

**Uniwersytet Medyczny  
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu  
Wydział Farmaceutyczny  
Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej**



***Paweł Dereziński***

**PROTEOMICZNA I METABOLOMICZNA  
ANALIZA SUROWICY KRWI I MOCZU  
W POSZUKIWANIU BIOMARKERÓW  
RAKA PROSTATY**

**ROZPRAWA DOKTORSKA**

**Promotor pracy: *prof. dr hab. Zenon J. Kokot***

**POZNAŃ 2015**

**Podczas realizacji pracy doktorskiej autor pobierał następujące stypendia:**

- 1. Stypendium doktorskie dla pracowników Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w roku 2014.**
- 2. Autor uzyskał środki finansowe na przygotowanie rozprawy doktorskiej z Narodowego Centrum Nauki w ramach finansowania stypendium doktorskiego na podstawie decyzji numer DEC-2014/12/T/NZ7/00544.**

***Panu prof. dr hab. Zenonowi J. Kokotowi***

pragnę serdecznie podziękować za umożliwienie realizacji pracy doktorskiej, za przekazaną wiedzę, za cenne wskazówki i uwagi merytoryczne oraz za życzliwość i wszelką udzieloną pomoc.

***Pracownikom Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, a w szczególności mgr Agnieszce Klupczyńskiej, mgr Joannie Hajduk oraz dr Janowi Matysiakowi,***

pragnę serdecznie podziękować za wszelką udzieloną pomoc, przede wszystkim podczas prowadzenia prac doświadczalnych, a także za przekazane wskazówki podczas realizacji pracy.

***Panu doktorowi Wojciechowi Sawickiemu***

pragnę serdecznie podziękować za pomoc w rekrutacji pacjentów do badań oraz w zebraniu próbek płynów ustrojowych, bez których nie byłaby możliwa realizacja badań.

***Pani dr Dorocie Nowak***

pragnę serdecznie podziękować za pomoc w obróbce otrzymanych danych.

***Najbliższej Rodzinie i Przyjaciółom***

pragnę złożyć serdeczne podziękowania za wszelkie wsparcie udzielone podczas realizacji pracy oraz za okazywane wiarę i zrozumienie.

**Słowa kluczowe:**

rak prostaty, proteomika, metabolomika, biomarkery, aminokwasy, peptydy, angiogeneza, kreatynina, surowica, mocz, spektrometria mas, LC-ESI-QqQ-MS/MS, MALDI-TOF-MS, separacja magnetyczna, cytometria przepływowa, analizy statystyczne

**SPIS TREŚCI**

|   |    |
|---|----|
| 1. Wstęp.....   | 8  |
| 1.1. Wykaz skrótów stosowanych w pracy .....  | 9  |
| 2. Część teoretyczna.....   | 13 |
| 2.1. Rak prostaty.....  | 13 |
| 2.2. Proteomika i metabolomika.....   | 24 |
| 2.3. Aspekty proteomiczne i metabolomiczne w badaniach raka prostaty .....  | 30 |
| 2.4. Techniki analityczne w proteomice i metabolomice .....   | 37 |
| 3. Cel pracy .....  | 43 |
| 4. Część doświadczalna .....  | 47 |
| 4.1. Rekrutacja pacjentów do badań .....  | 47 |
| 4.1.1. Kryteria włączenia pacjentów do grupy badanej oraz do grupy kontrolnej ..  | 47 |
| 4.1.2. Charakterystyka pacjentów.....   | 48 |
| 4.2. Pobór próbek .....   | 49 |
| 4.3. Optymalizacja i walidacja metody rozdziału i oznaczania aminokwasów w jednym cyklu analitycznym w surowicy i moczu przy wykorzystaniu zestawu LC-ESI-QqQ-MS/MS ..... | 50 |
| 4.3.1. Odczynniki.....  | 50 |
| 4.3.2. Oznaczanie aminokwasów z wykorzystaniem odczynnika aTRAQ.....  | 50 |
| 4.3.3. Przygotowanie roztworów wykorzystywanych w metodyce oznaczania aminokwasów.....  | 51 |
| 4.3.4. Przygotowanie próbek do analizy .....  | 52 |
| 4.3.5. Parametry HPLC .....   | 52 |
| 4.3.6. Parametry MS .....   | 53 |
| 4.3.7. Walidacja metody .....   | 57 |
| 4.4. Opracowanie, optymalizacja i walidacja metody oznaczania kreatyniny w moczu przy wykorzystaniu zestawu LC-ESI-QqQ-MS/MS.....   | 58 |
| 4.4.1. Odczynniki.....  | 58 |
| 4.4.2. Przygotowanie roztworów wzorców i próbek kontrolnych .....   | 58 |
| 4.4.3. Przygotowanie próbek do analizy .....  | 58 |
| 4.4.4. Parametry HPLC .....   | 59 |
| 4.4.5. Parametry MS .....   | 59 |
| 4.4.6. Walidacja metody .....   | 60 |
| 4.4.7. Porównanie z metodą wykorzystującą reakcję Jaffe'go .....  | 62 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.5. Optymalizacja metody zateżenia i oczyszczania próbek surowicy i moczu .....   | 63  |
| 4.5.1. Odczynniki.....   | 63  |
| 4.5.2. Przygotowanie roztworów wykorzystywanych do zateżenia i oczyszczania próbek.....  | 63  |
| 4.5.3. Przeprowadzenie zateżenia i oczyszczania próbek .....   | 63  |
| 4.6. Optymalizacja metody profilowania peptydów obecnych w surowicy i moczu przy wykorzystaniu zestawu MALDI-TOF-MS.....               | 65  |
| 4.6.1. Odczynniki.....   | 65  |
| 4.6.2. Przygotowanie roztworów wykorzystywanych w profilowaniu peptydów .....  | 65  |
| 4.6.3. Przygotowanie próbek do profilowania peptydów .....   | 66  |
| 4.6.4. Parametry MS i wstępna obróbka profili peptydowych .....  | 67  |
| 4.7. Oznaczanie wybranych biomarkerów nowotworowych w surowicy z wykorzystaniem separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej ..... | 68  |
| 4.7.1. Odczynniki.....   | 68  |
| 4.7.2. Oznaczanie białek z wykorzystaniem zestawu Bio-Plex .....   | 68  |
| 4.7.3. Przygotowanie roztworów wzorców i próbek kontrolnych .....  | 72  |
| 4.7.4. Przygotowanie innych roztworów wykorzystywanych w metodyce oznaczania białek.....   | 72  |
| 4.7.5. Przygotowanie próbek do analizy .....   | 73  |
| 4.7.6. Parametry czytnika .....  | 73  |
| 4.7.7. Walidacja metody .....  | 74  |
| 4.8. Statystyczna analiza otrzymanych wyników .....  | 75  |
| 4.8.1. Jednozmiennowe analizy statystyczne .....   | 75  |
| 4.8.2. Wielozmiennowe analizy statystyczne .....   | 76  |
| 5. Wyniki .....  | 78  |
| 5.1. Tabele.....   | 78  |
| 5.1.1. Spis tabel .....  | 78  |
| 5.1.2. Tabele .....  | 82  |
| 5.2. Ryciny.....   | 108 |
| 5.2.1. Spis rycin.....   | 108 |
| 5.2.2. Ryciny .....  | 112 |
| 6. Omówienie wyników.....  | 128 |
| 6.1. Oznaczanie aminokwasów w jednym cyklu analitycznym w surowicy i moczu przy wykorzystaniu zestawu LC-ESI-QqQ-MS/MS.....            | 128 |
| 6.1.1. Walidacja metody .....  | 128 |
| 6.1.2. Analiza próbek rzeczywistych .....  | 129 |

---

|  |     |
|--|-----|
| 6.2. Oznaczanie kreatyniny w moczu przy wykorzystaniu zestawu LC-ESI-QqQ-MS/MS.....  | 131 |
| 6.2.1. Optymalizacja parametrów MS .....   | 131 |
| 6.2.2. Optymalizacja parametrów HPLC .....   | 131 |
| 6.2.3. Walidacja metody .....  | 132 |
| 6.2.4. Porównanie z metodą wykorzystującą reakcję Jaffe'go .....   | 134 |
| 6.2.5. Analiza próbek rzeczywistych .....  | 134 |
| 6.3. Profilowanie peptydów obecnych w surowicy i moczu przy wykorzystaniu zestawu MALDI-TOF-MS.....                                    | 136 |
| 6.4. Oznaczanie wybranych biomarkerów nowotworowych w surowicy z wykorzystaniem separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej ..... | 138 |
| 6.4.1. Walidacja metody .....  | 138 |
| 6.4.2. Analiza próbek rzeczywistych .....  | 139 |
| 6.5. Statystyczna analiza otrzymanych wyników .....  | 140 |
| 6.5.1. Jednozmiennowe analizy statystyczne .....   | 140 |
| 6.5.2. Wielozmiennowe analizy statystyczne .....   | 142 |
| 7. Dyskusja .....  | 148 |
| 8. Wnioski .....   | 168 |
| 9. Streszczenie.....   | 172 |
| 10. Summary.....   | 176 |
| 11. Piśmiennictwo .....  | 180 |

## 1. Wstęp

Rak prostaty jest jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów i jedną z głównych przyczyn śmierci z powodu nowotworów wśród mężczyzn. Cechuje się zmiennym obrazem klinicznym, od wolno rosnących guzów bez znaczenia klinicznego lub o niewielkim znaczeniu, do agresywnych guzów dających przerzuty i prowadzących do śmierci [1]. Diagnoza raka prostaty, jak również zdolność przewidywania progresji choroby, pozostają problematyczne. Nie istnieje jedna, prosta procedura, która umożliwiałaby jednoznaczną diagnozę raka prostaty. Obecnie jego wczesne wykrywanie polega głównie na badaniu *per rectum* oraz badaniu poziomu swoistego antygeny sterczowego (PSA) we krwi [2]. Podwyższony poziom antygeny PSA we krwi pacjentów stanowi podstawę do wykonania biopsji prostaty. PSA nie jest jednak swoistym markerem raka prostaty i cechuje się stosunkowo niską swoistością.

Do klas związków, mogących pełnić rolę biomarkerów chorób nowotworowych, należą między innymi aminokwasy i inne związki małowcząsteczkowe, które znajdują się w kręgu zainteresowania metabolomiki, oraz peptydy i białka, których analizą zajmuje się proteomika. Nowotwory, w tym rak prostaty, są bowiem odpowiedzialne za wywoływanie zmian w organizmie na poziomie proteomicznym i metabolomicznym. W związku z tym analiza białek, peptydów oraz metabolitów w płynach ustrojowych jest obiecującym narzędziem w poszukiwaniu diagnostycznych i prognostycznych biomarkerów raka prostaty.

W prezentowanej pracy doktorskiej autor starał się wykorzystać potencjał proteomiki i metabolomiki. Celem naukowym badań prowadzonych w ramach realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej było zastosowanie nowoczesnej i złożonej strategii analityczno-bioinformatycznej w analizie związków endogennych (aminokwasów, peptydów i białek) w płynach ustrojowych (surowicy oraz moczu) w poszukiwaniu biomarkerów o wartości diagnostycznej mających znaczenie w wykrywaniu raka prostaty. Badania prowadzone były w oparciu o nowoczesną platformę analityczną, opartą na metodach spektrometrii mas (LC-ESI-QqQ-MS/MS, MALDI-TOF-MS) oraz testach immunologicznych. Nowatorski model poszukiwania biomarkerów raka prostaty z wykorzystaniem powyższych technik wsparty został zaawansowaną analizą chemometryczną. Realizacja pracy doktorskiej przyczyni się do przyspieszenia prac nad poszukiwaniem nowoczesnych biomarkerów raka prostaty, charakteryzujących się wysoką czułością i swoistością, co w konsekwencji może doprowadzić do opracowania nowych, małoinwazyjnych metod diagnostycznych.



### 1.1. Wykaz skrótów stosowanych w pracy

- %f-PSA – stosunek wolnej frakcji PSA do całkowitego stężenia PSA (ang. *percent-free PSA*)
- 1MHis – 1-metylo-L-histydyna
- 3MHis – 3-metylo-L-histydyna
- Aad – kwas L- $\alpha$ -aminoadypinowy
- Abu – kwas L- $\alpha$ -amino-n-masłowy
- ang. – angielski
- Ala – L-alanina
- Ans – L-anseryna
- Arg – L-arginina
- Asa – kwas argininobursztynowy
- Asn – L-asparagina
- Asp – kwas L-asparaginowy
- AUC – pole pod krzywą ROC (ang. *area under curve*)
- bAib – kwas D,L- $\beta$ -aminoizomasłowy
- bAla –  $\beta$ -alanina
- BPH – łagodny rozrost prostaty (ang. *benign prostatic hyperplasia*)
- Car – L-karnozyna
- Cit – L-cytrulina
- Cth – cystationina
- CV – współczynnik zmienności (ang. *coefficient of variation*)
- Cys – L-cystyna
- DNA – kwas deoksyrybonukleinowy (ang. *deoxyribonucleic acid*)
- EGFR – receptor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor*)
- ELISA – test immunoenzymatyczny (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*)
- EPS – wydzielina z prostaty otrzymana w wyniku masażu prostaty podczas badania *per rectum* (ang. *expressed prostatic secretion*)
- ESI – elektrorozpylanie (ang. *electrospray ionization*)
- EtN – etanoloamina
- FDA – Agencja Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*)
- FGF-basic – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *basic fibroblast growth factor*)

- GA – algorytm *Genetic Algorithm*
- GABA – kwas  $\gamma$ -amino-n-masłowy
- GC-MS – chromatografia gazowa połączona ze spektrometrią mas (ang. *gas chromatography – mass spectrometry*)
- G-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (ang. *granulocyte colony-stimulating factor*)
- Gln – L-glutamina
- Glu – kwas L- glutaminowy
- Gly – glicyna
- HCCA – kwas  $\alpha$ -cyjano-4-hydroksycynamonowy (ang.  *$\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid*)
- Hcit – L-homocytrulina
- Hcy – L-homocysteina
- HGF – czynnik wzrostu hepatocytów (ang. *hepatocyte growth factor*)
- His – L-histydyna
- $^1\text{H-NMR}$  – protonowy NMR (ang. *proton NMR*)
- HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *high performance liquid chromatography*)
- Hyl –  $\delta$ -hydroksylizyna
- Hyp – hydroksy-L-prolina
- IL-6 – interleukina 6 (ang. *interleukin-6*)
- Ile – L-izoleucyna
- LC-ESI-QqQ-MS/MS – chromatografia cieczowa połączona z jonizacją przez elektrorozpylanie i tandemową spektrometrią mas typu potrójny kwadrupol (ang. *liquid chromatography – electrospray ionization – triple quadrupole tandem mass spectrometry*)
- LC-MS – chromatografia cieczowa połączona ze spektrometrią mas (ang. *liquid chromatography – mass spectrometry*)
- LC-MS/MS – chromatografia cieczowa połączona z tandemową spektrometrią mas (ang. *liquid chromatography – tandem mass spectrometry*)
- Leu – L-leucyna
- LLOQ – dolna granica oznaczalności (ang. *lower limit of quantification*)
- LOD – granica wykrywalności (ang. *limit of detection*)
- LOQ – granica oznaczalności (ang. *limit of quantification*)
- Lys – L-lizyna

- MALDI – jonizacja laserowa wspomagana matrycą (ang. *matrix-assisted laser desorption ionization*)
- MALDI-TOF-MS – spektrometria mas z jonizacją laserową wspomaganą matrycą i z detektorem czasu przelotu (ang. *matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight – mass spectrometry*)
- Met – L-metionina
- MRM – monitorowanie reakcji wielokrotnych (ang. *multiple reaction monitoring*)
- MS – spektrometria mas (ang. *mass spectrometry*)
- MS/MS – tandemowa spektrometria mas (ang. *tandem mass spectrometry*)
- Nle – L-norleucyna
- NMR – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. *nuclear magnetic resonance*)
- Nva – L-norwalina
- Orn – L-ornityna
- PDGF – płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. *platelet-derived growth factor*)
- PDGF-AB/BB – płytkopochodny czynnik wzrostu – heterodimer zbudowany z łańcucha A i łańcucha B / homodimer zbudowany z dwóch łańcuchów B (ang. *platelet-derived growth factor – heterodimer composed of a combination of A and B chains / homodimer composed of two B chains*)
- PECAM-1 – płytkowo-śródbłonkowe białko adhezyjne 1 (ang. *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*)
- PEtN – o-fosfoetanolamina
- Phe – L-fenylalanina
- PLS-DA – ang. *partial least squares – discriminant analysis*
- Pro – L-prolina
- PSA – swoisty antygen sterczowy (ang. *prostate-specific antigen*)
- PSer – o-fosfo-L-seryna
- QC – algorytm *QuickClassifier*
- Q/q – stosunek pierwszego (ilościowego) do drugiego (jakościowego) przejścia masowego (ang. *quantifier/qualifier transition ratio*)
- ROC – ang. *receiver operating characteristic*
- Sar – sarkozyna
- SCF – czynnik komórek macierzystych (ang. *stem cell factor*)
- SD – odchylenie standardowe (ang. *standard deviation*)
- sEGFR – rozpuszczalny receptor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *soluble epidermal growth factor receptor*)

- SELDI-TOF-MS – spektrometria mas z jonizacją laserową wzmocnioną powierzchniowo i z detektorem czasu przelotu (ang. *surface-enhanced laser desorption ionization – time of flight – mass spectrometry*)
- Ser – L-seryna
- sHER2/neu – rozpuszczalny receptor kinazy tyrozynowej erbB-2 (ang. *soluble receptor tyrosine-protein kinase erbB-2*)
- sIL-6R $\alpha$  – rozpuszczalny receptor  $\alpha$  interleukiny 6 (ang. *soluble interleukin-6 receptor  $\alpha$* )
- sMRM – planowane monitorowanie reakcji wielokrotnych (ang. *scheduled multiple reaction monitoring*)
- S/N – stosunek sygnału do szumu (ang. *signal-to-noise ratio*)
- SNN – algorytm *Supervised Neural Network*
- sTIE-2 – rozpuszczalny receptor dla angiopoetyny (ang. *soluble angiopoietin receptor*)
- sVEGFR-1 – rozpuszczalny receptor 1 naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (ang. *soluble vascular endothelial growth factor receptor 1*)
- sVEGFR-2 – rozpuszczalny receptor 2 naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (ang. *soluble vascular endothelial growth factor receptor 2*)
- Tau – tauryna
- Thr – L-treonina
- Trp – L-tryptofan
- Tyr – L-tyrozyna
- UHPLC – ultrasprawa chromatografia cieczowa (ang. *ultra-high performance liquid chromatography*)
- ULOQ – górna granica oznaczalności (ang. *upper limit of quantification*)
- Val – L-walina
- VIP – ang. *variable importance in projection*
- WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*)

## 2. Część teoretyczna

### 2.1. Rak prostaty

Choroby nowotworowe stanowią poważny problem współczesnego społeczeństwa. Zaliczamy do nich między innymi raka prostaty. Choroby te, ze względu na zbyt późne wykrycie, powodują poważne powikłania, a nawet śmierć. Dlatego istotna jest diagnostyka, pozwalająca na wykrycie choroby w jej jak najwcześniejszym stadium. Dzięki temu możliwe jest odpowiednio szybkie rozpoczęcie leczenia, dające możliwość pełnego powrotu do zdrowia. Jednakże obecnie wykorzystywane metody diagnostyczne często wykrywają chorobę dopiero w jej zaawansowanym stadium, a to pogarsza rokowania dla pacjenta. Co więcej, wiele z tych metod nie jest w pełni wiarygodnych, a technologia ich stosowania jest inwazyjna.

Do analiz proteomiczno-metabolomicznych, realizowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej, wytypowano raka prostaty. Jest on jedną z najczęstszych i poważniejszych chorób cywilizacyjnych u mężczyzn. Mechanizmy molekularne odpowiedzialne za jego patogenezę nie zostały dotychczas precyzyjnie wyjaśnione. Rak prostaty jest złożoną jednostką chorobową, która na wczesnym stadium rozwoju nie daje specyficznych objawów. Do dnia dzisiejszego nie ma wyczerpujących danych identyfikujących białka oraz inne związki endogenne zaangażowane w rozwój i różnicowanie raka prostaty. Dlatego proponowana złożona strategia analityczno-bioinformatyczno-kliniczna może przyczynić się do odkrycia biomarkerów charakteryzujących się wysoką czułością i swoistością, co pozwoli na wczesne wykrycie tego nowotworu złośliwego i w konsekwencji zwiększy szanse pacjenta na pełne wyleczenie.

Rak prostaty, zwany również nowotworem złośliwym gruczołu krokowego, rakiem gruczołu krokowego lub rakiem stercza, to drugi najczęściej diagnozowany rak, a pierwszy wśród mężczyzn i szósta główna przyczyna zgonów z powodu nowotworów u mężczyzn na świecie [1, 3, 4]. Częstość występowania raka prostaty wzrosła w ostatnich latach, głównie z powodu starzenia się populacji, a także praktyki prowadzenia badań przesiewowych poziomu swoistego antygenu sterczowego (ang. *prostate-specific antigen*, PSA) i następnie ewentualnych biopsji [1]. Terapia raka prostaty jest efektywna tylko we wczesnym etapie rozwoju choroby. Pomimo doskonalenia terapii przeciwnowotworowych, wciąż nie ma skutecznej metody leczenia raka prostaty w jego stadium zaawansowanym [1].

Etiologia raka prostaty jest heterogenna. Wśród czynników etiologicznych raka gruczołu krokowego wymienić należy płeć, wiek, rasę, wywiad rodzinny, czynniki

genetyczne oraz styl życia. Męskie hormony płciowe (androgeny: testosteron i 5 $\alpha$ -dihydrotestosteron) odgrywają główną rolę w powstawaniu tego nowotworu złośliwego, a ryzyko zachorowania wraz z wiekiem wzrasta. Rak prostaty jest zwykle rozpoznawany po 60. roku życia, a średni wiek mężczyzn, u których zachodzi rozpoznanie, to 72 lata [5]. Po 80. roku życia chorobę stwierdza się u około 80 % mężczyzn [6]. Większe ryzyko rozwoju raka gruczołu krokowego cechuje mężczyzn rasy czarnej w porównaniu z rasą białą. Co więcej, w przypadku rasy czarnej rak prostaty jest rozpoznawany w młodszym wieku, a rokowania dla pacjenta są gorsze. Populacja azjatycka jest z kolei grupą etniczną o najniższej częstości występowania tej choroby [4, 5, 7]. Jednakże częstość ta wzrasta w większości państw azjatyckich, czego przyczyn upatruje się w zmianie diety i stylu życia na bardziej zachodni, zwiększonym dostępie do testów PSA i gwałtownym starzeniu się populacji [8].

Głównym czynnikiem ryzyka rozwoju raka prostaty jest występowanie choroby w rodzinie [9]. Predyspozycja zachorowania w przypadku mężczyzn, u których krewnych I stopnia wystąpił rak prostaty, wzrasta kilkukrotnie. Dotyczy to szczególnie sytuacji, gdy krewni zachorowali przed 60. rokiem życia [5]. Ponadto wyróżnia się dziedzicznego raka stercza, rozpoznawanego na podstawie cech rodowodowo-klinicznych, który stanowi 5-10 % wszystkich przypadków tego nowotworu złośliwego i 30-40 % przypadków diagnozowanych w młodszym wieku [9, 10]. Dziedziczny rak prostaty jest rozpoznawany przeciętnie 6-7 lat wcześniej niż sporadyczna postać tego nowotworu i w związku z tym charakteryzuje się większą śmiertelnością. Młodszy wiek zachorowania jest jednakże jedyną cechą kliniczną odróżniającą raka prostaty dziedzicznego od sporadycznego. Sposobem na ograniczenie śmiertelności z powodu raka stercza w rodzinach obciążonych genetycznie są badania przesiewowe, których celem jest diagnoza choroby w jej wczesnym, uleczalnym stadium.

Do czynników etiologicznych raka prostaty zalicza się także styl życia. Ryzyko rozwoju raka stercza jest zwiększone u osób spożywających duże ilości zwierzęcych tłuszczów nasyconych. Wykazano, że spożywanie produktów pochodzenia zwierzęcego bogatych w tłuszcze nasycone wiąże się z gorszym rokowaniem w przypadku mężczyzn leczonych z powodu raka prostaty [11]. Ponadto wykazano, że istnieje korelacja między spożywaniem tłuszczów jednonienasyconych a poprawą odsetka przeżyć wśród chorujących na raka gruczołu krokowego [12]. Z kolei zwiększone spożycie soi i ryżu zmniejsza zagrożenie rakiem stercza [6]. Mała ekspozycja na światło słoneczne i niedobór witaminy D są związane z podwyższonym ryzykiem raka prostaty ze względu na antyproliferacyjny i wspomagający różnicowanie wpływ metabolitów witaminy D na nowotwór złośliwy prostaty [4]. Jednakże nie ma przekonujących dowodów na to, że zmiana diety lub stylu życia może zapobiec

rozwojowi raka prostaty [2]. Sugeruje się, iż znaczenie dla powstawania raka stercza mogą mieć zakażenia wirusowe [6].

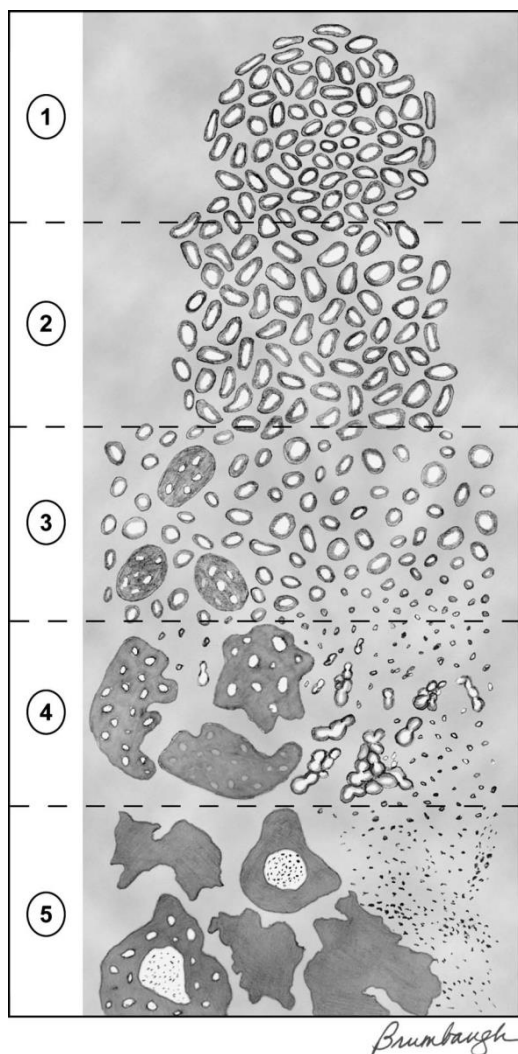
Pomimo że dokładne mechanizmy kancerogenezy w przypadku raka prostaty nie zostały dotychczas całkowicie wyjaśnione, istnieją dowody potwierdzające istotną rolę czynników genetycznych w etiologii tego nowotworu złośliwego [4]. Z tym wiążą się najprawdopodobniej różnice w podatności na raka prostaty pomiędzy grupami etnicznymi i zwiększone ryzyko zachorowania u osób z pozytywnym wywiadem rodzinnym [13]. Badania obejmujące bliźnięta wykazały, że wpływ czynników genetycznych na rozwój raka stercza jest większy niż na rozwój innych typów nowotworów [14]. W ciągu ostatnich 20 lat prowadzone były badania genetyczne mające na celu identyfikację genów odpowiedzialnych za zwiększenie ryzyka zachorowania na raka stercza. Genetyczne mechanizmy leżące u podstaw raka prostaty okazały się znacznie bardziej skomplikowane niż początkowo sądzono. Niedawne badania asocjacyjne całego genomu w różnych grupach etnicznych doprowadziły do zidentyfikowania ponad 40 przypadków polimorfizmu pojedynczego nukleotydu stwierdzanych w sekwencjach różnych genów lub chromosomalnych *loci*, które są znacząco powiązane z ryzykiem rozwoju raka prostaty, włączając w to wiele *loci* w regionie chromosomu 8q24, geny specyficzne dla prostaty, geny związane z metabolizmem i hormonami oraz regiony niekodujące żadnego genu [4]. To więcej niż w przypadku innych nowotworów. Jednakże dotychczas wyjaśniono znaczenie biologiczne lub funkcje tylko nielicznych wariantów związanych z polimorfizmem pojedynczego nukleotydu. Wyzwaniem stojącym przed badaczami zajmującymi się genomiką raka prostaty jest zrozumienie funkcjonalnych konsekwencji wszystkich wariantów powiązanych z tym nowotworem i ich udziału w procesie kancerogenezy i biologii raka gruczołu krokowego, a także dalsza identyfikacja *loci* lub genów związanych z rozwojem choroby w różnych populacjach i grupach etnicznych. Podjęto próby oszacowania ryzyka rozwoju raka prostaty poprzez połączenie różnych wariantów w testach klinicznych, co pozwoliło zidentyfikować wąską grupę osób o wysokim ryzyku raka gruczołu krokowego. Jednakże nie udało się określić ryzyka wystąpienia agresywnej postaci raka. Genami, które są najbardziej prawdopodobnymi kandydatami do uznania ich powiązania z rakiem prostaty, są geny zaangażowane w metabolizm testosteronu i szlak androgenów, ponieważ od tych czynników zależy wzrost tkanki nabłonkowej prostaty i komórek raka prostaty. Kandydatem jest także gen *BRCA2*, zwłaszcza w przypadkach raka prostaty diagnozowanych w młodszym wieku [15]. Mutacje w tym genie występują jednak rzadko u pacjentów z rakiem stercza i mogą wyjaśnić jedynie niewielką część przypadków choroby. Dalsze badania w zakresie genomiki raka stercza przyniosą duże korzyści kliniczne, włączając w to

odkrycie nowych biomarkerów raka prostaty, ocenę ryzyka zachorowania na ten nowotwór złośliwy oraz opracowanie efektywnych strategii skriningowych i zapobiegawczych w odniesieniu do raka prostaty.

Większość przypadków raka prostaty (95 %) stanowią nowotwory złośliwe tkanki nabłonkowej gruczołu krokowego (raki gruczołowe, gruczolakoraki, *adenocarcinomas*) o różnym, najczęściej pośrednim, stopniu złośliwości [5]. Rak gruczołowy prostaty powstaje, gdy normalne komórki gruczołu krokowego wydzielające nasienie mutują w komórki nowotworowe. Wywodzi się on najczęściej ze strefy obwodowej stercza (75 % przypadków), rzadziej ze strefy przejściowej lub centralnej [6]. Posiada często wiele ognisk. Z biegiem czasu komórki rakowe zaczynają się dzielić i rozprzestrzeniają się do otaczającej tkanki gruczołu krokowego, tworząc guz. Rzadziej występują inne typy histologiczne raka prostaty niż rak gruczołowy, takie jak: mięsak (mięśniakomięsak poprzecznie prążkowany, mięśniakomięsak gładko-komórkowy), chłoniak, rak drobnokomórkowy. Nowotwór w obrębie prostaty może pojawić się także jako przerzut z innego narządu albo w wyniku naciekania przez ciągłość zaawansowanego raka jelita grubego lub pęcherza moczowego.

Stopień złośliwości histologicznej (ang. *grading*) raka prostaty określa się z wykorzystaniem skali Gleasona (ang. *Gleason grading system*) [16]. System został opracowany w 1966 roku przez Donalda F. Gleasona na podstawie cech architektonicznych nowotworu prostaty ocenianych pod mikroskopem [17-19]. Po niemal 50 latach od powstania ten system klasyfikacji patomorfologicznej raka prostaty pozostaje jednym z najważniejszych predyktorów prognostycznych choroby. Nie znaczy to jednak, że przez ten czas nie ulegał zmianom. Modyfikacje systemu Gleasona miały na celu przystosowanie go do zmieniających się praktyk w medycynie, polepszenie predykcji wyniku leczenia nowotworu oraz polepszenie korelacji pomiędzy wynikami w skali Gleasona (ang. *Gleason score*) otrzymanymi dla materiału pochodzącego z biopsji i radykalnej prostatektomii. Ostatnie modyfikacje zostały zaproponowane w 2005 roku przez *International Society of Urological Pathology* i stanowią obecnie standard w urologii [16]. Na podstawie tych wytycznych histopatolog ocenia strukturę histologiczną tkanki nowotworowej.





Rycina 1. System Gleasona [16]. Pięć typów histoarchitektonicznych raka prostaty. Typ 1 odpowiada komórkom najbardziej zróżnicowanym, natomiast typ 5 komórkom najmniej zróżnicowanym.

Wyróżnia się pięć typów histoarchitektonicznych nowotworu prostaty, którym przypisane są punkty (stopnie) odpowiadające numerowi typu (Rycina 1). Typ 1 odnosi się do nowotworu wysoko zróżnicowanego, przypominającego budową prawidłowe komórki stercza. Typ 5 z kolei jest przypisany komórkom nowotworowym nisko zróżnicowanym. Typy 1 i 2 występują rzadko, najczęstszy jest natomiast typ 3. Histopatolog określa ponadto dominujący pod względem objętości typ w danej próbce oraz typ drugo- i trzeciorzędowy. Następnie sumuje stopnie odpowiadające typowi dominującemu guza oraz typowi o najmniej zróżnicowanych komórkach. Uzyskany wynik w skali Gleasona zawiera się zatem w zakresie od 2 do 10 punktów. Rak gruczołu krokowego o wyższym wyniku w skali Gleasona jest bardziej agresywny, rozwija się szybciej, ma gorsze rokowania oraz większe ryzyko naciekania i

wystąpienia przerzutów. Wynik ma również znaczenie terapeutyczne, ponieważ pomaga w kwalifikacji pacjentów do dalszego leczenia. Pierorazio i wsp. [20] wykorzystali zmodyfikowany w 2005 roku system Gleasona oraz bazę danych pacjentów, którzy przeszli zabieg radykalnej prostatektomii, w celu podzielenia skali Gleasona na grupy o największej wartości prognostycznej. Na podstawie analiz statystycznych wykazali, że zaproponowany przez nich podział był silnym predyktorem czasu bez wznowy biochemicznej (ang. *biochemical recurrence-free survival*). Swoje wyniki opublikowali w 2013 roku rekomendując, by punkty w skali Gleasona podawać w połączeniu z jedną z pięciu grup prognostycznych (Tabela 1). Grupy te odzwierciedlają rokowania danego pacjenta i są według autorów zrozumiałe zarówno dla lekarzy, jak i dla pacjentów.

Tabela 1. Grupy prognostyczne odpowiadające wynikowi w skali Gleasona [20]. Grupa prognostyczna I wiąże się z bardzo dobrymi rokowaniami i jest najkorzystniejsza dla pacjenta. Rokowania pogarszają się znacząco od grupy prognostycznej I do V.

| Wynik w skali Gleasona | Grupa prognostyczna |
|------------------------|---------------------|
| ≤ 6                    | I                   |
| 3 + 4 = 7              | II                  |
| 4 + 3 = 7              | III                 |
| 8                      | IV                  |
| 9–10                   | V                   |

Rak prostaty cechuje się zmiennym obrazem klinicznym, od wolno rosnących guzów bez znaczenia klinicznego lub o niewielkim znaczeniu, do agresywnych guzów dających przerzuty i prowadzących do śmierci [1]. Większość przypadków raka prostaty nie wywołuje poważnych implikacji klinicznych ani zgonu, a wykrywane są dopiero w badaniach sekcyjnych zmarłych z innych przyczyn [6]. Nowotwór złośliwy prostaty rozwija się wolno, a wczesną diagnozę choroby utrudnia fakt, że w początkowej fazie nie daje ona objawów. Te pojawiają się dopiero, gdy zmiany nowotworowe są już rozległe. Do objawów raka stercza ze strony układu moczowego zalicza się: częstomocz, ból przy oddawaniu moczu, trudności w rozpoczęciu mikcji, zmniejszenie strumienia moczu, przerywany strumień moczu, wrażenie niepełnego opróżnienia pęcherza moczowego oraz nagle uczucie parcia na pęcherz, szczególnie w nocy [6]. Podobnym do raka prostaty zespołem objawów charakteryzuje się łagodny rozrost prostaty, zwany także gruczolakiem prostaty (ang. *benign prostatic hyperplasia*, BPH), który może być przyczyną nieswoistych dolegliwości ze strony dolnych dróg

moczowych lub może współistnieć z nowotworem złośliwym prostaty [5, 6]. W związku z tym różnicowanie pomiędzy obiema jednostkami chorobowymi możliwe jest jedynie przy zastosowaniu czułych i swoistych metod diagnostycznych. Rak prostaty szerzy się przez naciekanie i rozrost, zajmując otaczające tkanki i narządy, w tym moczowody, pęcherzyki nasienne, ściany miednicy. Zaawansowany regionalnie rak gruczołu krokowego może wywołać krwinkomocz, dysurię, nietrzymanie moczu, zaburzenia wzwodu, objawy niewydolności nerek, hematospermię oraz bóle podbrzusza, okolic lędźwiowych, krocza i odbytu. Rak prostaty daje przerzuty drogą naczyń krwionośnych do kości, najczęściej miednicy, kręgosłupa, żeber, mostka lub kości udowych, oraz do narządów mięszzowych, głównie wątroby i płuc. Ponadto drogą naczyń limfatycznych zajmuje węzły chłonne. W przypadku przerzutów pojawić się mogą: ból kości, złamania, paraplegia, powiększenie węzłów chłonnych, obrzęki kończyn, krwawienia, zaburzenia krzepnięcia, wyniszczenie nowotworowe, śpiączka [5, 6].

Stopień zaawansowania nowotworu złośliwego prostaty (ang. *staging*) ma obok stopnia złośliwości histologicznej istotne znaczenie dla wyboru metody leczenia oraz określenia rokowania. Stopień zaawansowania określa się na podstawie badań obrazowych według klasyfikacji TNM (ang. *tumor, nodus, metastases* – guz, węzeł chłonny, przerzuty). Zgodnie z tą klasyfikacją, T odnosi się do guza pierwotnego, N do przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych, natomiast M do przerzutów odległych. W systemie klasyfikacji TNM raka prostaty ocenia się między innymi to, czy guz jest obecny, czy jest wyczuwalny *per rectum* i widoczny w badaniach obrazowych, czy jest ograniczony do gruczołu krokowego, czy nacieka poza torebkę gruczołu krokowego, czy są obecne przerzuty w okolicznych węzłach chłonnych oraz czy są obecne przerzuty odległe w węzłach chłonnych, kościach lub innej lokalizacji [5, 6].

Diagnostyka nowotworu złośliwego prostaty pozostaje problematyczna. Nie istnieje jedna, prosta procedura, która umożliwiłaby jego jednoznaczną diagnozę. Obecnie wczesne wykrywanie raka prostaty polega głównie na badaniu *per rectum* oraz badaniu poziomu swoistego antygenu sterczowego (PSA) we krwi [2]. Ryzyko niedoszacowania w ocenie stopnia klinicznego zaawansowania wynosi tu jednak 30-60 % [5]. Potwierdzenie diagnozy uzyskuje się poprzez mikroskopową weryfikację podejrzanej zmiany. Materiał do badań uzyskuje się na drodze biopsji, która jest wykonywana pod kontrolą przezodbytniczej ultrasonografii (ang. *transrectal ultrasonography*, TRUS).

Białko PSA zwane jest również kalikreina III, seminina lub antygenem P-30. PSA to glikoproteina o masie cząsteczkowej około 34 kDa. Jest proteazą serynową (EC 3.4.21.77) z rodziny kalikrein, a genem ją kodującym jest zlokalizowany na chromosomie 19 w regionie 19q13 gen *KLK3* [21, 22]. PSA jest enzymem

proteolitycznym, który powoduje upłynnienie nasienia [6]. PSA produkowane jest prawie wyłącznie przez tkankę nabłonkową gruczołu prostaty, a proces ten jest regulowany przez androgeny [4-6, 21]. Swoisty antygen sterczowy jest obecny w surowicy w małych ilościach u mężczyzn ze zdrową prostatą, natomiast w obecności raka prostaty jego stężenie jest podwyższone. W związku z tym w 1988 roku znalazł zastosowanie jako marker raka gruczołu krokowego [22]. Podkreślić jednak należy, że PSA nie jest swoistym markerem raka prostaty.

Podwyższony poziom antygeny PSA we krwi pacjentów stanowi podstawę do wykonania biopsji prostaty [23]. Przyjmowany zwykle punkt odcięcia stężenia PSA wynoszący 4  $\mu\text{g/l}$  wykrywa wiele przypadków raka prostaty, ale nie ze stuprocentową czułością. Innymi słowy, część przypadków raka nie zostanie wykryta. Obniżenie punktu odcięcia zwiększa czułość kosztem obniżenia swoistości [2, 24]. Nie ma jednak takiego punktu odcięcia PSA, który gwarantowałby wykrycie wszystkich przypadków nowotworu [25]. PSA cechuje się stosunkowo niską swoistością, ponieważ wyniki biopsji okazują się negatywne nawet u 75% mężczyzn, u których stężenie antygeny PSA wynosi od 2 do 10  $\text{ng/ml}$  i/lub wynik badania *per rectum* u nich był podejrzan [26]. Podwyższony poziom PSA może być bowiem spowodowany nie tylko przez nowotwór złośliwy prostaty, ale towarzyszy także takim zmianom chorobowym, jak zapalenie prostaty, łagodny rozrost prostaty, zawał prostaty oraz urazy stercza [5, 27-29]. Zatem stężenie PSA w surowicy nie różnicuje łagodnego przerostu prostaty od nowotworu złośliwego gruczołu krokowego. Konsekwencją niskiej swoistości PSA może być błędna diagnoza i podjęcie niewłaściwego leczenia, często zbyt dużymi dawkami leków, prowadzącymi do wystąpienia działań niepożądanych. Co więcej, obecnie około 30% nowotworów usuniętych w wyniku zastosowania radykalnej prostatektomii okazuje się klinicznie nieistotnymi, niewymagającymi tak inwazyjnego leczenia [30]. Wiele z wykrywanych guzów prostaty to guzy wolno rosnące, a agresywne leczenie w przypadku pacjentów z takimi guzami może skutkować działaniami niepożądanymi i obniżać jakość życia pacjenta przy niewielkiej bądź żadnej korzyści wynikającej z terapii [1]. Antygen PSA ma również ograniczoną zdolność przewidywania wyników leczenia chorych na raka stercza oraz ograniczoną przydatność przy podejmowaniu decyzji dotyczących podjęcia leczenia uzupełniającego [31]. U mężczyzn powyżej 75. roku życia, u których oznaczone stężenie PSA w surowicy wynosi poniżej 3  $\mu\text{g/l}$ , można zaniechać prowadzenia dalszych oznaczeń tego markera z uwagi na niewielkie ryzyko rozwoju agresywnej postaci raka stercza podczas pozostałego im życia [32].

Podstawowym celem badań przesiewowych w kierunku raka prostaty jest redukcja zgonów spowodowanych tym nowotworem złośliwym i tym samym

przedłużenie życia. Dodatkowym pozytywnym rezultatem takich badań jest zredukowanie przypadków choroby związanych z wystąpieniem przerzutów. Prowadzone były randomizowane badania mające na celu ocenę skuteczności badań przesiewowych wykorzystujących pomiar stężenia PSA pod kątem redukcji śmiertelności, jednakże nie opublikowano żadnych badań odnoszących się do efektów testów przesiewowych w odniesieniu do rozwoju postaci nowotworu złośliwego z przerzutami [24]. Mężczyzn, u których wykryto raka prostaty w konsekwencji przeprowadzenia badań przesiewowych, można podzielić na 3 kategorie: tych, których rak doprowadzi do śmierci pomimo wczesnej detekcji i leczenia; tych, u których rak nie wywołałby poważnych implikacji klinicznych, nawet gdyby nie przeprowadzono badań przesiewowych; oraz tych, w przypadku których wczesna diagnoza i leczenie wpłynęło na długość życia. Liczbę mężczyzn, których zakwalifikować można do ostatniej kategorii, oszacowano w dwóch dużych randomizowanych badaniach [24]. Wykazano, że liczba mężczyzn, którzy uniknęli śmierci z powodu raka stercza przez 10-14 lat po badaniach przesiewowych, była w najlepszym wypadku bardzo mała, nawet w grupie wiekowej 55-69 lat, i wahała się od 0 do 1 na 1000 mężczyzn poddanych badaniom przesiewowym.

Z drugiej strony można zauważyć szkody wynikające z prowadzenia badań przesiewowych w oparciu o pomiar poziomu PSA w surowicy. Wyniki stężenia PSA okazują się często fałszywie dodatnie. Dotyczy to około 80 % przypadków, gdy za punkt odcięcia przyjęto wartość między 2,5 a 4,0 µg/l [33]. Konsekwencją wyników fałszywie dodatnich dla pacjentów są negatywne efekty psychologiczne, włączając w to ciągły stres związany z rakiem. Mężczyźni z fałszywie dodatnim wynikiem częściej przechodzą dodatkowe badania, w tym jedną lub więcej biopsji. W ciągu dziesięciu lat około 15-20 % mężczyzn uzyska wynik stężenia PSA, który zakwalifikuje ich do biopsji, zależnie od przyjętego dla PSA punktu odcięcia i częstotliwości badań przesiewowych [33]. Zabieg biopsji gruczołu krokowego jest procedurą inwazyjną, z którą wiąże się szereg zdarzeń niepożądanych. Przeprowadzone badania wykazały, że u 43,6 % mężczyzn, którzy przeszli zabieg biopsji w konsekwencji testów PSA, wystąpił ból w ciągu 35 dni po zabiegu [34]. Gorączka pojawiła się u 17,5 % mężczyzn, krwimocz u 65,8 %, krew pojawiła się w kale u 36,8 %, a w nasieniu u 92,6 %. Ponadto w odniesieniu do biopsji prostaty pojawiały się doniesienia o infekcjach, a nawet zgonach. W ciągu 35 dni po pierwszym zabiegu jeden na dziesięciu mężczyzn wymagał pomocy podstawowej opieki zdrowotnej, a jeden na stu wymagał hospitalizacji. Bezpośrednio po pierwszej biopsji jeden na dziesięciu mężczyzn miał negatywny stosunek do konieczności ewentualnego powtórzenia procedury, określając to jako znaczny bądź umiarkowany problem, a po siedmiu dniach taki stosunek wykazywało już dwóch na

dziesięciu mężczyzn. Szkody dla pacjentów wynikają także z podjętego leczenia. W USA prawie 90 % mężczyzn ze zdiagnozowanym w wyniku badań przesiewowych rakiem prostaty jest leczonych chirurgicznie, poprzez radioterapię lub terapię pozbawienia androgenów (ang. *androgen deprivation therapy*, ADT) [35, 36]. Jednakże nawet pięciu na 1000 mężczyzn umiera w przeciągu miesiąca po operacji prostaty, natomiast między 10 a 70 pacjentów doświadcza poważnych komplikacji. Radioterapia i prostatektomia wiążą się z długotrwałymi niekorzystnymi skutkami, w tym z nietrzymaniem moczu i zaburzeniami erekcji u nawet trzech na dziesięciu mężczyzn, a radioterapia może ponadto prowadzić do zaburzeń czynności jelit. Z kolei terapia pozbawienia androgenów zastosowana u mężczyzn z rakiem prostaty ograniczonym do gruczołu krokowego wiąże się z zaburzeniami erekcji u czterech na dziesięciu mężczyzn, a także z ginekomastią i uderzeniami gorąca [37, 38]. W związku z tym, że korzyści wynikające z prowadzenia badań przesiewowych opartych o testy PSA nie przeważają nad szkodami, które są związane z takimi badaniami, panel ekspertów *United States Preventive Services Task Force* w 2012 roku zarekomendował, aby nie używać swoistego antygenu sterczowego w badaniach przesiewowych [24].

Obserwuje się tendencję, zarówno wśród lekarzy, jak i pacjentów, do kierowania do leczenia większości przypadków wykrytego dzięki badaniom przesiewowym raka prostaty, co dowodzi obecnej niezdolności do odróżniania postaci o małym znaczeniu klinicznym, które nigdy nie staną się symptomatyczne, od tych, które doprowadzą do śmierci [24]. W celu ograniczenia wyników fałszywie dodatnich w testach PSA i zwiększenia trafności diagnozy konieczne są poszukiwania dodatkowych markerów raka prostaty, pozwalających na jednoznaczne potwierdzenie obecności nowotworu złośliwego u pacjenta. Ponadto jednym z obecnych priorytetów jest opracowanie biomarkerów prognostycznych, które pozwoliłyby identyfikować pacjentów z wolno postępującymi chorobami prostaty o niskim ryzyku progresji, tak by pacjenci ci mogli uniknąć niepotrzebnego leczenia i obciążenia finansowego, a zamiast tego by byli objęci obserwacją [1]. Wczesna diagnoza raka prostaty jest konieczna w postępowaniu z klinicznie istotnymi przypadkami tej choroby. Rak prostaty w postaci guza ograniczonego do gruczołu krokowego może być efektywnie leczony poprzez przeprowadzenie zabiegu prostatektomii, radioterapię lub inne leczenie miejscowe. Z kolei w przypadku zaawansowanego raka prostaty w postaci nawrotu choroby bądź jej rozprzestrzenienia (przerzutów) poza obszar gruczołu krokowego do węzłów chłonnych, kości lub innych miejsc w organizmie, standardem terapeutycznym jest terapia pozbawienia androgenów [1]. Natomiast pacjenci z wolno rosnącymi guzami ograniczonymi do prostaty nie powinni być kierowani do leczenia, a zamiast tego

powinno się ich objąć obserwacją i monitorować progresję choroby w celu wdrożenia leczenia wówczas, gdy stanie się to konieczne [39].

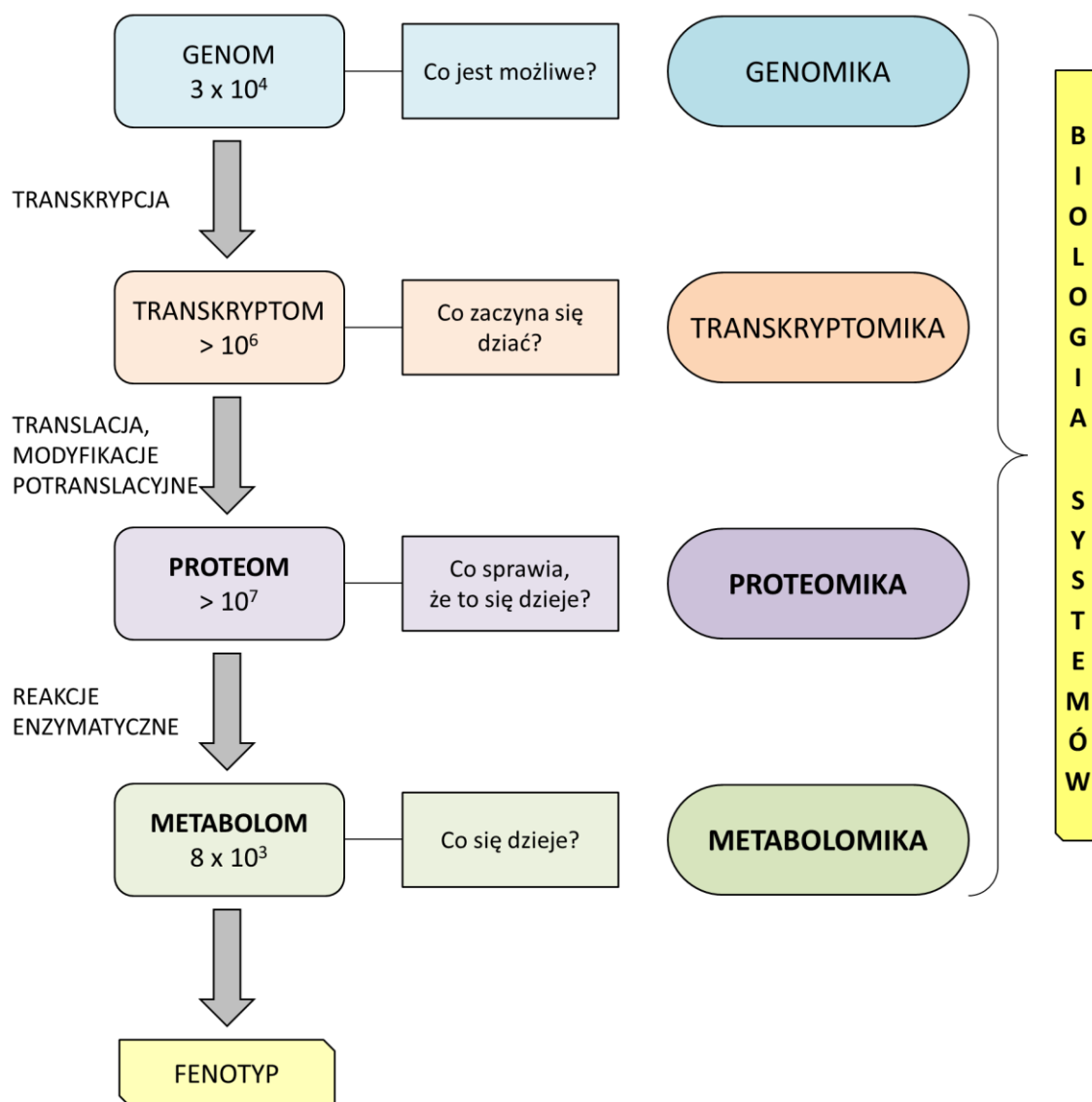
W celu polepszenia diagnostyki klinicznie istotnych przypadków raka prostaty i zwiększenia użyteczności klinicznej testów PSA zaproponowano szereg modyfikacji badań przesiewowych opartych o ten biomarker [5, 24]. Proponowane modyfikacje to: odniesienie PSA do wieku chorego (ang. *age-specific PSA*, A-PSA), odniesienie PSA do objętości gruczołu krokowego (ang. *PSA density*, PSAD), odniesienie PSA do objętości strefy przejściowej gruczołu krokowego (ang. *PSA density of the transition zone*, PSAD-TZ), odniesienie PSAD do wieku chorego (ang. *age-specific PSA density*, A-PSAD), odniesienie tempa wzrostu PSA do funkcji czasu (ang. *PSA velocity*, PSA-V, a także *PSA slope* i *PSA doubling time*), określenie stosunku wolnej frakcji PSA (ang. *free PSA*, f-PSA) do całkowitego PSA (ang. *total PSA*, t-PSA) będącego sumą frakcji wolnej i związanej z  $\alpha$ -1-antychymotrypsyną lub  $\alpha$ -2-makroglobuliną (%f-PSA). Modyfikacje te wykorzystują fakt, że poziom PSA w surowicy zależy od wielu czynników, między innymi od objętości prostaty i wieku [4]. Brakuje jednak dowodów na to, że którakolwiek ze zmodyfikowanych strategii oznaczania PSA poprawia wyniki zdrowotne, a niektóre z nich mogą nawet generować szkody [24]. Jedno z badań wykazało, że stosowanie PSA-V bez innych dodatkowych wskaźników może prowadzić do zakwalifikowania do biopsji jednego na siedmiu mężczyzn bez jednoczesnego zwiększenia dokładności predykcyjnej [40]. W celu ograniczenia liczby niepotrzebnych biopsji przy zachowaniu detekcji większości klinicznie istotnych przypadków raka stercza opracowany został algorytm postępowania uwzględniający nie tylko poziom PSA, ale również objętość gruczołu krokowego, wynik badania *per rectum* i wynik przezodbytniczego badania ultrasonograficznego [41]. Jednakże i w tym przypadku nie udowodniono poprawy wyników zdrowotnych.

## 2.2. Proteomika i metabolomika

Prowadzone od lat na świecie badania z wykorzystaniem między innymi nowoczesnych i stale udoskonalanych technik łączonych LC-MS doprowadziły do dynamicznego rozwoju proteomiki i metabolomiki. Te dwie dziedziny stanowią elementy tak zwanej biologii systemów. Biologia systemów wychodzi naprzeciw wyzwaniom stojącym przed współczesną nauką i stawia sobie za cel badanie złożonych i skomplikowanych oddziaływań, które zachodzą w systemach biologicznych. Scala ona w jeden system zależności cztery główne „omiki”, którymi są gemonika, transkryptomika, proteomika i metabolomika (Rycina 2).

Genetyka i genomika, od których zaczyna się przepływ informacji w organizmie, nie dają informacji o wszystkich zjawiskach zachodzących w komórce ani nie opisują wszystkich relacji pomiędzy różnymi poziomami organizacji biologicznej. Uzasadniony jest zatem wzrost zainteresowania proteomiką i metabolomiką. Identyfikacja peptydów i białek, produktów ekspresji genów, to kolejny krok w kierunku całościowego opisu systemów biologicznych. Należy przy tym zaznaczyć, że proteom, w przeciwieństwie do genomu, jest dynamiczny, niejednorodny i cechuje się zmiennym stężeniem, nie jest zatem prostą funkcją ekspresji genów [42]. Jeszcze większa dynamika charakteryzuje metabolom, czyli ogół metabolitów obecnych w organizmie, tkance czy komórce. Metabolity pełnią różnorodne funkcje w organizmie, natomiast ich obecność, a tym bardziej stężenie, nie wynika wprost z sekwencji nukleotydów. Spośród „omik” to metabolomika jest najbardziej związana z fenotypem. Nie dziwi zatem fakt, iż naukowcy na całym świecie wykorzystują potencjał proteomiki i metabolomiki między innymi w poszukiwaniu biomarkerów chorób nowotworowych [43-55].





Rycina 2. Diagram ilustrujący techniki „omiczne”. Przepływ informacji w organizmie zaczyna się od genów, których liczba wynosi około  $3 \times 10^4$ , a kończy na metabolitach, których liczba jest szacowana na około  $8 \times 10^3$ . Spośród „omik”, metabolomika jest najbardziej związana z fenotypem [42, 47].

Pojęcie biomarker funkcjonuje w terminologii medycznej od wielu lat. Pod tym pojęciem według Agencji Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) należy rozumieć wskaźnik, dający się obiektywnie zmierzyć i możliwy do zastosowania w ocenie przebiegu procesów fizjologicznych, patologicznych, a także odpowiedzi organizmu na podjęte leczenie [56]. Amerykański *National Cancer Institute* definiuje z kolei biomarker jako biomolekułę obecną we krwi, innych płynach ustrojowych lub tkankach, która jest sygnałem normalnego bądź anormalnego procesu, stanu

organizmu lub choroby [1]. Pod względem właściwości biologicznych biomarkerem może być cecha, materiał biologiczny (komórka, tkanka, itd.), gen lub cząsteczka obecna w płynie ustrojowym czy w materiale biologicznym (produkty genów, enzymy, hormony, metabolity, itd.), a nawet cały zmieniony profil białkowy, peptydowy albo metaboliczny, które wskazują na przebieg choroby lub postępy w leczeniu [42, 57].

Biomarkery są przydatne w diagnostyce oraz przy podejmowaniu decyzji terapeutycznych. Obecnie do szeroko stosowanych biomarkerów w praktyce klinicznej należą między innymi: temperatura ciała (marker gorączki), ciśnienie krwi (marker chorób układu krążenia), glukoza (marker cukrzycy), cholesterol (marker miażdżycy i chorób układu sercowo-naczyniowego), PSA (marker raka gruczołu krokowego), ALAT i AspAT (markery chorób wątroby i dróg żółciowych), troponiny (markery zawału mięśnia sercowego), białko C-reaktywne (marker stanów zapalnych). Jednakże dzięki dużemu postępowi nauki wciąż odkrywane i charakteryzowane są nowe markery w wielu dziedzinach, między innymi w onkologii, kardiologii oraz pulmonologii. Pozwalają one nie tylko poszerzyć dostępny panel technik diagnostycznych, ale także przyczyniają się do lepszego zrozumienia patomechanizmów stanów chorobowych oraz mechanizmów naprawczych związanych z podjętym leczeniem.

Dla celów diagnostycznych, klinicznych i opracowywania nowych leków między innymi w dziedzinie onkologii można wyróżnić cztery typy biomarkerów: diagnostyczne, prognostyczne, predykcyjne oraz farmakodynamiczne [1, 56]. Biomarkery każdego z wymienionych typów mogą wpłynąć na podejmowanie decyzji terapeutycznych i pomóc w opracowywaniu leków przeciwnowotworowych. Biomarkery diagnostyczne wskazują na toczący się w organizmie określony proces chorobowy. Pozwalają zdiagnozować istniejącą chorobę nowotworową u danego pacjenta, co stanowi podstawę do podjęcia dalszych działań. Biomarkery prognostyczne określają ryzyko wystąpienia choroby lub informują o naturalnym przebiegu choroby nowotworowej bez wdrożenia terapii lub przy standardowym schemacie terapii. Pozwalają rozróżnić pacjentów z guzem nowotworowym, dla których rokowania są pomyślne, od tych ze złymi rokowaniami. Mogą być wykorzystane do podejmowania decyzji o tym kogo leczyć i jak agresywnie leczyć. Biomarkery predykcyjne charakteryzują się tym, że wykorzystuje się je do wskazania tych pacjentów, którzy z największym prawdopodobieństwem odniosą korzyść z odpowiedniej terapii, co stanowi przykład medycyny spersonalizowanej. Umożliwiają wybór terapii dającej największe prawdopodobieństwo powodzenia, ponieważ pomagają ocenić najbardziej prawdopodobną odpowiedź na określony rodzaj terapii u danego pacjenta. Z kolei biomarkery farmakodynamiczne pozwalają ocenić efekty danego leku względem guza, potwierdzić cel terapeutyczny i mechanizm działania leku. Mogą być czasem pomocne przy określeniu skutecznej dawki leku.

Do klas związków, mogących pełnić rolę biomarkerów, należą między innymi aminokwasy i inne związki małowcząsteczkowe, które znajdują się w kręgu zainteresowania metabolomiki, oraz peptydy i białka, których analizą zajmuje się proteomika.

Proteomika jest dziedziną nauki, która rozwinęła się jako kontynuacja i uzupełnienie badań nad sekwencjonowaniem genomu. Proteomika stawia sobie za cel identyfikację kodowanych przez genom peptydów i białek, których ogół zwany jest proteomem [42]. Koncept proteomu został zapoczątkowany przez Marca Wilkinsa w 1994 roku [52]. Od tamtego czasu określenia proteom oraz proteomika na stałe weszły do języka nauki, a ilość badań proteomicznych stale wzrasta, o czym świadczą między innymi publikowane coraz liczniej artykuły naukowe oraz powstające czasopisma naukowe poświęcone tej tematyce. W porównaniu do genomu i transkryptomu, proteom jest znacznie bardziej złożony i dynamiczny [54]. Nie jest on prostą punkcją ekspresji genów, co czyni badania proteomiczne znacznie bardziej złożonymi niż można by tego oczekiwać biorąc pod uwagę jedynie liczbę genów (Rycina 2). Białka są właściwymi funkcjonalnymi molekułami w komórkach i reprezentują jej aktualny stan, dlatego ich oznaczanie jako część diagnozy może wspomagać wykrywanie stanów patologicznych. Znana jest dziś już ogromna ilość białkowych biomarkerów, które znalazły zastosowanie w diagnostyce klinicznej, wyborze odpowiedniej metody leczenia oraz monitorowaniu postępów choroby i skuteczności terapii.

Badania proteomiczne obejmują procedury jednoczesnego oczyszczania i separacji związków wchodzących w skład wieloskładnikowych próbek materiału biologicznego, a następnie ich identyfikację i interpretację w celu selekcji potencjalnych biomarkerów, których przydatność w dalszej kolejności musi być zweryfikowana i zwalidowana [42]. Strategia proteomiczna umożliwia szybką identyfikację różnic pomiędzy profilami białkowymi w różnych próbkach, co pozwala wykryć potencjalne biomarkery lub szlaki metaboliczne zaangażowane w stan chorobowy. We współczesnej proteomice można wyróżnić trzy podstawowe procedury analityczne: *bottom-up*, *shotgun* oraz *top-down* [42]. Najpopularniejsza strategia *bottom-up* opiera się na rozdzieleniu mieszaniny białek przy pomocy elektroforezy dwuwymiarowej. Strategia ta jest jednak mało powtarzalna i czasochłonna. W związku z tym zastępowana jest często przez strategię *shotgun*, w której wstępnie trawi się wszystkie białka w próbce, a otrzymaną mieszaninę peptydów rozdziela się za pomocą chromatografii cieczowej i następnie przeprowadza się ich identyfikację za pomocą technik spektrometrii mas. Ostatnia strategia, *top-down*, polega na fragmentacji całych białek i nie wymaga ich wcześniejszego trawienia. Te trzy techniki wzajemnie się uzupełniają.

Metabolomika opiera się o kompleksową analizę małowcząsteczkowych metabolitów organizmu lub określonej próbki biologicznej i korzysta z biochemicznej wiedzy rozwijanej na przestrzeni wielu lat [58]. Metabolomika to ostatnia z tak zwanych technik „omicznych” i skupia się na półproduktach i produktach metabolizmu, między innymi węglowodanach, kwasach tłuszczowych, aminokwasach, nukleotydach, kwasach organicznych, witaminach, antyoksydantach i innych grupach związków (Rycina 2). Analogicznie do genomu, transkryptomu i proteomu, ogół metabolitów tworzy metabolom, który może odnosić się do wszystkich poziomów organizacji biologicznej: organizmu, tkanki, komórki bądź jej kompartmentu [58]. Liczba metabolitów w organizmie człowieka jest stosunkowo niska w porównaniu do liczby genów czy białek, jednakże liczba czynników, które mają wpływ na poziomy metabolitów w płynach biologicznych i tkankach, jest bardzo duża. Metabolom jest dynamiczny i podatny na naturalne fluktuacje oraz czynniki zewnętrzne, w związku z czym metabolomika zapewnia wgląd w aktualny stan organizmu. Poziomy metabolitów można traktować jako wypadkową odpowiedź organizmu na choroby, podjęte leczenie, czynniki środowiskowe, dietę, modyfikacje genetyczne, zmiany w mikroflorze jelitowej i zmienioną aktywność enzymów [59-61]. Dlatego też spośród nauk „omicznych” to metabolomika jest najbardziej związana z fenotypem.

Współczesna metabolomika obejmuje czasowo kilka ostatnich dekad. Warto jednak zwrócić uwagę na to, że koncept metabolomiki, czyli wykorzystanie związków chemicznych jako biomarkerów diagnostycznych, pochodzi z czasów starożytnych, niezależnie od tego czy Starożytni rozumieli naturę biomarkerów, czy też nie. Idea, że zmiany w tkankach lub płynach ustrojowych są wskaźnikami chorób, była obecna między innymi w pracach Hipokratesa, który zaproponował metodę diagnozy cukrzycy na podstawie słodkiego, owocowego zapachu z ust w IV w. p.n.e., a w 1506 roku Ulrich Pinder opracował diagram moczu, który pozwalał diagnozować różne choroby na podstawie koloru, zapachu i smaku moczu [62]. Publikacją uważaną za pierwszą w dziedzinie współczesnej metabolomiki jest praca Paulinga i wsp. z 1971 roku [63]. Natomiast słowo metabolomika zostało wymyślone w późnych latach pięćdziesiątych, a pierwszą publikacją używającą słowa metabolom była praca Olivera i wsp. z 1998 roku [64]. Genomika, transkryptomika ani proteomika nie wyjaśniają całkowicie złożonej odpowiedzi organizmu na bodźce fizjologiczne i patofizjologiczne, dlatego w ostatnich latach wzrasta zainteresowanie badaniami metabolomicznymi [42, 61]. Liczne takie badania mają na celu poszukiwanie metabolitów, które różnicowałyby próbki pochodzące od pacjentów z określoną chorobą i od osób zdrowych bądź też spełniały rolę biomarkerów prognostycznych albo predykcyjnych. Jest to jedno z głównych zadań metabolomiki.

Współcześnie w metabolomice wyróżnia się trzy podejścia badawcze: metaboliczny „odcisk palca”, profilowanie metabolitów oraz metabolomikę celowaną. Strategia „odcisku palca” to globalna i szybka ocena odtwarzalnego „wzoru” metabolitów w próbce biologicznej bez konieczności identyfikacji metabolitów. „Odcisk palca” reprezentuje wiele różnych klas związków o potencjalnym znaczeniu, ale nie określonych *a priori*. Ta strategia nie wymaga zaawansowanego przygotowania próbki ani całkowitego rozdziału chromatograficznego. Zamiast tego wykorzystuje techniki, które prowadzą do otrzymania mniej złożonych i bardziej odtwarzalnych danych. Metaboliczny „odcisk palca” jest wykorzystywany głównie do klasyfikacji próbek, a nie do analizy ilościowej. Celem tego podejścia badawczego jest bowiem dyskryminacja pomiędzy próbkami o różnym statusie biologicznym, np. zdrowie /choroba, na podstawie unikalnej sygnatury charakteryzującej stan metaboliczny określonej tkanki czy płynu biologicznego [65-67].

Profilowanie metabolitów to w metabolomice podejście niecelowane. Koncentruje się również na analizie szerokiego zakresu metabolitów, między innymi aminokwasów, cukrów, lipidów czy soli żółciowych, a związki o potencjalnym znaczeniu także nie są znane *a priori*. Jednakże w przeciwieństwie do metabolicznego „odcisku palca”, profilowanie metabolitów ma na celu identyfikację tak wielu związków, jak to możliwe, a także ich oznaczenie ilościowe. Wiąże się to z koniecznością prowadzenia wysokoprzepustowych analiz metabolitów, które wymagają rozdziału chromatograficznego o wysokiej rozdzielczości oraz detekcji z wykorzystaniem spektrometrii mas. Ta strategia pozwala wykryć zmiany w nieoczekiwanych częściach metabolomu. Zmiany te mogą się odnosić do konkretnych szlaków metabolicznych. W związku z tym profilowanie metabolitów często prowadzi do sformułowania nowych hipotez badawczych i do identyfikacji nowych metabolicznych biomarkerów [65, 66, 68].

Metabolomika celowana skupia się na monitorowaniu jednego lub kilku predefiniowanych metabolitów, co zwykle pozwala na ich identyfikację i precyzyjne oznaczenie w próbkach. Analizowane związki są wybierane *a priori* na podstawie znanych szlaków metabolicznych lub zidentyfikowanych biomarkerów i są powiązane z konkretną reakcją w organizmie. Techniki analityczne w przypadku metabolomiki celowanej, w tym przygotowanie próbki i metody detekcji, mają na celu zapewnienie maksymalnej czułości i selektywności dla osiągnięcia niskich granic wykrywalności i oznaczalności metabolitów [65, 66, 68].

### 2.3. Aspekty proteomiczne i metabolomiczne w badaniach raka prostaty

Naukowcy na całym świecie poszukują biomarkerów diagnostycznych i prognostycznych raka prostaty. W ostatnich latach pojawiło się wiele doniesień naukowych odnośnie wykrycia biomarkerów, mogących potencjalnie polepszyć diagnostykę raka prostaty lub pomóc w identyfikacji pacjentów z agresywnymi postaciami nowotworu. Należą do nich takie grupy związków, jak: białka, kwasy nukleinowe oraz metabolity [43, 69, 70].

Komórki nowotworowe wykazują odmienny metabolizm oraz zwiększone wymagania energetyczne w porównaniu do komórek zdrowych. Ponieważ niektóre zmiany metaboliczne zachodzą we wczesnym etapie procesu transformacji nowotworowej, mogą nie tylko przyczynić się do poznania biomarkerów umożliwiających wykrycie raka w początkowym stadium jego rozwoju, ale także zostać wykorzystane jako potencjalny cel terapii nowotworowej. Cechą charakterystyczną odmiennego metabolizmu komórek gruczołu krokowego jest wzmożona produkcja cytrynianu, PSA oraz poliamin (sperminy i mio-inozytolu), które są głównymi składnikami płynu wydzielanego i magazynowanego przez prostatę [70]. Zakłada się, że choć zmiany genetyczne leżą u podstaw transformacji nowotworowej w prostacie, to zmieniona aktywność komórkowa wymaga adaptacji metabolizmu, by dostosować się do wymagań bioenergetycznych komórek nowotworowych. Te adaptacje związane są między innymi z metabolizmem cytrynianu, którego stężenie w efekcie procesu karcynogenezy spada.

Zaburzenia metaboliczne komórek i całego organizmu odzwierciedlane są także poprzez stężenia aminokwasów w płynach ustrojowych. Na podstawie dostępnego piśmiennictwa naukowego wiadomo, że profile aminokwasowe mogą się różnić w zależności od rodzaju nowotworu oraz jego stadium zaawansowania [71, 72]. Aminokwasy są niezbędnymi komponentami białek, enzymów, są także prekursorami wielu ważnych fizjologicznie związków, takich jak hormony, neuroprzekaźniki, aminy biogenne, hem, kreatyna, zasady purynowe i pirymidynowe, tlenek azotu, sole żółciowe, glukoza. Pod względem chemicznym aminokwasy są związkami organicznymi, zawierającymi w swojej cząsteczce zasadową grupę aminową i kwasową grupę karboksylową. Aminokwasy można podzielić na dwie podstawowe grupy. Pierwszą stanowią aminokwasy proteogenne (biogenne, budujące białka), do których zaliczamy 20 związków. Oprócz nich można wyróżnić grupę aminokwasów nieproteogennych (niebiałkowych), do których zaliczamy między innymi taurynę, ornitynę, cytrulinę, sarkozynę. Poza swoją rolę strukturalną aminokwasy pełnią wiele ważnych funkcji w organizmie. Aminokwasy takie jak kwas glutaminowy i kwas

asparaginowy są neurotransmiterami oraz prekursorami neurotransmiterów, umożliwiając transmisję impulsów nerwowych w mózgu ssaków. Jako składniki cytokin i receptorów komórkowych aminokwasy biorą udział w przekazywaniu sygnałów pomiędzy komórkami organizmu. Zmiany w dostępności aminokwasów wpływają w znaczący sposób na wiele funkcji komórkowych, w tym na regulację sygnałów komórkowych, ekspresję genów i transport samych aminokwasów.

