturę wyjściowego zestawu danych, wynik korekty efektu paczki oraz rezultat uzupełnienia brakujących wartości.

Tak przygotowany zestaw danych został poddany analizie statystycznej mającej na celu określenie istotności różnic ilościowych pomiędzy porównywanymi grupami (rozdział 3.3.2).



Rysunek 11 Przygotowanie danych do analizy statystycznej. (A) Analiza głównych składowych (PCA) po odrzuceniu zmiennych, dla których $MCAR \geq 10\%$ i/lub $MNAR \geq 50\%$, (B) PCA po wykonaniu korekty efektu paczki, (C) PCA po uzupełnieniu wartości brakujących. Rysunek przygotowany przez dr inż. Agatę Kurczyk.

3.4.2. Analiza statystyczna różnic między porównywanymi grupami

3.4.2.1. Analiza statystyczna różnic między grupami kobiet z badania populacyjnego HUNT2

W celu zbadania znamienych statystycznie różnic w stężeniach 284 związków pomiędzy analizowanymi grupami kobiet zastosowano test u Manna-Whitneya (Mann i inni, 1947), dla którego określono wielkość efektu „r” obliczony ze wzoru:

$$r = \frac{z}{\sqrt{N}}$$

gdzie:

- z to wartość statystyki testowej
- N to łączna liczba obserwacji w dwóch analizowanych grupach pacjentów.

Interpretację wielkości efektu przyjęto zgodnie z kryterium Cohena: mały efekt: $r \geq 0,1$, średni efekt: $r \geq 0,3$, duży efekt: $r \geq 0,5$ (Cohen, 1988).

Wyjaśnienie wyboru metody oceny istotności różnic. Wielkość efektu stanowi niezależną od liczebności próby, ilościową miarę różnicy między porównywanymi grupami (istotność merytoryczną), w przeciwieństwie do p-wartości, która dostarcza jedynie informacji o obecności bądź braku różnicy i przy wystarczająco dużej próbie niemal zawsze wykaże znaczącą różnicę. Ponadto obliczanie wielkości efektu umożliwia ilościowe porównanie wyników otrzymanych w ramach różnych doświadczeń. Co więcej miara ta pozwala by rezultaty analiz przeprowadzonych na małej grupie mogły służyć jako zapowiedź zmian

obserwowanych w porównaniach zbiorów o większej liczebności (Sullivan i inni, 2012) (Tomczak i inni, 2014) (Nakagawa i inni, 2007).

W przypadku zestawu pozostałych 105 metabolitów wyłączonych z analizy ilościowej zastosowano dokładny test Fishera (Fisher, 1934) (Fisher, 1935) w celu sprawdzenia czy stan nieobecności/obecności danego cząsteczki był związany z grupą. Ponadto dla każdej analizy zastosowano korektę na wielokrotne testowanie Benjaminiego-Hochberga (Benjamini i inni, 1995). Wszystkie hipotezy statystyczne zostały przetestowane na 5% poziomie istotności.

Aby określić stopień związku między poziomami metabolitów a czasem do wykrycia nowotworu lub wiekiem kobiet w momencie oddania próbki do badania obliczono współczynniki korelacji rang Spearmana (Spearman, 1904).

Trzy podgrupy wiekowe (młodsza, średnia, starsza) kobiet wybranych z kohorty uczestniczącej w badaniu HUNT2 wyznaczono za pomocą estymacji mieszaniny gaussowskiej.

3.4.2.2. Analiza statystyczna różnic między grupami pacjentek z nowotworami

Analizę stężeń metabolitów różnicujących przypadki BC (n=112) i kontrole (n=95) przeprowadzono za pomocą testu u Manna–Whitneya (Mann i inni, 1947), a następnie wykonano korektę Benjaminiego–Hochberga (Benjamini i inni, 1995), aby zmniejszyć liczbę wyników fałszywie dodatnich. W celu identyfikacji metabolitów różnicujących przypadki czterech typów nowotworów (BC, CC, HNC, LC) oraz próbki kontrolne (Ctr) zastosowano test Kruskala-Wallisa (Kruskal i inni, 1952), a następnie wykonano test post-hoc Conover (Conover i inni, 1979) (Conover, 1999) dla porównań parami. Wszystkie hipotezy statystyczne przetestowano na 5% poziomie istotności. Dodatkowo, dla wszystkich porównań obliczono wielkość efektu „r” według wzoru umieszczonego w poprzednim podrozdziale.

W celu oceny podobieństw między analizowanymi grupami przeprowadzono hierarchiczne grupowanie. Obliczono średnie stężenie metabolitów dla próbek w określonej grupie (stężenia zostały wcześniej przekształcone w z-score). Każdą analizowaną grupę scharakteryzowano za pomocą wektora składającego się z obliczonych średnich stężeń 284 związków, a następnie analizowano podobieństwa między grupami. W tym celu przeprowadzono aglomeracyjną hierarchiczną analizę skupień stosując odległość

Minkowskiego do obliczania miary odległości między punktami i metodę średnich połączeń jako metodę wiązania skupień (Jain i inni, 1999).

Dla metabolitów wyłączonych z analizy ilościowej, wykonano dokładny test Fishera (Fisher, 1934) (Fisher, 1935) by sprawdzić, czy istnieje związek między nieobecnością/obecnością cząsteczek a analizowanymi grupami.

Wszystkie analizy przeprowadzono przy użyciu oprogramowania R Statistical Software (wersja 4.1.2, R Foundation for Statistical Computing, Wiedeń, Austria).

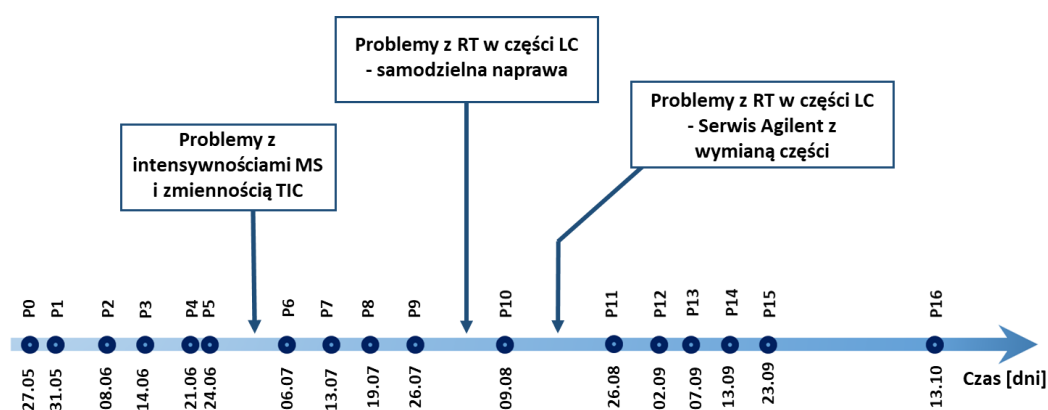
3.4.3. Analiza bioinformatyczna szlaków metabolicznych

Dla metabolitów opisanych w sposób ilościowy przeprowadzono analizę wzbogacenia szlaków metabolicznych przy pomocy dostępnego online, darmowego narzędzia MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/ModuleView.xhtml>, ostatni dostęp: 6.10.2023r.). Identyfikację zmian w ścieżkach wykonano dla porównań parami. Ponadto dla każdego porównania określono liczbę metabolitów istotnie różnicujących obrębie danego szlaku.

4. Wyniki

4.1. Wpływ stabilności układu pomiarowego na jakość otrzymanych danych

Analiza spektrometryczna płytki startowej (P0) oraz 16 płytek pomiarowych (od P1 do P16) przeprowadzona została w ciągu 141 dni (ok. 6 miesięcy). Utrzymanie jakości pomiarów na stałym poziomie w trakcie tak długiego i złożonego z ponad 1200 próbek eksperymentu stanowiło ogromne wyzwanie (Rysunek 12). Pomimo przeglądu i czyszczenia obu urządzeń wchodzących w skład układu pomiarowego (chromatograf cieczowy + spektrometr mas) przeprowadzonego przez autoryzowany serwis, w trakcie analiz napotkano szereg komplikacji.



Rysunek 12 Schemat obrazujący przebieg pomiarów w czasie wraz z doświadczonymi komplikacjami. P-płytką

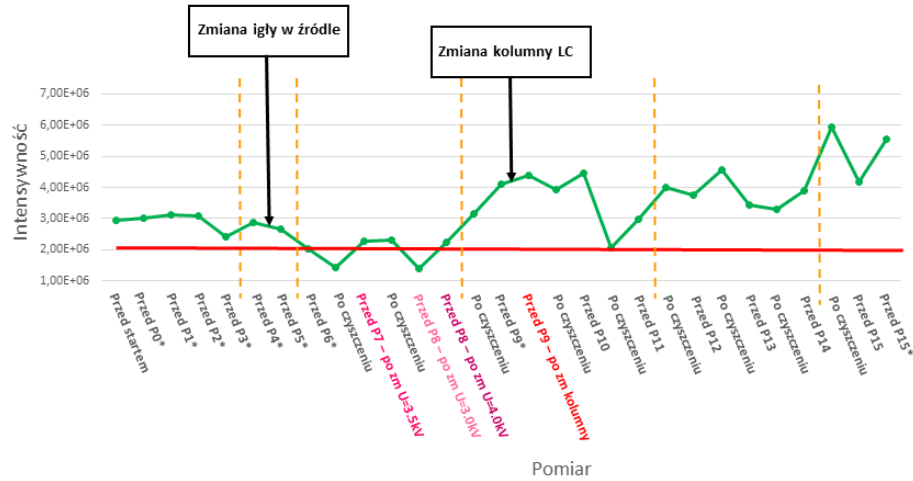
Podczas testu sprawności układu, wykonanego po czyszczeniu źródła jonów po skończonych analizach czwartej płytki pomiarowej wystąpił problem związany z brakiem stabilności rozpylania oraz niskiej intensywności jonu o m/z 428 (w części z bezpośrednim nastrzykiem), będącego jednym z kryteriów dopuszczających do startu przygotowania kolejnej z płytek. Pomimo intensywnego płukania 100% MeOH oraz 100% izopropanolem w dalszym ciągu obserwowano niestabilność aerozolu, w związku z czym wymieniono igłę w źródle jonów na nową. Wymiana ta pozytywnie wpłynęła na parametry aerozolu, powodując, że wszystkie kryteria podczas ponownie przeprowadzonego testu sprawności układu zostały spełnione (Rysunek 13), w skutek czego przystąpiono do przygotowania i analizy piątej płytki pomiarowej (P5). Niestety po wykonaniu pomiarów w ramach płytki P5 i standardowym czyszczeniu stożka wraz ze źródłem jonów, problemy związane z rozpylaniem oraz intensywnościami sygnałów powróciły (Rysunek 12 i Rysunek 13). W tej sytuacji przyspieszono (w porównaniu ze wcześniej opracowanym schematem) czyszczenie układu soczewek oraz wymianę na nową kapilary do transferu jonów, co pozwoliło na spełnienie

wymagań testowych i wznowienie analiz. Nie mniej jednak w trakcie pomiarów w obrębie płytek P7 i P8, zarówno w części dotyczącej aminokwasów i amin biogennych jak i lipidów, intensywność sygnałów od jonów obecnych w mieszaninie testowej nie osiągała minimalnych wartości pozwalających na ilościowe oznaczenia metabolitów. Mając pewność, że wykonano wszystkie możliwe czynności związane czyszczeniem układu, podjęto próbę zmiany parametrów rozpylania aerozolu (spray) poprzez zwiększenie napięcia. Zabieg ten pozwolił na poprawę czułości MS, jednocześnie zapewniając optymalne warunki rozpylania i jonizacji, co umożliwiło prowadzenie dalszych analiz. W przypadku pomiarów lipidów w ramach płytek P9-P16 napięcie zwiększano stopniowo przy każdej płytce.

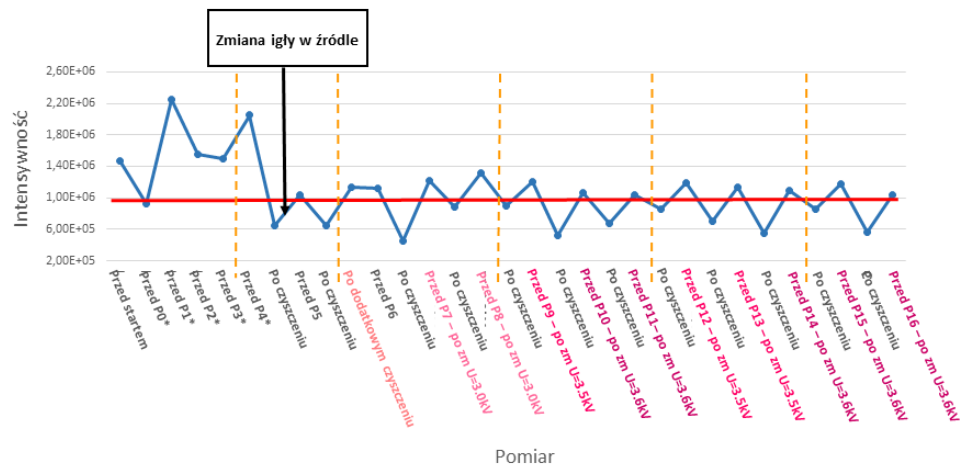
Innym rodzajem komplikacji spotkanej w trakcie pomiarów był dryf (zmiana) czasu retencji dla cząsteczek w obrębie pięciu kontroli jakości, obserwowany podczas rutynowego przeglądu pomiarów aminokwasów i amin biogennych w ramach płytki P9 (Rysunek 14). W związku z tym spostrzeżeniem przeprowadzono kontrolę sprawności pomp i miksera odpowiedzialnych za kontrolę gradientu stężenia ACN stanowiącego fazę ruchomą oraz ponowne odgazowanie i płukanie układu chromatograficznego. Ponadto sprawdzono i dokręcono wszelkie możliwe połączenia mogące stanowić przyczynę jakiegokolwiek nieszczelności. Jednakże wykonując test stabilności układu w dalszym ciągu obserwowano zmianę RT związków obecnych w mieszaninie. Mając na uwadze fakt, że przygotowaną płytkę LC należy przeanalizować w ciągu 48h, a także znając ilość próbek, które wcześniej zostały przepuszczone przez kolumnę chromatograficzną podjęto decyzję o wymianie jej na nową. Test wykonany po wymianie fazy stacjonarnej wykazał poprawne działanie układu, w skutek czego powtórzono oznaczenia z etapem rozdziału chromatograficznego dla płytki P9. Ponowne sprawdzenie czasów retencji metabolitów w obrębie pięciu kontroli jakości na płytce również nie ujawniło żadnych alarmujących fluktuacji. Niepokojące różnice w RT metabolitów ponownie zaobserwowano podczas testu sprawności układu po rutynowym czyszczeniu. Nieudane próby zlokalizowania przyczyny i samodzielnego rozwiązania problemu spowodowała wezwanie autoryzowanego serwisu chromatografu (po pomiarach płytki P10) i wymianę części, które uległy awarii (Rysunek 12).

Test stabilności układu

Część z rozdziałem chromatograficznym – aminokwasy i aminy biogenne
Jon: m/z 743



Część z bezpośrednim nastrzykiem – lipidy
Jon: m/z 428

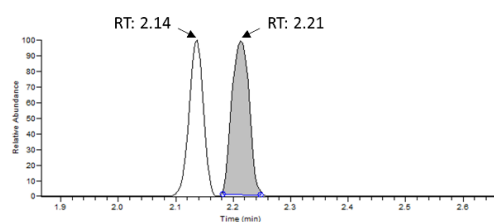


Oznaczenia:

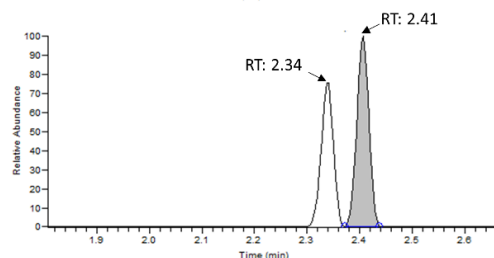
— m/z 428 — m/z 743 — Wartość progowa — Czyszczenie s-lens i zmiana kapilary

Rysunek 13 Test sprawności układu pomiarowego. Oddzielnie przedstawiono wykres dla jonu m/z 743 (z rozdziałem chromatograficznym; górna część) i jonu m/z 428 (z bezpośrednim nastrzykiem; dolna część). Test wykonany po czyszczeniu stożka i źródła jonów (w przypadku płytek P0 do P4 pomiar przed płytką był równoważny z pomiarem „po czyszczeniu”); test po dodatkowym czyszczeniu – test sprawności układu wykonany po przypieszonym (w porównaniu ze schematem czyszczenia) czyszczeniu s-lens i zmianie kapilary; „Po zm U” oznacza analizę mieszniny testowej przeprowadzoną po zmianie napięcia z 2.5kV na wyższe;

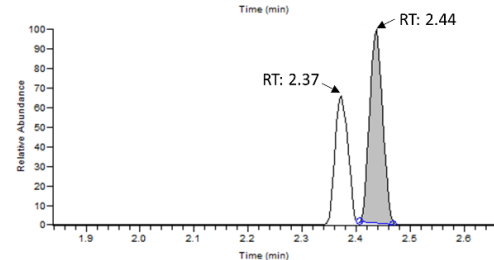
D7-ADMA i D6-SDMA (m/z 344)



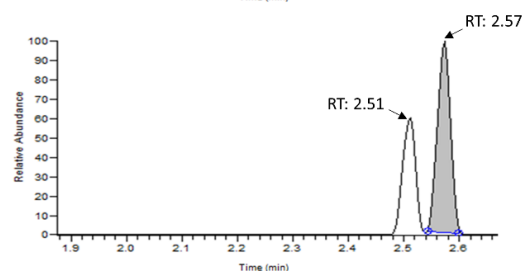
P8 QC - dołek 96



P9 QC- dołek 50



P9 QC- dołek 79



P9 QC- dołek 96

Rysunek 14 Dryf czasu retencji na przykładzie standardu wewnętrznego dla ADMA (pierwszy pik, z białym polem pod krzywą) i SDMA (drugi pik, z szarym polem pod krzywą), obserwowany podczas rutynowego przeglądu pomiarów aminokwasów i amin biogennych w ramach płytki P9. Na rysunku pokazano również chromatogram dla tego samego związku badanego na płycie P8. D7-ADMA- Asymetryczna dimetyloarginina znakowana deuterem (ang. deuterium labeled asymmetric dimethylarginine); D6-SDMA - Symetryczna dimetyloarginina znakowana deuterem (ang. deuterium labeled symmetric dimethylarginine); QC- kontrola jakości; RT- czas retencji

Dla związków, dla których liczba wartości brakujących nie przekraczała 50% obliczono i wyrysowano wartości procentowe współczynnika zmienności (CV) pomiarów QC definiowany wzorem:

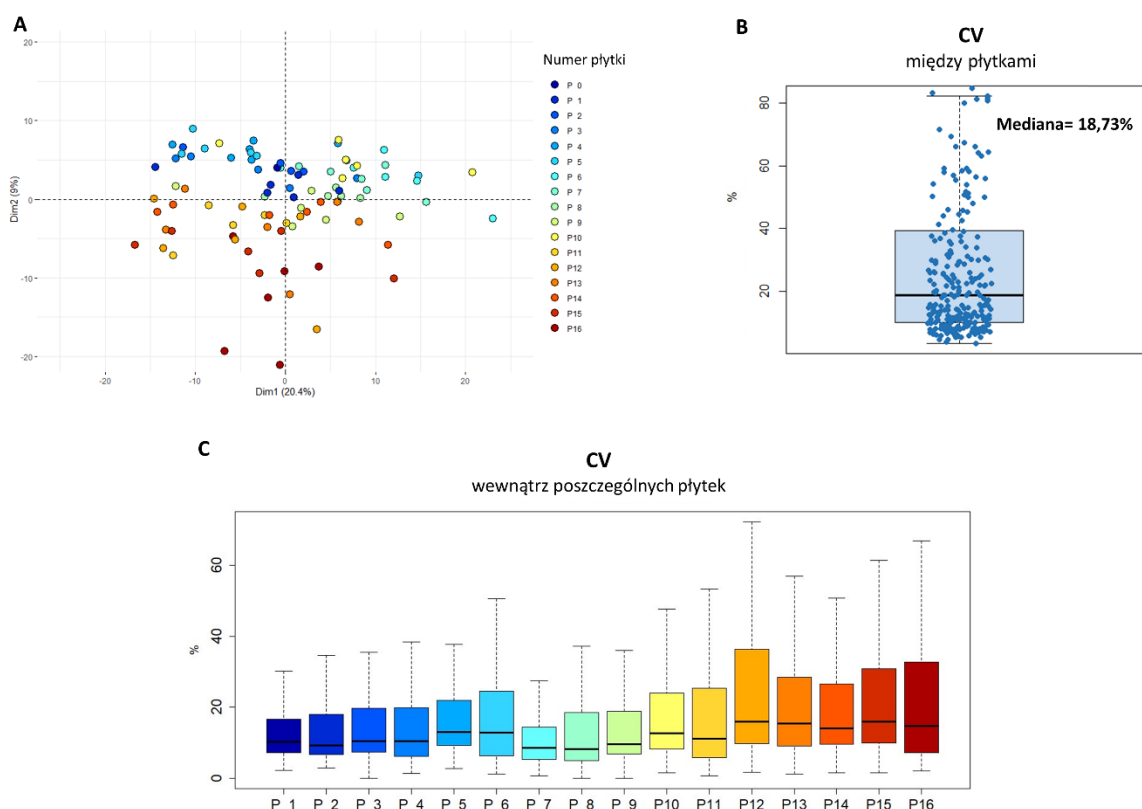
$$CV = \frac{\text{średnia arytmetyczna}}{\text{odchylenie standardowe}} * 100\%$$

Parametr ten jest powszechnie stosowany w badaniach metabolomicznych do oceny stabilności metody. Analizę przeprowadzono w dwóch ujęciach:

- dla powtórzeń QC w obrębie każdej płytki pomiarowej osobno (ang. *intra-batch*) (Rysunek 15C)

- dla powtórzeń QC w obrębie wszystkich 16 płytek łącznie (*ang. inter-batch*) (Rysunek 15B).

Rozpatrując uzyskane wartości współczynnika zmienności wewnątrz poszczególnych płytek obserwowano, że CV dla 44-75% metabolitów mieścił się w granicy 15% (tj. charakteryzowały się bardzo dobrą powtarzalnością, zgodnie z obecnymi zaleceniami amerykańskiej Agencji Żywności i Leków (Food and Drug Administration, 2022)), a mediana tego współczynnika mieściła się w zakresie 8-16%. Ponadto w wyniku obliczeń wykonanych dla wszystkich płytek, mediana całkowitego CV między płytkami wynosiła dla wszystkich próbek QC 18,73%.



Rysunek 15 (A) Analiza głównych składowych (PCA) ogólnych podobieństw między próbkami kontroli jakości w obrębie 17 płytek. Wykres przedstawia 2 serie danych umieszczone w układzie współrzędnych wyznaczonych przez 2 główne składowe: oddzielnie zaznaczono próbki kontroli jakości analizowanych w ramach różnych płytek pomiarowych. (B) Współczynnik zmienności dla metabolitów obecnych w mieszaninach służących do kontroli jakości pomiarów obliczony dla QC w obrębie wszystkich płytek pomiarowych. (C) Współczynnik zmienności dla metabolitów obecnych w mieszaninach służących do kontroli jakości pomiarów obliczony dla QC w obrębie każdej płytek pomiarowej osobno.

Pomimo wszystkich czynności stabilizujących pomiar wskazanych w rozdziale 3.3, surowe wyniki pomiarów wskazywały na istnienie efektu paczki – co uwiadacza PCA przedstawiony na Rysunku 11A oraz obliczony współczynnik zmienności dla kontroli jakości. W związku z tym zdecydowano o uwzględnieniu w procedurze obróbki danych korektę efektu paczki. Wynik korekty efektu paczki został przedstawiony na Rysunku 11B. Tak skorygowany zestaw danych,

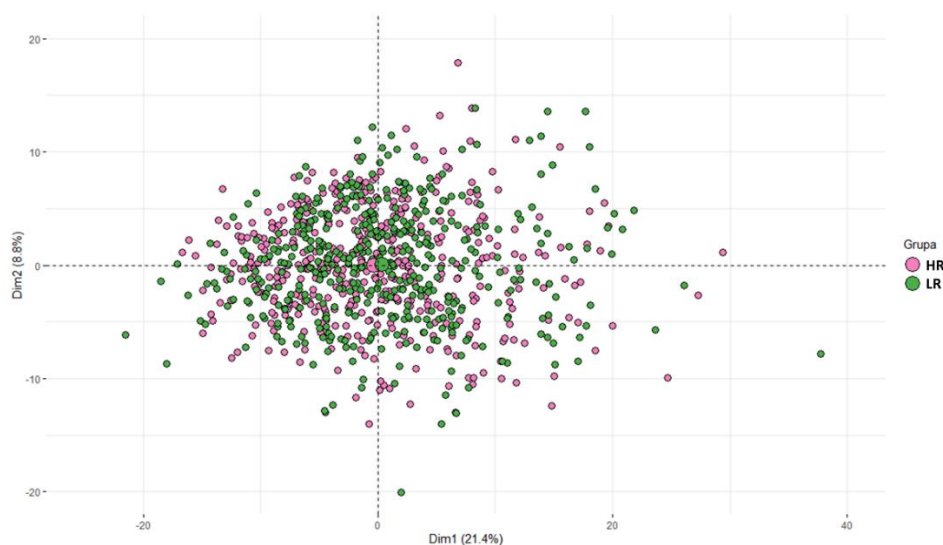
po uzupełnieniu danych brakujących (Rysunek 11C) został wykorzystany w analizach, których wyniki przedstawione są w dalszej części pracy.

4.2. Identyfikacja cech metabolomu surowicy mających związek z ryzykiem raka piersi

4.2.1. Identyfikacja metabolitów, których stężenie w surowicy różni się u osób, które rozwinęły nowotwór (HR, high risk) i osób, które pozostały zdrowe w okresie obserwacji (LR, low risk)

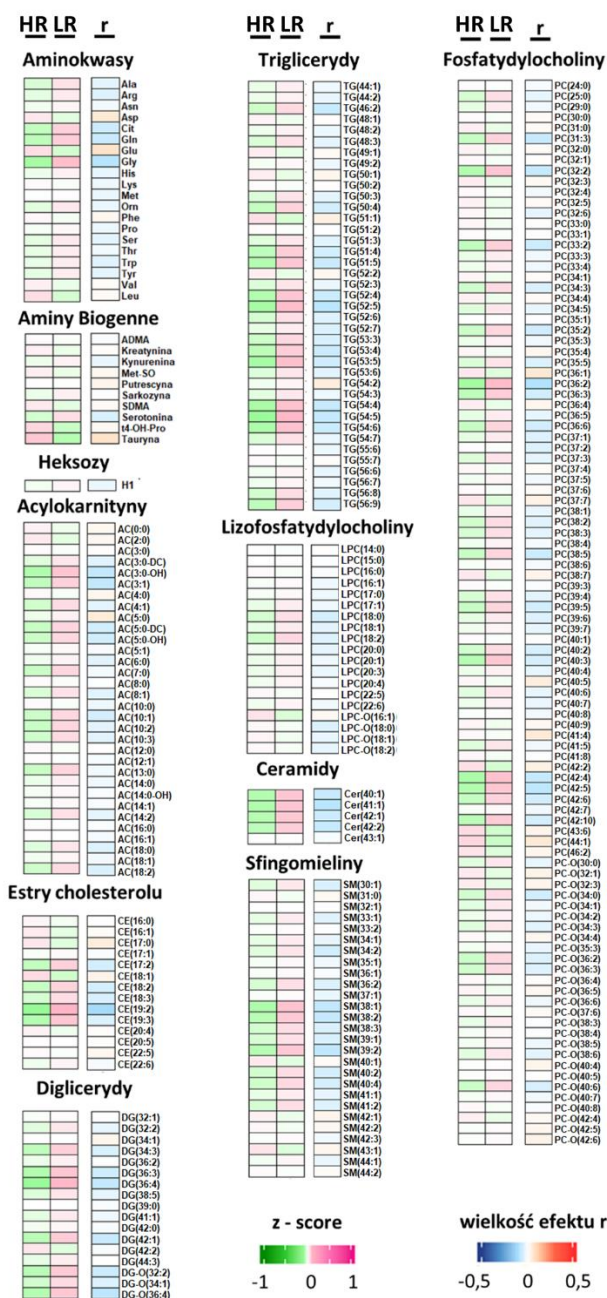
Przy użyciu techniki spektrometrii mas w 906 próbkach surowicy pobranych w ramach badania populacyjnego HUNT2 wykryto 389 metabolitów. Po przyjęciu kryteriów dotyczących wartości brakujących w obecnych danych (patrz rozdział 3.3.1) 284 związki wykorzystano w analizach ilościowych. Zbiór ten zawierał wartości stężeń dla 30 aminokwasów i amin biogennych, heksoz, 32 acylokarnityn, 14 estrów cholesterolu, 56 glicerydów, 119 glicerofosfolipidów, 32 sfingolipidów.

Nienadzorowana analiza głównych składowych wszystkich próbek (Rysunek 16) wykazała dużą niejednorodność oraz brak wyraźnie widocznych skupisk zgodnych z grupą dotyczącą diagnozy w trakcie obserwacji (HR i LR). Pierwsza główna składowa (PC1) odpowiadała za 21% całkowitej wariancji, a zmiennymi, które najbardziej z nią korelowały były SM(41:1) oraz TG(51:2).



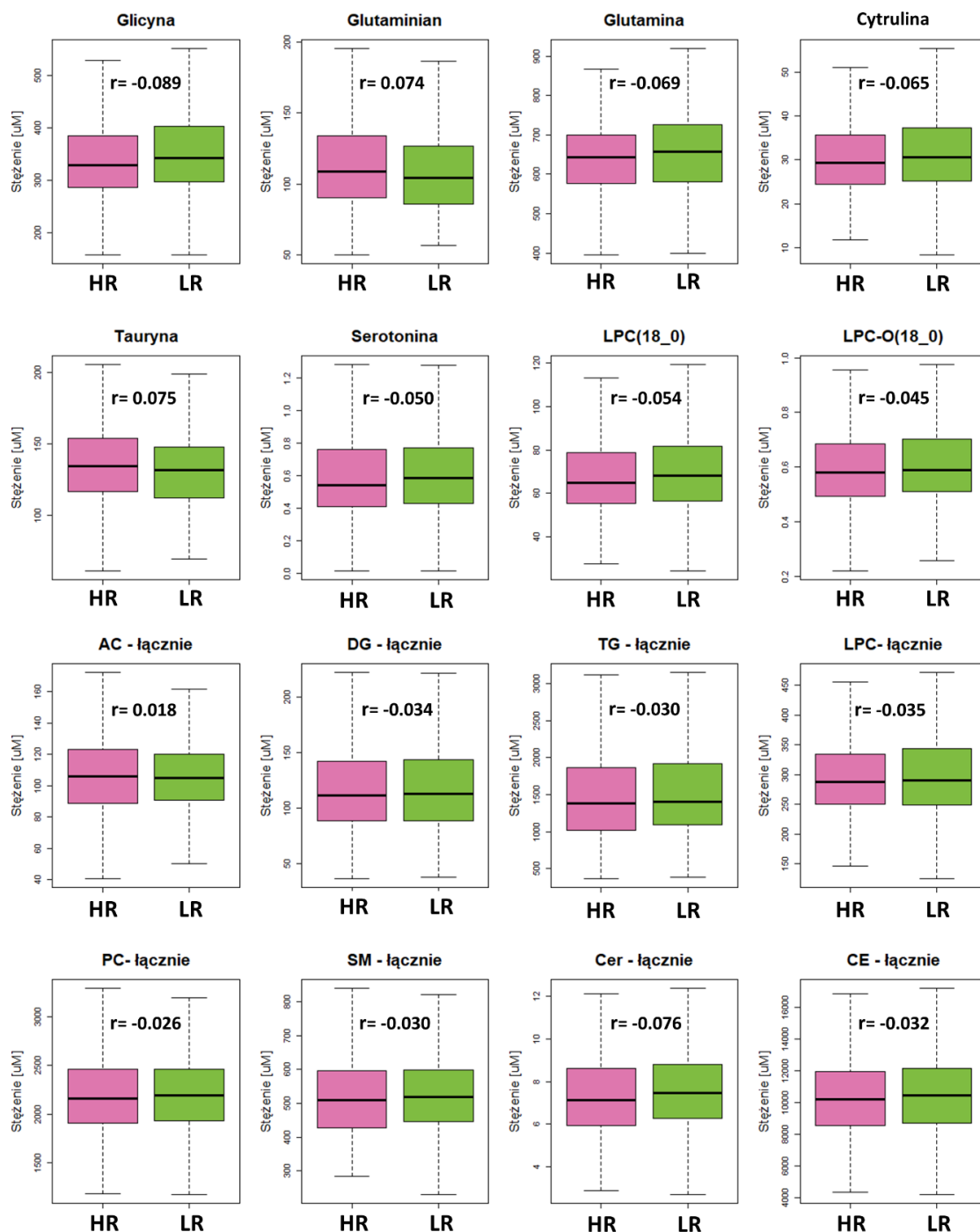
Rysunek 16 Analiza głównych składowych (PCA) ogólnych podobieństw między próbkami. Wykres przedstawia 2 serie danych umieszczone w układzie współrzędnych wyznaczonych przez 2 główne składowe: oddzielnie zaznaczono próbki kobiet, u których w okresie obserwacji zdiagnozowano rak piersi (HR), lub które pozostały wolne od raka (LR) (duże koła oznaczają średnią dla każdej grupy).

Porównanie poziomów poszczególnych metabolitów przy użyciu testów statystycznych w próbkach surowicy od 453 kobiet ze zdiagnozowanym BC podczas obserwacji (HR) i 453 kobiet, które pozostały wolne od choroby w tym czasie (LR) nie wykazała istotnych statystycznie różnic. Obliczenia miar siły efektu również wskazały na znikome różnice w stężeniach metabolitów pomiędzy obiema grupami. Średnie stężenia oznaczonych ilościowo związków oraz siły różnic między porównywanymi grupami przedstawiono w formie mapy ciepła na Rysunku 17.



Rysunek 17 Poziomy metabolitów w pre-diagnostycznych próbkach surowicy kobiet, u których zdiagnozowano raka piersi podczas 15-letniej obserwacji (HR) i oraz kobiet, które pozostały wolne od raka w tym czasie (LR). Mapa ciepła przedstawia średnie poziomy analizowanych metabolitów w każdej grupie (reprezentowane jako z-score) oraz istotność różnic między grupami (reprezentowane jako wielkość efektu „r”)

Spoglądając na rozkład danych dla poszczególnych związków lub ich grup (mediany, kwartyle, wartości minimalne i maksymalne), podobnie jak w przypadku analizy wielkości efektu, zaobserwowano znikome różnice pomiędzy porównywanymi grupami kobiet. Przykładowe wykresy pudełkowe otrzymane podczas analiz umieszczono na Rysunku 18.



Rysunek 18 Stężenia wybranych metabolitów (glicyna - Gly; glutaminian - Glu, glutamina - Gln, cytrulina - Cit, tauryna, serotonina i lizofosfatydylocholiny: LPC(18:0) i LPC-O(18:0)) oraz zagregowanego stężenia związków należących do określonej klasy lipidów w grupie HR i grupie LR; istotność różnic między grupami pokazano jako wielkość efektu „r”; AC-acylokarbony; DG- diglicerydy; TG- triglicerydy; LPC- lizofosfatydylocholiny; PC- fosfatydylocholiny; SM- sfingomieliny; Cer- ceramidy; CE- estry cholesterolu

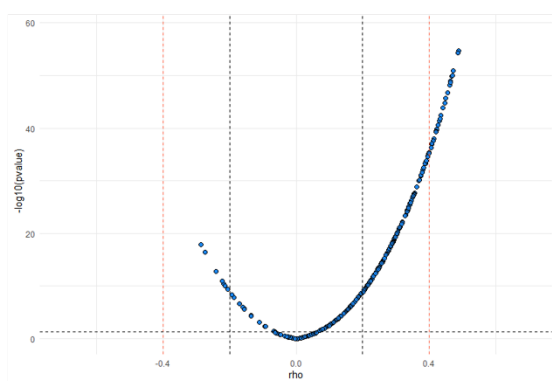
Dla pozostałych 105 metabolitów nie zakwalifikowanych do analizy ilościowej zbadano czy status obecności lub jej braku jest zależny od grup dotyczących diagnozy w trakcie obserwacji (HR i LR). Wykazano brak istnienia takiej zależności w przypadku któregośkolwiek z badanych metabolitów. Wyniki dołączono w formie tabeli wraz z pozostałymi plikami na płycie CD dołączonej do dysertacji.

4.2.2. Określenie wpływu wieku na stężenie metabolitów we krwi uczestniczek

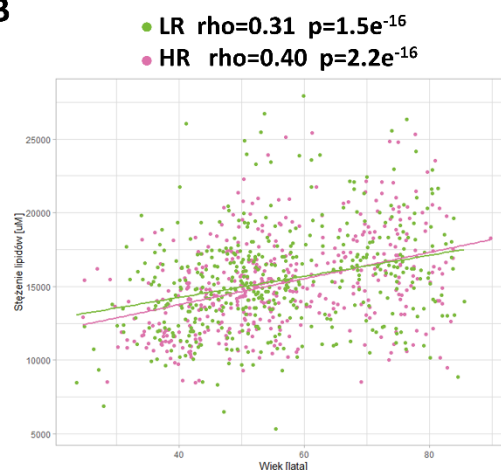
Szukając przyczyny dużej heterogenności materiału, który skutkował brakiem widocznych różnic w porównaniu grup dotyczących diagnozy nowotworu w trakcie obserwacji (HR vs. LR), sprawdzono czy możliwe czynniki oddziałujące na metabolom mogą wywierać wpływ na zmiany stężeń metabolitów w takim stopniu, aby obraz zmian związany z ryzykiem nowotworu został zaciemniony.

Jednym z czynników, dla którego zauważono silną korelację ze stężeniem analizowanych cząsteczek był wiek uczestniczek badania, niezależnie od przynależności do grupy HR lub LR (Rysunek 19A). Przykładem takiej zależności jest wzrost zagregowanego poziomu lipidów w surowicy wraz ze wzrostem wieku uczestniczek badania HUNT2 (Rysunek 19B). Co ciekawe analizując rezultaty uzyskane dla zagregowanych stężeń poszczególnych klas lipidów spostrzeżono, że jedynie łączne stężenie lizofosfatydylocholin (LPC) nie wykazywało korelacji z wiekiem kobiet.

A

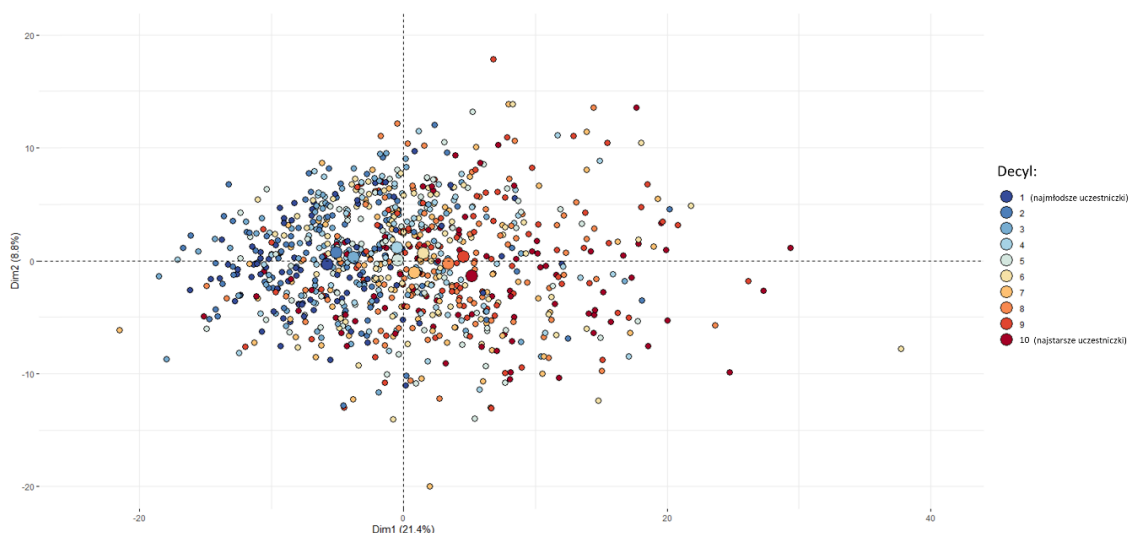


B



Rysunek 19 Korelacja pomiędzy wiekiem uczestniczek badania HUNT2 a stężenia metabolitów w surowicy. **(A)** istotność korelacji między stężeniami każdego z metabolitów a wiekiem w momencie badania (wszystkie uczestniczki łącznie). **(B)** korelacja między zagregowanym stężeniem stężenia wszystkich analizowanych związków lipidowych a wiekiem uczestniczek badania (osobno zaznaczono grupy HR i LR). Na obu panelach przedstawiono wartość współczynnika korelacji rho oraz istotność statystyczną (wartość p).

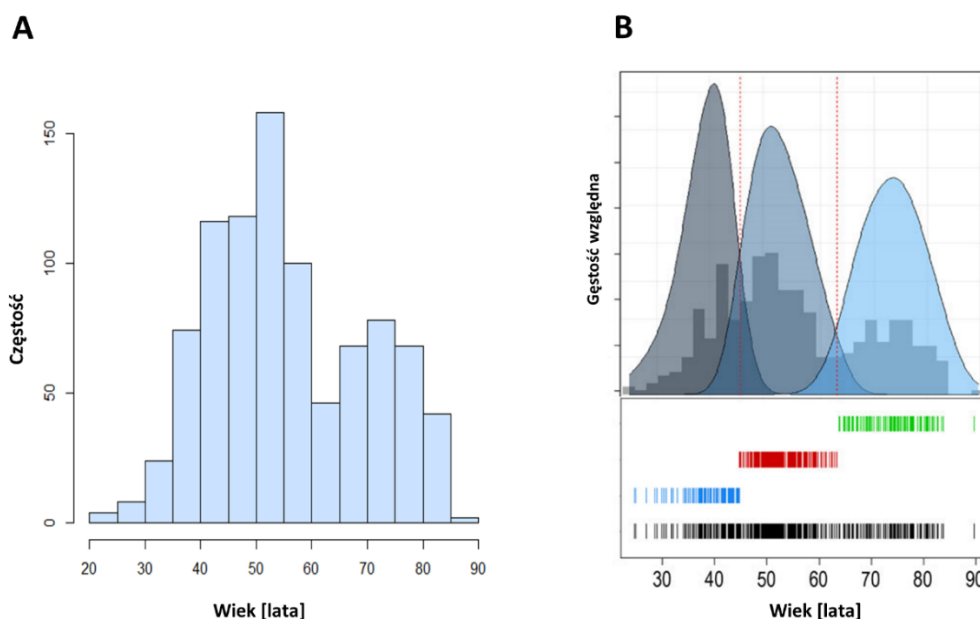
Po wykryciu omówionej wyżej korelacji ponownie przeprowadzono analizę głównych składowych dla wszystkich próbek, dzieląc je na decyle według wieku uczestniczek (Rysunek 20). W rezultacie zauważono systematyczne przesunięcie podgrup w prawą stronę wykresu PCA wraz ze zwiększającym się wiekiem kobiet.



Rysunek 20 Analiza głównych składowych (PCA) ogólnych podobieństw między próbkami surowicy pochodzącymi od uczestniczek badania HUNT2 w różnym wieku. Wykres przedstawia 10 serii danych umieszczonych w układzie współrzędnych wyznaczonych przez 2 główne składowe: oddzielnie zaznaczono kolejne decyle wieku uczestniczek badania (duże koła oznaczają średnią dla każdej grupy).

Mając na uwadze otrzymane wyniki stwierdzono, że poszukiwanie czynników związanych z ryzykiem BC należy przeprowadzić w podgrupach charakteryzujących się mniejszym rozrzutem wieku. Na podstawie wyrysowanego histogramu wieku uczestniczek badania oraz braku informacji o rzeczywistym statusie menopauzy (również istotnym czynnikiem oddziałującym na metabolom u kobiet) u większości z nich, zdecydowano się wyróżnić trzy podgrupy wiekowe: „młodsze niż przeciętne”, „przeciętne/w średnim wieku” i „starsze niż przeciętne”. Do wyznaczenia wartości granicznych wieku dla każdej z nich wykorzystano model mieszaniny Gaussa, gdzie dane wejściowe stanowił rzeczywisty rozkładu wieku w kohorcie badawczej (Rysunek 21). Jako elementy mieszaniny zidentyfikowano trzy podgrupy:

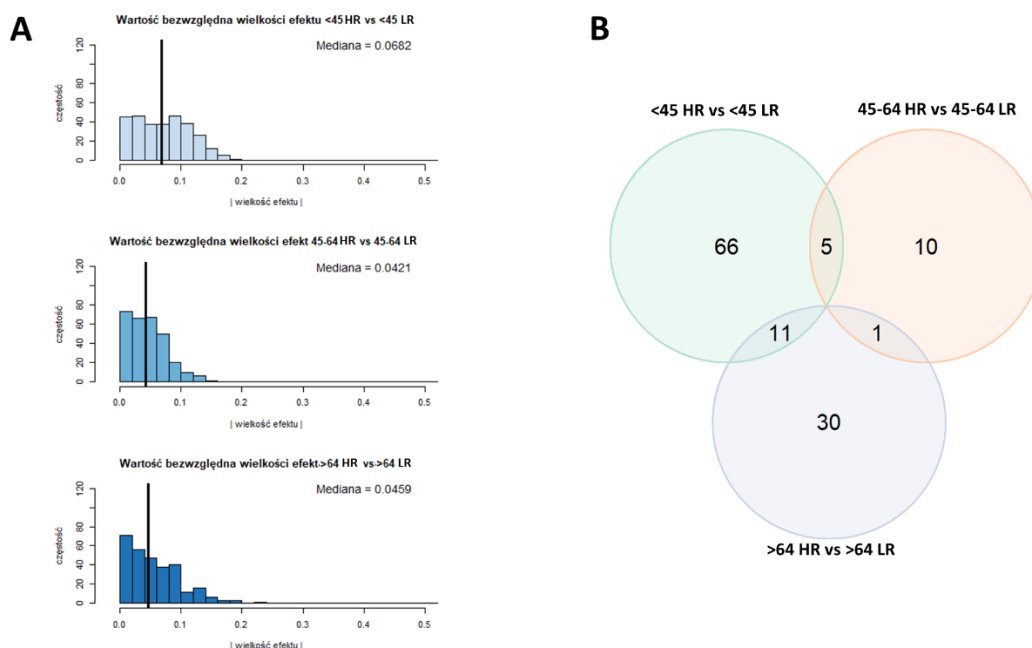
- kobiety poniżej 45 roku życia (112 par HR/LR),
- kobiety w wieku 45–64 lat (206 par HR/LR),
- kobiety powyżej 64 roku życia (135 par HR/LR).



Rysunek 21 (A) Rozkład wieku uczestniczek badania HUNT2 wybranych do analizy metabolomu (wszystkie uczestniczki razem); (B) Rozkład wieku uczestniczek badania HUNT2 wraz z zaznaczonymi składowymi modelu mieszaniny Gaussa, na podstawie których wyodrębniono trzy podgrupy: <45 lat, 45-64 lata, i >64 lat (dolna część).

Informacja o statusie menopauzy była niedostępna dla większości uczestniczek badania HUNT2, jednak przeciętny wiek menopauzalny w populacji Norweskiej to 49 lat. Dlatego w przypadku trzech zidentyfikowanych podgrup należy uznać, że podgrupa najmłodsza to kobiety przed menopauzą, podgrupa najstarsza to kobiety po menopauzie, zaś w grupie pośredniej obecne są kobiety o różnym statusie menopauzy.

Po powyższym podziale wykonano powtórny analizę różnic pomiędzy przypadkami ze zdiagnozowanym BC (HR) oraz dopasowanymi grupami kontrolnymi (LR). W rezultacie znaleziono 123 związki, dla których wielkość efektu była wyższa niż znikoma ($|r| \geq 0,1$) w co najmniej jednej podgrupie wiekowej (tabela zawierająca porównania dla wszystkich związków załączona na płycie CD). Największą liczbę różnic w stężeniach związków odnotowano w przypadku kobiet poniżej 45 r.ż., dla których $|r| \geq 0,1$ obserwowano dla 82 cząsteczek (z czego aż 66 tworzyło unikalny zbiór dla tego przedziału wiekowego) a mediana siły efektu wynosiła 0,0682. Z kolei w zbiorze par pomiędzy 45 a 64 r.ż. tylko 16 związków wykazywało różnice o takiej wielkości efektu (10 metabolitów unikalnych, mediana $|r| = 0,0421$), a grupa starszych niż przeciętnie uczestniczek charakteryzowała się $|r| \geq 0,1$ dla 42 związków (z czego 30 unikalnych) i medianą $|r|$ na poziomie 0,0459 (Rysunek 22).