Stężenie aminokwasów, zarówno w surowicy, jak i w moczu, jest odbiciem stanu metabolicznego organizmu. Utrzymywane jest na stałym poziomie u osób zdrowych, jednak ulega zmianom w różnych stanach patologicznych, między innymi w dysfunkcji wątroby czy w chorobach nowotworowych [73, 74]. Translokacja wolnych aminokwasów w surowicy pacjentów onkologicznych jest związana m. in. ze wzmożoną syntezą białek w komórkach rakowych. Nieprawidłowy profil aminokwasów jest zatem spowodowany odmiennym metabolizmem związanym z toczącym się procesem kancerogenezy. Pod pojęciem nieprawidłowego profilu aminokwasowego należy rozumieć nie tylko wzrost lub spadek stężenia poszczególnych aminokwasów w płynach ustrojowych, ale także zmiany wzajemnych stosunków pomiędzy konkretnymi aminokwasami lub ich całymi grupami. Ponieważ profile aminokwasowe mogą się różnić w zależności od rodzaju nowotworu lub jego stadium zaawansowania, należy sądzić, że zmiany profilu stężeń aminokwasów w płynach ustrojowych mogą być obiecującym biomarkerem różnych chorób nowotworowych, w tym raka prostaty.

W doniesieniach naukowych pojawiają się liczne informacje o metabolitach, których poziomy w płynach ustrojowych, takich jak surowica, mocz czy wydzielina z prostaty, a także w tkankach, wykazują korelację z progresją raka prostaty i których zmiany poziomów mogą potencjalnie odróżniać nieistotne klinicznie przypadki raka od choroby agresywnej. Należą do nich między innymi aminokwasy: sarkozyna [69], prolina [69], leucyna [69], tauryna [75], kwas glutaminowy [75], kinurenina [69], a także metabolity należące do innych klas związków chemicznych: cytrynian [76], cholina [77], uracyl [69], glicerolo-3-fosforan [69], mio-inozytol [76], spermina [76], mleczan [78].

Metabolitem różnicującym nowotwór złośliwy prostaty od gruczolaka tego narządu została ogłoszona w 2009 roku sarkozyna – aminokwas nieproteogeny będący N-metylową pochodną glicyny [69]. Sarkozyna jest zaangażowana w metabolizm aminokwasów oraz w procesy metylacji, zachodzące podczas progresji raka prostaty [79]. Jest produktem pośrednim szlaku oksydacji choliny [80]. Sreekumar i wsp. [69] wykorzystując techniki łączone LC-MS oraz GC-MS zbadali profil metaboliczny w 262 próbkach biologicznych, obejmujących tkanki, mocz i osocze pacjentów z dodatnim i ujemnym wynikiem biopsji prostaty. Wykazali oni znaczący wzrost stężenia sarkozyny w tkankach objętych nowotworem złośliwym stercza w

porównaniu z grupą kontrolną oraz podwyższony poziom tego aminokwasu w moczu chorych na ten nowotwór. Zawężając badania do pacjentów posiadających PSA w zakresie „szarej strefy”, czyli 2-10 ng/ml, Sreekumar i wsp. stwierdzili, że stężenie sarkozyny w moczu lepiej różnicuje pacjentów z dodatnim i ujemnym wynikiem biopsji stercza w porównaniu z poziomem PSA w surowicy.

Jentzmik i wsp. [81] podjęli się weryfikacji sarkozyny jako potencjalnego biomarkera pozwalającego na wczesną detekcję raka prostaty i predykcję stopnia jego agresywności. Ich niezależne badanie obejmowało 106 pacjentów z rakiem, 33 pacjentów bez objawów raka (potwierdzonych biopsjami) oraz 12 zdrowych mężczyzn i 12 zdrowych kobiet. Wykazano, że poziom sarkozyny w moczu po badaniu *per rectum* nie powoduje lepszego różnicowania między pacjentami z guzem prostaty a grupą kontrolną w porównaniu ze stężeniem PSA w we krwi. Co więcej, znacząco lepszym od poziomu sarkozyny w moczu markerem nowotworu złośliwego gruczołu krokowego okazał się wskaźnik %f-PSA (stosunek frakcji wolnej PSA do całkowitego stężenia tego antygeny w surowicy). Stężenia sarkozyny nie były ponadto powiązane ani ze stopniem zaawansowania raka, ani ze stopniem złośliwości. W kolejnych miesiącach pojawiły się następne badania weryfikujące rolę stężenia sarkozyny w moczu jako markera raka prostaty. Sreekumar i wsp. [82] potwierdzili swoje wcześniejsze wnioski dotyczące istotnie wyższego poziomu sarkozyny w moczu pacjentów z guzem stercza. Podkreślili jednocześnie, że celem ich wcześniejszych badań [69] nie było ustanowienie sarkozyny klinicznym testem wykrywającym raka prostaty, a ich praca miała być raczej przedstawieniem wyników i dowodem na użyteczność ich strategii, w której profilowanie metabolitów wykorzystane zostało do poszukiwania w tkankach biomarkerów agresywnej postaci raka prostaty, spośród których sarkozyna może być także wykryta w moczu i dodatkowo pełnić rolę w progresji raka. Intencją badań zespołu było zatem zademonstrowanie potencjału metabolomiki w poszukiwaniu potencjalnych biomarkerów raka. Kolejne dwa zespoły badaczy: Colleselli i wsp. [83] oraz Wu i wsp. [84] nie stwierdziły istotnych statystycznie różnic między stężeniem sarkozyny w moczu chorych na raka prostaty a grupą kontrolną. Wyjaśnienia rozbieżności pomiędzy doniesieniami o roli sarkozyny w moczu jako markera raka stercza podjęli się także Cao i wsp. [85]. Zespół ten wykazał, że sarkozyna posiada słaby potencjał prognostyczny i diagnostyczny w porównaniu z parametrem %f-PSA. Wiele grup badaczy podjęło także wysiłki mające na celu oszacowanie znaczenia stężenia sarkozyny w surowicy jako markera nowotworu złośliwego gruczołu krokowego. Struys i wsp. [86] stwierdzili, że poziom sarkozyny w surowicy nie różni się u pacjentów zdrowych oraz cierpiących na nowotwór złośliwy prostaty. Z kolei Lucarelli i wsp. [23] udowodnili wartość diagnostyczną sarkozyny w surowicy u pacjentów z



niskim poziomem PSA, wynoszącym mniej niż 4 ng/ml. Jak natomiast wykazali Bohm i wsp. [28], stężenie sarkozyny w surowicy nie jest jednak czynnikiem różnicującym pomiędzy wczesnym a zaawansowanym stadium nowotworu złośliwego stercza.

Przykład sarkozyny pokazuje, jak bardzo złożonym zagadnieniem jest poszukiwanie biomarkerów. Należy kontynuować badania podejmowane w celu wyjaśnienia wątpliwości dotyczących tej problematyki. Ponadto na przykładzie sarkozyny można zauważyć, jak ważnym etapem procesu poszukiwania biomarkerów jest ich walidacja [60, 87]. Termin ten odnosi się nie tylko do analitycznej części badań, lecz również do wszystkich czynności, które mają na celu zapewnienie wysokiej jakości wniosków wyciąganych z analizy danych [88]. Walidacja rezultatów badań pozwala między innymi zweryfikować wnioski poprzez analizę dodatkowych zbiorów danych w celu odróżnienia wyników fałszywie dodatnich od tych, które stanowią istotną wartość.

Badania mające na celu znalezienie nowych, bardziej specyficznych markerów nowotworu złośliwego gruczołu krokowego koncentrują się nie tylko na analizie metabolomu ludzkiego organizmu, ale także w równie dużym stopniu na analizie jego profilu białkowego. Na podstawie analizy dostępnego piśmiennictwa naukowego można wytypować szereg białek umożliwiających pełniejsze zrozumienie toczącego się w organizmie procesu kancerogenezy oraz mogących ulepszyć i przyspieszyć diagnozę raka prostaty, a także przewidzieć nawrót choroby. Ze względu na małą liczebność badanych prób, brak walidacji stosowanych metod oraz różnice w wynikach otrzymanych w różnych zespołach badawczych trudno na dzień dzisiejszy stwierdzić, czy któreś z tych białek może posiadać rzeczywiste znaczenie diagnostyczne.

Do potencjalnych białkowych biomarkerów raka stercza zaliczamy m.in. proteazę serynową KLK2 (ang. *kallikrein-related peptidase 2*), która posiada w 80% identyczną budowę jak antygen PSA oraz jest wydzielana przez te same komórki nabłonka gruczołu krokowego. Stwierdzono podwyższony poziom tego enzymu w surowicy osób chorych na raka stercza. Białko to w połączeniu z parametrami PSA lub %f-PSA przyczyniło się do polepszenia trafności diagnozy tego nowotworu złośliwego [89, 90]. Kolejny potencjalny marker raka stercza stanowi swoisty antygen błonowy gruczołu krokowego (ang. *prostate-specific membrane antigen*, PSMA) [91, 92]. Białkiem odzwierciedlającym zmiany zachodzące w początkowym stadium nowotworu złośliwego stercza jest wczesny antygen raka prostaty (ang. *early prostate cancer antigen*, EPCA) [93, 94]. Z kolei funkcję obiecującego wskaźnika diagnostycznego obecnego w moczu chorych na raka gruczołu krokowego przypisuje się antygenowi nowotworu złośliwego stercza (ang. *prostate cancer antigen 3*, PCA 3) [95]. Białkiem pozwalającym na odróżnienie łagodnego przerostu prostaty od nowotworu złośliwego tego gruczołu jest także racemaza metyloacylo-CoA (ang. *methylacyl-CoA racemase*,

AMACR) [96]. Duży potencjał diagnostyczny przypisuje się antygenowi komórek macierzystych stercza (ang. *prostate stem cell antigen*, PSCA), ponieważ wykazano istnienie dodatniej korelacji pomiędzy produkcją PSCA a punktami w skali Gleasona, wielkością guza i obecnością przerzutów [97]. Do listy kandydatów na biomarkery raka stercza należy także zaliczyć: hepsynę, E-kadherynę, chromograninę A, białko CRISP-3 (ang. *cysteine-rich secretory protein 3*), urokinazowy aktywator plazminogenu (ang. *urokinase-type plasminogen activator*, u-PA) i wiele innych [31]. Podsumowując, konieczne są dalsze badania poświęcone potencjalnym markerom nowotworu złośliwego gruczołu krokowego, mające na celu weryfikację dotychczas uzyskanych wyników i potwierdzenie ich użyteczności w diagnostyce klinicznej, a także poszukiwanie nowych biomarkerów, które zwiększyłyby trafność diagnozy i w konsekwencji umożliwiły wdrożenie właściwego sposobu leczenia.

Ze wzrostem guzów nowotworowych, a zwłaszcza guzów litych, ściśle wiąże się proces angiogenezy w ich obrębie, który polega na zwiększeniu liczby naczyń krwionośnych [98]. Z procesem tym związana jest obecność różnorodnych czynników stymulujących wzrost guza. Są to białka, których rola w kancerogenezie jest coraz lepiej poznana i wiele z nich jest typowanych na biomarkery chorób nowotworowych. W tej grupie wymienić można następujące białka: rozpuszczalny receptor naskórkowego czynnika wzrostu, zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów, czynnik wzrostu hepatocytów, osteopontyna, płytkopochodny czynnik wzrostu, płytkowo-śródbłonkowe białko adhezyjne 1, czynnik komórek macierzystych oraz rozpuszczalne receptory 1 i 2 naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu.

Rozpuszczalny receptor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *soluble epidermal growth factor receptor*, sEGFR) to rozpuszczalny fragment domeny pozakomórkowej receptora naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) [99]. Jest to receptor dla zewnątrzkomórkowych ligandów białkowych z rodziny naskórkowego czynnika wzrostu i należy do rodziny receptorów ErbB, stanowiących podrodzinę czterech receptorowych kinaz tyrozynowych. Mutacje prowadzące do nadekspresji lub zwiększonej aktywności EGFR mogą prowadzić do rozwoju nowotworu, a identyfikacja EGFR jako onkogenu doprowadziła do opracowania wielu leków przeciwnowotworowych skierowanych przeciwko temu receptorowi, zwanych inhibitorami EGFR [100, 101]. Rozpuszczalny fragment EGFR o masie 110 kDa jest obecny we krwi, ponieważ odłącza się od macierzystego błonowego białka o masie 170 kDa.

Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *basic fibroblast growth factor*, FGF-basic) jest członkiem rodziny czynników wzrostu fibroblastów, do której należy

ponad 20 białek kontrolujących wiele procesów komórkowych, w tym proliferację, różnicowanie i przeżywalność [102]. Czynniki te są zaangażowane w proces angiogenezy, gojenie się ran i rozwój zarodków. FGF-basic jest silnym czynnikiem wzrostu dla normalnych oraz nowotworowych komórek nabłonkowych prostaty [103]. Ze względu na udział w angiogenezie FGF-basic odgrywa istotną rolę w progresji nowotworu [102]. Ekspresja FGF-basic ma miejsce w raku prostaty, a także w innych nowotworach złośliwych, między innymi piersi, płuca czy trzustki.

Czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (ang. *granulocyte colony-stimulating factor*, G-CSF) to hemopoetyczny czynnik wzrostu. Jest glikoproteiną stymulującą szpik kostny do produkcji granulocytów i komórek macierzystych [104]. Oprócz swojej roli w systemie krwiotwórczym G-CSF działa również na komórki nerwowe jako czynnik neurotroficzny. Rekombinowana forma G-CSF jest wykorzystywana w leczeniu. W przypadku niektórych nowotworów podaje się go pacjentom po chemioterapii cierpiącym z powodu neutropenii.

Czynnik wzrostu hepatocytów (ang. *hepatocyte growth factor*, HGF) jest białkiem regulującym wzrost komórek, ruchliwość komórek i morfogenezę. Ta wielofunkcyjna cytokina bierze udział w procesach angiogenezy, karcynogenezy i regeneracji tkanek. Przyczynia się do progresji nowotworu w wielu różnych tkankach, a także do powstawania przerzutów nowotworowych [105-107]. Wykazano, że HGF odgrywa także rolę w rozwoju raka prostaty [105].

Osteopontyna jest glikoproteiną wiążącą integrynę i składa się z około 300 reszt aminokwasowych [108, 109]. Występuje w wielu tkankach i narządach organizmu i jest wydzielana do płynów ustrojowych, między innymi do krwi, moczu oraz nasienia. Osteopontyna pełni wiele funkcji w organizmie. Jej stężenie zwiększa się w ostrych i przewlekłych stanach zapalnych. Białko to bierze udział w powstawaniu kamieni nerkowych, w regulacji odpowiedzi immunologicznej na alergeny, wpływa również na progresję zmian miażdżycowych. Badania wskazują, że osteopontyna bierze udział w progresji nowotworów i że może pełnić rolę biomarkera w prognozowaniu przebiegu różnych nowotworów i monitorowaniu ich leczenia [108, 109].

Płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. *platelet-derived growth factor*, PDGF) jest czynnikiem wzrostu, odgrywającym istotną rolę w angiogenezie. Pod względem budowy chemicznej jest glikoproteiną i dimerem, który może występować w kilku różnych izoformach. Może być homodimerem składającym się z dwóch łańcuchów A, B, C lub D, a także heterodimerem zbudowanym z łańcucha A i łańcucha B [110]. PDGF reguluje wiele procesów komórkowych i odgrywa rolę w patogenezie różnych typów nowotworu [111].

Płytkowo-śródbłonkowe białko adhezyjne 1 (ang. *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*, PECAM-1) jest białkiem wiążącym ze sobą komórki śródbłonka. Jest zaangażowane w migrację leukocytów, angiogenezę i aktywację integryn.

Czynnik komórek macierzystych (ang. *stem cell factor*, SCF) to cytokina hemopoetyczna, która może występować jako białko transbłonowe lub rozpuszczalne [112, 113]. Pełni ważną rolę w proliferacji i przeżyciu pluripotencjalnych komórek prekursorowych. Głównym źródłem SCF jest szpik kostny.

Rozpuszczalne receptory naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (ang. *soluble vascular endothelial growth factor receptor*, sVEGFR) to białka, które są rozpuszczalnymi formami różnych receptorów dla naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (ang. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) [98]. Jest to główny czynnik odpowiedzialny za proces angiogenezy, a jego aktywność biologiczna zależy od obecności specyficznych białek receptorowych na powierzchni śródbłonka [98, 114]. Cytokina VEGF pobudza migrację i proliferację komórek śródbłonka oraz zwiększa przepuszczalność naczyń krwionośnych śródbłonka. To ułatwia komórkom rakowym przechodzenie do pozanaczyniowej przestrzeni i w konsekwencji zapoczątkowanie tworzenia przerzutów. Swoje działanie na komórki śródbłonka VEGF wywiera poprzez wiązanie z receptorami, do których należą receptory 1, 2 i 3 (odpowiednio VEGFR-1, VEGFR-2 i VEGFR-3). Oprócz postaci związanych z błoną komórkową receptory dla VEGF mogą występować również w formie rozpuszczalnej (sVEGFR-1 i sVEGFR-2), a ich budowa jest nieco inna niż odpowiadających im receptorów błonowych.

## 2.4. Techniki analityczne w proteomice i metabolomice

Strategie i techniki analityczne oraz sposoby rozwiązywania problemów stosowane w proteomice różnią się od tych wykorzystywanych w metabolomice, jednakże obie te dziedziny stają przed wyzwaniem, jakim jest analiza złożonych matryc biologicznych, najczęściej płynów ustrojowych, takich jak surowica, osocze, mocz, ślina czy płyn mózgowo-rdzeniowy [42].

Strategie proteomiczne i metabolomiczne wykorzystuje się do analizy niezwykle szerokiego spektrum próbek biologicznych, od narządów i tkanek, poprzez płyny ustrojowe, aż do hodowli komórkowych [42]. Nie ulega wątpliwości, że płyny ustrojowe są najlepszym źródłem materiału analitycznego do poszukiwania biomarkerów z punktu widzenia klinicznego. Dotyczy to zwłaszcza płynów łatwo dostępnych, takich jak surowica/osocze, mocz oraz ślina, ponieważ ich pobieranie może odbyć się nawet w warunkach domowych i nie stanowi dużego obciążenia dla pacjenta. W odniesieniu do raka prostaty wyróżnić można cztery główne źródła biomarkerów. Są to: tkanki uzyskane w wyniku biopsji lub zabiegu prostatektomii; pełna krew, surowica lub osocze; mocz lub mocz z wydzieliną z prostaty otrzymaną w wyniku masażu prostaty podczas badania *per rectum* (ang. *expressed prostatic secretion*, EPS); EPS lub płyn nasienny [115, 116]. Tabela 2 prezentuje zalety i ograniczenia związane z różnymi rodzajami analizowanego materiału biologicznego oraz typy markerów, których poszukuje się w poszczególnych rodzajach próbek. Krew oraz płyny „bliskie” gruczołowi prostaty (mocz, EPS, nasienie), które mogą być pobrane nieinwazyjnie, stanowią obiecujące źródło rozpuszczalnych związków – potencjalnych biomarkerów.

Tabela 2. Podstawowe źródła biomarkerów raka prostaty [115, 116]. Zalety i ograniczenia związane z różnymi rodzajami próbek odnoszą się do techniki poboru, przechowywania, objętości i składu próbek oraz markerów, które mogą zostać wykryte.

| Rodzaj materiału biologicznego  | Markery   | Zalety   | Ograniczenia   |
|---------------------------------|---|--|--|
| tkanka                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>- cechy histopatologiczne</li> <li>- proliferacja komórek</li> <li>- cząsteczki</li> <li>- aberracje lub wzory genetyczne</li> </ul>           | <ul style="list-style-type: none"> <li>- bezpośrednia ocena ekspresji białka lub genu</li> <li>- kompletny obraz ekspresji białek guza</li> <li>- potencjalny wgląd w biologię raka prostaty</li> <li>- najlepszy materiał do oceny odpowiedzi na podjętą terapię</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- inwazyjna technika poboru próbek</li> <li>- próbki zamrażane lub utrwalane w formalinie i zatapiane w parafinie</li> <li>- duża złożoność próbki</li> <li>- ograniczona ilość próbki</li> </ul> |
| pełna krew, surowica lub osocze | <ul style="list-style-type: none"> <li>- PSA</li> <li>- krążące komórki nowotworowe</li> <li>- krążące DNA nowotworowe</li> <li>- mikroRNA</li> <li>- rozpuszczalne białka</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- nieinwazyjna technika poboru próbki</li> <li>- szybka i tania technika poboru próbki</li> <li>- możliwość pobrania dużej objętości próbki</li> <li>- szybka diagnoza</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- duży zakres dynamiczny</li> <li>- niskie stężenie markerów</li> <li>- złożoność próbki</li> <li>- odległość od guza</li> </ul>  |
| mocz lub mocz z EPS             | <ul style="list-style-type: none"> <li>- mikroRNA</li> <li>- RNA (np. <i>PCA3</i>)</li> <li>- rozpuszczalne białka</li> <li>- egzosomy</li> </ul>                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>- nieinwazyjna technika poboru próbki</li> <li>- szybka i tania technika poboru próbki</li> <li>- możliwość pobrania dużej objętości próbki</li> <li>- bliskość guza</li> <li>- szybka diagnoza</li> </ul>                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>- niskie stężenie markerów</li> <li>- niestandardyzowana technika poboru próbki</li> <li>- zmienność składu dla danego pacjenta</li> </ul>  |
| EPS lub płyn nasienny           | <ul style="list-style-type: none"> <li>- rozpuszczalne białka</li> <li>- egzosomy</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- bliskość guza</li> <li>- prawdopodobne większe stężenie białek prostaty</li> <li>- szybka i tania technika poboru próbki</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- inwazyjna procedura</li> <li>- brak możliwości rutynowego poboru próbki</li> <li>- złożoność próbki</li> <li>- zmienność składu dla danego pacjenta</li> </ul>                                  |

Analiza krwi jest procedurą diagnostyczną stosowaną od wielu lat. Najczęściej nie analizuje się krwi pełnej, lecz otrzymane z niej pochodne płyny, takie jak surowica i osocze. Surowicę otrzymuje się przez odwirowanie skrzepłej krwi i stanowi ona frakcję krwi pozbawioną elementów morfotycznych i fibrynogenu. Osocze natomiast stanowi płynną frakcję krwi, w której zawieszono są elementy morfotyczne. Otrzymuje się je przez wirowanie krwi. Złożoność składu surowicy i osocza jest utrudnieniem w poszukiwaniu biomarkerów. Dla przykładu, proteom osocza ma zakres dynamiczny stężeń znanych białek obejmujący aż 10 rzędów wielkości [115]. Zdarza się zatem, że białka o niskiej zawartości nie są wykrywane przez obecnie dostępne techniki. Zaledwie 12 białek, między innymi albumina i immunoglobuliny, stanowi ponad 96 % ogółu białek surowicy [42]. Nie są one interesujące z diagnostycznego punktu widzenia, natomiast ich obecność w matrycy maskuje inne białka o potencjalnym znaczeniu klinicznym. W związku z tym koniecznym elementem badań proteomicznych jest usunięcie przeszkadzających białek za pomocą technik deplecji i oczyszczenie próbki lub wzbogacenie próbki w odniesieniu do potencjalnie ważnych składników.

Analiza moczu jest powszechnie stosowaną procedurą diagnostyczną, która posiada wiele zalet w porównaniu z analizą innych płynów ustrojowych. Jest wykorzystywana w wielu dziedzinach praktyki klinicznej. Przykłady rutynowych analiz moczu to pomiar cukromoczu (związany m. in. z przebiegiem cukrzycy), bilirubiny (związanej z dysfunkcją nerek lub niedrożnością dróg żółciowych) i hormonów, np. gonadotropiny kosmówkowej [117, 118]. Ponadto próbki moczu wykorzystuje się do analiz farmakokinetycznych leków [119, 120], analizy ekspozycji na egzogenne toksyny [121-123], analizy konsumpcji środków odurzających [124, 125], kontroli antydopingowej [126, 127] i monitorowania terapii [128]. W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania analizą moczu w poszukiwaniu biomarkerów chorób nowotworowych [125, 129-131].

Próbki moczu można podzielić na próbki pobrane o jednym czasie, próbki stanowiące dobową zbiórkę moczu oraz próbki połączone z dwóch lub większej liczby próbek zebranych w określonym przedziale czasu. Te rodzaje zbiórki moczu mają swoje zalety i ograniczenia [117, 121]. Dobowa zbiórka moczu jest uciążliwa, jednakże pozwala uzyskać lepszy wgląd w ekspozycję na toksyny egzogenne. Jednorazowe próbki moczu mogą być pobierane o dowolnej porze dnia, jednakże należy pamiętać, że stężenia związków obecnych w moczu zależą od jego objętości. Konieczna jest zatem kompensacja różnic w objętości moczu poprzez normalizację stężeń oznaczonych związków do stężenia substancji obecnej w moczu, ale nie reabsorbowanej [42]. Najczęściej w tym celu wykorzystuje się kreatyninę.

Kreatynina (2-amino-1-metylo-2-imidazolidyn-4-on) jest produktem ubocznym powstającym z kreatyny, cząsteczki o dużym znaczeniu dla dostarczania energii do komórek, głównie w mięśniach [117]. Kreatynina jest markerem czynności nerek i jest wykorzystywana w diagnozowaniu chorób nerek [118]. Oznaczanie kreatyniny jest ponadto ważnym elementem analizy moczu. Stężenia oznaczanych związków dzieli się zwykle przez stężenie kreatyniny oznaczone w tej samej próbce moczu [117, 132-134]. Ponieważ kreatynina jest wydalana z organizmu ze stałą szybkością, jej oznaczanie wykorzystuje się do oceny kompletności dobowej zbiórki moczu [133, 135]. Natomiast w przypadku profilowania białkowego w moczu oznaczenie kreatyniny w każdej próbce poprzedza rozcieńczenie próbek do najniższego stężenia kreatyniny zmierzonego w populacji próbek [136, 137].

Białka surowicy są filtrowane na podstawie ich wielkości i ładunków przez barierę filtracji kłębuszkowej w nerkach. Mogą następnie ulec reabsorpcji w proksymalnych kanalikach nerkowych [138]. W związku z tym stężenie białek w moczu jest zwykle bardzo niskie i wynosi około 150 mg/24 h. W skład proteomu moczu wchodzi jednak nie tylko białka pochodzące z filtracji, ale także pochodzące z nerek i układu moczowo-płciowego. Podobnie jak w przypadku analizy surowicy lub osocza, tak również w analizie moczu można stosować techniki deplecji. Niektóre białka, np. uromoduliny, są bowiem obecne w moczu w dużym stężeniu i mogą utrudniać analizę innych białek, występujących w mniejszych stężeniach [42].

Podstawowe narzędzia analityczne wykorzystywane przez proteomikę to: dwuwymiarowa elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (2D-PAGE), dwuwymiarowa chromatografia cieczowa połączona z tandemową spektrometrią mas (2D LC-MS/MS), jonizacja laserowa wspomagana matrycą z detektorem czasu przelotu (MALDI-TOF) oraz nanoelektrozpylanie (nanoESI) [42]. Techniki oparte na dwuwymiarowej elektroforezie żelowej były pierwszymi używanymi w analizie proteomu [49]. Badania proteomiczne zostały następnie rozszerzone o techniki nieżelowe, takie jak LC-MS. Metody żelowe i nieżelowe mają swoje zalety i ograniczenia. Badania oparte o techniki żelowe są czasochłonne i trudne do automatyzacji, stanowią jednak efektywne narzędzie globalnego przeglądu i porównania ilościowego tysięcy białek jednocześnie w obrębie złożonych układów biologicznych. Aby sprostać wymaganiom dogłębnej analizy proteomicznej, opracowane zostały procedury pre-frakcjonowania oraz deplecji i wzbogacania próbek. Rozwój aparatury i procedur analitycznych, w tym wykorzystanie żeli z immobilizowanym gradientem pH w wąskim zakresie, obrazowania fluorescencyjnego, mikromacierzy białkowych oraz rozwój metod spektrometrii mas i metod chromatograficznych, pozwolił poszerzyć spektrum aplikacyjne badań proteomicznych.



Współczesna metabolomika wykorzystuje techniki analityczne i chemometryczne do detekcji i oznaczania setek metabolitów w płynach ustrojowych lub tkankach. Do podstawowych narzędzi analitycznych metabolomiki należą: chromatografia cieczowa połączona z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS), chromatografia gazowa połączona ze spektrometrią mas (GC-MS), chromatografia gazowa połączona z tandemową spektrometrią mas (GC-MS/MS), tandemowy spektrometr mas z analizatorem rezonansu cyklotronowego z transformacją Fouriera (FT ICR MS/MS) oraz spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) [42]. Dwie najbardziej powszechne platformy analityczne stosowane w metabolomice, czyli NMR (przede wszystkim  $^1\text{H-NMR}$ ) i MS, pozwalają analizować wiele małocząsteczkowych metabolitów obecnych w próbce, włączając w to ich identyfikację i oznaczenie ilościowe, każda z nich ma jednak zalety i ograniczenia [43, 87].

Zalety spektroskopii NMR obejmują nieskomplikowane procedury przygotowania próbek i niezależność od rozdziału analitów. Technika NMR nie powoduje zniszczenia próbek, które dzięki temu mogą zostać użyte w dalszych analizach innymi metodami. Niedestrykcyjna natura NMR jest szczególnie użyteczna w analizie metabolitów komórek lub tkanek. Ponadto, składniki matrycy próbki w mniejszym stopniu wpływają na intensywność sygnału NMR niż w przypadku MS, co czyni NMR odpowiednim narzędziem do analiz złożonych próbek biologicznych. Głównym ograniczeniem techniki NMR pozostaje jej niska czułość [61, 139].

Zastosowanie spektrometrii mas w badaniach metabolomicznych zwykle wymaga oddzielenia metabolitów od analizowanych płynów biologicznych. W związku z tym spektrometria mas jest często łączona z wysokorozdzielczymi technikami, takimi jak chromatografia cieczowa, chromatografia gazowa czy elektroforeza kapilarna [87, 139, 140]. Platformy łączące chromatografię ze spektrometrią mas są chętnie stosowane w metabolomice ze względu na ich wysoką czułość i powtarzalność. MS jest techniką destrykcyjną względem próbek, jednakże tylko niewielkie ich ilości (rzędu mikrolitrów) są potrzebne do analiz. W GC-MS związki są ogrzewane i analizowane w stanie gazowym, dlatego nielotne substancje nie mogą być analizowane bezpośrednio i wymagają derywatywacji. LC-MS poprzez wybór odpowiednich kolumn i faz ruchomych zapewnia możliwość analizowania szerokiego zakresu metabolitów, od hydrofilowych po hydrofobowe [139, 140]. Innowacją w chromatografii było wprowadzenie techniki ultrasprawnej chromatografii cieczowej (ang. *ultra-high performance liquid chromatography*, UHPLC), która korzysta z krótszych kolumn o mniejszej średnicy wewnętrznej i mniejszych ziarnach, co skutkuje wzrostem sprawności kolumny, czułości, skróconym czasem analizy i mniejszym zużyciem fazy ruchomej w porównaniu do wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) [87,

139]. Mechanizm rozdzielczy w elektroforezie kapilarnej jest inny niż w technikach LC i GC i pozwala analizować cząsteczki obdarzone ładunkiem elektrycznym. Bardzo dobra zdolność rozdzielcza to główna zaleta tej techniki analitycznej, podczas gdy niska powtarzalność jest jedną z jej głównych wad [139-141].

Biomarkery wykryte przy pomocy technik NMR i MS są często różne, co sugeruje komplementarną naturę tych dwóch platform analitycznych [142]. Można zatem wnioskować, że kompleksową charakterystykę metabolomu organizmu można otrzymać jedynie przez połączenie różnych technik analitycznych i danych pochodzących z różnych instrumentów.

Badania kliniczne koncentrujące się na poszukiwaniu biomarkerów różnych chorób z wykorzystaniem technik spektrometrii mas w dziedzinach proteomiki i metabolomiki są kosztowne i czasochłonne. Wiążą się również z wymaganiami odnoszącymi się do populacji badanej, sposobu poboru próbek i ich przechowywania, prowadzenia analiz i statystycznej interpretacji wyników. Jednakże korzyścią z identyfikacji potencjalnych biomarkerów, ich walidacji i konstrukcji na ich podstawie modeli klasyfikacyjnych i dyskryminacyjnych jest implementacja tych markerów do praktyki klinicznej z wykorzystaniem opracowanych na te potrzeby tańszych metod analitycznych.

### 3. Cel pracy

Rak prostaty jest jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów i jedną z głównych przyczyn śmierci z powodu nowotworów wśród mężczyzn. Diagnoza raka prostaty, jak również zdolność przewidywania progresji choroby, pozostaje problematyczna. Nowotwory są odpowiedzialne za wywoływanie zmian w organizmie na poziomie proteomicznym i metabolomicznym [143]. W związku z tym analiza białek, peptydów oraz metabolitów w płynach ustrojowych jest obiecującym narzędziem w poszukiwaniu diagnostycznych i prognostycznych biomarkerów raka prostaty.

Celem naukowym badań prowadzonych w ramach realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej było zastosowanie nowoczesnej i złożonej strategii analityczno-bioinformatycznej w analizie związków endogennych w płynach ustrojowych (surowicy oraz moczu) w poszukiwaniu biomarkerów o wartości diagnostycznej mających znaczenie w wykrywaniu raka prostaty. Badania prowadzone były w oparciu o nowoczesną platformę analityczną, opartą na metodach spektrometrii mas (LC-ESI-QqQ-MS/MS, MALDI-TOF-MS) oraz testach immunologicznych. Nowatorski model poszukiwania biomarkerów raka prostaty w oparciu o powyższe techniki wsparty został zaawansowaną analizą chemometryczną. Rycina 3 przedstawia schemat badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej.

Oznaczanie małowymiarowych metabolitów, w tym aminokwasów, w płynach biologicznych (surowica, mocz) jest małoinwazyjną metodą o wysokim potencjale diagnostycznym. Na podstawie analizy ilościowej aminokwasów w surowicy lub moczu można stwierdzić obecność zaburzeń fizjologicznych, schorzeń neurologicznych, chorób metabolicznych, a także chorób nowotworowych. W niniejszej pracy planowano potwierdzić hipotezę mówiącą o tym, że rak prostaty wywołuje zmiany w profilach wolnych aminokwasów w wybranych płynach ustrojowych. Oceniony został także potencjał aminokwasów w surowicy i moczu jako biomarkerów raka prostaty i ich użyteczność w klasyfikacji pacjentów z rakiem prostaty i osób zdrowych. Badanie profili wolnych aminokwasów oparto o technikę LC-ESI-QqQ-MS/MS, czyli chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas, oraz o odczytnik aTRAQ. Technika LC-ESI-QqQ-MS/MS umożliwia globalne zobrazowanie aktualnego stanu fizjologicznego organizmu na poziomie metabolomicznym. Pozwala analizować różne klasy związków, przede wszystkim związki małowymiarowe, takie jak na przykład aminokwasy. Stwarza zatem nowe możliwości zarówno poszukiwania biomarkerów (między innymi raka prostaty), jak również diagnostyki bezinwazyjnej, opartej na analizie płynów ustrojowych łatwych do pozyskania od pacjentów i możliwej do zastosowania w badaniach przesiewowych. Do zalet metody wykorzystującej

odczynniki aTRAQ i technikę LC-ESI-QqQ-MS/MS w oznaczaniu aminokwasów w płynach ustrojowych należy wysoka specyficzność, skrócony czas analizy w porównaniu do innych technik analizy aminokwasów, mała objętość próbki biologicznej wymagana do wykonania oznaczeń, duża ilość analitów oznaczana w jednym cyklu analitycznym oraz niska granica wykrywalności [144, 145]. W celu potwierdzenia możliwości zastosowania metody w analizie aminokwasów została ona poddana walidacji.

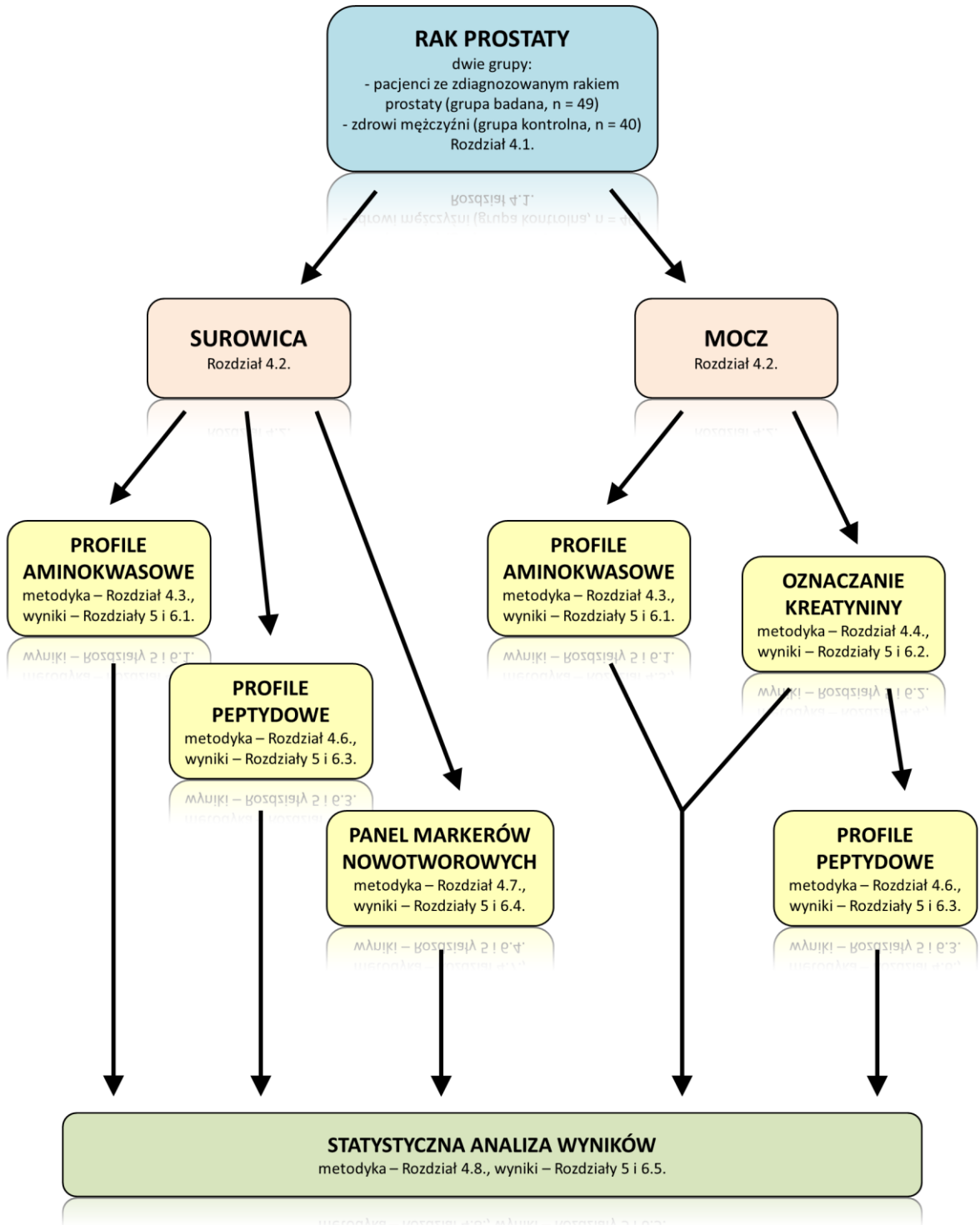
Grupą związków, mogących potencjalnie pełnić rolę biomarkerów, są także peptydy i białka. Ekspresja tych związków zmienia się bowiem w różnych stanach patologicznych [143]. Analiza peptydów i określenie korelacji jakościowych i ilościowych w obrębie peptydowych „odcisków palca” stwarza podstawy do opracowania szybkich i bezinwazyjnych metod diagnostycznych wielu chorób, w tym nowotworowych. Z tego względu w niniejszej pracy planowana była analiza profili peptydowych w wybranych płynach ustrojowych w celu potwierdzenia hipotezy mówiącej o tym, że profile peptydowe ulegają zmianie w raku prostaty. Oceniona została ponadto użyteczność profili peptydowych w surowicy i moczu w dyskryminacji mężczyzn cierpiących na raka prostaty i zdrowych. Ponieważ peptydy mają wyższe masy cząsteczkowe w porównaniu do aminokwasów, ich analiza wymaga innego podejścia analitycznego. Badanie profili peptydowych oparto o technikę MALDI-TOF-MS, czyli spektrometrię mas ze źródłem jonów typu MALDI i analizatorem czasu przelotu. Technika MALDI-TOF-MS pozwala globalnie zobrazować aktualny stan fizjologiczny organizmu na poziomie proteomicznym. Wieloskładnikowy peptydowy „odcisk palca” charakteryzuje się większą specyficznością w stosunku do pojedynczych markerów, a analizy wykorzystujące profile peptydowe mogą znacząco przyczynić się do polepszenia diagnostyki raka prostaty. Wśród zalet metody wykorzystującej technikę MALDI-TOF-MS w profilowaniu peptydów wymienić należy wysoką czułość, nieskomplikowaną procedurę przygotowania próbek, małą objętość płynu biologicznego wymaganego do wykonania analiz i możliwość automatyzacji procesu [143].

W surowicy krwi znajduje się wiele białek nieposiadających znaczenia diagnostycznego (np. albuminy czy globuliny), które dodatkowo utrudniają analizę i detekcję peptydów i białek o potencjalnym znaczeniu w diagnostyce chorób. Także w moczu niektóre białka, np. uromoduliny, są obecne w dużym stężeniu i mogą utrudniać analizę innych białek, występujących w mniejszych stężeniach [42]. W przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej badaniach wykorzystano końcówki ZipTip w celu zatężenia peptydów w surowicy i moczu oraz oczyszczenia próbek z zanieczyszczających ją składników utrudniających dalszą analizę. Wykorzystane końcówki ZipTip wypełnione były złożem C18, a ich technologia opiera

się na ekstrakcji do fazy stałej. Zatężanie i oczyszczanie próbek surowicy i moczu stanowiło jeden z etapów przygotowania próbek przed profilowaniem peptydowym wykorzystującym technikę MALDI-TOF-MS.

Analiza moczu jest procedurą, która wymaga specyficznego podejścia ze względu na różnice w objętości moczu w próbkach pobieranych jednorazowo. Od objętości moczu zależą bowiem stężenia związków w nim obecnych. Konieczna jest zatem kompensacja różnic w objętości moczu poprzez normalizację stężeń oznaczanych związków do stężenia kreatyniny w moczu [42]. W tym celu stężenia oznaczanych związków dzieli się przez stężenie kreatyniny oznaczone w tej samej próbce moczu [117, 132-134], a w przypadku profilowania peptydów w moczu oznaczenie kreatyniny w każdej próbce poprzedza rozcieńczenie próbek do najniższego stężenia kreatyniny w danej populacji próbek [136, 137]. W ramach pracy doktorskiej opracowano i zwalidowano metodę oznaczania kreatyniny w moczu z wykorzystaniem techniki LC-ESI-QqQ-MS/MS oraz nafazoliny jako wzorca wewnętrznego. Opracowaną metodę wykorzystano następnie do normalizacji stężeń aminokwasów w próbkach moczu uzyskanych z wykorzystaniem techniki LC-ESI-QqQ-MS/MS oraz odpowiedniego rozcieńczenia próbek moczu przed profilowaniem peptydowym wykorzystującym technikę MALDI-TOF-MS.

Proces angiogenezy, czyli tworzenia się nowych naczyń krwionośnych, jest jednym z fundamentalnych procesów zachodzących w organizmie i jest ściśle związany ze wzrostem guzów nowotworowych [98, 146, 147]. W procesie angiogenezy uczestniczy wiele białek, a ich ekspresja ulega zmianie w związku z toczącym się procesem nowotworowym [148]. Białka te mogą pełnić rolę biomarkerów chorób nowotworowych. W prezentowanej pracy podjęto się analizy panelu markerów nowotworowych w surowicy w celu oceny, jak poziomy wybranych białek kształtują się w raku prostaty, i określenia ich potencjalnej użyteczności klinicznej w diagnostyce raka prostaty. Oznaczono w tym celu 16 markerów nowotworowych z wykorzystaniem metody separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej przy użyciu zestawu Bio-Plex. Metoda jest przykładem testu immunologicznego oraz techniki multipleksowej i pozwala równocześnie analizować wiele analitów w jednym cyklu analitycznym. Do zalet tej metody w porównaniu do standardowych analiz techniką ELISA należy mała objętość próbki biologicznej wymagana do wykonania oznaczeń, prosta procedura przygotowania próbek, zwiększona przepustowość oraz obniżenie kosztów analiz. Wykorzystana metoda została zwalidowana i cechuje się dobrymi parametrami, między innymi wysoką precyzją, czułością i szerokim zakresem oznaczalności, co pozwala na jej zastosowanie w analizie panelu markerów nowotworowych [149].



Rycina 3. Schemat badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej.

## 4. Część doświadczalna

Na przeprowadzenie badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej wyraziła zgodę Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (Uchwała nr 200/13).

Prowadzone przez autora w ramach pracy doktorskiej badania realizowane były w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Badania były prowadzone z wykorzystaniem dwóch technik spektrometrii mas oraz testów immunologicznych. Analizy LC-ESI-QqQ-MS/MS wykonywane zostały z wykorzystaniem spektrometru 4000 QTRAP (AB Sciex), natomiast do analiz MALDI-TOF-MS wykorzystywany był spektrometr UltrafleXtreme (Bruker Daltonics). Z kolei testy immunologiczne przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu Bio-Plex (Bio-Rad) oraz cytometru przepływowego Bio-Plex MAGPIX (Bio-Rad). Analizy statystyczne wykonane zostały przy pomocy zaawansowanych programów statystycznych, takich jak Statistica 10.0 (StatSoft), ClinPro Tools (Bruker Daltonics) oraz dostępne online oprogramowanie MetaboAnalyst 3.0.

### 4.1. Rekrutacja pacjentów do badań

#### 4.1.1. Kryteria włączenia pacjentów do grupy badanej oraz do grupy kontrolnej

Wszystkie osoby biorące udział w badaniach zostały zapoznawane z celem i charakterem badań oraz podpisały zgodę na udział w badaniach.

Grupę badaną stanowili pacjenci ze zdiagnozowanym rakiem prostaty, którzy rekrutowani byli spośród pacjentów Oddziału Urologicznego Kliniki św. Rodziny w Poznaniu. Kryteria włączenia do grupy badanej obejmowały: rozpoznanie raka prostaty na podstawie obrazu klinicznego, brak współistnienia innych chorób nowotworowych, brak historii leczenia raka prostaty. Rozpoznanie raka prostaty opierało się na badaniu *per rectum*, przeprowadzeniu przezodbytniczego badania USG (TRUS), badaniu poziomu PSA w surowicy, histopatologicznym badaniu bioptatu (ostateczna diagnoza). Kryteria wyłączenia z grupy badanej obejmowały: brak rozpoznania raka prostaty, leczenie raka prostaty, współistnienie innej choroby nowotworowej.

Grupę kontrolną stanowili zdrowi mężczyźni, nie cierpiący na raka prostaty ani na inne choroby przewlekłe. Osoby do grupy kontrolnej były rekrutowane spośród osób zgłaszających się na okresowe badania lekarskie. Grupa kontrolna odpowiadała grupie badanej pod względem płci, wieku, rasy oraz stylu życia (np. palenie papierosów).

#### 4.1.2. Charakterystyka pacjentów

Wśród pacjentów biorących udział w projekcie przeprowadzane zostały badania ankietowe, które miały na celu zebranie informacji o grupie badanej i kontrolnej niezbędnych do podjęcia decyzji o włączeniu bądź wyłączeniu danej osoby z badań. Najmłodszy pacjent ze zdiagnozowanym rakiem prostaty miał 52 lata, a najstarszy 86 lat, przy średniej wieku pacjentów w grupie badanej wynoszącej 67,7 lat i medianie wynoszącej 67 lat. W grupie kontrolnej najmłodszy mężczyzna miał 40 lat, a najstarszy 79 lat, natomiast średnia i mediana wieku mężczyzn w grupie kontrolnej wynosiły odpowiednio 61,3 lat i 62,5 lat.

Histopatologiczne badanie tkanki pobranej podczas biopsji poza potwierdzeniem diagnozy dostarczyło również informacji o stopniu złośliwości histologicznej raka prostaty u danego pacjenta (wynik w skali Gleasona). Dziewiętnastu pacjentów uzyskało wynik w skali Gleasona  $3 + 3 = 6$ , co lokuje ich w grupie prognostycznej I i wiąże się z dobrymi rokowaniami [20]. Dwudziestu czterech pacjentów uzyskało wynik 7. U dwudziestu spośród nich dominującym typem histoarchitektonicznym nowotworu prostaty był typ 3 i ci pacjenci znaleźli się w grupie prognostycznej II. Pozostałych czterech pacjentów z wynikiem w skali Gleasona 7 zostało zaklasyfikowanych do grupy prognostycznej III o gorszych rokowaniach ze względu na przewagę typu 4 komórek nowotworowych. Czterech pacjentów uzyskało wynik w skali Gleasona  $4 + 4 = 8$  (grupa prognostyczna IV). Najwyższy stopień złośliwości histologicznej spośród pacjentów zrekrutowanych do badań miało dwóch mężczyzn i dla nich rokowania były najgorsze (grupa prognostyczna V). Typ histoarchitektoniczny 4 dominował u jednego z nich, a typ 5 u drugiego. Charakterystyka pacjentów z grupy badanej została przedstawiona w Tabeli 3.



Tabela 3. Charakterystyka grupy badanej – pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem prostaty.

|                                    |                   | Grupa badana (n = 49) | Procent |
|------------------------------------|-------------------|-----------------------|---------|
| Stopień złośliwości histologicznej | Gleason 3 + 3 = 6 | 19                    | 38,8    |
|                                    | Gleason 3 + 4 = 7 | 20                    | 40,8    |
|                                    | Gleason 4 + 3 = 7 | 4                     | 8,2     |
|                                    | Gleason 4 + 4 = 8 | 4                     | 8,2     |
|                                    | Gleason 4 + 5 = 9 | 1                     | 2,0     |
|                                    | Gleason 5 + 4 = 9 | 1                     | 2,0     |
| Wiek [lata]                        | średnia           | 67,7                  | -       |
|                                    | mediana           | 67                    | -       |
|                                    | minimum           | 52                    | -       |
|                                    | maksimum          | 86                    | -       |
| BMI [kg/m <sup>2</sup> ]           | średnia           | 27,5                  | -       |
|                                    | mediana           | 27,2                  | -       |
|                                    | minimum           | 21,1                  | -       |
|                                    | maksimum          | 36,0                  | -       |
| Palenie papierosów                 | tak               | 9                     | 18,4    |
|                                    | nie               | 40                    | 81,6    |
| Rak prostaty w rodzinie            | tak               | 9                     | 18,4    |
|                                    | nie               | 40                    | 81,6    |

#### 4.2. Pobór próbek

Pobór próbek krwi oraz moczu od pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem prostaty (grupa badana) i od osób zdrowych (grupa kontrolna) odbył się w specjalistycznych laboratoriach służby zdrowia. Próbki pobierane były na czczo. Krew pobierana była do fiolek zawierających aktywator krzepnięcia. Po utworzeniu skrzepu próbka była wirowana w celu uzyskania surowicy. Mocz pobierany był do odpowiednich pojemników.

Pobrane próbki płynów biologicznych przechowywane były w temperaturze -20 °C nie dłużej niż 6 godzin. Następnie próbki były transportowane przez upoważnione osoby z zachowaniem zasad bezpieczeństwa i w warunkach zapewniających stabilność próbek do zamrażarki niskotemperaturowej, utrzymującej temperaturę -80 °C. W takich warunkach próbki były przechowywane do momentu wykonania oznaczeń.

Pobrano zostało 49 próbek krwi i 49 próbek moczu od pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem prostaty, a także 40 próbek krwi i 40 próbek moczu od osób zdrowych. Tym samym liczebność grupy badanej wyniosła 49, natomiast liczebność grupy kontrolnej wyniosła 40.

### 4.3. Optymalizacja i walidacja metody rozdziału i oznaczania aminokwasów w jednym cyklu analitycznym w surowicy i moczu przy wykorzystaniu zestawu LC-ESI-QqQ-MS/MS

#### 4.3.1. Odczynniki

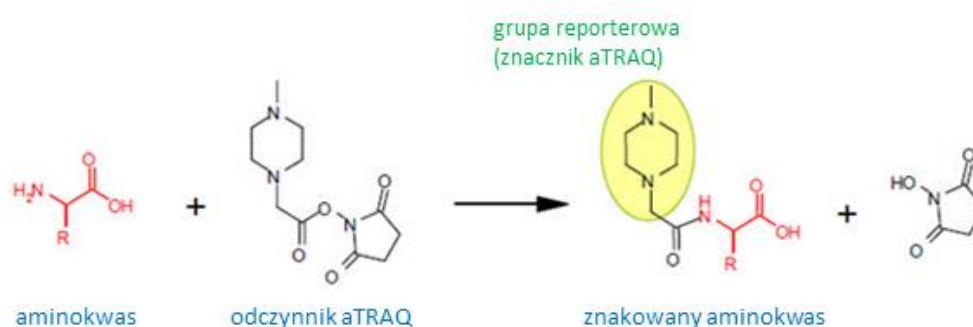
- zestaw aTRAQ do analizy aminokwasów w płynach ustrojowych („*aTRAQ Kit for Amino Acid Analysis of Physiological Fluids*”) – AB Sciex (Framingham, MA, USA); w skład zestawu wchodzi:
  - odczynnik aTRAQ  $\Delta 8$
  - kwas sulfosalicylowy 10 % – zawierający 400 pmol/ $\mu$ l norleucyny
  - bufor boranowy o pH 8,5 – zawierający 20 pmol/ $\mu$ l norwaliny
  - hydroksyloamina 1,2 %
  - kwas mrówkowy 100 % – modyfikator A fazy ruchomej
  - kwas heptafluoromasłowy 100 % – modyfikator B fazy ruchomej
  - izopropanol
  - zestaw wzorców wewnętrznych – aminokwasów znakowanych odczynnikiem aTRAQ  $\Delta 0$
  - kwas mrówkowy 2 %
- kontrolne osocze (ang. *Control Plasma*) – AB Sciex (Framingham, MA, USA)
- woda ultraczysta – otrzymana z wykorzystaniem system oczyszczającego Millipore Simplicity UV (Waters Corporation, Milford, MA, USA)
- metanol HPLC *gradient grade* – J.T. Baker (Center Valley, PA, USA)

#### 4.3.2. Oznaczanie aminokwasów z wykorzystaniem odczynnika aTRAQ

Do oznaczenia aminokwasów w próbkach surowicy i moczu wykorzystano zestaw aTRAQ, który umożliwia oznaczenie 42 wolnych aminokwasów w płynach ustrojowych i matrycach biologicznych (m. in. surowica, mocz, płyn mózgowo-rdzeniowy, ekstrakty tkankowe) [144]. W rzeczywistości nie wszystkie te związki są pod względem chemicznym aminokwasami, jednakże dla uproszczenia używa się określenia aminokwas, zarówno w piśmiennictwie naukowym, jak i w niniejszej pracy. Listę oznaczanych aminokwasów przedstawia Tabela 5.

Odczynnik aTRAQ (zarówno  $\Delta 0$ , jak i  $\Delta 8$ ) zawiera w swojej cząsteczce grupę reporterową (znacznik aTRAQ) i reaktywną grupę aminową, która reaguje z pierwszo- i drugorzędową grupą aminową każdego aminokwasu. Aminokwas w analizowanych próbkach biologicznych (anality) są znakowane za pomocą znacznika aTRAQ o masie

121 Da w reakcji z odczynnikiem aTRAQ  $\Delta 8$  (Rycina 4). Grupa reporterowa tego odczynnika jest znakowana izotopowo i zawiera w swojej strukturze sześć atomów  $^{13}\text{C}$  oraz dwa atomy  $^{15}\text{N}$ . Każdy aminokwas posiada odpowiadający mu wzorzec wewnętrzny znakowany uprzednio znacznikiem aTRAQ o identycznej budowie chemicznej, lecz innej masie izotopowej (113 Da). W tym przypadku grupa reporterowa odczynnika aTRAQ  $\Delta 0$  posiada sześć atomów  $^{12}\text{C}$  oraz dwa atomy  $^{14}\text{N}$ . Dzięki temu poszczególne znakowane aminokwasy pochodzące z próbki biologicznej oraz ich wzorce wewnętrzne różnią się między sobą masą o 8 jednostek (lub 16 jednostek w przypadku aminokwasów, które przyłączają dwie grupy reporterowe). Mają one takie same czasy retencji, nie ulegają bowiem rozdzieleniu chromatograficznemu. Jednakże mogą być rozróżnione dzięki unikalnym przejściom masowym (przejściom MRM). Brak konieczności rozdzielenia chromatograficznego związków jest zaletą analiz LC-MS/MS, w których detekcja odbywa się z wykorzystaniem spektrometrii mas. Wyjątkiem w przypadku oznaczania aminokwasów są aminokwasy izobaryczne, dla których przejścia masowe są identyczne (Tabela 5). W związku z tym te aminokwasy nie są rozróżniane przez spektrometr mas i muszą być uprzednio rozdzielone na kolumnie chromatograficznej.



Rycina 4. Przebieg reakcji znakowania przy użyciu odczynnika aTRAQ [150]. Grupa reporterowa ma masę 121 Da w przypadku aminokwasów w próbce biologicznej (zawiera sześć atomów  $^{13}\text{C}$  oraz dwa atomy  $^{15}\text{N}$ ) i 113 Da w przypadku wzorców wewnętrznych.

#### 4.3.3. Przygotowanie roztworów wykorzystywanych w metodyce oznaczania aminokwasów

Roztwór odczynnika aTRAQ  $\Delta 8$  przygotowano poprzez dodanie do fiolki z odczynnikiem aTRAQ  $\Delta 8$  70  $\mu\text{l}$  izopropanolu i dokładne wymieszanie. Roztwór jest

stabilny przez 4 tygodnie. Roztwór wzorców wewnętrznych przygotowano poprzez dodanie do fiolki z aminokwasami znakowanymi uprzednio odczynnikiem aTRAQ  $\Delta 8$  około 1,8 ml 2 % kwasu mrówkowego (dokładna objętość jest każdorazowo podana w Certyfikacie Analizy dla danego zestawu odczynników).

#### 4.3.4. Przygotowanie próbek do analizy

Po rozmrożeniu surowicy lub moczu 40  $\mu\text{l}$  próbki mieszano z 10  $\mu\text{l}$  kwasu sulfosalicylowego w celu wytrącenia białek obecnych w próbce, a następnie wirowano przy 10000 g przez 2 minuty. 10  $\mu\text{l}$  supernatantu rozcieńczano mieszając z 40  $\mu\text{l}$  buforu boranowego, który zapewniał zasadowe środowisko konieczne do zajścia reakcji znakowania. W kolejnym etapie do 10  $\mu\text{l}$  mieszaniny supernatant / bufor boranowy dodawano 5  $\mu\text{l}$  roztworu odczynnika aTRAQ  $\Delta 8$  w celu przeprowadzenia reakcji znakowania aminokwasów obecnych w analizowanej próbce. Po wymieszaniu inkubowano próbkę w temperaturze pokojowej przez co najmniej 30 minut. Następnie zatrzymywano reakcję znakowania poprzez dodanie 5  $\mu\text{l}$  hydroksyloaminy, która reagowała z nadmiarem odczynnika aTRAQ  $\Delta 8$ . Próbkę mieszano i inkubowano w temperaturze pokojowej przez co najmniej 15 minut. Po tym czasie mieszano próbkę z 32  $\mu\text{l}$  roztworu wzorców wewnętrznych. Objętość próbek redukowano poprzez odparowanie części rozpuszczalnika za pomocą koncentratora próżniowego (miVac Duo, Genevac, Stone Ridge, NY, USA) przez 15 minut. Próbkę rozcieńczano 20  $\mu\text{l}$  wody i po wymieszaniu przenoszono do insertu o małej objętości umieszczonego we fiolce do autosamplera. Przygotowano w ten sposób wszystkie próbki surowicy i moczu od pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem prostaty (grupa badana) i od osób zdrowych (grupa kontrolna).

#### 4.3.5. Parametry HPLC

Do rozdzielania chromatograficznego wykorzystano wysokosprawny chromatograf cieczowy (ang. *high performance liquid chromatograph*, HPLC) 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). W skład zestawu HPLC wchodził degazer, pompa binarna, autosampler oraz termostat kolumny chromatograficznej. Czas analizy wynosił 18 minut. Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na kolumnie chromatograficznej AB Sciex C18 (150 mm  $\times$  4,6 mm, 5,0  $\mu\text{m}$ ) (AB Sciex, Framingham, MA, USA). Przepływ faz ruchomych wynosił 800  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Fazami ruchomymi były woda (faza A) oraz metanol (faza B), obie z dodatkiem 0,1 % kwasu mrówkowego i 0,01 % kwasu heptafluoromasłowego. Rozdział chromatograficzny

przebiegał przy zastosowaniu elucji gradientowej (Tabela 4). Temperatura kolumny była utrzymywana na poziomie 50 °C. Objętość nastrzyku wynosiła 2 µl. Igła nastrzykująca roztwór na kolumnę była płukana wodą przez 30 s przed każdym nastrzykiem.

Eluat opuszczający kolumnę i HPLC nie trafiał do spektrometru mas w ciągu całego czasu analizy. Wykorzystano zawór, który kierował do spektrometru mas tylko tę część eluatu, która opuszczała kolumnę pomiędzy 1,5 a 13,0 min analizy. W tym przedziale czasu zawierały się bowiem czasy retencji wszystkich analizowanych związków. Pozostała część eluatu trafiała do zlewki, co pozwalało ograniczyć zanieczyszczanie źródła jonów spektrometru mas i tym samym zmniejszyć częstość czyszczenia aparatu.

Tabela 4. Procentowy udział faz ruchomych podczas rozdziału chromatograficznego w metodzie LC-MS/MS oznaczania aminokwasów.

| Czas [min]  | Faza A [%]  | Faza B [%]  |
|-------------|-------------|-------------|
| 0 – 6,0     | od 98 do 60 | od 2 do 40  |
| 6,0 – 10,0  | 60          | 40          |
| 10,0 – 11,0 | od 60 do 10 | od 40 do 90 |
| 11,0 – 12,0 | 10          | 90          |
| 12,0 – 13,0 | od 10 do 98 | od 90 do 2  |
| 13,0 – 18,0 | 98          | 2           |

#### 4.3.6. Parametry MS

Do detekcji analitów wykorzystano technikę spektrometrii mas. Analizy MS/MS wykonano wykorzystując tandemowy spektrometr mas typu potrójny kwadrupol 4000 QTRAP (AB Sciex, Framingham, MA, USA). Spektrometr mas tego typu składa się ze źródła jonów typu elektrorozpylanie (ang. *electrospray ionization*, ESI), trzech szeregowo ułożonych kwadrupoli (z których pierwszy i trzeci pełnią rolę analizatora mas, natomiast drugi jest komorą kolizyjną) oraz detektora. Wykorzystano typ jonizacji pozytywny przy napięciu elektrody (ang. *ion spray voltage*) wynoszącym 4500 V. Inne parametry źródła jonów były następujące: temperatura w źródle jonów, 600 °C; gaz rozpylający 1 (ang. *ion source gas 1*), 60 psig; gaz rozpylający 2 (ang. *ion source gas 2*), 50 psig; gaz kurtynowy (ang. *curtain gas*), 20 psig.

Wykorzystany w analizach tryb skanowania to planowane monitorowanie reakcji wielokrotnych (ang. *scheduled multiple reaction monitoring*, sMRM). W tym trybie pracy pierwszy kwadrupol (Q1) został zoptymalizowany w taki sposób, aby przepuszczać

tylko jony macierzyste (prekursorowe) o określonym stosunku masy do ładunku ( $m/z$ ). Odpowiadały one analitom – aminokwasom pochodzącym z próbek surowicy i moczu oznakowanym za pomocą znacznika aTRAQ o masie 121 Da oraz wzorcom wewnętrznym – aminokwasom oznakowanym za pomocą znacznika aTRAQ o masie 113 Da (Tabela 5). Następnie jony macierzyste ulegały fragmentacji w drugim kwadrupolu (Q2). użytym gazem kolizyjnym był azot. Trzeci kwadrupol (Q3) przepuszczał z kolei tylko wybrane jony potomne (fragmentacyjne) o odpowiednich stosunkach  $m/z$  (121,1 i 113,1 Da). Były to jony reporterowe odpowiadające grupom reporterowym odczynników aTRAQ  $\Delta 8$  i  $\Delta 0$  przyłączonym do aminokwasów w reakcji znakowania (Tabela 5). Te jony docierały do detektora i były przez niego zliczane. Tryb sMRM jest modyfikacją trybu monitorowania reakcji wielokrotnych (ang. *multiple reaction monitoring*, MRM) i jest użyteczny szczególnie wówczas, gdy w danej metodzie monitoruje się wiele przejść MRM. W trybie sMRM dla każdego przejścia MRM definiuje się okno czasowe obejmujące czas retencji analizowanego związku odpowiadającego danemu przejściu masowemu. Monitorowanie danego przejścia MRM odbywa się następnie tylko w obrębie danego okna czasowego. Takie podejście zmniejsza liczbę przejść MRM monitorowanych w określonym czasie analizy, co z kolei pozwala zmaksymalizować czas skanowania każdego przejścia MRM (ang. *dwell time*) i polepszyć jakość chromatogramów. Tym samym jakość danych otrzymywanych w analizach wykorzystujących tryb sMRM jest lepsza, a w związku z tym uzyskuje się większą dokładność i powtarzalność wyników. Parametry MS związane z analizowanymi związkami były następujące: potencjał rozpadu klastrów (ang. *declustering potential*, DP), 30 V; potencjał wejścia (ang. *entrance potential*, EP), 10 V; potencjał wyjścia z komory kolizyjnej (ang. *collision cell exit potential*, CXP), 5 V. Wartości energii kolizyjnej (ang. *collision energy*, CE) były różne dla różnych związków (Tabela 5).

Zbieranie danych i ich przetwarzanie odbywało się z wykorzystaniem oprogramowania Analyst 1.5 (AB Sciex, Framingham, MA, USA). Dla każdego przejścia masowego wykreślany był chromatogram. Stężenia aminokwasów we wszystkich próbkach surowicy oraz moczu zostały wyznaczone w oparciu o pola powierzchni zintegrowanych pików. Stężenie danego aminokwasu było obliczane poprzez podzielenie pola powierzchni pików danego aminokwasu przez pole powierzchni pików odpowiadającego mu wzorca wewnętrznego i pomnożenie przez stężenie wzorca wewnętrznego. Otrzymane stężenia zostały zebrane w odpowiednich arkuszach kalkulacyjnych i sprawdzone pod względem kompletności danych. Stężenia aminokwasów w próbkach moczu zostały znormalizowane na stężenie kreatyniny.

Tabela 5. Parametry MS dla aminokwasów oznaczanych z wykorzystaniem odczynników aTRAQ. Dla każdego oznaczanego aminokwasu podano przejścia MRM i energię kolizyjną odpowiadające oznaczanemu aminokwasowi obecnemu w próbce biologicznej (analit) oraz jego wzorcowi wewnętrznemu. Przejścia MRM są jednakowe w przypadku aminokwasów izobarycznych. Q1 m/z – stosunek masy do ładunku jonu macierzystego, Q3 m/z – stosunek masy do ładunku jonu potomnego, CE – energia kolizyjna.

(ciąg dalszy Tabeli 5 na kolejnej stronie)

| Aminokwas                                    | Skrót              |                              | Q1<br>m/z      | Q3<br>m/z      | CE<br>[V] |
|--|--------------------|------------------------------|----------------|----------------|-----------|
| o-fosfo-L-seryna                             | PSer               | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 326,1<br>334,1 | 113,1<br>121,1 | 30<br>30  |
| o-fosfoetanolamina                           | PEtN               | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 282,1<br>290,1 | 113,1<br>121,1 | 30<br>30  |
| tauryna                                      | Tau                | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 266,1<br>274,1 | 113,1<br>121,1 | 30<br>30  |
| L-asparagina                                 | Asn                | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 273,2<br>281,2 | 113,1<br>121,1 | 30<br>30  |
| L-seryna                                     | Ser                | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 246,2<br>254,2 | 113,1<br>121,1 | 30<br>30  |
| glicyna                                      | Gly                | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 216,1<br>224,1 | 113,1<br>121,1 | 30<br>30  |
| hydroksy-L-prolina                           | Hyp                | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 272,1<br>280,1 | 113,1<br>121,1 | 30<br>30  |
| etanolamina                                  | EtN                | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 202,2<br>210,2 | 113,1<br>121,1 | 30<br>30  |
| L-glutamina                                  | Gln                | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 287,2<br>295,2 | 113,1<br>121,1 | 30<br>30  |
| kwask L-asparaginowy                         | Asp                | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 274,1<br>282,1 | 113,1<br>121,1 | 30<br>30  |
| L-cytrulina                                  | Cit                | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 316,2<br>324,2 | 113,1<br>121,1 | 30<br>30  |
| L-treonina                                   | Thr                | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 260,2<br>268,2 | 113,1<br>121,1 | 30<br>30  |
| sarkozyna<br>β-alanina<br>L-alanina          | Sar<br>bAla<br>Ala | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 230,2<br>238,2 | 113,1<br>121,1 | 30<br>30  |
| kwask L- glutaminowy                         | Glu                | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 288,2<br>296,2 | 113,1<br>121,1 | 30<br>30  |
| L-histydyna                                  | His                | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 296,2<br>304,2 | 113,1<br>121,1 | 30<br>30  |
| 1-metylo-L-histydyna<br>3-metylo-L-histydyna | 1MHis<br>3MHis     | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 310,2<br>318,2 | 113,1<br>121,1 | 30<br>30  |

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

|   |                     |                              |                |                |          |
|---|---------------------|------------------------------|----------------|----------------|----------|
| kwas argininobursztynowy  | Asa                 | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 431,2<br>439,2 | 113,1<br>121,1 | 50<br>50 |
| L-homocytrulina   | Hcit                | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 330,2<br>338,2 | 113,1<br>121,1 | 30<br>30 |
| L-anseryna  | Ans                 | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 381,2<br>389,2 | 113,1<br>121,1 | 30<br>30 |
| L-karnozyna   | Car                 | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 367,2<br>375,2 | 113,1<br>121,1 | 30<br>30 |
| kwas L- $\alpha$ -aminoadypinowy  | Aad                 | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 302,2<br>310,2 | 113,1<br>121,1 | 30<br>30 |
| kwasy $\gamma$ -amino-n-masłowy<br>kwasy D, L- $\beta$ -<br>aminoizomasłowy<br>kwasy L- $\alpha$ -amino-n-<br>masłowy | GABA<br>bAib<br>Abu | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 244,2<br>252,2 | 113,1<br>121,1 | 30<br>30 |
| L-arginina  | Arg                 | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 315,2<br>323,2 | 113,1<br>121,1 | 30<br>30 |
| L-prolina   | Pro                 | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 256,2<br>264,2 | 113,1<br>121,1 | 30<br>30 |
| L-ornityna  | Orn                 | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 413,3<br>429,3 | 113,1<br>121,1 | 50<br>50 |
| cystationina  | Cth                 | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 503,3<br>519,3 | 113,1<br>121,1 | 50<br>50 |
| L-cystyna   | Cys                 | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 521,2<br>537,2 | 113,1<br>121,1 | 50<br>50 |
| $\delta$ -hydroksylizyna  | Hyl                 | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 443,3<br>459,3 | 113,1<br>121,1 | 50<br>50 |
| L-lizyna  | Lys                 | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 427,3<br>443,3 | 113,1<br>121,1 | 50<br>50 |
| L-metionina   | Met                 | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 290,2<br>298,2 | 113,1<br>121,1 | 30<br>30 |
| L-walina<br>L-norwalina   | Val<br>Nva          | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 258,2<br>266,2 | 113,1<br>121,1 | 30<br>30 |
| L-tyrozyna  | Tyr                 | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 322,2<br>330,2 | 113,1<br>121,1 | 30<br>30 |
| L-homocysteina  | Hcy                 | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 549,3<br>565,3 | 113,1<br>121,1 | 50<br>50 |
| L-izoleucyna<br>L-leucyna<br>L-norleucyna   | Ile<br>Leu<br>Nle   | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 272,2<br>280,2 | 113,1<br>121,1 | 30<br>30 |
| L-feniloalanina   | Phe                 | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 306,2<br>314,2 | 113,1<br>121,1 | 30<br>30 |
| L-tryptofan   | Trp                 | wzorzec wewnętrzny<br>analit | 345,2<br>353,2 | 113,1<br>121,1 | 30<br>30 |



#### 4.3.7. Walidacja metody

Metoda LC-MS/MS oznaczania aminokwasów z wykorzystaniem odczynników aTRAQ jest zwalidowana z uwzględnieniem następujących parametrów: granica oznaczalności, zakres, precyzja, dokładność. Granica oznaczalności jest różna dla różnych aminokwasów i wynosi od 0,05  $\mu\text{M}$  dla kwasu  $\gamma$ -amino-n-masłowego do 1  $\mu\text{M}$  dla glicyny, kwasu argininobursztynowego i L-cystyny (Tabela 9, 10 i 11). Zakres metody obejmuje stężenia od granicy oznaczalności do 10000  $\mu\text{M}$  dla wszystkich aminokwasów, co odpowiada co najmniej czterem rzędom wielkości. W celu weryfikacji walidacji ocenie poddano następujące parametry: dokładność, precyzja (powtarzalność i odtwarzalność) w odniesieniu do oznaczanych stężeń aminokwasów i czasów retencji.