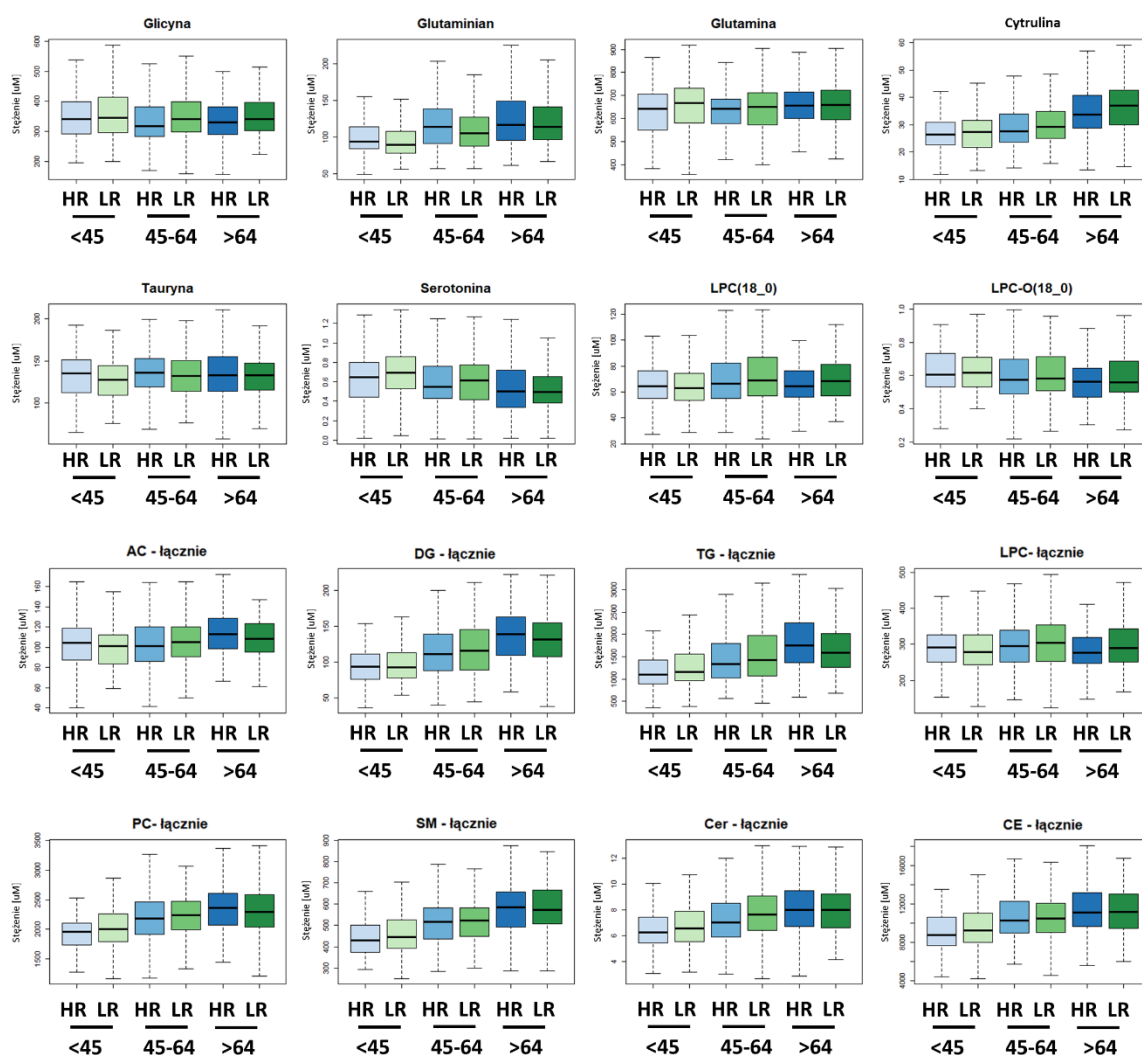
Rysunek 22 (A) Histogramy dystrybucji metabolitów uszeregowanych wg. zwiększającej się istotności różnic (wielkości efektu r) między grupami HR i LR w trzech podgrupach wiekowych uczestniczek (tj.: <45, 45-64, >64 lat); pionowe linie przedstawiają medianę wartości r w danej podgrupie wiekowej. (B) Diagram Venna ilustrujący liczbę metabolitów różnicujących grupę HR i LR, w poszczególnych grupach wiekowych; uwzględniono związki, dla których różnice wykazywały większą niż znikoma wielkość efektu.

Analiza różnic w stężeniu aminokwasów pomiędzy przypadkami HR i LR wykazała różne wzory w poszczególnych grupach wiekowych. 13 aminokwasów wykazało wzrost stężenia wraz z wiekiem. Poziom sześciu z nich (m.in.: cytruliny) wzrastał u pań ze zwiększonym ryzykiem (HR) niezależnie od podgrupy wiekowej, w przeciwieństwie do kwasu glutaminowego i asparaginy, dla których zaobserwowano spadek stężenia. W przypadku 7 pozostałych aminokwasów, wykazujących tendencję spadkową wraz z wzrostem wieku uczestniczek, stężenie trzech z nich (m.in. Gly) ulegało obniżeniu u pań zaliczanych do grupy HR, bez względu na przedział wiekowy. Ponadto u kobiet przeciętnie młodszych obserwowano niższy poziom większości amin biogennych (w przeciwieństwie do pań po 64 r.ż.). Jedynie w przypadku serotoniny zauważono spadek stężenia wraz ze zwiększonym ryzykiem BC w najstarszej grupie wiekowej.

Analiza zagregowanego stężenia głównych klas lipidów, za wyjątkiem lizofosfatydylocholin (LPC), wykazała wzrost ich poziomu wraz ze wzrostem wieku uczestniczek badania. Podczas analizy różnic wykonanej dla kobiet z grupy HR i LR, przeprowadzonej odpowiednio dla poszczególnych podgrup wiekowych nie zaobserwowano jednego wzoru/ trendu zmian wśród związków lipidowych. Co jednak ciekawe, w grupie pań po 64 r.ż. zauważono najniższe stężenie LPC, a istotność różnicy pomiędzy porównywanymi

przypadkami HR i dopasowaną grupą LR była największa wśród analizowanych 3 podgrup wiekowych ($|r| \geq 0,1$). Ponadto, po obliczeniu stosunku PC do LPC (o znaczeniu coraz szerzej badanym w chorobach związanych ze stanem zapalnym) wykazano jego wzrost z wiekiem.

Wykresy obrazujące stężenie wybranych metabolitów w grupie HR i grupie LR w trzech podgrupach wiekowych uczestniczek umieszczono na Rysunku 23. Z kolei wartości obliczonej wielkości efektu oraz ich interpretację dla poszczególnych związków lub ich grup zamieszczono w Tabeli 7.



Rysunek 23 Stężenia wybranych metabolitów (glicyna - Gly; glutaminian - Glu, glutamina - Gln, cytrulina - Cit, tauryna, serotonina i lizofosfatydylocholino LPC(18:0) i LPC-O(18:0)) oraz zagregowane stężenia związków należącej do określonej klasy lipidów w grupie HR i grupie LR w trzech podgrupach wiekowych uczestniczek; istotność różnic (wartość r) przedstawiono w Tabeli 7. AC-acylokarnityny; DG- diglicerydy; TG- triglicerydy; LPC- lizofosfatydylocholino; PC- fosfatydylocholino; SM-sfingomieliny; Cer- ceramidy; CE- estry cholesterolu

Tabela 7 Wielkość efektu i jego interpretacja dla wybranych metabolitów (glicyny, glutaminianu, glutaminy, cytruliny, tauryny, serotoniny i lizofosfatydylocholin: LPC(18:0) i LPC-O(18:0)) oraz zagregowane stężenia związków należące do określonej klasy lipidów w grupie HR i grupie LR w trzech podgrupach wiekowych uczestniczek.

Metabolit	Różnice pomiędzy HR i LR w grupie do 45 lat		Różnice pomiędzy HR i LR w grupie 45-64 lat		Różnice pomiędzy HR i LR w grupie powyżej 64 lat	
	wielkość efektu	interpretacja	wielkość efektu	interpretacja	wielkość efektu	interpretacja
Glicyna	-0,044	znikomy	-0,118	mały	-0,080	znikomy
Glutaminian	0,120	mały	0,108	mały	0,020	znikomy
Glutamina	-0,159	mały	-0,053	znikomy	-0,011	znikomy
Cytrulina	-0,034	znikomy	-0,069	znikomy	-0,096	znikomy
Tauryna	0,130	mały	0,063	znikomy	0,043	znikomy
Serotonina	-0,103	mały	-0,050	znikomy	-0,019	znikomy
LPC(18:0)	0,048	znikomy	-0,076	znikomy	-0,100	mały
LPC-O(18:0)	0,023	znikomy	-0,057	znikomy	-0,074	znikomy
AC - łącznie	0,066	znikomy	-0,052	znikomy	0,098	znikomy
DG - łącznie	-0,047	znikomy	-0,078	znikomy	0,071	znikomy
TG - łącznie	-0,097	znikomy	-0,075	znikomy	0,114	mały
LPC - łącznie	0,053	znikomy	-0,038	znikomy	-0,103	mały
PC - łącznie	-0,113	mały	-0,028	znikomy	0,051	znikomy
SM - łącznie	-0,089	znikomy	-0,006	znikomy	-0,016	znikomy
Cer - łącznie	-0,094	znikomy	-0,130	mały	0,023	znikomy
CE - łącznie	-0,090	znikomy	-0,024	znikomy	-0,010	znikomy

AC-acylokarnityny; DG- diglicerydy; TG- triglicerydy; LPC- lizofosfatydylocholin; PC- fosfatydylocholin; SM- sfingomieliny; Cer- ceramidy; CE- estry cholesterolu

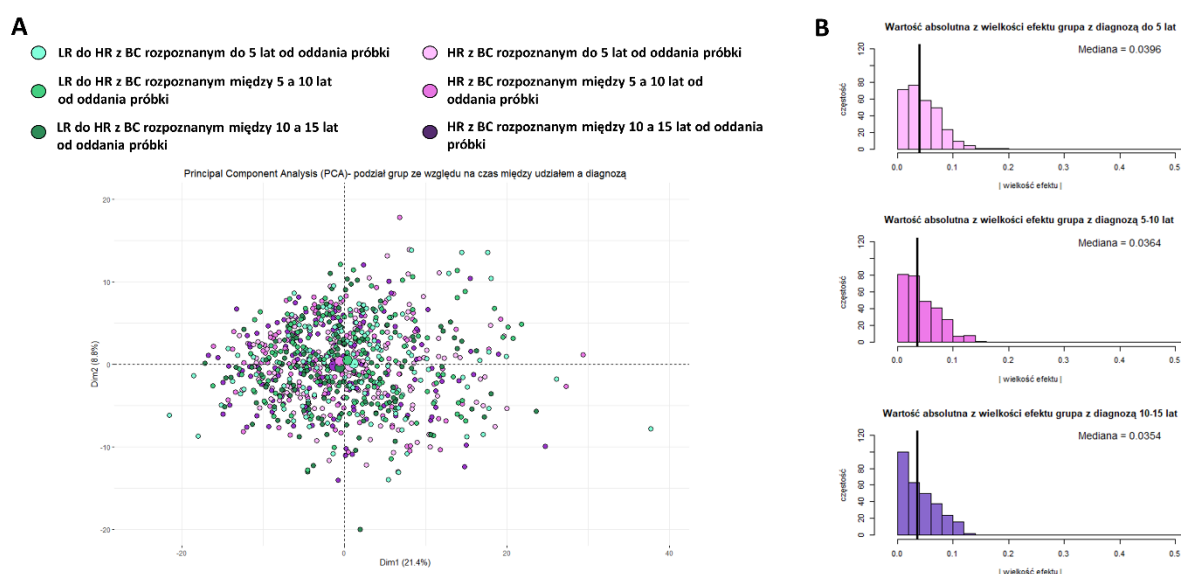
4.2.3. Identyfikacja metabolitów odróżniających podgrupy osób w różnym wieku, które rozwinęły nowotwór w różnym czasie od pobrania materiału

Głównym kryterium doboru uczestniczek do niniejszego badania było zapewnienie równomiernego rozkładu liczebności podgrup kobiet, u których zdiagnozowano BC w różnych odstępach czasu po pobraniu próbki oraz dopasowanych do nich wolnych od nowotworu piersi kontroli (tj. grupy HR i LR). Wybór ten miał na celu sprawdzenie, czy istnieje zależność pomiędzy czasem rozpoznania raka, a różnicami obserwowanymi pomiędzy grupami HR i LR. W związku z tym, w kolejnym etapie wykonano analizę w następujących podgrupach:

- kobiety, u których rak piersi został zdiagnozowany w trakcie 5 lat obserwacji („wczesna” diagnoza),
- kobiety, u których rak piersi został zdiagnozowany podczas obserwacji trwającej od 5 do 10 lat,

- kobiety, u których rak piersi został zdiagnozowany w okresie od 10 do 15 lat obserwacji („późna” diagnoza).

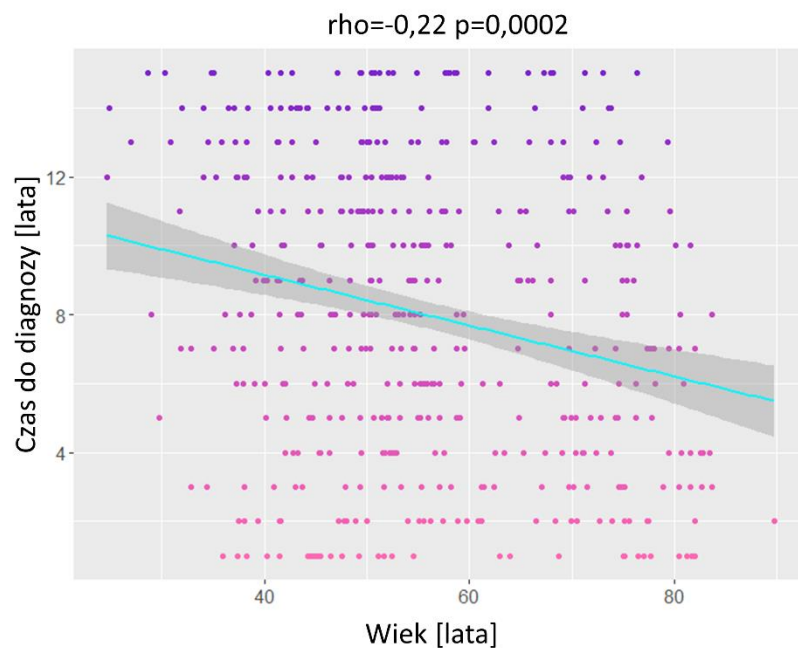
Podobnie jak w przypadku analizy ogólnych grup (tj. HR i LR bez podziału na mniejsze podzbiory) nienadzorowana analiza głównych składowych (Rysunek 24A) wykazała dużą niejednorodność oraz brak wyraźnie widocznych skupisk zgodnych z grupą dotyczącą czasu jaki upłynął pomiędzy oddaniem próbki a rozpoznaniem nowotworu (w przypadku HR) i dopasowanych kontroli wolnych od nowotworu (LR). Pierwsza główna składowa (PC1) odpowiadała za 21% całkowitej wariancji, a zmiennymi, które najbardziej z nią korelowały były SM(41:1) i TG(51:2).



Rysunek 24 (A) Analiza głównych składowych (PCA) ogólnych podobieństw między próbkami surowicy pochodzącymi od uczestniczek badania HUNT2, u których nowotwór zdiagnozowano w różnym czasie od momentu udziału w badaniu (grupa HR) oraz odpowiednich próbek kontrolnych (LR). Wykres przedstawia 6 serii danych umieszczonych w układzie współrzędnych wyznaczonych przez 2 główne składowe: oddzielnie zaznaczono uczestniczki badania z rakiem piersi zdiagnozowanym w okresie do 5, do 10 lub do 15 lat obserwacji oraz dopasowane kontrole wolne od raka (duże koła oznaczają średnią dla każdej grupy). (B) Histogramy dystrybucji metabolitów uszeregowanych wg. zwiększającej się istotności różnic (wielkość efektu r) między grupami HR i LR w trzech podgrupach różniących się czasem do rozpoznania raka w okresie (do 5 lat, 5 do 10 lat, 10 do 15 lat obserwacji).

W ramach porównania znaleziono 48 związków, dla których wielkość efektu była wyższa niż znikoma ($|r| \geq 0,1$) co najmniej w jednym podzbiory związanym z czasem do diagnozy: 16 metabolitów dla grupy do 5 lat (mediana $|r| = 0,0396$), 17 metabolitów w grupie 5-10 lat (mediana $|r| = 0,0364$) oraz 18 metabolitów w grupie par z późną diagnozą (mediana $|r| = 0,0354$; Rysunek 24B). Ze wszystkich 48 związków jedynie 3 metabolity CE(19:2), PC(42:4), PC(42:5) były wspólne dla porównań skrajnych grup związanych z diagnozą tj. dla par z wczesną i późną diagnozą.

Ponadto zaobserwowano ujemną korelację pomiędzy wiekiem uczestniczek w momencie pobrania próbki a czasem do rozpoznania u nich nowotworu (Rysunek 25). Oznacza to, że młodsze uczestniczki badania przeważnie usłyszały diagnozę po dłuższym czasie obserwacji niż panie, których wiek w momencie pobrania próbki był wyższy. To spostrzeżenie, pozwoliło na podjęcie decyzji o oddzielnym poszukiwaniu hipotetycznych różnic pomiędzy przypadkami „wczesnie” i „późno” zdiagnozowanymi w podgrupach określonych na podstawie wieku. Analizy zawężono do dwóch, skrajnych grup wiekowych (<45 lat i >64 lat) (Rysunek 26A).



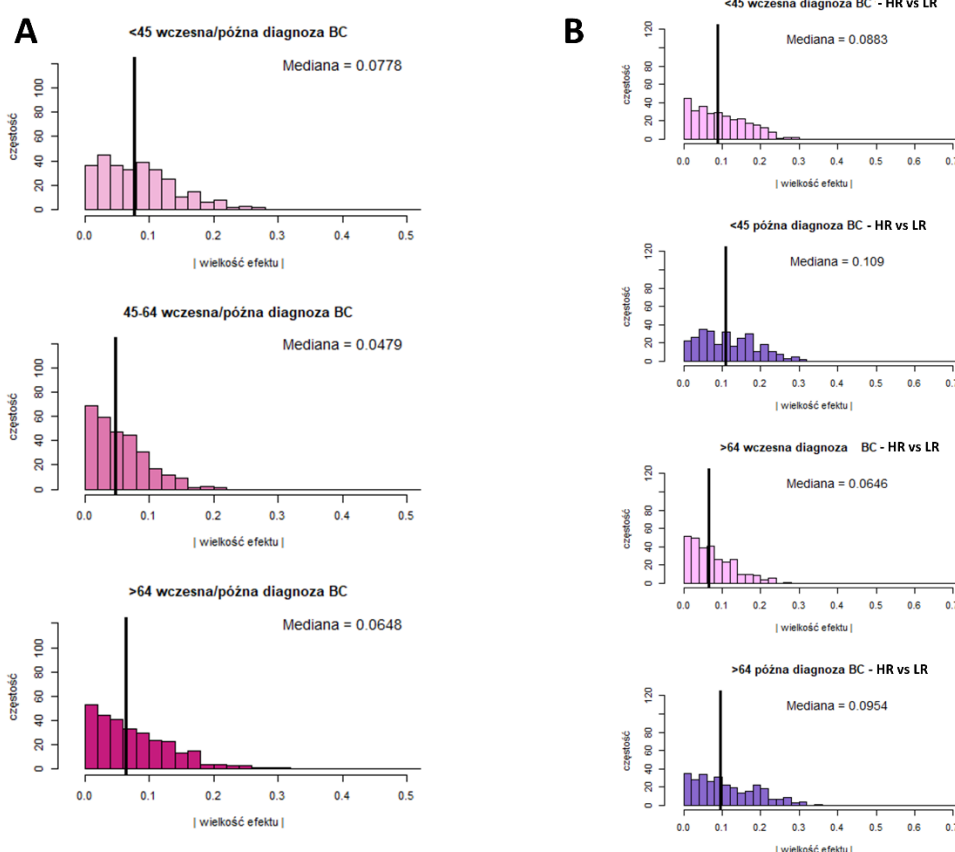
Rysunek 25 Korelacja między wiekiem uczestniczek w momencie pobrania próbki a czasem do rozpoznania raka piersi (czas między pobraniem próbki a diagnozą) w grupie HR; przedstawiono wartość współczynnika korelacji rho oraz istotność statystyczną (wartość p).

Chcąc znaleźć cząsteczki charakterystyczne dla HR, w kolejnym kroku porównano profile metaboliczne uzyskane dla kobiet z grup HR i LR w obrębie zdefiniowanych 4 podgrup:

- kobiety poniżej 45 r.ż., z nowotworem zdiagnozowanym do 5 lat od startu badania;
- kobiety poniżej 45 r.ż., z nowotworem zdiagnozowanym ponad 10 lat od startu badania;
- kobiety powyżej 64 r.ż., z nowotworem zdiagnozowanym do 5 lat od startu badania;
- kobiety powyżej 64 r.ż., z nowotworem zdiagnozowanym ponad 10 lat od startu badania.

W każdym przypadku do kobiet z grupy HR wykorzystano dopasowaną wiekiem kontrolę z grupy LR.

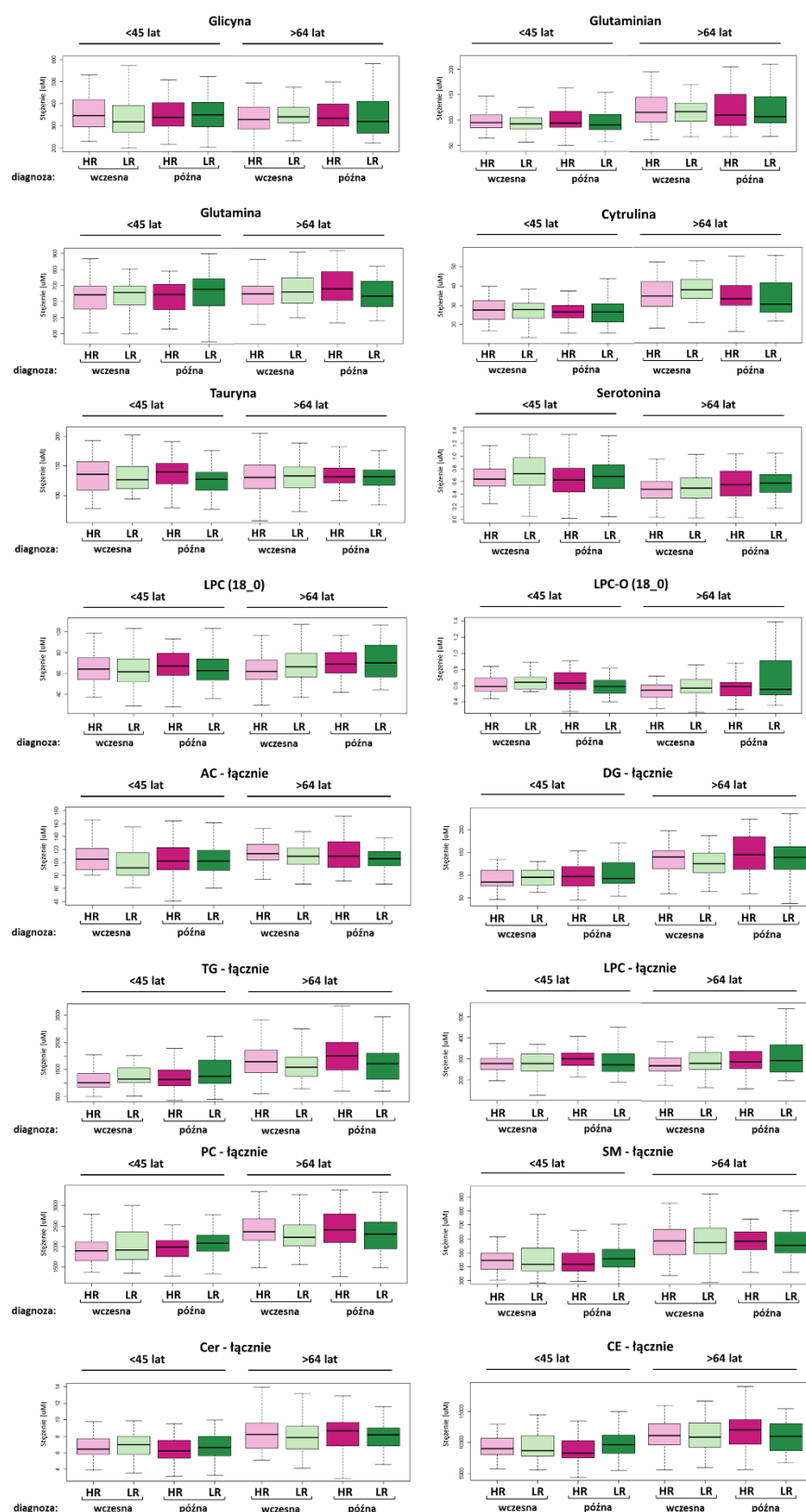
Zaobserwowano, że liczba metabolitów różnicujących ($|r| \geq 0,1$) panie z grupy HR z wczesną i późną diagnozą była podobna w podgrupach młodszych i starszych uczestniczek (odpowiednio 104 i 93 związki). Mediany modułu wielkości efektu dla tych podgrup wynosiły 0,078 dla kobiet do 45 r.ż. i 0,065 dla pań po 64 r.ż. (patrz Rysunek 26A). Należy podkreślić, że różne związki odróżniały przypadki z wczesną i późną diagnozą niezależnie od wieku. Wykazano również, że liczba metabolitów różnicujących grupy HR i LR była wyższa w przypadku nowotworów późno zdiagnozowanych w porównaniu do nowotworów wcześniej zdiagnozowanych niezależnie od podgrupy wiekowej. Co ciekawe siła różnic ($|r|$) była większa w przypadku grupy najmłodszej (<45 lat): mediana $|r| = 0,088$ (dla porównania z diagnozą do 5 lat) oraz mediana $|r| = 0,109$ (dla porównania z diagnozą po ponad 10 latach) (patrz Rysunek 26B).



Rysunek 26 Scharakteryzowanie istotności różnic w stężeniu metabolitów pomiędzy różnymi podgrupami uczestniczek badania HUNT2. (A) Histogramy dystrybucji metabolitów uszeregowanych wg. zwiększającej się istotności różnic (wielkość efektu r) między podgrupami HR różniącymi się czasem do zdiagnozowani nowotworu (<5 lat – wczesna diagnoza oraz 10-15 lat – późna diagnoza) w trzech podgrupach wiekowych uczestniczek (tj. <45, 45-64, >64 lat). (B) Histogramy dystrybucji metabolitów uszeregowanych wg. zwiększającej się istotności różnic (wielkość efektu r) między kobietami ze zdiagnozowanym rakiem (HR) i odpowiednimi kontrolami (LR) w podgrupach różniącymi się czasem do zdiagnozowani nowotworu (<5 lat – wczesna diagnoza oraz 10-15 lat – późna diagnoza) i wiekiem (<45 lat oraz >64 lat). Pionowe linie przedstawiają medianę wartości r w danej podgrupie wiekowej.

Należy podkreślić, że inne metabolity odróżniały przypadki HR i LR w poszczególnych podgrupach zdefiniowanych pod względem wieku i czasu do diagnozy. Co więcej dużą niejednorodność zauważono również w obrębie kierunku zmian cząsteczek (tj. wzrostu lub spadku stężenia w porównywanych grupach), co widać na przykładzie cytruliny, której istotną zmianę obserwowano u kobiet starszych - spadek jej stężenia był związany z wczesną diagnozą BC, a wzrost odnotowano dla późnego rozpoznania nowotworu. Interesujące zmiany obserwowane były w przypadku AC(16:0), której istotny spadek widoczny był dla nowotworów wcześniej zdiagnozowanych u młodszych kobiet oraz dla kobiet po 64r.ż. z późną diagnozą. Z kolei wzrost poziomu tej cząsteczki odnotowano dla późno rozpoznanego BC u pań poniżej 45 r.ż. oraz nowotworu zdiagnozowanego do 5 lat od startu badania u uczestniczek zakwalifikowanych do najstarszej grupy wiekowej.

Jednakże w większości analizowanych metabolitów widoczna była silna zależność zmian stężenia i wieku (np. PC czy TG), która została zbadana w rozdziale 4.2.2. Wykresy pudełkowe dla przykładowych związków lub ich klas przedstawiono na Rysunku 27.



Rysunek 27 Stężenia wybranych metabolitów (glicyny - Gly; glutaminianu - Glu, glutaminy - Gln, cytruliny - Cit, tauryny, serotoniny i lizofosfatydylocholin: LPC(18:0) i LPC-O(18:0)) oraz zagregowane stężenia związków należących do określonej klasy lipidów w grupie HR i grupie LR w czterech podgrupach uczestniczek różniących się wiekiem (<45 lat i >64 lata) i czasem do diagnozy nowotworu (wczesna/>5 lat i późna/10-15 lat); istotność różnic (wartość r) przedstawiono w Tabeli 8. AC- acylokarnityny; DG- diglicerydy; TG- triglicerydy; LPC- lizofosfatydylocholiny; PC- fosfatydylocholiny; SM- sfingomieliny; Cer- ceramidy; CE- estry cholesterolu

Tabela 8. Różnice pomiędzy przypadkami HR i LR w podgrupach uczestniczek badania HUNT2 różniących się wiekiem i czasem diagnozy BC. Wielkość efektu i jego interpretacja dla wybranych metabolitów (glicyny; glutaminianu, glutaminy, cytruliny, tauryny, serotoniny i lizofosfatydylocholiny: LPC(18:0) i LPC-O(18:0)) oraz zagregowane stężenia związków należącej do określonej klasy lipidów w grupie HR i grupie LR w czterech podgrupach uczestniczek różniących się wiekiem (<45 lat i >64 lata) i czasem do diagnozy nowotworu (wczesna/>5 lat i późna/10-15 lat).

Metabolit	BC wczesnie zdiagnozowany (<5 lat) w grupie <45 lat		BC późno zdiagnozowany (>10 lat) w grupie <45 lat		BC wczesnie zdiagnozowany (<5 lat) w grupie >64 lat		BC późno zdiagnozowany (>10 lat) w grupie >64 lat	
	wielkość efektu	interpretacja	wielkość efektu	interpretacja	wielkość efektu	interpretacja	wielkość efektu	interpretacja
Glicyna	0,119	mały	-0,032	znikomy	-0,080	znikomy	0,038	znikomy
Glutaminian	0,112	mały	0,106	mały	0,028	znikomy	-0,002	znikomy
Glutamina	-0,046	znikomy	-0,179	mały	-0,096	znikomy	0,216	mały
Cytrulina	0,044	znikomy	0,045	znikomy	-0,145	mały	0,168	mały
Tauryna	0,037	znikomy	0,235	mały	-0,030	znikomy	0,034	znikomy
Serotonina	-0,163	mały	-0,075	znikomy	-0,040	znikomy	-0,012	znikomy
LPC(18:0)	0,067	znikomy	0,110	mały	-0,126	mały	-0,002	znikomy
LPC-O(18:0)	-0,169	mały	0,172	mały	-0,169	mały	-0,063	znikomy
AC - łącznie	0,211	mały	0,020	znikomy	0,136	mały	0,109	mały
DG - łącznie	-0,098	znikomy	-0,044	znikomy	0,132	mały	0,067	znikomy
TG - łącznie	-0,180	mały	-0,148	mały	0,142	mały	0,216	mały
LPC - łącznie	-0,020	znikomy	0,192	mały	-0,108	mały	-0,029	znikomy
PC - łącznie	-0,100	mały	-0,192	mały	0,127	mały	0,109	mały
SM - łącznie	0,008	znikomy	-0,169	mały	-0,003	znikomy	0,071	znikomy
Cer - łącznie	-0,088	znikomy	-0,153	mały	0,091	znikomy	0,136	mały
CE - łącznie	0,020	znikomy	-0,226	mały	0,011	znikomy	0,101	mały

AC-acylokarnityny; DG- diglicerydy; TG- triglicerydy; LPC- lizofosfatydylocholiny; PC- fosfatydylocholiny; SM- sfingomieliny; Cer- ceramidy; CE- estry cholesterolu

4.2.4. Identyfikacja szlaków metabolicznych związanych z podwyższonym ryzykiem rozwoju raka piersi

W kolejnym etapie wykonano analizę wzbogacenia szlaków metabolicznych związanych z różnicującymi cząsteczkami, znalezionymi w porównaniach dotyczących wieku i czasu do diagnozy nowotworu (Rysunek 28). Przeprowadzona analiza wykazała, że metabolity inaczej odróżniające HR i LR w podgrupach kobiet młodszych i starszych (tj.: <45 i >64) były związane ze ścieżkami powiązanymi z glutaminolizą oraz degradacją rozgałęzionych aminokwasów. Ponadto wyłącznie w podgrupie pań po 64 r.ż. zauważono zmiany metabolizmu Ala i His, związane z czasem diagnozy nowotworu (wczesna i późna diagnoza).



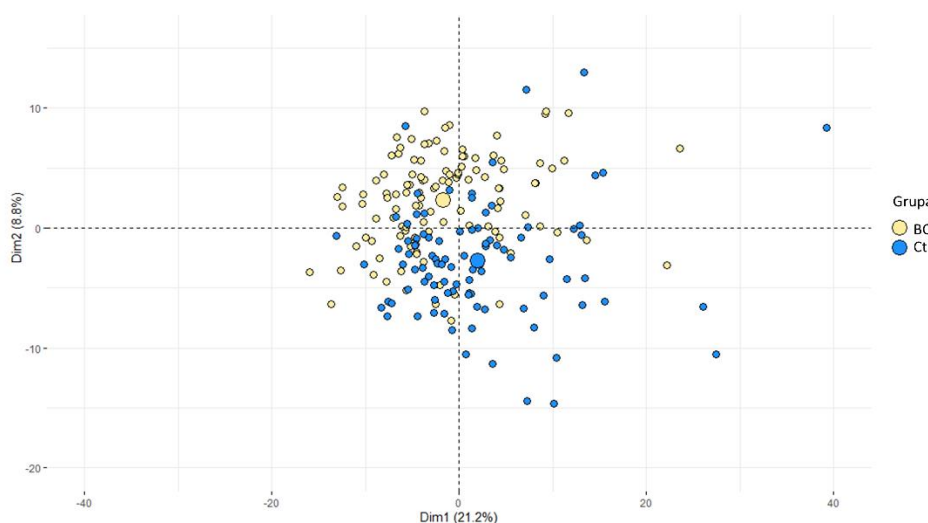
Rysunek 28 Szlaki metaboliczne związane ze związkami wykazującymi różnice stężenia między podgrupami uczestniczek badania HUNT2. Przedstawiono szlaki związane z metabolitami odróżniającymi próbki HR i LR w podgrupach kobiet najmłodszych (<45 lat) i najstarszych (>64 lata) oraz metabolitami odróżniającymi kobiety z wczesną (<5 lat) i późną (10-15 lat) diagnozą raka w podgrupie kobiet najmłodszych (<45 lat) i najstarszych (>64 lata) (wyłącznie przypadki HR). Szlaki istotnie nadreprezentowane ($p < 0.05$) zaznaczono gwiazdkami; wielkość koła odpowiada liczbie różnicujących związków związanych z danym szlakiem.

4.3. Identyfikacja cech metabolomu surowicy charakterystycznych dla raka piersi

4.3.1. Identyfikacja metabolitów, których stężenie w surowicy różni się u pacjentek z rakiem piersi i kobiet zdrowych

Profile metaboliczne analizowano stosując technikę spektrometrii mas w 112 próbkach surowicy pobranych od kobiet ze zdiagnozowanym rakiem piersi (BC) oraz 95 pań wolnych od choroby nowotworowej (Ctr). Podobnie jak w przypadku danych otrzymanych dla próbek pochodzących z badania HUNT2 wykryto 389 związków, z czego po przyjęciu kryteriów dotyczących wartości brakujących (patrz rozdział 3.3.1) do analiz ilościowych zakwalifikowano 284 cząsteczek (30 aminokwasów i amin biogennych, heksozy i 253 lipidów).

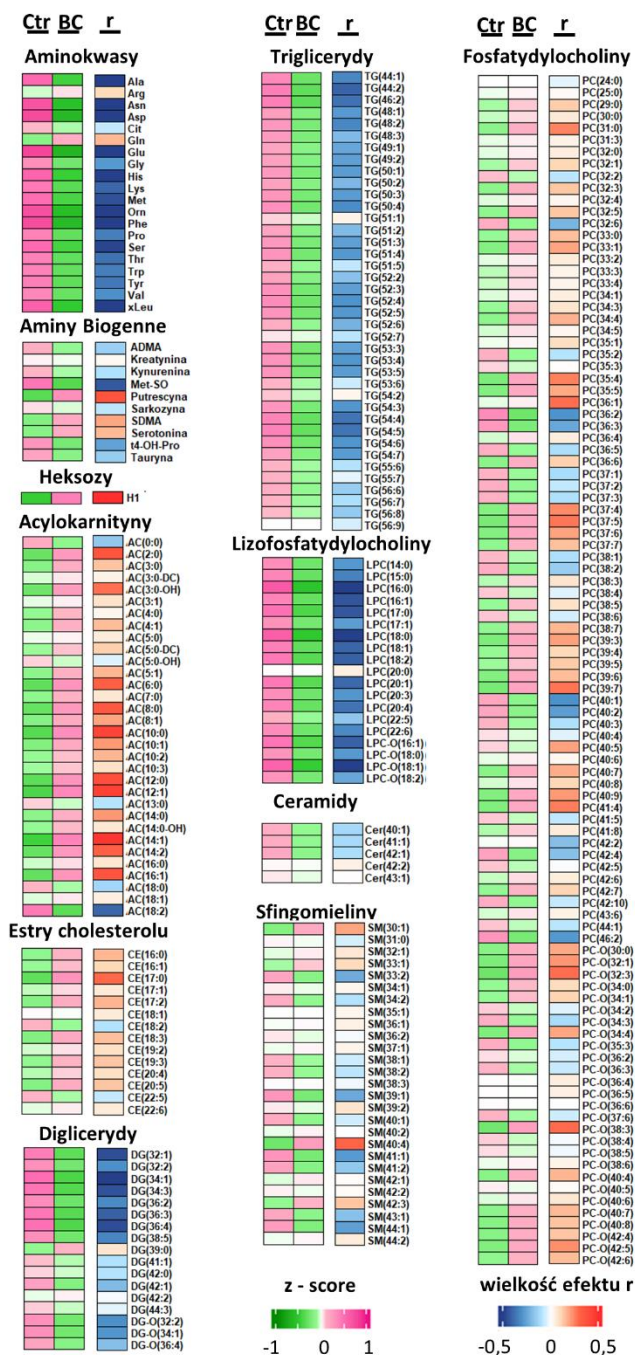
Nienadzorowana analiza głównych składowych wszystkich próbek (Rysunek 29) wykazała obecność dobrze widocznych skupisk zgodnych z grupą dotyczącą diagnozy (BC i Ctr). Pierwsza główna składowa (PC1) odpowiadała za 21% całkowitej wariancji, a zmiennymi, które najbardziej z nią korelowały były TG(50:3) oraz TG(51:2).



Rysunek 29 Analiza głównych składowych (PCA) ogólnych podobieństw między próbkami pacjentek z rakiem piersi i kobiet zdrowych. Wykres przedstawia 2 serie danych umieszczone w układzie współrzędnych wyznaczonych przez 2 główne składowe: oddzielnie zaznaczono próbki pacjentek (BC) i osób zdrowych (Ctr) (duże koła oznaczają średnią dla każdej grupy).

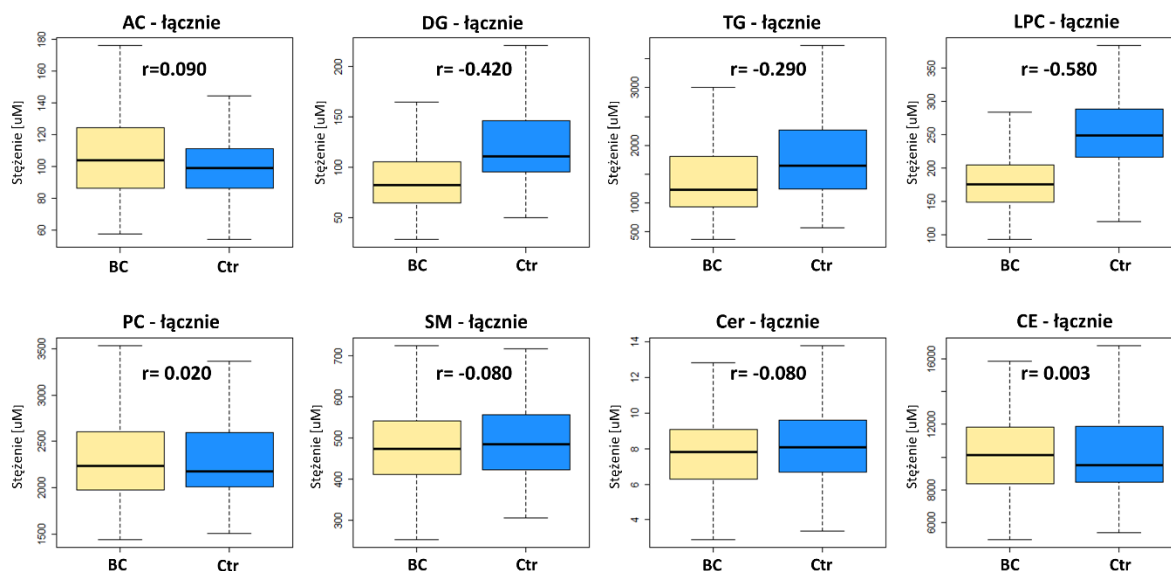
Porównanie stężeń poszczególnych metabolitów wykazało liczne istotne statycznie różnice. Średnią bądź dużą wielkość efektu ($|r| \geq 0,3$) obserwowano dla 60 cząsteczek, z czego 49 z nich (16 aminokwasów, 1 amina biogenna, 9 DG, 8 TG, 12 LPC, 2 PC) charakteryzował obniżony, a pozostałych 11 (9 AC, 1 amina i heksoza) zwiększony poziom w grupie BC. Średnie stężenia oznaczonych ilościowo związków oraz siły różnic między grupą kobiet z rozpoznaniem BC oraz grupą kontrolną przedstawiono w formie mapy ciepła na Rysunku 30.

Ponadto, analiza statusu obecności/nieobecności pozostałych 105 metabolitów wykazała, że brak AC(15:0), AC(18:1), DG(38:0), PC(44:3) oraz Cer(44:0) był istnieniem częściej obserwowany w przypadku grupy BC.



Rysunek 30 Poziomy wszynek wszystkich metabolitów w próbkach surowicy 112 pacjentek z rakiem piersi (BC) i 95 kobiet zdrowych (Ctr). Mapa ciepła przedstawia średnie poziomy analizowanych metabolitów w każdej grupie (reprezentowane jako z-score) oraz istotność różnic między grupami (reprezentowane jako wielkość efektu „r”).

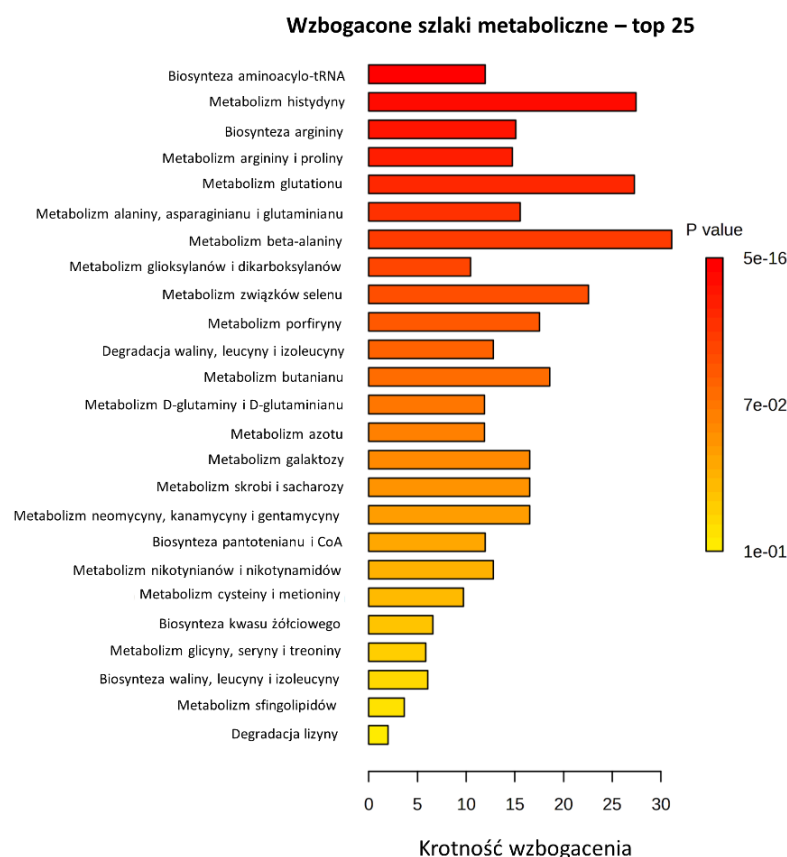
W następnym etapie porównano również zagregowane stężenia głównych klas związków lipidowych. W rezultacie wykazano znaczący spadek poziomów lizofosfatydylocholin, oraz di- i triglicerydów u pacjentek z rakiem piersi ($r < -0,1$) (Rysunek 31).



Rysunek 31. Zagregowane stężenia związków należącej do określonej klasy lipidów w grupie pacjentek (BC) i grupie kontrolnej (Ctr); istotność różnic między grupami pokazano jako wielkość efektu „ r ”. AC-acylokarnityny; DG- diglicerydy; TG- triglicerydy; LPC- lizofosfatydylocholiny; PC- fosfatydylocholiny; SM- sfingomieliny; Cer- ceramidy; CE- estry cholesterolu

4.3.2. Identyfikacja szlaków metabolicznych związanych z rozwojem raka piersi

Dla wszystkich metabolitów oznaczonych w sposób ilościowy przeprowadzono analizę wzbogacenia szlaków metabolicznych, która ujawniła zmiany w obrębie ścieżek związanych z metabolizmem aminokwasów (m.in. histydyny), związanych z produkcją energii, czy homeostazą REDOX (metabolizm glutationu) (Rysunek 32).



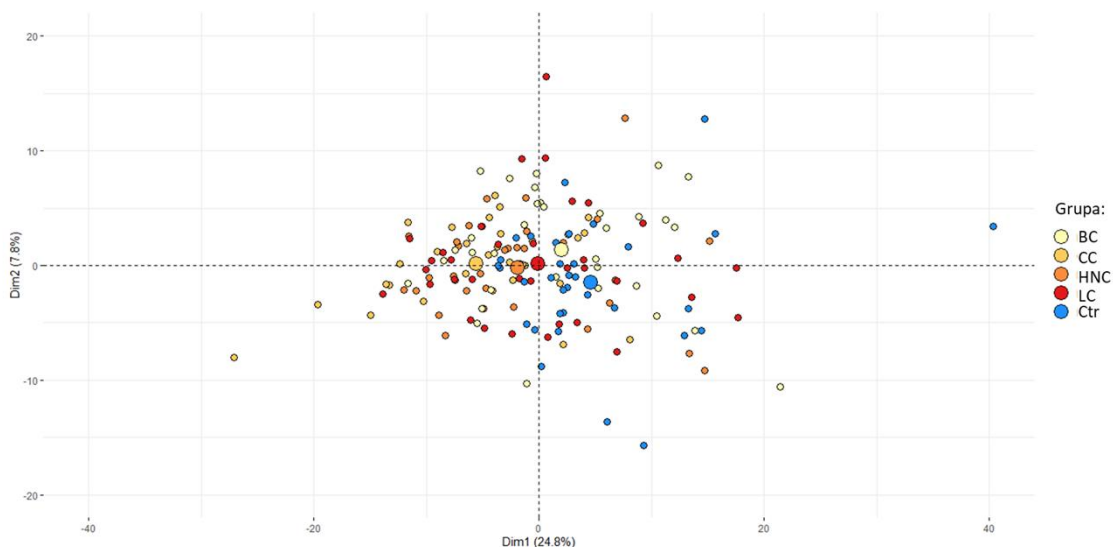
Rysunek 32 Szlaki metaboliczne związane z metabolitami, których stężenie było istotnie inne ($p < 0.05$) w surowicy pacjentek z rakiem piersi (BC) i kobiet zdrowych (Ctr); na wykresie pokazano 25 ścieżek o największej nadreprezentacji (krotność wzbogacenia).

4.3.3. Identyfikacja metabolitów, których stężenie w surowicy odróżnia kobiety zdrowe i pacjentki z różnymi typami nowotworów litych

Chcąc sprawdzić czy otrzymana sygnatura metaboliczna raka piersi zawiera cechy metabolomu charakterystyczne dla innych typów nowotworów litych do analizy włączono próbki kobiet z rozpoznaniem rakiem jelita grubego (CC), regionu głowy i szyi (HNC) lub płuc (LC). Wiedząc z przeprowadzonych wcześniej analiz, że wiek jest czynnikiem wywierającym duży wpływ na tego typu badania, z grupy pacjentek z BC oraz zdrowych pań wydzielono mniejsze podgrupy ($n=35$) w celu zapewnienia podobnego rozkładu wieku we wszystkich pięciu porównywanych zbiorach.

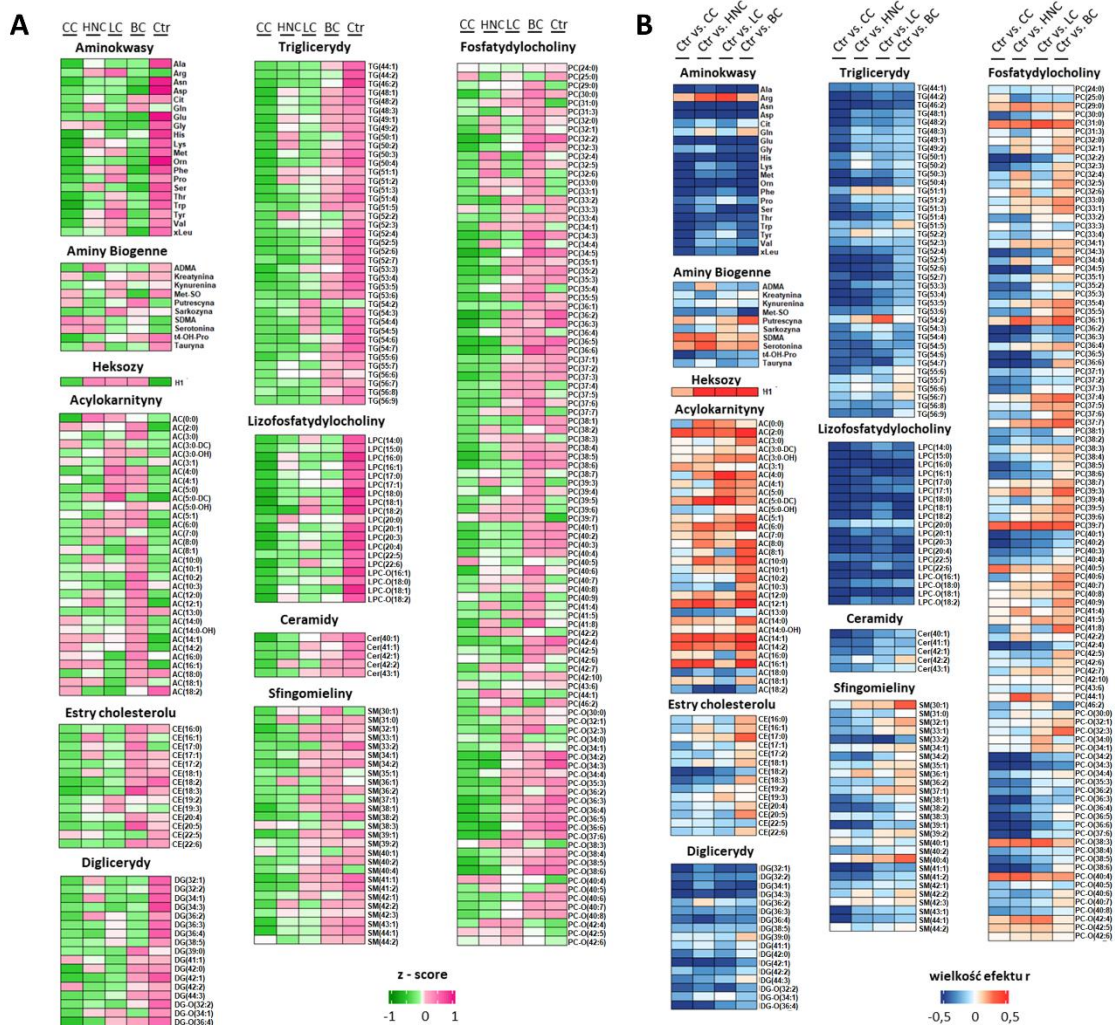
Analiza PCA (Rysunek 33) wykazała największą odległość pomiędzy grupą kontrolną a grupami raków. Nie mniej jednak, obserwowano dużą niejednorodność w obrębie wszystkich porównywanych próbek i brak wyraźnie widocznych skupisk dotyczących rodzaju nowotworu (CC, BC, HNC i LC). W tym przypadku zmiennymi najbardziej korelującymi

z pierwszą główną składową były: SM(41:1) i SM(41:2), a PC1 odpowiadała za 25% całkowitej wariancji.