Dokładność metody została sprawdzona poprzez analizę kontrolnego osocza, do którego dołączony jest certyfikat z zakresami referencyjnymi stężeń 23 aminokwasów. W celu sprawdzenia powtarzalności metody jedna próbka surowicy została przygotowana w trzech powtórzeniach i każde z nich było następnie nastrzykiwane trzykrotnie, co dało sumarycznie 9 analiz tej próbki. W celu sprawdzenia odtwarzalności metody powtórzono procedurę dla powtarzalności w ciągu trzech kolejnych dni, a każde powtórzenie było nastrzykiwane jednokrotnie, co dało sumarycznie 9 analiz tej próbki. Próbka surowicy wykorzystana do przetestowania powtarzalności była jedną z próbek zebranych do innych badań prowadzonych przez zespół badawczy autora [144]. W podobny sposób przeprowadzono weryfikację powtarzalności metody w odniesieniu do analizy moczu.

Dodatkowo weryfikowano stabilność czasów retencji i czułość zestawu LC-MS. Przed każdą sekwencją analiz przeprowadzano test sprawności systemu (ang. *system suitability test*), aby przygotować zestaw LC-MS do pracy i sprawdzić poprawność jego działania. W celu sprawdzenia wydajności reakcji znakowania (ang. *labeling efficiency*) i odzysku wykorzystano nieproteogenne aminokwasy: norleucynę i norwalinę. Były one dodawane do każdej próbki na etapie ich przygotowania do analizy. Norleucyna była dodawana razem z kwasem sulfosalicylowym, natomiast norwalina razem z buforem boranowym.

Obecność wzorca wewnętrznego dla każdego aminokwasu kompensuje efekty matrycy oraz poprawia precyzję i dokładność oznaczeń. Ponadto podnosi specyficzność metody, zapewniając poprawną identyfikację analitów. Identyfikacja aminokwasów w próbkach fizjologicznych opiera się o unikalne przejścia masowe dla każdego analitu oraz o zgodność czasów retencji aminokwasów i odpowiadających im wzorców wewnętrznych.

#### 4.4. Opracowanie, optymalizacja i walidacja metody oznaczania kreatyniny w moczu przy wykorzystaniu zestawu LC-ESI-QqQ-MS/MS

##### 4.4.1. Odczynniki

- kwas mrówkowy – Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- kreatynina – Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- nafazolina – Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- acetonitryl HPLC *grade* – J.T. Baker (Center Valley, PA, USA)
- woda ultraczysta – otrzymana z wykorzystaniem system oczyszczającego Millipore Simplicity UV (Waters Corporation, Milford, MA, USA).

##### 4.4.2. Przygotowanie roztworów wzorców i próbek kontrolnych

Odważono dokładnie odpowiednie ilości kreatyniny i nafazoliny, która pełniła funkcję wzorca wewnętrznego, a następnie rozpuszczono w wodzie w celu otrzymania dwóch roztworów podstawowych wzorców o stężeniu 1 mg/ml. Sprawdzono stabilność tak przygotowanych roztworów podstawowych przez okres 4 miesięcy przechowywanych w temperaturze -20 °C. Przygotowano roztwory robocze wzorców o stężeniach 10 µg/ml i 100 ng/ml dla kreatyniny oraz 10 µg/ml i 200 ng/ml dla nafazoliny poprzez rozcieńczenie odpowiednich roztworów podstawowych wodą. Roztwory kreatyniny do krzywej wzorcowej zostały przygotowane poprzez wymieszanie odpowiednich objętości roztworów roboczych kreatyniny ze 100 µl roztworu roboczego wzorca wewnętrznego o stężeniu 200 ng/ml i z wodą do otrzymania 1 ml każdego z roztworów. Stężenia roztworów do krzywej wzorcowej obejmowały zakres od 5 do 1500 ng/ml. Roztwory robocze i roztwory do krzywej wzorcowej były przygotowywane w dniu analizy. Próbkę kontrolne (ang. *quality control*, QC) były przygotowywane poprzez obciążanie próbek moczu określonymi ilościami wzorca kreatyniny. W procesie walidacji wykorzystano próbki kontrolne obciążone trzema różnymi ilościami wzorca kreatyniny.

##### 4.4.3. Przygotowanie próbek do analizy

Po rozmrożeniu próbki moczu 100 µl moczu było mieszane z 2 µl kwasu mrówkowego w celu wytrącenia białek obecnych w próbce, a następnie wirowane przy 10000 g przez 2 minuty. 2 µl supernatantu było dodawane do 100 µl roztworu roboczego wzorca wewnętrznego o stężeniu 200 ng/ml i mieszane. Roztwór

uzupełniano wodą do objętości 4 ml, co skutkowało 2000-krotnym rozcieńczeniem moczu. Do analizy LC-MS/MS 1 ml otrzymanego roztworu przenoszono do fiolki do autosamplera. Każda próbka moczu była przygotowana w trzech powtórzeniach. Przygotowano w ten sposób wszystkie próbki moczu od pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem prostaty (grupa badana) i od osób zdrowych (grupa kontrolna).

#### 4.4.4. Parametry HPLC

Do rozdzielania chromatograficznego wykorzystano wysokosprawny chromatograf cieczowy 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), ten sam jak w punkcie 4.3.5. Czas analizy wynosił 15 minut. Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na kolumnie chromatograficznej XTerra C18 (100 mm × 2,1 mm, 3,5 μm) (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Przepływ faz ruchomych wynosił 100 μl/min. Fazami ruchomymi były 0,1 % roztwór kwasu mrówkowego w wodzie (faza A) oraz 0,1 % roztwór kwasu mrówkowego w acetonitrylu (faza B). Rozdział chromatograficzny przebiegał przy zastosowaniu elucji gradientowej (Tabela 6). Temperatura kolumny była utrzymywana na poziomie 25 °C. Objętość nastrzyku wynosiła 5 μl. Igła nastrzykująca roztwór na kolumnę była płukana wodą przez 30 s przed każdym nastrzykiem.

Tabela 6. Procentowy udział faz ruchomych podczas rozdzielania chromatograficznego w metodzie LC-MS/MS oznaczania kreatyniny.

| Czas [min] | Faza A [%]  | Faza B [%]  |
|------------|-------------|-------------|
| 0 – 0,5    | 85          | 15          |
| 0,5 – 7,0  | od 85 do 20 | od 15 do 80 |
| 7,0 – 7,5  | 20          | 80          |
| 7,5 – 8,5  | od 20 do 85 | od 80 do 15 |
| 8,5 – 15,0 | 85          | 15          |

#### 4.4.5. Parametry MS

Do detekcji analitów wykorzystano technikę spektrometrii mas. Analizy MS/MS wykonano wykorzystując tandemowy spektrometr mas typu potrójny kwadrupol 4000 QTRAP (AB Sciex, Framingham, MA, USA) wyposażony w źródło jonów typu ESI, ten sam jak w punkcie 4.3.6. Wykorzystano typ jonizacji pozytywny przy napięciu elektrody wynoszącym 4500 V. Inne parametry źródła jonów były następujące: temperatura w źródle jonów, 550 °C; gaz rozpylający 1, 35 psig; gaz rozpylający 2, 40 psig; gaz

kurtynowy, 40 psig. Parametry źródła jonów zależą od wielkości przepływu faz ruchomych, były zatem zoptymalizowane przy przepływie wykorzystanym w metodzie poprzez kolejne nastrzyki roztworu roboczego wzorca kreatyniny.

Wykorzystany tryb skanowania to MRM. Pozwala on osiągnąć wysoką specyficzność i czułość oznaczeń. użytym gazem kolizyjnym był azot. Dla obu analizowanych związków (oznaczana w metodzie kreatynina oraz wzorzec wewnętrzny – nafazolina) wybrano po dwie pary jonów jon macierzysty – jon potomny (po dwa przejścia masowe). Czas skanowania każdej pary jonów (ang. *dwell time*) wynosił 150 ms. Optymalizacji zostały poddane następujące parametry MS związane z analizowanymi związkami: potencjał rozpadu klastrów (DP), potencjał wejścia (EP), energia kolizyjna (CE) oraz potencjał wyjścia z komory kolizyjnej (CXP). Optymalizacja miała miejsce podczas nastrzyku roztworów roboczych wzorców kreatyniny i nafazoliny przy stałym przepływie wynoszącym 10 µl/min przy użyciu pompki strzykawkowej (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) połączonej bezpośrednio ze źródłem jonów spektrometru mas.

Zbieranie danych i ich przetwarzanie odbywało się z wykorzystaniem oprogramowania Analyst 1.5 (AB Sciex, Framingham, MA, USA).

#### 4.4.6. Walidacja metody

Metoda oznaczania kreatyniny w moczu została zwalidowana zgodnie z wytycznymi FDA dla metod bioanalitycznych [151]. Walidacji poddano następujące parametry: selektywność, dokładność, precyzja (powtarzalność i odtwarzalność), liniowość, zakres, granica wykrywalności, granica oznaczalności oraz stabilność.

Selektywność metody została zweryfikowana poprzez sprawdzenie chromatogramów pod kątem ewentualnych interferujących pików w czasie retencji analitów dla każdego z przejść MRM. Ponadto dla obu analizowanych związków wyznaczano stosunek pierwszego przejścia masowego (wykorzystywanego do analizy ilościowej) do drugiego przejścia masowego (wykorzystywanego do potwierdzenia tożsamości związku) (ang. *quantifier/qualifier transition ratio*, Q/q) i porównywano ze średnim stosunkiem Q/q wyznaczonym dla wzorców. Zgodnie z wytycznymi Unii Europejskiej, aby potwierdzić tożsamość związku uzyskany stosunek Q/q powinien znajdować się w zakresie tolerancji 20 % [152].

Liniowość metody została wyznaczona poprzez analizę 8 punktów krzywej kalibracyjnej w trzech powtórzeniach. Współczynnik korelacji r powyżej wartości 0,995 był uznawany za satysfakcjonujący.

Granice wykrywalności (ang. *limit of detection*, LOD) oraz granice oznaczalności (ang. *limit of quantification*, LOQ) metody wyznaczono na podstawie wartości stosunku sygnału do szumu (ang. *signal-to-noise ratio*, S/N) na chromatogramie. LOD określono jako stężenie analitu, dla którego S/N wynosiło 3, natomiast LOQ odnosiło się do stężenia analitu, dla którego S/N wynosiło 10.

Dokładność metody została sprawdzona przy użyciu próbek kontrolnych obciążonych trzema różnymi ilościami wzorca kreatyniny. Zgodnie z wytycznymi FDA [151] dokładność została sprawdzona poprzez wykonanie pięciu powtórzeń dla każdego stężenia. Dokładność była akceptowana, jeśli średnia wartość stężenia kreatyniny otrzymana po analizie pięciu powtórzeń próbek kontrolnych o określonym stężeniu mieściła się w zakresie 15 % rzeczywistej wartości.

W celu sprawdzenia precyzji metody wybrano trzy próbki moczu o różnych stężeniach kreatyniny (niskim, średnim i wysokim). Precyzja została obliczona jako współczynnik zmienności (ang. *coefficient of variation*, CV) pomiędzy powtórzonymi pomiarami i była akceptowana, jeśli mieściła się w zakresie 15 %. Sprawdzono zarówno precyzję w odniesieniu do próbek przygotowanych tego samego dnia (powtarzalność, ang. *intra-day precision*), jak również w różnych dniach (odtwarzalność, ang. *inter-day precision*). Zgodnie z wytycznymi FDA [151] do oceny powtarzalności przygotowano po pięć powtórzeń dla każdej próbki i następnie analizowano je w jednej sekwencji analiz, z kolei do oceny odtwarzalności przygotowano po pięć powtórzeń dla każdej próbki każdorazowo w ciągu pięciu kolejnych dni.

Określenie stabilności obejmowało sprawdzenie stabilności względem powtarzanych procesów zamrażania i rozmrażania (ang. *freeze and thaw stability*), stabilności krótkoterminowej (ang. *short-term stability*), stabilności roztworów podstawowych (ang. *stock solution stability*) i stabilności przygotowanych próbek (ang. *post-preparative stability*, *autosampler stability*). Stabilność względem powtarzanych procesów zamrażania i rozmrażania została sprawdzona przy wykorzystaniu trzech próbek moczu, które zostały poddane trzem cyklom zamrażania i rozmrażania. Trzy porcje każdej z tych próbek moczu były przechowywane w temperaturze -20 °C przez 24 godziny i następnie rozmrażane w temperaturze pokojowej. Po rozmrożeniu próbki były ponownie zamrażane na 24 godziny w tych samych warunkach. Taki cykl był powtórzony jeszcze dwukrotnie, a następnie próbki były analizowane metodą LC-MS/MS. Do określenia stabilności krótkoterminowej wykorzystano trzy próbki moczu, które zostały rozmrożone w temperaturze pokojowej, przechowywane w tej temperaturze przez 4 godziny, a następnie analizowane. Procedura została powtórzona trzykrotnie dla każdej z tych próbek moczu. Stabilność roztworów

podstawowych analitu (kreatyniny) oraz wzorca wewnętrznego (nafazoliny) została sprawdzona po przechowywaniu porcji tych roztworów w dwóch warunkach: w temperaturze pokojowej przez 6 godzin oraz w temperaturze -20 °C przez 4 miesiące. Po tym czasie stabilność oceniono porównując odpowiedź instrumentu dla tych roztworów z odpowiedzią dla roztworów świeżo przygotowanych. Do określenia stabilności przygotowanych próbek wykorzystano trzy próbki moczu oraz jeden roztwór do krzywej wzorcowej po przechowywaniu przez 24 i 48 godzin w autosamplerze.

#### **4.4.7. Porównanie z metodą wykorzystującą reakcję Jaffe'go**

20 próbek moczu zostało dodatkowo przeanalizowanych w laboratorium zewnętrznym za pomocą metody kolorymetrycznej z wykorzystaniem analizatora ADVIA Chemistry (Siemens) [153]. Metoda jest oparta na reakcji kwasu pikrynowego z kreatyniną w środowisku zasadowym opisanej przez Jaffe'go i stanowi obecnie laboratoryjny standard w oznaczaniu kreatyniny. Porównane zostały wyniki oznaczeń kreatyniny w moczu otrzymane przy wykorzystaniu opracowanej metody LC-MS/MS z wynikami uzyskanymi metodą kolorymetryczną.

## 4.5. Optymalizacja metody zatężania i oczyszczania próbek surowicy i moczu

### 4.5.1. Odczynniki

- acetonitryl LC-MS *grade* – J.T. Baker (Center Valley, PA, USA)
- kwas trifluorooctowy – Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- woda – J.T. Baker (Center Valley, PA, USA)

### 4.5.2. Przygotowanie roztworów wykorzystywanych do zatężania i oczyszczania próbek

0,1 % oraz 1 % roztwór kwasu trifluorooctowego w wodzie przygotowano przez rozcieńczenie wodą kwasu trifluorooctowego. 50 % roztwór acetonitrylu przygotowano przez dodanie do 300 µl acetonitrylu 240 µl wody oraz 60 µl 1 % wodnego roztworu kwasu trifluorooctowego.

### 4.5.3. Przeprowadzenie zatężania i oczyszczania próbek

Wszystkie próbki surowicy oraz moczu od pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem prostaty (grupa badana) i od osób zdrowych (grupa kontrolna) zostały oczyszczone i zatężone. Wykorzystano w tym celu końcówki ZipTip (Millipore, MA) wypełnione złożem C18. Technika polega na ekstrakcji do fazy stałej. Złoże C18 kondycjonowano poprzez dwukrotne przepłukanie końcówki ZipTip acetonitrylem oraz dwukrotne przepłukanie 0,1 % wodnym roztworem kwasu trifluorooctowego.

Próbki surowicy rozcieńczono 0,1 % roztworem kwasu trifluorooctowego w wodzie w stosunku 1:5 i następnie wprowadzano na złożę C18 poprzez dziesięciokrotne przepuszczenie roztworu przez końcówkę ZipTip. W celu przemycia złoża wykorzystano 0,1 % roztwór kwasu trifluorooctowego w wodzie, po czym wymywano frakcję peptydów za pomocą 5 µl 50 % roztworu acetonitrylu, trzykrotnie przepuszczając roztwór przez złożę.

Oczyszczanie próbek moczu i następujące później profilowanie peptydów wymagało innej procedury w porównaniu do próbek surowicy ze względu na konieczność przeprowadzenia normalizacji, jak również ze względu na to, że zawartość peptydów w moczu jest niższa niż w surowicy. Procedura przygotowania próbek moczu została zatem zoptymalizowana. Próbki moczu poddano normalizacji poprzez rozcieńczenie ich wodą do najniższego stężenia kreatyniny w populacji próbek (metodyka oznaczania kreatyniny została opisana w Rozdziale 4.4, natomiast wyniki zostały przedstawione w

Rozdziale 6.2). Maksymalne rozcieńczenie wynosiło około 1:9 dla próbki moczu o najwyższym stężeniu kreatyniny, natomiast próbka moczu o najniższym stężeniu kreatyniny nie została w ogóle rozcieńczona. 9  $\mu$ l tak przygotowanych próbek moczu mieszano z 1  $\mu$ l 1 % wodnego roztworu kwasu trifluoroctowego, po czym wprowadzano na złoże C18 poprzez dziesięciokrotne przepuszczenie roztworu przez końcówkę ZipTip. Złoże przemywano 0,1 % wodnym roztworem kwasu trifluoroctowego, a następnie eluowano frakcję peptydów za pomocą 1  $\mu$ l acetonitrylu, jednokrotnie przepuszczając rozpuszczalnik przez złoże, nanosząc eluat bezpośrednio na płytkę AnchorChip Standard 800  $\mu$ m (Bruker Daltonics, Brema, Niemcy) w trzech powtórzeniach.



## 4.6. Optymalizacja metody profilowania peptydów obecnych w surowicy i moczu przy wykorzystaniu zestawu MALDI-TOF-MS

### 4.6.1. Odczynniki

- kwas  $\alpha$ -cyjano-4-hydroksycynamonowy (HCCA) – Bruker Daltonics (Brema, Niemcy)
- mieszanina wzorców peptydów do kalibracji („*Peptide Calibration Standard*”) – Bruker Daltonics (Brema, Niemcy); w skład mieszaniny wchodzi: angiotensyna II, angiotensyna I, substancja P, bombezyna, fragment 1-17 hormonu adrenokortykotropowego, fragment 18-39 hormonu adrenokortykotropowego, somatostatyna 28
- mieszanina wzorców białek do kalibracji („*Protein Calibration Standard I*”) – Bruker Daltonics (Brema, Niemcy); w skład zestawu wchodzi: insulina, ubikwityna 1 (oraz inne białka nie wykorzystane do kalibracji w niniejszej pracy doktorskiej ze względu na masy białek wykraczające poza analizowany zakres mas)
- octan amonu – Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- diwodorofosforan amonu – Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- etanol – J.T. Baker (Center Valley, PA, USA)
- aceton – J.T. Baker (Center Valley, PA, USA)
- acetonitryl LC-MS *grade* – J.T. Baker (Center Valley, PA, USA)
- kwas trifluorooctowy – Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- woda – J.T. Baker (Center Valley, PA, USA)

### 4.6.2. Przygotowanie roztworów wykorzystywanych w profilowaniu peptydów

Odważono kwas  $\alpha$ -cyjano-4-hydroksycynamonowy i rozpuszczono w acetonie, otrzymując roztwór podstawowy HCCA o stężeniu 1 mg/ml. Przygotowano roztwór HCCA o stężeniu 0,3 mg/ml, który pełnił rolę matrycy do profilowania peptydowego surowicy, przez dodanie do 300  $\mu$ l roztworu podstawowego HCCA 33  $\mu$ l acetonu oraz 666  $\mu$ l etanolu. Wykorzystanie matrycy jest niezbędne w technice MALDI (ang. *matrix-assisted laser desorption ionization*, jonizacja laserowa wspomagana matrycą). Rolą matrycy jest zaabsorbowanie energii promienia laserowego i przekazanie części tej energii do analizowanych związków, co wywołuje ich jonizację i wybija je z matrycy. Jest to łagodna metoda jonizacji i nie doprowadza ona do fragmentacji cząsteczek.

Dobór rodzaju matrycy jest związany z analizowanym zakresem mas peptydów lub białek i jest ważnym etapem przygotowania próbki do analizy MALDI-TOF-MS. Inny roztwór HCCA przygotowano jako matrycę do profilowania moczu. Odważony HCCA rozpuszczono w uprzednio przygotowanej mieszaninie zamierającej 85 % acetonitrylu, 15 % wody, 0,1 % kwasu trifluorooctowego oraz 1 mM diwodorofosforanu amonu.

Przygotowano roztwory kalibrantów – peptydów oraz białek – przez rozpuszczenie mieszaniny wzorców peptydów w 125 µl 0,1 % wodnego roztworu kwasu trifluorooctowego oraz mieszaniny wzorców białek w takiej samej ilości rozpuszczalnika. Mieszaniny kalibrantów składają się z peptydów i białek o określonych masach w zakresie 1 – 10 kDa i są używane w celu zewnętrznej kalibracji spektrometru mas. 10 mM roztworu octanu amonu przygotowano przez rozpuszczenie 77 mg substancji w 100 ml wody. Zmieszano przygotowane roztwory wzorców peptydów, wzorców białek oraz octanu amonu w stosunku 1:5:4.

#### **4.6.3. Przygotowanie próbek do profilowania peptydów**

W przypadku próbek surowicy po przeprowadzonej deplecji 1 µl eluatu (frakcji peptydów pochodzących z próbki) mieszano z 10 µl roztworu matrycy. 1 µl tak przygotowanej mieszaniny nanoszono za pomocą pipety automatycznej na płytkę AnchorChip Standard 800 µm (Bruker Daltonics, Brema, Niemcy) w trzech powtórzeniach. Płytkę AnchorChip posiada 384 miejsca (spoty), na które nanosi się próbki zmieszane z matrycą. Płytkę tego typu umożliwia precyzyjne wyrównanie spotów dzięki ich hydrofilowym właściwościom, które wywołują efekt centrowania podczas wysychania próbki. Dzięki temu zapewnione jest to, że każdy strzał lasera w źródle jonów spektrometru mas trafi w próbkę, co wpływa na wydajność procesu zbierania danych. Ponadto płytkę AnchorChip pozwala zwiększyć czułość analiz dzięki temu, że próbka wysycha na małej powierzchni spotu. Na płytkę nanoszono również roztwór wzorców peptydów i białek do kalibracji. Przygotowana płytkę po wyschnięciu była umieszczana w spektrometrze mas MALDI-TOF/TOF.

Inną procedurę, zwaną techniką suchej kropli, zastosowano w przypadku eluatów próbek moczu. Bezpośrednio naniesione na płytkę AnchorChip eluaty pozostawiano do wyschnięcia, a następnie dodawano do nich 1 µl roztworu matrycy. W podobny sposób nanoszono na płytkę roztwory kalibrantów i mieszano z matrycą. Po wyschnięciu płytkę umieszczano w spektrometrze mas.

#### 4.6.4. Parametry MS i wstępna obróbka profili peptydowych

Do profilowania peptydów wykorzystano technikę spektrometrii mas. Analizy MS wykonano wykorzystując spektrometr mas typu MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Brema, Niemcy). Spektrometr mas tego typu składa się ze źródła jonów typu MALDI, analizatora mas typu TOF (ang. *time of flight*, analizator czasu przelotu) oraz detektora. Spektrometr UltrafleXtreme wyposażony jest w laser 2 kHz w trybie TOF. Profilowanie opiera się na analizie widm MS otrzymywanych w trybie liniowym. Parametry spektrometru mas były następujące: tryb jonizacji pozytywny, napięcie w źródle jonów 1 (ang. *ion source 1*), 25,09 kV; napięcie w źródle jonów 2 (ang. *ion source 2*), 23,79 kV; napięcie na soczewce (ang. *lens*), 6,40 kV; pulsacyjna ekstrakcja jonów (ang. *pulsed ion extraction*), 260 ns; supresja matrycy (ang. *matrix suppression mass cut off*), m/z 700 Da. Widma MS (profile peptydowe) zostały wygenerowane w zakresie mas 1000 – 10000 Da. Dla każdego spotu na płytce AnchorChip sumowano wyniki z 2000 strzałów lasera. Do generowania widm i ich bezpośredniej obróbki oraz analizy wykorzystano oprogramowanie FlexControl 3.4, FlexAnalysis 3.4 oraz ClinPro Tools 3.0 (Bruker Daltonics, Brema, Niemcy).

W celu otrzymania listy pików wraz z intensywnościami dla widma każdej analizowanej próbki surowicy i moczu przeprowadzono wstępną obróbkę profili peptydowych z wykorzystaniem programu MALDIquant 1.10 [154]. Aby osiągnąć stabilizację wariacji wyciągnięto pierwiastek kwadratowy z intensywności w pojedynczych widmach. Widma zostały także wygładzone z wykorzystaniem algorytmu Savitzky-Golay. Korekcja linii bazowej została wykonana przy użyciu algorytmu TopHat. Intensywności we wszystkich widmach zostały następnie znormalizowane z wykorzystaniem mediany intensywności (oddzielnie dla zbioru widm wygenerowanych dla próbek surowicy i moczu). Do dalszych analiz jako piki potraktowano zmienne, dla których stosunek S/N był powyżej 5. Piki powiązane z tą samą masą zostały wyrównane przy pomocy regresji statystycznej.

## 4.7. Oznaczanie wybranych biomarkerów nowotworowych w surowicy z wykorzystaniem separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej

### 4.7.1. Odczynniki

- zestaw „*Bio-Plex Pro Human Cancer Biomarker Panel 1 (16-plex)*” do analizy biomarkerów – Bio-Rad (Hercules, CA, USA); w skład zestawu wchodzi:
  - liofilizat wzorców oznaczanych białek
  - roztwór zawierający kulki magnetyczne
  - roztwór zawierający biotynylowane przeciwciała do detekcji
  - roztwór zawierający koniugat streptoawidyny i fikoerytryny
  - roztwór do rozcieńczania wzorców
  - roztwór do rozcieńczania próbek
  - roztwór do rozcieńczania biotynylowanych przeciwciał do detekcji
  - bufor do analiz
  - bufor do przepłukiwania
  - liofilizat do przygotowania roztworu kontrolnego o wysokim stężeniu
  - liofilizat do przygotowania roztworu kontrolnego o niskim stężeniu
- zestaw „*MAGPIX Calibration Kit*” do kalibracji czytnika – Bio-Rad (Hercules, CA, USA); w skład zestawu wchodzi roztwór mikrosfer „*MAGPIX Calibrator*”
- zestaw „*MAGPIX Performance Verification Kit*” do weryfikacji kalibracji czytnika – Bio-Rad (Hercules, CA, USA); w skład zestawu wchodzi roztwory mikrosfer „*MAGPIX Verifier*”, „*MAGPIX Fluidics 1*” oraz „*MAGPIX Fluidics 2*”

### 4.7.2. Oznaczanie białek z wykorzystaniem zestawu Bio-Plex

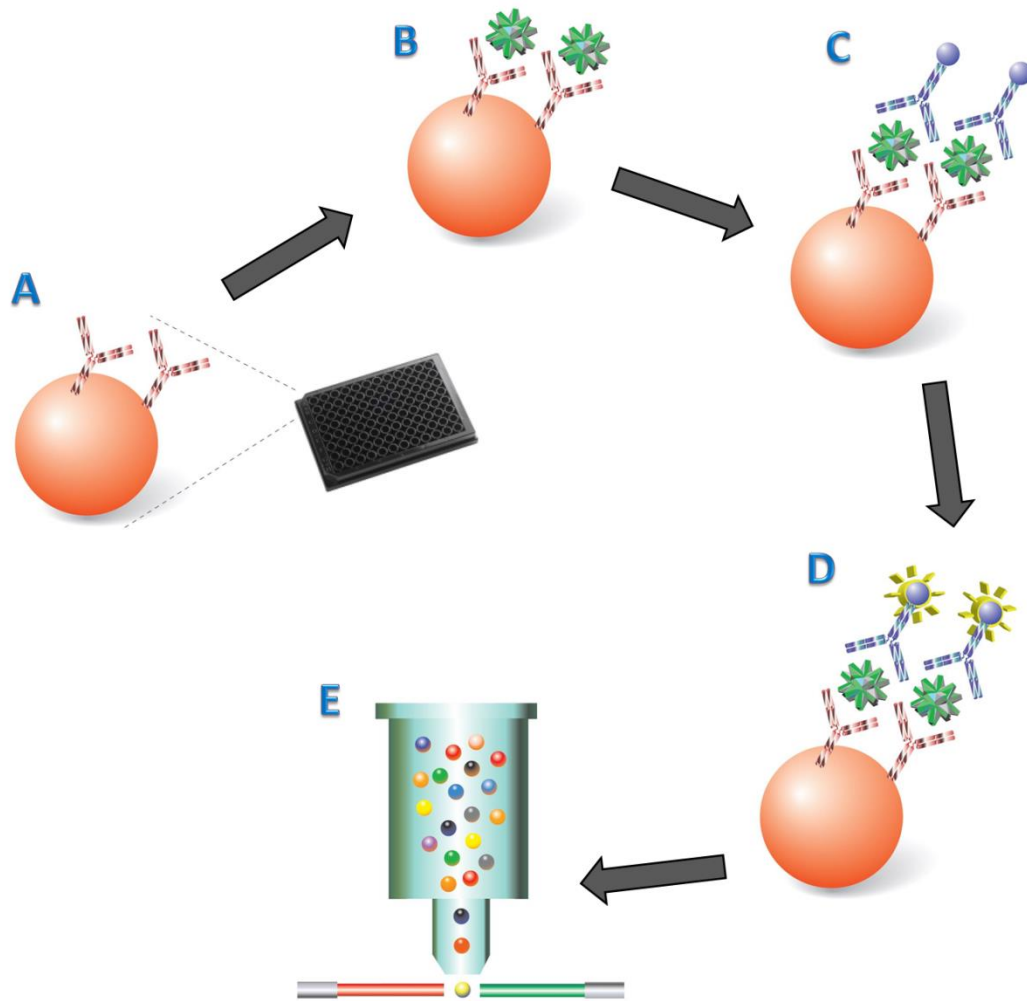
Do oznaczenia białek w próbkach surowicy wykorzystano zestaw „*Bio-Plex Pro Human Cancer Biomarker Panel 1 (16-plex)*”, który umożliwia jednoczesne oznaczenie 16 białek w różnych matrycach biologicznych (m. in. surowica, osocze, kultury komórkowe). Oznaczane w metodzie białka to: rozpuszczalny receptor naskórkowego czynnika wzrostu (sEGFR), zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (FGF-basic), folistatyna, czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (G-CSF), rozpuszczalny receptor kinazy tyrozynowej erbB-2 (sHER2/neu), czynnik wzrostu hepatocytów (HGF), rozpuszczalny receptor  $\alpha$  interleukiny 6 (sIL-6Ra), leptyna, osteopontyna, płytkopochodny czynnik wzrostu – heterodimer zbudowany z łańcucha A i łańcucha B / homodimer zbudowany z dwóch łańcuchów B (PDGF-AB/BB), płytkowo-śródbłonkowe białko adhezyjne 1 (PECAM-1), prolaktyna, czynnik komórek

macierzystych (SCF), rozpuszczalny receptor dla angiopoetyny (sTIE-2), rozpuszczalny receptor 1 naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (sVEGFR-1) i rozpuszczalny receptor 2 naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (sVEGFR-2). Są to markery (receptory, cytokiny, chemokiny, czynniki wzrostu i hormony) o bezpośrednim znaczeniu w związanej z guzem angiogenezie, czyli tworzeniu się nowych naczyń krwionośnych, a także w innych związanych z chorobą nowotworową procesach, takich jak metastaza (przerzut nowotworowy), proliferacja komórek, adhezja komórek, apoptoza, reakcja zapalna [148]. Angiogeneza jest fundamentalnym procesem w wielu fizjologicznych i patologicznych zjawiskach zachodzących w organizmie. Zachodzi w wielu procesach chorobowych, między innymi w nowotworach, reumatoidalnym zapaleniu stawów, chorobach układu krążenia, cukrzycy oraz łuszczycy [146, 147]. Analiza próbek z wykorzystaniem zestawu Bio-Plex dostarcza informacji o profilu klinicznie istotnych białkowych biomarkerów związanych z procesem angiogenezy.

Metoda oznaczania białek wykorzystuje barwione fluorescencyjnie kulki (mikrosfery) magnetyczne. Są one kluczowe podczas etapów przepłukiwania w procedurze przygotowania próbek do analizy. Separacja magnetyczna jest procedurą wygodną dla użytkownika i zapewnia wysoką powtarzalność wyników. Ponadto kulki magnetyczne stanowią podstawę technologii Luminex/xMAP [155]. Jest to jedna z technik multipleksowych (ang. *multiplex assay*). Techniki multipleksowe to typ oznaczeń, które równocześnie analizują wiele analitów w jednym cyklu analitycznym, co odróżnia je od procedur mierzących jeden analit w danej analizie [156]. Techniki takie są szeroko stosowane w genomice i proteomice, gdzie analizuje się profil biomolekuł określonej grupy (np. mRNA, białek) w próbce biologicznej w celu określenia wpływu stanu chorobowego, warunków eksperymentalnych lub mutacji DNA na biomolekuły i szlaki w danej próbce. Przykłady technik multipleksowych to: mikromacierz DNA, seryjna analiza ekspresji genów, sekwencjonowanie DNA, multipleksowa reakcja łańcuchowa polimerazy, mikromacierz białkowa, mikromacierz przeciwciał oraz wspomniana technologia Luminex/xMAP. W technologii Luminex/xMAP każdy rodzaj kulek magnetycznych posiada odmienny kod kolorystyczny (adres spektralny), który umożliwia dyskryminację poszczególnych analitów w multipleksowej mieszaninie. Pozwala to na jednoczesną detekcję nawet setek różnych biomolekuł w pojedynczym dołku 96-dołkowej mikroplatyki.

Oznaczanie z wykorzystaniem zestawu Bio-Plex to w rzeczywistości test immunologiczny powiązany z kulkami magnetycznymi. Zasada oznaczania jest podobna jak w metodzie „kanapkowej” ELISA (ang. „*sandwich*” ELISA; ELISA – ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*, test immunoenzymatyczny). Przeciwciała

wychwytyjące, specyficzne względem danego biomarkera (antygeny) są kowalencyjnie związane z powierzchnią określonych kulek magnetycznych barwionych fluorescencyjnie różnymi stosunkami dwóch fluoroforów. Dzięki takiemu sposobowi barwienia kulki są klasyfikowane do jednego ze 100 unikalnych regionów. Kulki reagują z biomarkerami obecnymi w próbce (antygeny wiążą się ze specyficznymi przeciwciałami). Po serii płukań w celu usunięcia niezwiązanych białek dodaje się specyficznych biotynylowanych przeciwciał do detekcji. Tworzy się wówczas struktura „kanapki”. Na końcu dodaje się koniugat streptoawidyny i fikoerytryny, w wyniku czego powstaje finalny kompleks. Fikoerytryna jest barwnikiem, który pełni tu rolę znacznika fluorescencyjnego. Fluorescencyjnie znakowana streptoawidyna łączy się z biotynylowanymi przeciwciałami. Technologia Luminex/xMAP wykorzystuje cytometr przepływowy wyposażony w dwa lasery lub dwie diody elektroluminescencyjne i system optyczny do rozpoznawania kulek magnetycznych (klasyfikowania ich na podstawie adresów spektralnych) i następnie detekcji promieniowania emitowanego przez fikoerytrynę związanego z obecnością analitu. Intensywność sygnału stanowi podstawę analizy ilościowej. Schemat powyższej procedury przedstawiony jest na Rycinie 5.



Rycina 5. Schemat procedury „kanapkowego” testu immunologicznego opartego na kulkach magnetycznych, wykorzystującego technologię Luminex/xMAP i zestaw Bio-Plex [157]. A – kulki magnetyczne z kowalencyjnie związanymi przeciwciałami nakładają się na płytkę 96-dołkową. B – po dodaniu próbki biomarkery wiążą się z przeciwciałami. C – dodane biotynylowane przeciwciała wiążą się z biomarkerami, tworząc strukturę „kanapki”. D – dodana fluorescencyjnie znakowana streptoawidyna łączy się z biotynylowanymi przeciwciałami. E – w cytometrze przepływowym kulki magnetyczne są sortowane i mierzona jest intensywność sygnału znacznika fluorescencyjnego z wykorzystaniem dwóch laserów lub dwóch diod elektroluminescencyjnych.

#### **4.7.3. Przygotowanie roztworów wzorców i próbek kontrolnych**

Roztwór wyjściowy wzorców białek przygotowano poprzez dodanie do fiołki z wzorcami 781  $\mu\text{l}$  roztworu do rozcieńczania wzorców i delikatne wymieszanie, a następnie inkubowano na lodzie przez 30 minut. Tak przygotowany roztwór stanowi jednocześnie roztwór do krzywej wzorcowej o najwyższym stężeniu. Pozostałe 7 punktów krzywej wzorcowej przygotowano poprzez czterokrotne rozcieńczanie kolejnych roztworów. W tym celu do probówek typu Eppendorf dodano po 150  $\mu\text{l}$  roztworu do rozcieńczania wzorców. Następnie do jednej z probówek dodano 50  $\mu\text{l}$  roztworu do krzywej wzorcowej o najwyższym stężeniu, zmieszano i 50  $\mu\text{l}$  przygotowanego roztworu przeniesiono do kolejnej probówki. Procedurę kontynuowano aż do ostatniego punktu krzywej wzorcowej. Całą krzywą wzorcową przygotowano w dwóch powtórzeniach. Roztwory kontrolne o wysokim i niskim stężeniu przygotowano poprzez dodanie do fiołek z odpowiednimi liofilizatami 250  $\mu\text{l}$  roztworu do rozcieńczania wzorców i delikatne wymieszanie. Tak przygotowane roztwory inkubowano na lodzie przez 30 minut. Wszystkie przygotowane roztwory zużyto bezpośrednio po przygotowaniu.

#### **4.7.4. Przygotowanie innych roztworów wykorzystywanych w metodyce oznaczania białek**

Przygotowano roztwór roboczy zawierający kulki magnetyczne przez wstrząśnięcie stężonego roztworu zawierającego kulki magnetyczne, a następnie 20-krotnie rozcieńczenie buforem do analiz. Roztwór chroniono przed światłem za pomocą folii aluminiowej i doprowadzono do temperatury pokojowej przed użyciem. Roztwór roboczy zawierający biotynylowane przeciwciała do detekcji przygotowano 10 minut przed użyciem poprzez wstrząśnięcie stężonego roztworu zawierającego przeciwciała, a następnie 20-krotne rozcieńczenie roztworem do rozcieńczania przeciwciał. Roztwór roboczy zawierający koniugat streptoawidyny i fikoerytryny przygotowano 10 minut przed użyciem poprzez wstrząśnięcie stężonego roztworu zawierającego koniugat i 100-krotne rozcieńczenie buforem do analiz. Roztwór chroniono przed światłem. Wszystkie roztwory przygotowano w nadmiarze, który miał zapewnić możliwość swobodnego pobrania właściwych objętości roztworów pipetą ośmiokanałową z odpowiedniego rezerwuaru.



#### 4.7.5. Przygotowanie próbek do analizy

Próbki surowicy rozmrożono i pozostawiono na lodzie. Rozcieńczenia próbek surowicy przygotowano bezpośrednio przed przeprowadzeniem procedury testu immunologicznego. Próbki rozcieńczono czterokrotnie, mieszając każdorazowo 45  $\mu$ l roztworu do rozcieńczania próbek z 15  $\mu$ l surowicy, i doprowadzono do temperatury pokojowej. Do każdego wykorzystywanego dołka płytki 96-dołkowej o płaskim dnie dodano 50  $\mu$ l roztworu roboczego zawierającego kulki magnetyczne. Płytkę płukano dwukrotnie za pomocą 100  $\mu$ l buforu do przepłukiwania. Po dodaniu każdej porcji roztworu płytkę umieszczano na minutę na podkładce magnetycznej pod przykryciem z folii aluminiowej, po czym nie zdejmując płytki z podkładki wylewano roztwór. Podkładka magnetyczna zapewniała przyciągnięcie kulek magnetycznych do dna płytki, dzięki czemu kulki nie były wylewane wraz z roztworem. Następnie do odpowiednich dołków płytki dodano po 50  $\mu$ l roztworów do krzywej wzorcowej, roztworów kontrolnych, próbek ślepych (roztwór do rozcieńczania wzorców) oraz rozcieńczonych próbek surowicy. Płytkę przykryto taśmą uszczelniającą i inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej w ciemności pod przykryciem z folii aluminiowej z jednoczesnym wstrząsaniem przy 850 rpm. Po inkubacji płytkę trzykrotnie płukano za pomocą 100  $\mu$ l buforu do przepłukiwania. W kolejnym kroku do wszystkich dołków dodano po 25  $\mu$ l roztworu roboczego zawierającego biotynylowane przeciwciała do detekcji. Płytkę przykryto taśmą uszczelniającą i ponownie inkubowano przez pół godziny w tych samych warunkach. Po inkubacji płytkę płukano trzykrotnie za pomocą 100  $\mu$ l buforu do przepłukiwania, a następnie do wszystkich dołków dodano po 50  $\mu$ l roztworu roboczego zawierającego koniugat streptoawidyny i fikoerytryny, po czym płytkę przykryto taśmą uszczelniającą i inkubowano przez 10 minut w tych samych warunkach. Po trzykrotnym przepłukaniu płytki, analogicznie jak we wcześniejszych etapach, dodano do wszystkich dołków po 125  $\mu$ l buforu do analiz, przykryto płytkę taśmą uszczelniającą i wytrząsano przez 30 s. Płytkę z przygotowanymi próbkami umieszczano w czytniku – cytometrze przepływowym.

#### 4.7.6. Parametry czytnika

Do detekcji analitów wykorzystano technologię Luminex/xMAP. Dane zbierano przy użyciu czytnika Bio-Plex MAGPIX (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Czytnik ten jest cytometrem przepływowym wyposażonym w dwie diody elektroluminescencyjne, z których jedna emituje światło czerwone o długości fali 635 nm, a druga emituje światło zielone o długości fali 532 nm. Czerwona dioda oświetla barwniki fluorescencyjne

każdej kulki, prowadząc do klasyfikacji kulek i tym samym identyfikacji analitów. W tym samym czasie zielona dioda wzbudza fikoerytrynę, która generuje sygnał. Detekcja emitowanego promieniowania odbywa się przy użyciu fotopowielacza, a na podstawie odczytanych intensywności fluorescencji, które są proporcjonalne do stężenia białek związanych z kulkami, wyznacza się krzywe wzorcowe oraz zawartości białek w próbkach. Objętość próbki pobierana przez czytnik z każdego dołka płytki wynosiła 50 µl. Zbieranie danych i ich przetwarzanie odbywało się z wykorzystaniem oprogramowania Bio-Plex Manager (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

#### **4.7.7. Walidacja metody**

Metoda separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej oznaczania białek z wykorzystaniem zestawu Bio-Plex jest zwalidowana z uwzględnieniem następujących parametrów: specyficzność i reaktywność krzyżowa, dokładność (odzysk), precyzja (powtarzalność i odtwarzalność), czułość (LOD), zakres (dolna granica oznaczalności (ang. *lower limit of quantification*, LLOQ) / górna granica oznaczalności (ang. *upper limit of quantification*, ULOQ)), liniowość rozcieńczenia, paralelizm i efekt matrycy. W celu weryfikacji walidacji oceniono poddano dokładność metody oraz wykreślono krzywe wzorcowe dla analitów z wykorzystaniem 5-parametrowej regresji logistycznej, oceniono poprawność ich dopasowania i określono zakres (LLOQ/ULOQ) dla każdego analitu. Dokładność metody została sprawdzona poprzez analizę dwóch roztworów kontrolnych, o wysokim i niskim stężeniu białek, do których dołączony jest certyfikat z zakresami referencyjnymi stężeń wszystkich 16 białek. Dodatkowo przed każdą analizą weryfikowano sprawność systemu, aby przygotować cytometr przepływowy do pracy i sprawdzić poprawność jego kalibracji.

#### 4.8. Statystyczna analiza otrzymanych wyników

W celu analizy danych metabolomicznych i proteomicznych otrzymanych w przeprowadzonych badaniach wykorzystano analizy statystyczne jednozmiennowe oraz wielozmiennowe. Zmiennymi w analizach były stężenia aminokwasów oznaczone w próbkach surowicy i moczu, intensywności peptydów z widm MS otrzymanych w wyniku profilowania próbek surowicy i moczu oraz stężenia białek oznaczone w próbkach surowicy. Każda próbka była przypisana do jednej z dwóch analizowanych grup: pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem prostaty (grupa badana,  $n = 49$ ) lub osób zdrowych (grupa kontrolna,  $n = 40$ ). Odpowiednio przygotowane zbiory danych analizowano w programie Statistica 10.0 (StatSoft Polska, Kraków), z wykorzystaniem platformy online MetaboAnalyst 3.0 oraz w programie ClinPro Tools 3.0 (Bruker Daltonics, Brema, Niemcy). We wszystkich analizach statystycznych za istotną statystycznie przyjęto wartość  $p \leq 0,05$ .

##### 4.8.1. Jednozmiennowe analizy statystyczne

Przeprowadzono analizy jednozmiennowe uzyskanych danych. W programie Statistica porównano poziomy zmiennych pomiędzy grupami. W pierwszej kolejności sprawdzano normalność rozkładu analizowanych zmiennych (aminokwasów, peptydów oraz białek) w płynach ustrojowych (surowicy oraz moczu) wykorzystując test W Shapiro-Wilka. Jest to preferowany test normalności, ponieważ cechuje go duża moc w porównaniu do innych testów. Zmienne, których rozkład stężeń (w przypadku aminokwasów oraz białek) lub intensywności (w przypadku peptydów) nie spełniał założeń o normalności rozkładu, poddano analizie statystycznej z użyciem nieparametrycznego testu U Manna-Whitney'a. Służy on do weryfikacji hipotezy zerowej o nieistotności różnic pomiędzy medianami badanych zmiennych w dwóch grupach. W przypadku zmiennych, których rozkład spełniał założenie o normalności rozkładu, zastosowano analizę jednorodności wariancji przy użyciu testu Levene'a i testu Browna-Forsythe'a. W przypadku nie spełnienia założenia o jednorodności wariancji w obrębie grup, w celu oceny równości średnich w dwóch grupach przeprowadzono test F Welcha. Natomiast w przypadku, gdy na podstawie obliczonej przez program wartości prawdopodobieństwa testowego ( $p$ ) brak było podstaw do odrzucenia hipotezy o jednorodności wariancji, do oceny zróżnicowania przeciętnego poziomu stężeń aminokwasów lub intensywności peptydów w dwóch grupach użyto testu t-Studenta. Zmienne, których poziomy różniły się pomiędzy grupą badaną i kontrolną ( $p \leq 0,05$ ), uznano za potencjalnie istotne dla raka prostaty.

Wykorzystując platformę MetaboAnalyst wykreślono krzywe *receiver operating characteristic* (ang., ROC) używane do oceny poprawności klasyfikatora. Określono poprawność klasyfikacji osobno dla każdej zmiennej oraz porównano między sobą uzyskane modele klasyfikacyjne przy użyciu pola pod wykresem krzywej ROC (ang. *area under curve*, AUC).

#### 4.8.2. Wielozmiennowe analizy statystyczne

Wykorzystując platformę MetaboAnalyst przeprowadzono analizy wielozmiennowe uzyskanych danych. W pierwszej kolejności wykonywano normalizację (wstępną obróbkę) danych, która obejmowała trzy etapy. Dane zostały poddane normalizacji w odniesieniu do próbek (ang. *sample normalization*) w celu zniwelowania różnic pomiędzy próbkami (rodzaj normalizacji – ang. *normalization by sum*), a także transformacji (logarytmowaniu) i autoskalowaniu w celu umożliwienia porównywania zmiennych między sobą. Te etapy normalizacji danych odbywały się niezależnie dla każdego analizowanego statystycznie zbioru zmiennych. Czterema podstawowymi zbiorami danych były: stężenia aminokwasów w próbkach surowicy, stężenia aminokwasów w próbkach moczu znormalizowane na kreatyninę, intensywności peptydów w próbkach surowicy oraz intensywności peptydów w próbkach moczu.

W celu przedstawienia korelacji w obrębie danych oraz porównania profili aminokwasowych i białkowych między grupą badaną i kontrolną przeprowadzono analizy PLS-DA (ang. *partial least squares – discriminant analysis*). PLS-DA wykorzystano do klasyfikacji próbek oraz do wytypowania zmiennych mających największe znaczenie w klasyfikacji pacjentów do jednej z dwóch grup. PLS-DA jest metodą nadzorowaną i w związku z tym ma tendencję do nadmiernego dopasowywania danych. Dlatego modele otrzymane w PLS-DA powinny być walidowane. W celu walidacji modeli przeprowadzono testy permutacji [158]. Test permutacji polega na losowej zamianie etykiet identyfikujących analizowane grupy, po czym analiza PLS-DA jest wykonywana dla zbioru danych z nowymi etykietami. Ten proces jest powtarzany wiele razy (w analizach przeprowadzanych w niniejszej pracy przeprowadzono po 2000 powtórzeń), a następnie ocenia się, czy klasyfikacja próbek była istotna ze statystycznego punktu widzenia, czy też była przypadkowa.

Wykorzystując platformę MetaboAnalyst wykreślono ponadto krzywe ROC dla modeli składających się z wielu zmiennych i dla każdego modelu określono poprawność klasyfikacji oraz porównano między sobą uzyskane modele klasyfikacyjne przy użyciu wartości AUC. W programie Statistica przeprowadzono ponadto analizy

dyskryminacyjne w celu oceny zdolności klasyfikacyjnych wybranych grup zmiennych (aminokwasów, peptydów), w tym czułości i swoistości. Każda analiza dyskryminacyjna została poprzedzona normalizacją odpowiedniego zbioru danych poprzez platformę MetaboAnalyst.

Do wielozmiennowej analizy profili peptydowych wykorzystano również program ClinPro Tools. Zarówno dla próbek surowicy, jak i moczu, wygenerowane zostały trzy modele klasyfikacyjne z wykorzystaniem trzech różnych algorytmów. Pierwszy z nich to *QuickClassifier* (QC), który jest algorytmem sortującym jednoczynnikowym. Kolejny algorytm to *Supervised Neural Network* (SNN), wykorzystujący charakterystyczne widma dla każdej grupy, zwane prototypami. Ostatnim algorytmem jest *Genetic Algorithm* (GA), który wybiera kombinacje pików najbardziej istotne dla dyskryminacji. Dla każdego modelu uzyskano wartość określoną jako zdolność rozpoznawania, czyli poprawność klasyfikacji pacjentów do odpowiedniej grupy chorych lub zdrowych. Przeprowadzono ponadto procedurę walidacji krzyżowej. Walidacja krzyżowa określa wiarygodność zbudowanego modelu i może być użyta do przewidzenia, jak model będzie się zachowywał w przyszłości.

Przeprowadzono dodatkowe analizy PLS-DA danych dla próbek pacjentów z rakiem prostaty z wykorzystaniem platformy MetaboAnalyst. Celem analiz było określenie korelacji w obrębie danych poprzez sprawdzenie, czy możliwa jest dyskryminacja próbek w zależności od stopnia złośliwości histologicznej. Pacjentów podzielono na trzy grupy według klasyfikacji patomorfologicznej raka prostaty: grupa z sześcioma punktami w skali Gleasona ( $n = 19$ ), grupa z siedmioma punktami w skali Gleasona ( $n = 24$ ) oraz grupa z ośmioma lub dziewięcioma punktami w skali Gleasona ( $n = 6$ ). Analizowano cztery zbiory danych: stężenia aminokwasów w próbkach surowicy, stężenia aminokwasów w próbkach moczu znormalizowane na kreatyninę, intensywności peptydów w próbkach surowicy oraz intensywności peptydów w próbkach moczu.

## 5. Wyniki

### 5.1. Tabele

#### 5.1.1. Spis tabel

Tabele 1 i 2 dotyczą Części teoretycznej i są umieszczone w Rozdziale 2.

**Tabela 1, strona 18.** Grupy prognostyczne odpowiadające wynikowi w skali Gleasona [20]. Grupa prognostyczna I wiąże się z bardzo dobrymi rokowaniami i jest najkorzystniejsza dla pacjenta. Rokowania pogarszają się znacząco od grupy prognostycznej I do V.

**Tabela 2, strona 38.** Podstawowe źródła biomarkerów raka prostaty [115, 116]. Zalety i ograniczenia związane z różnymi rodzajami próbek odnoszą się do techniki poboru, przechowywania, objętości i składu próbek oraz markerów, które mogą zostać wykryte.

Tabele 3-6 dotyczą Części doświadczalnej i są umieszczone w Rozdziale 4.

**Tabela 3, strona 49.** Charakterystyka grupy badanej – pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem prostaty.

**Tabela 4, strona 53.** Procentowy udział faz ruchomych podczas rozdziału chromatograficznego w metodzie LC-MS/MS oznaczania aminokwasów.

**Tabela 5, strony 55-56.** Parametry MS dla aminokwasów oznaczanych z wykorzystaniem odczynników aTRAQ. Dla każdego oznaczanego aminokwasu podano przejścia MRM i energię kolizyjną odpowiadające oznaczanemu aminokwasowi obecnemu w próbce biologicznej (analit) oraz jego wzorcowi wewnętrznemu. Przejścia MRM są jednakowe w przypadku aminokwasów izobarycznych. Q1 m/z – stosunek masy do ładunku jonu macierzystego, Q3 m/z – stosunek masy do ładunku jonu potomnego, CE – energia kolizyjna.

**Tabela 6, strona 59.** Procentowy udział faz ruchomych podczas rozdziału chromatograficznego w metodzie LC-MS/MS oznaczania kreatyniny.

Tabele 7-30 dotyczą Wyników i są umieszczone w Rozdziale 5.

**Tabela 7, strona 82.** Parametry walidacyjne metody LC-MS/MS oznaczania aminokwasów: precyzja dla oznaczania aminokwasów w surowicy oraz dokładność. AA – aminokwas, Powt. – powtarzalność, Odt. – odtwarzalność.

**Tabela 8, strona 83.** Parametry walidacyjne metody LC-MS/MS oznaczania aminokwasów: precyzja dla oznaczania aminokwasów w moczu. AA – aminokwas, Powt. – powtarzalność, Odt. – odtwarzalność.

**Tabela 9, strona 84.** Oznaczone stężenia aminokwasów [ $\mu\text{M}$ ] w surowicy pacjentów z grupy badanej ( $n = 49$ ) z wykorzystaniem metody LC-MS/MS. LOQ – granica oznaczalności.

**Tabela 10, strona 85.** Oznaczone stężenia aminokwasów [ $\mu\text{M}$ ] w surowicy pacjentów z grupy kontrolnej ( $n = 40$ ) z wykorzystaniem metody LC-MS/MS. LOQ – granica oznaczalności.

**Tabela 11, strona 86.** Oznaczone minimalne stężenia aminokwasów [ $\mu\text{M}$ ] w moczu pacjentów z grupy badanej ( $n = 49$ ) i z grupy kontrolnej ( $n = 40$ ) przed normalizacją z wykorzystaniem metody LC-MS/MS. LOQ – granica oznaczalności.

**Tabela 12, strona 87.** Oznaczone stężenia aminokwasów znormalizowane na stężenie kreatyniny (stosunki stężeń aminokwas / kreatynina) [ $10 \mu\text{M}$  aminokwasu / M kreatyniny] w moczu pacjentów z grupy badanej ( $n = 49$ ) z wykorzystaniem metody LC-MS/MS.

**Tabela 13, strona 88.** Oznaczone stężenia aminokwasów znormalizowane na stężenie kreatyniny (stosunki stężeń aminokwas / kreatynina) [ $10 \mu\text{M}$  aminokwasu / M kreatyniny] w moczu pacjentów z grupy kontrolnej ( $n = 40$ ) z wykorzystaniem metody LC-MS/MS.

**Tabela 14, strona 89.** Parametry MS dla metody LC-MS/MS oznaczania kreatyniny w moczu. DP – potencjał rozpadu klastrów, EP – potencjał wejścia, CE – energia kolizyjna, CXP – potencjał wyjścia z komory kolizyjnej, \* - pierwszy jon potomny (pierwsze przejście masowe, ilościowe), \*\* - drugi jon potomny (drugie przejście masowe, jakościowe).

**Tabela 15, strona 89.** Odzysk dla metody LC-MS/MS oznaczania kreatyniny w moczu dla próbek kontrolnych moczu obciążonych trzema różnymi poziomami wzorca kreatyniny.

**Tabela 16, strona 89.** Powtarzalność metody LC-MS/MS oznaczania kreatyniny w moczu dla trzech poziomów stężeń kreatyniny. CV – współczynnik zmienności.

**Tabela 17, strony 90-93.** Intensywności peptydów w surowicy pacjentów z grupy badanej i kontrolnej otrzymane z wykorzystaniem metody MALDI-TOF-MS.

**Tabela 18, strony 94-97.** Intensywności peptydów w moczu pacjentów z grupy badanej i kontrolnej otrzymane z wykorzystaniem metody MALDI-TOF-MS.

**Tabela 19, strona 98.** Dokładność metody separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej oznaczania białek. Zakresy referencyjne dla roztworów kontrolnych o wysokim i niskim stężeniu oraz stężenia oznaczone [pg/ml].

**Tabela 20, strona 98.** Oznaczone stężenia białek [pg/ml] w surowicy pacjentów z grupy badanej (n = 49) z wykorzystaniem separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej. LLOQ – dolna granica oznaczalności, ULOQ – górna granica oznaczalności.

**Tabela 21, strona 99.** Oznaczone stężenia białek [pg/ml] w surowicy pacjentów z grupy kontrolnej (n = 40) z wykorzystaniem separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej. LLOQ – dolna granica oznaczalności, ULOQ – górna granica oznaczalności.

**Tabela 22, strony 100-101.** Porównanie średnich stężeń aminokwasów w dwóch grupach w surowicy i moczu oznaczonych z wykorzystaniem metody LC-MS/MS.

**Tabela 23, strona 101.** Porównanie średnich stężeń białek [pg/ml] w surowicy pacjentów w dwóch grupach oznaczonych z wykorzystaniem separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej.



**Tabela 24, strona 102.** Analiza dyskryminacyjna. Zmienne wprowadzone do modeli zbudowanych na podstawie oznaczonych stężeń aminokwasów w próbkach surowicy. Model 1 A – zbudowany z wykorzystaniem metody krokowej postępującej, model 1 B – zbudowany z wykorzystaniem predefiniowanych zmiennych (najbardziej różnicujących aminokwasów według analiz jednozmiennowych).

**Tabela 25, strona 103.** Analiza dyskryminacyjna. Zmienne wprowadzone do modeli zbudowanych na podstawie oznaczonych stężeń aminokwasów w próbkach moczu. Model 2 A – zbudowany z wykorzystaniem metody krokowej postępującej, model 2 B – zbudowany z wykorzystaniem predefiniowanych zmiennych (najbardziej różnicujących aminokwasów według analiz jednozmiennowych).

**Tabela 26, strona 104.** Analiza dyskryminacyjna. Zmienne wprowadzone do modeli zbudowanych na podstawie wyznaczonych intensywności peptydów w próbkach surowicy. Model 3 A – zbudowany z wykorzystaniem metody krokowej postępującej, model 3 B – zbudowany z wykorzystaniem predefiniowanych zmiennych (najbardziej różnicujących peptydów według analiz jednozmiennowych).

**Tabela 27, strona 105.** Analiza dyskryminacyjna. Zmienne wprowadzone do modeli zbudowanych na podstawie wyznaczonych intensywności peptydów w próbkach moczu. Model 4 A – zbudowany z wykorzystaniem metody krokowej postępującej, model 4 B – zbudowany z wykorzystaniem predefiniowanych zmiennych (najbardziej różnicujących peptydów według analiz jednozmiennowych).

**Tabela 28, strona 106.** Analiza dyskryminacyjna. Porównanie modeli zbudowanych na podstawie czterech zbiorów danych dwoma różnymi sposobami. Czułość, swoistość i ogólna poprawność klasyfikacji wyznaczone na podstawie zbioru testowego.

**Tabela 29, strona 107.** Ogólna poprawność klasyfikacji dla opartych o krzywe ROC modeli składających się z różnej ilości zmiennych i otrzymanych dla czterech zbiorów danych.

**Tabela 30, strona 107.** Wyniki zdolności klasyfikacyjnych trzech modeli klasyfikacyjnych wykorzystujących profile peptydowe w próbkach surowicy i moczu.

## 5.1.2. Tabele

Tabela 7. Parametry walidacyjne metody LC-MS/MS oznaczania aminokwasów: precyzja dla oznaczania aminokwasów w surowicy oraz dokładność. AA – aminokwas, Powt. – powtarzalność, Odt. – odtwarzalność.

| AA    | Precyzja – współczynnik zmienności [%] (n = 9) |       |                       |      |                                   |      | Dokładność – kontrolne osocze |           |
|-------|--|-------|-----------------------|------|-----------------------------------|------|-------------------------------|-----------|
|       | Stężenie                                       |       | Czas retencji analitu |      | Czas retencji wzorca wewnętrznego |      | Stężenie [µM]                 |           |
|       | Powt.  | Odt.  | Powt.                 | Odt. | Powt.                             | Odt. | Zakres referencyjny           | Oznaczone |
| Tau   | 6,54   | 2,21  | 0,66                  | 1,87 | 0,51                              | 2,33 | 25,9 - 38,8                   | 33,9      |
| Asn   | 2,96   | 6,04  | 0,44                  | 2,38 | 0,53                              | 1,67 | 26,4 - 39,7                   | 32,6      |
| Ser   | 1,32   | 10,35 | 0,43                  | 2,64 | 0,48                              | 1,87 | 68,6 - 100,3                  | 86,5      |
| Gly   | 3,10   | 10,05 | 0,41                  | 2,28 | 0,39                              | 2,37 | 137,0 - 206,0                 | 193,3     |
| Hyp   | 2,10   | 10,99 | 0,46                  | 2,66 | 0,41                              | 2,54 | -                             | -         |
| EtN   | 2,29   | 7,72  | 0,32                  | 2,17 | 0,32                              | 2,28 | -                             | -         |
| Gln   | 1,59   | 11,49 | 0,28                  | 2,18 | 0,39                              | 2,74 | 220,0 - 330,0                 | 253,4     |
| Asp   | 6,03   | 7,05  | 0,31                  | 2,56 | 0,21                              | 2,07 | 10,2 - 15,3                   | 11,5      |
| Cit   | 8,23   | 18,24 | 0,19                  | 1,98 | 0,25                              | 2,27 | 16,8 - 25,2                   | 20,2      |
| Thr   | 1,46   | 10,23 | 0,24                  | 2,20 | 0,24                              | 2,38 | 79,8 - 120,0                  | 98,2      |
| Sar   | 6,06   | 2,86  | 0,26                  | 2,40 | 0,35                              | 1,90 | -                             | -         |
| bAla  | 2,81   | 8,34  | 0,27                  | 2,08 | 0,16                              | 2,20 | -                             | -         |
| Ala   | 3,62   | 5,92  | 0,15                  | 2,03 | 0,09                              | 2,40 | 279,0 - 418,0                 | 408,1     |
| Glu   | 4,77   | 6,74  | 0,18                  | 2,04 | 0,15                              | 1,99 | 147,0 - 221,0                 | 162,8     |
| His   | 6,89   | 3,26  | 0,25                  | 3,09 | 0,19                              | 1,96 | 57,8 - 86,7                   | 68,7      |
| 1MHis | 0,58   | 6,53  | 0,25                  | 2,65 | 0,25                              | 2,03 | -                             | -         |
| 3MHis | 3,57   | 9,07  | 0,15                  | 2,18 | 0,30                              | 3,09 | -                             | -         |
| Aad   | 11,54  | 11,16 | 0,00                  | 1,48 | 0,00                              | 2,65 | -                             | -         |
| bAib  | 7,01   | 6,28  | 0,07                  | 1,37 | 0,00                              | 2,62 | -                             | -         |
| Abu   | 2,70   | 10,00 | 0,07                  | 1,40 | 0,07                              | 1,39 | 10,9 - 16,4                   | 16,1      |
| Arg   | 7,82   | 6,02  | 0,15                  | 2,11 | 0,13                              | 1,84 | 45,3 - 67,9                   | 54,0      |
| Pro   | 3,27   | 8,39  | 0,07                  | 1,45 | 0,07                              | 2,05 | 159,0 - 238,0                 | 230,5     |
| Orn   | 1,29   | 10,10 | 0,07                  | 1,63 | 0,00                              | 1,48 | 56,1 - 84,1                   | 56,7      |
| Cys   | 23,83  | 20,05 | 0,07                  | 1,29 | 0,07                              | 1,48 | -                             | -         |
| Lys   | 4,73   | 12,09 | 0,07                  | 1,29 | 0,07                              | 1,40 | 92,1 - 138,0                  | 129,9     |
| Met   | 2,38   | 10,20 | 0,11                  | 1,07 | 0,17                              | 2,11 | 41,9 - 62,8                   | 47,3      |
| Val   | 1,28   | 10,59 | 0,17                  | 1,00 | 0,17                              | 1,38 | 145,0 - 217,0                 | 197,2     |
| Tyr   | 6,13   | 10,82 | 0,11                  | 0,76 | 0,16                              | 1,56 | 39,2 - 58,7                   | 43,9      |
| Ile   | 2,74   | 7,01  | 0,00                  | 0,97 | 0,00                              | 1,41 | 46,1 - 69,2                   | 55,1      |
| Leu   | 0,73   | 9,05  | 0,00                  | 1,09 | 0,00                              | 1,34 | 127,0 - 191,0                 | 156,1     |
| Phe   | 1,22   | 8,16  | 0,00                  | 0,94 | 0,00                              | 2,27 | 59,3 - 88,9                   | 65,0      |
| Trp   | 1,38   | 6,98  | 0,48                  | 0,49 | 0,48                              | 1,29 | 35,5 - 53,2                   | 39,6      |

Tabela 8. Parametry walidacyjne metody LC-MS/MS oznaczania aminokwasów: precyzja dla oznaczania aminokwasów w moczu. AA – aminokwas, Powt. – powtarzalność, Odt. – odtwarzalność.

| Aminokwas | Precyzja – współczynnik zmienności [%] (n = 9) |       |                       |      |                                   |      |
|-----------|--|-------|-----------------------|------|-----------------------------------|------|
|           | Stężenie                                       |       | Czas retencji analitu |      | Czas retencji wzorca wewnętrznego |      |
|           | Powt.  | Odt.  | Powt.                 | Odt. | Powt.                             | Odt. |
| PEtN      | 2,55   | 2,59  | 0,48                  | 1,19 | 0,48                              | 1,14 |
| Tau       | 6,34   | 3,47  | 0,69                  | 1,08 | 0,46                              | 1,10 |
| Asn       | 3,20   | 4,91  | 0,66                  | 1,56 | 0,50                              | 1,57 |
| Ser       | 0,23   | 5,63  | 0,50                  | 1,48 | 0,50                              | 1,50 |
| Gly       | 8,20   | 5,55  | 0,61                  | 1,44 | 0,61                              | 1,52 |
| Hyp       | 10,92  | 18,07 | 0,48                  | 2,27 | 0,47                              | 1,37 |
| EtN       | 2,26   | 1,73  | 0,42                  | 1,61 | 0,56                              | 1,50 |
| Gln       | 3,46   | 3,77  | 0,58                  | 1,41 | 0,58                              | 1,38 |
| Asp       | 6,71   | 7,57  | 0,58                  | 1,44 | 0,73                              | 1,28 |
| Cit       | 7,63   | 13,70 | 0,51                  | 1,17 | 0,51                              | 1,17 |
| Thr       | 6,03   | 6,29  | 0,51                  | 1,17 | 0,39                              | 1,18 |
| Sar       | 8,29   | 17,50 | 0,40                  | 1,25 | 0,40                              | 1,24 |
| bAla      | 2,70   | 15,07 | 0,50                  | 1,26 | 0,37                              | 1,27 |
| Ala       | 4,88   | 4,90  | 0,47                  | 1,27 | 0,59                              | 1,27 |
| Glu       | 1,65   | 5,69  | 0,62                  | 1,15 | 0,62                              | 1,16 |
| His       | 1,66   | 3,47  | 0,54                  | 2,11 | 0,54                              | 2,13 |
| 1MHis     | 4,71   | 5,83  | 0,51                  | 1,72 | 0,51                              | 1,72 |
| 3MHis     | 4,19   | 4,59  | 0,46                  | 2,10 | 0,58                              | 2,12 |
| Asa       | 5,85   | 6,50  | 0,49                  | 1,63 | 0,61                              | 1,66 |
| Hcit      | 7,88   | 6,13  | 0,32                  | 0,82 | 0,32                              | 0,80 |
| Car       | 7,00   | 10,92 | 0,23                  | 2,00 | 0,56                              | 1,99 |
| Aad       | 9,45   | 6,75  | 0,31                  | 0,73 | 0,21                              | 0,75 |
| GABA      | 9,94   | 12,39 | 0,43                  | 0,94 | 0,33                              | 0,99 |
| bAib      | 3,44   | 3,12  | 0,30                  | 0,74 | 0,20                              | 0,73 |
| Abu       | 5,36   | 8,07  | 0,30                  | 0,73 | 0,20                              | 0,75 |
| Arg       | 15,28  | 3,30  | 0,65                  | 2,08 | 0,44                              | 1,97 |
| Pro       | 0,53   | 9,43  | 0,40                  | 0,84 | 0,40                              | 0,80 |
| Orn       | 0,29   | 18,68 | 0,50                  | 1,04 | 0,30                              | 1,11 |
| Cth       | 12,09  | 10,23 | 0,00                  | 0,85 | 0,30                              | 0,86 |
| Cys       | 5,29   | 5,23  | 0,19                  | 0,76 | 0,29                              | 0,78 |
| Hyl       | 5,74   | 14,01 | 0,31                  | 2,83 | 0,31                              | 1,15 |
| Lys       | 3,35   | 5,31  | 0,28                  | 0,82 | 0,19                              | 0,84 |
| Met       | 1,72   | 3,03  | 0,17                  | 0,50 | 0,17                              | 0,47 |
| Val       | 4,83   | 6,45  | 0,17                  | 0,50 | 0,17                              | 0,49 |
| Tyr       | 2,02   | 4,91  | 0,16                  | 0,39 | 0,16                              | 0,38 |
| Ile       | 8,87   | 15,46 | 0,15                  | 0,30 | 0,15                              | 0,29 |
| Leu       | 4,56   | 4,94  | 0,22                  | 0,28 | 0,14                              | 0,30 |
| Phe       | 1,75   | 4,09  | 0,14                  | 0,30 | 0,14                              | 0,28 |
| Trp       | 2,40   | 1,62  | 0,00                  | 0,50 | 0,00                              | 0,50 |

Tabela 9. Oznaczone stężenia aminokwasów [ $\mu\text{M}$ ] w surowicy pacjentów z grupy badanej ( $n = 49$ ) z wykorzystaniem metody LC-MS/MS. LOQ – granica oznaczalności.