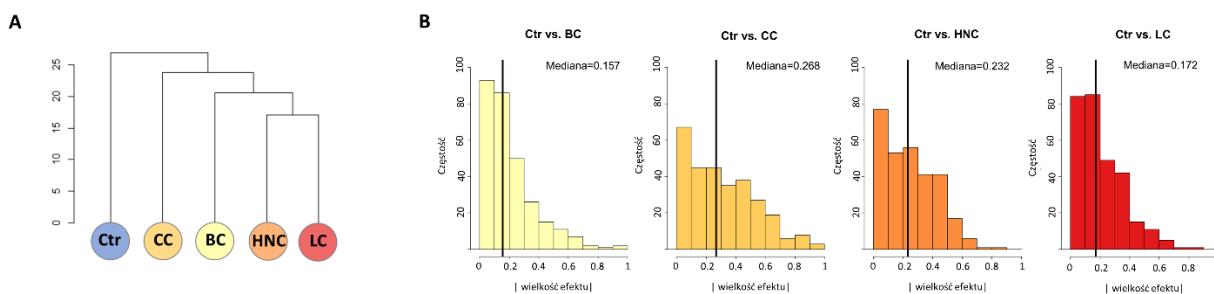
Rysunek 33. Analiza głównych składowych (PCA) ogólnych podobieństw między próbkami. Wykres przedstawia 5 serii danych umieszczonych w układzie współrzędnych wyznaczonych przez 2 główne składowe: oddzielnie zaznaczono próbki pochodzące od kobiet zdrowych (Ctr) oraz pacjentek z rozpoznaniem raka piersi (BC), raka jelita grubego (CC), raka regionu głowy i szyi (HNC) i raka płuca (LC) (duże koła oznaczają średnią dla każdej grupy).

Zaobserwowano, że 161 związków wykazywało znaczącą różnicę stężenia ($|r| \geq 0,3$) pomiędzy którymkolwiek rodzajem nowotworu, a grupą kontrolną. W większości były to metabolity zaliczane do aminokwasów, diglicerydów, triglicerydów i lizofosfatydylocholin, których stężenie malało w surowicy pacjentek onkologicznych. Ponadto stężenie heksoz (w tym glukozy) w surowicy było znacznie zwiększone w próbkach wszystkich typów nowotworu. Chcąc zobrazować zmiany poziomów cząsteczek pomiędzy zestawami próbek na Rysunku 34 zamieszczono mapę ciepłą zawierającą średnie stężenia oznaczonych ilościowo związków oraz siły zmian między grupami pacjentek z chorobą nowotworową (różnego typu) a grupą kontrolną.



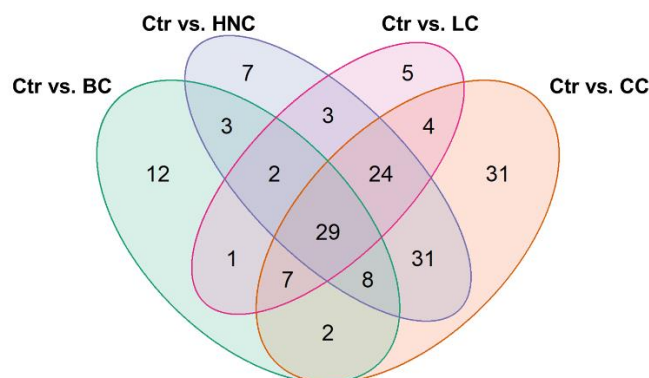
Rysunek 34. Poziomy metabolitów w próbkach surowicy od pacjentek z rakiem jelita grubego (CC; n=30), rakiem regionu głowy i szyi (HNC; n=32), rakiem płuca (LC; n=35), rakiem piersi (BC; n=35) i kobiet zdrowych (Ctr; n=35). Mapa ciepła przedstawia średnie poziomy analizowanych metabolitów w każdej grupie (reprezentowane jako z-score) oraz istotność różnic między grupami (reprezentowane jako wielkość efektu „r”).

Stosując metodę hierarchicznej klasteryzacji wykazano największe podobieństwo profili metabolicznych przypadków z grupy LC i grupy HC (Rysunek 35A). Natomiast porównanie siły różnic pomiędzy grupami raków a grupą kobiet zdrowych, wykonane na podstawie wyrysowanych histogramów i wyznaczonej dla nich mediany uwiarygodniło, że dla zbiorów próbek CC oraz HNC istnieje największy efekt wielkości różnic (mediana wynosząca odpowiednio 0,268 i 0,232). Z kolei najniższą siłę różnic obserwowano dla porównania wykonanego dla przypadków BC oraz Ctr, dla którego wartość mediany $|r|$ była równa 0,157 (Rysunek 35B).



Rysunek 35. Różnice profilów metabolomu surowicy między grupami kobiet. (A) Dendrogram obrazujący wynik klasteryzacji hierarchicznej pięciu „sztucznych” próbek odzwierciedlających stężenia metabolitów uśrednione dla całej grupy; wysokość każdego ramienia reprezentuje odległość Minkowskiego między dwiema analizowanymi grupami połączonymi w klastrze. (B) Histogramy dystrybucji metabolitów uszeregowanych wg. zwiększającej się istotności różnic (wielkość efektu r) między grupą kobiet zdrowych (Ctr) a grupami pacjentek z różnymi nowotworami litymi (BC, CC, HNC, LC); pionowe linie reprezentują medianę wielkości efektu „ r ”.

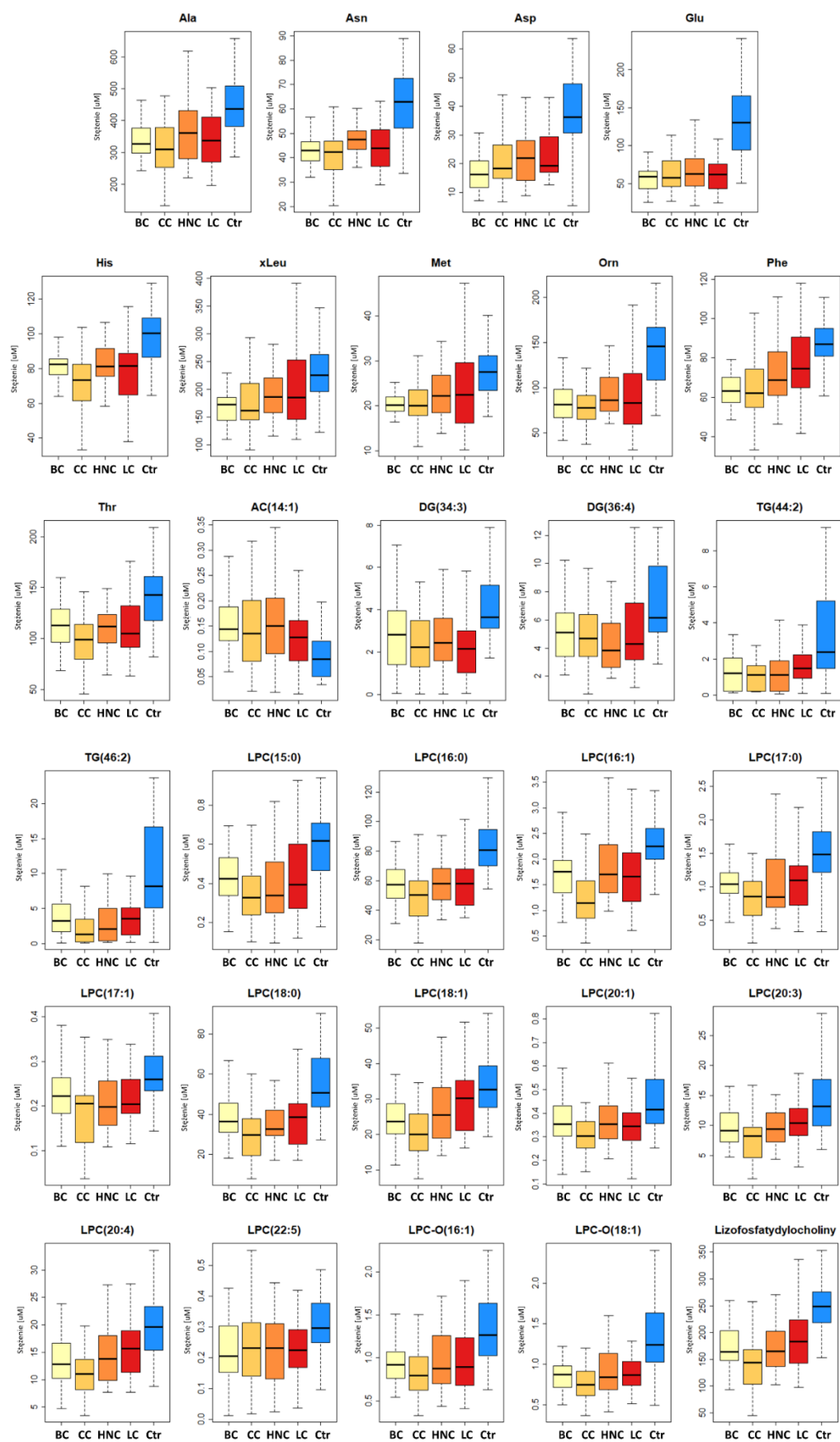
Poszukując uniwersalnej sygnatury charakterystycznej dla wszystkich nowotworów litych, tj. jednolicie odróżniającej je od kobiet wolnych od nowotworu (tzw. „*pan-cancer signature*”) wyznaczono zbiór wspólny cech spełniający to założenie. Zamieszczony na Rysunku 36 diagram Venna pokazuje rezultat analizy: nakładanie się 29 cech różniących grupę kontrolną i wszystkie cztery typy nowotworów litych (duża i średnia wielkość efektu).



Rysunek 36 Diagram Venna ilustrujący liczbę metabolitów, które odróżniały próbki kobiet zdrowych (Ctr) i próbki pacjentek z różnymi typami nowotworów litych (BC, HNC, LC, CC); uwzględniono związki, dla których różnice wykazywały dużą i średnią wielkość efektu.

W skład tak określonej „uniwersalnej” sygnatury raka wchodzi: 11 aminokwasów, 1 acylokarnityna, 4 di- i triglicerydy oraz 13 lizofosfatydylocholin wraz z ich zagregowanym poziomem (Rysunek 37). Co ciekawe wszystkie oprócz jednego związku, tj. AC(14:1), wykazały zmniejszone stężenie w próbkach pochodzących od pacjentek onkologicznych.

Należy więc zauważyć, że większość (28 z 40) cząsteczek wykrytych jako różnicujące pomiędzy przypadkami z BC i grupą kontrolną, wykazywała podobne zmiany między 3 pozostałymi typami nowotworów litych i grupą kontrolną. Niemniej jednak przeprowadzone badanie umożliwiło detekcję 12 unikalnych cech metabolicznej sygnatury nowotworu piersi, odróżniających ją od profilu metabolicznego uzyskanego dla grupy kontrolnej.

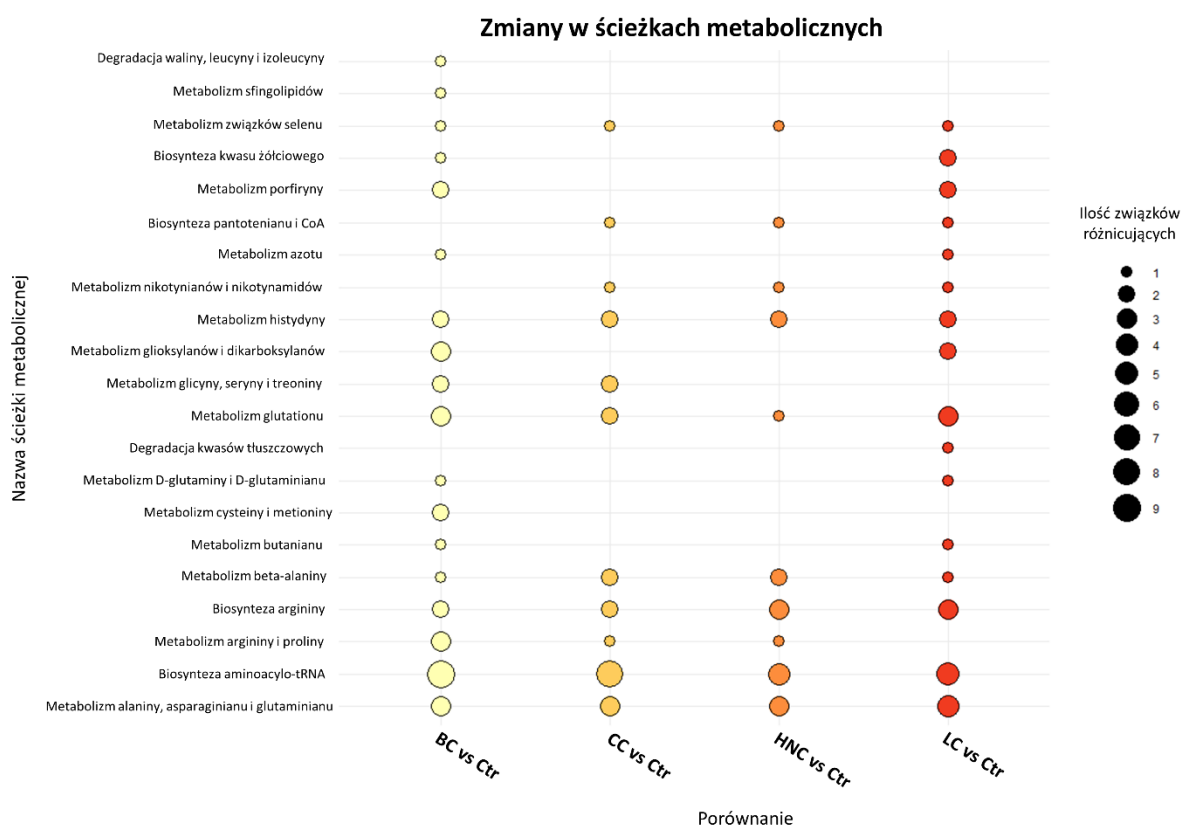


Rysunek 37. Stężenia metabolitów (28 związków i łączne stężenie LPC), których poziom był różny (duża lub średnia wielkość efektu) między próbkami kobiet zdrowych (Ctr) i próbkami pacjentek z czterema typami nowotworów litych (BC, CC, HNC, LC).

Ala– alanina; Asn- asparagina; Asp- asparaginian; Glu- glutaminian; His- histydyna; xLeu- leucyna+izoleucyna; Met- metionina; Orn- ornityna; Phe- fenyloalanina; Thr- treonina; AC- acylokarnityny; DG- diglicerydy; TG- triglicerydy; LPC- lizofosfatydylocholiny; PC- fosfatydylocholiny; SM- sfingomieliiny; Cer- ceramidy; CE- estry cholesterolu

4.3.4. Identyfikacja szlaków metabolicznych związanych z „uniwersalną” sygnaturą nowotworową

Analiza szlaków metabolicznych związanych z cząsteczkami, których poziomy różniły się w porównaniach 4 typów nowotworów oraz grupy kontrolnej, ujawniła zmiany w podobnych ścieżkach we wszystkich analizowanych typach raków (Rysunek 38). W wynikach zauważalnie dominowały szlaki związane z metabolizmem aminokwasów. Należy również podkreślić, że związki zaangażowane w metabolizm glikolizy oraz mechanizmy obronne przed uszkodzeniami oksydacyjnymi były wspólne dla próbek pochodzących od wszystkich pacjentek onkologicznych.



Rysunek 38. Szlaki metaboliczne związane ze związkami, których stężenie było istotnie różne w surowicy kobiet zdrowych i pacjentek z czterema typami nowotworów litych (wielkość koła odpowiada liczbie metabolitów różnicujących związanych z danym szlakiem).

5. Dyskusja

5.1. Stabilność układu pomiarowego i jakość danych

Badanie i poznawanie najbardziej dynamicznie zmieniającego się ludzkiego układu molekularnego jakim jest metabolom niewątpliwie daje szansę na lepsze zrozumienie chorób człowieka. Rozwój technik analitycznych takich jak spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) czy spektrometria mas (MS) pozwala na identyfikację wieloskładnikowych sygnatur odzwierciedlających zmiany zachodzące w organizmie (np. w trakcie choroby nowotworowej). Ze względu na wysoką selektywność, czułość, możliwość oznaczania szerokiej gamy analitów oraz kompatybilność z różnymi technikami separacji (w tym przypadku chromatografią cieczową) do analiz jakościowych i ilościowych przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wykorzystano metodę MS. Należy jednak podkreślić, że pomimo ogromnych możliwości zastosowanej techniki LC-MS, jest ona niezwykle złożona i podatna na różnego rodzaju błędy. W związku z tym analizy tego rodzaju wymagają doświadczenia i dokładnego zrozumienia zasad pomiaru przez eksperymentatora oraz systematycznej kontroli jakości. W trwających wiele miesięcy wielkoskalowych badaniach metabolomicznych opartych na spektrometrii mas powtarzalność i dobra stabilność to cechy pomiaru w dalszym ciągu trudne do osiągnięcia. Kluczowe jest, aby przed przystąpieniem do analiz starannie zaplanować i zoptymalizować poszczególne etapy procesu analitycznego m.in. plan konserwacji urządzeń czy protokołów monitorowania i wykrywania wszelkich odchyłeń na wczesnym etapie, zanim wystąpi awaria wpływająca na jakość uzyskanych wyników.

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej zaproponowano plan pracy oraz wyszczególniono czynności mające wpływ na wydajność pomiarów i jakość otrzymanych danych (patrz rozdział 3.3). Zgodnie z źródłami literaturowymi w harmonogramie eksperymentów uwzględniono m.in. regularne czyszczenie ścieżki jonów, optymalizację parametrów jonizacji oraz rutynowe analizy kształtów piku czy czasu retencji (Pitt, 2009) (Kang i inni, 2017) (Luo i inni, 2016) (Vogeser i inni, 2016). Ponadto, mając na uwadze fakt, że wydajność LC-MS zwykle zmienia się w czasie i opierając się na zaleceniach ujętych w publikacjach (Alseekh i inni, 2021) oraz (Ding i inni, 2022), przed przystąpieniem do analiz metabolomicznych losowo rozmieszczono próbki od kobiet z wszystkich badanych grup na płytkach pomiarowych zapewniając przy tym proporcjonalny udział grup na wszystkich

płytkach (rozdział 3.2.1). Stosując powyższe zasady, w ciągu 6 miesięcy pomiarów, w ramach 17 płytek pomiarowych (uznawanych jako *partie*, ang. *batch*), wykonano analizę profili metabolicznych obecnych w 1245 próbkach surowicy kobiet. Mediany współczynnika zmienności obliczonego dla próbek kontroli jakości (QC) wewnątrz partii mieściły się w zakresie 8-16%, a mediana wartości CV między płytkami wynosiła 18,73%. Obie wartości median (wewnątrz i między płytkami) były zbliżone do wyników raportowanych we wcześniej opublikowanych pracach. Zespół S.Moore'a podczas analiz uzyskał medianę CV wewnątrz partii na poziomie 13%, a między partiami 18% (Moore i inni, 2021). Podobnie w przypadku badań prowadzonych przez Mary Playdon i współpracowników, którzy donoszą, że mediana współczynnika zmienności wynosiła 21% (Playdon i inni, 2017). Z kolei w publikacji S. Jung, czy M. His otrzymano lepszą jakość i powtarzalność pomiarów (mediana CV odpowiednio 10,1% i 5,3%) (Jung i inni, 2023) (His i inni, 2019). Co więcej w badaniu wielkoskalowym, przeprowadzonym z wykorzystaniem 3248 próbek osocza, 168 na 180 analizowanych cząsteczek charakteryzował $CV < 25\%$ (Kühn i inni, 2016). W tym miejscu należy podkreślić, że do porównania współczynnika zmienności pomiędzy badaniami trzeba podchodzić bardzo ostrożnie. Ze względu na wrażliwość LC-MS na czynniki zewnętrzne praktycznie niemożliwe jest otrzymanie takich samych wyników w eksperymentach przeprowadzonych w różnych laboratoriach (Wehrens i inni, 2016). W zależności od źródła, również metoda obliczania CV była różna. W części przypadków autorzy pod uwagę biorą cały zbiór danych (bez jakiegokolwiek wstępnej selekcji cech), w innych przypadkach uwzględniają tylko związki, dla których nie obserwowano wartości brakujących, bądź też parametr obliczany jest na podstawie badanych próbek, a nie kontroli jakości. Różniły się także platformy i urządzenia, za pomocą których wykonano analizy metaboliczne. Ponadto w kilku z dostępnych prac pomiary zostały zlecone wyspecjalizowanym w tym zakresie firmom zewnętrznym. W żadnej ze wspomnianych wyżej publikacji autorzy nie opisywali protokołów monitorowania usterek/błędów, które wystąpiły w trakcie analiz. Co jednak najważniejsze badania odróżniał czas trwania pomiarów, liczba partii oraz ilość powtórzeń próbek uwzględnianych w obliczeniach współczynnika. Niemniej jednak uzyskane wyniki pokazują, że jakość analiz wykonanych w ramach niniejszej rozprawy jest porównywalna z jakością innych poprawnie udokumentowanych badań metabolomicznych.

Pomimo iż, badania metabolomu przy użyciu techniki LC-MS prowadzone są już ponad 20 lat, w dalszym ciągu nie ma jednej, uniwersalnej metody przygotowania, wstępnego

przetwarzania i normalizacji danych pochodzący z eksperymentów z zastosowaniem LC-MS. Dane generowane w wyniku długoterminowych pomiarów narażone są na występowanie niepożądanych i niekontrolowanych różnic w intensywności sygnału, które mogą utrudnić ich interpretację. Przed przystąpieniem do jakiegokolwiek analizy statystycznej należy usunąć tego typu zmiany, aby pomiary wykonane dla próbek w obrębie wszystkich partii (w tym przypadku płytek) były bezpośrednio porównywalne (Brunius i inni, 2016) (Wehrens i inni, 2016). Korekcję efektu paczki można przeprowadzić na kilka sposobów. W tej pracy zastosowano empiryczną metodę Bayesa z uwzględnieniem badanych próbek. Warto wspomnieć, że część badaczy podchodzi do zagadnienia efektu paczki opierając się na próbkach kontroli jakości (QC) (Sanchez-Illana i inni, 2018) (Shi i inni, 2022) czy wewnętrznych standardach znakowanych izotopowo (Bromke i inni, 2015). Korekta efektu paczki w sposób wykonany w ramach rozprawy, prowadzi do poprawy jakości danych (podobnie jak metoda uwzględniająca QC), ale jej niewątpliwą przewagą jest poprawa pomiarów większej liczby metabolitów. Ponadto na jej korzyść przemawia również fakt, iż długi czas badań może powodować, że jakość próbek kontrolnych może się pogorszyć. Z kolei stosowanie standardów znakowanych izotopowo nie gwarantuje dobrego pokrycia metabolomu (Guo i inni, 2023) (Han i inni, 2020) (Wehrens i inni, 2016) (Liu i inni, 2020). Oprócz efektu paczki, w danych metabolomicznych do błędnej interpretacji przyczynia się również obecność wartości brakujących. Zgodnie z dostępną literaturą, braki te mogą obejmować od 10 do nawet 40% wszystkich wartości pomiarowych. Przyczyny ich występowania mogą mieć różne podłoże (analityczne, obliczeniowe, a także biologiczne), i w zależności od tego zagadnienie to należy rozpatrywać w inny sposób. W wyniku analiz wykonanych w ramach niniejszej pracy wartości brakujące stanowiły ok. 30% danych, z których przeważająca większość spowodowana była stężeniem związków poniżej progu detekcji. W dysertacji zastosowano zróżnicowane podejście do wspomnianego problemu. Podobnie jak w pracy (Qiu i inni, 2008) w pierwszym kroku wykonano filtrowanie, w wyniku którego do dalszego przetwarzania wyodrębniono cechy ($n=284$), dla których liczba pomiarów poniżej progu detekcji stanowiła mniej niż 50%. Ponadto w dalszych etapach przeprowadzono uzupełnienie danych na dwa różne sposoby. W przypadku pomiarów brakujących z powodów „losowych” (np. problem z pomiarem kalibranta) stosowano metodę najczęściej opisywaną w literaturze, tj. metodę imputacji k-najbliższych sąsiadów (kNN). Wcześniej wykazano, że metoda ta jest szczególnie przydatna dla zbiorów danych MS z bezpośrednim nastrzykiem (Hrydziusko i inni, 2011), a (Gromski i

inni, 2014) opisali jej zastosowanie w danych pochodzących z eksperymentów GC-MS. Natomiast w przypadku pomiarów brakujących z powodów nie losowych (stężenie poniżej progu detekcji), zastosowano oryginalną metodę opracowaną przez dr Agatę Kurczyk.

Podsumowując, w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wysoką jakość danych i ich późniejszej analizy zapewniono w dwojaki sposób:

- a) poprzez uwzględnienie proaktywnego planu konserwacji oraz prowadzenie ścisłego monitorowania jakości pomiarów i niezwłoczne wdrażanie działań zaradczych;
- b) poprzez zindywidualizowane i zoptymalizowane podejście do przygotowania oraz wstępnego przetwarzania danych.

5.2. Metabolomiczna sygnatura ryzyka raka piersi

Choć pierwsze informacje w literaturze na temat czynników ryzyka raka piersi pojawiły się w 1967 roku (Moore i inni, 1967), a cechy molekularne tego nowotworu zostały już szczegółowo opisane, to zauważalny jest brak uniwersalnego wzoru zmian metabolitów charakterystycznego dla stanów sprzyjających rozwojowi BC. Zagadnienie to jest niezwykle ważne, ponieważ pomimo wieloletnich badań rak piersi nadal jest najczęstszym nowotworem wśród kobiet na całym świecie, a jego etiologia w dalszym ciągu pozostaje niejasna.

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej zbadano profile metaboliczne obecne w przed diagnostycznych próbkach surowicy pochodzących od 906 zdrowych uczestniczek badania populacyjnego HUNT2. W celu identyfikacji cech związanych ryzykiem raka piersi, w analizowanej grupie znalazły się kobiety, u których w ciągu 15 lat obserwacji zdiagnozowano raka piersi (określone jako grupa z wysokim ryzykiem, HR), oraz panie dopasowane na podstawie wieku, które w tym samym czasie nie chorowały na raka piersi (określone jako grupa z niskim ryzykiem, LR).

W wyniku analizy danych dotyczących stylu życia i zdrowia kobiet potwierdzono znaną wcześniej odwrotną zależność pomiędzy ryzykiem BC i liczbą donoszonych ciąż (tj. malejące ryzyko wraz z liczbą dzieci) (Kvale i inni, 1987). Ponadto zaobserwowano wzrost ryzyka wystąpienia nowotworu wraz ze stosowaniem hormonalnej terapii zastępczej (HTZ) (zjawisko również wcześniej opisane np. przez Chen i współpracowników (Chen i inni, 2002)). Zarówno ciąża, jak i stosowanie HTZ niewątpliwie wpływają na metabolizm i profil cząsteczek obecny w krwi kobiet (Orczyk-Pawilowicz i inni, 2016).

Jedną z obserwacji niniejszej pracy było stwierdzenie, że różnice profilu metabolicznego kobiet o większym i mniejszym ryzyku raka piersi są największe w grupie osób młodszych (przed menopauzą). Ma to prawdopodobnie związek z charakterystycznymi cechami metabolizmu w tej grupie wiekowej. Według doniesień literaturowych, w czasie ciąży (a więc u kobiet przed menopauzą), w surowicy wzrasta poziom trójglicerydów, cholesterolu całkowitego i lipoprotein o małej i bardzo małej gęstości (Brizzi i inni, 1999) (Herrera, 2000). Z kolei w eksperymentach, w których materiał do badań stanowiło osocze dowiedziono, że stężenia części aminokwasów, kwasów tłuszczowych, acylokarnityn, fosfatydylocholin i sfingomielin ulegały znacznemu obniżeniu (Lindsay i inni, 2015) (Mitro i inni, 2021). Co więcej, w wyniku intensywnego transportu glukozy przez łożysko i pomimo jednoczesnej, wzmożonej aktywności glukoneogenetycznej w krwi matki obserwowana była hipoglikemia (Herrera, 2000). Zatem prawdopodobne jest, że zmiany metabolizmu związane z ciążą mogą mieć wpływ na cechy metabolizmu surowicy obserwowane w grupie młodszych kobiet.

Z kolei na różnice profilu metabolicznego kobiet o większym i mniejszym ryzyku raka piersi w grupie starszych pań po menopauzie istotny wpływ może mieć stosowanie hormonalnej terapii zastępczej. Metaanaliza oparta na 73 badaniach, przeprowadzona przez Nie i wsp. wykazała obniżony poziom cholesterolu całkowitego, cholesterolu lipoproteinowego (LDL-C) oraz lipoproteiny (a) (LP(a)) w surowicy pań stosujących HTZ, w porównaniu z kobietami otrzymującymi placebo (lub grupą bez żadnej interwencji) (Nie i inni, 2022). Godsland, który w swojej metaanalizie przeanalizował 248 badań dotyczących 42 różnych schematów HTZ, również wysunął analogiczne wnioski, jednakże podkreślając, że powyższy efekt widoczny był jedynie w przypadku schematów zawierających wyłącznie estrogeny (Godsland, 2001). Podobną konkluzję przedstawił kilka lat wcześniej Rijpkema, stwierdzając, że „*ostateczny efekt zależy od rodzaju i dziennej dawki zarówno składnika estrogenowego, jak i progestagenowego*” (Rijpkema i inni, 1990). Ponadto w badaniu przeprowadzonym na kohorcie *Cancer Prevention II Nutrition* u osób leczonych hormonalnie (w schemacie z estrogenem lub estrogenem w połączeniu z progestyną) wykazano wyższy poziom mono- i diacylogliceroli oraz niższy poziom acylokarnityn i kilku aminokwasów (Stevens i inni, 2018). W 2020 roku grupa Balasubramanian’a potwierdziła spostrzeżenia poprzedników dodając do zmian w profilu metabolicznym krwi spowodowanych HZT (w podobnym schemacie jak wyżej): wzrost ilości triacylogliceroli, fosfatydyloetanolamin i fosfatydylocholin oraz spadku amin czwartorzędowych, lizofosfatydylocholin, i estrów cholesterolu

(Balasubramanian i inni, 2020). Wszystkie wspomniane wyniki wskazują, na bardziej złożony, zależy od schematu charakter związku pomiędzy hormonalną terapią zastępczą i metabolizmem.

Podczas analiz metabolomicznych wykonanych w ramach rozprawy znaleziono kilka specyficznych cząsteczek (np. glicyna, tauryna czy LPC(18:0), których stężenia w surowicy odróżniały kobiety, u których ostatecznie rozwinął się BC od par z grupy niskiego ryzyka. Niestety wielkość efektu takich różnic była stosunkowo niska – $|r| < 0,1$. Szukając przyczyn słabo widocznych różnic pomiędzy grupami z wysokim i niskim ryzykiem nowotworu znaleziono silną korelację między stężeniami metabolitów a wiekiem uczestniczek. Podobnie jak w pracach zespołów Yu, Di Cesare oraz Hernandez'a wykazano wzrostową tendencję poziomów acylkarnityn, fosfatydylocholin, sfingomielin, a także niektórych aminokwasów (np. glutaminian) wraz z wiekiem par (Yu i inni, 2012) (Di Cesare i inni, 2021) (Hernandes i inni, 2022). Ponadto w przypadku LPC(18:2) zaobserwowano silną, negatywną zależność pomiędzy stężeniem związku i wiekiem uczestniczek, tak jak donoszą Gana i współpracownicy (Gana i inni, 2014). Wszystkie poczynione obserwacje obrazują adaptację metabolizmu energii i lipidów, wywołaną zmianami hormonalnymi zachodzącymi w organizmie kobiety w ciągu jej życia. Wzrost poziomu lipidów (fosfoglicerydów, sfingomieliny i fosfatydylocholin) może odzwierciedlać wpływ zmieniających się poziomów estrogenu i progesteronu na enzymy wątrobowe, bądź też może wiązać się z przyrostem masy ciała, który jest częstym zjawiskiem u kobiet po menopauzie (Yu i inni, 2012) (Auro i inni, 2014) (Cui i inni, 2019). Po menopauzie następuje redystrybucja tkanki tłuszczowej z okolic bioder, pośladków i ud w kierunku zwiększonego odkładania się w jamie brzusznej. Ponadto zmiany stężenia estrogenu wpływają na zawartość tłuszczu wielonienasyconych (PUFA ang. *polyunsaturated fatty acid*) w tkankach oraz m.in. zdolności do przechowywania kwasów tłuszczowych w kropelkach lipidowych. W skutek wspomnianych zmian w organizmie kobiety rozwija się bardziej aterogenny układ lipidowy, a w surowicy krwi obserwowany jest wzrost stężenia całkowitego cholesterolu, trójglicerydów, cholesterolu LDL i VLDL (w przeciwieństwie do spadającego poziomu HDL (Hernandes i inni, 2022) (Mattsson i inni, 2007) (Kilim i inni, 2013) (Di Cesare i inni, 2021) (Sharma i inni, 2022).

Mając na uwadze fakt, iż wiek był główną przyczyną wpływającą na możliwość znalezienia cech związanych z ryzykiem zachorowania na BC, dalsze analizy przeprowadzono w mniejszych podgrupach wykazujących się mniejszym zróżnicowaniem wieku.

Zauważono, że w grupie kobiet młodszych i w średnim wieku (zwłaszcza kobiet poniżej 45. roku życia), obniżony poziom di- i tri-glicerydów, fosfatydylocholin, sfingolipidów (ceramidów i sfingomielin) był powiązany ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka piersi. Analogiczne obserwacje odnotowane zostały w ramach wcześniej przeprowadzonych badań przez zespoły Brantley, His, Debik, Lécuyer i Kühn'a (Brantley i inni, 2022) (His i inni, 2019) (Debik i inni, 2022) (Lécuyer i inni, 2018) (Kühn i inni, 2016). Warto zauważyć, że w wyniku przeprowadzonych w ramach rozprawy analiz stwierdzono powiązanie dwóch konkretnych metabolitów: AC(2:0) ze zwiększonym i PC (36:3) ze zmniejszonym ryzykiem BC podobnie jak w pracy His i wsp. (His i inni, 2019). Ponadto, u kobiet, u których w czasie obserwacji rozwinął się rak piersi zaobserwowano obniżony poziom LPC(18:0), co jest spójne z wynikami badań Kühna i jego zespołu (Kühn i inni, 2016).

Obniżone stężenie cząsteczek lipidowych w surowicy może wskazywać na ich zwiększony transport i akumulację w obrębie komórek/tkanki gruczołu, tworząc tym samym zapasy umożliwiające szybki i niekontrolowany podział w przyszłości. Ponadto na drodze tych zmian promowaniu mogą ulec procesy sprzyjające rozwojowi nowotworu. Lipidy odgrywają kluczową rolę w budowie błony komórkowej, w sygnalizacji międzykomórkowej czy magazynowaniu energii w formie kropeł lipidowych. Zwiększona liczba kropeł lipidowych (m.in.: ułatwiających ucieczkę spod adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej organizmu) uważana jest za jedną z charakterystycznych cech komórki nowotworowej. Ponadto krople lipidowe stanowią również fosfolipidowe rezerwuary zaopatrujące komórki nowotworowe w substancje budulcowe, tym samym umożliwiające im szybki wzrost guza. Co więcej na drodze hydrolizy fosfocholiny wytwarzane są lipidowe mediatory promujące przeżycie, proliferację i modulację układu odpornościowego (de Freitas Saito i inni, 2022) (Jin i inni, 2023) (Schwartzburd, 2023). Wpływ na ucieczkę spod nadzoru układu odpornościowego, inicjację i progresję nowotworu ma zwiększenie zawartości sfingomielin (SM) w błonie komórkowej. Poprzez zwiększenie zawartości SM płynność i przepuszczalność błony ulegają zmniejszeniu, wskutek czego utracone zostają mechanizmy zahamowania kontaktowego, ekspresja cząsteczek na powierzchni komórki i koordynacja szlaków sygnałowych. W badaniach dotyczących lipidomiu tkanek nowotworu piersi wykazano zwiększony poziom PE, PI, PC, LPC i SM, co wpisuje się w hipotezę, że zmniejszone stężenie lipidów w surowicy mogłoby wynikać z ich akumulacji w tkance nowotworowej (Cífková i inni, 2014) (Kang i inni, 2011) (Hilvo i inni, 2011) (Tallima i inni, 2021).

W przeprowadzonym badaniu oprócz analizy lipidów określano również stężenia aminokwasów i amin biogennych. Choć wielkość różnic ustalona na podstawie wielkości efektu nie przekraczała progu istotności, dla kilku aminokwasów zauważono podobny trend zmian związany z ryzykiem BC jak we wcześniej opublikowanych pracach. Podobnie jak w badaniach przeprowadzonych przez Yoo, Brantley, Lécuyer, oraz Zeleznik i ich zespoły zauważono, że ryzyko choroby wzrasta wraz ze wzrostem stężenia m.in. waliny, leucyny (Lécuyer i inni 2018) (Yoo i inni 2018) (Brantley i inni 2022) (Zeleznik i inni 2021). Ponadto w wyniku analizy szlaków metabolicznych spostrzeżono, że cząsteczki związane z ryzykiem zachorowania na nowotwór piersi uczestniczą w metabolizmie aminokwasów aromatycznych (Phe, Tyr, Trp) i aminokwasów rozgałęzionych (Val, Leu, Ile), co było spójne z rezultatami otrzymanymi przez Yoo i wsp. (Yoo i inni 2018). W pracy Brantley zasugerowano, że *„zwiększony poziom aminokwasów na wiele lat przed diagnozą zapewnia gościnne środowisko dla komórek nowotworowych. W późniejszym czasie aminokwasy te będą wykorzystywane w celu napędzania rozwoju nowotworu.”* Według większości źródeł literaturowych dotyczących badań profili metabolicznych obecnych w próbkach surowicy/osocza pochodzących od pacjentek w momencie rozpoznania BC i w późniejszych jego stadiach widoczny jest obniżony poziom aminokwasów, co może potwierdzać hipotezę postawioną przez Brantley (Brantley i inni 2022) (Yuan i inni 2018) (Eniu i inni 2019) (Miyagi i inni 2011).

Co ciekawe, w wyniku analiz wykonanych w ramach niniejszej dysertacji zaobserwowano odwrotną zależność pomiędzy stężeniem argininy a ryzykiem raka piersi. Spostrzeżenie to jest spójne z wcześniej wykonanym przez His i wsp. badaniem, w przeciwieństwie do wyników opublikowanych przez grupę Lécuyer, która wskazuje na spadek ryzyka BC wraz ze wzrostem stężenia tego aminokwasu (His i inni, 2019) (Lécuyer i inni, 2018). Warto podkreślić, że wcześniej opublikowane prace, do których porównane zostały otrzymane w ramach dysertacji wyniki, dotyczyły kohort kobiet w różnym wieku (średnia wieku mieściła się w szerokim przedziale od 45 do 68 lat). Inny wiek uczestników (wraz z różnymi platformami analitycznymi i technikami analitycznymi) mógł przyczynić się do ewentualnych rozbieżności pomiędzy badaniami dotyczącymi konkretnych metabolitów np. argininy. Metabolizm argininy jest powiązany z różnymi stanami patologicznymi: od chorób autoimmunologicznych czy zakaźnych, aż po nowotwory. Arginina stanowi substrat szlaków metabolicznych, które wpływają na biologię komórek odpornościowych takich jak makrofagi, komórki NK,

czy limfocyty T. Jej dostępność, synteza, katabolizm, jak i dostrojenie tych procesów może powodować rozbieżne efekty immunologiczne o charakterze pro- lub przeciw- zapalnym. Pierwszy opis szkodliwego wpływu niedoboru argininy w postaci upośledzonej aktywacji ludzkich limfocytów T pochodzi z 1968 (Barile i inni, 1968). Z kolei badania przeprowadzone przez Rodríguez'a i wsp. wykazały, że odpowiedni dostęp do argininy stanowi warunek proliferacji limfocytów T, a eksperymenty wykonane przez zespół Lamas'a ujawniły taki sam efekt, oraz dodatkowe obniżenie cytotoksyczności w przypadku komórek NK (komórek układu odpornościowego posiadających własności naturalnej cytotoksyczności) (Rodríguez i inni, 2006) (Lamas i inni, 2012). Wszystkie te mechanizmy prowadzą do ucieczki komórek spod nadzoru układu odpornościowego. W literaturze istnieją również wzmianki, że immunosupresja wywołana wyczerpaniem argininy jest bardziej korzystna dla wzrostu nowotworu niż ograniczenia wynikające ze zmniejszonego dostępu do tego aminokwasu (Martí i Líndez i inni, 2021). Zatem prawdopodobne jest, że zaobserwowane obniżenie stężenia argininy w surowicy krwi pań, u których w czasie obserwacji wykryto BC to sygnał odzwierciedlający stan sprzyjający rozwojowi raka piersi, szczególnie widoczny w przypadku kobiet poniżej 45 r.ż.

Podsumowując, w rezultacie badań opisanych w niniejszej dysertacji, w zgodzie z wcześniej opublikowanymi pracami, wykazano, że obniżony poziom w surowicy lipidów i oraz kilku aminokwasów wiązał się ze zwiększonym ryzykiem raka piersi.

W dostępnej literaturze można znaleźć doniesienia o obniżonym poziomie niektórych metabolitów we krwi pacjentów onkologicznych, odzwierciedlającym zwiększony transfer do tkanki nowotworowej z powodu wyższego poziomu zużycia tych cząsteczek przez komórki nowotworowe (Koundouros i inni, 2019). Aczkolwiek mało prawdopodobne jest, aby w przypadku kobiet, które w momencie oddania próbki uznawane były za zdrowe, a nowotwór rozwinął się podczas długoletniej obserwacji (1-15 lat) taka sytuacja miała miejsce. Można by spodziewać się, że taki mechanizm będzie zauważalny u pań, u których nowotwór zdiagnozowano w niedługim czasie po włączeniu do badania, jednakże wpływ tych przypadków byłby niski uwzględniając całą, analizowaną kohortę. W ramach projektu wykonano analizę zmian profilu metabolitów w podgrupie kobiet, u których nowotwór piersi zdiagnozowano w ciągu roku od pobrania próbki krwi (analiza nie przedstawiona w rozprawie doktorskiej). W rezultacie porównania przeprowadzonego pomiędzy paniami o wysokim i niskim ryzyku jedynie w przypadku triglicerydów zaobserwowano wzrost ryzyka BC wraz

z obniżonym poziomem tych cząsteczek. Tak więc pozostałe zmiany obserwowane w grupie podwyższonego ryzyka, takie jak wzrost stężenia acylokarnityn, lizofosfatydylocholin, estrów cholesterolu czy heksoz, raczej wskazywały na cechy promujące rozwój nowotworu (np. obecność stanów zapalnych) niż obecność przedklinicznych stadiów choroby nowotworowej (His i inni, 2019) (Hung i inni, 2012) (Knuplez i inni, 2020) (Rutkowski i inni, 2014) (Zhang i inni, 2020). Wiadomo, że przewlekłe procesy zapalne, zarówno ogólnoustrojowe, jak i w prawidłowej tkance piersi, mogą przyczyniać się do rozwoju raka piersi u kobiet (Danforth, 2021).

Chociaż wykazano powiązanie między stężeniami metabolitów w próbkach przed diagnostycznych i czasem do rozpoznania nowotworu piersi, to zależność ta przypuszczalnie odzwierciedlała odwrotną korelację między wiekiem i czasem rozpoznania nowotworu oraz silny związek poziomów metabolitów z wiekiem uczestniczek w momencie dołączenia do badania. Ponadto porównanie pań z grupy HR i odpowiadającym im przypadkom LR wykazało podobny zakres różnic u kobiet, u których BC zdiagnozowano wcześniej (w ciągu 5 lat obserwacji) i później (po ponad 10 lat obserwacji). Co więcej, gdy przeanalizowano osobno podgrupy określone na podstawie wieku, zauważono, iż więcej cząsteczek odróżnia grupę wysokiego i niskiego ryzyka BC w przypadku późno niż wcześniej zdiagnozowanych pań (rozdział 4.2.3). Powyższe spostrzeżenia wskazują więc, iż wykryte w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej zmiany profilu metabolomu w surowicy u kobiet, u których ostatecznie w trakcie obserwacji rozwinął się nowotwór, były związane raczej z czynnikami sprzyjającymi/umożliwiającymi rozwój nowotworu niż zmianami metabolicznymi bezpośrednio związanymi z obecnością choroby bezobjawowej.

5.3. Metabolomiczna sygnatura raka piersi

Metabolity obecne we krwi stanowią potencjalne źródło biomarkerów pozwalających na odróżnienie pacjentek chorych na raka piersi od kobiet wolnych od choroby czy też pacjentek z innymi typami nowotworów. W ramach kolejnego etapu niniejszego projektu doktorskiego, w poszukiwaniu profilu metabolicznego reprezentatywnego dla ogólnoustrojowej dysregulacji metabolicznej spowodowanej rozwojem nowotworu piersi, przeanalizowano cząsteczki obecne w surowicy 112 pacjentek onkologicznych Narodowego Instytutu Onkologii w Gliwicach oraz 95 zdrowych wolontariuszek.

W wyniku pomiarów w surowicy pań ze zdiagnozowanym BC zauważono obniżony poziom większości badanych aminokwasów (z wyjątkiem Arg i Gln), sulfotlenku metioniny, ceramidów, di- i triglicerydów oraz lizofosfatydylocholin, w przeciwieństwie do heksoz (w zbiór których wchodziła m.in. glukoza), acylokarnityn, estrów cholesterolu czy putrescyny, których stężenia były znacząco zwiększone.

Wprawdzie w literaturze nie ma obecnej jednej, uniwersalnej, metabolicznej sygnatury charakterystycznej dla raka piersi, niemniej jednak opisane wyżej wyniki były spójne z większością dostępnych na ten temat prac. Przykładowo, w badaniu przeprowadzonym przez Yuan i wsp. przy użyciu starszej wersji zestawu Biocrates, podobnie jak w analizach wykonanych w dysertacji, wykazano obniżone stężenie aminokwasów (Ala, Asn, Glu, His, Leu, Lys, Met, Orn, Phe, Thr, Trp, Val), dwóch amin (putrescyna i Met-SO) oraz zwiększony poziom acylkarnityn C2 oraz C14:1 w osoczu pacjentek z BC (Yuan i inni, 2018). Ponadto w pracach innych zespołów również wspomniano o obniżonym poziomie aminokwasów w osoczu (Miyagi i inni, 2011) (Jové i inni, 2017) (Fan i inni, 2016) czy surowicy (More i inni, 2018) (Eniu i inni, 2019) kobiet ze zdiagnozowanym nowotworem piersi.

Aminokwasy są cząsteczkami wymaganymi do syntezy nukleotydów i białek, a także pełniącymi inne funkcje np.: sygnalizacyjne (m.in. aktywują szlak mTOR). Metabolizm tej grupy związków odgrywa kluczową rolę w proliferacji komórek raka piersi (Geck i inni, 2016) (Wei i inni, 2021). Szereg badań, w tym analizy przeprowadzone przez zespół More'a (które dowiodły odwrotne zachowanie metabolitów między tkanką a krwią), wykazało że niższy poziom aminokwasów może być powiązany ze zwiększonym zapotrzebowaniem i wychwytem cząsteczek z krwi przez komórki nowotworowe, wynikającą ze zwiększonej ekspresji transporterów aminokwasów takich jak SLC1A5, SLC6A14 czy LAT1 (More i inni, 2018) (Xie i inni, 2015) (Lieu i inni, 2020) (Bel'skaya i inni, 2023).

Co więcej, poprzednie badania również wykazały podwyższony poziom putrescyny oraz glukozy w surowicy lub osoczu kobiet dotkniętych BC (Byun i inni, 2007) (Sieri i inni, 2011) (Eniu i inni, 2019) (Park i inni, 2019) (Kebede i inni, 2022). Zwiększone stężenie poliamin (w tym putrescyny) we krwi kobiet chorych na nowotwór piersi odzwierciedla wzmożoną syntezę poliamin w tkance guza, która spowodowana jest zwiększoną aktywnością enzymów odpowiedzialnych za ten proces. Zwiększona dostępność poliamin przyspiesza wzrost, zwiększa potencjał komórek nowotworowych do inwazji i osłabia przeciwnowotworowe działanie komórek układu odpornościowego (Soda, 2011). Z kolei wysoki poziom glukozy

sprzyja selekcji komórek nowotworowych, które są odporne na niedotlenienie, a wytwarzanie przez nie energii zachodzi na drodze glikolizy. Efekt ten został zaobserwowany i opisany po raz pierwszy przez Otto Warburga. Ponadto wzmożony i szybki metabolizm glukozy poprzez szlak pentozofosforanowy, związany z nadekspresją białka transketolazy TKTL1, może prowadzić do zakwaszenia macierzy, zwiększenia inwazyjności komórek i ostatecznie tworzenia przerzutów. U osób chorych na nowotwór zmieniony metabolizm glukozy przejawia się w zauważalnych ogólnoustrojowych nieprawidłowościach metabolicznych, prowadzących do kacheksji (Földi i inni, 2007) (Wittig i inni, 2007) (Contiero i inni, 2013).