| Aminokwas | Średnia | SD   | Mediana | Min.  | Maks. | LOQ |
|-----------|---------|------|---------|-------|-------|-----|
| Tau       | 115,1   | 30,6 | 117,2   | 32,7  | 174,5 | 0,5 |
| Asn       | 39,0    | 6,6  | 38,7    | 26,5  | 55,1  | 0,5 |
| Ser       | 126,4   | 23,2 | 128,5   | 84,9  | 174,7 | 0,5 |
| Gly       | 227,7   | 39,5 | 219,2   | 163,6 | 362,1 | 1,0 |
| Hyp       | 13,3    | 7,8  | 10,4    | 5,1   | 35,9  | 0,2 |
| EtN       | 7,6     | 1,1  | 7,6     | 5,1   | 10,4  | 0,5 |
| Gln       | 407,8   | 56,1 | 404,0   | 303,8 | 509,1 | 0,5 |
| Asp       | 14,2    | 6,1  | 14,0    | 4,6   | 26,4  | 0,1 |
| Cit       | 26,1    | 9,2  | 24,6    | 10,4  | 54,2  | 0,5 |
| Thr       | 102,1   | 23,4 | 106,0   | 53,4  | 168,0 | 0,2 |
| Sar       | 1,7     | 1,0  | 1,4     | 0,6   | 5,6   | 0,2 |
| bAla      | 21,5    | 11,8 | 18,7    | 4,4   | 54,3  | 0,5 |
| Ala       | 396,5   | 80,0 | 384,8   | 281,9 | 604,1 | 0,2 |
| Glu       | 53,7    | 23,9 | 47,5    | 24,6  | 142,7 | 0,5 |
| His       | 55,8    | 9,2  | 56,8    | 36,1  | 75,6  | 0,5 |
| 1MHis     | 5,1     | 8,0  | 2,0     | 0,3   | 44,7  | 0,2 |
| 3MHis     | 4,5     | 1,7  | 4,5     | 2,1   | 8,9   | 0,2 |
| Aad       | 1,0     | 0,4  | 0,9     | 0,3   | 2,5   | 0,2 |
| bAib      | 2,0     | 1,2  | 1,7     | 0,7   | 7,3   | 0,2 |
| Abu       | 20,9    | 7,6  | 18,9    | 6,6   | 46,1  | 0,2 |
| Arg       | 71,5    | 15,2 | 67,4    | 47,9  | 110,4 | 0,5 |
| Pro       | 202,6   | 62,3 | 191,0   | 101,1 | 413,9 | 0,1 |
| Orn       | 79,3    | 22,1 | 81,1    | 32,4  | 139,5 | 0,5 |
| Cys       | 12,9    | 15,5 | 2,6     | 1,0   | 56,0  | 1,0 |
| Lys       | 154,9   | 25,0 | 150,9   | 115,2 | 233,2 | 0,5 |
| Met       | 16,9    | 4,1  | 16,7    | 10,6  | 28,9  | 0,1 |
| Val       | 222,8   | 40,0 | 220,9   | 139,9 | 328,6 | 0,2 |
| Tyr       | 40,6    | 9,1  | 38,8    | 25,1  | 68,9  | 0,5 |
| Ile       | 56,3    | 14,6 | 54,3    | 29,4  | 103,1 | 0,5 |
| Leu       | 101,6   | 23,4 | 100,0   | 59,1  | 163,4 | 0,5 |
| Phe       | 47,8    | 7,9  | 45,7    | 34,9  | 72,5  | 0,2 |
| Trp       | 41,2    | 7,8  | 40,3    | 27,1  | 60,2  | 0,1 |

## WYNIKI

Tabela 10. Oznaczone stężenia aminokwasów [ $\mu\text{M}$ ] w surowicy pacjentów z grupy kontrolnej (n = 40) z wykorzystaniem metody LC-MS/MS. LOQ – granica oznaczalności.

| Aminokwas | Średnia | SD    | Mediana | Min.  | Maks. | LOQ |
|-----------|---------|-------|---------|-------|-------|-----|
| Tau       | 105,6   | 42,1  | 105,5   | 48,0  | 232,1 | 0,5 |
| Asn       | 44,3    | 8,2   | 43,7    | 27,7  | 63,4  | 0,5 |
| Ser       | 121,7   | 28,5  | 117,4   | 78,2  | 199,1 | 0,5 |
| Gly       | 234,5   | 52,6  | 229,7   | 136,8 | 404,6 | 1,0 |
| Hyp       | 12,3    | 7,6   | 9,5     | 3,1   | 40,7  | 0,2 |
| EtN       | 9,8     | 2,3   | 9,6     | 6,3   | 16,2  | 0,5 |
| Gln       | 496,3   | 96,2  | 488,1   | 333,6 | 734,3 | 0,5 |
| Asp       | 11,8    | 4,2   | 11,2    | 5,0   | 21,0  | 0,1 |
| Cit       | 26,9    | 8,4   | 27,8    | 7,4   | 45,2  | 0,5 |
| Thr       | 100,6   | 23,3  | 95,5    | 62,6  | 152,3 | 0,2 |
| Sar       | 1,2     | 0,6   | 1,2     | 0,2   | 3,0   | 0,2 |
| bAla      | 15,6    | 8,8   | 14,2    | 5,9   | 45,1  | 0,5 |
| Ala       | 488,3   | 130,8 | 479,9   | 207,6 | 782,2 | 0,2 |
| Glu       | 65,4    | 30,2  | 59,3    | 24,8  | 187,3 | 0,5 |
| His       | 63,7    | 11,1  | 61,2    | 47,9  | 101,2 | 0,5 |
| 1MHis     | 6,0     | 5,3   | 4,6     | 0,7   | 24,8  | 0,2 |
| 3MHis     | 3,2     | 0,9   | 3,1     | 1,6   | 6,3   | 0,2 |
| Aad       | 1,0     | 0,3   | 0,9     | 0,5   | 2,0   | 0,2 |
| bAib      | 1,9     | 0,9   | 1,8     | 0,8   | 4,2   | 0,2 |
| Abu       | 24,1    | 7,2   | 23,6    | 13,1  | 42,8  | 0,2 |
| Arg       | 95,0    | 29,1  | 87,7    | 58,3  | 180,1 | 0,5 |
| Pro       | 188,8   | 53,8  | 183,5   | 98,9  | 311,3 | 0,1 |
| Orn       | 92,9    | 27,0  | 85,4    | 46,7  | 158,4 | 0,5 |
| Cys       | 4,3     | 5,2   | 2,7     | 1,0   | 30,5  | 1,0 |
| Lys       | 188,8   | 41,9  | 189,5   | 122,5 | 299,9 | 0,5 |
| Met       | 23,7    | 5,8   | 22,5    | 14,3  | 36,3  | 0,1 |
| Val       | 236,8   | 42,2  | 232,6   | 161,9 | 307,6 | 0,2 |
| Tyr       | 43,6    | 10,0  | 41,8    | 26,5  | 68,7  | 0,5 |
| Ile       | 69,9    | 13,2  | 70,1    | 45,5  | 101,5 | 0,5 |
| Leu       | 124,7   | 24,5  | 125,5   | 77,6  | 189,0 | 0,5 |
| Phe       | 55,8    | 8,8   | 55,8    | 41,2  | 83,7  | 0,2 |
| Trp       | 44,9    | 9,5   | 43,4    | 30,3  | 67,4  | 0,1 |

Tabela 11. Oznaczone minimalne stężenia aminokwasów [ $\mu\text{M}$ ] w moczu pacjentów z grupy badanej ( $n = 49$ ) i z grupy kontrolnej ( $n = 40$ ) przed normalizacją z wykorzystaniem metody LC-MS/MS. LOQ – granica oznaczalności.

| Aminokwas | Grupa badana ( $n = 49$ ) | Grupa kontrolna ( $n = 40$ ) | LOQ  |
|-----------|---------------------------|------------------------------|------|
| PEtN      | 1,0                       | 4,2                          | 0,5  |
| Tau       | 95,3                      | 25,8                         | 0,5  |
| Asn       | 9,0                       | 19,2                         | 0,5  |
| Ser       | 37,0                      | 67,5                         | 0,5  |
| Gly       | 75,8                      | 190,9                        | 1,0  |
| Hyp       | 0,2                       | 0,2                          | 0,2  |
| EtN       | 57,1                      | 74,5                         | 0,5  |
| Gln       | 7,0                       | 97,3                         | 0,5  |
| Asp       | 0,2                       | 0,3                          | 0,1  |
| Cit       | 0,5                       | 0,5                          | 0,5  |
| Thr       | 3,4                       | 24,4                         | 0,2  |
| Sar       | 0,2                       | 0,2                          | 0,2  |
| bAla      | 1,1                       | 2,8                          | 0,5  |
| Ala       | 17,6                      | 30,9                         | 0,2  |
| Glu       | 1,3                       | 2,9                          | 0,5  |
| His       | 8,6                       | 154,0                        | 0,5  |
| 1MHis     | 11,6                      | 13,4                         | 0,2  |
| 3MHis     | 32,2                      | 44,5                         | 0,2  |
| Asa       | 1,0                       | 1,9                          | 1,0  |
| Hcit      | 1,8                       | 3,9                          | 0,2  |
| Car       | 0,5                       | 1,4                          | 0,5  |
| Aad       | 0,3                       | 5,9                          | 0,2  |
| GABA      | 0,3                       | 0,1                          | 0,05 |
| bAib      | 13,0                      | 6,2                          | 0,2  |
| Abu       | 0,2                       | 1,5                          | 0,2  |
| Arg       | 1,7                       | 4,2                          | 0,5  |
| Pro       | 1,4                       | 1,3                          | 0,1  |
| Orn       | 1,4                       | 4,6                          | 0,5  |
| Cth       | 0,5                       | 2,0                          | 0,5  |
| Cys       | 4,9                       | 10,6                         | 1,0  |
| Hyl       | 0,5                       | 0,6                          | 0,5  |
| Lys       | 3,7                       | 9,3                          | 0,5  |
| Met       | 0,2                       | 1,6                          | 0,1  |
| Val       | 3,2                       | 8,7                          | 0,2  |
| Tyr       | 2,5                       | 14,3                         | 0,5  |
| Ile       | 1,0                       | 2,6                          | 0,5  |
| Leu       | 2,3                       | 7,0                          | 0,5  |
| Phe       | 3,1                       | 10,0                         | 0,2  |
| Trp       | 2,7                       | 8,3                          | 0,1  |

Tabela 12. Oznaczone stężenia aminokwasów znormalizowane na stężenie kreatyniny (stosunki stężeń aminokwas / kreatynina) [10 µM aminokwasu / M kreatyniny] w moczu pacjentów z grupy badanej (n = 49) z wykorzystaniem metody LC-MS/MS.

| Aminokwas | Średnia | SD     | Mediana | Min.   | Maks.   |
|-----------|---------|--------|---------|--------|---------|
| PEtN      | 113,5   | 78,8   | 97,9    | 7,2    | 299,7   |
| Tau       | 6605,8  | 4062,7 | 5836,1  | 560,5  | 16462,5 |
| Asn       | 637,7   | 369,9  | 604,3   | 123,4  | 1620,4  |
| Ser       | 2843,2  | 1420,3 | 2513,9  | 512,9  | 5925,1  |
| Gly       | 8527,7  | 4702,0 | 7533,5  | 1050,8 | 19514,0 |
| Hyp       | 31,2    | 42,2   | 13,5    | 1,9    | 167,4   |
| EtN       | 2440,2  | 774,7  | 2597,8  | 847,0  | 4838,3  |
| Gln       | 2781,4  | 1403,1 | 2677,3  | 97,0   | 6676,7  |
| Asp       | 22,0    | 16,7   | 19,0    | 2,3    | 69,2    |
| Cit       | 42,3    | 40,3   | 29,2    | 5,7    | 167,3   |
| Thr       | 957,9   | 755,4  | 691,1   | 47,1   | 3227,7  |
| Sar       | 12,7    | 15,6   | 7,3     | 0,8    | 101,5   |
| bAla      | 288,5   | 471,5  | 162,0   | 13,7   | 3113,6  |
| Ala       | 2270,2  | 1761,9 | 1573,1  | 266,5  | 7452,4  |
| Glu       | 89,0    | 50,4   | 83,1    | 12,5   | 239,8   |
| His       | 3829,7  | 2627,3 | 3060,1  | 119,2  | 9470,3  |
| 1MHis     | 2516,9  | 3764,6 | 1138,7  | 124,6  | 16491,3 |
| 3MHis     | 1558,8  | 634,0  | 1525,9  | 364,0  | 3190,0  |
| Asa       | 111,5   | 97,6   | 85,1    | 16,7   | 451,0   |
| Hcit      | 120,4   | 59,2   | 122,9   | 19,0   | 338,8   |
| Car       | 118,5   | 171,2  | 65,3    | 3,8    | 1101,0  |
| Aad       | 212,6   | 157,4  | 151,7   | 4,2    | 584,3   |
| GABA      | 12,6    | 5,4    | 12,2    | 3,8    | 33,1    |
| bAib      | 1639,6  | 2082,6 | 866,2   | 209,9  | 9144,3  |
| Abu       | 110,1   | 56,5   | 105,9   | 2,8    | 237,2   |
| Arg       | 161,5   | 208,8  | 100,4   | 21,6   | 952,3   |
| Pro       | 91,1    | 53,1   | 79,3    | 11,8   | 288,7   |
| Orn       | 124,2   | 96,2   | 104,9   | 12,5   | 427,9   |
| Cth       | 97,6    | 67,0   | 96,3    | 4,9    | 269,4   |
| Cys       | 400,7   | 321,1  | 349,2   | 38,3   | 1816,3  |
| Hyl       | 28,4    | 26,9   | 21,1    | 5,7    | 161,7   |
| Lys       | 905,5   | 1360,8 | 423,1   | 51,3   | 7879,6  |
| Met       | 63,6    | 40,4   | 58,1    | 2,8    | 184,6   |
| Val       | 342,2   | 208,9  | 301,9   | 44,4   | 1033,9  |
| Tyr       | 537,6   | 335,3  | 438,8   | 34,7   | 1372,7  |
| Ile       | 93,9    | 53,5   | 81,0    | 13,9   | 267,2   |
| Leu       | 218,1   | 149,3  | 188,0   | 31,9   | 708,1   |
| Phe       | 338,2   | 207,7  | 280,8   | 43,0   | 997,0   |
| Trp       | 466,9   | 271,8  | 414,5   | 37,4   | 1159,9  |

Tabela 13. Oznaczone stężenia aminokwasów znormalizowane na stężenie kreatyniny (stosunki stężeń aminokwas / kreatynina) [10 µM aminokwasu / M kreatyniny] w moczu pacjentów z grupy kontrolnej (n = 40) z wykorzystaniem metody LC-MS/MS.

| Aminokwas | Średnia | SD     | Mediana | Min.   | Maks.   |
|-----------|---------|--------|---------|--------|---------|
| PEtN      | 308,3   | 228,2  | 263,6   | 41,2   | 1313,6  |
| Tau       | 6227,6  | 7766,2 | 3790,1  | 931,5  | 40322,8 |
| Asn       | 1018,5  | 474,7  | 900,7   | 392,8  | 2804,3  |
| Ser       | 3527,1  | 1471,1 | 3108,8  | 1180,9 | 7353,6  |
| Gly       | 10731,4 | 7523,6 | 8648,7  | 2952,8 | 44161,0 |
| Hyp       | 43,8    | 73,8   | 17,1    | 3,1    | 387,0   |
| EtN       | 4103,6  | 1463,4 | 3800,6  | 2021,2 | 7776,4  |
| Gln       | 4238,6  | 1867,7 | 3889,5  | 1505,0 | 10003,7 |
| Asp       | 17,3    | 15,7   | 10,6    | 4,1    | 76,3    |
| Cit       | 62,0    | 66,9   | 47,0    | 11,3   | 422,3   |
| Thr       | 1016,9  | 499,7  | 920,3   | 377,0  | 2323,3  |
| Sar       | 19,2    | 19,8   | 11,5    | 2,5    | 80,6    |
| bAla      | 237,1   | 250,6  | 173,1   | 26,1   | 1385,6  |
| Ala       | 2501,1  | 1732,9 | 1997,5  | 477,5  | 7384,6  |
| Glu       | 145,3   | 109,0  | 114,1   | 38,3   | 623,5   |
| His       | 5773,9  | 2619,1 | 5603,4  | 2142,9 | 12610,5 |
| 1MHis     | 4777,7  | 5467,9 | 2731,4  | 138,0  | 24075,1 |
| 3MHis     | 2147,8  | 1106,8 | 1841,4  | 764,3  | 6658,4  |
| Asa       | 108,2   | 60,1   | 87,6    | 38,3   | 288,6   |
| Hcit      | 275,7   | 253,7  | 196,5   | 67,7   | 1136,1  |
| Car       | 125,8   | 129,0  | 86,9    | 18,6   | 560,4   |
| Aad       | 312,3   | 204,4  | 253,8   | 111,8  | 1034,0  |
| GABA      | 30,3    | 12,0   | 29,4    | 1,3    | 62,4    |
| bAib      | 1716,0  | 2213,8 | 871,6   | 115,0  | 9943,9  |
| Abu       | 114,3   | 52,8   | 106,6   | 23,2   | 253,4   |
| Arg       | 278,2   | 165,8  | 238,9   | 69,6   | 878,5   |
| Pro       | 83,4    | 63,6   | 60,8    | 21,9   | 287,4   |
| Orn       | 186,9   | 136,6  | 146,4   | 49,1   | 689,9   |
| Cth       | 279,9   | 411,1  | 162,2   | 37,3   | 1923,2  |
| Cys       | 584,8   | 439,4  | 445,1   | 189,0  | 2385,6  |
| Hyl       | 102,2   | 173,3  | 47,7    | 13,1   | 898,7   |
| Lys       | 1684,3  | 2162,3 | 1047,9  | 262,8  | 10773,2 |
| Met       | 96,7    | 41,2   | 86,4    | 37,1   | 212,6   |
| Val       | 366,8   | 164,5  | 324,5   | 164,8  | 970,4   |
| Tyr       | 820,2   | 451,6  | 642,5   | 350,1  | 2369,7  |
| Ile       | 124,8   | 65,7   | 101,1   | 49,0   | 367,8   |
| Leu       | 283,5   | 138,0  | 237,7   | 120,6  | 681,7   |
| Phe       | 476,7   | 232,1  | 364,0   | 215,3  | 1089,0  |
| Trp       | 665,2   | 353,0  | 547,3   | 272,7  | 1631,4  |



Tabela 14. Parametry MS dla metody LC-MS/MS oznaczania kreatyniny w moczu. DP – potencjał rozpadu klastrów, EP – potencjał wejścia, CE – energia kolizyjna, CXP – potencjał wyjścia z komory kolizyjnej, \* - pierwszy jon potomny (pierwsze przejście masowe, ilościowe), \*\* - drugi jon potomny (drugie przejście masowe, jakościowe).

| Związek    | Jon nacierzysty (m/z) | DP [V] | EP [V] | Jon potomny (m/z) | CE [eV] | CXP [V] |
|------------|-----------------------|--------|--------|-------------------|---------|---------|
| kreatynina | 114,1                 | 60     | 10     | 86.1*             | 17      | 15      |
|            |                       |        |        | 44.1**            | 33      | 10      |
| nafazolina | 211,1                 | 90     | 10     | 141.1*            | 47      | 24      |
|            |                       |        |        | 115.1**           | 65      | 20      |

Tabela 15. Odzysk dla metody LC-MS/MS oznaczania kreatyniny w moczu dla próbek kontrolnych moczu obciążonych trzema różnymi poziomami wzorca kreatyniny.

| Dodany wzorec kreatyniny [ng/ml] | Stężenie kreatyniny [ng/ml] (n = 5)<br>średnia ± SD | Odzysk [%] |
|----------------------------------|---|------------|
| 0                                | 327,7 ± 12,4  | nd         |
| 100,0                            | 425,0 ± 34,6  | 97,7       |
| 500,0                            | 779,3 ± 94,1  | 90,3       |
| 1000,0                           | 1266,7 ± 106,0                                      | 93,9       |

Tabela 16. Powtarzalność metody LC-MS/MS oznaczania kreatyniny w moczu dla trzech poziomów stężeń kreatyniny. CV – współczynnik zmienności.

| Powtarzalność (intra-day precision)<br>(n = 5) |        | Odtwarzalność (inter-day precision)<br>(n = 5) |        |
|--|--------|--|--------|
| Stężenie kreatyniny [ng/ml]<br>średnia ± SD    | CV [%] | Stężenie kreatyniny [ng/ml]<br>średnia ± SD    | CV [%] |
| 125,3 ± 9,4                                    | 7,51   | 129,5 ± 16,5                                   | 12,74  |
| 308,8 ± 11,3                                   | 3,65   | 331,0 ± 28,9                                   | 8,74   |
| 841,0 ± 9,8                                    | 1,17   | 931,6 ± 79,4                                   | 8,52   |

Tabela 17. Intensywności peptydów w surowicy pacjentów z grupy badanej i kontrolnej otrzymane z wykorzystaniem metody MALDI-TOF-MS.

(ciąg dalszy Tabeli 17 na kolejnych stronach)

| Peptyd<br>(m/z) | Grupa badana (n = 49) |      |       |       |       | Grupa kontrolna (n = 40) |      |       |       |       |
|-----------------|-----------------------|------|-------|-------|-------|--------------------------|------|-------|-------|-------|
|                 | Śr.                   | SD   | Med.  | Min.  | Maks. | Śr.                      | SD   | Med.  | Min.  | Maks. |
| 1005,19         | 5,4                   | 2,7  | 5,8   | 0,49  | 10,3  | 3,8                      | 1,7  | 3,7   | 1,12  | 7,7   |
| 1021,02         | 85,6                  | 32,0 | 88,6  | 14,62 | 147,5 | 86,7                     | 37,0 | 87,5  | 11,75 | 166,5 |
| 1037,22         | 15,5                  | 9,2  | 13,8  | 0,87  | 30,5  | 12,8                     | 5,8  | 13,3  | 2,34  | 38,0  |
| 1043,03         | 5,3                   | 2,8  | 4,8   | 0,10  | 12,7  | 9,1                      | 6,9  | 7,3   | 0,53  | 28,3  |
| 1049,39         | 5,1                   | 2,5  | 5,2   | 0,14  | 11,0  | 3,5                      | 2,2  | 3,1   | 0,00  | 10,9  |
| 1065,21         | 8,5                   | 5,0  | 9,0   | 0,19  | 19,0  | 6,9                      | 3,1  | 6,9   | 0,18  | 21,3  |
| 1073,72         | 9,5                   | 4,3  | 9,1   | 1,57  | 19,5  | 8,7                      | 3,8  | 8,6   | 1,54  | 21,5  |
| 1074,64         | 9,1                   | 3,8  | 9,0   | 1,40  | 18,5  | 8,5                      | 3,7  | 7,6   | 2,02  | 19,7  |
| 1078,06         | 33,3                  | 16,8 | 33,7  | 5,67  | 85,3  | 50,5                     | 26,4 | 42,8  | 7,17  | 113,3 |
| 1081,45         | 17,4                  | 7,0  | 18,0  | 4,90  | 31,5  | 21,5                     | 9,1  | 19,4  | 7,64  | 46,4  |
| 1093,41         | 3,8                   | 1,9  | 3,4   | 0,86  | 8,2   | 2,7                      | 1,2  | 2,7   | 0,18  | 6,2   |
| 1099,41         | 2,7                   | 2,3  | 2,1   | 0,00  | 10,1  | 14,0                     | 8,3  | 13,5  | 0,86  | 41,7  |
| 1109,23         | 7,5                   | 4,0  | 7,7   | 1,25  | 15,3  | 6,1                      | 2,6  | 5,9   | 0,00  | 13,3  |
| 1125,40         | 9,5                   | 5,5  | 10,0  | 0,84  | 20,8  | 8,7                      | 4,0  | 8,5   | 2,52  | 27,0  |
| 1129,92         | 3,8                   | 2,0  | 3,7   | 0,73  | 9,3   | 4,0                      | 2,0  | 3,5   | 0,14  | 9,1   |
| 1153,32         | 6,0                   | 3,0  | 6,5   | 0,13  | 12,0  | 7,2                      | 4,7  | 5,5   | 2,61  | 18,6  |
| 1169,41         | 6,9                   | 4,0  | 7,4   | 0,26  | 13,6  | 6,0                      | 3,1  | 6,2   | 0,73  | 19,1  |
| 1194,42         | 2,2                   | 1,8  | 2,0   | 0,00  | 8,6   | 8,4                      | 10,6 | 3,6   | 0,08  | 42,5  |
| 1207,37         | 166,7                 | 64,0 | 176,8 | 37,11 | 282,0 | 186,5                    | 68,3 | 188,8 | 28,22 | 315,8 |
| 1216,98         | 5,1                   | 2,6  | 4,5   | 0,59  | 13,7  | 8,0                      | 5,1  | 6,7   | 0,10  | 20,4  |
| 1221,13         | 5,1                   | 2,9  | 4,7   | 0,00  | 13,8  | 5,1                      | 2,8  | 4,6   | 0,49  | 12,8  |
| 1229,21         | 13,8                  | 7,0  | 13,4  | 1,10  | 33,4  | 17,7                     | 9,1  | 16,6  | 1,40  | 34,5  |
| 1233,46         | 3,1                   | 2,3  | 2,5   | 0,00  | 8,7   | 6,5                      | 4,0  | 5,7   | 0,78  | 21,6  |
| 1244,97         | 7,6                   | 2,5  | 7,2   | 3,74  | 16,8  | 7,9                      | 8,9  | 5,7   | 0,13  | 56,0  |
| 1251,24         | 3,4                   | 1,8  | 3,1   | 0,04  | 9,8   | 5,0                      | 3,5  | 4,9   | 0,00  | 18,3  |
| 1261,39         | 51,2                  | 21,8 | 49,9  | 6,47  | 116,5 | 49,1                     | 20,1 | 43,2  | 14,62 | 98,3  |
| 1264,29         | 44,4                  | 24,2 | 42,0  | 8,70  | 131,7 | 60,7                     | 24,4 | 60,3  | 22,40 | 122,2 |
| 1277,36         | 22,0                  | 13,0 | 21,4  | 1,73  | 59,2  | 21,2                     | 11,5 | 18,5  | 2,68  | 48,5  |
| 1283,25         | 12,0                  | 6,4  | 11,8  | 0,00  | 34,6  | 11,9                     | 7,2  | 9,9   | 2,50  | 29,1  |
| 1288,69         | 5,5                   | 2,1  | 5,8   | 1,69  | 9,0   | 1,4                      | 1,3  | 1,2   | 0,00  | 4,7   |
| 1300,82         | 9,6                   | 5,7  | 9,2   | 0,72  | 23,2  | 9,9                      | 6,1  | 9,0   | 1,54  | 28,3  |
| 1301,27         | 9,4                   | 5,6  | 9,4   | 1,16  | 24,1  | 10,2                     | 6,1  | 9,1   | 1,53  | 30,1  |
| 1304,65         | 8,4                   | 3,4  | 7,9   | 1,59  | 18,3  | 11,4                     | 7,3  | 8,2   | 3,32  | 30,0  |
| 1305,66         | 7,4                   | 3,3  | 7,1   | 1,63  | 20,0  | 12,3                     | 9,8  | 8,2   | 2,82  | 41,6  |
| 1309,08         | 6,8                   | 3,5  | 6,1   | 0,88  | 18,2  | 7,5                      | 3,5  | 7,4   | 1,71  | 14,8  |
| 1321,29         | 3,5                   | 1,9  | 3,2   | 0,53  | 8,1   | 5,0                      | 5,1  | 2,9   | 0,30  | 24,3  |
| 1332,57         | 10,5                  | 3,4  | 10,6  | 4,49  | 22,1  | 7,0                      | 4,4  | 5,7   | 1,30  | 17,8  |
| 1351,56         | 115,7                 | 67,0 | 109,0 | 20,60 | 315,6 | 162,2                    | 74,7 | 172,9 | 31,70 | 324,8 |
| 1364,33         | 6,4                   | 3,3  | 6,4   | 0,57  | 16,7  | 7,5                      | 4,1  | 6,8   | 0,58  | 20,4  |

## WYNIKI

|         |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1373,39 | 10,0  | 7,3   | 8,6   | 1,39  | 34,7  | 17,0  | 9,6   | 17,0  | 3,51  | 39,5  |
| 1376,76 | 7,5   | 2,5   | 7,1   | 3,31  | 15,0  | 8,9   | 4,4   | 8,5   | 2,42  | 21,3  |
| 1389,93 | 6,6   | 2,6   | 6,4   | 2,42  | 13,3  | 12,0  | 8,1   | 10,8  | 2,48  | 50,0  |
| 1395,27 | 5,1   | 3,0   | 4,8   | 0,01  | 13,0  | 7,9   | 3,4   | 7,3   | 1,24  | 16,1  |
| 1419,82 | 50,1  | 31,1  | 42,8  | 7,09  | 123,4 | 48,0  | 29,6  | 42,3  | 12,50 | 134,9 |
| 1435,71 | 19,9  | 15,6  | 15,6  | 1,68  | 60,4  | 19,0  | 15,6  | 11,8  | 2,38  | 62,2  |
| 1441,50 | 8,2   | 7,7   | 6,3   | 0,00  | 31,6  | 6,4   | 5,8   | 4,6   | 0,00  | 21,3  |
| 1450,70 | 33,5  | 20,6  | 27,8  | 7,71  | 101,5 | 59,4  | 34,7  | 58,0  | 11,98 | 152,2 |
| 1466,79 | 279,1 | 124,2 | 295,5 | 61,31 | 641,0 | 315,0 | 127,8 | 327,5 | 74,95 | 585,6 |
| 1488,62 | 31,1  | 17,0  | 29,6  | 5,29  | 85,7  | 43,1  | 22,3  | 43,3  | 13,79 | 101,5 |
| 1504,88 | 11,5  | 8,7   | 11,8  | 0,00  | 44,3  | 19,9  | 16,7  | 16,0  | 3,05  | 91,5  |
| 1510,41 | 8,7   | 4,7   | 8,2   | 1,63  | 24,0  | 9,9   | 7,0   | 8,3   | 0,41  | 30,9  |
| 1519,99 | 39,5  | 14,4  | 39,6  | 7,47  | 70,4  | 36,8  | 11,0  | 34,1  | 13,17 | 63,8  |
| 1528,28 | 7,2   | 3,5   | 7,7   | 0,76  | 17,0  | 11,8  | 8,4   | 8,9   | 0,53  | 37,6  |
| 1537,93 | 27,2  | 11,2  | 26,4  | 7,28  | 61,5  | 30,1  | 9,4   | 28,7  | 12,99 | 55,2  |
| 1546,64 | 113,2 | 47,7  | 111,6 | 24,53 | 212,0 | 93,2  | 40,9  | 92,4  | 11,69 | 181,3 |
| 1563,80 | 8,2   | 4,8   | 6,9   | 2,02  | 23,3  | 22,0  | 15,2  | 20,6  | 0,58  | 63,0  |
| 1568,50 | 13,1  | 6,9   | 12,9  | 2,23  | 35,5  | 12,1  | 5,7   | 11,1  | 2,06  | 28,4  |
| 1585,14 | 4,8   | 3,9   | 3,5   | 0,43  | 23,7  | 5,4   | 3,8   | 4,4   | 0,35  | 16,2  |
| 1607,81 | 4,6   | 3,2   | 4,8   | 0,00  | 12,6  | 8,3   | 6,1   | 6,9   | 0,00  | 30,4  |
| 1617,79 | 110,2 | 55,4  | 105,8 | 6,49  | 252,4 | 118,0 | 42,0  | 118,0 | 27,91 | 226,2 |
| 1627,92 | 19,9  | 11,1  | 16,5  | 4,60  | 56,9  | 16,3  | 17,1  | 10,7  | 0,81  | 94,5  |
| 1639,46 | 19,2  | 11,9  | 16,8  | 3,34  | 51,9  | 22,2  | 9,7   | 22,4  | 4,69  | 44,2  |
| 1655,76 | 5,4   | 3,5   | 4,2   | 0,00  | 15,7  | 7,7   | 5,3   | 6,7   | 1,84  | 25,3  |
| 1661,06 | 5,1   | 3,0   | 4,8   | 0,63  | 12,8  | 4,9   | 2,5   | 4,7   | 0,98  | 10,8  |
| 1679,00 | 4,8   | 2,5   | 4,8   | 0,73  | 11,2  | 5,2   | 2,8   | 4,7   | 1,39  | 14,5  |
| 1692,31 | 8,3   | 5,7   | 6,7   | 2,41  | 32,5  | 23,6  | 17,9  | 20,2  | 3,94  | 75,4  |
| 1699,77 | 3,8   | 1,7   | 3,6   | 0,45  | 7,4   | 3,9   | 1,6   | 4,1   | 0,75  | 7,8   |
| 1721,32 | 4,0   | 2,3   | 3,6   | 0,42  | 11,5  | 4,9   | 2,9   | 5,0   | 0,53  | 13,5  |
| 1741,40 | 26,0  | 16,1  | 23,2  | 4,50  | 98,7  | 27,6  | 35,5  | 15,1  | 0,86  | 174,8 |
| 1779,38 | 16,0  | 9,5   | 12,8  | 3,43  | 52,0  | 48,2  | 38,2  | 41,4  | 6,89  | 205,6 |
| 1866,53 | 34,0  | 21,1  | 27,6  | 7,19  | 98,3  | 117,2 | 78,2  | 98,6  | 8,71  | 314,2 |
| 1888,55 | 3,9   | 2,4   | 3,2   | 0,10  | 10,7  | 13,3  | 9,6   | 11,3  | 1,74  | 37,5  |
| 1897,69 | 29,1  | 15,9  | 23,8  | 5,41  | 88,4  | 59,1  | 70,0  | 35,4  | 2,26  | 289,9 |
| 1919,73 | 3,8   | 2,2   | 3,5   | 1,07  | 12,2  | 7,1   | 9,9   | 3,9   | 0,00  | 44,4  |
| 1922,95 | 4,8   | 4,2   | 3,6   | 0,77  | 27,3  | 5,6   | 5,9   | 3,4   | 0,28  | 24,3  |
| 1935,75 | 2,8   | 1,4   | 2,6   | 0,52  | 6,7   | 8,6   | 7,4   | 6,7   | 0,23  | 35,9  |
| 1945,40 | 6,5   | 4,8   | 5,5   | 0,21  | 22,8  | 6,2   | 8,9   | 2,6   | 0,00  | 40,9  |
| 1993,75 | 23,2  | 22,7  | 11,3  | 1,30  | 101,2 | 16,6  | 23,0  | 8,2   | 0,00  | 116,8 |
| 2022,79 | 30,1  | 22,8  | 25,3  | 2,52  | 82,7  | 67,4  | 48,8  | 62,2  | 0,91  | 210,8 |
| 2082,79 | 4,9   | 2,6   | 4,3   | 1,08  | 12,9  | 9,1   | 6,9   | 7,3   | 1,04  | 29,2  |
| 2093,22 | 3,0   | 2,1   | 2,7   | 0,19  | 11,0  | 6,1   | 3,4   | 5,5   | 1,85  | 14,3  |
| 2105,96 | 5,9   | 2,3   | 5,4   | 0,91  | 11,1  | 4,8   | 2,0   | 4,6   | 0,30  | 8,2   |
| 2117,02 | 8,2   | 7,8   | 5,1   | 0,07  | 34,1  | 4,0   | 3,0   | 3,1   | 0,00  | 13,2  |
| 2154,32 | 5,1   | 3,0   | 4,2   | 1,52  | 18,0  | 6,4   | 3,8   | 5,8   | 0,20  | 14,8  |
| 2212,57 | 5,9   | 5,9   | 3,7   | 0,99  | 35,9  | 6,3   | 4,9   | 5,2   | 0,23  | 20,2  |

## WYNIKI

|         |      |      |      |       |       |      |      |      |      |       |
|---------|------|------|------|-------|-------|------|------|------|------|-------|
| 2241,00 | 8,0  | 8,2  | 4,2  | 0,92  | 38,0  | 6,1  | 7,9  | 3,6  | 0,00 | 41,1  |
| 2272,73 | 7,0  | 6,4  | 5,5  | 1,28  | 38,7  | 3,4  | 4,3  | 2,1  | 0,00 | 20,8  |
| 2284,04 | 34,1 | 31,2 | 21,0 | 1,91  | 140,8 | 24,6 | 30,8 | 14,6 | 0,16 | 152,9 |
| 2295,07 | 3,9  | 3,2  | 3,2  | 0,37  | 20,9  | 6,1  | 5,1  | 4,8  | 0,65 | 20,3  |
| 2379,65 | 14,4 | 5,6  | 13,7 | 3,53  | 34,9  | 11,6 | 5,1  | 11,1 | 3,05 | 23,7  |
| 2424,47 | 4,9  | 2,5  | 4,7  | 0,90  | 13,6  | 4,2  | 2,4  | 3,5  | 0,75 | 9,5   |
| 2467,98 | 5,7  | 2,8  | 5,2  | 0,10  | 13,4  | 5,5  | 3,1  | 4,8  | 1,63 | 11,8  |
| 2496,01 | 4,3  | 2,4  | 3,5  | 0,36  | 11,3  | 3,8  | 2,5  | 3,0  | 0,21 | 11,8  |
| 2554,89 | 27,2 | 14,4 | 23,5 | 3,57  | 65,2  | 36,4 | 26,3 | 29,4 | 6,73 | 114,3 |
| 2575,25 | 9,1  | 8,7  | 5,8  | 0,47  | 48,2  | 7,3  | 7,6  | 4,9  | 1,29 | 36,7  |
| 2604,21 | 10,7 | 5,3  | 9,5  | 1,83  | 24,8  | 12,9 | 9,7  | 11,4 | 0,68 | 45,9  |
| 2617,79 | 3,5  | 3,2  | 2,0  | 0,00  | 11,5  | 4,8  | 4,1  | 3,7  | 0,23 | 14,5  |
| 2660,94 | 17,9 | 7,7  | 17,4 | 1,88  | 42,3  | 8,9  | 7,3  | 7,8  | 0,00 | 22,2  |
| 2673,92 | 4,9  | 3,0  | 4,3  | 1,46  | 18,7  | 8,6  | 7,1  | 5,9  | 0,06 | 26,2  |
| 2760,12 | 5,1  | 3,1  | 4,5  | 0,70  | 16,5  | 4,9  | 3,4  | 4,6  | 0,38 | 12,3  |
| 2770,12 | 31,8 | 20,0 | 26,8 | 4,19  | 81,7  | 24,6 | 13,6 | 24,0 | 4,96 | 62,7  |
| 2791,08 | 4,4  | 2,9  | 3,9  | 0,00  | 16,7  | 3,9  | 2,0  | 3,2  | 1,47 | 10,5  |
| 2862,94 | 9,2  | 9,1  | 7,6  | 1,74  | 64,6  | 4,8  | 4,1  | 3,4  | 0,10 | 15,7  |
| 2884,38 | 4,6  | 2,6  | 4,4  | 0,52  | 14,9  | 2,7  | 1,5  | 2,2  | 0,79 | 7,3   |
| 2933,15 | 38,6 | 18,0 | 37,5 | 6,51  | 85,6  | 37,9 | 22,3 | 32,2 | 6,00 | 85,8  |
| 2954,96 | 5,0  | 2,6  | 4,4  | 1,13  | 11,5  | 4,5  | 2,8  | 4,2  | 0,37 | 12,3  |
| 2973,30 | 2,4  | 1,4  | 2,2  | 0,14  | 5,8   | 4,8  | 3,3  | 3,5  | 0,74 | 14,3  |
| 3158,65 | 6,3  | 3,1  | 6,0  | 1,48  | 15,3  | 6,2  | 5,9  | 4,5  | 1,60 | 28,3  |
| 3192,44 | 24,5 | 13,8 | 23,1 | 3,95  | 73,0  | 22,4 | 14,1 | 20,4 | 3,54 | 63,0  |
| 3241,40 | 9,7  | 6,1  | 8,1  | 1,74  | 33,2  | 4,2  | 3,3  | 3,2  | 0,00 | 10,6  |
| 3263,42 | 35,5 | 19,3 | 32,3 | 3,29  | 97,3  | 31,5 | 21,2 | 28,8 | 2,70 | 86,8  |
| 3278,87 | 4,7  | 3,6  | 3,6  | 0,00  | 20,5  | 3,8  | 3,3  | 2,7  | 0,53 | 14,9  |
| 3315,82 | 5,5  | 2,3  | 5,9  | 0,48  | 11,1  | 5,0  | 2,1  | 5,1  | 1,33 | 8,9   |
| 3951,91 | 11,1 | 6,1  | 9,8  | 1,86  | 27,5  | 7,7  | 5,9  | 6,7  | 0,76 | 26,3  |
| 3955,32 | 9,8  | 4,3  | 9,3  | 1,02  | 19,4  | 8,0  | 6,7  | 6,4  | 1,76 | 40,2  |
| 3965,49 | 4,1  | 3,5  | 3,1  | 0,04  | 12,7  | 4,1  | 3,9  | 2,3  | 0,33 | 15,6  |
| 4053,59 | 11,7 | 5,6  | 10,8 | 3,28  | 25,0  | 8,2  | 5,6  | 7,4  | 0,41 | 22,4  |
| 4090,64 | 7,2  | 2,6  | 6,9  | 1,64  | 13,2  | 6,4  | 2,7  | 6,0  | 1,18 | 11,5  |
| 4209,73 | 40,3 | 14,4 | 38,8 | 10,73 | 75,1  | 33,7 | 14,2 | 36,6 | 4,73 | 63,5  |
| 4266,81 | 6,4  | 2,5  | 6,2  | 0,78  | 12,9  | 4,8  | 2,6  | 4,6  | 0,00 | 11,4  |
| 4565,77 | 4,1  | 2,3  | 4,1  | 0,60  | 9,9   | 5,1  | 2,3  | 5,0  | 1,08 | 9,6   |
| 4572,93 | 3,7  | 1,7  | 3,5  | 0,76  | 8,2   | 3,6  | 1,7  | 3,3  | 0,41 | 6,3   |
| 4710,12 | 5,1  | 2,5  | 4,8  | 0,99  | 12,1  | 5,8  | 2,7  | 5,3  | 2,15 | 10,8  |
| 5003,75 | 5,2  | 2,0  | 5,2  | 0,93  | 10,9  | 4,5  | 3,7  | 3,5  | 0,39 | 18,4  |
| 5063,79 | 3,7  | 1,6  | 3,5  | 0,45  | 9,7   | 5,0  | 2,6  | 5,1  | 0,63 | 11,7  |
| 5336,31 | 6,2  | 3,2  | 5,4  | 1,47  | 16,1  | 8,1  | 5,3  | 6,5  | 1,47 | 25,3  |
| 5903,95 | 10,4 | 6,0  | 9,3  | 1,57  | 26,8  | 6,3  | 5,8  | 3,9  | 0,46 | 25,5  |
| 6432,17 | 11,8 | 6,0  | 10,0 | 4,43  | 29,8  | 9,7  | 4,1  | 9,6  | 1,34 | 19,8  |
| 6630,33 | 20,9 | 8,3  | 20,1 | 9,43  | 40,5  | 18,5 | 7,2  | 19,0 | 1,83 | 34,3  |
| 7156,22 | 16,0 | 19,5 | 9,2  | 0,46  | 76,4  | 14,2 | 17,2 | 7,8  | 0,67 | 70,1  |
| 7171,79 | 8,4  | 9,7  | 4,0  | 0,30  | 37,6  | 3,2  | 2,8  | 2,4  | 0,00 | 11,3  |

WYNIKI

|         |      |     |     |      |      |      |     |      |      |      |
|---------|------|-----|-----|------|------|------|-----|------|------|------|
| 7765,35 | 10,6 | 4,8 | 9,5 | 2,03 | 28,4 | 8,2  | 4,7 | 8,0  | 1,31 | 22,8 |
| 8916,69 | 2,9  | 2,2 | 2,2 | 0,00 | 12,4 | 4,5  | 2,1 | 4,5  | 0,56 | 10,6 |
| 9133,29 | 9,6  | 5,2 | 9,7 | 1,58 | 23,8 | 12,8 | 6,2 | 13,0 | 1,56 | 25,3 |
| 9149,58 | 6,1  | 2,8 | 5,8 | 0,44 | 14,2 | 6,3  | 2,8 | 6,5  | 0,27 | 11,4 |
| 9423,44 | 9,0  | 4,7 | 8,7 | 1,73 | 20,8 | 10,8 | 5,4 | 11,2 | 0,66 | 22,3 |

Tabela 18. Intensywności peptydów w moczu pacjentów z grupy badanej i kontrolnej otrzymane z wykorzystaniem metody MALDI-TOF-MS.

(ciąg dalszy Tabeli 18 na kolejnych stronach)

| Peptyd<br>(m/z) | Grupa badana (n = 49) |      |      |      |       | Grupa kontrolna (n = 40) |      |      |       |       |
|-----------------|-----------------------|------|------|------|-------|--------------------------|------|------|-------|-------|
|                 | Śr.                   | SD   | Med. | Min. | Maks. | Śr.                      | SD   | Med. | Min.  | Maks. |
| 1014,58         | 6,1                   | 3,5  | 5,9  | 0,67 | 16,6  | 8,0                      | 3,0  | 7,3  | 2,60  | 15,5  |
| 1051,81         | 2,6                   | 1,8  | 2,2  | 0,05 | 10,0  | 4,2                      | 2,2  | 3,6  | 0,69  | 9,4   |
| 1060,20         | 4,3                   | 2,4  | 3,6  | 0,63 | 10,1  | 4,8                      | 1,5  | 5,0  | 1,88  | 8,4   |
| 1085,91         | 4,6                   | 2,6  | 4,2  | 0,08 | 14,0  | 6,3                      | 1,8  | 6,5  | 1,51  | 10,4  |
| 1097,80         | 3,0                   | 2,2  | 2,5  | 0,00 | 9,4   | 3,8                      | 2,2  | 3,7  | 0,41  | 9,6   |
| 1126,69         | 8,3                   | 6,4  | 6,2  | 0,72 | 33,3  | 11,6                     | 6,2  | 11,0 | 2,46  | 30,8  |
| 1149,16         | 5,9                   | 5,6  | 4,4  | 0,35 | 26,7  | 4,5                      | 3,7  | 3,5  | 0,00  | 18,4  |
| 1162,32         | 8,9                   | 5,9  | 7,6  | 1,92 | 26,8  | 13,3                     | 6,1  | 12,5 | 4,05  | 36,3  |
| 1181,96         | 5,6                   | 3,5  | 5,0  | 0,93 | 15,6  | 8,5                      | 3,9  | 7,4  | 3,06  | 20,9  |
| 1205,06         | 3,0                   | 2,9  | 1,8  | 0,16 | 13,4  | 4,0                      | 2,6  | 3,7  | 0,24  | 13,2  |
| 1219,23         | 53,7                  | 33,4 | 48,4 | 4,06 | 135,1 | 80,4                     | 32,6 | 77,8 | 30,78 | 163,7 |
| 1234,11         | 4,2                   | 3,1  | 3,6  | 0,84 | 15,9  | 6,6                      | 2,7  | 5,9  | 3,56  | 15,1  |
| 1237,03         | 6,7                   | 5,4  | 5,6  | 1,06 | 31,1  | 14,5                     | 6,7  | 13,0 | 5,68  | 31,0  |
| 1241,20         | 4,0                   | 2,7  | 3,4  | 0,50 | 13,2  | 6,8                      | 4,5  | 6,1  | 1,71  | 23,3  |
| 1252,21         | 16,4                  | 12,5 | 13,0 | 0,58 | 53,8  | 33,9                     | 15,7 | 28,9 | 11,61 | 91,2  |
| 1258,49         | 3,6                   | 2,1  | 3,0  | 0,99 | 10,6  | 5,2                      | 1,7  | 5,1  | 1,68  | 11,0  |
| 1270,22         | 3,4                   | 2,9  | 2,5  | 0,09 | 13,9  | 8,2                      | 6,0  | 6,4  | 2,17  | 32,6  |
| 1290,60         | 3,0                   | 1,8  | 2,6  | 0,25 | 10,3  | 4,6                      | 2,0  | 4,5  | 1,22  | 9,3   |
| 1323,30         | 6,4                   | 5,1  | 5,3  | 0,69 | 24,8  | 14,1                     | 7,7  | 12,3 | 3,86  | 33,6  |
| 1369,32         | 4,0                   | 2,5  | 3,0  | 0,18 | 12,4  | 6,2                      | 2,5  | 5,7  | 2,00  | 12,9  |
| 1380,27         | 3,4                   | 2,1  | 3,0  | 0,48 | 9,2   | 6,5                      | 2,6  | 6,0  | 2,87  | 13,7  |
| 1410,00         | 2,9                   | 1,8  | 2,7  | 0,22 | 7,5   | 5,0                      | 1,8  | 4,7  | 1,95  | 9,2   |
| 1426,17         | 5,7                   | 3,9  | 4,8  | 1,11 | 19,2  | 10,8                     | 5,0  | 9,3  | 3,42  | 23,8  |
| 1448,04         | 2,9                   | 2,0  | 2,5  | 0,35 | 10,5  | 6,2                      | 2,8  | 5,7  | 1,96  | 15,6  |
| 1509,30         | 3,5                   | 2,3  | 2,9  | 0,10 | 9,1   | 6,0                      | 2,2  | 5,9  | 0,66  | 11,8  |
| 1525,17         | 7,3                   | 5,0  | 6,0  | 0,33 | 24,1  | 10,7                     | 3,2  | 10,9 | 3,42  | 20,1  |
| 1534,86         | 6,6                   | 2,7  | 6,4  | 2,44 | 13,7  | 7,1                      | 3,0  | 7,3  | 1,87  | 16,4  |
| 1578,17         | 3,0                   | 1,7  | 3,0  | 0,38 | 9,2   | 4,7                      | 1,7  | 4,6  | 2,02  | 11,5  |
| 1598,48         | 3,5                   | 1,8  | 3,2  | 1,09 | 9,2   | 4,0                      | 1,3  | 4,1  | 0,97  | 7,3   |
| 1625,73         | 4,6                   | 4,1  | 3,4  | 0,00 | 21,0  | 10,0                     | 4,9  | 8,6  | 4,72  | 29,0  |
| 1635,80         | 2,6                   | 1,6  | 2,4  | 0,00 | 6,1   | 4,4                      | 1,5  | 4,4  | 1,57  | 8,1   |
| 1642,73         | 5,8                   | 4,6  | 5,1  | 0,07 | 23,0  | 10,7                     | 5,2  | 9,7  | 2,68  | 26,7  |
| 1652,72         | 2,7                   | 2,1  | 2,2  | 0,13 | 11,1  | 5,1                      | 1,9  | 4,9  | 1,07  | 9,1   |
| 1682,14         | 17,1                  | 22,9 | 9,8  | 0,42 | 137,3 | 14,2                     | 14,2 | 8,9  | 0,71  | 60,0  |
| 1735,51         | 3,5                   | 2,6  | 2,6  | 0,03 | 11,1  | 6,2                      | 2,8  | 5,6  | 2,29  | 13,6  |
| 1739,80         | 5,0                   | 5,1  | 3,3  | 0,12 | 30,3  | 11,0                     | 5,8  | 8,8  | 4,36  | 37,0  |
| 1769,05         | 13,2                  | 17,0 | 7,9  | 1,34 | 102,8 | 8,4                      | 7,7  | 6,2  | 0,66  | 39,4  |
| 1793,20         | 4,0                   | 2,1  | 3,7  | 0,28 | 9,3   | 8,8                      | 2,7  | 8,6  | 4,23  | 17,5  |
| 1796,80         | 4,4                   | 3,1  | 3,6  | 0,42 | 18,4  | 8,5                      | 3,2  | 7,9  | 4,24  | 21,0  |

## WYNIKI

|         |      |      |      |      |       |      |      |      |       |       |
|---------|------|------|------|------|-------|------|------|------|-------|-------|
| 1879,44 | 5,0  | 4,3  | 4,1  | 0,43 | 24,4  | 9,4  | 3,4  | 8,7  | 3,48  | 21,1  |
| 1884,76 | 4,7  | 3,5  | 3,8  | 0,13 | 16,2  | 8,3  | 3,7  | 7,8  | 2,70  | 20,3  |
| 1895,20 | 5,4  | 5,8  | 3,9  | 0,22 | 35,9  | 5,7  | 1,8  | 5,7  | 2,68  | 12,6  |
| 1913,36 | 49,7 | 42,9 | 38,0 | 0,31 | 194,0 | 22,8 | 20,9 | 17,2 | 0,04  | 105,8 |
| 1936,23 | 4,6  | 3,6  | 3,3  | 0,61 | 20,6  | 8,0  | 3,0  | 7,7  | 3,74  | 19,7  |
| 1951,36 | 3,6  | 2,3  | 3,1  | 0,56 | 10,5  | 6,1  | 2,3  | 6,0  | 2,57  | 14,0  |
| 1979,74 | 5,0  | 3,1  | 4,8  | 0,48 | 16,6  | 5,8  | 2,0  | 5,5  | 2,21  | 11,1  |
| 1994,36 | 5,7  | 2,9  | 5,0  | 0,47 | 14,2  | 9,9  | 3,2  | 9,5  | 5,32  | 18,3  |
| 2010,46 | 6,9  | 4,6  | 6,3  | 1,12 | 19,4  | 13,7 | 4,2  | 12,9 | 7,12  | 25,3  |
| 2017,35 | 3,4  | 2,8  | 2,1  | 0,03 | 12,8  | 6,7  | 3,2  | 6,3  | 1,97  | 19,2  |
| 2027,01 | 2,8  | 2,0  | 2,0  | 0,00 | 10,3  | 3,8  | 1,6  | 3,6  | 0,39  | 8,0   |
| 2032,96 | 3,4  | 2,6  | 2,6  | 0,03 | 14,1  | 6,0  | 2,4  | 5,9  | 2,63  | 14,5  |
| 2050,43 | 27,8 | 23,5 | 23,1 | 2,35 | 128,3 | 54,8 | 15,2 | 54,2 | 26,34 | 108,3 |
| 2066,30 | 12,7 | 11,8 | 9,3  | 0,20 | 55,5  | 25,2 | 7,1  | 24,3 | 10,26 | 43,7  |
| 2081,71 | 11,3 | 10,2 | 8,3  | 1,51 | 42,6  | 24,9 | 9,1  | 23,7 | 7,21  | 57,3  |
| 2088,21 | 5,3  | 4,3  | 4,2  | 0,55 | 21,0  | 9,8  | 3,6  | 8,8  | 3,97  | 20,0  |
| 2140,12 | 3,9  | 3,7  | 2,7  | 0,40 | 14,8  | 8,8  | 3,9  | 8,7  | 2,34  | 20,5  |
| 2171,56 | 2,9  | 3,1  | 1,9  | 0,00 | 18,5  | 5,4  | 2,4  | 4,9  | 1,13  | 10,7  |
| 2177,35 | 4,4  | 2,9  | 3,7  | 0,54 | 16,5  | 7,2  | 1,9  | 6,8  | 3,45  | 11,9  |
| 2195,46 | 7,7  | 4,3  | 6,9  | 0,47 | 22,9  | 8,6  | 3,0  | 8,6  | 3,13  | 18,3  |
| 2207,36 | 3,8  | 3,1  | 2,8  | 0,45 | 14,0  | 6,6  | 2,7  | 6,0  | 1,83  | 14,6  |
| 2212,55 | 3,7  | 3,4  | 2,1  | 0,02 | 15,2  | 8,3  | 4,8  | 7,9  | 1,72  | 24,5  |
| 2235,57 | 8,4  | 5,7  | 7,5  | 0,91 | 34,0  | 15,5 | 3,7  | 15,0 | 8,52  | 23,3  |
| 2251,64 | 41,4 | 32,7 | 34,1 | 0,34 | 136,2 | 88,5 | 24,8 | 89,2 | 40,31 | 156,1 |
| 2268,12 | 18,0 | 15,7 | 15,2 | 0,50 | 66,9  | 38,6 | 13,3 | 35,7 | 16,50 | 74,6  |
| 2284,06 | 7,4  | 4,3  | 6,2  | 1,31 | 16,2  | 13,4 | 6,1  | 12,4 | 2,98  | 26,6  |
| 2308,25 | 3,7  | 1,9  | 3,5  | 0,56 | 8,4   | 4,5  | 1,9  | 4,7  | 0,03  | 8,2   |
| 2316,33 | 2,9  | 2,4  | 2,3  | 0,13 | 14,1  | 5,5  | 2,0  | 5,1  | 2,25  | 10,9  |
| 2324,07 | 4,2  | 1,7  | 4,2  | 1,16 | 8,4   | 5,6  | 1,6  | 5,7  | 1,89  | 9,5   |
| 2364,03 | 2,8  | 1,8  | 2,4  | 0,06 | 9,0   | 3,9  | 1,6  | 4,1  | 1,10  | 6,7   |
| 2379,65 | 8,1  | 5,1  | 7,1  | 2,12 | 28,2  | 10,5 | 3,4  | 10,2 | 5,38  | 18,8  |
| 2387,18 | 3,4  | 1,4  | 3,4  | 0,31 | 6,6   | 5,6  | 2,2  | 5,4  | 2,33  | 11,3  |
| 2415,30 | 3,6  | 2,1  | 3,2  | 0,00 | 11,2  | 5,6  | 1,9  | 5,6  | 2,21  | 10,1  |
| 2438,45 | 5,2  | 3,7  | 4,5  | 1,27 | 21,7  | 4,0  | 2,1  | 3,4  | 0,56  | 9,6   |
| 2444,56 | 4,6  | 2,0  | 4,6  | 0,31 | 9,5   | 9,1  | 2,9  | 8,3  | 4,47  | 16,1  |
| 2485,46 | 4,0  | 2,2  | 4,2  | 0,32 | 8,7   | 5,4  | 1,6  | 5,5  | 2,08  | 8,1   |
| 2509,48 | 2,3  | 1,8  | 1,7  | 0,00 | 7,1   | 4,1  | 1,4  | 3,8  | 2,05  | 8,0   |
| 2527,94 | 4,5  | 2,2  | 4,1  | 0,59 | 9,1   | 5,5  | 3,2  | 5,0  | 0,00  | 12,1  |
| 2550,12 | 2,7  | 1,9  | 2,5  | 0,00 | 9,2   | 4,0  | 1,9  | 3,9  | 0,63  | 10,2  |
| 2566,68 | 20,2 | 16,3 | 14,9 | 2,44 | 71,4  | 33,4 | 13,0 | 32,4 | 12,67 | 66,2  |
| 2582,97 | 6,4  | 5,6  | 4,7  | 0,06 | 22,4  | 11,6 | 4,5  | 10,4 | 4,64  | 24,1  |
| 2602,20 | 3,6  | 1,8  | 3,2  | 0,36 | 8,1   | 3,7  | 1,3  | 3,4  | 1,39  | 7,0   |
| 2611,86 | 3,5  | 1,8  | 3,4  | 0,55 | 11,4  | 4,5  | 2,1  | 4,4  | 1,41  | 12,2  |
| 2628,49 | 5,9  | 3,1  | 5,6  | 1,59 | 19,3  | 8,3  | 2,5  | 8,0  | 3,57  | 13,7  |
| 2645,25 | 7,0  | 4,0  | 5,9  | 0,71 | 16,5  | 9,3  | 2,8  | 9,7  | 4,13  | 15,8  |
| 2649,43 | 5,1  | 2,1  | 5,2  | 0,46 | 10,3  | 6,3  | 1,7  | 6,3  | 3,15  | 11,1  |

## WYNIKI

|         |      |      |      |      |      |      |     |      |       |      |
|---------|------|------|------|------|------|------|-----|------|-------|------|
| 2661,16 | 5,0  | 6,8  | 2,8  | 0,00 | 32,9 | 6,9  | 4,8 | 6,7  | 0,00  | 17,1 |
| 2665,86 | 10,1 | 5,3  | 9,4  | 0,91 | 26,1 | 13,0 | 5,2 | 13,0 | 6,35  | 33,1 |
| 2682,09 | 19,0 | 10,5 | 17,0 | 0,26 | 63,5 | 24,1 | 8,8 | 23,2 | 13,50 | 61,5 |
| 2698,05 | 23,9 | 14,6 | 21,8 | 0,00 | 88,2 | 29,9 | 8,8 | 27,6 | 16,35 | 59,0 |
| 2727,97 | 5,8  | 3,5  | 5,1  | 0,90 | 20,1 | 4,5  | 1,9 | 4,5  | 1,13  | 9,5  |
| 2743,92 | 4,3  | 3,2  | 4,4  | 0,08 | 12,5 | 8,2  | 2,2 | 7,5  | 5,26  | 12,2 |
| 2770,02 | 3,7  | 2,2  | 3,5  | 0,00 | 9,5  | 4,1  | 1,7 | 3,6  | 1,32  | 8,7  |
| 2802,01 | 9,8  | 4,1  | 9,3  | 1,32 | 19,5 | 6,6  | 3,1 | 6,6  | 2,49  | 15,4 |
| 2827,54 | 9,7  | 8,6  | 7,1  | 0,34 | 40,6 | 17,9 | 5,0 | 17,9 | 6,75  | 27,8 |
| 2841,70 | 6,7  | 3,5  | 6,0  | 0,70 | 16,7 | 8,8  | 2,5 | 9,0  | 3,82  | 13,0 |
| 2928,20 | 3,4  | 2,4  | 3,1  | 0,02 | 13,6 | 6,2  | 1,8 | 6,0  | 3,05  | 11,6 |
| 2944,81 | 8,3  | 7,3  | 6,1  | 0,21 | 35,4 | 16,6 | 4,7 | 16,6 | 5,07  | 28,8 |
| 3002,08 | 7,1  | 5,5  | 6,2  | 0,00 | 30,5 | 8,7  | 2,5 | 8,2  | 4,91  | 14,9 |
| 3015,41 | 14,8 | 9,0  | 13,8 | 1,63 | 41,6 | 24,5 | 7,2 | 22,9 | 11,26 | 39,8 |
| 3025,44 | 8,4  | 4,2  | 8,1  | 0,98 | 19,3 | 11,5 | 3,4 | 12,1 | 3,67  | 18,1 |
| 3044,14 | 11,6 | 6,1  | 10,6 | 1,84 | 38,8 | 16,0 | 5,9 | 15,1 | 8,32  | 40,0 |
| 3061,12 | 6,7  | 3,1  | 6,7  | 1,21 | 15,0 | 8,1  | 2,3 | 8,1  | 3,42  | 13,4 |
| 3066,10 | 5,1  | 2,2  | 5,2  | 0,61 | 10,5 | 5,6  | 1,8 | 5,6  | 2,67  | 10,0 |
| 3095,17 | 3,6  | 1,4  | 3,9  | 0,08 | 7,9  | 3,7  | 1,3 | 3,5  | 0,96  | 6,6  |
| 3124,05 | 4,4  | 1,9  | 4,9  | 1,10 | 10,3 | 4,9  | 2,4 | 4,5  | 0,63  | 12,1 |
| 3139,27 | 5,1  | 2,1  | 4,7  | 0,39 | 9,7  | 5,8  | 2,1 | 5,4  | 1,83  | 10,7 |
| 3140,45 | 5,3  | 2,1  | 5,2  | 0,87 | 10,9 | 5,6  | 2,0 | 5,5  | 1,54  | 9,2  |
| 3155,10 | 5,9  | 3,4  | 5,1  | 0,59 | 17,1 | 6,2  | 2,4 | 5,9  | 1,77  | 12,1 |
| 3170,98 | 5,7  | 4,0  | 5,4  | 0,20 | 27,3 | 6,2  | 1,9 | 6,1  | 2,05  | 11,3 |
| 3195,72 | 3,9  | 3,1  | 3,3  | 0,12 | 17,6 | 7,2  | 3,2 | 6,1  | 2,86  | 18,3 |
| 3212,04 | 15,6 | 11,6 | 13,2 | 1,03 | 61,2 | 23,8 | 6,4 | 22,7 | 12,75 | 42,1 |
| 3251,82 | 6,5  | 3,0  | 6,7  | 0,00 | 12,4 | 5,9  | 2,7 | 6,0  | 0,74  | 13,3 |
| 3261,51 | 5,8  | 5,8  | 4,0  | 0,00 | 26,8 | 10,6 | 3,7 | 9,6  | 2,92  | 20,6 |
| 3268,49 | 16,1 | 8,8  | 14,8 | 1,04 | 41,7 | 21,7 | 5,7 | 21,7 | 10,49 | 39,6 |
| 3283,85 | 15,6 | 7,0  | 15,4 | 3,68 | 35,5 | 15,2 | 3,9 | 15,0 | 7,70  | 25,1 |
| 3289,68 | 8,1  | 3,9  | 7,8  | 1,63 | 18,4 | 8,2  | 2,6 | 7,8  | 1,33  | 14,3 |
| 3340,10 | 5,1  | 3,2  | 4,6  | 0,44 | 14,4 | 8,0  | 2,6 | 7,8  | 3,18  | 13,3 |
| 3359,53 | 5,1  | 3,5  | 4,8  | 0,35 | 18,3 | 5,3  | 2,0 | 5,0  | 1,99  | 9,6  |
| 3388,46 | 11,6 | 4,3  | 11,5 | 2,47 | 20,6 | 8,9  | 3,9 | 8,7  | 1,61  | 16,2 |
| 3406,65 | 9,6  | 3,9  | 9,6  | 1,45 | 18,6 | 7,4  | 3,4 | 7,0  | 1,56  | 16,7 |
| 3408,12 | 9,6  | 4,0  | 9,8  | 0,81 | 19,1 | 8,0  | 3,7 | 6,9  | 2,51  | 19,7 |
| 3424,92 | 5,4  | 2,4  | 5,1  | 0,94 | 11,9 | 5,1  | 2,3 | 4,9  | 1,18  | 12,3 |
| 3425,93 | 5,4  | 2,3  | 5,2  | 0,54 | 11,3 | 5,0  | 2,3 | 4,8  | 1,53  | 12,0 |
| 3443,86 | 9,8  | 13,2 | 7,3  | 0,34 | 78,7 | 10,2 | 3,4 | 10,2 | 3,10  | 18,7 |
| 3459,98 | 16,8 | 10,1 | 15,8 | 0,02 | 45,3 | 23,1 | 6,5 | 23,4 | 9,20  | 37,6 |
| 3475,63 | 3,2  | 2,4  | 3,0  | 0,00 | 9,1  | 3,9  | 1,5 | 3,9  | 1,64  | 7,3  |
| 3534,28 | 3,8  | 1,9  | 3,8  | 0,80 | 7,7  | 3,1  | 1,3 | 3,1  | 0,43  | 6,1  |
| 3635,90 | 6,2  | 3,3  | 5,8  | 0,70 | 22,0 | 4,2  | 1,3 | 4,2  | 1,39  | 6,8  |
| 3722,29 | 8,3  | 3,7  | 8,1  | 0,03 | 21,1 | 7,3  | 2,3 | 7,6  | 3,47  | 12,9 |
| 3738,53 | 7,6  | 3,7  | 7,4  | 0,67 | 19,2 | 7,9  | 2,4 | 7,6  | 3,52  | 12,7 |
| 3989,94 | 7,4  | 4,4  | 6,4  | 1,39 | 19,9 | 3,0  | 1,9 | 2,6  | 0,08  | 8,1  |



## WYNIKI

|         |      |      |      |      |      |      |     |      |      |      |
|---------|------|------|------|------|------|------|-----|------|------|------|
| 4008,67 | 6,2  | 2,7  | 6,0  | 1,48 | 14,5 | 7,6  | 3,0 | 7,1  | 2,12 | 16,9 |
| 4025,05 | 4,9  | 2,3  | 4,8  | 0,06 | 12,2 | 5,8  | 1,9 | 5,8  | 2,03 | 11,1 |
| 4046,90 | 4,4  | 2,5  | 4,0  | 0,69 | 11,2 | 2,1  | 1,1 | 2,0  | 0,17 | 6,0  |
| 4065,72 | 3,5  | 2,5  | 2,7  | 0,24 | 13,8 | 3,9  | 1,9 | 3,5  | 1,18 | 8,4  |
| 4101,14 | 12,2 | 6,4  | 10,3 | 1,34 | 31,4 | 12,8 | 4,7 | 12,8 | 4,53 | 22,9 |
| 4116,98 | 6,1  | 3,7  | 5,3  | 1,14 | 20,9 | 5,9  | 2,3 | 5,7  | 1,22 | 11,3 |
| 4173,37 | 5,8  | 2,8  | 5,3  | 0,47 | 12,3 | 4,0  | 1,9 | 3,7  | 0,14 | 8,4  |
| 4293,23 | 14,0 | 6,5  | 12,9 | 1,68 | 34,2 | 16,0 | 6,2 | 14,4 | 3,99 | 29,5 |
| 4309,18 | 13,4 | 6,0  | 13,0 | 1,75 | 30,5 | 13,3 | 4,7 | 13,1 | 3,06 | 22,8 |
| 4470,76 | 3,8  | 1,8  | 3,8  | 0,34 | 9,6  | 4,1  | 1,7 | 4,0  | 1,00 | 7,7  |
| 4633,18 | 4,0  | 1,7  | 3,9  | 1,00 | 8,6  | 4,2  | 1,5 | 4,3  | 0,44 | 7,3  |
| 4803,87 | 8,0  | 5,8  | 7,1  | 0,37 | 34,1 | 3,5  | 2,1 | 3,0  | 0,72 | 9,1  |
| 4866,58 | 3,7  | 1,7  | 3,6  | 0,14 | 6,8  | 3,6  | 1,3 | 3,8  | 1,01 | 6,3  |
| 5004,07 | 5,5  | 3,7  | 4,7  | 0,24 | 17,4 | 2,5  | 1,4 | 2,1  | 0,35 | 6,5  |
| 5215,86 | 3,6  | 1,4  | 3,3  | 1,72 | 8,7  | 3,2  | 1,3 | 2,8  | 1,48 | 6,3  |
| 6134,03 | 3,5  | 1,5  | 3,2  | 1,00 | 7,3  | 3,3  | 1,5 | 2,9  | 1,11 | 7,1  |
| 6174,85 | 18,3 | 11,7 | 16,9 | 0,90 | 55,5 | 8,7  | 6,7 | 6,0  | 0,47 | 25,2 |
| 6190,60 | 12,3 | 7,6  | 11,3 | 1,24 | 41,2 | 6,7  | 4,6 | 5,3  | 0,51 | 16,8 |

Tabela 19. Dokładność metody separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej oznaczania białek. Zakresy referencyjne dla roztworów kontrolnych o wysokim i niskim stężeniu oraz stężenia oznaczone [pg/ml].

| Białko       | Roztwór kontrolny o wysokim stężeniu |           | Roztwór kontrolny o niskim stężeniu |           |
|--------------|--------------------------------------|-----------|-------------------------------------|-----------|
|              | Zakres referencyjny                  | Oznaczone | Zakres referencyjny                 | Oznaczone |
| sEGFR        | 10244 - 23903                        | 18490,9   | 482 - 1125                          | 1085,8    |
| FGF-basic    | 871 - 2033                           | 1300,2    | 98 - 230                            | 172,7     |
| folistatyna  | 4242 - 9897                          | 4494,6    | 273 - 636                           | 290,7     |
| G-CSF        | 2526 - 5895                          | 2558,3    | 205 - 479                           | 280,4     |
| sHER2/neu    | 3492 - 8149                          | 6682,1    | 214 - 498                           | 428,1     |
| HGF          | 4181 - 9756                          | 4830,3    | 306 - 714                           | 391,3     |
| sIL-6Ra      | 825 - 1925                           | 1383,3    | 48 - 111                            | 97,7      |
| leptyna      | 4740 - 11059                         | 5914,6    | 269 - 627                           | 616,3     |
| osteopontyna | 11440 - 26694                        | 14832,9   | 655 - 1528                          | 943,6     |
| PDGF-AB/BB   | 2506 - 5848                          | 2852,2    | 178 - 415                           | 244,3     |
| PECAM-1      | 12219 - 28512                        | 26125,1   | 910 - 2124                          | 1984,6    |
| prolaktyna   | 27274 - 63640                        | 36677,7   | 930 - 2170                          | 1960,5    |
| SCF          | 4054 - 9460                          | 5014,4    | 139 - 324                           | 223,7     |
| sTIE-2       | 32718 - 76342                        | 41039,6   | 895 - 2089                          | 1462,3    |
| sVEGFR-1     | 2380 - 5554                          | 3509,8    | 173 - 403                           | 304,7     |
| sVEGFR-2     | 19573 - 45671                        | 36112,0   | 1068 - 2493                         | 2292,0    |

Tabela 20. Oznaczone stężenia białek [pg/ml] w surowicy pacjentów z grupy badanej (n = 49) z wykorzystaniem separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej. LLOQ – dolna granica oznaczalności, ULOQ – górna granica oznaczalności.

| Białko       | Średnia | SD      | Mediana | Min.    | Maks.    | LLOQ | ULOQ     |
|--------------|---------|---------|---------|---------|----------|------|----------|
| sEGFR        | 24863,9 | 4848,1  | 24856,9 | 9699,6  | 37427,6  | 44,8 | 212605,8 |
| FGF-basic    | 266,1   | 27,5    | 265,8   | 206,9   | 336,6    | 4,6  | 4737,4   |
| folistatyna  | 463,0   | 145,6   | 429,6   | 215,9   | 1051,9   | 1,8  | 27427,0  |
| G-CSF        | 128,5   | 19,4    | 123,4   | 82,0    | 177,4    | 1,1  | 15007,4  |
| sHER2/neu    | 5189,7  | 1314,0  | 4962,5  | 3198,3  | 10858,2  | 1,7  | 26896,8  |
| HGF          | 1709,0  | 548,1   | 1566,0  | 1182,8  | 5002,3   | 2,0  | 28957,0  |
| sIL-6Ra      | 11031,4 | 2058,1  | 10798,0 | 7077,2  | 16250,8  | 0,8  | 12174,4  |
| leptyna      | 7505,7  | 5250,7  | 6582,2  | 1249,7  | 24569,4  | 5,2  | 90151,1  |
| osteopontyna | 39644,6 | 15190,5 | 38656,2 | 15981,8 | 111453,7 | 61,1 | 183293,5 |
| PDGF-AB/BB   | 3643,2  | 1404,5  | 3501,9  | 991,5   | 7342,0   | 1,8  | 22593,6  |
| PECAM-1      | 5177,7  | 1285,3  | 4870,1  | 2964,5  | 8496,6   | 26,8 | 130878,7 |
| prolaktyna   | 9361,4  | 5662,1  | 7725,8  | 3904,9  | 34548,9  | 12,3 | 193021,4 |
| SCF          | 287,0   | 54,1    | 283,7   | 139,5   | 477,2    | 2,1  | 32694,5  |
| sTIE-2       | 9873,3  | 2445,4  | 9902,3  | 5300,9  | 16616,3  | 13,4 | 200214,3 |
| sVEGFR-1     | 241,6   | 75,7    | 239,3   | 125,6   | 422,3    | 2,1  | 28698,3  |
| sVEGFR-2     | 4832,8  | 1199,5  | 4858,1  | 2397,5  | 7840,9   | 12,8 | 198711,3 |

Tabela 21. Oznaczone stężenia białek [pg/ml] w surowicy pacjentów z grupy kontrolnej (n = 40) z wykorzystaniem separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej. LLOQ – dolna granica oznaczalności, ULOQ – górna granica oznaczalności.

| Białko       | Średnia | SD     | Mediana | Min.    | Maks.   | LLOQ | ULOQ     |
|--------------|---------|--------|---------|---------|---------|------|----------|
| sEGFR        | 22100,5 | 6359,3 | 22521,2 | 8945,1  | 35926,3 | 44,8 | 212605,8 |
| FGF-basic    | 242,1   | 32,4   | 242,7   | 145,2   | 311,5   | 4,6  | 4737,4   |
| folistatyna  | 424,6   | 156,8  | 399,9   | 165,3   | 941,0   | 1,8  | 27427,0  |
| G-CSF        | 111,4   | 23,8   | 110,0   | 47,6    | 172,3   | 1,1  | 15007,4  |
| sHER2/neu    | 5145,5  | 1470,4 | 5011,6  | 2583,6  | 9123,9  | 1,7  | 26896,8  |
| HGF          | 1359,2  | 291,6  | 1348,6  | 608,6   | 2298,4  | 2,0  | 28957,0  |
| sIL-6Ra      | 10575,5 | 3480,9 | 9667,2  | 2693,7  | 19780,1 | 0,8  | 12174,4  |
| leptyna      | 5639,7  | 3746,2 | 4568,3  | 731,2   | 15835,8 | 5,2  | 90151,1  |
| osteopontyna | 28687,3 | 8476,5 | 27730,2 | 11904,1 | 50100,3 | 61,1 | 183293,5 |
| PDGF-AB/BB   | 2552,6  | 1403,5 | 2214,1  | 270,3   | 6125,1  | 1,8  | 22593,6  |
| PECAM-1      | 4545,3  | 1414,5 | 4403,0  | 2008,1  | 8028,1  | 26,8 | 130878,7 |
| prolaktyna   | 8462,0  | 4109,2 | 7852,8  | 2646,9  | 19438,7 | 12,3 | 193021,4 |
| SCF          | 258,5   | 53,6   | 252,5   | 108,9   | 405,5   | 2,1  | 32694,5  |
| sTIE-2       | 9204,9  | 3106,7 | 9043,7  | 3110,3  | 16696,4 | 13,4 | 200214,3 |
| sVEGFR-1     | 167,3   | 61,1   | 156,9   | 23,3    | 302,1   | 2,1  | 28698,3  |
| sVEGFR-2     | 4417,7  | 1552,2 | 4064,1  | 1992,0  | 9055,8  | 12,8 | 198711,3 |

Tabela 22. Porównanie średnich stężeń aminokwasów w dwóch grupach w surowicy i moczu oznaczonych z wykorzystaniem metody LC-MS/MS.