W prezentowanej dysertacji, w surowicy pań z rozpoznaniem BC zaobserwowano znacznie niższe poziomy lizofosfatydylocholin niż w grupie kontrolnej. Spostrzeżenie to jest spójne z wynikami opublikowanymi przez grupę Fan, Qiu oraz Chen (Fan i inni, 2016) (Qiu i inni, 2013) (Chen i inni, 2016). W swojej pracy Qiu wraz ze współpracownikami, wykazali że LPC(16:0) oraz LPC(18:0) to dwa najsilniej różnicujące metabolity (tj.: charakteryzujące się najniższą p-wartością) pomiędzy kobietami z nowotworem piersi, a paniami wolnymi od choroby. Również Kühn wraz z zespołem potwierdzili wcześniejsze spostrzeżenia dotyczące zmian LPC(18:0). W niniejszej analizie obie lizofosfatydylocholiny, tj. LPC(16:0) i LPC(18:0), również stanowiły związki, które najbardziej odróżniały porównywane grupy pań spośród badanych cząsteczek w obrębie tej grupy lipidów. Obniżone poziomy LPC w surowicy przypuszczalnie odzwierciedlają ich transfer do tkanki nowotworowej i większe zużycie przez komórki nowotworowe. Spekuluje się, że LPC pełnią również role sygnalizacyjne, jednakże to zagadnienie w dalszym ciągu stanowi temat trwających badań. Krzeszinski i wsp. w rezultacie przeprowadzonych eksperymentów na komórkach raka piersi dowiedli, że dodane do pożywki LPC(18:0) i LPC(16:0) hamują migrację oraz nasilają apoptozę komórek nowotworowych poprzez indukcję ekspresji genów proapoptotycznych (np.: Bax), i jednocześnie hamowanie ekspresji genów antyapoptotycznych takich jak Bcl2 (Krzeszinski i inni, 2016). Z kolei Kühn poddaje dyskusji możliwość, że to produkty degradacji LPC (np.: kwas lizofosfatydowy (LPA)) wspierają powstawanie i rozwój nowotworów, w tym BC (Kühn i inni, 2016). Co więcej, w skutek nadekspresji acylotransferazy lizofosfatydylocholiny 1 (LPCAT1) przekształcającej LPC w PC następuje nasilone wbudowanie fosfatydylocholin w błonę komórkową, co prawdopodobnie ułatwia proliferację, adhezję oraz wpływa na ruchliwość komórek nowotworowych (Abdelzaher i inni, 2015). Wszystkie przytoczone wyniki wskazują, że odnotowane w ramach niniejszej rozprawy obniżenie poziomu lizofosfatydylocholin

w surowicy pacjentek z rakiem piersi wspiera rozwój nowotworu, niewątpliwie wpływając na zdolność do podziału i poruszania się komórek nowotworowych.

W tym miejscu należy podkreślić, że nie wszystkie wzorce metaboliczne opisane w dostępnych źródłach literaturowych pokrywają się z zaproponowaną w ramach dysertacji sygnaturą raka piersi. Na przykład przytoczone wcześniej badanie przeprowadzone przez Fan i wsp., oparte na kombinacji LC-MS i GC-MS oprócz obniżonego poziomu LPC i AA, czy zwiększonego poziomu Gln i AC(2:0) w osoczu par chorych na BC (obserwacja spójna z rezultatami niniejszych badań), wskazują na niższy poziom glukozy i wyższy poziom izoleucyny w materiale pochodzącym od pacjentek onkologicznych (Fan i inni, 2016). Ponadto analiza metabolomu osocza wykonana z zastosowaniem 3 różnych technik NMR, LC-MS i GC-MS, przeprowadzona w grupie latynoskich kobiet chorych na raka piersi, podobnie jak w tejże dysertacji ujawniła zwiększone stężenie kilku acylokarnityn, jednocześnie wykazując wzrost poziomu trójglicerydów i lizofosfatydylocholin (Cala i inni, 2018), co było niezgodne z uzyskanymi rezultatami. Z kolei grupa badaczy z Iranu badając surowice 22 kobiet z inwazyjnym, przewodowym rakiem piersi zaobserwowała wzrost poziomu stężenia tyrozyny (co było niezgodne z niniejszym badaniem), w tym samym momencie dostrzegając obniżony poziom związków należących do grupy triglicerydów (podobnie jak powyżej opisane analizy) (Amiri-Dashatan i inni, 2022).

Wszystkie wymienione niespójności widoczne pomiędzy pracami różnych grup mogą wynikać z zastosowania różnych technik analitycznych oraz braku jednolitości protokołów analitycznych i klinicznych. Ponadto tak jak wykazano w rozdziale 4.2.2 wiek dawców może stanowić czynnik zakłócający, co sugeruje, że różnice rezultatów mogą być spowodowane różnorodnością cech demograficznych i stylu życia wśród badanych kohort (His i inni, 2021).

Podsumowując, pomimo istnienia różnic pomiędzy opublikowanymi wynikami badań, to zaburzony metabolizm aminokwasów (widoczny w formie zmniejszonego stężenia AA w surowicy/osoczu) oraz glikoliza (przejawiająca się podwyższonym poziomem glukozy) okazały się ogólnymi cechami metabolicznymi obserwowanymi we krwi chorych na raka piersi.

5.4. Metaboliczna sygnatura czterech nowotworów litych

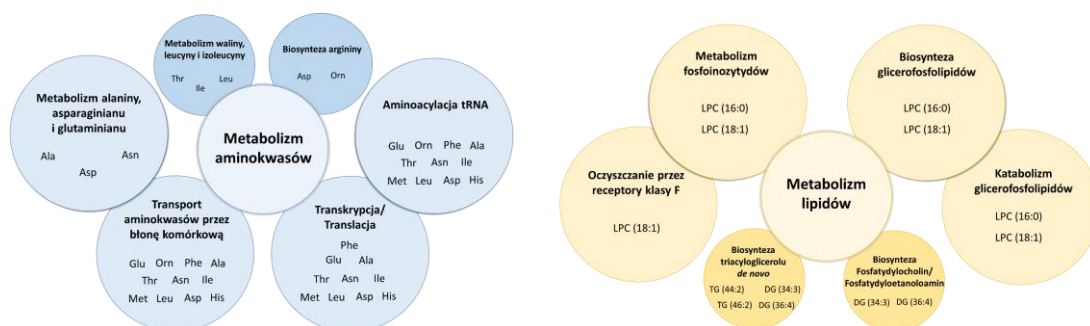
Chociaż główne cechy zmienionego metabolizmu komórek nowotworowych zostały poznane (patrz rozdział 1.2.1), to cechy swoiste dla różnych typów nowotworów w dalszym ciągu pozostają tematem licznych projektów badawczych (Goveia i inni, 2016) (Patela i inni, 2014) (Miyagi i inni, 2011). Na przykład Budhu wraz z zespołem przeprowadzili analizę profili metabolicznych tkanek piersi, trzustki i wątroby objętych chorobą nowotworową oraz tkanek prawidłowych. Porównanie cząsteczek różnicujących tkankę nowotworową i zdrową dla wszystkich narządów wykazało 4 wspólne związki butyrylokarnitynę, heksanokarnitynę, glicerol i linolenian. Ponadto zidentyfikowano zmiany swoiste dla poszczególnych rodzajów nowotworu, w tym zmiany w obrębie: 43 metabolitów dla raka wątroby, 35 dla raka trzustki oraz 106 dla raka piersi (Budhu i inni, 2014).

W ramach rozprawy doktorskiej przeanalizowano profile metaboliczne surowicy krwi pacjentek z rozpoznanymi czterema typami nowotworów litych. Zestawiając cząsteczki różnicujące pacjentki chorujące na dany typ nowotworu z kobietami zdrowymi zauważono kilka różnic we wzorach zmian metabolomu pomiędzy badanymi typami guzów. Przykładem mogą być różne profile lipidowe surowicy. U chorych na raka piersi nie obserwowano obniżonego poziomu fosfatydylocholin czy estrów cholesterolu, które były charakterystyczne dla chorych na raka głowy i szyi, płuc oraz jelita grubego. Ponadto jedynie w przypadku kobiet z BC spostrzeżono wzrost stężenia acylkarnityn. Niemniej jednak zidentyfikowano zestaw metabolitów, który w sposób uniwersalny odróżniał grupę kontrolną od pacjentek ze wszystkimi typami badanych nowotworów. Zbiór ten zawierał 28 cząsteczek i składał się z: obniżonego poziomu 10 aminokwasów, 4 di- i tri- glicerydów i 13 lizofosfatydylocholin (oraz zagregowanego stężenia wszystkich LPC) i zwiększonego stężenia acylkarnityny C14:1. Co więcej, dla większości próbek nowotworów charakterystyczny był podwyższony poziom glukozy w surowicy.

Cechą charakterystyczną hipotetycznej sygnatury raka był obniżony poziom większości aminokwasów w surowicy. Zmiany tego typu zostały już dobrze opisane i udokumentowane np.: w artykule zespołu Miyagi. Zespół ten wykazał zmiany w profilach AA pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem płuc, żołądka, jelita grubego, piersi i prostaty, także tych we wczesnych stadiach choroby (Miyagi i inni, 2011). Odkrycie tego zjawiska doprowadziło

do opracowania i wdrożenia klinicznego testu przesiewowego oceniającego ryzyko wystąpienia określonych nowotworów AminoIndex (AICS). W kwietniu 2011 r AICS został wprowadzony na rynek i jest dostępny w ponad 1500 szpitalach i klinikach w Japonii (Nagao i inni, 2020). Inną cechą związaną z nowotworem była dyslipidemia, której rola w nowotworzeniu jest intensywnie badana na przestrzeni ostatnich lat. W wyniku analiz spostrzeżono obniżony poziom lipidów (glicerydów, fosfolipidów, sfingolipidów) w surowicy pacjentów onkologicznych spowodowany zwiększonym ich wykorzystaniem przez komórki nowotworowe (Wang i inni, 2020). Największe różnice stężeń zaobserwowano w przypadku lizofosfatydylocholin, a w szczególności związków zawierających w swojej budowie łańcuch kwasu palmitynowego, stearynowego lub oleinowego (LPC(16:0), LPC(18:0) i LPC(18:1)). Metabolizm fosfatydylocholin w komórkach nowotworowych ulega zaburzeniu, co wywołuje zmianę poziomów ich prekursorów (np. choliny) i/lub pochodnych (np. lizofosfatydylocholin) we krwi (Ackerstaff i inni, 2003). Ponadto obniżony poziom LPC u pacjentów chorych na raka wiąże się z wysoką aktywnością metaboliczną, a także może stanowić wskaźnik zaawansowania choroby (Luo i inni, 2017). Co więcej, zarówno w rezultacie analiz przeprowadzonych w ramach niniejszej dysertacji (patrz Rozdział 4.3), jak i w pracach opublikowanych przez zespoły Kühn'a czy Widłaka powiązano obniżony poziom LPC(18:0) ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia nowotworów takich jak rak piersi, prostaty, płuca, czy jelita grubego (Kühn i inni, 2016) (Widłak i inni, 2021).

W związku z dokonanymi obserwacjami należy przyjąć, że różnice w stężeniach cząsteczek widoczne pomiędzy kobietami zdrowymi i chorymi na nowotwory były związane z deregulacją szlaków związanych z metabolizmem aminokwasów, glikolizą, metabolizmem lipidów i mechanizmami obrony przed uszkodzeniami oksydacyjnymi (Rysunek 39).



Rysunek 39 Graficzne podsumowanie zmienionych szlaków metabolicznych związanych ze związkami ujętymi w sygnaturze „pan-cancer”. Ala- alanina; Asn- asparagina; Asp- asparaginan; Glu- glutaminian; His- histydyna; Ile- izoleucyna; Leu- leucyna; Met- metionina; Orn- ornityna; Phe- fenyloalanina; Thr- treonina; DG- diglicerydy; TG- triglicerydy; LPC- lizofosfatydylocholina;

5.5. Podsumowanie

Wysokoprzepustowe podejście metabolomiczne, oparte o technikę spektrometrii mas, które zostało zastosowane w niniejszej dysertacji ujawniło cechy profilu metabolitów obecnych w surowicy kobiet związane z ryzykiem zachorowania na raka piersi. Niestety, pomimo mocnych stron modelu badawczego (stosunkowo dużej liczby uczestników i zastosowanej platformy analitycznej umożliwiającej pomiar ilościowy ponad 400 związków), związek zidentyfikowanych metabolitów z ryzykiem raka piersi nie miał dużej siły statystycznej, co wskazuje na niewielki potencjał zastosowania hipotetycznej sygnatury metabolomicznej jako testu możliwego do zastosowania w badaniach przesiewowych. Tym niemniej, dzięki wykorzystaniu reprezentatywnej kohorty wykazano, że wpływ wieku na metabolizm stanowi ważną przeszkodę w badaniu skierowanym na poszukiwanie biomarkerów ryzyka choroby.

Ponadto w rezultacie przeprowadzonych analiz zaproponowano cechy charakterystyczne metabolomu pacjentek z rozpoznanym klinicznie nowotworem piersi. Wykazano również, że cząsteczki kluczowe dla odróżnienia pacjentek z rakiem piersi od grupy kontrolnej pokrywały się ze związkami, które różnicowały kobiety chore na inne nowotwory łagodne od grupy zdrowych par. Dzięki temu w ramach dysertacji wykazano istnienie wzoru zmian 28 metabolitów, o potencjalnym zastosowaniu jako ogólnego biomarkera metabolicznego nowotworów (oczywiście po jego kompleksowej walidacji).

W pracy zwrócono szczególną uwagę na znaczenie sposobu projektowania doświadczenia zapewniającego jakość danych. Między innymi zaproponowano schemat wstępnego przetwarzania i analizy danych otrzymanych w wyniku badania wielkoskalowego, trwającego przez dłuższy okres czasu. Należy jednak podkreślić, iż w badaniach metabolomicznych konieczna jest analiza wpływu wieku, diety i stylu życia na metabolom, tak aby poprawić rozumienie otrzymanych rezultatów. W dalszym ciągu istnieje realna potrzeba lepszej standaryzacji metod przygotowania próbek, identyfikacji metabolitów oraz raportowania i deponowania danych dotyczących metabolomu człowieka.

6. Wnioski

- 1) Wiek uczestników badania stanowi istotny czynnik wywierający wpływ na zmiany stężeń metabolitów, a badania takie jak wykonane w ramach niniejszej dysertacji należy przeprowadzać na grupach charakteryzujących się mniejszym rozrzutem wieku dawców zapewniając podobną strukturę wieku porównywanych grup.
- 2) Obniżone stężenie lipidów i aminokwasów w surowicy jest związane z podwyższonym ryzykiem raka piersi w grupie zdrowych kobiet, jednak brak uniwersalnego wzoru zmian (wspólnego dla różnych grup wiekowych) i niewielka moc statystyczna różnic nie pozwalają na zaproponowanie metabolicznej sygnatury ryzyka.
- 3) Obniżony poziom większości aminokwasów (z wyjątkiem Arg i Gln), ceramidów, glicerydów i lizofosfatydylocholin, oraz zwiększone stężenie heksoz i acylokarnityn to cechy charakterystyczne metabolomu surowicy pacjentek z rakiem piersi.
- 4) Zestaw metabolitów odróżniających osoby zdrowe od pacjentek z rakiem piersi zawierał cząsteczki wchodzące w skład hipotetycznej uniwersalnej sygnatury raka charakterystycznej dla wielu nowotworów litych.

7. Bibliografia

- Abdelzaher Eman i Mostafa Mohamed Farouk . 2015. Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) upregulation in breast carcinoma contributes to tumor progression and predicts early tumor recurrence. *Tumor Biology*. 16 Luty 2015, strony 5473-83.
- Ackerstaff Ellen , Glunde Kristine i Bhujwalla Zaver M. . 2003. Choline Phospholipid Metabolism: A Target in Cancer Cells? *Journal of Cellular Biochemistry*. 19 Wrzesień 2003, strony 525-533.
- Admoun Claudia i Mayrovitz Harvey N. . 2022. The Etiology of Breast Cancer. [red.] Mayrovitz Harvey N. *Breast Cancer*. Brisbane : Exon Publications, 2022, strony 21-30.
- Albeshan Salman M. i inni. 2020. Can Breast Self-examination and Clinical Breast Examination Along With Increasing Breast Awareness Facilitate Earlier Detection of Breast Cancer in Populations With Advanced Stages at Diagnosis? *Clinical Breast Cancer*. Czerwiec 2020, strony 194-200.
- Alseekh Saleh i inni. 2021. Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices. *Nature Methods*. 8 Lipiec 2021, strony 747-756.
- American Cancer Society. 2021. Breast Cancer. [Online] 19 Listopad 2021. [Zacytowano: 23 Maj 2023.] <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/about/what-is-breast-cancer.html>.
- American College of Surgeons. [facs.org](https://www.facs.org). [Online] [Zacytowano: 18 Lipiec 2023.] <https://www.facs.org/for-patients/home-skills-for-patients/breast-cancer-surgery/breast-cancer-types/breast-cancer-staging/>.
- Amiri-Dashatan Nasrin i inni. 2022. Metabolomic study of serum in patients with invasive ductal breast carcinoma with LC-MS/MS approach. *The International Journal of Biological Markers*. 27 Wrzesień 2022, strony 349-359.
- Araújo Ana Margarida i inni. 2021. Toxicometabolomics: Small Molecules to Answer Big Toxicological Questions. *Metabolites*. 9 Październik 2021.
- Arnold Melina i inni. 2022. Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *Breast*. 2 wrzesień 2022, strony 15-23.
- Auro Kirs i inni. 2014. A metabolic view on menopause and ageing. *Nature communications*. 21 Sierpień 2014, str. 4708.
- Balasubramanian Raji i inni. 2020. Metabolomic effects of hormone therapy and associations with coronary heart disease among postmenopausal women. *Circulation: Genomic and Precision Medicine*. 3 Listopad 2020, str. e002977.
- Barile Michael F. i Leventhal Brigid G. 1968. Possible mechanism for Mycoplasma inhibition of lymphocyte transformation induced by phytohaemagglutinin. *Nature*. 17 Sierpień 1968, strony 751-752.
- Beger Richard D. . 2013. A Review of Applications of Metabolomics in Cancer. *Metabolites*. 24 Czerwiec 2013, strony 552-574.
- Bel'skaya Lyudmila V. , Gundyrev Ivan A. i Solomatin Denis V. . 2023. The Role of Amino Acids in the Diagnosis, Risk Assessment, and Treatment of Breast Cancer: A Review. *Current Issues in Molecular Biology*. 13 Wrzesień 2023, strony 7513–7537.
- Beňačka Roman i inni. 2022. Classic and New Markers in Diagnostics and Classification of Breast Cancer. *Cancers*. 5 Listopad 2022.

- Benjamini Yoav i Hochberg Yosef . 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society*. 1995, strony 289-300.
- Bian Xueli i inni. 2020. Lipid metabolism and cancer. *Journal of Experimental Medicine* . 26 Październik 2020.
- Brantley Kristen D. i inni. 2022. Plasma Metabolomics and Breast Cancer Risk over 20 Years of Follow-up among Postmenopausal Women in the Nurses' Health Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* . 1 Kwiecień 2022, strony 839–50.
- Brizzi Patrizia i inni. 1999. Lipoprotein metabolism during normal pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology* . 16 Marzec 1999, strony 430-434.
- Bromke Mariusz A. i inni. 2015. Metabolomic Profiling of 13 Diatom Cultures and Their Adaptation to Nitrate-Limited Growth Conditions. *PLoS One*. 6 Październik 2015.
- Brunius Carl , Shi Lin i Landberg Rikard . 2016. Large-scale untargeted LC-MS metabolomics data correction using between-batch feature alignment and cluster-based within-batch signal intensity drift correction. *Metabolomics*. 22 Wrzesień 2016, strony 1-13.
- Brunner Julia S. i Finley Lydia W.S. . 2021. SnapShot: cancer metabolism. *Molecular Cell* . 16 Wrzesień 2021, str. 3878.
- Budhu Anuradha i inni. 2014. Metabolic Profiles are Principally Different between Cancers of the Liver, Pancreas and Breast. *International Journal of Biological Sciences*. 30 Sierpień 2014, strony 966-972.
- Byun Jeong Ah i inni. 2007. Analysis of polyamines as carbamoyl derivatives in urine and serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 6 Czerwiec 2007, strony 73-80.
- Cala Mónica P. i inni. 2018. Multiplatform plasma metabolic and lipid fingerprinting of breast cancer: A pilot control-case study in Colombian Hispanic women. *PloS one*. 13 Luty 2018, str. e0190958.
- Cancer Research UK. 2023. cancerresearchuk. [Online] 2023. [Zacytowano: 18 Lipiec 2023.] <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/survival>.
- Castelli Florence Anne i inni. 2021. Metabolomics for personalized medicine: the input of analytical chemistry from biomarker discovery to point-of-care tests. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 27 Lipiec 2021, strony 759–789.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2022. Breast Cancer. [Online] 26 Wrzesień 2022. [Zacytowano: 23 Maj 2023.] https://www.cdc.gov/cancer/breast/basic_info/what-is-breast-cancer.htm.
- Chae Hee-Suk i Hong Seong-Tshool . 2022. Overview of Cancer Metabolism and Signaling Transduction. *International Journal of Molecular Sciences*. 20 Grudzień 2022.
- Chen Chi-Ling , Weiss Noel S. i Newcomb Polly . 2002. Hormone replacement therapy in relation to breast cancer. *Jama*. 13 Luty 2002, strony 734-741.
- Chen Ming i Huang Jiaoti . 2019. The expanded role of fatty acid metabolism in cancer: new aspects and targets. *Precision Clinical Medicine*. 19 Sierpień 2019, strony 183-191.
- Chen Xiaoli i inni. 2016. Plasma lipidomics profiling identified lipid biomarkers in distinguishing early-stage breast cancer from benign lesions. *Oncotarget*. 2 Maj 2016, strony 36622–36631.

- Chetwynd Andrew J. , Dunn Warwick B. i Rodriguez-Blanco Giovanni . 2017. Collection and Preparation of Clinical Samples for Metabolomics. *Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications*. brak miejsca : Springer International Publishing AG, 2017, strony 26-29.
- Cheung Pro Kit i inni. 2019. The applications of metabolomics in the molecular diagnostics of cancer. *Expert review of molecular diagnostics*. 15 Sierpień 2019, strony 785-793.
- Cífková Eva i inni. 2014. Determination of lipidomic differences between human breast cancer and surrounding normal tissues using HILIC-HPLC/ESI-MS and multivariate data analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 29 Październik 2014, strony 991-1002.
- Cohen Jacob. 1988. *Statistical power analysis for the behavioral sciences- 2nd ed*. New York : Lawrence Erlbaum Associates Inc, 1988.
- Coleman Cathy. 2017. Early detection and screening for breast cancer. *Seminars in Oncology Nursing*. maj 2017, strony 141-155.
- Conover William i Iman Roland. 1979. On multiple-comparisons procedures. *Los Alamos Sci. Lab. Tech. Rep. LA-7677-MS 1*. 1979.
- Conover William. 1999. *Practical nonparametric statistics*. Hoboken : Wiley, 1999.
- Contiero Paolo i inni. 2013. Fasting blood glucose and long-term prognosis of non-metastatic breast cancer: a cohort study. *Breast cancer research and treatment*. 9 Kwiecień 2013, strony 951–959.
- Corbex Marilys , Burton Robert i Sancho-Garnier Hélène . 2012. Breast cancer early detection methods for low and middle income countries, a review of the evidence. *The Breast*. 4 Styczeń 2012, strony 428-434.
- Cserni Gábor i inni. 2018. The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Archiv*. 27 styczeń 2018, strony 697–703.
- Cui Xiujuan i inni. 2019. Differential metabolomics networks analysis of menopausal status. *PLoS One*. 18 Wrzesień 2019, st. e0222353.
- Danforth David N. . 2021. The role of chronic inflammation in the development of breast cancer. *Cancers*. 3 August Sierpień 2021, str. 3918.
- Danzi Federica i inni. 2023. To metabolomics and beyond: a technological portfolio to investigate cancer metabolism. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 22 Marzec 2023.
- de Freitas Saito Renata i inni. 2022. Phosphatidylcholine-Derived Lipid Mediators: The Crosstalk Between Cancer Cells and Immune Cells. *Frontiers in Immunology*. 15 Luty 2022.
- De Santis Maria Chiara i inni. 2018. Signaling Pathways Regulating Redox Balance in Cancer Metabolism. *Frontiers in oncology*. 23 Kwiecień 2018.
- De Vitto Humberto , Pérez-Valencia Juan i Radosevich James A. . 2015. Glutamine at focus: versatile roles in cancer. *Tumor Biology*. 24 Grudzień 2015, strony 1541–1558.
- DeBerardinis Ralph J. i Chandel Navdeep S. . 2016. Fundamentals of cancer metabolism. *Science advances*. 27 Maj 2016.
- Debik Julia i inni. 2022. Lipoprotein and metabolite associations to breast cancer risk in the HUNT2 study. *British Journal of Cancer* . 14 Lipiec 2022, strony 1515–1524.