(ciąg dalszy Tabeli 22 na kolejnej stronie)

| Aminokwas | Surowica              |                          |           | Mocz                                       |                          |           |
|-----------|-----------------------|--------------------------|-----------|--|--------------------------|-----------|
|           | Stężenie [μM]         |                          | Wartość p | Stężenie [10 μM aminokwasu / M kreatyniny] |                          | Wartość p |
|           | Grupa badana (n = 49) | Grupa kontrolna (n = 40) |           | Grupa badana (n = 49)                      | Grupa kontrolna (n = 40) |           |
| PEtN      | -                     | -                        | -         | 113,5                                      | 308,3                    | < 0,001   |
| Tau       | 115,1                 | 105,6                    | 0,073     | 6605,8                                     | 6227,6                   | 0,032     |
| Asn       | 39,0                  | 44,3                     | 0,001     | 637,7                                      | 1018,5                   | < 0,001   |
| Ser       | 126,4                 | 121,7                    | 0,396     | 2843,2                                     | 3527,1                   | 0,018     |
| Gly       | 227,7                 | 234,5                    | 0,600     | 8527,7                                     | 10731,4                  | 0,148     |
| Hyp       | 13,3                  | 12,3                     | 0,433     | 31,2                                       | 43,8                     | 0,243     |
| EtN       | 7,6                   | 9,8                      | < 0,001   | 2440,2                                     | 4103,6                   | < 0,001   |
| Gln       | 407,8                 | 496,3                    | < 0,001   | 2781,4                                     | 4238,6                   | < 0,001   |
| Asp       | 14,2                  | 11,8                     | 0,034     | 22,0                                       | 17,3                     | 0,165     |
| Cit       | 26,1                  | 26,9                     | 0,271     | 42,3                                       | 62,0                     | 0,008     |
| Thr       | 102,1                 | 100,6                    | 0,754     | 957,9                                      | 1016,9                   | 0,145     |
| Sar       | 1,7                   | 1,2                      | 0,006     | 12,7                                       | 19,2                     | 0,056     |
| bAla      | 21,5                  | 15,6                     | 0,013     | 288,5                                      | 237,1                    | 0,898     |
| Ala       | 396,5                 | 488,3                    | < 0,001   | 2270,2                                     | 2501,1                   | 0,523     |
| Glu       | 53,7                  | 65,4                     | 0,021     | 89,0                                       | 145,3                    | 0,002     |
| His       | 55,8                  | 63,7                     | 0,001     | 3829,7                                     | 5773,9                   | 0,001     |
| 1MHis     | 5,1                   | 6,0                      | < 0,001   | 2516,9                                     | 4777,7                   | 0,010     |
| 3MHis     | 4,5                   | 3,2                      | 0,008     | 1558,8                                     | 2147,8                   | 0,004     |
| Asa       | -                     | -                        | -         | 111,5                                      | 108,2                    | 0,695     |
| Hcit      | -                     | -                        | -         | 120,4                                      | 275,7                    | < 0,001   |
| Car       | -                     | -                        | -         | 118,5                                      | 125,8                    | 0,316     |
| Aad       | 1,0                   | 1,0                      | 0,817     | 212,6                                      | 312,3                    | 0,001     |
| GABA      | -                     | -                        | -         | 12,6                                       | 30,3                     | < 0,001   |
| bAib      | 2,0                   | 1,9                      | 0,843     | 1639,6                                     | 1716,0                   | 0,795     |
| Abu       | 20,9                  | 24,1                     | 0,009     | 110,1                                      | 114,3                    | 0,689     |
| Arg       | 71,5                  | 95,0                     | < 0,001   | 161,5                                      | 278,2                    | < 0,001   |
| Pro       | 202,6                 | 188,8                    | 0,417     | 91,1                                       | 83,4                     | 0,188     |
| Orn       | 79,3                  | 92,9                     | 0,054     | 124,2                                      | 186,9                    | 0,002     |
| Cth       | -                     | -                        | -         | 97,6                                       | 279,9                    | < 0,001   |
| Cys       | 12,9                  | 4,3                      | 0,488     | 400,7                                      | 584,8                    | 0,003     |
| Hyl       | -                     | -                        | -         | 28,4                                       | 102,2                    | < 0,001   |
| Lys       | 154,9                 | 188,8                    | < 0,001   | 905,5                                      | 1684,3                   | < 0,001   |
| Met       | 16,9                  | 23,7                     | < 0,001   | 63,6                                       | 96,7                     | < 0,001   |
| Val       | 222,8                 | 236,8                    | 0,112     | 342,2                                      | 366,8                    | 0,274     |
| Tyr       | 40,6                  | 43,6                     | 0,180     | 537,6                                      | 820,2                    | < 0,001   |

## WYNIKI

|     |       |       |         |       |       |       |
|-----|-------|-------|---------|-------|-------|-------|
| Ile | 56,3  | 69,9  | < 0,001 | 93,9  | 124,8 | 0,008 |
| Leu | 101,6 | 124,7 | < 0,001 | 218,1 | 283,5 | 0,005 |
| Phe | 47,8  | 55,8  | < 0,001 | 338,2 | 476,7 | 0,001 |
| Trp | 41,2  | 44,9  | 0,083   | 466,9 | 665,2 | 0,002 |

Tabela 23. Porównanie średnich stężeń białek [pg/ml] w surowicy pacjentów w dwóch grupach oznaczonych z wykorzystaniem separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej.

| Białko       | Grupa badana<br>(n = 49) | Grupa kontrolna<br>(n = 40) | Wartość p |
|--------------|--------------------------|-----------------------------|-----------|
| sEGFR        | 24863,9                  | 22100,5                     | 0,022     |
| FGF-basic    | 266,1                    | 242,1                       | < 0,001   |
| folistatyna  | 463,0                    | 424,6                       | 0,177     |
| G-CSF        | 128,5                    | 111,4                       | < 0,001   |
| sHER2/neu    | 5189,7                   | 5145,5                      | 0,934     |
| HGF          | 1709,0                   | 1359,2                      | < 0,001   |
| sIL-6Ra      | 11031,4                  | 10575,5                     | 0,112     |
| leptyna      | 7505,7                   | 5639,7                      | 0,084     |
| osteopontyna | 39644,6                  | 28687,3                     | < 0,001   |
| PDGF-AB/BB   | 3643,2                   | 2552,6                      | < 0,001   |
| PECAM-1      | 5177,7                   | 4545,3                      | 0,030     |
| prolaktyna   | 9361,4                   | 8462,0                      | 0,615     |
| SCF          | 287,0                    | 258,5                       | 0,009     |
| sTIE-2       | 9873,3                   | 9204,9                      | 0,271     |
| sVEGFR-1     | 241,6                    | 167,3                       | < 0,001   |
| sVEGFR-2     | 4832,8                   | 4417,7                      | 0,033     |

Tabela 24. Analiza dyskryminacyjna. Zmienne wprowadzone do modeli zbudowanych na podstawie oznaczonych stężeń aminokwasów w próbkach surowicy. Model 1 A – zbudowany z wykorzystaniem metody krokowej postępującej, model 1 B – zbudowany z wykorzystaniem predefiniowanych zmiennych (najbardziej różnicujących aminokwasów według analiz jednozmiennowych).

| Model   | Zmienna      | Lambda Wilksa | Cząstkowa lambda Wilksa | F usunięcia    | p                  | Tolerancja    |
|---|--------------|---------------|-------------------------|----------------|--------------------|---------------|
| Model 1 A –<br>aminokwasy<br>w próbkach<br>surowicy,<br>metoda<br>krokowa | <b>Met</b>   | <b>0,1639</b> | <b>0,6225</b>           | <b>22,4346</b> | <b>&lt; 0,0001</b> | <b>0,2450</b> |
|   | <b>Ser</b>   | <b>0,1328</b> | <b>0,7680</b>           | <b>11,1751</b> | <b>0,0019</b>      | <b>0,4602</b> |
|   | <b>3MHis</b> | <b>0,1654</b> | <b>0,6165</b>           | <b>23,0121</b> | <b>&lt; 0,0001</b> | <b>0,3725</b> |
|   | <b>Tyr</b>   | <b>0,1315</b> | <b>0,7757</b>           | <b>10,6966</b> | <b>0,0023</b>      | <b>0,4254</b> |
|   | <b>EtN</b>   | <b>0,1264</b> | <b>0,8070</b>           | <b>8,8473</b>  | <b>0,0051</b>      | <b>0,3885</b> |
|   | <b>Glu</b>   | <b>0,1364</b> | <b>0,7476</b>           | <b>12,4897</b> | <b>0,0011</b>      | <b>0,2691</b> |
|   | Thr          | 0,1021        | 0,9994                  | 0,0235         | 0,8789             | 0,4157        |
|   | Gln          | 0,1081        | 0,9434                  | 2,2204         | 0,1447             | 0,3675        |
|   | <b>Cys</b>   | <b>0,1434</b> | <b>0,7113</b>           | <b>15,0204</b> | <b>0,0004</b>      | <b>0,2515</b> |
|   | <b>Tau</b>   | <b>0,1266</b> | <b>0,8057</b>           | <b>8,9204</b>  | <b>0,0050</b>      | <b>0,2988</b> |
|   | <b>1MHis</b> | <b>0,1236</b> | <b>0,8252</b>           | <b>7,8386</b>  | <b>0,0081</b>      | <b>0,4347</b> |
|   | <b>Orn</b>   | <b>0,1154</b> | <b>0,8839</b>           | <b>4,8614</b>  | <b>0,0338</b>      | <b>0,5694</b> |
|   | <b>Arg</b>   | <b>0,1159</b> | <b>0,8797</b>           | <b>5,0585</b>  | <b>0,0305</b>      | <b>0,5085</b> |
|   | <b>Lys</b>   | <b>0,1167</b> | <b>0,8743</b>           | <b>5,3197</b>  | <b>0,0268</b>      | <b>0,3331</b> |
|   | <b>Gly</b>   | <b>0,1235</b> | <b>0,8262</b>           | <b>7,7819</b>  | <b>0,0083</b>      | <b>0,3982</b> |
|   | bAib         | 0,1112        | 0,9175                  | 3,3278         | 0,0762             | 0,5718        |
| Ile   | 0,1098       | 0,9293        | 2,8159                  | 0,1018         | 0,4587             |               |
| Model 1 B –<br>aminokwasy<br>w próbkach<br>surowicy,<br>najniższe p       | Asn          | 0,2124        | 0,9999                  | 0,0045         | 0,9470             | 0,4967        |
|   | EtN          | 0,2248        | 0,9444                  | 2,1771         | 0,1485             | 0,6437        |
|   | Gln          | 0,2209        | 0,9612                  | 1,4918         | 0,2297             | 0,3342        |
|   | Sar          | 0,2174        | 0,9768                  | 0,8788         | 0,3546             | 0,5700        |
|   | bAla         | 0,2175        | 0,9761                  | 0,9046         | 0,3477             | 0,3982        |
|   | <b>Ala</b>   | <b>0,2632</b> | <b>0,8067</b>           | <b>8,8681</b>  | <b>0,0051</b>      | <b>0,5536</b> |
|   | Glu          | 0,2297        | 0,9242                  | 3,0325         | 0,0899             | 0,2572        |
|   | His          | 0,2161        | 0,9827                  | 0,6505         | 0,4251             | 0,4114        |
|   | <b>1MHis</b> | <b>0,2603</b> | <b>0,8156</b>           | <b>8,3645</b>  | <b>0,0064</b>      | <b>0,4359</b> |
|   | 3MHis        | 0,2205        | 0,9630                  | 1,4222         | 0,2406             | 0,2668        |
|   | Abu          | 0,2179        | 0,9746                  | 0,9634         | 0,3327             | 0,5205        |
|   | Arg          | 0,2197        | 0,9667                  | 1,2765         | 0,2658             | 0,4840        |
|   | Lys          | 0,2127        | 0,9982                  | 0,0649         | 0,8003             | 0,3901        |
|   | Met          | 0,2350        | 0,9037                  | 3,9435         | 0,0545             | 0,3290        |
|   | Ile          | 0,2148        | 0,9884                  | 0,4359         | 0,5132             | 0,1832        |
|   | Leu          | 0,2133        | 0,9955                  | 0,1665         | 0,6856             | 0,1201        |
| Phe   | 0,2127       | 0,9985        | 0,0547                  | 0,8164         | 0,2375             |               |

Tabela 25. Analiza dyskryminacyjna. Zmienne wprowadzone do modeli zbudowanych na podstawie oznaczonych stężeń aminokwasów w próbkach moczu. Model 2 A – zbudowany z wykorzystaniem metody krokowej postępującej, model 2 B – zbudowany z wykorzystaniem predefiniowanych zmiennych (najbardziej różnicujących aminokwasów według analiz jednozmiennowych).

| Model  | Zmienna     | Lambda Wilksa | Cząstkowa lambda Wilksa | F usunięcia    | p                  | Tolerancja    |
|--|-------------|---------------|-------------------------|----------------|--------------------|---------------|
| Model 2 A –<br>aminokwasy<br>w próbkach<br>mocz, metoda<br>krokowa | <b>Asn</b>  | <b>0,0804</b> | <b>0,7158</b>           | <b>14,6930</b> | <b>0,0005</b>      | <b>0,1911</b> |
|  | <b>Pro</b>  | <b>0,0668</b> | <b>0,8619</b>           | <b>5,9309</b>  | <b>0,0198</b>      | <b>0,2849</b> |
|  | <b>GABA</b> | <b>0,0819</b> | <b>0,7034</b>           | <b>15,6017</b> | <b>0,0003</b>      | <b>0,5156</b> |
|  | <b>Ser</b>  | <b>0,1251</b> | <b>0,4602</b>           | <b>43,3943</b> | <b>&lt; 0,0001</b> | <b>0,0914</b> |
|  | 3MHis       | 0,0580        | 0,9928                  | 0,2677         | 0,6080             | 0,2725        |
|  | Tau         | 0,0622        | 0,9256                  | 2,9738         | 0,0930             | 0,5076        |
|  | <b>Abu</b>  | <b>0,0812</b> | <b>0,7091</b>           | <b>15,1780</b> | <b>0,0004</b>      | <b>0,1988</b> |
|  | <b>His</b>  | <b>0,0709</b> | <b>0,8118</b>           | <b>8,5750</b>  | <b>0,0058</b>      | <b>0,1429</b> |
|  | <b>PEtN</b> | <b>0,0711</b> | <b>0,8099</b>           | <b>8,6830</b>  | <b>0,0055</b>      | <b>0,2350</b> |
|  | Gln         | 0,0605        | 0,9520                  | 1,8660         | 0,1802             | 0,0982        |
|  | <b>Ile</b>  | <b>0,0680</b> | <b>0,8466</b>           | <b>6,7050</b>  | <b>0,0137</b>      | <b>0,2230</b> |
|  | <b>Glu</b>  | <b>0,0733</b> | <b>0,7857</b>           | <b>10,0923</b> | <b>0,0030</b>      | <b>0,3387</b> |
|  | <b>Met</b>  | <b>0,0674</b> | <b>0,8549</b>           | <b>6,2797</b>  | <b>0,0167</b>      | <b>0,2915</b> |
|  | Gly         | 0,0639        | 0,9005                  | 4,0884         | 0,0505             | 0,2760        |
|  | <b>Hcit</b> | <b>0,0661</b> | <b>0,8706</b>           | <b>5,5007</b>  | <b>0,0245</b>      | <b>0,3393</b> |
|  | Cit         | 0,0626        | 0,9194                  | 3,2421         | 0,0799             | 0,3730        |
| bAib   | 0,0603      | 0,9552        | 1,7335                  | 0,1961         | 0,6994             |               |
| Model 2 B –<br>aminokwasy<br>w próbkach<br>mocz, najniższe p       | PEtN        | 0,2424        | 0,9987                  | 0,0495         | 0,8252             | 0,3791        |
|  | <b>Asn</b>  | <b>0,2734</b> | <b>0,8855</b>           | <b>4,7857</b>  | <b>0,0351</b>      | <b>0,2904</b> |
|  | EtN         | 0,2646        | 0,9151                  | 3,4340         | 0,0719             | 0,2751        |
|  | <b>Gln</b>  | <b>0,2737</b> | <b>0,8845</b>           | <b>4,8336</b>  | <b>0,0342</b>      | <b>0,0743</b> |
|  | Glu         | 0,2602        | 0,9304                  | 2,7693         | 0,1045             | 0,3864        |
|  | <b>His</b>  | <b>0,2799</b> | <b>0,8651</b>           | <b>5,7701</b>  | <b>0,0214</b>      | <b>0,0506</b> |
|  | Hcit        | 0,2502        | 0,9677                  | 1,2362         | 0,2734             | 0,3800        |
|  | Aad         | 0,2424        | 0,9988                  | 0,0448         | 0,8336             | 0,2778        |
|  | GABA        | 0,2672        | 0,9061                  | 3,8340         | 0,0578             | 0,6402        |
|  | <b>Arg</b>  | <b>0,2833</b> | <b>0,8547</b>           | <b>6,2914</b>  | <b>0,0166</b>      | <b>0,2073</b> |
|  | Orn         | 0,2544        | 0,9515                  | 1,8848         | 0,1781             | 0,1341        |
|  | Cth         | 0,2544        | 0,9515                  | 1,8854         | 0,1780             | 0,6431        |
|  | <b>Hyl</b>  | <b>0,2824</b> | <b>0,8574</b>           | <b>6,1537</b>  | <b>0,0178</b>      | <b>0,2633</b> |
|  | Lys         | 0,2514        | 0,9629                  | 1,4257         | 0,2401             | 0,1311        |
|  | Met         | 0,2439        | 0,9924                  | 0,2815         | 0,5989             | 0,2703        |
|  | Tyr         | 0,2426        | 0,9981                  | 0,0693         | 0,7939             | 0,1455        |
| Phe  | 0,2537      | 0,9541        | 1,7790                  | 0,1904         | 0,1293             |               |

Tabela 26. Analiza dyskryminacyjna. Zmienne wprowadzone do modeli zbudowanych na podstawie wyznaczonych intensywności peptydów w próbkach surowicy. Model 3 A – zbudowany z wykorzystaniem metody krokowej postępującej, model 3 B – zbudowany z wykorzystaniem predefiniowanych zmiennych (najbardziej różnicujących peptydów według analiz jednozmiennowych).

| Model  | Zmienna        | Lambda Wilksa | Cząstkowa lambda Wilksa | F usunięcia    | p                  | Tolerancja    |
|--|----------------|---------------|-------------------------|----------------|--------------------|---------------|
| Model 3 A –<br>peptydy w<br>próbkach<br>surowicy,<br>metoda<br>krokowa | <b>1099,41</b> | <b>0,0924</b> | <b>0,3391</b>           | <b>72,0997</b> | <b>&lt; 0,0001</b> | <b>0,2090</b> |
|  | <b>1288,69</b> | <b>0,0967</b> | <b>0,3241</b>           | <b>77,1674</b> | <b>&lt; 0,0001</b> | <b>0,3382</b> |
|  | <b>2973,30</b> | <b>0,0600</b> | <b>0,5220</b>           | <b>33,8817</b> | <b>&lt; 0,0001</b> | <b>0,2263</b> |
|  | <b>2496,01</b> | <b>0,0916</b> | <b>0,3422</b>           | <b>71,1121</b> | <b>&lt; 0,0001</b> | <b>0,2202</b> |
|  | 1935,75        | 0,0319        | 0,9810                  | 0,7179         | 0,4023             | 0,5413        |
|  | <b>2933,15</b> | <b>0,0407</b> | <b>0,7695</b>           | <b>11,0859</b> | <b>0,0020</b>      | <b>0,1832</b> |
|  | <b>1546,64</b> | <b>0,0603</b> | <b>0,5198</b>           | <b>34,1856</b> | <b>&lt; 0,0001</b> | <b>0,1836</b> |
|  | <b>5063,79</b> | <b>0,0457</b> | <b>0,6853</b>           | <b>16,9944</b> | <b>0,0002</b>      | <b>0,2126</b> |
|  | <b>1699,77</b> | <b>0,0393</b> | <b>0,7971</b>           | <b>9,4187</b>  | <b>0,0040</b>      | <b>0,4299</b> |
|  | <b>1194,42</b> | <b>0,0354</b> | <b>0,8864</b>           | <b>4,7436</b>  | <b>0,0359</b>      | <b>0,5380</b> |
|  | <b>2241,00</b> | <b>0,0415</b> | <b>0,7551</b>           | <b>11,9974</b> | <b>0,0014</b>      | <b>0,3789</b> |
|  | <b>3278,87</b> | <b>0,0391</b> | <b>0,8008</b>           | <b>9,2032</b>  | <b>0,0044</b>      | <b>0,3379</b> |
|  | <b>2760,12</b> | <b>0,0418</b> | <b>0,7503</b>           | <b>12,3153</b> | <b>0,0012</b>      | <b>0,4604</b> |
|  | 1221,13        | 0,0345        | 0,9081                  | 3,7423         | 0,0607             | 0,4612        |
|  | <b>1528,28</b> | <b>0,0392</b> | <b>0,7997</b>           | <b>9,2684</b>  | <b>0,0043</b>      | <b>0,3384</b> |
|  | <b>1049,39</b> | <b>0,0381</b> | <b>0,8231</b>           | <b>7,9516</b>  | <b>0,0077</b>      | <b>0,3606</b> |
| <b>3158,65</b>   | <b>0,0358</b>  | <b>0,8765</b> | <b>5,2119</b>           | <b>0,0283</b>  | <b>0,3569</b>      |               |
| Model 3 B –<br>peptydy w<br>próbkach<br>surowicy,<br>najniższe p       | <b>1099,41</b> | <b>0,1466</b> | <b>0,8101</b>           | <b>8,6716</b>  | <b>0,0056</b>      | <b>0,4957</b> |
|  | 1233,46        | 0,1242        | 0,9563                  | 1,6894         | 0,2017             | 0,5179        |
|  | 1288,69        | 0,1307        | 0,9084                  | 3,7330         | 0,0610             | 0,5346        |
|  | 1389,93        | 0,1306        | 0,9095                  | 3,6795         | 0,0628             | 0,4691        |
|  | 1450,70        | 0,1289        | 0,9216                  | 3,1494         | 0,0842             | 0,1733        |
|  | 1563,80        | 0,1190        | 0,9975                  | 0,0928         | 0,7623             | 0,2162        |
|  | 1692,31        | 0,1199        | 0,9904                  | 0,3584         | 0,5530             | 0,0707        |
|  | 1779,38        | 0,1202        | 0,9877                  | 0,4592         | 0,5022             | 0,0608        |
|  | 1866,53        | 0,1207        | 0,9838                  | 0,6105         | 0,4396             | 0,0876        |
|  | 1888,55        | 0,1188        | 0,9995                  | 0,0197         | 0,8890             | 0,2498        |
|  | <b>1935,75</b> | <b>0,1365</b> | <b>0,8703</b>           | <b>5,5153</b>  | <b>0,0243</b>      | <b>0,4112</b> |
|  | 2093,22        | 0,1215        | 0,9776                  | 0,8478         | 0,3631             | 0,3522        |
|  | <b>2272,73</b> | <b>0,1417</b> | <b>0,8379</b>           | <b>7,1559</b>  | <b>0,0111</b>      | <b>0,5438</b> |
|  | 2660,94        | 0,1207        | 0,9835                  | 0,6201         | 0,4360             | 0,2650        |
|  | 2884,38        | 0,1201        | 0,9888                  | 0,4191         | 0,5214             | 0,4194        |
|  | 3241,40        | 0,1198        | 0,9913                  | 0,3239         | 0,5727             | 0,2836        |
| 8916,69  | 0,1281         | 0,9270        | 2,9141                  | 0,0962         | 0,3972             |               |



Tabela 27. Analiza dyskryminacyjna. Zmienne wprowadzone do modeli zbudowanych na podstawie wyznaczonych intensywności peptydów w próbkach moczu. Model 4 A – zbudowany z wykorzystaniem metody krokowej postępującej, model 4 B – zbudowany z wykorzystaniem predefiniowanych zmiennych (najbardziej różnicujących peptydów według analiz jednozmiennowych).

| Model   | Zmienna        | Lambda Wilksa | Cząstkowa lambda Wilksa | F usunięcia    | p                  | Tolerancja    |
|---|----------------|---------------|-------------------------|----------------|--------------------|---------------|
| Model 4 A –<br>peptydy w<br>próbkach<br>moczu,<br>metoda<br>krokowa | <b>2081,71</b> | <b>0,0622</b> | <b>0,8425</b>           | <b>6,9165</b>  | <b>0,0124</b>      | <b>0,2132</b> |
|   | <b>2444,56</b> | <b>0,1351</b> | <b>0,3875</b>           | <b>58,4729</b> | <b>&lt; 0,0001</b> | <b>0,1878</b> |
|   | <b>4008,67</b> | <b>0,1224</b> | <b>0,4277</b>           | <b>49,4998</b> | <b>&lt; 0,0001</b> | <b>0,2111</b> |
|   | <b>2010,46</b> | <b>0,1441</b> | <b>0,3634</b>           | <b>64,8278</b> | <b>&lt; 0,0001</b> | <b>0,1549</b> |
|   | <b>3261,51</b> | <b>0,0617</b> | <b>0,8485</b>           | <b>6,6052</b>  | <b>0,0143</b>      | <b>0,2057</b> |
|   | <b>1448,04</b> | <b>0,0626</b> | <b>0,8367</b>           | <b>7,2191</b>  | <b>0,0107</b>      | <b>0,6048</b> |
|   | <b>3475,63</b> | <b>0,1389</b> | <b>0,3769</b>           | <b>61,1674</b> | <b>&lt; 0,0001</b> | <b>0,1264</b> |
|   | <b>1936,23</b> | <b>0,1058</b> | <b>0,4947</b>           | <b>37,7894</b> | <b>&lt; 0,0001</b> | <b>0,1762</b> |
|   | <b>1796,80</b> | <b>0,0981</b> | <b>0,5336</b>           | <b>32,3423</b> | <b>&lt; 0,0001</b> | <b>0,2382</b> |
|   | <b>2140,12</b> | <b>0,0737</b> | <b>0,7107</b>           | <b>15,0634</b> | <b>0,0004</b>      | <b>0,1818</b> |
|   | <b>3061,12</b> | <b>0,0791</b> | <b>0,6622</b>           | <b>18,8749</b> | <b>0,0001</b>      | <b>0,3444</b> |
|   | <b>3066,10</b> | <b>0,0660</b> | <b>0,7939</b>           | <b>9,6041</b>  | <b>0,0037</b>      | <b>0,3773</b> |
|   | <b>2566,68</b> | <b>0,0730</b> | <b>0,7173</b>           | <b>14,5813</b> | <b>0,0005</b>      | <b>0,2195</b> |
|   | <b>1060,20</b> | <b>0,0643</b> | <b>0,8147</b>           | <b>8,4143</b>  | <b>0,0062</b>      | <b>0,5459</b> |
|   | <b>2316,33</b> | <b>0,0661</b> | <b>0,7926</b>           | <b>9,6837</b>  | <b>0,0036</b>      | <b>0,4825</b> |
|   | <b>1097,80</b> | <b>0,0617</b> | <b>0,8488</b>           | <b>6,5931</b>  | <b>0,0144</b>      | <b>0,4693</b> |
| <b>1085,91</b>  | <b>0,0612</b>  | <b>0,8556</b> | <b>6,2425</b>           | <b>0,0170</b>  | <b>0,5381</b>      |               |
| Model 4 B –<br>peptydy w<br>próbkach<br>moczu,<br>najniższe p       | 1237,03        | 0,2190        | 0,9840                  | 0,6004         | 0,4433             | 0,4321        |
|   | 1270,22        | 0,2198        | 0,9804                  | 0,7379         | 0,3959             | 0,5321        |
|   | 1448,04        | 0,2306        | 0,9345                  | 2,5936         | 0,1158             | 0,5335        |
|   | 1625,73        | 0,2156        | 0,9992                  | 0,0307         | 0,8620             | 0,2758        |
|   | 1793,20        | 0,2162        | 0,9964                  | 0,1344         | 0,7160             | 0,4600        |
|   | 1879,44        | 0,2194        | 0,9822                  | 0,6706         | 0,4181             | 0,1575        |
|   | 1994,36        | 0,2335        | 0,9228                  | 3,0962         | 0,0867             | 0,3086        |
|   | 2010,46        | 0,2166        | 0,9947                  | 0,1985         | 0,6585             | 0,1811        |
|   | 2050,43        | 0,2155        | 0,9999                  | 0,0035         | 0,9531             | 0,0780        |
|   | 2066,30        | 0,2156        | 0,9992                  | 0,0285         | 0,8668             | 0,0704        |
|   | 2081,71        | 0,2163        | 0,9959                  | 0,1513         | 0,6996             | 0,2176        |
|   | 2235,57        | 0,2220        | 0,9705                  | 1,1229         | 0,2962             | 0,1758        |
|   | 2251,64        | 0,2169        | 0,9934                  | 0,2441         | 0,6242             | 0,1309        |
|   | 2316,33        | 0,2329        | 0,9252                  | 2,9928         | 0,0920             | 0,4400        |
|   | <b>2444,56</b> | <b>0,2653</b> | <b>0,8122</b>           | <b>8,5550</b>  | <b>0,0059</b>      | <b>0,5295</b> |
|   | 2928,20        | 0,2258        | 0,9543                  | 1,7721         | 0,1913             | 0,2612        |
| 2944,81   | 0,2222         | 0,9699        | 1,1502                  | 0,2905         | 0,1329             |               |

Tabela 28. Analiza dyskryminacyjna. Porównanie modeli zbudowanych na podstawie czterech zbiorów danych dwoma różnymi sposobami. Czułość, swoistość i ogólna poprawność klasyfikacji wyznaczone na podstawie zbioru testowego.

|                                | Modele zbudowane z wykorzystaniem metody krokowej postępującej  |  |  |   |
|--------------------------------|---|--|--|---|
|                                | <b>Model 1 A – aminokwasy w próbkach surowicy</b>   | <b>Model 2 A – aminokwasy w próbkach moczu</b> | <b>Model 3 A – peptydy w próbkach surowicy</b> | <b>Model 4 A – peptydy w próbkach moczu</b> |
| Lambda Wilksa                  | 0,1020  | 0,0576   | 0,3134   | 0,0524                                      |
| F                              | 19,161  | 35,624   | 67,279   | 39,386                                      |
| p                              | < 0,0001  | < 0,0001                                       | < 0,0001                                       | < 0,0001                                    |
| Czułość                        | 68,42 %   | 89,47 %  | 100,00 %                                       | 63,16 %                                     |
| Swoistość                      | 100,00 %  | 73,33 %  | 93,33 %  | 80,00 %                                     |
| Ogólna poprawność klasyfikacji | 82,35 %   | 82,35 %  | 97,06 %  | 70,59 %                                     |
|                                | Modele zbudowane z wykorzystaniem predefiniowanych zmiennych (najbardziej różnicujących aminokwasów według analiz jednozmiennowych) |  |  |   |
|                                | <b>Model 1 B – aminokwasy w próbkach surowicy</b>   | <b>Model 2 B – aminokwasy w próbkach moczu</b> | <b>Model 3 B – peptydy w próbkach surowicy</b> | <b>Model 4 B – peptydy w próbkach moczu</b> |
| Lambda Wilksa                  | 0,2123  | 0,2421   | 0,1187   | 0,2155                                      |
| F                              | 8,0735  | 6,8136   | 16,152   | 7,9253                                      |
| p                              | < 0,0001  | < 0,0001                                       | < 0,0001                                       | < 0,0001                                    |
| Czułość                        | 68,42 %   | 89,47 %  | 100,00 %                                       | 89,47 %                                     |
| Swoistość                      | 93,33 %   | 60,00 %  | 100,00 %                                       | 80,00 %                                     |
| Ogólna poprawność klasyfikacji | 79,41 %   | 76,47 %  | 100,00 %                                       | 85,29 %                                     |

Tabela 29. Ogólna poprawność klasyfikacji dla opartych o krzywe ROC modeli składających się z różnej ilości zmiennych i otrzymanych dla czterech zbiorów danych.

| Ilość zmiennych | Ogólna poprawność klasyfikacji [%] |                             |                             |                          |
|-----------------|------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|
|                 | Aminokwasy w próbkach surowicy     | Aminokwasy w próbkach moczu | Peptydy w próbkach surowicy | Peptydy w próbkach moczu |
| 2               | 80,6                               | 68,8                        | -                           | -                        |
| 3               | 80,2                               | 73,1                        | -                           | -                        |
| 5               | 83,1                               | 78,4                        | 88,7                        | 75,9                     |
| 10              | 83,0                               | 83,6                        | 92,2                        | 78,9                     |
| 15              | -                                  | -                           | 94,7                        | 79,8                     |
| 20              | 86,2                               | 88,1                        | -                           | -                        |
| 25              | -                                  | -                           | 95,9                        | 80,8                     |
| 32              | 89,7                               | -                           | -                           | -                        |
| 39              | -                                  | 91,3                        | -                           | -                        |
| 50              | -                                  | -                           | 97,3                        | 82,7                     |
| 100             | -                                  | -                           | 98,5                        | 80,6                     |

Tabela 30. Wyniki zdolności klasyfikacyjnych trzech modeli klasyfikacyjnych wykorzystujących profile peptydowe w próbkach surowicy i moczu.

|  | Surowica                   |                        | Mocz                       |                        |
|--|----------------------------|------------------------|----------------------------|------------------------|
|  | Zdolność rozpoznawania [%] | Walidacja krzyżowa [%] | Zdolność rozpoznawania [%] | Walidacja krzyżowa [%] |
| <i>QuickClassifier (QC)</i>            |                            |                        |                            |                        |
| Czułość                                | 83,33                      | 88,24                  | 84,78                      | 79,38                  |
| Swoistość                              | 79,49                      | 69,12                  | 87,50                      | 82,19                  |
| Ogólna poprawność klasyfikacji         | 81,41                      | 78,68                  | 86,14                      | 80,79                  |
| <i>Supervised Neural Network (SNN)</i> |                            |                        |                            |                        |
| Czułość                                | 81,25                      | 76,47                  | 73,91                      | 63,92                  |
| Swoistość                              | 92,31                      | 88,24                  | 97,50                      | 86,30                  |
| Ogólna poprawność klasyfikacji         | 86,78                      | 82,35                  | 85,71                      | 75,11                  |
| <i>Genetic Algorithm (GA)</i>          |                            |                        |                            |                        |
| Czułość                                | 97,92                      | 87,50                  | 93,48                      | 72,73                  |
| Swoistość                              | 84,62                      | 83,33                  | 92,50                      | 87,32                  |
| Ogólna poprawność klasyfikacji         | 91,27                      | 85,42                  | 92,99                      | 80,03                  |

## 5.2. Ryciny

### 5.2.1. Spis rycin

Ryciny 1 i 2 dotyczą Części teoretycznej i są umieszczone w Rozdziale 2.

**Rycina 1, strona 17.** System Gleasona [16]. Pięć typów histoarchitektonicznych raka prostaty. Typ 1 odpowiada komórkom najbardziej zróżnicowanym, natomiast typ 5 komórkom najmniej zróżnicowanym.

**Rycina 2, strona 25.** Diagram ilustrujący techniki „omiczne”. Przepływ informacji w organizmie zaczyna się od genów, których liczba wynosi około  $3 \times 10^4$ , a kończy na metabolitach, których liczba jest szacowana na około  $8 \times 10^3$ . Spośród „omik”, metabolomika jest najbardziej związana z fenotypem [42, 47].

Rycina 3 dotyczy Celu i jest umieszczona w Rozdziale 3.

**Rycina 3, strona 46.** Schemat badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej.

Ryciny 4 i 5 dotyczą Części doświadczalnej i są umieszczone w Rozdziale 4.

**Rycina 4, strona 51.** Przebieg reakcji znakowania przy użyciu odczynnika aTRAQ [150]. Grupa reporterowa ma masę 121 Da w przypadku aminokwasów w próbce biologicznej (zawiera sześć atomów  $^{13}\text{C}$  oraz dwa atomy  $^{15}\text{N}$ ) i 113 Da w przypadku wzorców wewnętrznych.

**Rycina 5, strona 71.** Schemat procedury „kanapkowego” testu immunologicznego opartego na kulkach magnetycznych, wykorzystującego technologię Luminex/xMAP i zestaw Bio-Plex [157]. A – kulki magnetyczne z kowalencyjnie związanymi przeciwciałami nakłada się na płytkę 96-dołkową. B – po dodaniu próbki biomarkery wiążą się z przeciwciałami. C – dodane biotynylowane przeciwciała wiążą się z biomarkerami, tworząc strukturę „kanapki”. D – dodana fluorescencyjnie znakowana streptoawidyna łączy się z biotynylowanymi przeciwciałami. E – w cytometrze przepływowym kulki magnetyczne są sortowane i mierzona jest intensywność sygnału

znacznika fluorescencyjnego z wykorzystaniem dwóch laserów lub dwóch diod elektroluminescencyjnych.

Ryciny 6-25 dotyczą Wyników i są umieszczone w Rozdziale 5.

**Rycina 6, strona 112.** Chromatogram wybranej próbki surowicy pacjenta z rakiem prostaty uzyskany w analizie LC-MS/MS aminokwasów.

**Rycina 7, strona 112.** Chromatogram wybranej próbki moczu pacjenta z rakiem prostaty uzyskany w analizie LC-MS/MS aminokwasów.

**Rycina 8, strona 113.** Widma fragmentacyjne protonowanych cząsteczek kreatyniny przy różnych wartościach energii kolizyjnej (CE).

**Rycina 9, strona 114.** Chromatogramy roztworu wzorca kreatyniny o stężeniu 200 ng/ml (A) oraz próbki moczu pacjenta z rakiem prostaty rozcieńczonej 2000-razy o oznaczonym stężeniu kreatyniny 269 ng/ml (B). Oba chromatogramy uzyskano w analizie LC-MS/MS i przedstawiają pierwsze przejścia masowe (ilościowe) kreatyniny (1,  $t_R = 1,93$  min) i wzorca wewnętrznego (2,  $t_R = 2,61$  min).

**Rycina 10, strona 115.** Porównanie wyników pomiarów kreatyniny w 20 próbkach moczu otrzymanych przy wykorzystaniu opracowanej metody LC-MS/MS i laboratoryjnej metody kolorymetrycznej.

**Rycina 11, strona 116.** Chromatogramy roztworu wzorca kreatyniny oraz 2000-razy rozcieńczonej próbki moczu uzyskane w analizie LC-MS/MS. Q – pierwsze przejście masowe (ilościowe), q – drugie przejście masowe (jakościowe), Q/q – stosunek przejścia masowego ilościowego do jakościowego.

**Rycina 12, strona 117.** „Widok żelowy” profili peptydowych surowicy otrzymanych w zakresie mas od 1 do 10 kDa dla grupy badanej – pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem prostaty (u dołu, kolor czerwony) oraz grupy kontrolnej (u góry, kolor zielony).

**Rycina 13, strona 117.** „Widok żelowy” profili peptydowych moczu otrzymanych w zakresie mas od 1 do 10 kDa dla grupy badanej – pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem prostaty (u dołu, kolor czerwony) oraz grupy kontrolnej (u góry, kolor zielony).

**Rycina 14, strona 118.** Uśrednione widma MS (profile peptydowe) surowicy otrzymane w zakresie mas od 1 do 10 kDa dla grupy badanej – pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem prostaty (kolor czerwony) oraz grupy kontrolnej (kolor zielony) (u dołu Ryciny) oraz powiększone fragmenty tych widm w pięciu węższych zakresach mas: A – od 1 do 2 kDa, B – od 2 do 4 kDa, C – od 4 do 6 kDa, D – od 6 do 8 kDa, E – od 8 do 10 kDa.

**Rycina 15, strona 119.** Uśrednione widma MS (profile peptydowe) moczu otrzymane w zakresie mas od 1 do 10 kDa dla grupy badanej – pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem prostaty (kolor czerwony) oraz grupy kontrolnej (kolor zielony) (u dołu Ryciny) oraz powiększone fragmenty tych widm w pięciu węższych zakresach mas: A – od 1 do 2 kDa, B – od 2 do 3 kDa, C – od 3 do 4 kDa, D – od 4 do 6,5 kDa, E – od 6,5 do 10 kDa.

**Rycina 16, strona 120.** Krzywe ROC dla metioniny i sakrozyny. W nawiasach pod wartościami AUC podano 95 % przedział ufności. Czerwone punkty odpowiadają optymalnym punktom odcięcia, dla których w nawiasie podano wartości swoistości i czułości.

**Rycina 17, strona 121.** Wykresy pudełkowe (u góry) oraz wykresy jądrowego estymatora gęstości (u dołu) dla stężeń aminokwasów w surowicy przed normalizacją oraz po normalizacji.

**Rycina 18, strona 122.** Wykresy wektorów odległości pierwszej składowej względem drugiej składowej otrzymane w analizach PLS-DA czterech zbiorów danych (A – stężenia aminokwasów w próbkach surowicy, B – stężenia aminokwasów w próbkach moczu znormalizowane na kreatyninę, C – intensywności peptydów w próbkach surowicy, D – intensywności peptydów w próbkach moczu) dla dwóch analizowanych grup: grupy badanej (n = 49, kolor czerwony) i grupy kontrolnej (n = 40, kolor zielony). W nawiasach podano procent wyjaśnianej zmienności przez poszczególne składowe.

**Rycina 19, strona 123.** Zmienne o największym znaczeniu w klasyfikacji (najwyższe wartości VIP) w analizie PLS-DA wykorzystującej stężenia aminokwasów w próbkach surowicy. Czerwone i zielone pola po prawej stronie wskazują na to, czy poziomy odpowiedniej zmiennej są wyższe czy niższe w danej grupie.

**Rycina 20, strona 123.** Zmienne o największym znaczeniu w klasyfikacji (najwyższe wartości VIP) w analizie PLS-DA wykorzystującej stężenia aminokwasów w próbkach moczu znormalizowane na kreatyninę. Czerwone i zielone pola po prawej stronie wskazują na to, czy poziomy odpowiedniej zmiennej są wyższe czy niższe w danej grupie.

**Rycina 21, strona 124.** Zmienne o największym znaczeniu w klasyfikacji (najwyższe wartości VIP) w analizie PLS-DA wykorzystującej intensywności peptydów w próbkach surowicy. Czerwone i zielone pola po prawej stronie wskazują na to, czy poziomy odpowiedniej zmiennej są wyższe czy niższe w danej grupie.

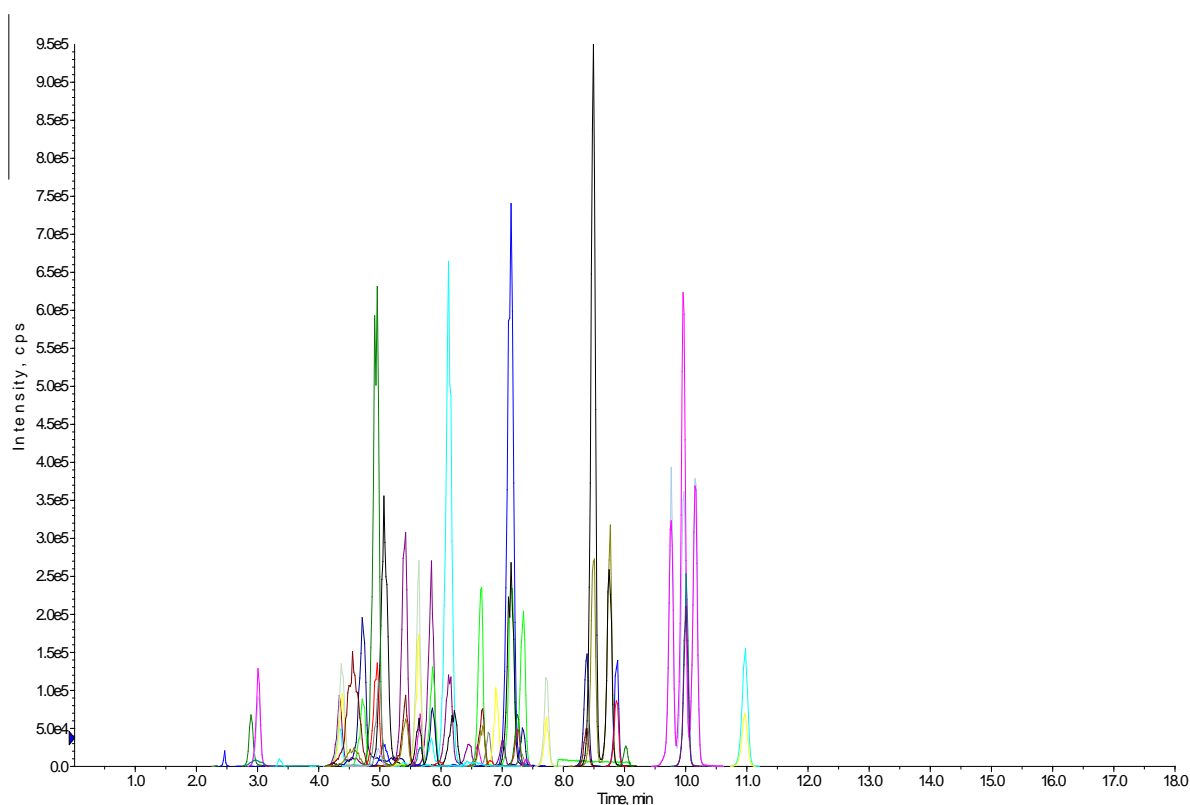
**Rycina 22, strona 124.** Zmienne o największym znaczeniu w klasyfikacji (najwyższe wartości VIP) w analizie PLS-DA wykorzystującej intensywności peptydów w próbkach moczu. Czerwone i zielone pola po prawej stronie wskazują na to, czy poziomy odpowiedniej zmiennej są wyższe czy niższe w danej grupie.

**Rycina 23, strona 125.** Wyniki testów permutacji dla stężeń aminokwasów w próbkach surowicy, potwierdzające wiarygodność modelu PLS-DA.

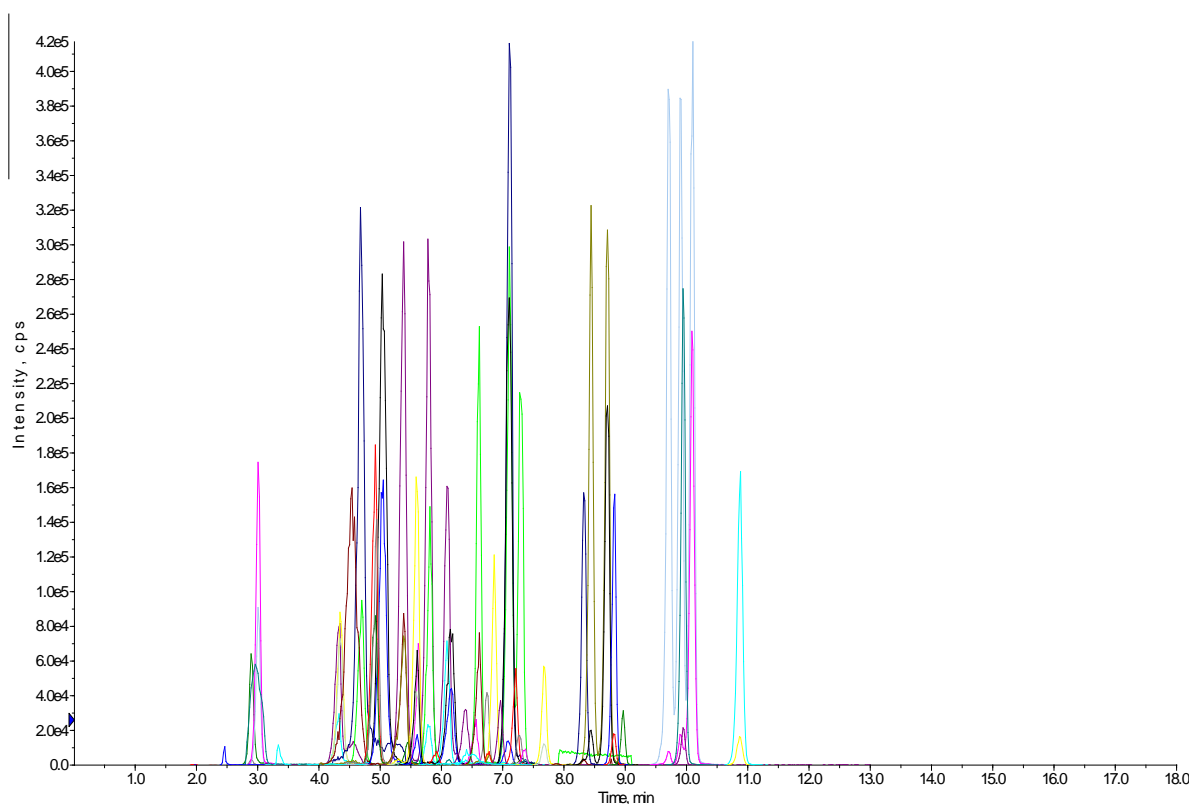
**Rycina 24, strona 126.** Wykresy wektorów odległości pierwszej składowej względem drugiej składowej otrzymane w analizach PLS-DA czterech zbiorów danych (A – stężenia aminokwasów w próbkach surowicy, B – stężenia aminokwasów w próbkach moczu znormalizowane na kreatyninę, C – intensywności peptydów w próbkach surowicy, D – intensywności peptydów w próbkach moczu) dla trzech analizowanych grup pacjentów z rakiem prostaty: z sześcioma punktami w skali Gleasona (n = 19, kolor czerwony), siedzioma punktami w skali Gleasona (n = 24, kolor zielony) oraz ośmioma lub dziewięcioma punktami w skali Gleasona (n = 6, kolor niebieski). W nawiasach podano procent wyjaśnianej zmienności przez poszczególne składowe.

**Rycina 25, strona 127.** Krzywe ROC dla modeli składających się z różnej ilości zmiennych wraz z wartościami AUC oraz w nawiasach 95 % przedziałami ufności otrzymane dla czterech zbiorów danych (A – stężenia aminokwasów w próbkach surowicy, B – stężenia aminokwasów w próbkach moczu znormalizowane na kreatyninę, C – intensywności peptydów w próbkach surowicy, D – intensywności peptydów w próbkach moczu).

## 5.2.2. Ryciny

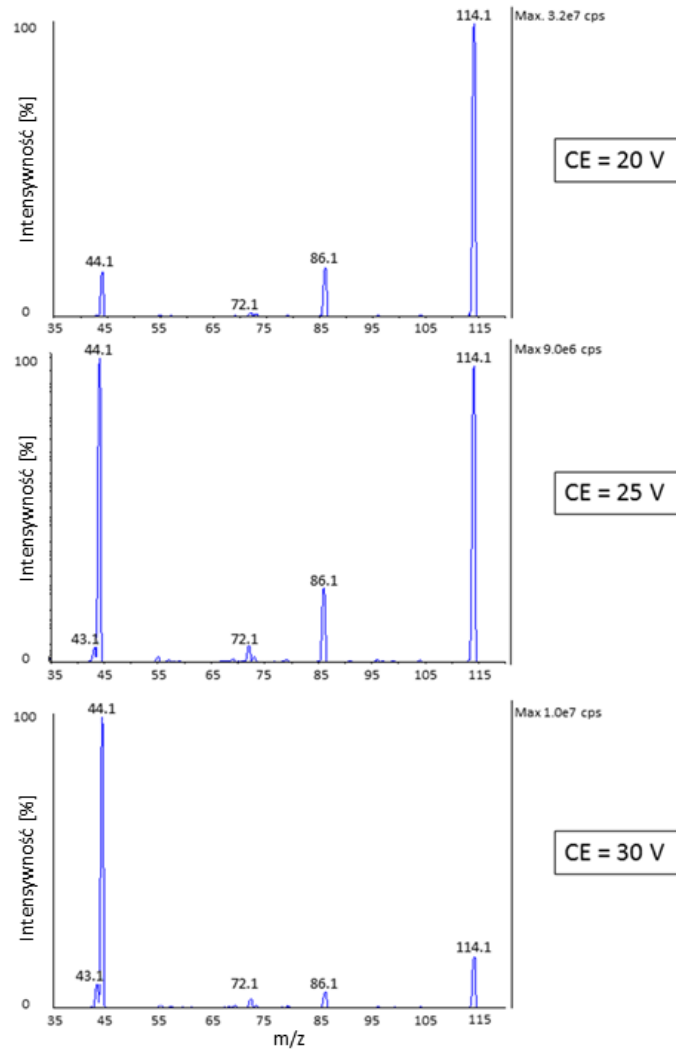


Rycina 6. Chromatogram wybranej próbki surowicy pacjenta z rakiem prostaty uzyskany w analizie LC-MS/MS aminokwasów.

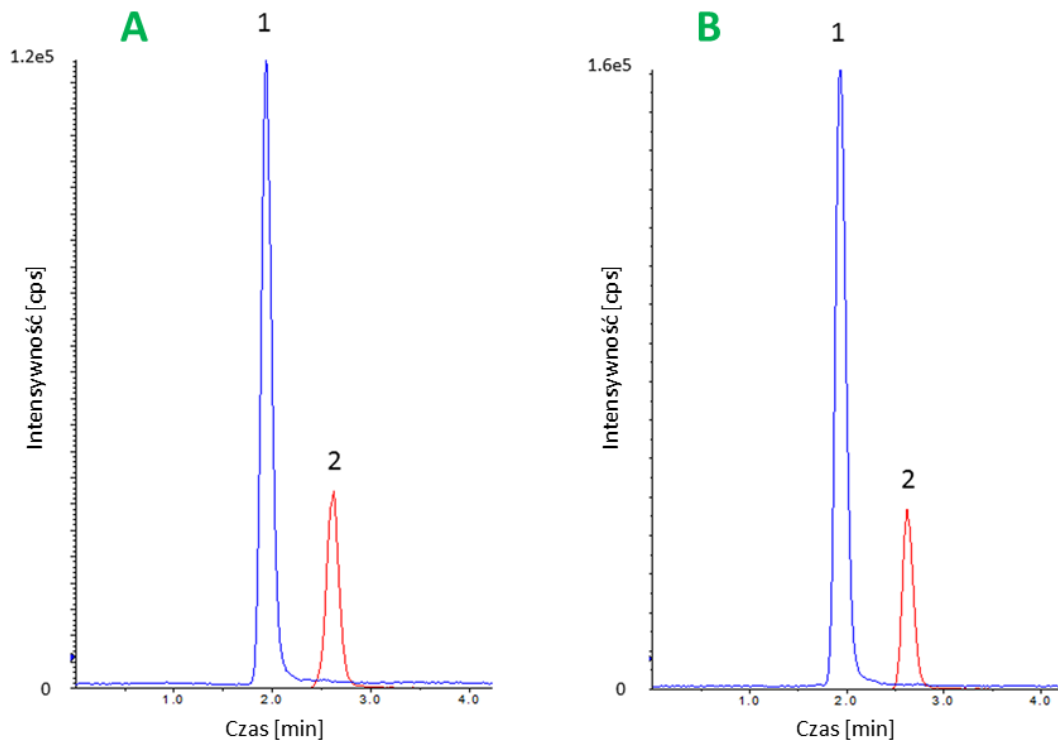


Rycina 7. Chromatogram wybranej próbki moczu pacjenta z rakiem prostaty uzyskany w analizie LC-MS/MS aminokwasów.

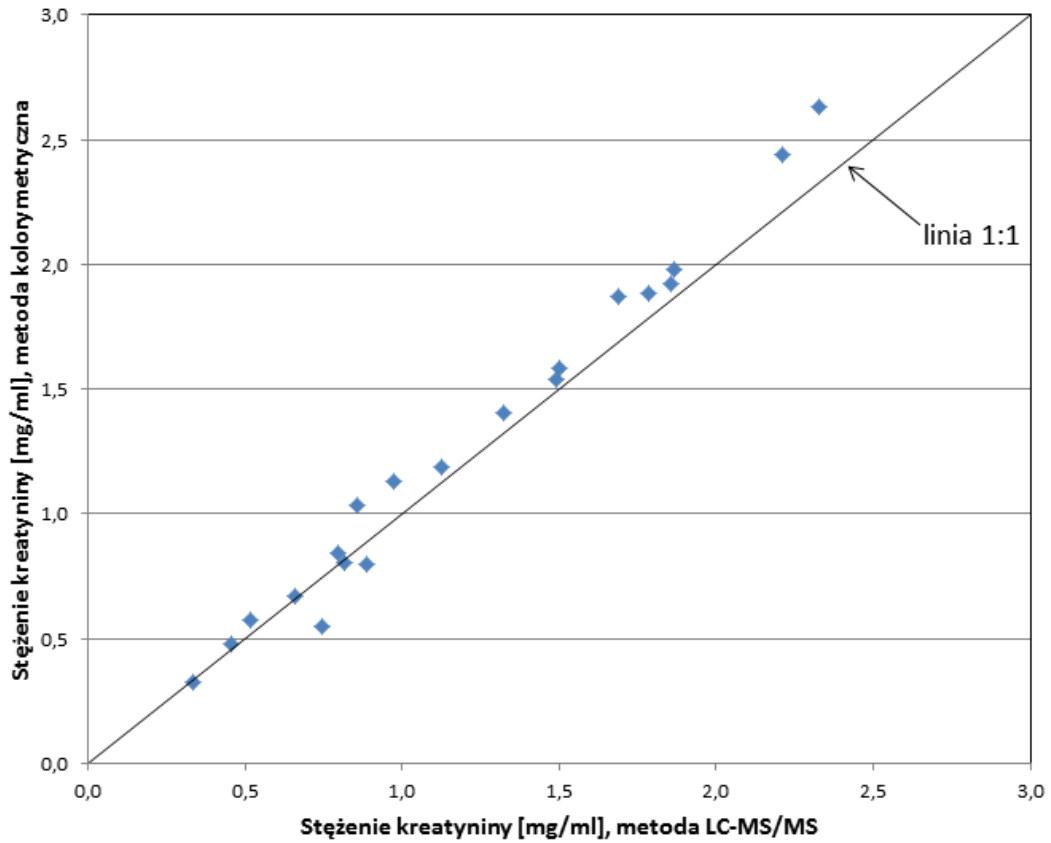




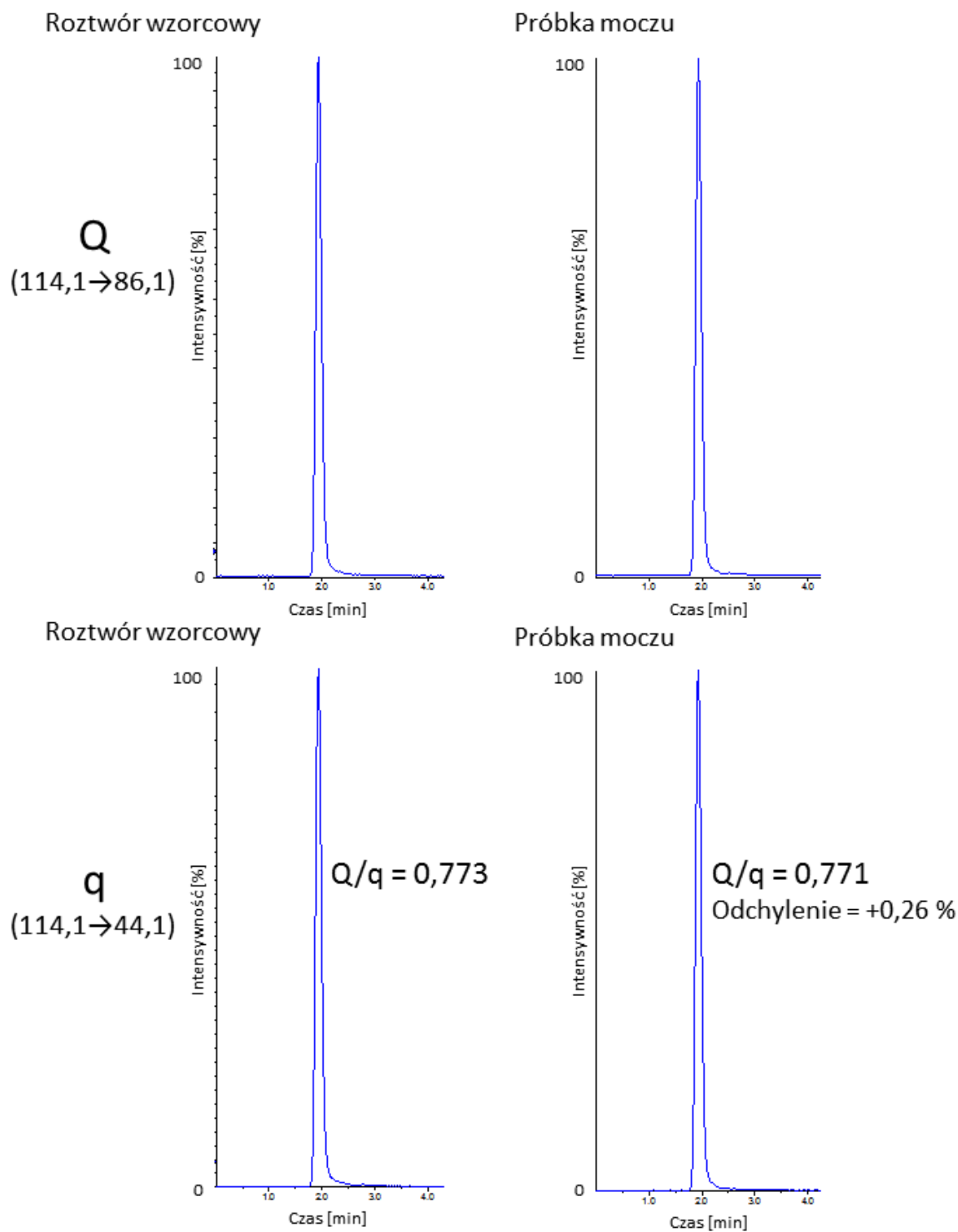
Rycina 8. Widma fragmentacyjne protonowanych cząsteczek kreatyniny przy różnych wartościach energii kolizyjnej (CE).



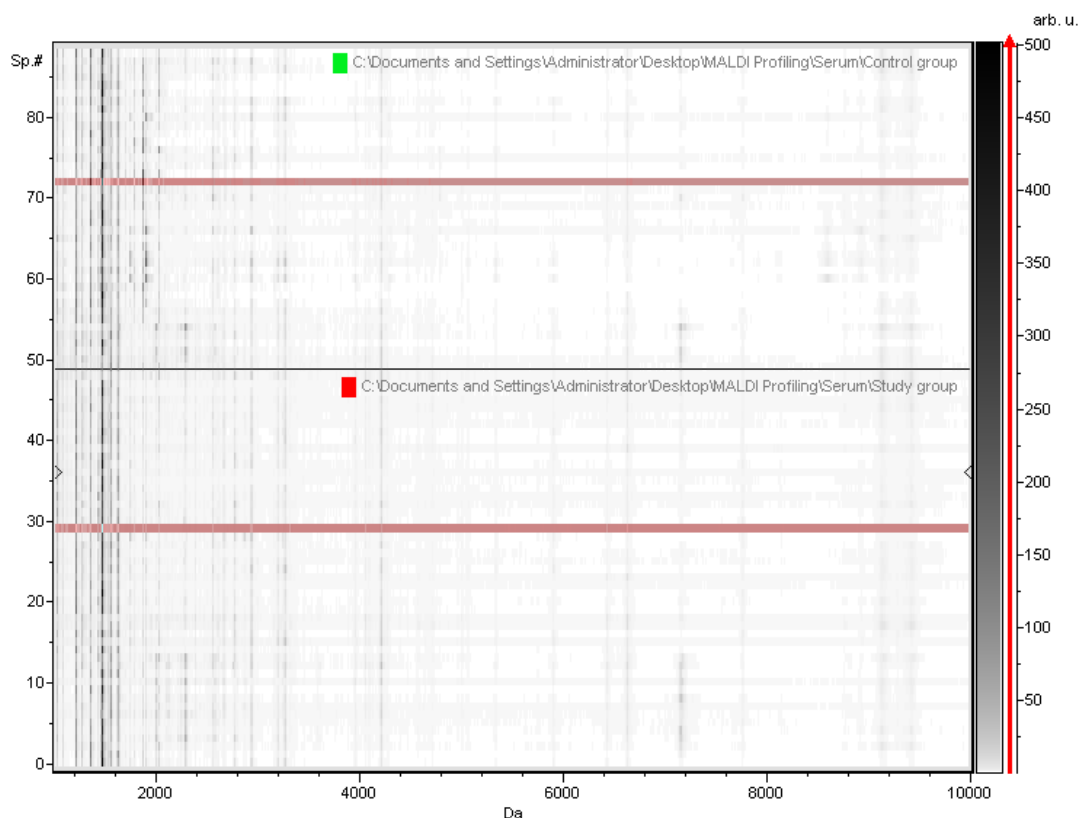
Rycina 9. Chromatogramy roztworu wzorca kreatyniny o stężeniu 200 ng/ml (A) oraz próbki moczu pacjenta z rakiem prostaty rozcieńczonej 2000-razy o oznaczonym stężeniu kreatyniny 269 ng/ml (B). Oba chromatogramy uzyskano w analizie LC-MS/MS i przedstawiają pierwsze przejścia masowe (ilościowe) kreatyniny (1,  $t_R = 1,93$  min) i wzorca wewnętrznego (2,  $t_R = 2,61$  min).



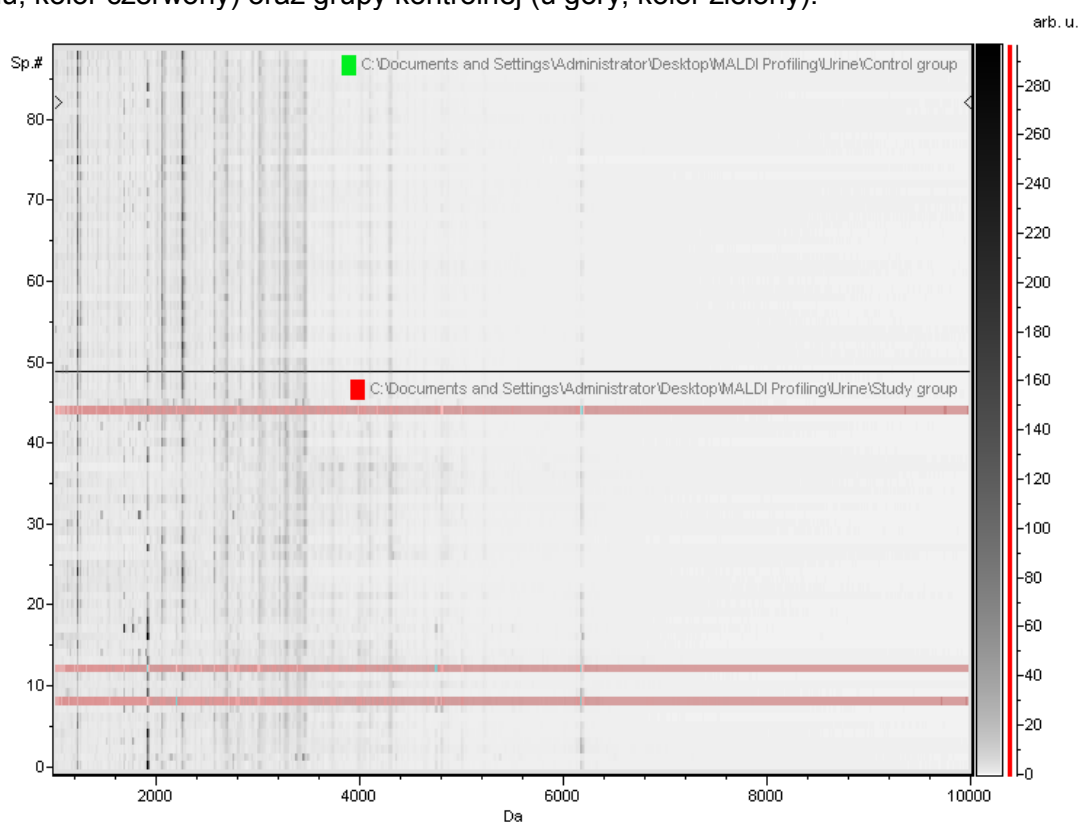
Rycina 10. Porównanie wyników pomiarów kreatyniny w 20 próbkach moczu otrzymanych przy wykorzystaniu opracowanej metody LC-MS/MS i laboratoryjnej metody kolorymetrycznej.



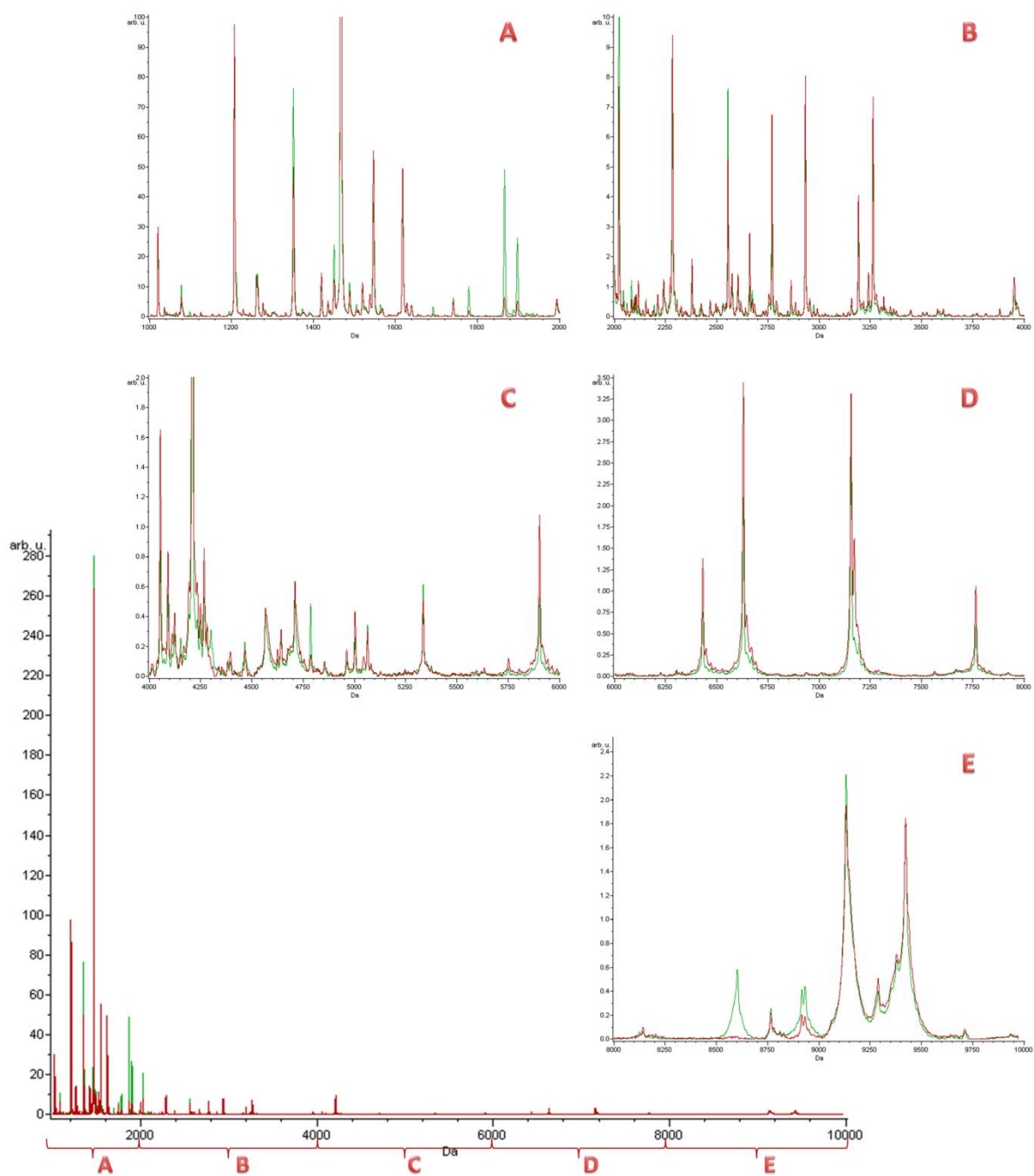
Rycina 11. Chromatogramy roztworu wzorca kreatyniny oraz 2000-razy rozcieńczonej próbki moczu uzyskane w analizie LC-MS/MS. Q – pierwsze przejście masowe (ilościowe), q – drugie przejście masowe (jakościowe), Q/q – stosunek przejścia masowego ilościowego do jakościowego.



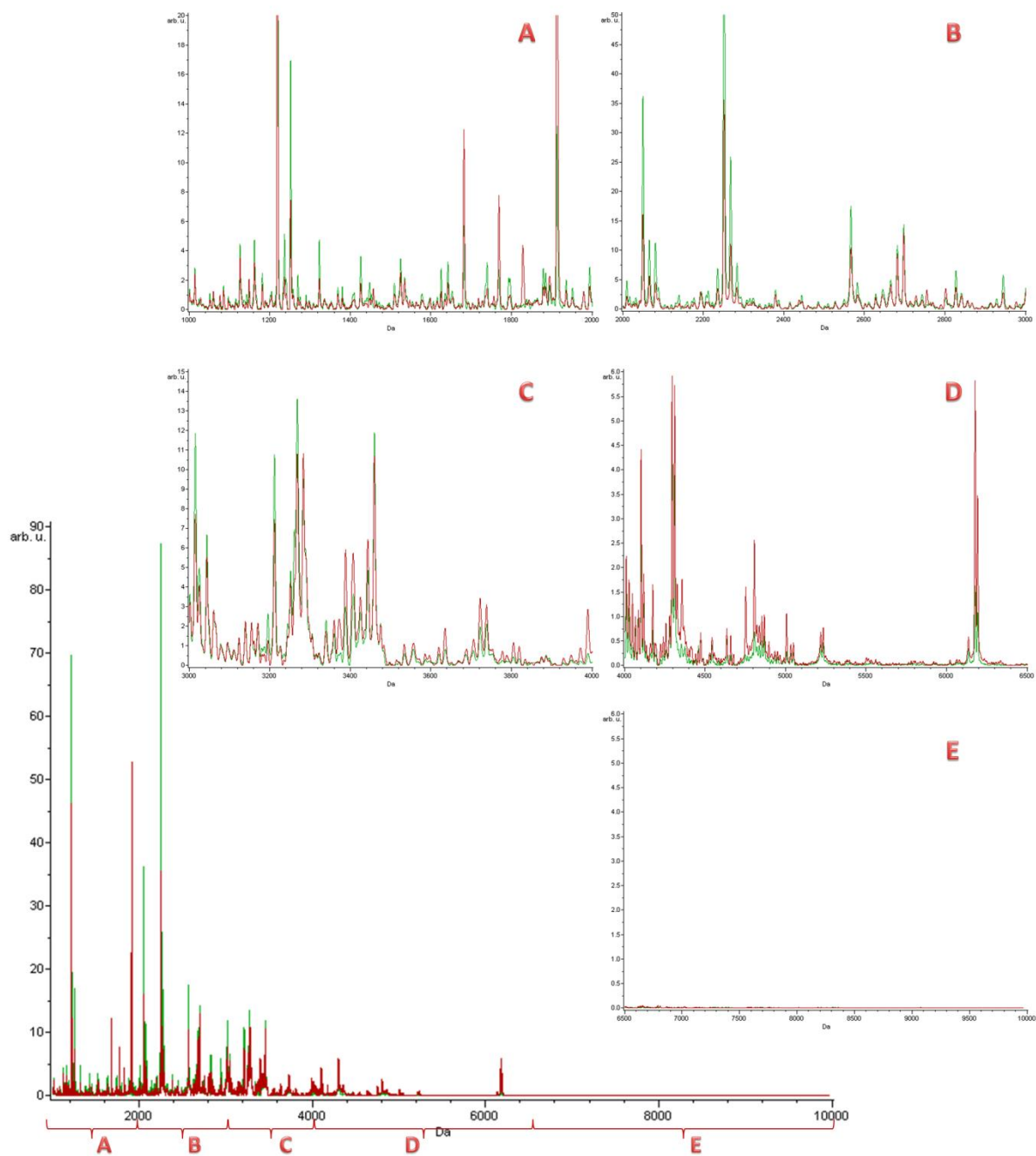
Rycina 12. „Widok żelowy” profili peptydowych surowicy otrzymanych w zakresie mas od 1 do 10 kDa dla grupy badanej – pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem prostaty (u dołu, kolor czerwony) oraz grupy kontrolnej (u góry, kolor zielony).



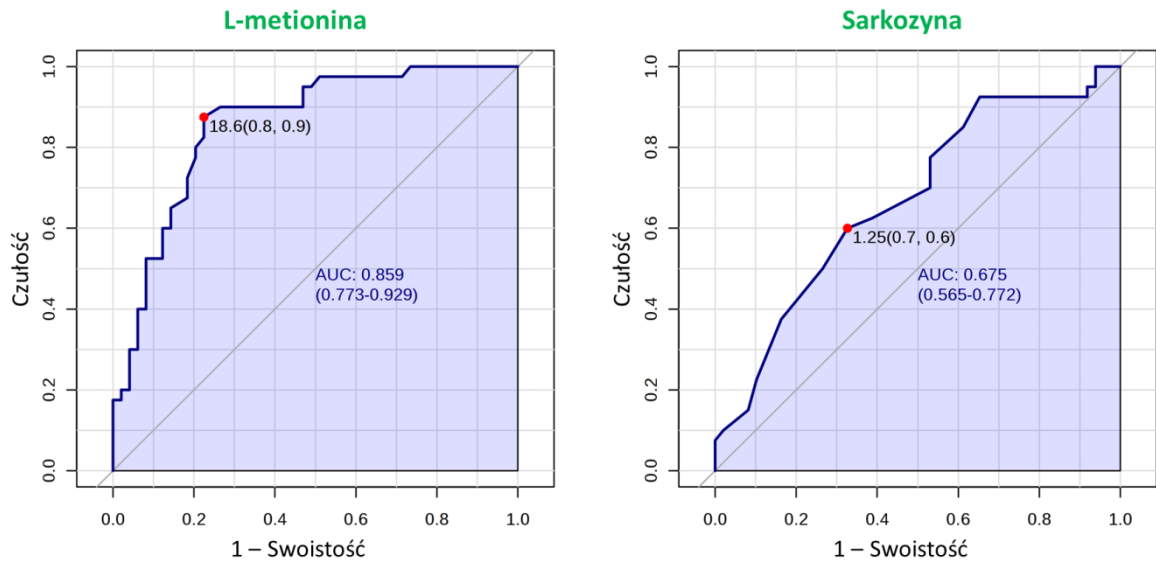
Rycina 13. „Widok żelowy” profili peptydowych moczu otrzymanych w zakresie mas od 1 do 10 kDa dla grupy badanej – pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem prostaty (u dołu, kolor czerwony) oraz grupy kontrolnej (u góry, kolor zielony).



Rycina 14. Uśrednione widma MS (profile peptydowe) surowicy otrzymane w zakresie mas od 1 do 10 kDa dla grupy badanej – pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem prostaty (kolor czerwony) oraz grupy kontrolnej (kolor zielony) (u dołu Ryciny) oraz powiększone fragmenty tych widm w pięciu węższych zakresach mas: A – od 1 do 2 kDa, B – od 2 do 4 kDa, C – od 4 do 6 kDa, D – od 6 do 8 kDa, E – od 8 do 10 kDa.

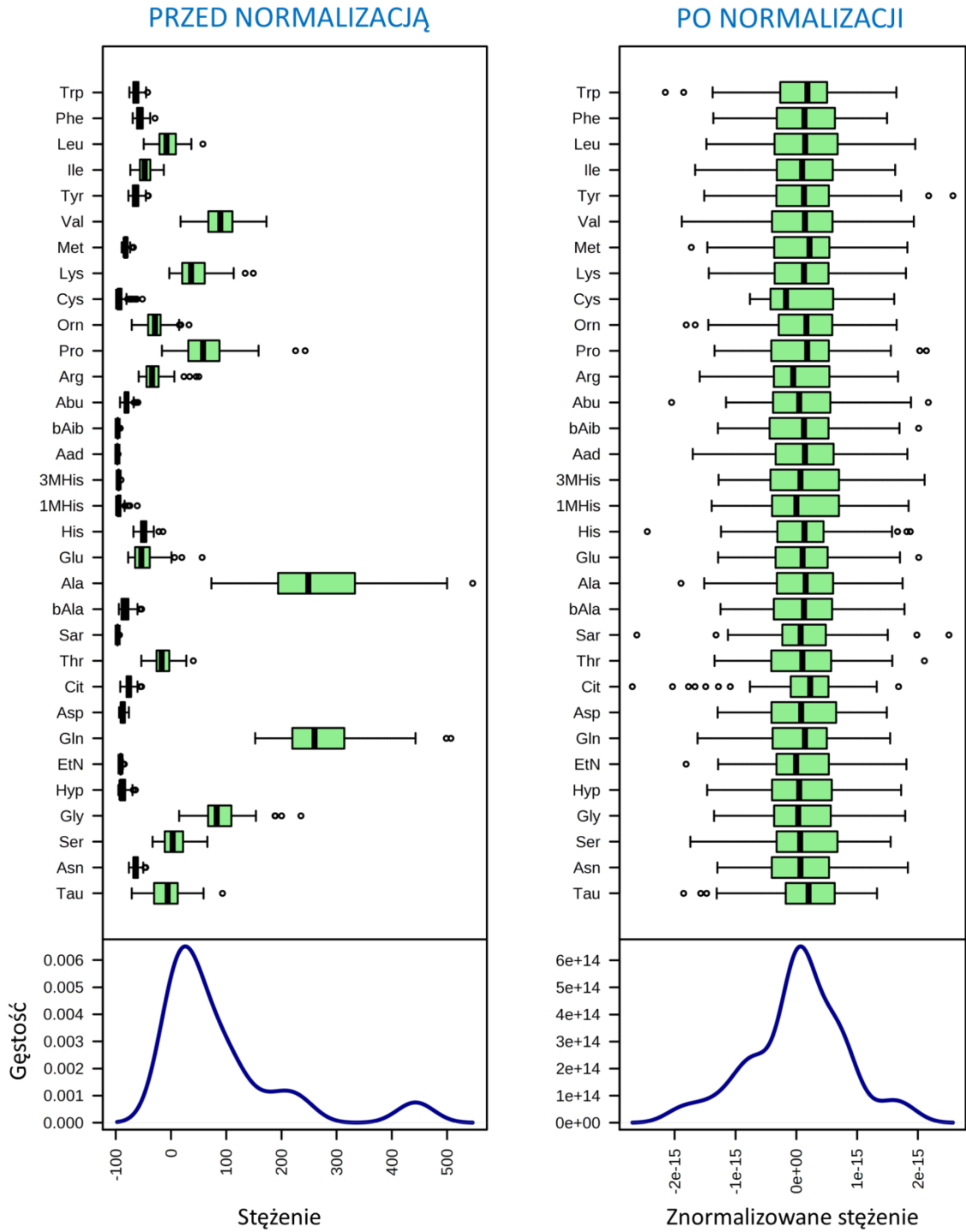


Rycina 15. Uśrednione widma MS (profile peptydowe) moczu otrzymane w zakresie mas od 1 do 10 kDa dla grupy badanej – pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem prostaty (kolor czerwony) oraz grupy kontrolnej (kolor zielony) (u dołu Ryciny) oraz powiększone fragmenty tych widm w pięciu węższych zakresach mas: A – od 1 do 2 kDa, B – od 2 do 3 kDa, C – od 3 do 4 kDa, D – od 4 do 6,5 kDa, E – od 6,5 do 10 kDa.

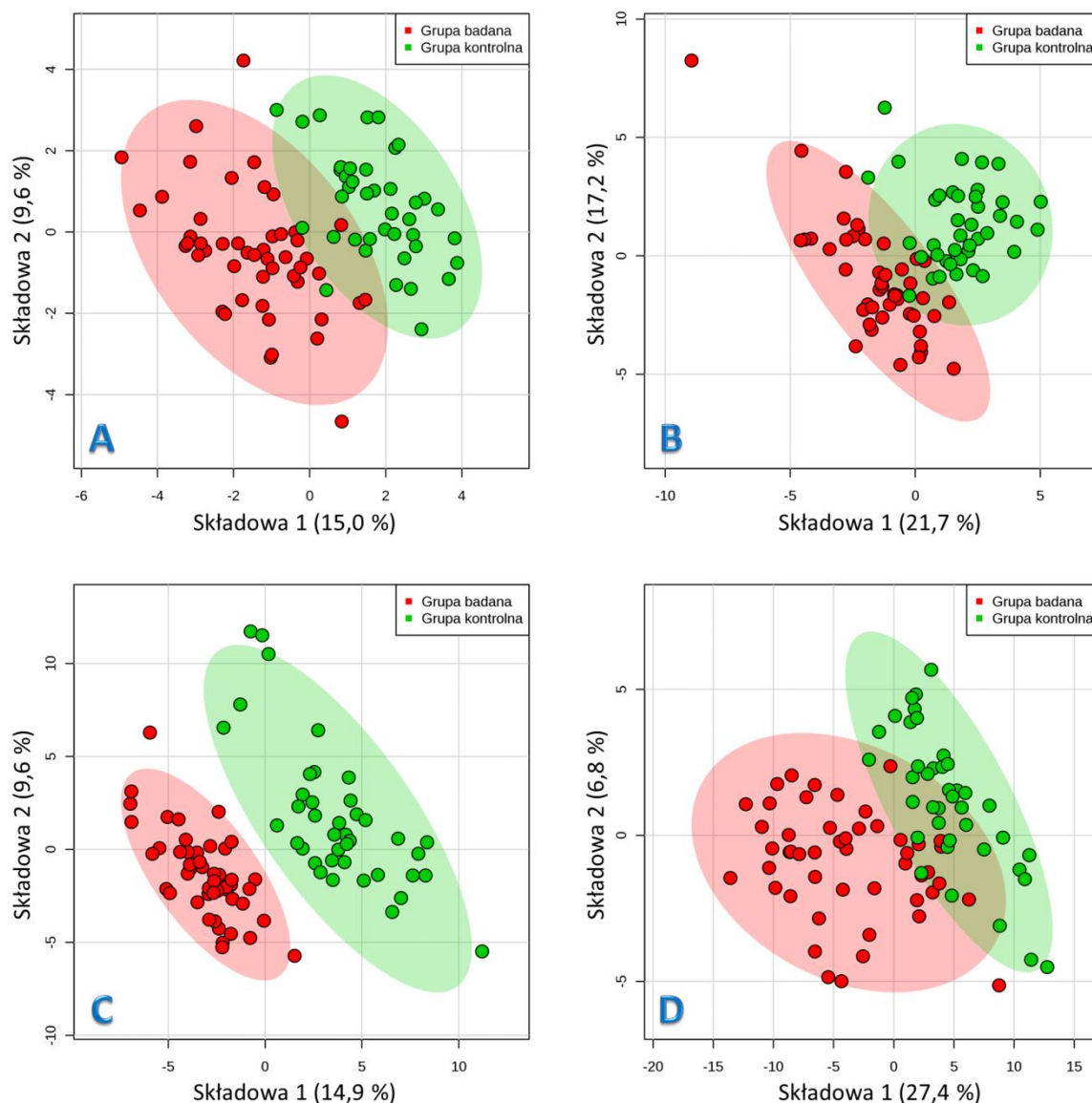


Rycina 16. Krzywe ROC dla metioniny i sakrozyny. W nawiasach pod wartościami AUC podano 95 % przedział ufności. Czerwone punkty odpowiadają optymalnym punktom odcięcia, dla których w nawiasie podano wartości swoistości i czułości.

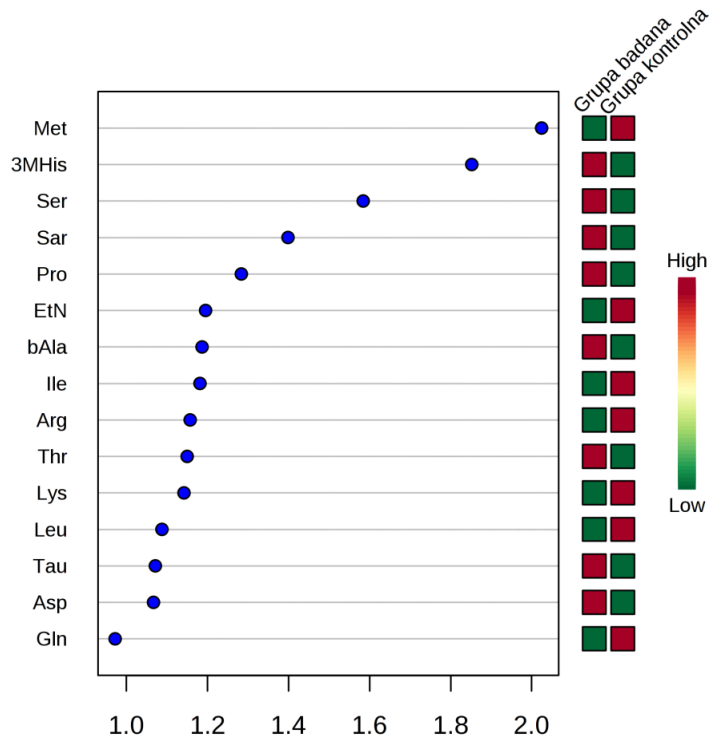




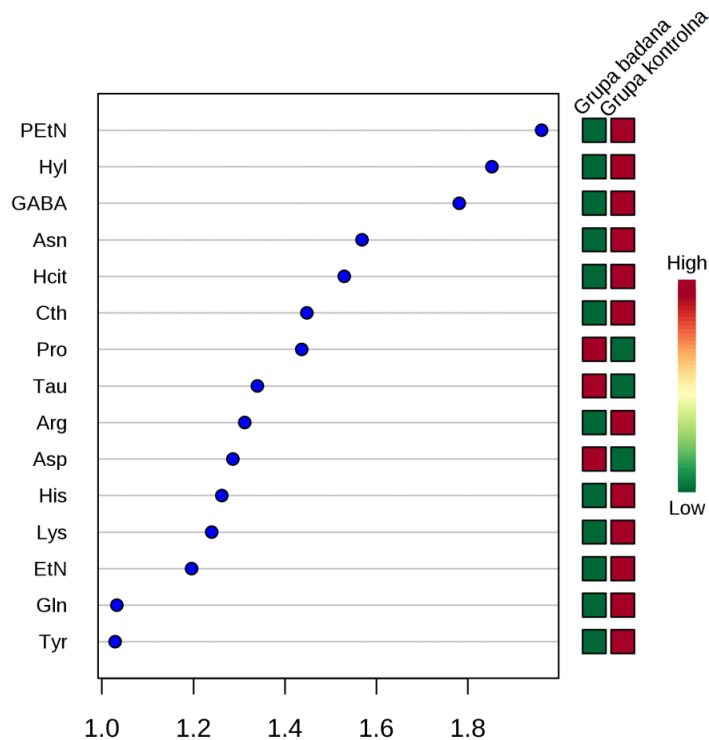
Rycina 17. Wykresy pudełkowe (u góry) oraz wykresy jądrowego estymatora gęstości (u dołu) dla stężeń aminokwasów w surowicy przed normalizacją oraz po normalizacji.



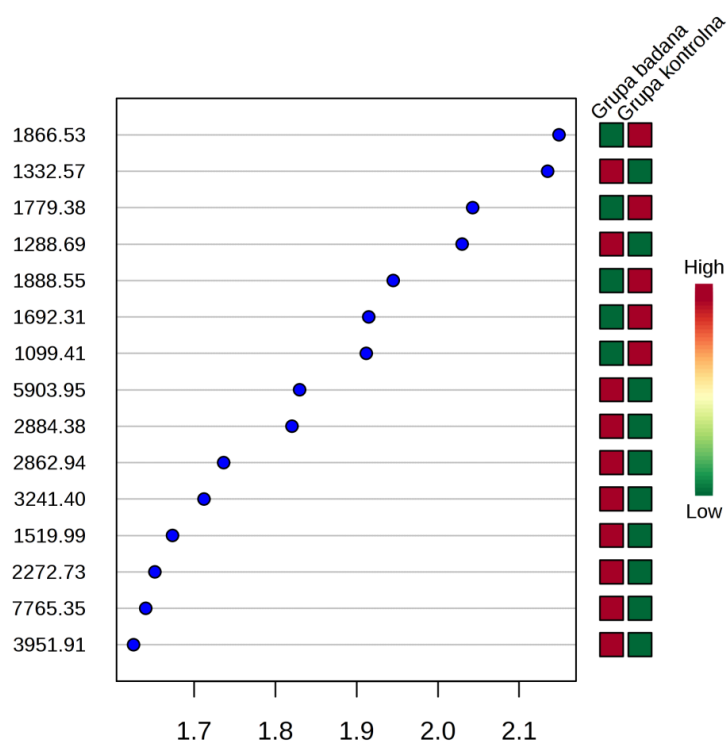
Rycina 18. Wykresy wektorów odległości pierwszej składowej względem drugiej składowej otrzymane w analizach PLS-DA czterech zbiorów danych (A – stężenia aminokwasów w próbkach surowicy, B – stężenia aminokwasów w próbkach moczu znormalizowane na kreatyninę, C – intensywności peptydów w próbkach surowicy, D – intensywności peptydów w próbkach moczu) dla dwóch analizowanych grup: grupy badanej ( $n = 49$ , kolor czerwony) i grupy kontrolnej ( $n = 40$ , kolor zielony). W nawiasach podano procent wyjaśnianej zmienności przez poszczególne składowe.



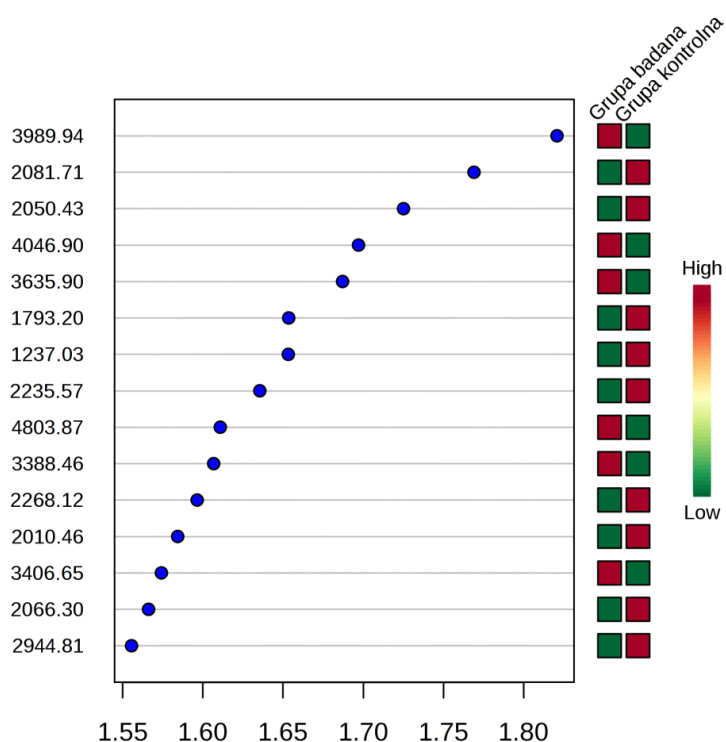
Rycina 19. Zmienne o największym znaczeniu w klasyfikacji (najwyższe wartości VIP) w analizie PLS-DA wykorzystującej stężenia aminokwasów w próbkach surowicy. Czerwone i zielone pola po prawej stronie wskazują na to, czy poziomy odpowiedniej zmiennej są wyższe czy niższe w danej grupie.



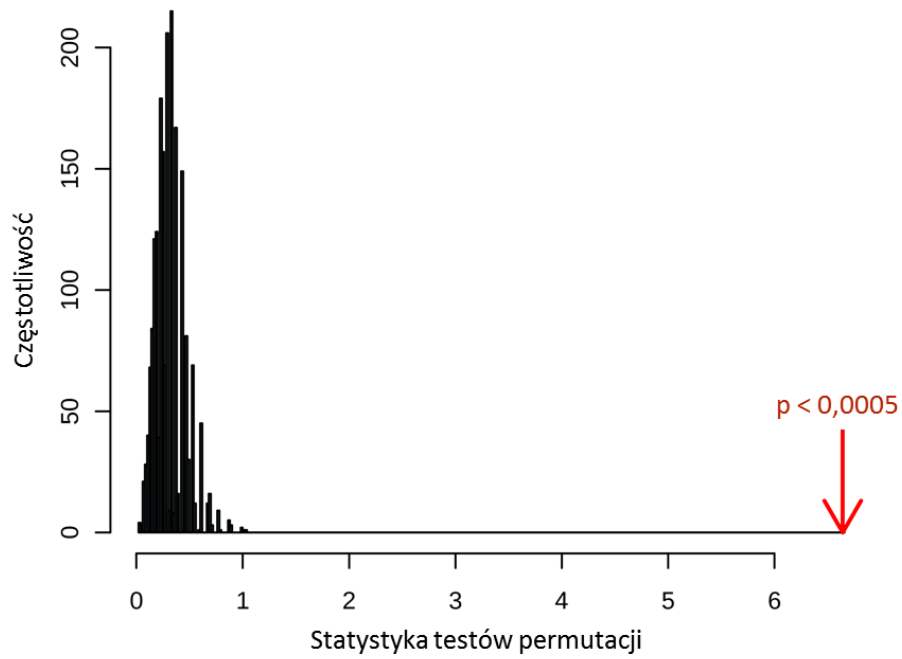
Rycina 20. Zmienne o największym znaczeniu w klasyfikacji (najwyższe wartości VIP) w analizie PLS-DA wykorzystującej stężenia aminokwasów w próbkach moczu znormalizowane na kreatyninę. Czerwone i zielone pola po prawej stronie wskazują na to, czy poziomy odpowiedniej zmiennej są wyższe czy niższe w danej grupie.



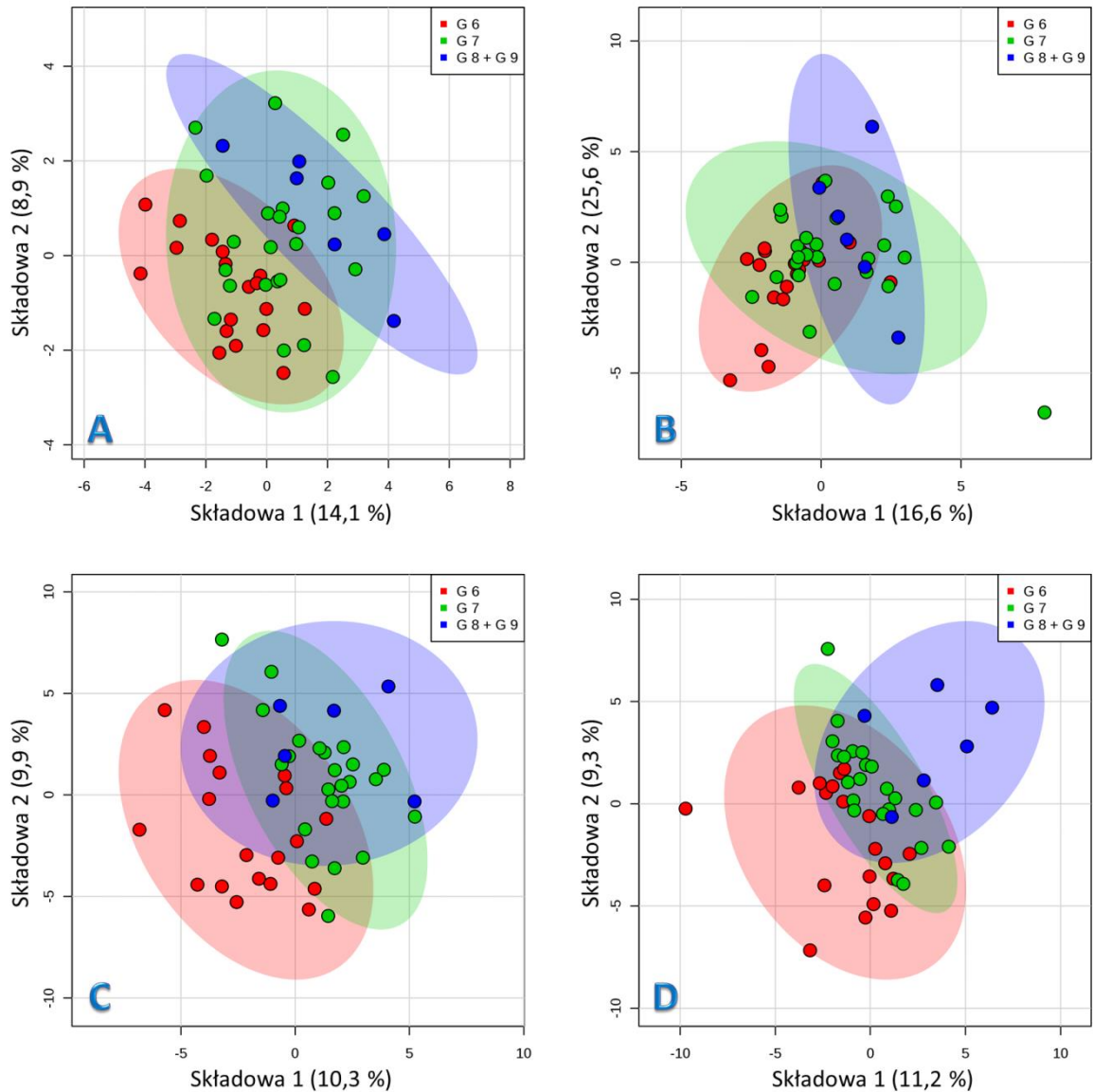
Rycina 21. Zmienne o największym znaczeniu w klasyfikacji (najwyższe wartości VIP) w analizie PLS-DA wykorzystującej intensywność peptydów w próbkach surowicy. Czerwone i zielone pola po prawej stronie wskazują na to, czy poziomy odpowiedniej zmiennej są wyższe czy niższe w danej grupie.



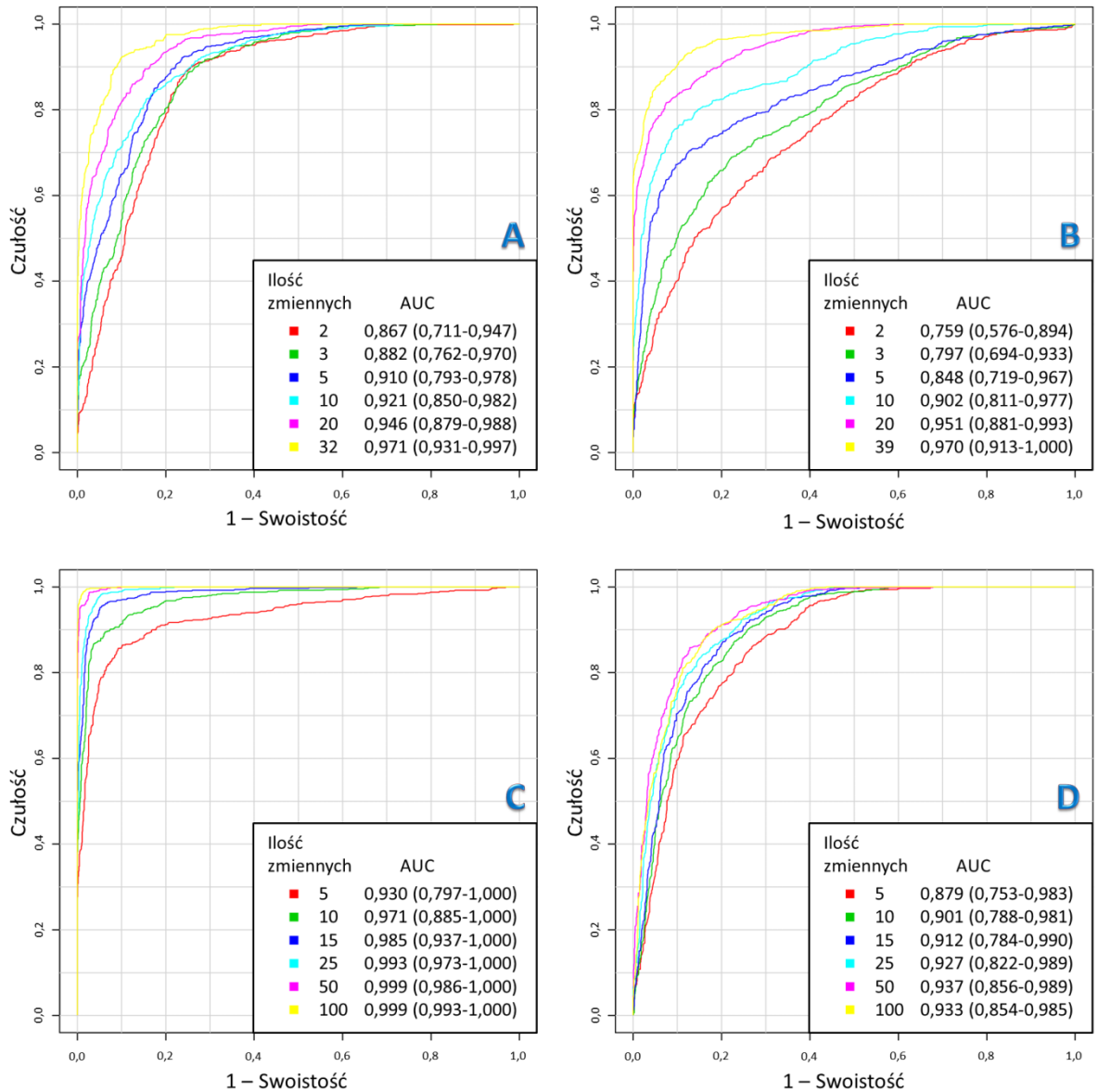
Rycina 22. Zmienne o największym znaczeniu w klasyfikacji (najwyższe wartości VIP) w analizie PLS-DA wykorzystującej intensywność peptydów w próbkach moczu. Czerwone i zielone pola po prawej stronie wskazują na to, czy poziomy odpowiedniej zmiennej są wyższe czy niższe w danej grupie.



Rycina 23. Wyniki testów permutacji dla stężeń aminokwasów w próbkach surowicy, potwierdzające wiarygodność modelu PLS-DA.



Rycina 24. Wykresy wektorów odległości pierwszej składowej względem drugiej składowej otrzymane w analizach PLS-DA czterech zbiorów danych (A – stężenia aminokwasów w próbkach surowicy, B – stężenia aminokwasów w próbkach moczu znormalizowane na kreatyninę, C – intensywności peptydów w próbkach surowicy, D – intensywności peptydów w próbkach moczu) dla trzech analizowanych grup pacjentów z rakiem prostaty: z sześcioma punktami w skali Gleasona ( $n = 19$ , kolor czerwony), siedzioma punktami w skali Gleasona ( $n = 24$ , kolor zielony) oraz ośmioma lub dziewięcioma punktami w skali Gleasona ( $n = 6$ , kolor niebieski). W nawiasach podano procent wyjaśnianej zmienności przez poszczególne składowe.



Rycina 25. Krzywe ROC dla modeli składających się z różnej ilości zmiennych wraz z wartościami AUC oraz w nawiasach 95 % przedziałami ufności otrzymane dla czterech zbiorów danych (A – stężenia aminokwasów w próbkach surowicy, B – stężenia aminokwasów w próbkach moczu znormalizowane na kreatyninę, C – intensywności peptydów w próbkach surowicy, D – intensywności peptydów w próbkach moczu).

## 6. Omówienie wyników

### 6.1. Oznaczanie aminokwasów w jednym cyklu analitycznym w surowicy i moczu przy wykorzystaniu zestawu LC-ESI-QqQ-MS/MS

Prezentowane i omówione w niniejszym rozdziale wyniki odnoszą się do metodyki przedstawionej w Rozdziale 4.3 związanej z oznaczaniem aminokwasów w próbkach surowicy i moczu z wykorzystaniem spektrometru mas 4000 QTRAP (AB Sciex). Do wyników omówionych poniżej odnoszą się Tabele 7-13 oraz Ryciny 6 i 7.

#### 6.1.1. Walidacja metody

Przed wykorzystaniem do analizy próbek rzeczywistych przeprowadzono dodatkowe eksperymenty w celu potwierdzenia walidacji metody LC-MS/MS oznaczania aminokwasów w surowicy i moczu, weryfikacji stabilności czasów retencji i czułości zestawu LC-MS oraz sprawdzenia wydajności reakcji znakowania.

Weryfikacji poddano następujące parametry walidacyjne: dokładność, precyzja (powtarzalność i odtwarzalność) w odniesieniu do oznaczanych stężeń aminokwasów i czasów retencji. Analizy kontrolnego osocza wykazały, że metoda jest dokładna. Wszystkie oznaczone stężenia aminokwasów w kontrolnym osoczu mieściły się w zakresach referencyjnych podanych w certyfikacie (Tabela 7). Przeprowadzone z wykorzystaniem kontrolnego osocza analizy udowodniły ponadto dobrą wydajność całej metodologii. W celu sprawdzenia powtarzalności metody obliczono współczynniki zmienności dla stężeń aminokwasów oraz czasów retencji aminokwasów i ich wzorców wewnętrznych w odniesieniu zarówno do surowicy, jak i moczu. Otrzymane wartości dowiodły dobrej precyzji metody w przypadku obu płynów ustrojowych (Tabela 7 i 8). Bardzo niskie były zwłaszcza współczynniki zmienności dla czasów retencji i wynosiły poniżej 1 % dla powtarzalności i poniżej 3 % dla odtwarzalności.

Przed każdą sekwencją analiz próbek rzeczywistych przeprowadzano test sprawności systemu, aby przygotować zestaw LC-MS do pracy i zweryfikować poprawność jego działania. Test umożliwiał sprawdzenie stabilności czasów retencji i czułości zestawu LC-MS. Pozytywny wynik testu był warunkiem kontynuowania analiz. Wydajność reakcji znakowania i odzysk sprawdzano wykorzystując dwa nieproteogenne aminokwasy: norleucynę i norwalinę. Wydajność procedury była akceptowana, kiedy odzysk tych aminokwasów mieścił się w zakresie 20 % wartości referencyjnej podanej w certyfikacie analizy dołączonym do każdego zestawu aTRAQ.



Wszystkie oznaczone stężenia norleucyny i norwaliny mieściły się w podanym zakresie.

Wyniki weryfikacji walidacji metody LC-MS/MS oznaczania aminokwasów z wykorzystaniem odczynników aTRAQ na próbkach surowicy zostały opublikowane w pracy pt. „Effects of a honeybee sting on the serum free amino acid profile in humans” (PLoS One, 2014, Vol. 9(7)) [144].

### 6.1.2. Analiza próbek rzeczywistych

Wykorzystując technikę LC-MS/MS oraz odczynnik aTRAQ uzyskano profile aminokwasowe surowicy i moczu. Ryciny 6 i 7 przedstawiają chromatogramy otrzymane dla wybranych próbek odpowiednio surowicy i moczu pacjenta z rakiem prostaty uzyskane w analizach LC-MS/MS. Dla każdego przejścia masowego wykreślony został osobny chromatogram, a różne przejścia masowe przedstawione zostały różnymi kolorami. Pomimo iż zastosowana metoda LC-MS/MS pozwala oznaczać 42 aminokwasy w próbce, nie wszystkie z nich zostały wykryte w analizowanych próbkach. W przypadku próbek surowicy oznaczono we wszystkich próbkach 32 aminokwasy i ich stężenia zostały wykorzystane do dalszych analiz (Tabela 9 i 10). 4 aminokwasy (fosfoetanolamina, kwas  $\gamma$ -amino-n-masłowy, cystationina,  $\delta$ -hydroksylizyna) oznaczono w części próbek, w pozostałych natomiast ich stężenia były poniżej granicy oznaczalności. Te aminokwasy zostały odrzucone z dalszych analiz. 6 aminokwasów (fosfoseryna, kwas argininobursztynowy, homocytrulina, anseryna, karnozyna, homocysteina) było poniżej granicy oznaczalności we wszystkich próbkach surowicy. W przypadku próbek moczu oznaczono we wszystkich próbkach 39 aminokwasów i ich stężenia zostały wykorzystane do dalszych analiz (Tabela 11). 2 aminokwasy (anseryna, homocysteina) oznaczono w części próbek, w pozostałych natomiast ich stężenia były poniżej granicy oznaczalności. Te aminokwasy zostały odrzucone z dalszych analiz. Jeden aminokwas (fosfoseryna) był poniżej granicy oznaczalności we wszystkich próbkach moczu. Tabele 12 i 13 przedstawiają oznaczone stężenia aminokwasów znormalizowane na stężenie kreatyniny (stosunki stężeń aminokwas / kreatynina) w próbkach moczu. Ponieważ metoda oznaczania aminokwasów została zwalidowana między innymi pod kątem powtarzalności, w związku z tym odchylenia standardowe uzyskane w oznaczaniu aminokwasów w dwóch grupach (badanej i kontrolnej) w surowicy i moczu są związane jedynie ze zmiennością populacyjną.

Wyniki przeprowadzonych jedno- i wielozmiennowych analiz statystycznych z wykorzystaniem jako danych oznaczonych stężeń aminokwasów zostały przedstawione w Rozdziale 6.5.

## 6.2. Oznaczanie kreatyniny w moczu przy wykorzystaniu zestawu LC-ESI-QqQ-MS/MS

Prezentowane i omówione w niniejszym rozdziale wyniki odnoszą się do metodyki przedstawionej w Rozdziale 4.4 związanej z oznaczaniem kreatyniny w próbkach moczu z wykorzystaniem spektrometru mas 4000 QTRAP (AB Sciex). Do wyników omówionych poniżej odnoszą się Tabele 14-16 oraz Ryciny 8-11.

### 6.2.1. Optymalizacja parametrów MS

Opracowanie metody oznaczania kreatyniny w moczu obejmowało optymalizację jonów pseudomolekularnych kreatyniny i wzorca wewnętrznego, analizę widm masowych tych związków, wybór i optymalizację jonów potomnych analizowanych związków. Obserwowano protonowane cząsteczki kreatyniny przy  $m/z$  114,1 oraz nafazoliny przy  $m/z$  211,1. Po fragmentacji w komorze kolizyjnej obserwowano kilka jonów potomnych w przypadku obu związków. Dla kreatyniny najbardziej intensywne były jony potomne o  $m/z$  44,1 i 86,1. Widma fragmentacyjne kreatyniny przy różnych wartościach energii kolizyjnej przedstawione są na Rycinie 8. Dla nafazoliny najbardziej intensywne były jony potomne o  $m/z$  141,1 i 115,1. W przypadku obu związków monitorowano po dwa przejścia MRM. Tabela 14 przedstawia wybrane przejścia masowe i odpowiadające im parametry MS: potencjał rozpadu klastrów, potencjał wejścia, energię kolizyjną oraz potencjał wyjścia z komory kolizyjnej. Wyznaczono również dla obu związków średni stosunek pierwszego przejścia masowego (wykorzystywanego do analizy ilościowej) do drugiego przejścia masowego (wykorzystywanego do potwierdzenia tożsamości związku) ( $Q/q$ ).

### 6.2.2. Optymalizacja parametrów HPLC

W trakcie opracowywania metody oznaczania kreatyniny w moczu przetestowano elucję izokratyczną i gradientową (przy różnych gradientach). Celem było uzyskanie jak najbardziej satysfakcjonujących wyników. Zastosowanie elucji gradientowej pozwoliło uzyskać lepsze kształty pików niż w przypadku elucji izokratycznej. Czas retencji dla kreatyniny wynosił 1,93 min, natomiast dla wzorca wewnętrznego 2,61 min. Rycina 9 przedstawia chromatogramy otrzymane dla roztworu wzorca kreatyniny i dla próbki moczu pacjenta z rakiem prostaty uzyskane w analizie LC-MS/MS. Rozdział gradientowy wykorzystany w opracowanej metodzie stwarza

możliwość włączenia do metody analizy innych klinicznie ważnych związków o szerokim zakresie polarności w jednym cyklu analitycznym.

### 6.2.3. Walidacja metody

Przed wykorzystaniem do analizy próbek rzeczywistych metoda LC-MS/MS oznaczania kreatyniny w moczu została zwalidowana. Walidacji poddano następujące parametry: selektywność, dokładność, precyzję (powtarzalność i odtwarzalność), liniowość, zakres, granicę wykrywalności, granicę oznaczalności oraz stabilność. Dobre parametry walidacji potwierdziły, że nafazolina może być wykorzystana jako wzorzec wewnętrzny w oznaczaniu kreatyniny w moczu.

Identyczne chromatogramy roztworów wzorcowych kreatyniny i próbek rzeczywistych dla każdego przejścia MRM potwierdziły brak interferujących pików w czasie retencji kreatyniny i wzorca wewnętrznego na chromatogramach próbek moczu (Rycina 9). Świadczy to o wysokiej selektywności metody. Co więcej, monitorowanie dwóch przejść masowych (ilościowego i jakościowego) i wyznaczenie stosunku intensywności odpowiadających im pików pozwala odróżnić analizowane związki od interferencji i potwierdzić tożsamość związków. Stosunek przejścia ilościowego do jakościowego (Q/q) jest bowiem wartością charakterystyczną dla każdego związku. Takie podejście wykorzystujące jon macierzysty i dwa jony potomne zapewnia uzyskanie 4 punktów identyfikacyjnych dla analizowanego związku, co spełnia wytyczne Unii Europejskiej [152]. Wyznaczone stosunki Q/q porównywano ze średnim stosunkiem Q/q wyznaczonym dla roztworów wzorcowych. Każdorazowo mieściły się one w zakresie tolerancji 20 %, co pozwoliło potwierdzić otrzymane wyniki analiz próbek moczu.

Metoda jest liniowa w zakresie stężeń od 5 do 1500 ng/ml, co odpowiada zakresowi stężeń kreatyniny od 1 do 300 mg/dl w nierozcieńczonych próbkach moczu. Szeroki zakres liniowości metody jest pożądanym w przypadku oznaczania kreatyniny ze względu na to, że związek ten występuje w moczu w dużym zakresie stężeń [159]. Dobrą liniowość opracowanej metody potwierdzają współczynniki regresji, które były wyższe niż 0,995 dla każdej przygotowanej krzywej wzorcowej. Krzywe wzorcowe zapewniły dobrą dokładność pomiarów kreatyniny, gdyż stężenia roztworów do krzywych wzorcowych obliczone na ich podstawie mieściły się w zakresie 15 % rzeczywistej wartości.

Granica wykrywalności metody wynosi 2 ng/ml, natomiast granica oznaczalności wynosi 5 ng/ml. Granica oznaczalności jest porównywalna z opracowanymi wcześniej metodami LC-MS/MS oznaczania kreatyniny w moczu [121,

133]. Możliwość pomiaru niższych stężeń kreatyniny nie wydaje się konieczna ze względu na to, że metabolit ten nie występuje w moczu w śladowych ilościach nawet uwzględniając 2000-krotne rozcieńczenie próbki. Ważniejsza z punktu widzenia spektrometrii mas jest możliwość oznaczeń w małych objętościach próbek biologicznych. Technika chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas jest podatna na występowanie efektów matrycy, związanych ze składnikami matrycy opuszczającymi kolumnę chromatograficzną w czasie retencji analitów i wpływających na wydajność jonizacji analitów w źródle jonów. Jednym z najprostszych sposobów ograniczenia efektów matrycy jest rozcieńczenie próbki [160]. Ze względu na niską granicę oznaczalności opracowanej metody próbka moczu może być rozcieńczona 2000-razy, co redukuje wpływ składników matrycy.

Dokładność metody została sprawdzona przy użyciu próbek kontrolnych moczu obciążonych trzema różnymi poziomami wzorca kreatyniny (niskim, średnim i wysokim). Otrzymane wyniki odzysku dla wszystkich próbek kontrolnych spełniały kryteria akceptowalności i mieściły się w zakresie od 90,3 % do 97,7% (Tabela 15). Można zatem wnioskować, że dokładność metody jest dobra niezależnie od stężenia kreatyniny w próbce moczu.

Opracowana metoda charakteryzuje się zadowalającą precyzją oznaczania kreatyniny. Precyzja została zmierzona dla trzech poziomów stężeń kreatyniny (niskiego, średniego i wysokiego). Powtarzalność metody oraz jej odtwarzalność wyrażone jako współczynniki zmienności (CV) nie przekraczały 15 %. Wartości te dla poszczególnych poziomów stężeń mieściły się w zakresie od 1,17 % do 12,74 % (Tabela 16). Metoda zapewnia zatem powtarzalne pomiary stężenia kreatyniny w próbkach moczu w całym zakresie liniowości.

Warunki testowane w badaniach stabilności odpowiadały możliwym sytuacjom występującym podczas przygotowywania próbek i ich analizy. Potwierdzono stabilność kreatyniny w moczu po trzech cyklach zamrażania i rozmrażania. Różnice w zawartości kreatyniny nie przekraczały bowiem 12 % w porównaniu do świeżych próbek moczu. Badania stabilności krótkoterminowej wykazały stabilność kreatyniny w moczu po przechowywaniu w temperaturze pokojowej przez 4 godziny. Różnice w zawartości kreatyniny nie przekraczały bowiem 15 % w porównaniu do świeżych próbek moczu. Wykazano stabilność roztworów podstawowych kreatyniny i wzorca wewnętrznego przechowywanych w temperaturze pokojowej przez 6 godzin oraz w temperaturze -20 °C przez 4 miesiące. Różnice w zawartości kreatyniny i wzorca wewnętrznego wynosiły poniżej 10 % w porównaniu do świeżo przygotowanych roztworów podstawowych. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów można również wyciągnąć wniosek o dobrej stabilności kreatyniny w przygotowanych

próbkach przechowywanych przez 24 i 48 godzin w autosamplerze. Różnice w zawartości kreatyniny znajdowały się w granicach od -1,6 % do 10,1 % oraz od -14,0 % do 4,9 % dla próbek przechowywanych odpowiednio przez 24 i 48 godzin w porównaniu do tych samych próbek moczu analizowanych bezpośrednio po przygotowaniu.

#### 6.2.4. Porównanie z metodą wykorzystującą reakcję Jaffe'go

Wyniki oznaczeń kreatyniny w moczu otrzymane przy wykorzystaniu opracowanej metody LC-MS/MS zostały porównane z wynikami uzyskanymi laboratoryjną metodą kolorymetryczną. W tym celu określono zawartość kreatyniny w 20 próbkach moczu za pomocą metody kolorymetrycznej wykorzystującej reakcję Jaffe'go. Pomimo że współczynnik korelacji  $R^2$  pomiędzy dwoma zbiorami wyników wynosił 0,9844, wykazano że metoda Jaffe'go zawyżyła stężenia kreatyniny w moczu w 80 % przetestowanych próbek (Rycina 10). Stężenia te były średnio o 4,6 % wyższe niż oznaczone w metodzie LC-MS/MS. Te wyniki są zgodne z wynikami uzyskanymi przez inne zespoły badawcze [161, 162], które również wskazują na zawyżanie stężeń kreatyniny przez metodę Jaffe'go. Można zatem wyciągnąć wniosek, iż metoda kolorymetryczna powinna zostać zrewidowana jako złoty laboratoryjny standard w oznaczaniu kreatyniny. Natomiast metoda LC-MS/MS może być rozważona jako nowa potencjalna metoda oznaczania kreatyniny w moczu w laboratoriach.

#### 6.2.5. Analiza próbek rzeczywistych

Wykorzystując opracowaną metodę LC-MS/MS oznaczono stężenie kreatyniny w moczu pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem prostaty (grupa badana) i w moczu osób zdrowych (grupa kontrolna). Potwierdzenie tożsamości kreatyniny przeprowadzono w oparciu o obliczenie stosunku intensywności pików przejścia ilościowego do jakościowego (Q/q) i porównanie ze średnim stosunkiem Q/q wyznaczonym dla roztworów wzorcowych kreatyniny. We wszystkich przeanalizowanych próbkach moczu różnica wartości stosunku Q/q w porównaniu ze stosunkiem średnim wynosiła poniżej 3 %. Rycina 11 pokazuje zgodność stosunku Q/q dla kreatyniny pomiędzy roztworem wzorcowym kreatyniny a wybraną próbką moczu.

Średnie stężenia kreatyniny oznaczone w próbkach moczu pacjentów z grupy badanej i z grupy kontrolnej wynosiły odpowiednio 121,4 mg/dl i 79,7 mg/dl, natomiast średnie stężenie tego metabolitu we wszystkich próbkach wynosiło 102,6 mg/dl. Zgodnie z danymi literaturowymi stężenia te odpowiadają przeciętnym poziomom

kreatyniny w moczu w populacji ludzkiej [134, 159]. Arndt [159] podaje, że średnie stężenie kreatyniny w moczu wyznaczone dla próbek pochodzących od 12456 mężczyzn wynosiło 97,5 mg/dl. Najniższe stężenie kreatyniny oznaczone dla grupy badanej wynosiło 32,2 mg/dl, natomiast dla grupy kontrolnej 30,9 mg/dl. Dowodzi to, że nie ma potrzeby opracowywania metody o większej czułości. Najwyższe stężenie kreatyniny wynosiło z kolei 298,0 mg/dl dla grupy badanej i 218,0 mg/dl dla grupy kontrolnej. Według Światowej Organizacja Zdrowia (WHO) należy unikać zarówno zbyt stężonych, jak i zbyt rozcieńczonych próbek moczu pobieranych do badań związanych z monitorowaniem ekspozycji na czynniki chemiczne w miejscu pracy [163]. Zgodnie z rekomendacją WHO, aby uznać próbkę moczu za ważną, powinna ona charakteryzować się stężeniem kreatyniny w zakresie od 30 do 300 mg/dl. Te wytyczne można wykorzystać do selekcji próbek moczu również w innych aplikacjach dotyczących analizy moczu. Można zatem wnioskować, że wszystkie próbki moczu przeanalizowane z wykorzystaniem opracowanej metody LC-MS/MS mogą zostać użyte w dalszych badaniach związanych z analizą innych związków wydalanych z moczem (oznaczanie aminokwasów i profilowanie peptydowe w próbkach moczu).

Technika LC-MS/MS stwarza możliwości identyfikacji i oznaczania wielu związków w małej objętości próbki biologicznej i w jednym cyklu analitycznym. W związku z tym, że opracowana metoda wykorzystuje rozdział gradientowy i detekcję MS oraz nie wymaga derywatywacji, może ona zostać zaadaptowana do jednoczesnego oznaczania innych związków wydalanych z moczem obok kreatyniny.

Przygotowana została publikacja doświadczalna pt. „Creatinine determination in urine by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry method” prezentująca opracowaną metodę oznaczania kreatyniny w moczu przy wykorzystaniu zestawu LC-MS. Praca została przyjęta do druku w czasopiśmie *Acta Poloniae Pharmaceutica. Drug Research*.

### 6.3. Profilowanie peptydów obecnych w surowicy i moczu przy wykorzystaniu zestawu MALDI-TOF-MS

Prezentowane i omówione w niniejszym rozdziale wyniki odnoszą się do metodyki przedstawionej w Rozdziale 4.6 związanej z profilowaniem peptydów w próbkach surowicy i moczu z wykorzystaniem spektrometru mas UltrafleXtreme (Bruker Daltonics). Do wyników omówionych poniżej odnoszą się Tabele 17-18 oraz Ryciny 12-15.

Wykorzystując technikę MALDI-TOF-MS otrzymano profile peptydowe surowicy i moczu w zakresie mas 1000 – 10000 Da. Masy te odpowiadają jednokrotnie naładowanym zjonizowanym peptydom  $[M+H]^+$ . Kalibracja zewnętrzna została wykonana z wykorzystaniem mieszaniny wzorców mieszczących się w zakresie mas 1 – 10 kDa: od 1047,189 Da (angiotensyna II) do 8565,764 Da (ubikwityna 1). Średnie odchylenie mas wzorców w stosunku do mas referencyjnych wynosiło poniżej 100 ppm. Widma MS surowicy i moczu wygenerowano po uprzednim przetestowaniu procedury przygotowania próbek. Procedura ta wymagała optymalizacji w przypadku próbek moczu, aby zapewnić widma o odpowiedniej intensywności. Różnice w porównaniu do próbek surowicy obejmowały sposób przeprowadzenia oczyszczania próbek, rozcieńczania, przygotowania matrycy i nanoszenia próbki na płytkę.

Ryciny 12 i 13 przedstawiają tak zwane „widoki żelowe” (ang. „gel view”) profili peptydowych odpowiednio surowicy i moczu dla wszystkich analizowanych próbek z dwóch grup w całym zakresie mas otrzymane w programie ClinPro Tools. Im ciemniejszy kolor, tym większa była intensywność odpowiedniego piku w danym widmie. Taki widok pozwala porównać ze sobą piki o określonych masach pomiędzy wszystkimi próbkami. Na czerwono zaznaczone są próbki odrzucone przez program ze względu na zbyt niską ogólną intensywność widma. Ryciny 14 i 15 przedstawiają uśrednione profile peptydowe odpowiednio surowicy i moczu dla grupy badanej i kontrolnej. Dzięki takiej wizualizacji możliwe jest porównanie profili pomiędzy grupami i próba wytypowania pików różnicujących. Ocena graficzna zarówno „widoków żelowych”, jak i uśrednionych widm, pozwoliła stwierdzić, iż profile peptydowe surowicy i moczu są różne u pacjentów z rakiem prostaty i u osób zdrowych. W celu pełniejszego scharakteryzowania tych różnic i oceny możliwości klasyfikacyjnych opartych o profile peptydowe wygenerowano listy pików wraz z ich intensywnościami. W przeanalizowanych próbkach surowicy 136 pików odpowiadających peptydom miało stosunek S/N powyżej 5 i ich intensywności zostały wykorzystane do dalszych analiz (Tabela 17). W przypadku próbek moczu stosunek S/N wyższy niż 5 miało 149 pików i ich intensywności wykorzystano w dalszych analizach (Tabela 18). W nielicznych



przypadkach (0,3 %) niektóre peptydy nie zostały wykryte we wszystkich próbkach ze względu na zbyt niski stosunek S/N. Intensywności takich peptydów mają wartość 0, jednakże na potrzeby wielowymiarowych analiz statystycznych zostały potraktowane jako braki danych i zastąpione połową minimalnej pozytywnej intensywności danego peptydu. Wartości m/z peptydów należy traktować jako średnie masy  $[M+H]^+$ , oddzielnie dla zbioru widm wygenerowanych dla próbek surowicy i moczu. Identyfikacja peptydów nie była konieczna i nie była celem niniejszej pracy, ponieważ skupiono się na analizie chemometrycznej profili peptydowych w postaci listy pików (sygnałów m/z) wraz z ich intensywnościami i ocenie ich zdolności klasyfikacyjnych.

Wyniki przeprowadzonych jedno- i wielozmiennowych analiz statystycznych z wykorzystaniem jako danych wyznaczonych intensywności peptydów zostały przedstawione w Rozdziale 6.5.

## 6.4. Oznaczanie wybranych biomarkerów nowotworowych w surowicy z wykorzystaniem separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej

Prezentowane i omówione w niniejszym rozdziale wyniki odnoszą się do metodyki przedstawionej w Rozdziale 4.7 związanej z oznaczaniem wybranych biomarkerów nowotworowych w próbkach surowicy z wykorzystaniem separacji magnetycznej i cytometru przepływowego Bio-Plex MAGPIX (Bio-Rad). Do wyników omówionych poniżej odnoszą się Tabele 19-21.

### 6.4.1. Walidacja metody

Metoda separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej oznaczania białek z wykorzystaniem zestawu Bio-Plex jest zwalidowana. Do parametrów walidacyjnych metody odnosi się Rozdział 4.7.7. w Części doświadczalnej. Dopasowanie krzywych kalibracyjnych przeprowadzono z wykorzystaniem 5-parametrowej regresji logistycznej, która jest preferowanym typem regresji dla technik multipleksowych [164]. Podstawową zaletą regresji logistycznej w porównaniu z regresją liniową jest możliwość przeprowadzania dokładnych oznaczeń w szerszym zakresie stężeń. Poprawność dopasowania krzywych kalibracyjnych oceniono przy pomocy trzech parametrów: odzysku standardów, wariancji resztkowej i prawdopodobieństwa dopasowania. Odzysk standardów wyznaczono poprzez obliczenie stężeń kalibratorów z równań regresji i porównanie ich ze stężeniami rzeczywistymi [164, 165]. Odzysk standardów wyrażono jako procentowy stosunek stężeń obliczonych do oczekiwanych. Punkty krzywych, dla których odzysk nie mieścił się w założonym zakresie 80-120 %, zostały odrzucone w celu otrzymania dokładniejszych krzywych kalibracyjnych. W przypadku wszystkich analizów odzysk w podanych granicach miało minimum 6 punktów, czyli tyle, ile stanowi najmniejszą wymaganą ilość punktów dla regresji logistycznej. Wariancja resztkowa mówi o tym, jak dobrze krzywa jest dopasowana do poszczególnych punktów. Natomiast prawdopodobieństwo dopasowania stanowi statystyczną ocenę wariancji resztkowej i mieści się w granicach od 0 (brak dopasowania) do 1 (całkowite dopasowanie). Wartości prawdopodobieństwa dopasowania dla oznaczanych białek mieściły się w granicach od 0,6395 dla osteopontyny do 0,9987 dla prolaktyny. Zakres metody jest inny dla każdego analitu. Wszystkie wartości LLOQ i ULOQ przedstawione zostały w Tabelach 20 i 21.

Weryfikacji poddano dokładność metody. Analizy roztworów kontrolnych wykazały, że metoda jest dokładna. Wszystkie oznaczone stężenia białek w roztworach kontrolnych, zarówno o wysokim, jak i niskim stężeniu, mieściły się w

zakresach referencyjnych podanych w certyfikacie (Tabela 19). Przed analizami z wykorzystaniem cytometru przepływowego wykonano kalibrację urządzenia, a także przeprowadzono test sprawności systemu, aby zweryfikować kalibrację czytnika. Pozytywny wynik testu był warunkiem kontynuowania analiz.

#### **6.4.2. Analiza próbek rzeczywistych**

Wykorzystując technikę separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej oznaczono stężenia wybranych biomarkerów białkowych w próbkach surowicy. Wszystkie białka zostały wykryte i oznaczone w analizowanych próbkach, a stężenia białek mieściły się w zakresie metody. Wszystkie białka zostały wykorzystane do dalszych analiz. Tabele 20 i 21 przedstawiają oznaczone stężenia białek w próbkach surowicy odpowiednio pacjentów z grupy badanej i kontrolnej wraz z dolnymi i górnymi granicami oznaczalności dla wszystkich białek.

Wyniki przeprowadzonych jednozmiennych analiz statystycznych z wykorzystaniem jako danych oznaczonych stężeń białek zostały przedstawione w Rozdziale 6.5.

## 6.5. Statystyczna analiza otrzymanych wyników

Prezentowane i omówione w niniejszym rozdziale wyniki odnoszą się do metodyki przedstawionej w Rozdziale 4.8 związanej ze statystyczną analizą wyników z wykorzystaniem programów Statistica 10.0 (StatSoft Polska), ClinPro Tools 3.0 (Bruker Daltonics) oraz platformy online MetaboAnalyst 3.0. Do wyników omówionych poniżej odnoszą się Tabele 22-30 oraz Ryciny 16-25.

W ramach realizacji pracy doktorskiej otrzymano profile aminokwasowe w próbkach surowicy i moczu przy użyciu metody LC-MS/MS, profile peptydowe w próbkach surowicy i moczu przy użyciu techniki MALDI-TOF-MS oraz profile wybranych biomarkerów białkowych w próbkach surowicy przy użyciu techniki separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej. Każda próbka wykorzystana do analiz należała do jednej z dwóch grup: grupy badanej, którą tworzyli pacjenci ze zdiagnozowanym rakiem prostaty, lub grupy kontrolnej, na którą składali się zdrowi mężczyźni. Wykorzystując otrzymane wyniki przeprowadzono następnie statystyczną analizę danych w celu porównania profili związków endogennych w surowicy oraz moczu pacjentów cierpiących na raka prostaty i zdrowych mężczyzn. Wyniki uzyskane we wszelkiego rodzaju badaniach naukowych znaczą bowiem tyle, co ich właściwa analiza i poprawna interpretacja. Przeprowadzone analizy statystyczne wykazały, że rak prostaty wywołuje zmiany w surowicy i moczu na poziomie proteomicznym i metabolomicznym. Istnieje zatem korelacja pomiędzy stanem biologicznym pacjenta a jego statusem proteomicznym i metabolomicznym.

### 6.5.1. Jednozmiennowe analizy statystyczne

Przeprowadzone jednozmiennowe analizy statystyczne pozwoliły wskazać, które zmienne pojawiały się na innych poziomach w próbkach pobranych od chorych na raka prostaty w porównaniu z próbkami kontrolnymi. W przypadku oznaczanych aminokwasów w surowicy wykazano, że statystycznie istotne różnice dotyczyły 18 z 32 oznaczonych związków, spośród których 4 były obecne na istotnie wyższych poziomach w grupie badanej. Były to (w kolejności od najniższej to najwyższej wartości prawdopodobieństwa  $p$ , od  $p = 0,006$  do  $p = 0,034$ ): sarkozyna, 3-metylo-L-histydyna,  $\beta$ -alanina oraz kwas asparaginowy. Natomiast 14 aminokwasów wykazywało poziomy istotnie niższe w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną. Wśród nich sześć aminokwasów, dla których wartość prawdopodobieństwa  $p$  była najniższa ( $p < 0,00002$ ), to: metionina, etanoloamina, glutamina, izoleucyna, arginina oraz leucyna.

W przypadku aminokwasów w moczu różne statystycznie poziomy stwierdzono dla 26 z 39 związków, spośród których jeden (tauryna) był obecny na istotnie wyższym poziomie w grupie badanej ( $p = 0,032$ ), natomiast poziomy 25 były istotnie niższe w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną. Siedem aminokwasów, dla których w przypadku moczu wartość  $p$  była najniższa ( $p < 0,00002$ ), to: kwas  $\gamma$ -amino-n-masłowy, fosfoetanolamina, etanolamina, homocytrulina, arginina,  $\delta$ -hydroksylizyna i asparagina. Nie wykazano natomiast istotnych statystycznie różnic w poziomach sarkozyny w moczu pomiędzy grupą pacjentów z rakiem prostaty a grupą kontrolną.

Porównanie średnich poziomów oznaczonych aminokwasów w grupie badanej i kontrolnej w płynach ustrojowych (surowicy i moczu) wraz z wartościami  $p$  przedstawia Tabela 22. Na podstawie Tabeli 22 można wyciągnąć wniosek, że stężenia aminokwasów w większości przypadków korelowały ze sobą w surowicy i moczu: w przypadku 24 z 32 aminokwasów, oznaczonych w obu analizowanych płynach ustrojowych, podwyższenie lub obniżenie poziomu danego aminokwasu w surowicy pacjentów z rakiem prostaty w porównaniu do grupy kontrolnej związane było z podobną zmianą poziomu tego aminokwasu w moczu.

Analizy wykorzystujące intensywności peptydów otrzymane w wyniku profilowania peptydowego wykazały statystycznie istotne różnice dotyczące 65 ze 136 peptydów w przypadku surowicy i 108 ze 149 w przypadku moczu. Pięć peptydów, dla których wartość  $p$  była najniższa w przypadku surowicy to peptydy o masach: 1288,69 Da, 1099,41 Da, 1866,53 Da, 1888,55 Da i 1779,38 Da. Natomiast w przypadku moczu najniższe wartości  $p$  uzyskano dla peptydów o masach: 1793,20 Da, 2444,56 Da, 2235,57 Da, 1237,03 Da i 2050,43 Da.

Przeprowadzone analizy wykorzystujące stężenia oznaczonych białek w surowicy wykazały, że 10 z 16 białek różni się istotnie statystycznie pomiędzy grupami (Tabela 23). Wszystkie 10 białek było obecnych na istotnie wyższych poziomach w grupie badanej. Białkami tymi, w kolejności od najniższej do najwyższej wartości  $p$ , były: sVEGFR-1, HGF, osteopontyna, FGF-basic, G-CSF, PDGF-AB/BB, SCF, sEGFR, PECAM-1 i sVEGFR-2.

Rycina 16 przedstawia przykładowe krzywe ROC wykreślone na podstawie stężeń dwóch aminokwasów w surowicy: metioniny, której poziomy w dwóch grupach różniły się najbardziej istotnie (najniższa wartość  $p$ ), oraz sarkozyny, która była typowana jako biomarker raka prostaty. Poprawność klasyfikacji w przypadku metioniny była najwyższa spośród wszystkich oznaczonych aminokwasów, o czym świadczy najwyższa wartość pola pod wykresem krzywej ROC wynosząca 0,859 oraz uzyskane wartości czułości i swoistości wynoszące odpowiednio około 90 % i 80 %. W przypadku sarkozyny wartość AUC wynosiła 0,675, natomiast czułość około 60 % i

swoistość około 70 %. Porównanie między sobą modeli klasyfikacyjnych uzyskanych przy użyciu AUC dla zmiennych w czterech zbiorach danych (stężenia aminokwasów w surowicy i moczu oraz intensywności peptydów w surowicy i moczu) wykazało, że w większości przypadków poprawność klasyfikacji dla danej zmiennej była tym wyższa, im niższa była wartość  $p$  uzyskana w testach statystycznych porównujących poziomy zmiennych pomiędzy grupą badaną a kontrolną (dane nie pokazane).

### 6.5.2. Wielozmiennowe analizy statystyczne

Wyniki jednozmiennowych analiz statystycznych sugerują, że pacjenci z rakiem prostaty i osoby zdrowe mogą być rozróżnieni przy użyciu analiz wielozmiennowych.

Przed analizą każdego zbioru danych przeprowadzana była normalizacja. Rycina 17 prezentuje graficzny obraz stężeń aminokwasów w surowicy przed normalizacją i po niej. Wyniki otrzymane w analizie PLS-DA poziomów aminokwasów w surowicy pokazują grupowanie pacjentów w zależności od przyporządkowania ich do jednej z dwóch grup, badanej lub kontrolnej (Rycina 18A). Ranking wartości *variable importance in projection* (ang., VIP) szereguje zmienne zgodnie z ich wkładem do separacji dwóch grup. Wytypowane aminokwasy mające największe znaczenie w klasyfikacji pacjentów (najwyższe wartości VIP) przedstawia Rycina 19. Następujące pięć aminokwasów miało najwyższe wartości VIP: metionina, 3-metylo-L-histydyna, seryna, sakrozyna i prolina. Otrzymany model został zwalidowany poprzez testy permutacji. Cała analiza została w tym celu powtórzona 2000 razy, ale z losowo zamienionymi etykietami grup, a wyniki porównano z tymi odpowiadającymi poprawnym etykietom. Wartość  $p < 0,0005$  dowodzi wiarygodności modelu PLS-DA (Rycina 23).

W analizie PLS-DA stężeń aminokwasów w moczu również osiągnięto dobrą separację grupy badanej i kontrolnej (Rycina 18B). Pięć aminokwasów o największym znaczeniu w tym modelu wg wartości VIP to: fosfoetanolamina,  $\delta$ -hydroksylizyna, kwas  $\gamma$ -amino-n-masłowy, asparagina i homocytrulina (Rycina 20). Zatem w przypadku moczu inne aminokwasy miały największy wkład do separacji dwóch grup niż w przypadku surowicy. Podobnie jak w przypadku analizy profili aminokwasowych w surowicy, także w przypadku moczu walidacja potwierdziła wiarygodność modelu ( $p < 0,0005$ ).