- Debik Julia i inni. 2022. Lipoprotein and metabolite associations to breast cancer risk in the HUNT2 study. *British Journal of Cancer*. 4 Sierpień 2022, strony 1515–1524.
- Dettmer Katja , Aronov Pavel A. i Hammock Bruce D. . 2006. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass spectrometry reviews*. 18 Sierpień 2006, strony 51-78.
- Di Cesare Francesca i inni. 2021. Age- and sex-dependent changes of free circulating blood metabolite and lipid abundances, correlations, and ratios. *Journals of Gerontology: Biological Sciences*. 8 Listopad 2021, strony 918-926.
- Ding Jun i Feng Yu-Qi . 2022. Mass spectrometry-based metabolomics for clinical study: Recent progresses and applications. *Trends in Analytical Chemistry*. 20 Grudzień 2022.
- Domagała Wenancjus . 2007. Molekularne podstawy karcynogenezy i ścieżki sygnałowe niektórych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego. *Polski Przegląd Neurologiczny*. 7 Wrzesień 2007, strony 127-141.
- Dona Anthony C. i inni. 2016. A guide to the identification of metabolites in NMR-based metabonomics/metabolomics experiments. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 23 Luty 2016, strony 135–153.
- Duffy Michael J. i inni. 2015. Biomarkers in breast cancer: where are we and where are we going? *Advances in clinical chemistry*. 2015, strony 1-23.
- Eniu Dan Tudor i inni. 2019. The decrease of some serum free amino acids can predict breast cancer diagnosis and progression. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 16 Marzec 2019, strony 17-24.
- Fan Yong i inni. 2016. Human plasma metabolomics for identifying differential metabolites and predicting molecular subtypes of breast cancer. *Oncotarget*. 1 Marzec 2016, strony 9925-38.
- Finley Lydia W.S. . 2023. What is cancer metabolism? *Cell*. 13 Kwiecień 2023, strony 1670-1688.
- Fisher Ronald. 1934. *Statistical methods for research workers, 5th ed*. Edinburgh : Oliver and Boyd, 1934.
- . 1935. The Logic of Inductive Inference. *Journal of the Royal Statistical Society*. 1935, strony 39-82.
- Földi Martha i inni. 2007. Transketolase protein TKTL1 overexpression: A potential biomarker and therapeutic target in breast cancer. *Oncology reports* . 1 Kwiecień 2007, strony 841-845.
- Food and Drug Administration. 2022. *M10 Bioanalytical method validation and study sample analysis*. Rockvill, Listopad 2022.
- Ganna Andrea i inni. 2014. Large-scale metabolomic profiling identifies novel biomarkers for incident coronary heart disease. *PLoS genetics*. 11 Grudzień 2014, str. e1004801.
- Geck Renee C. i Toker Alex . 2016. Nonessential amino acid metabolism in breast cancer. *Advances in Biological Regulation*. 21 Styczeń 2016, strony 11-17.
- Ginsburg Ophira i inni. 2020. Breast Cancer Early Detection: A Phased Approach to Implementation. *Cancer*. 29 Kwiecień 2020, strony 2379-2393.
- Godsland Ian F. . 2001. Effects of postmenopausal hormone replacement therapy on lipid, lipoprotein, and apolipoprotein (a) concentrations: analysis of studies published from 1974–2000. *Fertility and sterility*. 18 Styczeń 2001, strony 898-915.
- Gomase Virendra i inni. 2008. Metabolomics. *Current drug metabolism*. 9 Styczeń 2008, strony 89-98.

- Goveia Jermaine i inni. 2016. Meta-analysis of clinical metabolic profiling studies in cancer: challenges and opportunities. *EMBO molecular medicine*. 6 Wrzesień 2016, strony 1134-1142.
- Gowda G.A. Nagana i Raftery Daniel . 2015. Can NMR solve some significant challenges in metabolomics? *Journal of Magnetic Resonance*. 14 Lipiec 2015, strony 144–160.
- Gromski Piotr S. i inni. 2014. Influence of missing values substitutes on multivariate analysis of metabolomics data. *Metabolites*. 16 Czerwiec 2014, strony 433-452.
- Gu Yuchao i inni. 2010. GlcNAcylation Plays an Essential Role in Breast Cancer Metastasis. *Cancer research* . 28 Lipiec 2010, strony 6344–6351.
- Guo Fanjing i inni. 2023. Concordance-Based Batch Effect Correction for Large-Scale Metabolomics. *Analytical Chemistry*. 28 Kwiecień 2023, str. 7220–7228.
- Günther Ulrich L. 2015. Metabolomics Biomarkers for Breast Cancer. *Pathobiology*. Wrzesień 2015, strony 153-165.
- Haelle Tara. 2022. everydayhealth. [Online] 14 Luty 2022. [Zacytowano: 18 Lipiec 2023.] <https://www.everydayhealth.com/breast-cancer/stages-what-they-mean/>.
- Haince Jean-François i inni. 2022. Metabolomic Fingerprinting for the Detection of Early-Stage Lung Cancer: From the Genome to the Metabolome. *International Journal of Molecular Sciences*. 21 Styczeń 2022.
- Han Wei i Li Liang . 2020. Evaluating and minimizing batch effects in metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*. 29 Październik 2020, strony 421–442.
- Hernandes Vinicius Verri i inni. 2022. Age, sex, body mass index, diet and menopause related metabolites in a large homogeneous alpine cohort. *Metabolites*. 24 Luty 2022, str. 205.
- Herrera Eloisa. 2000. Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *European journal of clinical nutrition*. 1 Marzec 2000, strony 47-51.
- Hilvo Mika i inni. 2011. Novel Theranostic Opportunities Offered by Characterization of Altered Membrane Lipid Metabolism in Breast Cancer Progression. *Cancer research*. 29 Kwiecień 2011, strony 3236-3245.
- His Mathilde i inni. 2021. Lifestyle correlates of eight breast cancer-related metabolites: a cross-sectional study within the EPIC cohort. *BMC medicine*. 10 Grudzień 2021, str. 312.
- His Mathilde i inni. 2019. Prospective analysis of circulating metabolites and breast cancer in EPIC. *BMC Medicine*. 24 Wrzesień 2019.
- Houghton Serena C. i Hankinson Susan E. . 2021. Cancer Progress and Priorities: Breast Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. Maj 2021, strony 822–844.
- Hrydziusko Olga i Viant Mark R. . 2011. Missing values in mass spectrometry based metabolomics: an undervalued step in the data processing pipeline. *Metabolomics*. 8 Październik 2011, strony 161-174.
- Hung Nguyen Dang , Sok Dai-Eun i Kim Mee Ree . 2012. Prevention of 1-palmitoyl lysophosphatidylcholine-induced inflammation by polyunsaturated acyl lysophosphatidylcholine. *Inflammation Research* . 18 Styczeń 2012, strony 473-483.
- Jain Anil, Murty Narasimha i Flynn Patrick J. . 1999. Data clustering: a review. *ACM computing surveys (CSUR)* . 1999, strony 264-323.
- Jin Yi i inni. 2023. Lipid droplets: a cellular organelle vital in cancer cells. *Cell Death Discovery*. 20 Lipiec 2023.

- Jové Mariona i inni. 2017. A plasma metabolomic signature discloses human breast cancer. *Oncotarget*. 5 Styczeń 2017, strony 19522–19533.
- Jung Seungyoun i inni. 2023. Untargeted serum metabolomic profiles and breast density in young women. *Cancer Causes & Control*. 22 Wrzesień 2023, strony 1-12.
- Kalli Sirishma i inni. 2018. American Joint Committee on Cancer's Staging System for Breast Cancer, Eighth Edition: What the Radiologist Needs to Know. *Radiographics*. 31 maj 2018, strony 1921–1933.
- Kang Han Sung i inni. 2011. Protein and lipid MALDI profiles classify breast cancers according to the intrinsic subtype. *BMC Cancer*. 27 Październik 2011, strony 1-9.
- Kang Yang , Schneider Bradley B. i Covey Thomas R. . 2017. On the Nature of Mass Spectrometer Analyzer Contamination. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* . 21 Lipiec 2017, strony 2384–2392.
- Kebede Tinfash i inni. 2022. Assessment of serum uric acid, urea, and glucose levels and associated factors among breast cancer patients attending a tertiary hospital in bahirdar, ethiopia: a comparative cross-sectional study. *Ethiopian Journal of Health Sciences*. 1 Listopad 2022, strony 1183-1192.
- Kilim Srinivas R. i Chandala Srinivasa R. 2013. A comparative study of lipid profile and oestradiol in pre- and post-menopausal women. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR* . 1 Sierpień 2013, str. 1596.
- Kiseleva Olga i inni. 2021. Defining Blood Plasma and Serum Metabolome by GC-MS. *Metabolites*. 21 Grudzień 2021.
- Knuplez Eva i Marsche Gunther . 2020. An updated review of pro-and anti-inflammatory properties of plasma lysophosphatidylcholines in the vascular system. *International Journal of Molecular Sciences*. 24 Czerwiec 2020, str. 4501.
- Kosmides Alyssa K. i inni. 2014. Metabolomic Fingerprinting: Challenges and Opportunities. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*. 14 Lipiec 2014, strony 205-221.
- Koundouros Nikos i Poulogiannis George . 2019. Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. *British journal of cancer*. 10 Grudzień 2019, strony 4-22.
- Krokstad Steinar i inni. 2013. Cohort Profile: the HUNT Study, Norway. *International Journal of Epidemiology*. Sierpień 2013, strony 968–977.
- Kruskal William H. i Wallis W. Allen . 1952. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association*. Grudzień 1952, strony 583-621.
- Krzeszinski Jing Y. i inni. 2016. Lipid Osteoclastokines Regulate Breast Cancer Bone Metastasis. *Endocrinology*. 14 Grudzień 2016, strony 477-489.
- Kühn Tilman i inni. 2016. Higher plasma levels of lysophosphatidylcholine 18:0 are related to a lower risk of common cancers in a prospective metabolomics study. *BMC Medicine*. 28 Styczeń 2016, strony 1-9.
- Kvale Gunnar , Heuch Ivar i Elde Geir Egil. 1987. A prospective study of reproductive factors and breast cancer: I. Parity. *American journal of epidemiology*. Listopad 1987, strony 831–841.
- Lamas Bruno i inni. 2012 . Altered functions of natural killer cells in response to L-Arginine availability. *Cellular immunology*. 19 Grudzień 2012 , strony 182-190.

- Lécuyer Lucie i inni. 2018. NMR metabolomic signatures reveal predictive plasma metabolites associated with long-term risk of developing breast cancer. *International Journal of Epidemiology*. 1 Kwiecień 2018, strony 484-494.
- Lee Jae W. i inni. 2019. Hypoxia signaling in human diseases and therapeutic targets. *Experimental & Molecular Medicine*. 20 Czerwiec 2019, strony 1-13.
- Levenson Victor V. . 2007. Biomarkers for early detection of breast cancer: What, when, and where? *Biochimica et Biophysica Acta*. 31 Styczeń 2007, strony 847–856.
- Li Chunxia i inni. 2016. Metabolic reprogramming in cancer cells: glycolysis, glutaminolysis, and Bcl-2 proteins as novel therapeutic targets for cancer. *World Journal of Surgical Oncology*. 20 Styczeń 2016.
- Lieu Elizabeth L. i inni. 2020. Amino acids in cancer. *Experimental & Molecular Medicine*. 24 Styczeń 2020, strony 15-30.
- Lin Xiaoping i inni. 2020. Glucose Metabolism on Tumor Plasticity, Diagnosis, and Treatment. *Frontiers in oncology*. 6 Marzec 2020, str. 317.
- Lindsay Karen L. i inni. 2015. Longitudinal metabolomic profiling of amino acids and lipids across healthy pregnancy. *PloS one*. 30 Grudzień 2015, str. e0145794.
- Liu Qin i inni. 2020. Addressing the batch effect issue for LC/MS metabolomics data in data preprocessing. *Scientific reports*. 17 Sierpień 2020, str. 13856.
- Liu Xiaojing i Locasale Jason W. 2017. Metabolomics: A Primer. *Trends in Biochemical Sciences*. 11 Luty 2017, strony 274-284.
- Loke Sau Yeen i Lee Ann Siew Gek . 2017. The future of blood-based biomarkers for the early detection of breast cancer. *European Journal of Cancer*. 21 Grudzień 2017, strony 54-68.
- Lopes Aline Soriano i inni. 2017. Metabolomic Strategies Involving Mass Spectrometry Combined with Liquid and Gas Chromatography. [red.] Sussulini Alessandra. *Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Application* : Springer International Publishing AG, 2017, strony 77-98.
- Luo Ping i inni. 2016. Optimization of large-scale pseudotargeted metabolomics methodbased on liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 4 Luty 2016, strony 127-136.
- Luo Xiangjian i inni. 2017. Emerging roles of lipid metabolism in cancer metastasis. *Molecular Cancer* . 11 Kwiecień 2017, strony 1-10.
- Łukasiewicz Sergiusz i inni. 2021. Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies — An Updated Review. *Cancers*. 25 Sierpień 2021.
- Malhotra Gautam K i inni. 2010. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology & Therapy*. 15 Listopad 2010, strony 955–960.
- Mann Henry i Whitney Donald Ransoma. 1947. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *The annals of mathematical statistics*. Marzec 1947, strony 50-60.
- Martí i Líndez Adrià-Arnau i Reith Walter . 2021. Arginine-dependent immune responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 26 Maj 2021, strony 5303–5324.
- Martínez- Reyes Inmaculada i Chandel Navdeep S. . 2021. Cancer metabolism: looking forward. *Nature Reviews Cancer*. 16 Lipiec 2021, strony 669-680.

- Mattsson Cecilia i Olsson Tommy . 2007. Estrogens and glucocorticoid hormones in adipose tissue metabolism. *Current Medicinal Chemistry*. 1 Listopad 2007, strony 2918-2924.
- McCartney Amelia i inni. 2018. Metabolomics in breast cancer: A decade in review. *Cancer Treatment Reviews*. Czerwiec 2018, strony 88-96.
- Metabolomika – współczesny trend badawczy w medycynie i farmacji*. Struck-Lewicka Wiktoria i inni. 2018. 1/2018, 2018, GAZETA AMG, strony 14-17.
- Mielko Karolina Anna i inni. 2021. NMR spectroscopy as a “green analytical method” in metabolomics and proteomics studies. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 13 Czerwiec 2021.
- Mishra Alok i Verma Mukesh . 2010. Cancer Biomarkers: Are We Ready for the Prime Time? *Cancers*. 22 Marzec 2010, strony 190-208.
- Mitro Susanna D. i inni. 2021. Longitudinal plasma metabolomics profile in pregnancy—a study in an ethnically diverse US pregnancy cohort. *Nutrients* . 1 Wrzesień 2021, str. 3080.
- Miyagi Yohei i inni. 2011. Plasma Free Amino Acid Profiling of Five Types of Cancer Patients and Its Application for Early Detection. *PloS one*. 7 wrzesień 2011.
- Momenimovahed Zohre i Salehiniya Hamid . 2019. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer - Targets and Therapy*. 10 Kwiecień 2019, strony 151–164.
- Moore Francis D. i inni. 1967. Carcinoma of the Breast — A Decade of New Results with Old Concepts. *New England Journal of Medicine*. 10 Sierpień 1967, strony 293-296.
- Moore Steven C i inni. 2018. A Metabolomics Analysis of Body Mass Index and Postmenopausal Breast Cancer Risk. *Journal of the National Cancer Institute*. 9 Styczeń 2018, strony 588–597.
- Moore Steven C i inni. 2021. A Metabolomics Analysis of Postmenopausal Breast Cancer Risk in the Cancer Prevention Study II. *Metabolites*. 10 Luty 2021, str. 95.
- More Tushar H. i inni. 2018. Metabolomic alterations in invasive ductal carcinoma of breast: A comprehensive metabolomic study using tissue and serum samples. *Oncotarget*. 5 Styczeń 2018, strony 2678–2696.
- Nagao Kenji i Kimura Takeshi . 2020. Use of plasma-free amino acids as biomarkers for detecting and predicting disease risk. *Nutrition reviews*. 26 Listopad 2020, strony 79-85.
- Nakagawa Shinichi i Cuthill Innes C. . 2007. Effect size, confidence interval and statistical significance: a practical guide for biologists. *Biological reviews*. 18 Październik 2007, strony 591-605.
- Nicholson Jeremy K. i Lindon John C. . 2008. Metabonomics. *Nature*. 23 Październik 2008.
- Nie Guangning i inni. 2022. The effects of menopause hormone therapy on lipid profile in postmenopausal women: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Pharmacology*. 12 Kwiecień 2022, str. 850815.
- Orczyk-Pawilowicz Magdalena i inni. 2016. Metabolomics of Human Amniotic Fluid and Maternal Plasma during Normal Pregnancy. *PloS one*. 12 Kwiecień 2016.
- Orrantia-Borunda Erasmo i inni. 2022. Subtypes of Breast Cancer. [red.] Harvey N. Mayrovitz PHD. *Breast Cancer*. 22 : Exon Publications, 2022, str. Styczeń.
- Park Jae Hyung , Pyun Woo Yang i Park Hyun Woo . 2020. Cancer Metabolism: Phenotype, Signaling and Therapeutic Targets. *Cells*. 16 Październik 2020.

- Park Jiwon i inni. 2019. Plasma metabolites as possible biomarkers for diagnosis of breast cancer. *PLoS One*. 3 Grudzień 2019, str. e0225129.
- Patela Seema i Ahmed Shadab . 2014. Emerging field of metabolomics: Big promise for cancer biomarker identification and drug discovery. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* . 22 Grudzień 2014, strony 63–74.
- Pavlova Natalya N. i Thompson Craig B. . 2016. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell metabolism*. 12 Styczeń 2016, strony 27-47.
- Pitt James J . 2009. Principles and Applications of Liquid Chromatography- Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews*. Luty 2009, strony 19-34.
- Playdon Mary C i inni. 2017. Nutritional metabolomics and breast cancer risk in a prospective study. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 28 Czerwiec 2017, strony 637–49.
- Possemato Richard i inni. 2011. Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature*. 18 Sierpień 2011, strony 346-50.
- Psychogios Nikolaos i inni. 2011. The Human Serum Metabolome. *PLoS ONE*. 16 Luty 2011.
- Qiu Yang i inni. 2008. Multivariate classification analysis of metabolomic data for candidate biomarker discovery in type 2 diabetes mellitus. *Metabolomics*. 25 Lipiec 2008, strony 337-346.
- Qiu Yunping i inni. 2013. Mass spectrometry-based quantitative metabolomics revealed a distinct lipid profile in breast cancer patients. *International journal of molecular sciences*. 12 Kwiecień 2013, strony 8047-61.
- Quehenberger Oswald i inni. 2010. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *Journal of Lipid Research*. 29 Lipiec 2010, strony 3299–3305.
- Ren Jun-Ling i inni. 2018. Advances in mass spectrometry-based metabolomics for investigation of metabolites. *Royal Society of Chemistry advanced*. 5 Czerwiec 2018, strony 22335-22350.
- Rijpkema A.H.M., van der Sanden A.A. i Ruijs A.H.C. . 1990. Effects of post-menopausal oestrogen-progestogen replacement therapy on serum lipids and lipoproteins: a review. *Maturitas*. Wrzesień 1990, strony 259-285.
- Rodriguez Paulo C , Quiceno David G i Ochoa Augusto C . 2006 . L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood*. 5 Październik 2006 , strony 1568-1573.
- Rutkowski Jennifer M. i inni. 2014. Acylcarnitines activate proinflammatory signaling pathways. *American journal of physiology-endocrinology and metabolism*. 15 Czerwiec 2014, strony E1378-E1387.
- Sanchez-Illana Angel i inni. 2018. Model selection for within-batch effect correction in UPLC-MS metabolomics using quality control - Support vector regression. *Analytica Chimica Acta*. 23 Kwiecień 2018, strony 62-68.
- Schmidt Daniel R. i inni. 2021. Metabolomics in Cancer Research and Emerging Applications in Clinical Oncology. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 13 Maj 2021, strony :333–358.
- Schwartsburd Polina . 2023. Lipid droplets: could they be involved in cancer growth and cancer–microenvironment communications? *Cancer Communications*. 13 Styczeń 2023, strony 83-87.
- Serkova Natalie J. i Glunde Kristine . 2009. Metabolomics of Cancer. *Tumor Biomarker Discovery: Methods and Protocols*. 2009, strony 273-295.
- Sharma Jyoti i inni. 2022. Evaluation and management of blood lipids through a woman's life cycle. *American Journal of Preventive Cardiology*. 13 Marzec 2022, str. 100333.

- Shi Zhan i inni. 2022. A Comprehensive Mass Spectrometry-Based Workflow for Clinical Metabolomics Cohort Studies. *Metabolites*. 24 Listopad 2022, str. 1168.
- Shulaev Vladimir . 2006. Metabolomics technology and bioinformatics. *Briefings in bioinformatics*. 18 Maj 2006, strony 128-139.
- Sieri Sabina i inni. 2011. Prospective study on the role of glucose metabolism in breast cancer occurrence. *International journal of cancer* . 16 Marzec 2011, strony 921-929.
- Soda Kuniyasu . 2011. The mechanisms by which polyamines accelerate. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 11 Październik 2011, strony 1-9.
- Spearman Charles . 1904. The Proof and Measurement of Association between Two Things. *The American Journal of Psychology*. Styczeń 1904, strony 72-101.
- Stevens Victoria L. i inni. 2018 . Serum metabolomic profiles associated with postmenopausal hormone use. *Metabolomics*. 6 Lipiec 2018 , str. 97.
- Subramani Ramadevi i inni. 2022. Metabolomics of Breast Cancer: A Review. *Metabolites*. 13 Lipiec 2022.
- Sullivan Gail M. i Feinn Richard . 2012. Using Effect Size—or Why the P Value Is Not Enough. *Journal of Graduate Medical Education*,. Wrzesień 2012, strony 279–282.
- Sung Hyuna i inni. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. Maj 2021, strony 191-280.
- Tallima Hatem , Azzazy Hassan M. E. i El Ridi Rashika . 2021. Cell surface sphingomyelin: key role in cancer initiation, progression, and immune evasion. *Lipids in Health and Disease*. 31 Październik 2021, strony 1-12.
- Tomczak Maciej i Tomczak Ewa. 2014. *The need to report effect size estimates revisited. An overview of some recommended measures of effect size*. Poznań : brak nazwiska, 2014.
- Uprety Dipesh i Adjei Alex A . 2020. KRAS: From undruggable to a druggable Cancer Target. *Cancer Treat Reviews*. 14 Lipiec 2020.
- Vogesser Michael i Seger Christoph . 2016. Quality management in clinical application of mass spectrometry measurement systems. *Clinical Biochemistry*. 4 Lipiec 2016, strony 947-954.
- Walaszczyk Anna i Gabryś Dorota . 2019. Molecular markers used in breast cancer diagnosis — current practice and future perspectives. *Nowotwory. Journal of Oncology*. 2 Styczeń 2019, strony 259–267.
- Wang Raoxu i inni. 2019. Integration of lipidomics and metabolomics for in-depth understanding of cellular mechanism and disease progression. *Journal of Genetics and Genomics*. 25 Listopad 2019, strony 69-83.
- Wang Wenjun i inni. 2020. The Lipid Metabolic Landscape of Cancers and New Therapeutic Perspectives. *Frontiers in oncology*. 8 Grudzień 2020, str. 605154.
- Wehrens Ron i inni. 2016. Improved batch correction in untargeted MS-based metabolomics. *Metabolomics*. 18 Marzec 2016, strony 1-12.
- Wei Zhen i inni. 2021. Metabolism of Amino Acids in Cancer. *Frontiers in cell and developmental biology*. 12 Styczeń 2021, str. 603837.
- Widłak Piotr i inni. 2021. Serum Metabolite Profiles in Participants of Lung Cancer Screening Study; Comparison of Two Independent Cohorts. *Cancers* . 31 Maj 2021, str. 2714.

- Wittig Rainer i Coy Johannes F. . 2007. The Role of Glucose Metabolism and Glucose-Associated Signalling in Cancer. *Perspectives in medicinal chemistry*. 2007.
- Xie Guoxiang i inni. 2015. Lowered circulating aspartate is a metabolic feature of human breast cancer. *Oncotarget*. 20 Październik 2015, str. 33369.
- Yang Lifeng , Venneti Sriram i Nagrath Deepak . 2017. Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 8 Marzec 2017, strony 163–94.
- Yoo Hye Jin i inni. 2018. Analysis of metabolites and metabolic pathways in breast cancer in a Korean prospective cohort: the Korean Cancer Prevention Study-II. *Metabolomics*. 8 Czerwiec 2018.
- Yu Zhonghao i inni. 2012. Human serum metabolic profiles are age dependent. *Aging Cell*. 16 Lipiec 2012, strony 960-967.
- Yuan Baowen i inni. 2018. A plasma metabolite panel as biomarkers for early primary breast cancer detection. *International journal of cancer*. 13 Listopad 2018, strony 2833-2842.
- Zeleznik Oana A. i inni. 2021. Circulating amino acids and amino acid-related metabolites and risk of breast cancer among predominantly premenopausal women. *npj Breast Cancer*. 18 Maj 2021.
- Zhang Dunfang i inni. 2020. Hexose Uptake and Metabolism in Immune Homeostasis and Inflammation. *Frontiers in Immunology*. 10 Styczeń 2020, str. 832293.
- Zhang Xi-wu i inni. 2019. Mass spectrometry-based metabolomics in health and medical science: a systematic review. *RSC advances* . 14 Grudzień 2019, strony 3092-3104.
- Zhang Zhen i inni. 2018. PI3K/Akt and HIF-1 signaling pathway in hypoxia-ischemia. *Molecular Medicine Reports*. 9 Sierpień 2018, strony 3547-3554.
- Zhao Ru-Zhou i inni. 2019. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling. *International Journal of molecular medicine*. 19 Kwiecień 2019, strony 2-15.