Ryciny 18C i 18D przedstawiają wyniki analiz PLS-DA, w których jako zmienne wykorzystano intensywności peptydów w próbkach odpowiednio surowicy i moczu. Także dla tych zbiorów danych zaobserwowano, że próbki pobrane od pacjentów grupują się w zależności od przyporządkowania ich do grupy osób ze zdiagnozowanym

rakiem prostaty lub grupy kontrolnej. W przypadku próbek surowicy następujące pięć peptydów zostało wskazanych jako zmienne o największym znaczeniu w modelu: 1866,53 Da, 1332,57 Da, 1779,38 Da, 1288,69 Da oraz 1888,55 Da (Rycina 21). Natomiast w przypadku próbek moczu zmiennymi o największym znaczeniu w modelu były peptydy: 3989,94 Da, 2081,71 Da, 2050,43 Da, 4046,90 Da oraz 3635,90 Da (Rycina 22). Oba modele odpowiadające peptydom zostały zwalidowane i w obu przypadkach ich wiarygodność została potwierdzona ( $p = 0,0015$  w przypadku peptydów w próbkach surowicy oraz  $p < 0,0005$  w przypadku peptydów w próbkach moczu).

Ciekawą i wartą przeprowadzenia analizą było sprawdzenie, czy możliwa jest dyskryminacja próbek w zależności od stopnia złośliwości histologicznej raka prostaty. Wykonano w tym celu dodatkowe analizy PLS-DA, przeprowadzone na mniejszych zbiorach danych ograniczonych jedynie do próbek pobranych od pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem prostaty. Ich wyniki przedstawione są na Rycinie 24. W tych analizach pacjentów podzielono na trzy grupy według wzrastającego stopnia złośliwości histologicznej: grupę z sześcioma punktami w skali Gleasona (G 6), grupę z siedmioma punktami w skali Gleasona (G 7) oraz grupę z ośmioma lub dziewięcioma punktami w skali Gleasona (G 8 + G 9). We wszystkich czterech analizach, które wykorzystywały stężenia aminokwasów w próbkach surowicy, stężenia aminokwasów w próbkach moczu znormalizowane na kreatyninę, intensywności peptydów w próbkach surowicy oraz intensywności peptydów w próbkach moczu, zauważyć można grupowanie się pacjentów w zależności od przyporządkowania ich do jednej z trzech grup. Najlepsza separacja dotyczy dwóch skrajnych grup, czyli G 6 oraz G 8 + G 9. Punkty odpowiadające grupie G 7 są natomiast częściowo wymieszane z pozostałymi punktami na wykresach wektorów odległości. Trzy spośród czterech modeli nie przeszły jednak pomyślnie procesu walidacji ( $p = 0,1985$  w przypadku aminokwasów w próbkach surowicy,  $p = 0,0820$  w przypadku aminokwasów w próbkach moczu,  $p = 0,7260$  w przypadku peptydów w próbkach moczu). Potwierdzona została jedynie wiarygodność modelu opartego na peptydach w próbkach surowicy ( $p = 0,0350$ ).

Jednym z warunków przeprowadzenia analizy dyskryminacyjnej jest to, aby liczba zmiennych nie była wyższa niż liczba przypadków podzielona przez 5. W prezentowanych badaniach liczba przypadków wynosiła 89, w związku z tym liczba zmiennych w tym rodzaju analizy statystycznej nie powinna przekraczać 17. Ponieważ w każdym zbiorze danych uzyskanych w analizach LC-MS/MS i MALDI-TOF-MS liczba zmiennych była wyższa niż 17, dlatego nie wszystkie zmienne mogły znaleźć się w utworzonych modelach. Dla każdego zbioru danych analizę dyskryminacyjną przeprowadzono na dwa sposoby. Pierwszy z nich polegał na wykorzystaniu do

budowy modelu metody krokowej postępującej. Zgodnie z zasadą tej metody do modelu były włączane kolejne zmienne, które najbardziej przyczyniały się do polepszenia modelu. W drugim sposobie do budowy modelu wykorzystano 17 predefiniowanych zmiennych najsilniej różnicujących dwie grupy w każdym zbiorze na podstawie wyników analiz jednozmiennowych. Każdorazowo do budowy modelu wykorzystano tylko część próbek, wybranych losowo z grupy badanej i kontrolnej, które stanowiły zbiór uczący. Zbiór uczący składał się z 30 próbek należących do grupy badanej i 25 próbek należących do grupy kontrolnej, co stanowiło odpowiednio 61,2 % i 62,5 % liczebności analizowanych grup. Pozostałe próbki (19 próbek należących do grupy badanej i 15 próbek należących do grupy kontrolnej) stanowiły zbiór testowy, który był wykorzystany do zewnętrznej walidacji utworzonych modeli.

Wyniki analiz dyskryminacyjnych stężeń aminokwasów w próbkach surowicy przeprowadzonych na dwa sposoby pokazały, że zestawy 17 predyktorów były efektywne w przewidywaniu klasyfikacji pacjentów do jednej z dwóch grup (modele 1A i 1B, Tabela 24 i 28). Skonstruowane macierze klasyfikacji post-hoc pozwoliły na obliczenie czułości i swoistości dla modeli predykcyjnych 1A i 1B. W modelu 1A wystąpienie raka prostaty u danego pacjenta zostało przewidziane z czułością 68,42 %, natomiast brak nowotworu został przewidziany ze swoistością 100,00 %, przy ogólnej poprawności klasyfikacji wynoszącej 82,35 % (Tabela 28). Dotyczy to parametrów klasyfikacyjnych wyznaczonych na podstawie zbioru testowego. Oznacza to, że model 1A poprawnie przewidział obecność raka u 13 na 19 pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą i poprawnie przewidział brak raka u wszystkich 15 osób zdrowych, a zatem prawidłowy stan pacjenta został przewidziany u 28 na 34 osób. Czułość charakteryzująca ten model jest stosunkowo wysoka, natomiast swoistość jest najwyższa możliwa. Wartości cząstkowej lambdy Wilksa wskazują, jaki jest wkład poszczególnych predyktorów w modelu. Im niższa wartość cząstkowej lambdy Wilksa, tym wyższa moc dyskryminacyjna odpowiedniej zmiennej. Spośród użytych w modelu 1A predyktorów istotną rolę w dyskryminacji miało 13 aminokwasów, na co wskazują wartości krytycznego poziomu istotności  $p$  (Tabela 24). Wartości lambdy Wilksa są wartościami dla modelu, który powstałby po usunięciu danego predyktora z obecnego modelu. Ogólna wartość lambdy Wilksa dla modelu 1A wynosi 0,1020 (Tabela 28). Wartość ta wraz z wysoką wartością statystyki  $F$  równą 19,161 oraz  $p < 0,0001$  dowodzi, że dyskryminacja pacjentów przez zmienne znajdujące się w modelu jest istotna. Wartości  $F$  usunięcia są związane z cząstkową lambdą Wilksa określonej zmiennej i również odnoszą się do mocy dyskryminacyjnej danej zmiennej. Jest ona tym wyższa, im wyższa jest wartość  $F$  usunięcia. Z kolei tolerancja określonej zmiennej



jest miarą jej redundancji. Określa zatem, jaka część informacji niesionej przez daną zmienną nie jest powielana przez inne zmienne w modelu.

Zestaw aminokwasów wprowadzonych do modelu 1B różni się od zestawu w modelu 1A (Tabela 24). Model 1B składa się bowiem z wybranych *a priori* aminokwasów, podczas gdy do budowy modelu 1A program statystyczny miał do dyspozycji zbiór wszystkich oznaczonych aminokwasów. Parametry opisujące model 1B są nieco gorsze od tych odnoszących się do modelu 1A: wartość lambdy Wilksa jest wyższa, a wartość F, swoistość i ogólna poprawność klasyfikacji są niższe (Tabela 28). Tylko 2 aminokwasy miały istotną rolę w dyskryminacji (Tabela 24). Jednakże również w przypadku modelu 1B dyskryminacja grup pacjentów przez zmienne w modelu jest istotna.

Wyniki analiz dyskryminacyjnych stężeń aminokwasów w próbkach moczu, intensywności peptydów w próbkach surowicy oraz intensywności peptydów w próbkach moczu przedstawione są odpowiednio w Tabelach 25, 26 i 27, natomiast Tabela 28 przedstawia porównanie modeli zbudowanych na podstawie czterech zbiorów danych dwoma różnymi sposobami. W przypadku każdego zbioru danych można zauważyć, że model, do którego budowy wykorzystano metodę krokową postępującą, wskazuje większą liczbę zmiennych istotnych w dyskryminacji w porównaniu do modelu zbudowanego z wykorzystaniem predefiniowanych zmiennych najsilniej różnicujących grupę badaną i kontrolną na podstawie wyników analiz jednozmiennowych. Spośród wszystkich modeli najlepszymi parametrami klasyfikacyjnymi cechował się model 3B, który poprawnie sklasyfikował wszystkie próbki.

Użyteczność profili aminokwasowych i peptydowych w próbkach surowicy i moczu do klasyfikacji pacjentów analizowano również z wykorzystaniem krzywych ROC. W przypadku każdego zbioru danych wykreślone zostały krzywe ROC dla kilku modeli składających się z wielu zmiennych. Krzywe ROC były generowane przy pomocy algorytmu PLS-DA poprzez walidację krzyżową Monte-Carlo. W przypadku każdego modelu dwie trzecie próbek zostało użyte do oceny istotności zmiennych. Następnie określona ilość istotnych zmiennych (dla aminokwasów w surowicy: 2, 3, 5, 10, 20 i 32; dla aminokwasów w moczu: 2, 3, 5, 10, 20 i 39; dla peptydów w surowicy oraz moczu: 5, 10, 15, 25, 50 i 100) została wykorzystana do budowy modelu klasyfikacyjnego, który został zwalidowany na pozostałej liczbie jednej trzeciej próbek. Procedura była powtarzana wiele razy w celu wygenerowania modelu i obliczenia przedziału ufności. Częstotliwość, z jaką zmienne pojawiają się w modelu, odpowiada wartościom VIP dla tych zmiennych otrzymanych w analizach PLS-DA (Ryciny 19-22). Otrzymana dla każdego modelu krzywa ROC jest uśrednioną krzywą ze wszystkich

powtórzeń wykonanych podczas walidacji krzyżowej. Wszystkie wykreślone krzywe ROC dla wszystkich modeli w czterech zbiorach danych wraz z wartościami AUC oraz 95 % przedziałami ufności AUC są przedstawione na Rycinie 25. Można zauważyć wyraźny trend, że dla danego zbioru danych krzywe ROC zbudowane z większej ilości zmiennych przebiegają bliżej punktu (0,1) na układzie współrzędnych, co ma także swoje odzwierciedlenie we wzrastających wartościach AUC. Zatem im więcej zmiennych w modelu, tym lepszy był dany model klasyfikacyjny. Wyjątek stanowią tylko krzywe ROC dla modeli składających się z 50 i 100 peptydów w moczu, dla których zależność ta nie jest zachowana, choć różnice w przebiegu krzywych ROC ani w wartościach AUC nie są duże (Rycina 25D). Dla każdego modelu określono ogólną poprawność klasyfikacji, co również pozwoliło porównać między sobą uzyskane modele klasyfikacyjne (Tabela 29). Wyniki odpowiadają tym otrzymanym przez porównanie wartości AUC. Poprawność klasyfikacji próbek do odpowiedniej grupy wzrasta wraz ze wzrastającą liczbą zmiennych w modelu z dwoma wyjątkami: poprawność klasyfikacji jest wyższa dla modelu składającego się z 50 peptydów w moczu w porównaniu do 100 peptydów, a także jest nieznacznie wyższa dla modelu składającego się z 5 aminokwasów w surowicy w porównaniu do 10 aminokwasów. Natomiast porównanie modeli klasyfikacyjnych pomiędzy różnymi zbiorami danych, czyli porównanie między sobą zdolności klasyfikacyjnych profili aminokwasowych i peptydowych w surowicy i moczu prowadzi do wniosku, że najlepszą klasyfikację osiągnięto w przypadku peptydów w próbkach surowicy, a najgorszą w przypadku peptydów w próbkach moczu. Największy potencjał dyskryminacyjny peptydów w próbkach surowicy w raku prostaty spośród analizowanych zbiorów danych potwierdziły także analiza PLS-DA, gdzie w przypadku peptydów w surowicy osiągnięto najlepszą separację grupy badanej i kontrolnej (Rycina 18C), oraz analiza dyskryminacyjna, gdzie dla tego zbioru danych osiągnięto najlepsze parametry klasyfikacyjne (Tabela 28). Natomiast najmniejszy potencjał dyskryminacyjny peptydów w próbkach moczu według krzywych ROC może wynikać z faktu, że profilowanie peptydów w moczu wiąże się z koniecznością normalizacji próbek na stężenie kreatyniny, co stanowi dodatkowy etap rozcieńczania próbek, w których i tak wyjściowe stężenie peptydów jest niskie w porównaniu do surowicy. Profilowanie peptydowe moczu potencjalnie jest zatem mniej wiarygodne od profilowania peptydowego surowicy.

Dodatkowe analizy statystyczne przeprowadzone dla profili peptydowych w próbkach surowicy i moczu wykorzystywały trzy różne algorytmy: *QuickClassifier*, *Supervised Neural Network* i *Genetic Algorithm*. Modele klasyfikacyjne otrzymane przy użyciu tych algorytmów pozwalają ocenić użyteczność profili peptydowych do

klasyfikacji pacjentów. Wyniki zdolności klasyfikacyjnych dla wszystkich modeli, zarówno zdolności rozpoznawania przynależności próbek do grup, jak również walidacji krzyżowej, przedstawione są w Tabeli 30. Analiza tych wyników nie pozwala jednoznacznie wskazać, które profile peptydowe (surowicy czy moczu) cechują się większym potencjałem dyskryminacyjnym w odniesieniu do raka prostaty. Wysokie wartości czułości, swoistości oraz ogólnej poprawności klasyfikacji otrzymano dla obu zbiorów danych. Model wygenerowany dla profili peptydowych w surowicy przy użyciu algorytmu QC poprawnie sklasyfikował 81,41 % próbek, natomiast w przypadku profili peptydowych w moczu uzyskano poprawność klasyfikacji na poziomie 86,14 %. Przy użyciu algorytmu SNN model wygenerowany dla profili peptydowych w surowicy poprawnie sklasyfikował 86,78 % próbek, a model otrzymany dla profili peptydowych w moczu poprawnie sklasyfikował 85,71 % próbek. Najwyższą zdolnością rozpoznawania charakteryzowały się modele wygenerowane przy użyciu algorytmu GC: model wygenerowany dla profili peptydowych w surowicy poprawnie sklasyfikował bowiem 91,27 % próbek, a w przypadku profili peptydowych w moczu uzyskano poprawność klasyfikacji na poziomie 92,99 %. Dla wszystkich wygenerowanych modeli uzyskano wysokie wartości poprawności klasyfikacji w procedurze walidacji krzyżowej, wynoszące powyżej 75 %. Świadczy to o wysokiej wiarygodności modeli klasyfikacyjnych zbudowanych przy użyciu profili peptydowych.

## 7. Dyskusja

W niniejszej pracy doktorskiej podjęto się proteomicznej i metabolomicznej analizy płynów ustrojowych (surowicy krwi i moczu) w poszukiwaniu biomarkerów raka prostaty. Zastosowano nowoczesną i złożoną strategię analityczno-bioinformatyczną w analizie związków endogennych w płynach ustrojowych w poszukiwaniu biomarkerów o wartości diagnostycznej mających znaczenie w wykrywaniu raka prostaty. Badania prowadzone były w oparciu o nowoczesną platformę analityczną, wykorzystującą metody spektrometrii mas (LC-ESI-QqQ-MS/MS, MALDI-TOF-MS) oraz testy immunologiczne. Nowatorski model poszukiwania biomarkerów raka prostaty w oparciu o powyższe techniki wsparty został zaawansowaną analizą chemometryczną.

Zastosowana w badaniach strategia analityczno-bioinformatyczna potwierdziła, że analiza białek, peptydów oraz metabolitów w płynach ustrojowych jest obiecującym narzędziem w poszukiwaniu biomarkerów raka prostaty. Otrzymane wyniki dowodzą, że istnieje korelacja pomiędzy stanem biologicznym pacjenta a jego statusem proteomicznym i metabolomicznym.

### **Zastosowane techniki analityczne mogą być wykorzystane do poszukiwania biomarkerów raka prostaty**

Dane literaturowe oraz przeprowadzone badania podkreślają zalety wynikające z zastosowania odczynnika aTRAQ i techniki LC-MS/MS w oznaczaniu aminokwasów w płynach ustrojowych, wśród których należy wymienić wysoką specyficzność, zredukowany czas analizy (18 minut) w porównaniu do innych dostępnych technik analizy aminokwasów, możliwość oznaczania aż 42 aminokwasów w jednym cyklu analitycznym oraz niską granicę wykrywalności ( $\leq 1 \mu\text{M}$  dla każdego aminokwasu) [144, 145]. Objętość próbki potrzebna do analizy wykorzystującej odczynnik aTRAQ wynosi zaledwie 40  $\mu\text{l}$ , co pozwala oznaczać aminokwasy nawet w pojedynczej kropli materiału biologicznego.

Opracowana w ramach realizacji pracy doktorskiej metoda LC-MS/MS oznaczania kreatyniny w moczu charakteryzuje się prostą procedurą przygotowania próbek i krótkim czasem analizy. Parametry walidacyjne potwierdzają, że metoda jest czuła oraz zapewnia dokładne i precyzyjne pomiary stężenia kreatyniny. Zastosowanie trybu MRM i monitorowanie dwóch przejść masowych skutkuje wysoką selektywnością metody. Wprawdzie aparatura do analizy LC-MS jest droga, jednak zalety wykorzystania techniki LC-MS przewyższają w tym przypadku tę wadę. Redukcja kosztów była możliwa dzięki zastosowaniu w procedurze przygotowania próbek

niedrogich odczynników, w tym niedeuterowanego wzorca wewnętrznego. Procedura walidacji udowodniła, że nafazolina może pełnić funkcję wzorca wewnętrznego w opracowanej metodzie oznaczania kreatyniny w moczu. Ponieważ technika MS pozwala analizować jednocześnie wiele związków, a opracowana metoda korzysta z elucji gradientowej, w związku z tym możliwe jest włączenie do metody oznaczania innych klinicznie ważnych związków wydalanych z moczem w jednym cyklu analitycznym. Przykłady aplikacji, w których takie rozszerzenie metody może znaleźć zastosowanie, to m. in. badania metabolomiczne, poszukiwanie biomarkerów, kontrola antydopingowa, kryminalistyka, badanie wpływu środowiska na organizm.

### **Profile aminokwasowe są inne u osób z rakiem prostaty i u zdrowych mężczyzn, zatem rak wywołuje zmiany w organizmie na poziomie metabolomicznym**

Przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej badania potwierdziły, że aminokwasy to grupa metabolitów, która posiada wysoki potencjał wykorzystania jako biomarkery raka prostaty. Na podstawie przeprowadzonych jednozmiennych analiz statystycznych wykazano, że rak prostaty wywołuje zmiany w profilach wolnych aminokwasów w surowicy i moczu.

W próbkach surowicy oznaczono 32 aminokwasy. Wykazano, że statystycznie istotne różnice dotyczyły 18 z 32 oznaczonych związków, spośród których 4 były obecne na istotnie wyższych poziomach w grupie badanej (sarkozyna, 3-metylo-L-histydyna,  $\beta$ -alanina oraz kwas asparaginowy). Natomiast 14 aminokwasów wykazywało poziomy istotnie niższe w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną (między innymi: metionina, etanoloamina, glutamina, izoleucyna, arginina oraz leucyna) (Tabela 22).

W próbkach moczu oznaczono 39 aminokwasów. Różne statystycznie poziomy stwierdzono dla 26 z 39 związków, spośród których jeden (tauryna) był obecny na istotnie wyższym poziomie w grupie badanej, natomiast poziomy 25 były istotnie niższe w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną (między innymi: kwas  $\gamma$ -amino-n-masłowy, fosfoetanoloamina, etanoloamina, homocytrulina, arginina,  $\delta$ -hydroksylizyna i asparagina) (Tabela 22). Nie wykazano natomiast istotnych statystycznie różnic w poziomach sarkozyny w moczu pomiędzy grupą pacjentów z rakiem prostaty a grupą kontrolną.

Więcej aminokwasów oznaczono w moczu niż w surowicy i więcej związków pojawiało się na istotnie zmienionych poziomach w moczu w porównaniu do surowicy. Porównanie średnich poziomów oznaczonych aminokwasów w grupie badanej i kontrolnej w surowicy i moczu pozwala wyciągnąć wniosek, że stężenia aminokwasów

w większości przypadków korelowały ze sobą w obu płynach ustrojowych, bowiem podwyższenie lub obniżenie poziomu danego aminokwasu w surowicy pacjentów z rakiem prostaty w porównaniu do grupy kontrolnej związane było z podobną zmianą poziomu tego aminokwasu w moczu. Dotyczyło to 24 z 32 aminokwasów oznaczonych w obu analizowanych płynach ustrojowych.

Na podstawie dostępnego piśmiennictwa naukowego można stwierdzić, że dotychczas aminokwasy w raku prostaty były analizowane jedynie fragmentarycznie. Przeprowadzone w ramach realizacji rozprawy doktorskiej badania są wedle wiedzy autora pierwszymi, w których przeprowadzono kompleksową analizę profili aminokwasowych w dwóch różnych płynach ustrojowych pobranych od pacjentów z rakiem prostaty i zdrowych mężczyzn, oznaczając aż 42 metabolity w jednym cyklu analitycznym. Uzyskane wyniki zostały poddane analizom chemometrycznym w celu ewaluacji ich potencjalnej użyteczności jako biomarkerów raka prostaty. Przeprowadzono zarówno analizy jednozmiennowe, których celem było porównanie poziomów określonych metabolitów w dwóch grupach, jak również analizy wielozmiennowe, które miały na celu wykazanie użyteczności profilowania metabolitów w dyskryminacji pacjentów. Wyniki odniesiono następnie do aktualnego piśmiennictwa.

Otrzymane w przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej badaniach wyniki nie wyjaśniły do końca roli sarkozyny jako potencjalnego biomarkera raka prostaty. Stężenie tego aminokwasu w przeanalizowanych próbkach surowicy okazało się istotnie wyższe u pacjentów z rakiem prostaty (Tabela 22). Nie jest to zgodne z wynikami otrzymanymi przez Struysa i wsp. [86]. Struys i wsp. [86] oznaczyli stężenie sarkozyny w surowicy w trzech grupach mężczyzn: kontrolnej ( $n = 15$ ), z rakiem prostaty ograniczonym do narządu ( $n = 24$ ) i zaawansowanym rakiem prostaty z przerzutami ( $n = 18$ ), przy użyciu techniki LC-MS/MS i znakowanej izotopowo sarkozyny jako wzorca wewnętrznego. Statystyczna ocena wyników uzyskanych przez zespół wykazała, że nie ma statystycznie istotnych różnic w stężeniu sarkozyny pomiędzy trzema grupami i nie ma zatem dużych zmian w pozakomórkowych stężeniach sarkozyny, co wskazuje na ograniczony potencjał sarkozyny w diagnostyce raka prostaty. Nie sposób jednak nie zwrócić uwagi, że Struys i wsp. [86] oparli swoje wnioskowanie na stosunkowo małej liczebności grup. Wątpliwości w odniesieniu do sarkozyny w surowicy wciąż jest wiele, o czym świadczą sprzeczne doniesienia naukowe o ryzyku zachorowania na raka prostaty przy określonych poziomach tego aminokwasu. Koutros i wsp. [166] badali związek pomiędzy poziomami sarkozyny w surowicy a ryzykiem wystąpienia raka prostaty w 1122 próbkach pobranych od pacjentów chorych i 1112 próbkach kontrolnych, wykorzystując technikę LC-MS. Zaobserwowali znacząco podwyższone ryzyko wystąpienia raka prostaty wraz ze

zwiększającymi się poziomami sarkozyny. Zauważyli także związek pomiędzy sarkozyną a rakiem prostaty dla próbek surowicy pobranych w krótszym czasie poprzedzającym diagnozę, co sugeruje, że sarkozyna może być wczesnym biomarkerem choroby. Do innych wniosków doszli natomiast de Vogel i wsp. [80], którzy w swoich badaniach wykorzystali próbki surowicy pochodzące od 3000 pacjentów z rakiem prostaty i 3000 kontroli. Oznaczyli w nich stężenia sarkozyny, glicyny i seryny metodą GC-MS. Badacze wykazali, że wysokie stężenia sarkozyny i glicyny były związane ze zmniejszonym ryzykiem raka prostaty. Sugerują nawet, że wysoki poziom sarkozyny w surowicy może odgrywać ochronną rolę w rozwoju raka gruczołu krokowego. Podsumowując, obserwacje związane z sarkozyną, nawet jeśli nie potwierdzają jej użyteczności jako biomarkera diagnostycznego ani prognostycznego, to jednak sugerują jej rolę w etiologii raka prostaty [80].

Stężenie sarkozyny w moczu po normalizacji na stężenie kreatyniny w badanych próbkach analizowanych w ramach pracy doktorskiej nie różniło się istotnie statystycznie pomiędzy grupą badaną a kontrolną (Tabela 22). Niższe średnie stężenie sarkozyny otrzymano w grupie badanej. Potwierdza to wyniki innych zespołów badaczy, którzy odrzucają sarkozynę w moczu jako markera raka prostaty. Sarkozyna, zaangażowana w metabolizm aminokwasów oraz w procesy metylacji, zachodzące podczas progresji raka prostaty [79], została ogłoszona w 2009 roku metabolitem różnicującym nowotwór prostaty od gruczolaka tego narządu przez Sreekumara i wsp. [69]. Zespół wykazał wówczas między innymi to, że poziom tego aminokwasu jest podwyższony w moczu chorych na raka prostaty. Odkrycie to zespół Sreekumara i wsp. [82] potwierdził rok później. Jednak inni badacze zdecydowanie zanegowali to odkrycie. Jentzmik i wsp. [81] oznaczyli sarkozynę w moczu metodą GC-MS, a stężenia sarkozyny znormalizowali na kreatyninę. Mediana stężenia sarkozyny była o 13 % niższa w raku prostaty w stosunku do grupy kontrolnej. Autorzy wymieniają jednak nierówne proporcje pomiędzy analizowanymi grupami jako ograniczenie ich badań. Colleselli i wsp. [83] nie wykazali statystycznie istotnej różnicy pomiędzy stężeniami sarkozyny w moczu znormalizowanymi na kreatyninę osób z rakiem prostaty (n = 17) i grupy kontrolnej, przy czym stężenia u osób zdrowych były średnio o 11,7 % wyższe. Wu i wsp. [84] przebadali 20 próbek moczu pacjentów z rakiem prostaty, 8 próbek pacjentów z BPH i 20 próbek zdrowych mężczyzn techniką GC-MS. Także ich wyniki wskazują, że nie ma statystycznie istotnej różnicy między stężeniami sarkozyny w moczu w grupie osób z rakiem prostaty i kontrolnej.

Nieinwazyjna technika poboru próbek moczu to jedna z głównych przyczyn poszukiwania przez naukowców biomarkerów raka prostaty w tym płynie ustrojowym, a sarkozyna nie jest jedynym metabolitem, który pojawia się w tym kontekście w

doniesieniach naukowych. Heger i wsp. [79] przeanalizowali profile aminokwasowe w próbkach moczu pacjentów, aby wyjaśnić możliwość ich wykorzystania do diagnozy raka prostaty. Na podstawie otrzymanych wyników doszli do wniosku, że swoistość diagnozy może zostać polepszona dzięki oznaczeniu metabolitów w moczu. Opracowany model obejmował analizę sarkozyny, proliny, PSA i kwasu moczowego, których zespół nie zaobserwował w moczu osób zdrowych, natomiast ich poziomy były podwyższone u wszystkich pacjentów z rakiem prostaty. W przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej badaniach również zaobserwowano, że średnie stężenie proliny w moczu było wyższe w grupie badanej, natomiast średnie stężenie sakrozyny było w tej grupie niższe, choć test statystyczny wykazał, że nie ma różnicy w poziomach sarkozyny w obu grupach (Tabela 22).

Prolina pojawiała się w doniesieniach naukowych jako kandydat na biomarkera raka prostaty obok sarkozyny i leucyny. Sreekumar i wsp. [69] wskazali te trzy aminokwasy oraz dodatkowo uracyl, kinureninę i glicerolo-3-fosforan jako znacząco podwyższone wraz z progresją raka prostaty. W przypadku leucyny inne zespoły nie tylko nie potwierdziły tych doniesień, ale wręcz wykazały znacząco obniżone poziomy tego aminokwasu w raku prostaty (Teahan i wsp. [167], Miyagi i wsp. [73]). Shamsipur i wsp. [168] opracowali i zwalidowali metodę oznaczania w moczu czterech kandydatów na biomarkery raka stercza: sakrozyny, alaniny, leucyny i proliny. Metoda opiera się na dyspersyjnej derywatywacji i mikroekstrakcji ciecz-ciecz oraz technikach GC-MS i LC-MS. Wykorzystując opracowaną metodę oznaczono stężenia aminokwasów w 12 próbkach moczu mężczyzn chorych na raka prostaty i w 16 próbkach kontrolnych. Średnie stężenia sarkozyny i proliny były wyższe w przypadku raka prostaty. Średnie stężenie leucyny było natomiast obniżone, podobnie jak w przypadku wyników otrzymanych w prezentowanej pracy doktorskiej (Tabela 22) i w pracach Teahana i wsp. [167] oraz Miyagi i wsp. [73]. Bardzo mała liczebność grup i brak normalizacji stężeń każą jednak patrzeć na wyniki Shamsipura i wsp. [168] z dużą rezerwą, choć podkreślić należy, że celem ich pracy było przede wszystkim opracowanie szybkiej, selektywnej i czułej metody oznaczania wybranych związków.

Metodę LC-MS/MS oznaczania w moczu podobnego zestawu potencjalnych biomarkerów raka prostaty (sakrozyny, proliny, uracylu, kinureniny i glicerolo-3-fosforanu) oraz jednocześnie kreatyniny opracowali Jiang i wsp. [169]. Metoda jest prosta, szybka, czuła i selektywna i może być potencjalnie wykorzystana do oznaczania wybranych metabolitów na szeroką skalę. Z kolei Gamagedara i wsp. [170] oznaczyli poziomy proliny, kinureniny, uracylu i glicerolo-3-fosforanu w moczu pacjentów z rakiem prostaty i w grupie kontrolnej. Badacze doszli do wniosku, że te metabolity nie różnicują osób z rakiem prostaty i osób zdrowych i nie wykazują



korelacji ze stopniem zaawansowania raka ani ze stopniem złośliwości, nie mogą być zatem traktowane jako wiarygodne biomarkery diagnostyczne bądź prognostyczne raka prostaty.

Uzyskano w wyniku przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej badań statystycznie istotne niższe poziomy leucyny i izoleucyny, a także niższe średnie stężenia waliny zarówno w surowicy, jak i w moczu u mężczyzn ze zdiagnozowanym rakiem prostaty (Tabela 22). Stanowi to potwierdzenie wyników otrzymanych przez Teahana i wsp. [167]. Izoleucyna, leucyna i walina to trzy aminokwasy należące do grupy aminokwasów rozgałęzionych. Celem metabolomicznych badań przeprowadzonych przez Teahana i wsp. [167] była identyfikacja zmian metabolicznych związanych z transformacją nowotworową i identyfikacja biomarkerów agresywnego raka prostaty poprzez profilowanie metabolitów. Do badań wykorzystali linię komórkową RWPE-1 wyizolowaną ze zdrowego nabłonka strefy obwodowej ludzkiego gruczołu krokowego. Ponadto mutageneza linii RWPE-1 przy użyciu karcynogenu N-nitrozo-N-metylomocznika dostarczyła panelu linii komórkowych o wzrastającej złośliwości, który posłużył jako modelowy system *in vitro* do badania progresji raka prostaty, przede wszystkim jego agresywnej postaci. Badano wewnątrzkomórkowe i zewnątrzkomórkowe profile metaboliczne przy wykorzystaniu <sup>1</sup>H-NMR. Zauważono postępujące zmiany w wewnątrzkomórkowych poziomach wielu metabolitów. W szczególności dwa szlaki metaboliczne, metabolizm choliny i metabolizm rozgałęzionych aminokwasów, były zaburzone w wyniku transformacji nowotworowej. Wewnątrzkomórkowe i zewnątrzkomórkowe stężenia wszystkich trzech rozgałęzionych aminokwasów malały wraz z progresją raka prostaty. To, że ich szlak metaboliczny jest zmieniony w raku prostaty, było wiadomo już wcześniej. Wykazano obniżone stężenia rozgałęzionych aminokwasów w osoczu myszy z rakiem prostaty, a także wykazano, że komórki raka wchłaniają leucynę i walinę [171, 172]. Zmieniony metabolizm rozgałęzionych aminokwasów w ludzkim raku prostaty wykazali także Billingsley i wsp. [173]. Jak podaje Teahan i wsp. [167], obniżenie poziomów tej grupy metabolitów w raku prostaty może wynikać ze zwiększonej aktywacji szlaku anabolicznego, za pomocą którego aminokwasy są wbudowywane w białka. Jednakże szlaki kataboliczne również mogą odgrywać tu dużą rolę, o czym świadczyć może wyczerpanie się w zmienionych nowotworowo komórkach prostaty kwasu 3-hydroksy-3-metylomastłowego, metabolitu zaangażowanego w szlak degradacji rozgałęzionych aminokwasów i jego obecność w komórkach normalnych [167]. Szlak metaboliczny rozgałęzionych aminokwasów potencjalnie może być zatem źródłem biomarkerów agresywnej postaci raka prostaty. Teahan i wsp. [167] zauważyli ponadto, że poziom glicyny był obniżony w liniach komórkowych po transformacji nowotworowej, co

również znalazło potwierdzenie w obniżonych średnich stężeniach tego aminokwasu w surowicy i moczu pacjentów nowotworowych w prezentowanych badaniach (Tabela 22).

McDunn i wsp. [174] analizowali tkanki pobrane podczas zabiegu prostatektomii, zarówno zmienione nowotworowo, jak i wolne od raka, pochodzące z dwóch różnych banków tkanek. Platforma metabolomiczna wykorzystana w badaniach składała się z technik GC-MS i UHPLC-MS/MS. Badacze doszli do wniosku, że rak prostaty znacząco zmienił profile metabolitów w porównaniu do zdrowych tkanek oraz że panel analitów może być wykorzystany do tego, aby przenieść odkrycia w obszarze metabolomiki na użyteczne klinicznie testy diagnostyczne. 326 związków należących do różnych klas biochemicznych zostało zidentyfikowanych w próbkach pochodzących z obu banków tkanek. 30 spośród tych związków miało obniżone stężenia w tkankach zajętych rakiem, a 170 miało stężenia podwyższone, które dodatkowo jeszcze rosły w przypadkach raka prostaty bardziej zaawansowanych klinicznie. Należały do nich między innymi aminokwasy, także rozgałęzione. Nie jest to zgodne z wynikami otrzymanymi przez Teahana i wsp. [167]. W prezentowanych w niniejszej pracy doktorskiej badaniach stężenia wielu aminokwasów w surowicy i moczu były w raku prostaty obniżone (Tabela 22). Należy jednak pamiętać o ostrożności w porównywaniu wyników pomiędzy badaniami, które analizowały różne rodzaje próbek biologicznych. Z drugiej jednakże strony profile metaboliczne surowicy i moczu stanowią w dużej mierze odzwierciedlenie metabolomu komórek i tkanek. Na takim założeniu opiera się idea poszukiwania biomarkerów raka prostaty w płynach ustrojowych. Liczy się bowiem na to, że związek lub związki, których podwyższone lub obniżone stężenie stwierdzone zostanie w tkance nowotworowej, zostaną również wykryte w płynach ustrojowych i także tam będą w stanie różnicować osoby chore i zdrowe lub przewidywać progresję choroby, co może stanowić podstawę do opracowania nieinwazyjnych testów diagnostycznych. Potwierdzeniem tego, że profil metaboliczny surowicy i moczu odzwierciedla profil w komórkach nowotworowych, są zbieżne wyniki uzyskane w prezentowanej pracy doktorskiej i w badaniach Teahana i wsp. [167]. Należy także podkreślić dużą korelację pomiędzy otrzymanymi w prezentowanej pracy doktorskiej profilami aminokwasów w surowicy i moczu (Tabela 22).

Stosunkowo dawne badanie Hahna i wsp. [75] polegało na analizie  $^1\text{H-NMR}$  tkanek prostaty w dwóch grupach: BPH oraz raku prostaty. Dane spektralne zostały poddane analizie wielozmiennowej. Otrzymany model cechował się ogólną poprawnością klasyfikacji wynoszącą 96,6 % przy czułości 100 % i swoistości 95,5 %. Największy potencjał diagnostyczny według autorów miały trzy metabolity: cytrynian, tauryna i kwas glutaminowy. W odniesieniu do podwyższonego poziomu tauryny w

przypadku raka uzyskanego przez Hahna i wsp. [75] wyniki są zbieżne z uzyskanymi w prezentowanej pracy doktorskiej w odniesieniu do surowicy i moczu (Tabela 22). Także i tym razem wnioskowanie musi być ostrożne, głównie ze względu na to, że grupą odniesienia u Hahna i wsp. [75] był łagodny rozrost prostaty, a nie zdrowe tkanki. Hahn i wsp. [75] podsumowują swoje badania stwierdzeniem, że  $^1\text{H-NMR}$  wraz z wielozmienną analizą statystyczną mogą być wykorzystane do dyskryminacji tkanek prostaty z łagodnym przerostem i zmianą nowotworową z wysoką czułością i swoistością.

Uzyskane w przeprowadzonych w pracy doktorskiej badaniach stężenia etanoloaminy były znacząco niższe w grupie badanej zarówno w surowicy, jak i w moczu (Tabela 22). Różnice te były jednymi z najbardziej znaczących spośród wszystkich oznaczonych aminokwasów. Swanson i wsp. [175] analizowali 15 próbek tkanek nowotworowych i 32 próbki tkanek objętych łagodnym przerostem pobranych od 22 pacjentów techniką NMR. Zespół wskazał etanoloaminę jako istotnie obniżoną w tkankach rakowych. Etanoloamina pod względem budowy chemicznej jest pierwszorzędową aminą i pierwszorzędowym alkoholem. Ten metabolit jest jednym z głównych prekursorów i produktów degradacji błony fosfolipidowej, obok pochodnych etanoloaminy oraz pochodnych choliny. Jedną z pochodnych etanoloaminy jest fosfoetanoloamina, także analizowana przez Swansona i wsp. [175]. Jej stężenie było wyższe w tkankach objętych rakiem, choć różnica w odniesieniu do tkanek nierakowych nie była znacząca. Otrzymane w prezentowanej pracy doktorskiej wyniki wskazują na znacząco obniżone stężenie tego metabolitu w moczu grupy badanej, natomiast w surowicy stężenia fosfoetanoloaminy były poniżej poziomu oznaczalności w obu grupach (Tabela 22). Obserwuje się obecnie zainteresowanie poszukiwaniem odniesienia wspomnianych związków (choliny, etanoloaminy i ich pochodnych) do obecności raka, jego agresywności i odpowiedzi na zastosowaną terapię ze względu na informację, którą te związki niosą o proliferacji komórek, apoptozie i aktywności enzymów [175].

Scharakteryzowania profili wolnych aminokwasów w osoczu u pacjentów z chorobą nowotworową i oceny możliwości wykorzystania tych informacji do wczesnej detekcji podjęli się Miyagi i wsp. [73]. Ich badania obejmowały pięć typów raka: prostaty, płuca, żołądka, jelita grubego oraz piersi. W przypadku raka prostaty analizom poddano 134 próbki osocza osób chorych i 666 próbek osób zdrowych, przy czym w przypadku obu grup próbki pochodziły z kilku różnych szpitali. Profile aminokwasowe zostały oznaczone przy wykorzystaniu metody HPLC-ESI-MS poprzedzonej derywatyzacją przedkolumnową i obejmowały 19 analitów. Analizy jednozmiennowe (testy U Manna-Whitney'a) wykazały istnienie znaczących różnic w

profilach aminokwasowych między grupą kontrolną a pacjentami z każdym typem raka, natomiast analizy wielozmiennowe pozwoliły na wyraźną dyskryminację pacjentów chorych i osób zdrowych (AUC dla krzywych ROC wynosiło powyżej 0,75 dla każdego typu raka, a dla raka prostaty 0,783). W przypadku raka gruczołu krokowego wykazano, że poziomy alaniny, ornityny i w mniejszym stopniu lizyny były istotnie podwyższone u pacjentów chorych, natomiast poziomy tryptofanu i w mniejszym stopniu glutaminy, waliny, leucyny i argininy były obniżone. Poziomy pozostałych aminokwasów nie różniły się znacząco między grupami. Wyniki Miyagi i wsp. [73] częściowo pokrywają się z wynikami uzyskanymi w prezentowanej pracy doktorskiej, przede wszystkim w odniesieniu do aminokwasów o obniżonych stężeniach u pacjentów z rakiem prostaty według Miyagi i wsp. [73] (Tabela 22). Aminokwasy, których stężenia w prezentowanych w niniejszej rozprawie doktorskiej badaniach były najbardziej obniżone u pacjentów z rakiem prostaty, to metionina, glutamina, izoleucyna, arginina, leucyna. Podobny trend w przypadku tych aminokwasów zaobserwowali także Miyagi i wsp. [73], choć nie w każdym przypadku istotny statystycznie. Należy jednak zwrócić uwagę, że profile aminokwasowe analizowane w prezentowanej pracy doktorskiej obejmują więcej związków. Natomiast przewagą badań Miyagi i wsp. [73] była większa liczebność grup. Wyniki obu badań sugerują, że profile aminokwasowe mają ogromny potencjał dla polepszenia diagnostyki raka i zrozumienia jego patogenezы. Wcześniej Miyagi i wsp. [72] raportowali, że poziomy prolina były podwyższone w osoczu pacjentów z rakiem prostaty. Również w prezentowanych w niniejszej pracy doktorskiej badaniach zauważono, że w raku prostaty średnie stężenie prolina w surowicy było wyższe (Tabela 22).

### **Rak wywołuje zmiany w organizmie na poziomie proteomicznym, ponieważ profile peptydowe są inne u osób z rakiem prostaty i u zdrowych mężczyzn**

W ramach pracy doktorskiej otrzymano profile peptydowe wszystkich analizowanych próbek surowicy oraz moczu przy użyciu techniki MALDI-TOF-MS w zakresie mas 1000 – 10000 Da. Przeprowadzone porównanie profili peptydowych surowicy oraz moczu zdrowych mężczyzn i pacjentów cierpiących na raka prostaty wykazało, że ekspresja części peptydów jest w przypadku obu grup inna. Podczas progresji raka prostaty występują w organizmie zmiany na poziomie molekularnym, które prowadzą do wyrzutu peptydów, białek lub ich fragmentów z tkanki nowotworowej do płynów ustrojowych, takich jak surowica czy mocz. Profil biomolekularny próbek pozyskanych od pacjentów z rakiem prostaty jest w związku z tym inny niż profil próbek pobranych od osób zdrowych.

Analizy wykorzystujące intensywności peptydów otrzymane w wyniku profilowania peptydowego wykazały statystycznie istotne różnice dotyczące 65 ze 136 peptydów w przypadku surowicy i 108 ze 149 w przypadku moczu. Pięć peptydów, dla których wartość p była najniższa w przypadku surowicy to peptydy o masach: 1288,69 Da, 1099,41 Da, 1866,53 Da, 1888,55 Da i 1779,38 Da. Natomiast w przypadku moczu najniższe wartości p uzyskano dla peptydów o masach: 1793,20 Da, 2444,56 Da, 2235,57 Da, 1237,03 Da i 2050,43 Da.

Techniki profilowania peptydów i białek w surowicy i moczu były wykorzystywane przez różne zespoły naukowców, którzy także wykazali ich skuteczność do profilowania próbek w badaniach raka prostaty. Al-Ruwaili i wsp. [176] wykorzystali technikę SELDI-TOF-MS (ang. *surface-enhanced laser desorption ionization – time of flight – mass spectrometry*, spektrometria mas z jonizacją laserową wzmocnioną powierzchniowo i z detektorem czasu przelotu) do zbadania ekspresji białek w surowicy u pacjentów z rakiem prostaty. SELDI-TOF-MS stanowi alternatywę techniki MALDI-TOF-MS. W technice SELDI-TOF-MS próbki nanosi się na płytkę o zmodyfikowanej powierzchni, wykazującej powinowactwo biochemiczne do określonej klasy związków [143]. Al-Ruwaili i wsp. [176] porównali próbki surowicy pochodzące od pacjentów z wynikiem w skali Gleasona  $< 7$  oraz  $\geq 7$ , które sklasyfikowane zostały jako agresywna postać raka prostaty. Porównanie widm MS wykazało, że 26 pików istotnie różnicowało obie grupy pacjentów. Osiągnięte przez zespół czułość i swoistość były na poziomie odpowiednio 73,3 % i 60 %. Wykazano zatem przydatność techniki SELDI-TOF-MS w poszukiwaniu biomarkerów prognostycznych raka prostaty w surowicy.

Białka w moczu są obecne w bardzo niskich stężeniach, a próbki moczu charakteryzują się wysokim stężeniem soli, które utrudniają analizę tego płynu ustrojowego [138]. Dlatego przygotowanie próbki do analizy jest kluczowym etapem w badaniach proteomicznych moczu. Białka i peptydy obserwowane ostatecznie w analizach są silnie zależne od zastosowanej procedury przygotowania próbek. Procedura taka często musi zostać wybrana i zoptymalizowana dla konkretnej badanej choroby. Optymalizację procedury przygotowania próbek moczu przeprowadzili Calvano i wsp. [138], a następnie wykorzystali ją do profilowania białek techniką MALDI-TOF-MS w zakresie mas 1 – 12 kDa. Analizie poddali zarówno indywidualne próbki moczu pochodzące od 30 pacjentów z rakiem prostaty i 30 osób zdrowych, jak również połączone próbki dla obu grup. Zespół zauważył różnice w składzie białkowym indywidualnych próbek nie tylko pomiędzy grupami, ale także w obrębie grup. Ta zmienność międzyosobnicza jest nieunikniona ze względu na szereg czynników, które różnią się pomiędzy osobami biorącymi udział w badaniach, wśród których można wymienić między innymi dietę, stres, czynniki fizjologiczne, środowiskowe i genetyczne

[138]. Zmienność populacyjna została wykazana także w prezentowanej pracy doktorskiej i świadczą o niej duże różnice pomiędzy minimalnymi i maksymalnymi intensywnościami peptydów w próbkach zarówno surowicy, jak i moczu, w obrębie grupy badanej i kontrolnej, oraz duże odchylenia standardowe (Tabele 17 i 18). Calvano i wsp. [138] nie zauważyli dużych różnic pomiędzy profilami uzyskanymi dla połączonych próbek dla dwóch grup. Większą zmienność pomiędzy widmami MS zaobserwowali przy niższych wartościach  $m/z$ , na przykład pik odpowiadający peptydowi o  $m/z$  1432,91 miał większą intensywność w przypadku raka prostaty. Taki pik nie został zaobserwowany w przeprowadzonych w niniejszej pracy doktorskiej badaniach, co potwierdza rolę procedury przygotowania próbek na obserwowane peptydy.

Profilowanie białek i peptydów dostarcza informacji na temat biomolekuł o określonych wartościach  $m/z$ , różnicujących grupy, które pojedynczo lub jako cały panel mogą być wykorzystane do klasyfikacji próbek. Często kolejnym krokiem jest identyfikacja biomarkerów diagnostycznych lub prognostycznych odpowiadających określonym różnicującym pikom na widmach MS. Pozwala to odnieść zidentyfikowane białko do dostępnego piśmiennictwa naukowego i ocenić jego zaangażowanie w patomechanizm jednostki chorobowej, a także przeprowadzić walidację przy użyciu np. testu ELISA [143]. Identyfikacja peptydów nie była celem prezentowanej pracy doktorskiej. Wielu badaczy podejmuje się jednak tego zadania, także w analizach skupiających się na raku prostaty. Przykładowo, Le i wsp. [177] przeprowadzili profilowanie białek w surowicy przy użyciu techniki SELDI-TOF-MS u pacjentów z rakiem prostaty z przerzutami do kości i bez przerzutów. Dominujące piki obecne w surowicy pacjentów z przerzutami zostały następnie zidentyfikowane przy użyciu dwuwymiarowej elektroforezy żelowej, trawienia trypsyną i tandemowej spektrometrii mas jako izofomy surowiczego amyloidu A. Natomiast Lam i wsp. [178] zidentyfikowali białko odpowiadające znacząco mniej intensywnemu pikowi w profilach uzyskanych techniką MALDI-TOF-MS dla surowic pacjentów z zaawansowanym rakiem prostaty z przerzutami w porównaniu do surowic pacjentów z rakiem ograniczonym do narządu i zdrowych mężczyzn jako czynnik płytkowy 4. Białko to odpowiadało pikowi o masie  $m/z$  7771, a w celu jego identyfikacji przeprowadzono kilka etapów separacji i frakcjonowania. Ostatnim etapem była dwuwymiarowa elektroforeza żelowa, po której następowało trawienie trypsyną i analiza MALDI MS/MS. Identyfikowanie białek możliwe jest także w przypadku moczu. Flatley i wsp. [136] przeprowadzili profilowanie peptydów w moczu przed i po badaniu *per rectum* przy użyciu techniki MALDI-TOF-MS u pacjentów z rakiem prostaty oraz z nienowotworowymi zmianami w obrębie prostaty, poprzedzone normalizacją próbek moczu na stężenie kreatyniny. Pik o  $m/z$  10760

obecny w próbkach pobranych po badaniu per rectum był obecny na statystycznie niższych poziomach w próbkach pochodzących od mężczyzn chorych na raka prostaty. Technika rozkładu w źródle (ang. *in-source decay*, ISD) wykorzystująca spektrometr mas ze źródłem jonów MALDI pozwoliła na identyfikację tego piku jako  $\beta$ -mikroseminoproteiny. Flatley i wsp. [136] wskazują, że monitorowanie tego białka może polepszyć diagnostykę raka prostaty.

### **Profilowanie związków endogennych wsparte wielozmienną analizą statystyczną ma duży potencjał w dyskryminacji pacjentów**

Przeprowadzone w ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej badania wykazały, że techniki profilowania aminokwasów i peptydów wsparte wielozmienną analizą statystyczną mogą być wykorzystane do dyskryminacji pacjentów z rakiem prostaty oraz pacjentów zdrowych z wysoką czułością i swoistością. Otrzymane wyniki dowodzą, że rak prostaty wywołuje zmiany w organizmie na poziomie proteomicznym i metabolomicznym, które mogą zostać wykryte przy użyciu zaproponowanej platformy analityczno-bioinformatycznej, obejmującej profilowanie aminokwasów i profilowanie peptydów w dwóch różnych płynach ustrojowych oraz chemometryczną analizę danych. Istnieje zatem znacząca korelacja pomiędzy statusem biologicznym danego pacjenta (zdrowie/choroba) a jego statusem proteomicznym i metabolomicznym. Zmienione profile związków endogennych związane z toczącym się w organizmie procesem chorobowym są odpowiedzialne za dyskryminację mężczyzn, wykazaną w analizach PLS-DA (Rycina 18), analizach dyskryminacyjnych (Tabela 28), za pomocą krzywych ROC (Rycina 25, Tabela 29) oraz algorytmów QC, SNN i GA (Tabela 30).

W pracy doktorskiej wykazano, że poziomy aminokwasów w obu płynach ustrojowych, zarówno w surowicy, jak i w moczu, są użyteczne w klasyfikacji pacjentów z rakiem prostaty i osób zdrowych. Na podstawie przeprowadzonych analiz wielozmiennych stwierdzono, że zmienione obecnością raka prostaty profile aminokwasowe w obu płynach ustrojowych pozwalają osiągnąć grupowanie się pacjentów (analizy PLS-DA) oraz uzyskać wysoką poprawność klasyfikacji próbek do grupy pacjentów z rakiem lub grupy kontrolnej.

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano użyteczność profili peptydowych w surowicy i moczu w dyskryminacji mężczyzn cierpiących na raka prostaty i zdrowych. Przeprowadzenie analizy profili peptydowych w dwóch różnych płynach ustrojowych pobranych od pacjentów z rakiem prostaty i zdrowych mężczyzn wskazuje jednak, że większy potencjał dyskryminacyjny w raku prostaty charakteryzuje peptydy w próbkach surowicy. Zostało to wykazane na podstawie takich analiz

wielozmiennowych, jak PLS-DA, analiza dyskryminacyjna i krzywe ROC. Jedynie w analizach statystycznych wykorzystujących algorytmy QC, SNN i GA otrzymano podobne wartości czułości, swoistości oraz ogólnej poprawności klasyfikacji dla obu zbiorów danych (peptydów w surowicy i moczu). Mniejszy potencjał dyskryminacyjny peptydów w próbkach moczu wykazany w części analiz może wynikać z faktu, że wyjściowe stężenie peptydów w moczu jest niższe niż w surowicy, a ponadto profilowanie peptydów w moczu wiąże się z koniecznością normalizacji próbek na stężenie kreatyniny, co stanowi dodatkowy etap rozcieńczania próbek. Profilowanie peptydowe moczu potencjalnie jest zatem mniej wiarygodne od profilowania peptydowego surowicy.

Również inne zespoły badawcze wykazały użyteczność profilowania związków endogennych do klasyfikacji próbek w raku prostaty. Zang i wsp. [179] wykorzystali strategię profilowania metabolitów przy użyciu techniki UHPLC sprzężonej z wysokorozdzielczą tandemową spektrometrią mas, aby przeanalizować próbki surowicy od pacjentów z rakiem prostaty i osób zdrowych. Opracowali następnie oparty na metabolitach wielozmiennowy test diagnostyczny do przewidywania obecności raka prostaty na podstawie analizy próbek surowicy, charakteryzujący się dobrymi parametrami klasyfikacyjnymi (czułość 92,1 %, swoistość 94,3 %). Obejmował on panel 40 zmiennych – metabolitów obecnych na widmach MS/MS, który sprawdzał się lepiej niż test PSA. 31 metabolitów zostało zidentyfikowanych. Autorzy podjęli także próbę wglądu w zmiany na poziomie metabolicznym powiązane z rakiem gruczołu krokowego i w rolę metabolitów w szlaku biosyntezy hormonów steroidowych. Technika  $^1\text{H-NMR}$  została wykorzystana w poszukiwaniu biomarkerów raka prostaty przez Kumara i wsp. [180]. Badaniom poddali 40 próbek surowicy pochodzących od pacjentów z rakiem o niskim stopniu złośliwości histologicznej, 30 próbek od pacjentów z rakiem o stopniu wysokim, a także 32 próbki kontrolne. Otrzymane dane analizowali metodami PCA, PLS-DA oraz przy użyciu krzywych ROC. Model zbudowany z czterech metabolitów (alanina, pirogronian, glicyna i sarkozyna) był w stanie sklasyfikować próbki z dużą dokładnością (pole pod krzywą ROC 0,966, czułość 84,4 %, swoistość 92,9 %). Użyteczność modelu potwierdziła poprawność predykcyjna względem zbioru testowego wynosząca powyżej 99 %.

Biomarkerem nie musi być pojedynczy związek. Na podstawie przeprowadzonych badań można wnioskować, że panel markerów może poprawić diagnostykę raka prostaty. Taki panel stanowi swoisty proteomiczny lub metabolomiczny „odcisk palca”, specyficzny dla danego stanu organizmu. Modele klasyfikacyjne i dyskryminacyjne zbudowane przy użyciu wielu zmiennych cechują się wysoką czułością i swoistością. Wyniki uzyskane w prezentowanej pracy doktorskiej z



wykorzystaniem krzywych ROC (Tabela 29) pokazują, że wraz ze wzrostem ilości zmiennych poprawia się klasyfikacja pacjentów. Zmienne wykorzystane do budowy modeli wielozmiennowych nie zawsze odpowiadają zmiennym najbardziej różnicującym grupy w analizach jednozmiennowych. Jest to związane z tym, że przeprowadzenie analiz wielozmiennowych jest poprzedzone normalizacją danych, a same analizy wielozmiennowe poszukują zależności między zmiennymi i korelacji w ich obrębie, których nie da się dostrzec bez zastosowania metod chemometrycznych. O tym, że zmienne w wielozmiennowych modelach nie muszą wcale być tymi samymi, które najbardziej różnicowały grupy w analizach jednozmiennowych, albo kolejność ich istotności nie musi odpowiadać wartościom p w analizach jednozmiennowych, najlepiej świadczą wyniki przeprowadzonych analiz dyskryminacyjnych.

Analizy PLS-DA przeprowadzone dla trzech grup pacjentów z rakiem prostaty podzielonych według wzrastającego stopnia złośliwości histologicznej wykazały grupowanie się pacjentów w zależności od przyporządkowania ich do odpowiedniej grupy (Rycina 24). Wiarygodność większości modeli nie została potwierdzona testami permutacji. Może to wynikać z faktu, że klasyfikacja pacjentów w systemie Gleasona nie jest „ostra”. Opiera się bowiem na ocenie struktury histologicznej tkanki nowotworowej przez histopatologa. Czynniki ludzkie mogą prowadzić do różnic w ocenie pomiędzy lekarzami, którzy mogą niekiedy inaczej zaklasyfikować tę samą próbkę [16]. Ponadto przyjęty w prezentowanej pracy doktorskiej podział pacjentów na trzy grupy nie odpowiada każdemu wynikowi w skali Gleasona ani grupom prognostycznym (Tabele 1 i 3). Konieczne było połączenie pacjentów w trzy większe grupy ze względu na ograniczoną liczebność próbek. Zaobserwowany w analizach PLS-DA trend pozwala jednak wnioskować, że stopień złośliwości histologicznej raka prostaty ma swoje odbicie w profilu aminokwasowym i peptydowym płynów ustrojowych. W związku z tym uzasadnione jest poszukiwanie biomarkerów prognostycznych raka prostaty, które pozwoliłyby na dyskryminację pacjentów w zależności od poziomu agresywności nowotworu.

### **Poziomy wielu białek w surowicy uczestniczących w procesie angiogenezy zmieniają się w przypadku wystąpienia raka prostaty**

Przeprowadzone w ramach realizacji rozprawy doktorskiej analizy wykorzystujące stężenia oznaczonych białek w surowicy uczestniczących w procesie angiogenezy wykazały, że 10 z 16 białek różni się istotnie statystycznie pomiędzy grupami (Tabela 23). Wszystkie 10 białek było obecnych na istotnie wyższych poziomach w grupie pacjentów z rakiem prostaty. Białkami tymi, w kolejności od

najniższej do najwyższej wartości p, były: sVEGFR-1, HGF, osteopontyna, FGF-basic, G-CSF, PDGF-AB/BB, SCF, sEGFR, PECAM-1 i sVEGFR-2. Wśród tej grupy białek należy poszukiwać biomarkerów, które mogą znaleźć zastosowanie w diagnostyce raka prostaty.

W badaniach przeprowadzonych w ramach prezentowanej pracy wykazano istotnie podwyższone stężenie sEGFR w surowicy pacjentów z grupy badanej. Pomiar sEGFR we krwi prowadzone przez różne zespoły badawcze nie dały dotychczas jasnej odpowiedzi dotyczącej możliwych klinicznych implikacji związanych z oznaczaniem tego białka i jego wykorzystania jako potencjalnego biomarkera różnych nowotworów. Większość doniesień naukowych mówi o obniżonych poziomach sEGFR u pacjentów z różnymi nowotworami w porównaniu z osobami zdrowymi. Takie wyniki otrzymali Baron i wsp. [181] w przypadku raka nabłonkowego jajnika, Müller i wsp. [99] w przypadku raka piersi z przerzutami oraz Jantus-Lewintre i wsp. [182] i Maramotti i wsp. [101] w przypadku niedrobnokomórkowego raka płuca. Jednakże inne badania, przeprowadzone przez Jacota i wsp. [183] mówią o braku różnic w stężeniu tego białka między osobami chorymi a zdrowymi w przypadku niedrobnokomórkowego raka płuca. Sasaki i wsp. [184] nie wykazali z kolei różnic w przypadku grasiczaka. Natomiast Oh i wsp. [185] wykazali wyższe jego stężenia u pacjentów z rakiem szyjki macicy. Brak jednak w piśmiennictwie doniesień o oznaczaniu sEGFR w raku prostaty w porównaniu z grupą kontrolną. Molekularne mechanizmy leżące u podstaw różnych typów nowotworów różnią się między sobą. Maramotti i wsp. [101] zwracają uwagę, że w przypadku niedrobnokomórkowego raka płuca nadekspresja EGFR nie skutkuje wzrostem poziomów sEGFR w osoczu pacjentów, lecz znaczącym obniżeniem tych poziomów w porównaniu z grupą kontrolną. Sugerują, że nadekspresja EGFR w komórkach nowotworowych może interferować z fizjologiczną rolą sEGFR. Wyniki uzyskane w prezentowanej pracy doktorskiej, zgodnie z którymi – jak już wspomniano wyżej – w raku prostaty dochodzi do podwyższenia poziomów sEGFR w surowicy, wskazują na prawdopodobne odmienne mechanizmy molekularne raka prostaty w porównaniu do innych typów nowotworów.

W wyniku przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej badań stwierdzono znacząco podwyższone poziomy FGF-basic w surowicy pacjentów z rakiem prostaty w porównaniu z grupą zdrowych mężczyzn. Zmiany w ekspresji czynników wzrostu fibroblastów i ich receptorów odgrywają ważną rolę w progresji raka prostaty [103]. Giri i wsp. [103] wykazali, że poziom jednego z tych czynników, FGF-basic, jest znacząco podwyższony w tkankach objętych rakiem prostaty w porównaniu do zdrowych tkanek gruczołu krokowego. Ponadto zaobserwowali nadekspresję receptorów FGFR-1 i FGFR-2 w komórkach nabłonkowych raka prostaty, a także że ta nadekspresja

koreluje ze stopniem zróżnicowania komórek nowotworowych: im mniej zróżnicowane komórki (wyższy wynik w skali Gleasona), tym większa była ekspresja wymienionych receptorów. Wzrost ekspresji FGF-basic oraz kilku innych czynników wzrostu w przypadku tkanki objętej rakiem prostaty zaobserwowali także Soultzis i wsp. [186], natomiast nie zaobserwowali oni zwiększonej ekspresji tego białka w przypadku BPH w porównaniu do zdrowych tkanek gruczołu krokowego. Erdem i wsp. [102] wykazali w raku prostaty związek pomiędzy FGF-basic a genem AEG-1 (ang. *astrocyte elevated gene-1*), silnym mediatorem w rozwoju nowotworów złośliwych. Autorzy wskazują tę zależność jako niezależny prognostyczny parametr, który może być użyteczny do opracowania nowych procedur terapeutycznych. Na podstawie uzyskanych wyników prezentowanych w niniejszej pracy, pierwszych porównujących poziomy FGF-basic w surowicy u osób z rakiem prostaty i zdrowych, a także danych literaturowych dotyczących zwiększonej ekspresji tego czynnika wzrostu w raku prostaty, można wnioskować o potencjale FGF-basic jako biomarkera tej choroby.

Stężenie G-CSF oznaczone w próbkach surowicy pacjentów z rakiem prostaty było istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej. Naukowcy i klinicyści poszukują odpowiedzi na pytanie, czy G-CSF może sprzyjać rozwojowi nowotworu [104]. Nie ma pewności co do tego, czy podawanie tego czynnika pacjentom nowotworowym jest bezpieczne. Wprawdzie G-CSF zmniejsza częstość występowania i czas trwania neutropenii wywoływanej intensywną chemioterapią, nie zwiększa jednak czasu przeżycia pacjentów, co sugeruje możliwe wspieranie przez G-CSF progresji nowotworu. Może także sprzyjać powstawaniu przerzutów. W ośrodkowym układzie nerwowym G-CSF pełni rolę neurotroficznego czynnika wzrostu [104]. Natomiast związana z nowotworem neurogeneza została wykazana w przypadku agresywnych form raka prostaty [187]. Udowodniono również, że infiltracja guza prostaty przez nowe nerwy ze współczulnego i przywspółczulnego układu nerwowego odgrywa kluczową rolę w rozwoju i progresji raka [188]. Dobrenis i wsp. [104] wykazali, że G-CSF wpływa na progresję raka prostaty poprzez rozwój włókien nerwowych w obrębie nowotworu. Sugerują ponadto, że to odkrycie może prowadzić do opracowania nowych antyneurogennych terapii raka prostaty. O tym, że rak prostaty wydziela G-CSF, donieśli Matsuoka i wsp. [189]. Wykazali oni podwyższony poziom G-CSF w surowicy pacjenta z rakiem prostaty. Uzyskane w prezentowanej pracy doktorskiej wyniki również wskazują na produkcję G-CSF przez nowotwór złośliwy prostaty, wskazując na jego rolę w patogenezie choroby.

Przeprowadzone w ramach prezentowanej pracy doktorskiej badania wykazały znacząco podwyższone poziomy HGF w surowicy pacjentów z rakiem prostaty. Naughton i wsp. [190] wykryli znacząco wyższe poziomy HGF w surowicy pacjentów z

rakiem prostaty z przerzutami w porównaniu do pacjentów z rakiem ograniczonym do gruczołu krokowego i zdrowych mężczyzn. Autorzy zasugerowali, że HGF może być ważnym markerem raka prostaty w surowicy. Potwierdzili to Hashem i wsp. [106], którzy wykazali istotnie wyższe stężenia HGF w surowicy w przypadku zarówno raka prostaty ograniczonego do narządu, jak i postaci bardziej zaawansowanej z przerzutami, w porównaniu do grupy kontrolnej zdrowych mężczyzn. Najwyższe stężenia otrzymano w przypadku raka z przerzutami. Gupta i wsp. [107] wykazali użyteczność HGF jako potencjalnego biomarkera prognostycznego raka prostaty, wykazując znacząco podwyższone poziomy HGF w osoczu pacjentów z przerzutami raka prostaty do węzłów chłonnych. Nishimura i wsp. [191] zaproponowali z kolei wykorzystanie HGF oraz IL-6 w połączeniu z objętością gruczołu prostaty w badaniach przesiewowych raka prostaty, wykazując że parametry te są użyteczne w diagnostyce w przypadku pacjentów z PSA w zakresie „szarej strefy”. HGF jest mediatorem w rozprzestrzenianiu się raka prostaty [105]. Poprzez specyficzny receptor c-Met moduluje proliferację komórek, interakcje pomiędzy komórkami nowotworowymi, migrację komórek, adhezję komórek i proces angiogenezy. Przytoczone przykłady badań wraz z wynikami uzyskanymi w prezentowanej pracy doktorskiej pozwalają optymistycznie patrzeć na potencjał HGF jako biomarkera diagnostycznego i prognostycznego raka prostaty.

Istotnie podwyższone stężenie osteopontyny w surowicy zostało wykazane w przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej badaniach w grupie pacjentów z rakiem prostaty. Stanowi to potwierdzenie wcześniejszych rezultatów otrzymanych przez Fedarko i wsp. [192], którzy również wykazali znacząco wyższe poziomy osteopontyny w surowicy u pacjentów z rakiem prostaty, jak i u chorych z rakiem piersi i płuca. Khodavirdi i wsp. [193] wykazali, że osteopontyna przyczynia się do zwiększonej proliferacji komórek nowotworowych raka prostaty i progresji nowotworu. Natomiast Forootan i wsp. [194] wykazali dodatnią korelację pomiędzy poziomem ekspresji osteopontyny w komórkach i tkankach raka prostaty a stopniem agresywności nowotworu. Przeprowadzona przez Webera i wsp. [195] metaanaliza w celu oceny osteopontyny jako biomarkera agresywności raka prostaty i czasu przeżycia pacjentów, między innymi w raku prostaty, wykazała, że białko to jest znacząco powiązane z czasem przeżycia i progresją choroby. Jednakże pojawiły się także doniesienia negujące potencjał osteopontyny jako biomarkera. Puzone i wsp. [196] stwierdzili bowiem na podstawie przeprowadzonych badań, że poziomy osteopontyny w osoczu nie były podwyższone u pacjentów z rakiem prostaty ani nie różniły się pomiędzy pacjentami z rakiem prostaty wysoko- i niskozróżnicowanym. W związku z tym zespół uznał, że osteopontyna w osoczu nie jest biomarkerem diagnostycznym ani

prognostycznym raka prostaty. Otrzymane w prezentowanej pracy doktorskiej wyniki sugerują jednakże potencjał tego białka w diagnostyce raka gruczołu krokowego.

Oznaczone stężenia PDGF (łącznie dwóch izoform: heterodimeru zbudowanego z łańcucha A i łańcucha B oraz homodimeru zbudowanego z dwóch łańcuchów B) w surowicy w badaniach przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej były wyższe u pacjentów z rakiem prostaty niż w grupie kontrolnej. W piśmiennictwie naukowym nie ma doniesień o próbach wykorzystania tego czynnika w diagnostyce raka prostaty na podstawie oznaczeń w surowicy. Są jednak doniesienia mówiące o ekspresji i roli PDGF w patogenezie raka prostaty. Fudge i wsp. [197] wskazali na ekspresję homodimeru AA przez komórki nabłonkowe i zrębowe w raku prostaty. Sitaras i wsp. [198] wykazali ekspresję PDGF przez linie komórkowe raka prostaty, a Vlahos i wsp. [199] wykazali, że PDGF stymuluje proliferację ludzkich komórek zrębowych prostaty *in vitro*. Na potencjalną rolę homodimeru DD płytkopochodnego czynnika wzrostu w rozwoju i progresji raka prostaty wskazali Ustach i wsp. [200]. Z kolei Najy i wsp. [110] wykazali, że homodimer DD odgrywał ważną rolę w karcynogenezie komórek nabłonkowych raka prostaty, a ponadto wykazywał zwiększoną angiogenezę w raku prostaty w porównaniu do homodimeru BB. Natomiast Cheng i wsp. [201] wykazali, że homodimer BB produkowany przez komórki raka prostaty sprzyja proliferacji *in vivo* i *in vitro* mezenchymalnych komórek macierzystych, które z kolei sprzyjają rozwojowi nowotworu. Dowody na rolę różnych izoform PDGF w rozwoju raka prostaty powinny pociągnąć za sobą badania nad potencjalnym wykorzystaniem tych białek w diagnostyce choroby. Wyniki otrzymane w prezentowanej pracy doktorskiej pozwalają dostrzec potencjał PDGF jako biomarkera raka prostaty.

Otrzymane w wyniku przeprowadzonych badań wyniki wskazują na znacząco wyższe poziomy PECAM-1 w surowicy chorych na raka prostaty i są pierwszą znaną próbą wykorzystania oznaczania tego białka w surowicy do porównania pacjentów z rakiem prostaty i zdrowych mężczyzn. Piśmiennictwo naukowe mówi jednak o roli PECAM-1 w angiogenezie w raku prostaty. Karagiannis i wsp. [202] badali ścieżki sygnałowe w proteomie komórek śródbłonka raka prostaty i stwierdzili znaczącą nadekspresję PECAM-1 w komórkach śródbłonka w androgenno-niezależnym raku prostaty.

Stężenie SCF w surowicy pacjentów z rakiem prostaty, oznaczone w prezentowanych badaniach, okazało się istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej. To pierwsze badania porównujące poziomy SCF w surowicy pomiędzy takimi grupami. Wcześniej Mroczo i wsp. [203] wykazali istotnie podwyższony poziom SCF w surowicy pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca. Wiesner i wsp. [112]

wykazali, że komórki raka prostaty mogą uwalniać SCF do przestrzeni zewnątrzkomórkowej oraz że system sygnalizacyjny SCF i jego receptora CD117 ma potencjalny udział w przerzutach raka prostaty do kości. Natomiast Ma i wsp. [113] stwierdzili synergistyczny efekt SCF i G-CSF na komórki raka prostaty.

W przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej badaniach wykazano, że stężenia w surowicy zarówno sVEGFR-1, jak i sVEGFR-2, były istotnie podwyższone w grupie pacjentów z rakiem prostaty w porównaniu do grupy kontrolnej. Receptory sVEGFR-1 łączą się z każdą izoformą ligandu VEGF. Ich działanie nie jest do końca wyjaśnione. Sugeruje się, że może polegać na negatywnej regulacji procesu angiogenezy [98]. Dzieje się tak poprzez stabilizowanie VEGF w przestrzeni międzykomórkowej oraz zmniejszenie dostępności VEGF do śródbłonka naczyniowego i może prowadzić do hamowania powstawania naczyń krwionośnych w guzach nowotworowych i hamowania powstawania przerzutów. Z drugiej jednak strony piśmiennictwo naukowe podaje, że sVEGFR-1 i sVEGFR-2 prowadzą do angiogenezy [204]. W piśmiennictwie pojawiły się doniesienia zarówno o podwyższonych, jak i obniżonych poziomach sVEGFR-1 oraz sVEGFR-2 w różnych nowotworach. Enjoi i wsp. [205] wykazali znacząco podwyższone stężenie sVEGFR-1 w surowicy pacjentów z rakiem przewodów żółciowych w porównaniu z grupą kontrolną. Thielemann i wsp. [98] wykazali istotnie większe poziomy sVEGFR-1 w surowicy kobiet chorych na raka piersi w porównaniu z kobietami zdrowymi. Ponadto autorzy wykazali wartość prognostyczną tego białka, jego stężenie korelowało bowiem ze stopniem zaawansowania choroby. Im wyższy był stopień zaawansowania klinicznego raka piersi lub stopień złośliwości histologicznej guza, tym wyższe było stężenie sVEGFR-1. W innych badaniach Thielemann i wsp. [204] wykazali podobną zależność u kobiet z rakiem piersi dla sVEGFR-2. Natomiast Korzeniewska i wsp. [206] wykazali znacząco obniżone stężenia sVEGFR-1 i sVEGFR-2 w surowicy pacjentów z łagodnym gruczolakiem kory nadnerczy w porównaniu z grupą kontrolną, a Kikuchi i wsp. [207] stwierdzili obniżone poziomy tych białek w surowicy pacjentów z rakiem żołądka. Te dane wskazywać mogą na różne mechanizmy działania rozpuszczalnych form receptorów dla VEGF w różnych nowotworach. W przypadku raka prostaty sugerowana jest rola rodziny ligandów VEGF oraz receptorów VEGFR we wzroście i rozprzestrzenianiu się nowotworu poprzez aktywację unaczynienia guza [208]. Woollard i wsp. [208] wykazali zwiększoną ekspresję VEGFR-1 w tkance nowotworowej raka prostaty w porównaniu z łagodnym przerostem, co może wskazywać na mechanizm sygnalizacyjny zaangażowany w progresję raka prostaty, a jego inhibicja może przyczynić się do opracowania strategii terapeutycznych w raku prostaty. Uzyskane w przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej

badaniach wyniki potwierdzają, że poziomy rozpuszczalnych receptorów dla VEGF są powiązane z rakiem prostaty i w związku z tym ich oznaczanie może mieć znaczenie w diagnostyce choroby.

Wyniki przeprowadzonych badań związanych z poszukiwaniem biomarkerów raka prostaty są optymistyczne. Dowodzą bowiem, że istnieje korelacja pomiędzy stanem biologicznym danej osoby (obecność lub brak raka prostaty, a także różny stopień złośliwości histologicznej raka prostaty) a jego statusem proteomicznym i metabolomicznym. Poziomy niektórych aminokwasów, peptydów i białek w surowicy i moczu znacząco się zmieniają w sytuacji, gdy u pacjenta pojawia się rak prostaty. Ponadto wielozmiennowe modele zbudowane z wykorzystaniem profili związków endogennych są zdolne do dyskryminacji próbek z wysoką czułością i swoistością.

Otrzymane w niniejszej pracy wyniki upoważniają do zaproponowania dalszych kierunków badań. Można stwierdzić, że poszukując biomarkerów raka prostaty w grupie aminokwasów w przypadku surowicy należy zwrócić szczególną uwagę na następujące związki: metioninę, etanoloaminę, glutaminę, izoleucynę, argininę oraz leucynę. Natomiast w przypadku moczu szczególną uwagę należy zwrócić na następujące aminokwasy: kwas  $\gamma$ -amino-n-masłowy, fosfoetanoloaminę, etanoloaminę, homocytrulinę, argininę,  $\delta$ -hydroksylizynę i asparaginę. W przypadku profilowania peptydowego należy skupić się na wykorzystaniu do tego celu surowicy. Profilowanie peptydowe w moczu wydaje się być bowiem mniej wiarygodne. Wyjściowe stężenie peptydów w moczu jest niższe niż w surowicy, a ponadto profilowanie peptydów w moczu wiąże się z koniecznością normalizacji próbek na stężenie kreatyniny, co jest czasochłonne i stanowi dodatkowy etap rozcieńczania próbek. Co więcej, mniejszy jest w przypadku raka prostaty potencjał dyskryminacyjny peptydów w próbkach moczu w porównaniu do surowicy.

Podkreślić jednak należy, że konieczne są dalsze badania na większych ilościach próbek w celu walidacji modeli i potwierdzenia użyteczności profilowania aminokwasów (zwłaszcza zawężenia aminokwasów do wyżej wspomnianych) i peptydów, a także oznaczania białek zaangażowanych w proces angiogenezy, w diagnostyce raka prostaty i ocenie ryzyka progresji choroby.

## 8. Wnioski

Przeprowadzone badania w ramach rozprawy doktorskiej pt. „Proteomiczna i metabolomiczna analiza surowicy krwi i moczu w poszukiwaniu biomarkerów raka prostaty” pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Zastosowana w badaniach złożona strategia analityczno-bioinformatyczna do analizy związków endogennych w płynach ustrojowych (surowicy oraz moczu) potwierdziła, że analiza białek, peptydów oraz metabolitów w płynach ustrojowych jest obiecującym narzędziem w poszukiwaniu biomarkerów raka prostaty. Otrzymane wyniki dowodzą, że istnieje korelacja pomiędzy stanem biologicznym pacjenta a jego statusem proteomicznym i metabolomicznym.
2. Zoptymalizowano i zwalidowano metodę rozdzielania i oznaczania 42 aminokwasów w jednym cyklu analitycznym w surowicy i moczu przy wykorzystaniu zestawu LC-ESI-QqQ-MS/MS oraz odczynnika aTRAQ. Zastosowana metoda oznaczania aminokwasów charakteryzuje się wysoką specyficznością, skróconym czasem analizy w porównaniu do innych technik analizy aminokwasów, małą objętością próbki biologicznej wymaganej do wykonania oznaczeń, dużą ilością analitów oznaczanych w jednym cyklu analitycznym oraz niską granicą wykrywalności.
3. Przeprowadzone badania potwierdziły, że aminokwasy to grupa metabolitów, która posiada wysoki potencjał wykorzystania jako biomarkery raka prostaty. Prezentowane badania są pierwszymi, w których przeprowadzono kompleksową analizę profili aminokwasowych w dwóch różnych płynach ustrojowych pobranych od pacjentów z rakiem prostaty i zdrowych mężczyzn, analizując aż 42 metabolity w jednym cyklu analitycznym. Więcej aminokwasów oznaczono w moczu niż w surowicy i więcej związków pojawiało się na istotnie zmienionych poziomach w moczu w porównaniu do surowicy.



4. Na podstawie przeprowadzonych jednozmiennowych analiz statystycznych wykazano, że rak prostaty wywołuje zmiany w profilach wolnych aminokwasów w surowicy i moczu. W próbkach surowicy oznaczono 32 aminokwasy. Wykazano, że statystycznie istotne różnice dotyczyły 18 z 32 oznaczonych związków, spośród których 4 były obecne na istotnie wyższych poziomach w grupie badanej (sarkozyna, 3-metylo-L-histydyna,  $\beta$ -alanina oraz kwas asparaginowy). Natomiast 14 aminokwasów wykazywało poziomy istotnie niższe w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną (między innymi: metionina, etanoloamina, glutamina, izoleucyna, arginina oraz leucyna).
5. W próbkach moczu oznaczono 39 aminokwasów. Różne statystycznie poziomy stwierdzono dla 26 z 39 związków, spośród których jeden (tauryna) był obecny na istotnie wyższym poziomie w grupie badanej, natomiast 25 były istotnie niższe w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną (między innymi: kwas  $\gamma$ -amino-n-masłowy, fosfoetanolamina, etanoloamina, homocytrulina, arginina,  $\delta$ -hydroksylizyna i asparagina). Nie wykazano natomiast istotnych statystycznie różnic w poziomach sarkozyny w moczu pomiędzy grupą pacjentów z rakiem prostaty a grupą kontrolną.
6. W pracy wykazano, że poziomy aminokwasów w obu płynach ustrojowych, zarówno w surowicy, jak i w moczu, są użyteczne w klasyfikacji pacjentów z rakiem prostaty i osób zdrowych. Na podstawie przeprowadzonych analiz wielozmiennowych stwierdzono, że zmienione obecnością raka prostaty profile aminokwasowe w obu płynach ustrojowych pozwalają osiągnąć grupowanie się pacjentów (analizy PLS-DA) oraz uzyskać wysoką poprawność klasyfikacji próbek do grupy pacjentów z rakiem lub grupy kontrolnej.
7. Opracowano i zwalidowano nową metodę oznaczania kreatyniny w moczu przy wykorzystaniu zestawu LC-ESI-QqQ-MS/MS. Opracowana metoda oznaczania kreatyniny charakteryzuje się prostą procedurą przygotowania próbek, krótkim czasem analizy, wysoką selektywnością, czułością, dokładnością i precyzją.

8. Zoptymalizowano metodę profilowania peptydów obecnych w surowicy i moczu w zakresie mas od 1 do 10 kDa przy wykorzystaniu zestawu MALDI-TOF-MS. Wśród zalet metody należy wymienić wysoką czułość, nieskomplikowaną procedurę przygotowania próbek oraz małą objętość płynu biologicznego wymaganego do wykonania analiz.
9. Wykorzystując technikę MALDI-TOF-MS otrzymano profile peptydowe próbek surowicy i moczu. Na podstawie przeprowadzonych analiz statystycznych wykazano, że rak prostaty wywołuje zmiany w profilach peptydowych w surowicy i moczu. Analizy wykorzystujące intensywności peptydów otrzymane w wyniku profilowania peptydowego wykazały statystycznie istotne różnice dotyczące 65 ze 136 peptydów w przypadku surowicy i 108 ze 149 w przypadku moczu. Pięć peptydów, dla których wartość p była najniższa w przypadku surowicy to peptydy o masach: 1288,69 Da, 1099,41 Da, 1866,53 Da, 1888,55 Da i 1779,38 Da. Natomiast w przypadku moczu najniższe wartości p uzyskano dla peptydów o masach: 1793,20 Da, 2444,56 Da, 2235,57 Da, 1237,03 Da i 2050,43 Da.
10. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano użyteczność profili peptydowych w surowicy i moczu w dyskryminacji mężczyzn cierpiących na raka prostaty i zdrowych. Przeprowadzenie analizy profili peptydowych w dwóch różnych płynach ustrojowych pobranych od pacjentów z rakiem prostaty i zdrowych mężczyzn wskazuje jednak, że większy potencjał dyskryminacyjny w raku prostaty charakteryzuje peptydy w próbkach surowicy. Zostało to wykazane na podstawie takich analiz wielozmiennowych, jak PLS-DA, analiza dyskryminacyjna i krzywe ROC. Jedynie w analizach statystycznych wykorzystujących algorytmy QC, SNN i GA otrzymano podobne wartości czułości, swoistości oraz ogólnej poprawności klasyfikacji dla obu zbiorów danych (peptydów w surowicy i moczu).

11. Przeprowadzone analizy PLS-DA, w których analizowano trzy grupy pacjentów z rakiem prostaty wyodrębnione według wzrastającego stopnia złośliwości histologicznej (z sześcioma, siedmioma oraz ośmioma lub dziewięcioma punktami w skali Gleasona) wykazały grupowanie się pacjentów w zależności od przyporządkowania próbki do jednej z grup. Zatem stopień złośliwości histologicznej raka prostaty ma swoje odbicie w profilu aminokwasowym i peptydowym płynów ustrojowych. W związku z tym uzasadnione jest poszukiwanie biomarkerów prognostycznych raka prostaty, które pozwoliłyby na dyskryminację pacjentów w zależności od poziomu agresywności nowotworu.
  
12. Wykorzystując metodę separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej przy użyciu zestawu Bio-Plex analizowano panel 16 biomarkerów nowotworowych, którymi były białka uczestniczące w procesie angiogenezy. Na podstawie przeprowadzonych analiz statystycznych wykazano, że 10 z 16 białek było obecnych na istotnie wyższych poziomach w grupie badanej. Białkami tymi były: sVEGFR-1, HGF, osteopontyna, FGF-basic, G-CSF, PDGF-AB/BB, SCF, sEGFR, PECAM-1 i sVEGFR-2. Wśród tej grupy białek należy poszukiwać biomarkerów, które mogą znaleźć zastosowanie w diagnostyce raka prostaty.

## 9. Streszczenie

W niniejszej rozprawie doktorskiej zatytułowanej: „Proteomiczna i metabolomiczna analiza surowicy krwi i moczu w poszukiwaniu biomarkerów raka prostaty” podjęto próbę zastosowania nowoczesnej i złożonej strategii analityczno-bioinformatycznej w analizie związków endogennych w płynach ustrojowych (surowicy oraz moczu) w poszukiwaniu biomarkerów o wartości diagnostycznej mających znaczenie w wykrywaniu raka prostaty. Badania prowadzone były w oparciu o nowoczesną platformę analityczną, wykorzystującą metody spektrometrii mas (LC-ESI-QqQ-MS/MS, MALDI-TOF-MS) oraz testy immunologiczne. Nowatorski model poszukiwania biomarkerów raka prostaty w oparciu o powyższe techniki wsparty został zaawansowaną analizą chemometryczną. Do badań wykorzystano próbki surowicy i moczu pobrane od pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem prostaty (n = 49) oraz od zdrowych mężczyzn (n = 40).

Oznaczanie małowymiarowych metabolitów, w tym aminokwasów, w płynach biologicznych jest małoinwazyjną metodą o wysokim potencjale diagnostycznym. Badanie profili wolnych aminokwasów w surowicy i moczu oparto o technikę LC-ESI-QqQ-MS/MS oraz o odczynnik aTRAQ (AB Sciex). Zestaw aTRAQ umożliwia oznaczenie 42 wolnych aminokwasów w różnych płynach ustrojowych i matrycach biologicznych. Do przeprowadzenia analiz wykorzystano chromatograf cieczerwowy 1260 Infinity (Agilent Technologies) sprzężony ze spektrometrem mas 4000 QTRAP (AB Sciex). Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na kolumnie chromatograficznej AB Sciex C18 (150 mm × 4,6 mm, 5,0 μm). Przepływ faz ruchomych wynosił 800 μl/min. Fazami ruchomymi były woda (faza A) oraz metanol (faza B), obie z dodatkiem 0,1 % kwasu mrówkowego i 0,01 % kwasu heptafluoromasłowego. Czas analizy wynosił 18 minut. Rozdział chromatograficzny przebiegał przy zastosowaniu elucji gradientowej. Temperatura kolumny była utrzymywana na poziomie 50 °C, a objętość nasytywania wynosiła 2 μl. Aminokwasy były analizowane w trybie planowanego monitorowania reakcji wielokrotnych (sMRM). W celu weryfikacji walidacji wykorzystanej metody oznaczania aminokwasów ocenie poddano następujące parametry: dokładność, precyzja (powtarzalność i odtwarzalność) w odniesieniu do oznaczanych stężeń aminokwasów i czasów retencji.

Grupą związków, mogących potencjalnie pełnić rolę biomarkerów, są także peptydy i białka. Ponieważ peptydy mają wyższe masy cząsteczkowe w porównaniu do aminokwasów, ich analiza wymaga innego podejścia analitycznego. Badanie profili peptydowych w surowicy i moczu oparto o technikę MALDI-TOF-MS. Do przeprowadzenia analiz wykorzystano spektrometr mas UltrafleXtreme (Bruker

Daltonics). Przygotowanie próbek surowicy i moczu do profilowania peptydowego wykorzystującego technikę MALDI-TOF-MS obejmowało między innymi wykorzystanie końcówek ZipTip (Millipore) w celu zatężenia peptydów w surowicy i moczu oraz oczyszczenia próbek z zanieczyszczających je składników utrudniających dalszą analizę. Następnie próbki surowicy mieszano z odpowiednio przygotowanym roztworem HCCA, który pełnił rolę matrycy, i наносono na płytkę AnchorChip Standard 800  $\mu\text{m}$  (Bruker Daltonics). Z kolei próbki moczu najpierw наносono na płytkę AnchorChip, a następnie po wyschnięciu dodawano odpowiedni roztwór HCCA. Widma MS (profile peptydowe) zostały wygenerowane w zakresie mas 1000 – 10000 Da. W celu otrzymania listy pików wraz z intensywnościami dla widma każdej analizowanej próbki surowicy i moczu przeprowadzono wstępną obróbkę profili peptydowych.

Ponadto analizowano panel markerów nowotworowych (białek uczestniczących w procesie angiogenezy) w surowicy z wykorzystaniem metody separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej przy użyciu zestawu Bio-Plex (Bio-Rad). Metoda jest przykładem testu immunologicznego oraz techniki multipleksowej i pozwala równocześnie analizować wiele analitów w jednym cyklu analitycznym. Wykorzystany zestaw Bio-Plex umożliwia jednoczesne oznaczenie 16 białek w różnych matrycach biologicznych. W metodzie stosuje się barwione fluorescencyjnie kulki magnetyczne, stanowiące podstawę technologii Luminex/xMAP. Do przeprowadzenia analiz wykorzystano cytometr przepływowy Bio-Plex MAGPIX (Bio-Rad), wyposażony w dwie diody elektroluminescencyjne, z których jedna emituje światło czerwone o długości fali 635 nm, a druga emituje światło zielone o długości fali 532 nm. W celu weryfikacji walidacji wykorzystanej metody oznaczania białek ocenie poddano dokładność metody oraz wykreślono krzywe wzorcowe dla analitów z wykorzystaniem 5-parametrowej regresji logistycznej, oceniono poprawność ich dopasowania i określono zakres (LLOQ/ULOQ) dla każdego analitu.

Analiza moczu jest procedurą, która wymaga specyficznego podejścia ze względu na różnice w objętości moczu w próbkach pobieranych jednorazowo. Konieczna jest kompensacja różnic w objętości moczu poprzez normalizację stężeń oznaczanych związków do stężenia kreatyniny w moczu. Opracowano metodę oznaczania kreatyniny w moczu z wykorzystaniem techniki LC-ESI-QqQ-MS/MS oraz nafazoliny jako wzorca wewnętrznego. Do przeprowadzenia analiz wykorzystano chromatograf cieczowy 1260 Infinity (Agilent Technologies) sprzężony ze spektrometrem mas 4000 QTRAP (AB Sciex). Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na kolumnie chromatograficznej XTerra C18 (100 mm  $\times$  2,1 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ) (Waters Corporation). Przepływ faz ruchomych wynosił 100  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Fazami

ruchomymi były 0,1 % roztwór kwasu mrówkowego w wodzie (faza A) oraz 0,1 % roztwór kwasu mrówkowego w acetonitrylu (faza B). Czas analizy wynosił 15 minut. Rozdział chromatograficzny przebiegał przy zastosowaniu elucji gradientowej. Temperatura kolumny była utrzymywana na poziomie 25 °C, a objętość nastrzyku wynosiła 5 µl. Wykorzystanym trybem skanowania było monitorowanie reakcji wielokrotnych (MRM). Przeprowadzono walidację opracowanej metody oznaczania kreatyniny w moczu. Walidacji poddano następujące parametry: selektywność, dokładność, precyzję (powtarzalność i odtwarzalność), liniowość, zakres, granicę wykrywalności, granicę oznaczalności oraz stabilność. Opracowaną metodę wykorzystano następnie do normalizacji stężeń aminokwasów w próbkach moczu uzyskanych z wykorzystaniem techniki LC-ESI-QqQ-MS/MS oraz odpowiedniego rozcieńczenia próbek moczu przed profilowaniem peptydowym wykorzystującym technikę MALDI-TOF-MS.

W celu analizy danych metabolomicznych i proteomicznych otrzymanych w przeprowadzonych badaniach wykorzystano analizy statystyczne jednozmiennowe (test U Manna-Whitney'a, test t-Studenta, test F Welcha, krzywe ROC) oraz wielozmiennowe (PLS-DA, krzywe ROC, analiza dyskryminacyjna, algorytmy QC, SNN i GA). Zmiennymi w analizach były stężenia aminokwasów oznaczone w próbkach surowicy i moczu, intensywności peptydów z widm MS otrzymanych w wyniku profilowania próbek surowicy i moczu oraz stężenia białek oznaczone w próbkach surowicy.

Otrzymane wyniki dowodzą, że rak prostaty wywołuje zmiany w surowicy i moczu na poziomie proteomicznym i metabolomicznym. Istnieje zatem korelacja pomiędzy stanem biologicznym pacjenta a jego statusem proteomicznym i metabolomicznym.

Przeprowadzone badania potwierdziły, że aminokwasy to grupa metabolitów, która posiada wysoki potencjał wykorzystania jako biomarkery raka prostaty. Prezentowane badania są pierwszymi, w których przeprowadzono kompleksową analizę profili aminokwasowych w dwóch różnych płynach ustrojowych pobranych od pacjentów z rakiem prostaty i zdrowych mężczyzn, analizując aż 42 metabolity w jednym cyklu analitycznym. Wykazano, że rak prostaty wywołuje zmiany w profilach wolnych aminokwasów w surowicy i moczu. Stwierdzono, że w przypadku surowicy statystycznie istotne różnice dotyczyły 18 z 32 oznaczonych aminokwasów, spośród których 4 były obecne na istotnie wyższych poziomach w grupie badanej (sarkozyna, 3-metylo-L-histydyna, β-alanina oraz kwas asparaginowy), natomiast 14 wykazywało poziomy istotnie niższe w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną (między innymi: metionina, etanoloamina, glutamina, izoleucyna, arginina oraz leucyna). W

przypadku moczu różne statystycznie poziomy stwierdzono dla 26 z 39 aminokwasów, spośród których jeden (tauryna) był obecny na istotnie wyższym poziomie w grupie badanej, natomiast poziomy 25 były istotnie niższe w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną (między innymi: kwas  $\gamma$ -amino-n-masłowy, fosfoetanolamina, etanolamina, homocytrulina, arginina,  $\delta$ -hydroksylizyna i asparagina). Nie wykazano natomiast istotnych statystycznie różnic w poziomach sarkozyny w moczu pomiędzy grupą pacjentów z rakiem prostaty a grupą kontrolną. Na podstawie przeprowadzonych analiz wielozmiennowych wykazano, że zmienione obecnością raka prostaty profile aminokwasowe zarówno w surowicy, jak i w moczu, są użyteczne w klasyfikacji pacjentów z rakiem prostaty i osób zdrowych z wysoką czułością i swoistością.

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że rak prostaty wywołuje zmiany w profilach peptydowych w surowicy i moczu. Stwierdzono statystycznie istotne różnice intensywności dotyczące 65 ze 136 peptydów w przypadku surowicy i 108 ze 149 w przypadku moczu. Pięć peptydów, dla których wartość p była najniższa w przypadku surowicy to peptydy o masach: 1288,69 Da, 1099,41 Da, 1866,53 Da, 1888,55 Da i 1779,38 Da. Natomiast w przypadku moczu najniższe wartości p uzyskano dla peptydów o masach: 1793,20 Da, 2444,56 Da, 2235,57 Da, 1237,03 Da i 2050,43 Da. Wielozmiennowe modele zbudowane z wykorzystaniem profili peptydowych w surowicy i moczu wykazały ich użyteczność w dyskryminacji mężczyzn cierpiących na raka prostaty i zdrowych. Większy potencjał dyskryminacyjny w raku prostaty charakteryzuje jednak peptydy w próbkach surowicy.

W pracy stwierdzono grupowanie się pacjentów w zależności od punktów w skali Gleasona. Zatem stopień złośliwości histologicznej raka prostaty ma swoje odbicie w profilu aminokwasowym i peptydowym płynów ustrojowych.

Przeprowadzone badania wykazały, że 10 białek (sVEGFR-1, HGF, osteopontyna, FGF-basic, G-CSF, PDGF-AB/BB, SCF, sEGFR, PECAM-1 i sVEGFR-2) uczestniczących w procesie angiogenezy było obecnych na istotnie wyższych poziomach w grupie pacjentów z rakiem prostaty w porównaniu z grupą kontrolną.

## 10. Summary

In the presented doctoral thesis entitled: „Proteomic and metabolomic analysis of serum and urine in search for prostate cancer biomarkers” an attempt was made to use the modern and complex analytical-bioinformatic strategy in the analysis of endogenous compounds in body fluids (serum and urine) in search for biomarkers of diagnostic value with potential of prostate cancer detection. The study was performed based on the modern analytical platform that uses mass spectrometry methods (LC-ESI-QqQ-MS/MS, MALDI-TOF-MS) and immunological tests. The innovatory model of searching for prostate cancer biomarkers based on the aforementioned techniques was supported by the advanced chemometric analysis. The investigation was performed with serum and urine samples derived from prostate cancer patients (n = 49) and control group of healthy men (n = 40).

Determination of low-molecular weight metabolites, including amino acids, in biological fluids is the little invasive method of high diagnostic potential. The analysis of free amino acid profiles in serum and urine was based on the LC-ESI-QqQ-MS/MS technique and the aTRAQ (AB Sciex) reagent. The aTRAQ kit allows to quantify 42 free amino acids in a range of physiological fluids and biological matrices. The analyses were performed with the liquid chromatography instrument 1260 Infinity (Agilent Technologies) coupled to the 4000 QTRAP mass spectrometer (AB Sciex). The chromatographic separation was performed with the AB Sciex C18 (150 mm × 4,6 mm, 5,0 µm) chromatography column. The flow rate of mobile phases was maintained at 800 µl/min. The mobile phases were water (phase A) and methanol (phase B), both with 0,1 % formic acid and 0,01 % heptafluorobutyric acid. The time of analysis was 18 minutes. The chromatographic separation was carried out with the gradient elution. The separation temperature was set at 50 °C and the injection volume was 2 µl. The amino acids were measured in scheduled multiple reaction monitoring (sMRM) mode. In order to verify the validation of the method of amino acid quantitation the following parameters were assessed: accuracy, precision (intra-day and inter-day) of amino acid concentrations and retention times.

The group of compounds, which can potentially serve as biomarkers, are also peptides and proteins. Since peptides have higher molecular masses comparing to amino acids, their analysis requires different analytical approach. The analysis of peptide profiles in serum and urine was based on the MALDI-TOF-MS technique. The analyses were performed using the UltrafleXtreme (Bruker Daltonics) mass spectrometer. The serum and urine sample preparation for peptide profiling using the MALDI-TOF-MS technique involved i.a. the use of the ZipTip (Millipore) pipette tips to



concentrate the peptides in serum and urine and to purify the samples from contaminating components which could hinder the subsequent analysis. Serum samples were then mixed with the adequately prepared HCCA solution, which served as the matrix, and spotted onto the AnchorChip Standard 800  $\mu\text{m}$  (Bruker Daltonics) target. In turn, urine samples were first spotted onto the AnchorChip target and then after drying out the adequate HCCA solution was added. The MS spectra (peptide profiles) were recorded in the mass range 1000 – 10000 Da. In order to obtain the list of peaks with their intensities for spectrum of each analyzed serum and urine sample, the preprocessing of peptide profiles was performed.

Moreover, the panel of cancer markers (proteins involved in the process of angiogenesis) in serum was analyzed using the magnetic separation and flow cytometry method and the Bio-Plex (Bio-Rad) kit. The method is an example of the immunological test and multiplex technique and allows to simultaneously analyze multiple analytes in a single analytical run. The utilized Bio-Plex kit allows to quantify 16 proteins at the same time in a range of biological matrices. In the method fluorescently dyed magnetic beads are used. They are the basis of the Luminex/xMAP technology. The analyses were performed using the Bio-Plex MAGPIX (Bio-Rad) flow cytometer, equipped with two diodes, one of which emits red light with a wavelength of 635 nm, while the other one emits green light with a wavelength of 532 nm. In order to verify the validation of the method of protein quantitation the accuracy was assessed and the standard curves for the analytes were plotted using the five-parameter logistic regression, goodness of fit of standard curves was evaluated and range (LLOQ/ULOQ) for each analyte was determined.

Analysis of urine is a procedure that requires the specific approach because of the differences in urine volume in spot urine samples. The compensation of differences in urine volume is necessary and it is achieved by the normalization of concentrations of determined compounds to the creatinine concentration in urine. An LC-ESI-QqQ-MS/MS method for creatinine determination in urine with naphazoline as internal standard has been developed. The analyses were performed with the liquid chromatography instrument 1260 Infinity (Agilent Technologies) coupled to the 4000 QTRAP mass spectrometer (AB Sciex). The chromatographic separation was performed with the XTerra C18 (100 mm  $\times$  2,1 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ) (Waters Corporation) chromatography column. The flow rate of mobile phases was maintained at 100  $\mu\text{l}/\text{min}$ . The mobile phases were 0,1 % formic acid in water (phase A) and 0,1 % formic acid in acetonitrile (phase B). The time of analysis was 15 minutes. The chromatographic separation was carried out with the gradient elution. The separation temperature was set at 25  $^{\circ}\text{C}$  and the injection volume was 5  $\mu\text{l}$ . Multiple reaction monitoring (MRM)

mode was used. The developed method of creatinine determination in urine was validated. The following validation parameters were assessed: selectivity, accuracy, intra-day and inter-day precision, linearity, range, limit of quantification, limit of detection and stability tests. The developed method was subsequently used to normalize the amino acid concentrations in urine samples obtained by using LC-ESI-QqQ-MS/MS technique and to appropriately dilute urine samples prior to the protein profiling using MALDI-TOF-MS technique.

In order to analyze the proteomic and metabolomic data obtained in the performed studies, the univariate (Mann-Whitney U test, Student's t-test, Welch's F test, ROC curves) and multivariate (PLS-DA, ROC curves, discriminant function analysis, QC, SNN and GA algorithms) statistical analyses were applied. The variables in the analyses were the amino acid concentrations quantified in serum and urine samples, the peptide intensities of MS spectra obtained from serum and urine samples profiling and protein concentrations quantified in serum samples.

The obtained results proved that prostate cancer causes changes in serum and urine on the proteomic and metabolomic level. Therefore, there is a correlation between the biological condition of the patient and his proteomic and metabolomic status.

The performed studies confirmed that amino acids is a group of metabolites, which has a high potential of use as prostate cancer biomarkers. The presented study is the first to perform the comprehensive analysis of amino acid profiles in two different body fluids obtained from prostate cancer patients and healthy men. 42 metabolites were analyzed in one analytical run. It was demonstrated that prostate cancer causes changes in free amino acid profiles in serum and urine. In case of serum, statistically significant differences were found in case of 18 of 32 quantified amino acids, among which 4 were present on significantly higher levels in the research group (sarcosine, 3-methyl-L-histidine,  $\beta$ -alanine and aspartic acid), while 14 had levels significantly lower in the research group comparing to the control group (i.a. methionine, ethanolamine, glutamine, isoleucine, arginine and leucine). In case of urine, levels of 26 of 39 amino acids differed significantly, among which one (taurine) was present at significantly higher level in the research group, while 25 had levels significantly lower in the research group comparing to the control group (i.a.  $\gamma$ -amino-n-butyric acid, phosphoethanolamine, ethanolamine, homocitrulline, arginine,  $\delta$ -hydroxylysine and asparagine). Statistically significant differences in levels of urinary sarcosine between the group of prostate cancer patients and the control group were not demonstrated. Based on the performed multivariate statistical analyses it was demonstrated that amino acids profiles changed by the presence of prostate cancer are useful in

classification of prostate cancer patients and healthy men with high sensitivity and specificity, both in serum and urine.

Based on the performed studies it was demonstrated that prostate cancer causes changes in peptide profiles in serum and urine. Statistically significant differences in intensities were found in case of 65 of 136 peptides in serum and in case of 108 of 149 peptides in urine. Five peptides with the lowest p value in case of serum were peptides of masses of: 1288,69 Da, 1099,41 Da, 1866,53 Da, 1888,55 Da and 1779,38 Da. In case of urine, the lowest p values were obtained for peptides of masses of: 1793,20 Da, 2444,56 Da, 2235,57 Da, 1237,03 Da and 2050,43 Da. Multivariate models built using peptide profiles in serum and urine demonstrated their ability to discriminate men with prostate cancer and healthy ones. However, peptides in serum samples has higher discriminatory potential in prostate cancer.

The obtained results demonstrated the grouping of patients according to the Gleason score. Therefore, grading of prostate cancer is reflected in amino acid and peptide profile of body fluids.

The performed studies demonstrated that 10 proteins (sVEGFR-1, HGF, osteopontin, FGF-basic, G-CSF, PDGF-AB/BB, SCF, sEGFR, PECAM-1 and sVEGFR-2), which are involved in angiogenesis, were present at significantly higher levels in the group of prostate cancer patients comparing to the control group.

## 11. Piśmiennictwo

1. Liu Y, Hegde P, Zhang F, Hampton G, Jia S. Prostate cancer - a biomarker perspective. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3:72.
2. Group Health Cooperative. Prostate cancer screening guideline. 2013, 1-9.
3. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(2):69-90.
4. Nakagawa H, Akamatsu S, Takata R, Takahashi A, Kubo M, Nakamura Y. Prostate cancer genomics, biology, and risk assessment through genome-wide association studies. *Cancer Sci*. 2012;103(4):607-13.
5. Krzemieniecki K, Zygulska A. Wybrane zagadnienia współczesnej onkologii, Zeszyt 1 – Rak gruczołu krokowego. *Via Medica*. 2009.
6. Dadej R, Cieslinski P, Kwias Z. Rak stercza. *Wspolczesna Onkol*. 2002;6(2):108-116.
7. Hsing AW, Devesa SS. Trends and patterns of prostate cancer: what do they suggest? *Epidemiol Rev*. 2001;23(1):3-13.
8. Matsuda T, Saika K. Comparison of time trends in prostate cancer incidence (1973-2002) in Asia, from cancer incidence in five continents, Vols IV-IX. *Jpn J Clin Oncol*. 2009;39(7):468-9.
9. Bratt O. Hereditary prostate cancer: Clinical aspects. *J Urology*. 2002;168(3):906-13.
10. Carter BS, Bova GS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Isaacs WB, i wsp. Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. *J Urol*. 1993;150(3):797-802.
11. Meyer F, Bairati I, Shadmani R, Fradet Y, Moore L. Dietary fat and prostate cancer survival. *Cancer Causes Control*. 1999;10(4):245-51.
12. Fradet Y, Meyer F, Bairati I, Shadmani R, Moore L. Dietary fat and prostate cancer progression and survival. *Eur Urol*. 1999;35(5-6):388-91.
13. Schaid DJ. The complex genetic epidemiology of prostate cancer. *Hum Mol Genet*. 2004;13 Spec No 1:R103-21.
14. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, i wsp. Environmental and heritable factors in the causation of cancer - Analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *New Engl J Med*. 2000;343(2):78-85.
15. Edwards SM, Kote-Jarai Z, Meitz J, Hamoudi R, Hope Q, Osin P, i wsp. Two percent of men with early-onset prostate cancer harbor germline mutations in the BRCA2 gene. *Am J Hum Genet*. 2003;72(1):1-12.

16. Epstein JI, Allsbrook WC, Amin MB, Egevad LL, Bastacky S, Beltran AL, i wsp. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2005;29(9):1228-42.
17. Bailar JC, 3rd, Mellinger GT, Gleason DF. Survival rates of patients with prostatic cancer, tumor stage, and differentiation--preliminary report. *Cancer Chemother Rep.* 1966;50(3):129-36.
18. Gleason DF. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep.* 1966;50(3):125-8.
19. Mellinger GT, Gleason D, Bailar J, 3rd. The histology and prognosis of prostatic cancer. *J Urol.* 1967;97(2):331-7.
20. Pierorazio PM, Walsh PC, Partin AW, Epstein JI. Prognostic Gleason grade grouping: data based on the modified Gleason scoring system. *BJU Int.* 2013;111(5):753-60.
21. Lilja H. Biology of prostate-specific antigen. *Urology.* 2003;62(5 Suppl 1):27-33.
22. Kohli M, Tindall DJ. New developments in the medical management of prostate cancer. *Mayo Clin Proc.* 2010;85(1):77-86.
23. Lucarelli G, Fanelli M, Larocca AMV, Germinario CA, Rutigliano M, Vavallo A, i wsp. Serum sarcosine increases the accuracy of prostate cancer detection in patients with total serum PSA less than 4.0 ng/ml. *Prostate.* 2012;72(15):1611-21.
24. Moyer VA, Force USPST. Screening for prostate cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med.* 2012;157(2):120-34.
25. Thompson IM, Ankerst DP, Chi C, Lucia MS, Goodman PJ, Crowley JJ, i wsp. Operating characteristics of prostate-specific antigen in men with an initial PSA level of 3.0 ng/ml or lower. *JAMA.* 2005;294(1):66-70.
26. Postma R, Schroder FH. Screening for prostate cancer. *Eur J Cancer.* 2005;41(6):825-33.
27. Pavlou M, Diamandis EP. The search for new prostate cancer biomarkers continues. *Clin Chem.* 2009;55(7):1277-9.
28. Bohm L, Serafin AM, Fernandez P, Van der Watt G, Bouic PJ, Harvey J. Plasma sarcosine does not distinguish early and advanced stages of prostate cancer. *S Afr Med J.* 2012;102(8):677-9.
29. Velonas VM, Woo HH, dos Remedios CG, Assinder SJ. Current status of biomarkers for prostate cancer. *Int J Mol Sci.* 2013;14(6):11034-60.
30. Sardana G, Dowell B, Diamandis EP. Emerging biomarkers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Clin Chem.* 2008;54(12):1951-60.
31. Mazzola CR, Ghoneim T, Shariat SF. [Emerging biomarkers for the diagnosis, staging and prognosis of prostate cancer]. *Prog Urol.* 2011;21(1):1-10.

32. Schaeffer EM, Carter HB, Kettermann A, Loeb S, Ferrucci L, Landis P, i wsp. Prostate Specific Antigen Testing Among the Elderly-When To Stop? *J Urology*. 2009;181(4):1606-13.
33. Schroder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V, i wsp. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N Engl J Med*. 2009;360(13):1320-8.
34. Rosario DJ, Lane JA, Metcalfe C, Donovan JL, Doble A, Goodwin L, i wsp. Short term outcomes of prostate biopsy in men tested for cancer by prostate specific antigen: prospective evaluation within ProtecT study. *Brit Med J*. 2012;344.
35. Welch HG, Albertsen PC. Prostate Cancer Diagnosis and Treatment After the Introduction of Prostate-Specific Antigen Screening: 1986-2005. *J Natl Cancer I*. 2009;101(19):1325-9.
36. Cooperberg MR, Broering JM, Carroll PR. Time Trends and Local Variation in Primary Treatment of Localized Prostate Cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(7):1117-23.
37. Chou R, Croswell JM, Dana T, Bougatsos C, Blazina I, Fu R, i wsp. Screening for prostate cancer: a review of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 2011;155(11):762-71.
38. Chou R, Dana T, Bougatsos C, Fu R, Blazina I, Gleitsmann K, i wsp. Treatments for Localized Prostate Cancer: Systematic Review to Update the 2002 US Preventive Services Task Force Recommendation. U.S. Preventive Services Task Force Evidence Syntheses, formerly Systematic Evidence Reviews. Rockville (MD)2011.
39. Thomsen FB. Active surveillance strategy for patients with localised prostate cancer: criteria for progression. *Dan Med J*. 2015;61(2).
40. Vickers AJ, Till C, Tangen CM, Lilja H, Thompson IM. An Empirical Evaluation of Guidelines on Prostate-specific Antigen Velocity in Prostate Cancer Detection. *J Natl Cancer I*. 2011;103(6):462-9.
41. Roobol MJ, Steyerberg EW, Kranse R, Wolters T, van den Bergh RC, Bangma CH, i wsp. A risk-based strategy improves prostate-specific antigen-driven detection of prostate cancer. *Eur Urol*. 2010;57(1):79-85.
42. Kraj A, Drabik A, Silberring J. Proteomika i metabolomika. Wydawnictwa Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa 2010.
43. Spratlin JL, Serkova NJ, Eckhardt SG. Clinical applications of metabolomics in oncology: a review. *Clin Cancer Res*. 2009;15(2):431-40.
44. Taguchi A, Hanash SM. Unleashing the Power of Proteomics to Develop Blood-Based Cancer Markers. *Clinical Chemistry*. 2013;59(1):119-26.

45. Wang XJ, Zhang AH, Sun H. Power of Metabolomics in Diagnosis and Biomarker Discovery of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*. 2013;57(5):2072-7.
46. Patel S, Ahmed S. Emerging field of metabolomics: Big promise for cancer biomarker identification and drug discovery. *J Pharm Biomed Anal*. 2015;107C:63-74.
47. Aboud OA, Weiss RH. New opportunities from the cancer metabolome. *Clin Chem*. 2013;59(1):138-46.
48. Gupta S, Chawla K. Oncometabolomics in cancer research. *Expert Rev Proteomics*. 2013;10(4):325-36.
49. Shiryayeva L. Proteomics and metabolomics in biological and medical applications. 2011.
50. Claudino WM, Goncalves PH, di Leo A, Philip PA, Sarkar FH. Metabolomics in cancer: a bench-to bedside intersection. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012;84(1):1-7.
51. Armitage EG, Barbas C. Metabolomics in cancer biomarker discovery: current trends and future perspectives. *J Pharm Biomed Anal*. 2014;87:1-11.
52. Wilkins MR, Appel RD, Williams KL, Hochstrasser DF. Proteome research: Concepts, technology and application. Springer 2007.
53. Paul D, Kumar A, Gajbhiye A, Santra MK, Srikanth R. Mass Spectrometry-Based Proteomics in Molecular Diagnostics: Discovery of Cancer Biomarkers Using Tissue Culture. *Biomed Res Int*. 2013.
54. Hudler P, Kocevar N, Komel R. Proteomic Approaches in Biomarker Discovery: New Perspectives in Cancer Diagnostics. *Sci World J*. 2014.
55. Honda K, Ono M, Shitashige M, Masuda M, Kamita M, Miura N, i wsp. Proteomic Approaches to the Discovery of Cancer Biomarkers for Early Detection and Personalized Medicine. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 2013;43(2):103-9.
56. Beger RD. A review of applications of metabolomics in cancer. *Metabolites*. 2013;3(3):552-74.
57. Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, Hoth DF, i wsp. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69(3):89-95.
58. Fiehn O. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol*. 2002;48(1-2):155-71.
59. Holmes E, Wilson ID, Nicholson JK. Metabolic phenotyping in health and disease. *Cell*. 2008;134(5):714-7.
60. Vermeersch KA, Styczynski MP. Applications of metabolomics in cancer research. *J Carcinog*. 2013;12:9.
61. Bu Q, Huang YN, Yan GY, Cen XB, Zhao YL. Metabolomics: A Revolution for Novel Cancer Marker Identification. *Comb Chem High T Scr*. 2012;15(3):266-75.

62. Nicholson JK, Lindon JC. Systems biology - Metabonomics. *Nature*. 2008;455(7216):1054-6.
63. Pauling L, Robinson AB, Teranishi R, Cary P. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971;68(10):2374-6.
64. Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol*. 1998;16(9):373-8.
65. Blekherman G, Laubenbacher R, Cortes DF, Mendes P, Torti FM, Akman S, i wsp. Bioinformatics tools for cancer metabolomics. *Metabolomics*. 2011;7(3):329-43.
66. Drexler DM, Reily MD, Shipkova PA. Advances in mass spectrometry applied to pharmaceutical metabolomics. *Anal Bioanal Chem*. 2011;399(8):2645-53.
67. Ellis DI, Dunn WB, Griffin JL, Allwood JW, Goodacre R. Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. *Pharmacogenomics*. 2007;8(9):1243-66.
68. Schuhmacher R, Krska R, Weckwerth W, Goodacre R. Metabolomics and metabolite profiling. *Anal Bioanal Chem*. 2013;405(15):5003-4.
69. Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, Khan AP, Cao Q, Yu J, i wsp. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature*. 2009;457(7231):910-4.
70. Trock BJ. Application of metabolomics to prostate cancer. *Urol Oncol*. 2011;29(5):572-81.
71. Lai HS, Lee JC, Lee PH, Wang ST, Chen WJ. Plasma free amino acid profile in cancer patients. *Semin Cancer Biol*. 2005;15(4):267-76.
72. Miyagi Y, Miura T, Moriyama M, Ohta J, Muramatsu T, Imaizumi A, i wsp. Probability of plasma amino acid concentration and its profile as a novel diagnostic marker for prostate cancer. *Cancer Res* 2010;70(8 Suppl):Abstract nr 4632.
73. Miyagi Y, Higashiyama M, Gochi A, Akaike M, Ishikawa T, Miura T, i wsp. Plasma free amino acid profiling of five types of cancer patients and its application for early detection. *PLoS One*. 2011;6(9):e24143.
74. Thapar R, Titus MA. Recent Advances in Metabolic Profiling And Imaging of Prostate Cancer. *Curr Metabolomics*. 2014;2(1):53-69.
75. Hahn P, Smith IC, Leboldus L, Littman C, Somorjai RL, Bezabeh T. The classification of benign and malignant human prostate tissue by multivariate analysis of <sup>1</sup>H magnetic resonance spectra. *Cancer Res*. 1997;57(16):3398-401.
76. Serkova NJ, Gamito EJ, Jones RH, O'Donnell C, Brown JL, Green S, i wsp. The metabolites citrate, myo-inositol, and spermine are potential age-independent markers of prostate cancer in human expressed prostatic secretions. *Prostate*. 2008;68(6):620-8.



77. Swindle P, Ramadan S, Stanwell P, McCredie S, Russell P, Mountford C. Proton magnetic resonance spectroscopy of the central, transition and peripheral zones of the prostate: assignments and correlation with histopathology. *MAGMA*. 2008;21(6):423-34.
78. Schiebler ML, Miyamoto KK, White M, Maygarden SJ, Mohler JL. In vitro high resolution 1H-spectroscopy of the human prostate: benign prostatic hyperplasia, normal peripheral zone and adenocarcinoma. *Magn Reson Med*. 1993;29(3):285-91.
79. Heger Z, Cernei N, Gumulec J, Masarik M, Eckschlager T, Hrabec R, i wsp. Determination of common urine substances as an assay for improving prostate carcinoma diagnostics. *Oncol Rep*. 2014;31(4):1846-54.
80. de Vogel S, Ulvik A, Meyer K, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE, i wsp. Sarcosine and other metabolites along the choline oxidation pathway in relation to prostate cancer-A large nested case-control study within the JANUS cohort in Norway. *Int J Cancer*. 2014;134(1):197-206.
81. Jentzmik F, Stephan C, Miller K, Schrader M, Erbersdobler A, Kristiansen G, i wsp. Sarcosine in Urine after Digital Rectal Examination Fails as a Marker in Prostate Cancer Detection and Identification of Aggressive Tumours. *European Urology*. 2010;58(1):12-8.
82. Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, Khan AP, Cao Q, Yu J, i wsp. Re: Florian Jentzmik, Carsten Stephan, Kurt Miller, i wsp. Sarcosine in urine after digital rectal examination fails as a marker in prostate cancer detection and identification of aggressive tumours. *Eur Urol* 2010;58:12-8. *Eur Urol*. 2010;58(3):e29-30; author reply e1-2.
83. Colleselli D, Stenzl A, Schwentner C. Re: Florian Jentzmik, Carsten Stephan, Kurt Miller, i wsp. Sarcosine in Urine after Digital Rectal Examination Fails as a Marker in Prostate Cancer Detection and Identification of Aggressive Tumours. *Eur Urol* 2010; 58: 12-8. *European Urology*. 2010;58(5):E51-E.
84. Wu H, Liu TT, Ma CG, Xue RY, Deng CH, Zeng HZ, i wsp. GC/MS-based metabolomic approach to validate the role of urinary sarcosine and target biomarkers for human prostate cancer by microwave-assisted derivatization. *Anal Bioanal Chem*. 2011;401(2):635-46.
85. Cao DL, Ye DW, Zhu Y, Zhang HL, Wang YX, Yao XD. Efforts to resolve the contradictions in early diagnosis of prostate cancer: a comparison of different algorithms of sarcosine in urine. *Prostate Cancer P D*. 2011;14(2):166-72.
86. Struys EA, Heijboer AC, van Moorselaar J, Jakobs C, Blankenstein MA. Serum sarcosine is not a marker for prostate cancer. *Ann Clin Biochem*. 2010;47(Pt 3):282.

87. Gika HG, Theodoridis GA, Plumb RS, Wilson ID. Current practice of liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics and metabonomics. *J Pharmaceut Biomed.* 2014;87:12-25.
88. Goodacre R, Broadhurst D, Smilde AK, Kristal BS, Baker JD, Beger R, i wsp. Proposed minimum reporting standards for data analysis in metabolomics. *Metabolomics.* 2007;3(3):231-41.
89. Recker F, Kwiatkowski MK, Piironen T, Pettersson K, Huber A, Lummen G, i wsp. Human glandular kallikrein as a tool to improve discrimination of poorly differentiated and non-organ-confined prostate cancer compared with prostate-specific antigen. *Urology.* 2000;55(4):481-5.
90. Stephan C, Jung K, Nakamura T, Yousef GM, Kristiansen G, Diamandis EP. Serum human glandular kallikrein 2 (hK2) for distinguishing stage and grade of prostate cancer. *Int J Urol.* 2006;13(3):238-43.
91. Elgamal AA, Holmes EH, Su SL, Tino WT, Simmons SJ, Peterson M, i wsp. Prostate-specific membrane antigen (PSMA): current benefits and future value. *Semin Surg Oncol.* 2000;18(1):10-6.
92. Gasinska A, Luczynska E, Wilk W, Cichocka A. Differences in the expression of telomerase and prostate-specific membrane antigen in non-advanced prostatic cancer. *Folia Histochem Cytobiol.* 2013;51(1):66-72.
93. Uetsuki H, Tsunemori H, Taoka R, Haba R, Ishikawa M, Kakehi Y. Expression of a novel biomarker, EPCA, in adenocarcinomas and precancerous lesions in the prostate. *J Urology.* 2005;174(2):514-8.
94. Zhao ZG, Zeng GH, Zhong W. Serum Early Prostate Cancer Antigen (EPCA) as a Significant Predictor of Incidental Prostate Cancer in Patients Undergoing Transurethral Resection of the Prostate for Benign Prostatic Hyperplasia. *Prostate.* 2010;70(16):1788-98.
95. Marks LS, Fradet Y, Deras IL, Blase A, Mathis J, Aubin SMJ, i wsp. PCA3 molecular urine assay for prostate cancer in men undergoing repeat biopsy. *Urology.* 2007;69(3):532-5.
96. Jiang Z, Wu CL, Woda BA, Iczkowski KA, Chu PG, Tretiakova MS, i wsp. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a multi-institutional study of a new prostate cancer marker. *Histopathology.* 2004;45(3):218-25.
97. Gu Z, Thomas G, Yamashiro J, Shintaku IP, Dorey F, Raitano A, i wsp. Prostate stem cell antigen (PSCA) expression increases with high gleason score, advanced stage and bone metastasis in prostate cancer. *Oncogene.* 2000;19(10):1288-96.

98. Thielemann A, Kopczynski Z, Baszczuk A, Cwiklinska K, Grodecka-Gazdecka S. Assessment of sVEGFR-1 concentration in patients with breast cancer. *Wspolczesna Onkol.* 2010;14(3):189-95.
99. Muller V, Witzel I, Pantel K, Krenkel S, Luck HJ, Neumann R, i wsp. Prognostic and predictive impact of soluble epidermal growth factor receptor (sEGFR) protein in the serum of patients treated with chemotherapy for metastatic breast cancer. *Anticancer Res.* 2006;26(2B):1479-87.
100. Zhang H, Berezov A, Wang Q, Zhang G, Drebin J, Murali R, i wsp. ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *J Clin Invest.* 2007;117(8):2051-8.
101. Maramotti S, Paci M, Micciche F, Ciarrocchi A, Cavazza A, De Bortoli M, i wsp. Soluble epidermal growth factor receptor isoforms in non-small cell lung cancer tissue and in blood. *Lung Cancer.* 2012;76(3):332-8.
102. Erdem H, Yildirim U, Uzunlar AK, Cam K, Tekin A, Kayikci MA, i wsp. Relationship among expression of basic-fibroblast growth factor, MTDH/Astrocyte elevated gene-1, adenomatous polyposis coli, matrix metalloproteinase 9, and COX-2 markers with prognostic factors in prostate carcinomas. *Niger J Clin Pract.* 2013;16(4):418-23.
103. Giri D, Ropiquet F, Ittmann M. Alterations in expression of basic fibroblast growth factor (FGF) 2 and its receptor FGFR-1 in human prostate cancer. *Clinical Cancer Research.* 1999;5(5):1063-71.
104. Dobrenis K, Gauthier LR, Barroca V, Magnon C. Granulocyte colony-stimulating factor off-target effect on nerve outgrowth promotes prostate cancer development. *Int J Cancer.* 2015;136(4):982-8.
105. Hurlle RA, Davies G, Parr C, Mason MD, Jenkins SA, Kynaston HG, i wsp. Hepatocyte growth factor/scatter factor and prostate cancer: a review. *Histol Histopathol.* 2005;20(4):1339-49.
106. Hashem M, Essam T. Hepatocyte growth factor as a tumor marker in the serum of patients with prostate cancer. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2005;17(2):114-20.
107. Gupta A, Karakiewicz PI, Roehrborn CG, Lotan Y, Zlotta AR, Shariat SF. Predictive value of plasma hepatocyte growth factor/scatter factor levels in patients with clinically localized prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(22):7385-90.
108. Thoms JW, Dal Pra A, Anborgh PH, Christensen E, Fleshner N, Menard C, i wsp. Plasma osteopontin as a biomarker of prostate cancer aggression: relationship to risk category and treatment response. *Brit J Cancer.* 2012;107(5):840-6.
109. Mrochem J, Bartnik W. Osteopontin - a new marker in neoplastic diseases. *Wspolczesna Onkol.* 2008;12(8):349-53.

110. Najy AJ, Won JJ, Movilla LS, Kim HRC. Differential Tumorigenic Potential and Matriptase Activation between PDGF B versus PDGF D in Prostate Cancer. *Mol Cancer Res.* 2012;10(8):1087-97.
111. Li Y, Cozzi PJ, Russell PJ. Promising tumor-associated antigens for future prostate cancer therapy. *Med Res Rev.* 2010;30(1):67-101.
112. Wiesner C, Nabha SM, Dos Santos EB, Yamamoto H, Meng H, Melchior SW, i wsp. C-kit and its ligand stem cell factor: potential contribution to prostate cancer bone metastasis. *Neoplasia.* 2008;10(9):996-1003.
113. Ma Y, Liang D, Liu J, Axcrona K, Kvalheim G, Giercksky KE, i wsp. Synergistic effect of SCF and G-CSF on stem-like properties in prostate cancer cell lines. *Tumour Biol.* 2012;33(4):967-78.
114. Wu FTH, Stefanini MO, Mac Gabhann F, Kontos CD, Annex BH, Popel AS. A systems biology perspective on sVEGFR1: its biological function, pathogenic role and therapeutic use. *J Cell Mol Med.* 2010;14(3):528-52.
115. Kim Y, Kislinger T. Novel approaches for the identification of biomarkers of aggressive prostate cancer. *Genome Med.* 2013;5(6):56.
116. Pin E, Fredolini C, Petricoin EF, 3rd. The role of proteomics in prostate cancer research: biomarker discovery and validation. *Clin Biochem.* 2013;46(6):524-38.
117. Ryan D, Robards K, Prenzler PD, Kendall M. Recent and potential developments in the analysis of urine: a review. *Anal Chim Acta.* 2011;684(1-2):8-20.
118. Simerville JA, Maxted WC, Pahira JJ. Urinalysis: A comprehensive review. *Am Fam Physician.* 2005;71(6):1153-62.
119. Burckhardt BB, Tins J, Laeer S. Simultaneous quantitative and qualitative analysis of aliskiren, enalapril and its active metabolite enalaprilat in undiluted human urine utilizing LC-ESI-MS/MS. *Biomed Chromatogr.* 2014;28(12):1679-91.
120. Ramesh T, Rao PN, Rao RN. Development of LC-MS/MS method for the determination of dapiprazole on dried blood spots and urine: application to pharmacokinetics. *Biomed Chromatogr.* 2014;28(5):615-20.
121. Hou H, Xiong W, Zhang X, Song D, Tang G, Hu Q. LC-MS-MS Measurements of Urinary Creatinine and the Application of Creatinine Normalization Technique on Cotinine in Smokers' 24 Hour Urine. *J Anal Methods Chem.* 2012;2012:245415.
122. Strickland P, Kang D, Sithisarankul P. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in urine as biomarkers of exposure and effect. *Environ Health Persp.* 1996;104:927-32.
123. Tsuji JS, Williams PRD, Edwards MR, Allamneni KP, Kelsh MA, Paustenbach DJ, i wsp. Evaluation of mercury in urine as an indicator of exposure to low levels of mercury vapor. *Environ Health Persp.* 2003;111(4):623-30.

124. Chiang JF, Hsiao YT, Ko WK, Wu SM. Analysis of multiple abused drugs and hypnotics in urine by sweeping CE. *Electrophoresis*. 2009;30(14):2583-9.
125. Cho SH, Jung BH, Lee SH, Lee WY, Kong G, Chung BC. Direct determination of nucleosides in the urine of patients with breast cancer using column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr*. 2006;20(11):1229-36.
126. Thomas A, Hoppner S, Geyer H, Schanzer W, Petrou M, Kwiatkowska D, i wsp. Determination of growth hormone releasing peptides (GHRP) and their major metabolites in human urine for doping controls by means of liquid chromatography mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2011;401(2):507-16.
127. Thomas A, Walpurgis K, Krug O, Schanzer W, Thevis M. Determination of prohibited, small peptides in urine for sports drug testing by means of nano-liquid chromatography/benchtop quadrupole orbitrap tandem-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2012;1259:251-7.
128. Korpi-Steiner NL, Netzel BC, Seegmiller JC, Hagan JB, Singh RJ. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of urinary fluticasone propionate-17beta-carboxylic acid for monitoring compliance with inhaled-fluticasone propionate therapy. *Steroids*. 2010;75(1):77-82.
129. Issaq HJ, Nativ O, Waybright T, Luke B, Veenstra TD, Issaq EJ, i wsp. Detection of bladder cancer in human urine by metabolomic profiling using high performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Urology*. 2008;179(6):2422-6.
130. Kim K, Aronov P, Zakharkin SO, Anderson D, Perroud B, Thompson IM, i wsp. Urine Metabolomics Analysis for Kidney Cancer Detection and Biomarker Discovery. *Mol Cell Proteomics*. 2009;8(3):558-70.
131. Loft S, Danielsen P, Lohr M, Jantzen K, Hemmingsen JG, Roursgaard M, i wsp. Urinary excretion of 8-oxo-7,8-dihydroguanine as biomarker of oxidative damage to DNA. *Arch Biochem Biophys*. 2012;518(2):142-50.
132. Struck W, Siluk D, Yumba-Mpanga A, Markuszewski M, Kaliszan R, Markuszewski MJ. Liquid chromatography tandem mass spectrometry study of urinary nucleosides as potential cancer markers. *J Chromatogr A*. 2013;1283:122-31.
133. Park EK, Watanabe T, Gee SJ, Schenker MB, Hammock BD. Creatinine measurements in 24 h urine by liquid chromatography--tandem Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem*. 2008;56(2):333-6.
134. Barr DB, Wilder LC, Caudill SP, Gonzalez AJ, Needham LL, Pirkle JL. Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: implications for urinary biologic monitoring measurements. *Environ Health Perspect*. 2005;113(2):192-200.

135. Harris SA, Purdham JT, Corey PN, Sass-Kortsak AM. An evaluation of 24-hour urinary creatinine excretion for use in identification of incomplete urine collections and adjustment of absorbed dose of pesticides. *Aihaj*. 2000;61(5):649-57.
136. Flatley B, Wilmott KG, Malone P, Cramer R. MALDI MS Profiling of Post-DRE Urine Samples Highlights the Potential of beta-Microseminoprotein as a Marker for Prostatic Diseases. *Prostate*. 2014;74(1):103-11.
137. van Swelm RPL, Laarakkers CMM, Kooijmans-Otero M, de Jong EMGJ, Masereeuw R, Russel FGM. Biomarkers for methotrexate-induced liver injury: Urinary protein profiling of psoriasis patients. *Toxicol Lett*. 2013;221(3):219-24.
138. Calvano CD, Aresta A, Iacovone M, De Benedetto GE, Zambonin CG, Battaglia M, i wsp. Optimization of analytical and pre-analytical conditions for MALDI-TOF-MS human urine protein profiles. *J Pharmaceut Biomed*. 2010;51(4):907-14.
139. Putri SP, Yamamoto S, Tsugawa H, Fukusaki E. Current metabolomics: Technological advances. *J Biosci Bioeng*. 2013;116(1):9-16.
140. Lenz EM, Wilson ID. Analytical strategies in metabonomics. *J Proteome Res*. 2007;6(2):443-58.
141. Ban E, Park SH, Kang MJ, Lee HJ, Song EJ, Yoo YS. Growing trend of CE at the omics level: The frontier of systems biology - An update. *Electrophoresis*. 2012;33(1):2-13.
142. Wilson ID, Plumb R, Granger J, Major H, Williams R, Lenz EA. HPLC-MS-based methods for the study of metabonomics. *J Chromatogr B*. 2005;817(1):67-76.
143. Flatley B, Malone P, Cramer R. MALDI mass spectrometry in prostate cancer biomarker discovery. *Bba-Proteins Proteom*. 2014;1844(5):940-9.
144. Matysiak J, Dereziński P, Klupczynska A, Matysiak J, Kaczmarek E, Kokot ZJ. Effects of a honeybee sting on the serum free amino acid profile in humans. *PLoS One*. 2014;9(7):e103533.
145. Held PK, White L, Pasquali M. Quantitative urine amino acid analysis using liquid chromatography tandem mass spectrometry and aTRAQ (R) reagents. *J Chromatogr B*. 2011;879(26):2695-703.
146. Staton CA, Stribbling SM, Tazzyman S, Hughes R, Brown NJ, Lewis CE. Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *Int J Exp Pathol*. 2004;85(5):233-48.
147. Staton CA, Reed MW, Brown NJ. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *Int J Exp Pathol*. 2009;90(3):195-221.
148. Bridges EM, Harris AL. The angiogenic process as a therapeutic target in cancer. *Biochem Pharmacol*. 2011;81(10):1183-91.

149. Li DN, Chiu HC, Gupta V, Chan DW. Validation of a multiplex immunoassay for serum angiogenic factors as biomarkers for aggressive prostate cancer. *Clin Chim Acta*. 2012;413(19-20):1506-11.
150. Strona internetowa AB Sciex, <http://www.sciex.com/products/standards-and-reagents/aTRAQ-Kits-for-Amino-Acid-Analysis-of-Physiological-Fluids.xml>. Data wejścia: 21.01.2015.
151. Food and Drug Administration. Guidance for industry: bioanalytical method validation. May 2001.
152. European Commission Decision 2002/657/EC (17 August 2002). *Official Journal of the European Communities* 221 (2002) 8.
153. Qin J, Wang H, Rets A, Harari S, Alexis H, Eid I, i wsp. Stability of BUN and creatinine determinations on the Siemens Advia 1800 analyzer. *J Clin Lab Anal*. 2013;27(6):435-7.
154. Gibb S, Strimmer K. MALDIquant: a versatile R package for the analysis of mass spectrometry data. *Bioinformatics*. 2012;28(17):2270-1.
155. Dale E, Gette B, Gerasimopoulos E, Dines J, Yeck T. Second generation multiplex immunoassays. *BioRadiations* 2008;125:16-21.
156. Laxman B, Morris DS, Yu J, Siddiqui J, Cao J, Mehra R, i wsp. A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer. *Cancer Res*. 2008;68(3):645-9.
157. Zimmerman R, Hamiltin T, Ma L, Gupta V. Composite profiling of angiogenic factors using Bio-Plex Pro Human Cancer Biomarker Panel 1. Bio-Rad Laboratories, Inc., tech note 6156, 2011.
158. Xia JG, Wishart DS. Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. *Nat Protoc*. 2011;6(6):743-60.
159. Arndt T. Urine-creatinine concentration as a marker of urine dilution: Reflections using a cohort of 45,000 samples. *Forensic Sci Int*. 2009;186(1-3):48-51.
160. Trufelli H, Palma P, Famiglini G, Cappiello A. An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*. 2011;30(3):491-509.
161. Liu WS, Chung YT, Yang CY, Lin CC, Tsai KH, Yang WC, i wsp. Serum Creatinine Determined by Jaffe, Enzymatic Method, and Isotope Dilution-Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Patients Under Hemodialysis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2012;26(3):206-14.
162. Leung EM, Chan W. A novel reversed-phase HPLC method for the determination of urinary creatinine by pre-column derivatization with ethyl chloroformate: comparative studies with the standard Jaffe and isotope-dilution mass spectrometric assays. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406(6):1807-12.

163. World Health Organization, Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace. Vol 1. Geneva:World Health Organization 1996.
164. Baud M. Data analysis, mathematical modeling. Str. 656–671 w: Methods of Immunological Analysis Volume 1: Fundamentals (Masseyeff RF i wsp., eds), VCH Publishers, Inc., New York, NY (1993).
165. Nix B, Wild D. Calibration curve-fitting. Str. 198–210 w: The Immunoassay Handbook, 2nd ed (David Wild, ed), Nature Publishing Group, New York, NY (2001).
166. Koutros S, Meyer TE, Fox SD, Issaq HJ, Veenstra TD, Huang WY, i wsp. Prospective evaluation of serum sarcosine and risk of prostate cancer in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial. *Carcinogenesis*. 2013;34(10):2281-5.
167. Teahan O, Bevan CL, Waxman J, Keun HC. Metabolic signatures of malignant progression in prostate epithelial cells. *Int J Biochem Cell B*. 2011;43(7):1002-9.
168. Shamsipur M, Naseri MT, Babri M. Quantification of candidate prostate cancer metabolite biomarkers in urine using dispersive derivatization liquid-liquid microextraction followed by gas and liquid chromatography-mass spectrometry. *J Pharmaceut Biomed*. 2013;81-82:65-75.
169. Jiang YQ, Cheng XL, Wang CA, Ma YF. Quantitative Determination of Sarcosine and Related Compounds in Urinary Samples by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 2010;82(21):9022-7.
170. Gamagedara S, Kaczmarek AT, Jiang YQ, Cheng XL, Rupasinghe M, Ma YF. Validation study of urinary metabolites as potential biomarkers for prostate cancer detection. *Bioanalysis*. 2012;4(10):1175-83.
171. Kirikae M, Diksic M, Yamamoto YL. Quantitative Measurements of Regional Glucose-Utilization and Rate of Valine Incorporation into Proteins by Double-Tracer Autoradiography in the Rat-Brain Tumor-Model. *J Cerebr Blood F Met*. 1989;9(1):87-95.
172. Ishiwata K, Kubota K, Murakami M, Kubota R, Senda M. A comparative study on protein incorporation of L-[methyl-3H]methionine, L-[1-14C]leucine and L-2-[18F]fluorotyrosine in tumor bearing mice. *Nucl Med Biol*. 1993;20(8):895-9.
173. Billingsley KL, Park JM, Josan S, Hurd R, Mayer D, Spielman-Sun E, i wsp. The feasibility of assessing branched-chain amino acid metabolism in cellular models of prostate cancer with hyperpolarized [1-(13)C]-ketoisocaproate. *Magn Reson Imaging*. 2014;32(7):791-5.
174. McDunn JE, Li Z, Adam KP, Neri BP, Wolfert RL, Milburn MV, i wsp. Metabolomic signatures of aggressive prostate cancer. *Prostate*. 2013;73(14):1547-60.



175. Swanson MG, Keshari KR, Tabatabai ZL, Simko JP, Shinohara K, Carroll PR, i wsp. Quantification of choline- and ethanolamine-containing metabolites in human prostate tissues using <sup>1</sup>H HR-MAS total correlation spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2008;60(1):33-40.
176. Al-Ruwaili JA, Larkin SE, Zeidan BA, Taylor MG, Adra CN, Aukim-Hastie CL, i wsp. Discovery of serum protein biomarkers for prostate cancer progression by proteomic analysis. *Cancer Genomics Proteomics*. 2010;7(2):93-103.
177. Le L, Chi K, Tyldesley S, Flibotte S, Diamond DL, Kuzyk MA, i wsp. Identification of serum amyloid a as a biomarker to distinguish prostate cancer patients with bone lesions. *Clinical Chemistry*. 2005;51(4):695-707.
178. Lam YW, Mobley JA, Evans JE, Carmody JF, Ho SM. Mass profiling-directed isolation and identification of a stage-specific serologic protein biomarker of advanced prostate cancer. *Proteomics*. 2005;5(11):2927-38.
179. Zang XL, Jones CM, Long TQ, Monge ME, Zhou MS, Walker LD, i wsp. Feasibility of Detecting Prostate Cancer by Ultraperformance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Serum Metabolomics. *J Proteome Res*. 2014;13(7):3444-54.
180. Kumar D, Gupta A, Mandhani A, Sankhwar SN. Metabolomics-derived prostate cancer biomarkers: fact or fiction? *J Proteome Res*. 2015;14(3):1455-64.
181. Baron AT, Cora EM, Lafky JM, Boardman CH, Buenafe MC, Rademaker A, i wsp. Soluble epidermal growth factor receptor (sEGFR/sErbB1) as a potential risk, screening, and diagnostic serum biomarker of epithelial ovarian cancer. *Cancer Epidem Biomar*. 2003;12(2):103-13.
182. Jantus-Lewintre E, Sirera R, Cabrera A, Blasco A, Caballero C, Iranzo V, i wsp. Analysis of the prognostic value of soluble epidermal growth factor receptor plasma concentration in advanced non-small-cell lung cancer patients. *Clin Lung Cancer*. 2011;12(5):320-7.
183. Jacot W, Pujol JL, Boher JM, Lamy PJ. Serum EGF-receptor and HER-2 extracellular domains and prognosis of non-small-cell lung cancer. *Brit J Cancer*. 2004;91(3):430-3.
184. Sasaki H, Yukiue H, Sekimura A, Mizuno K, Konishi A, Yano M, i wsp. Elevated serum epidermal growth factor receptor level in stage IV thymoma. *Surg Today*. 2004;34(5):477-9.
185. Oh MJ, Choi JH, Kim IH, Lee YH, Huh JY, Park YK, i wsp. Detection of epidermal growth factor receptor in the serum of patients with cervical carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2000;6(12):4760-3.

186. Soultzis N, Karyotis I, Delakas D, Spandidos DA. Expression analysis of peptide growth factors VEGF, FGF2, TGFB1, EGF and IGF1 in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Int J Oncol.* 2006;29(2):305-14.
187. Olar A, He DD, Florentin D, Ding Y, Ayala G. Biologic correlates and significance of axonogenesis in prostate cancer. *Hum Pathol.* 2014;45(7):1358-64.
188. Magnon C, Hall SJ, Lin J, Xue XN, Gerber L, Freedland SJ, i wsp. Autonomic Nerve Development Contributes to Prostate Cancer Progression. *Science.* 2013;341(6142):143-+.
189. Matsuoka Y, Arai G, Okada Y, Aida J. Prostate Cancer-Producing Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *Urol Int.* 2009;82(1):113-5.
190. Naughton M, Picus J, Zhu X, Catalona WJ, Vollmer RT, Humphrey PA. Scatter factor-hepatocyte growth factor elevation in the serum of patients with prostate cancer. *J Urol.* 2001;165(4):1325-8.
191. Nishimura K, Arichi N, Tokugawa S, Yoshioka I, Namba Y, Kishikawa H, i wsp. Hepatocyte growth factor and interleukin-6 in combination with prostate volume are possible prostate cancer tumor markers in patients with gray-zone PSA levels. *Prostate Cancer P D.* 2008;11(3):258-63.
192. Fedarko NS, Jain A, Karadag A, Van Eman MR, Fisher LW. Elevated serum bone sialoprotein and osteopontin in colon, breast, prostate, and lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2001;7(12):4060-6.
193. Khodavirdi AC, Song Z, Yang S, Zhong C, Wang S, Wu H, i wsp. Increased expression of osteopontin contributes to the progression of prostate cancer. *Cancer Res.* 2006;66(2):883-8.
194. Frootan SS, Foster CS, Aachi VR, Adamson J, Smith PH, Lin K, i wsp. Prognostic significance of osteopontin expression in human prostate cancer. *Int J Cancer.* 2006;118(9):2255-61.
195. Weber GF, Lett GS, Haubein NC. Osteopontin is a marker for cancer aggressiveness and patient survival. *Brit J Cancer.* 2010;103(6):861-9.
196. Puzone R, Paleari L, Montefiore F, Ruggiero L, Puntoni M, Maffezzini M, i wsp. Osteopontin plasma level does not detect prostate cancer in patients referred for diagnostic prostate biopsy. *Int J Biol Markers.* 2010;25(4):200-6.
197. Fudge K, Bostwick DG, Stearns ME. Platelet-derived growth factor A and B chains and the alpha and beta receptors in prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate.* 1996;29(5):282-6.
198. Sitaras NM, Sariban E, Bravo M, Pantazis P, Antoniadis HN. Constitutive production of platelet-derived growth factor-like proteins by human prostate carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 1988;48(7):1930-5.

199. Vlahos CJ, Kriauciunas TD, Gleason PE, Jones JA, Eble JN, Salvas D, i wsp. Platelet-derived growth factor induces proliferation of hyperplastic human prostatic stromal cells. *J Cell Biochem.* 1993;52(4):404-13.
200. Ustach CV, Taube ME, Hurst NJ, Jr., Bhagat S, Bonfil RD, Cher ML, i wsp. A potential oncogenic activity of platelet-derived growth factor d in prostate cancer progression. *Cancer Res.* 2004;64(5):1722-9.
201. Cheng J, Ye H, Liu Z, Xu C, Zhang Z, Liu Y, i wsp. Platelet-derived growth factor-BB accelerates prostate cancer growth by promoting the proliferation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 2013;114(7):1510-8.
202. Karagiannis GS, Saraon P, Jarvi KA, Diamandis EP. Proteomic signatures of angiogenesis in androgen-independent prostate cancer. *Prostate.* 2014;74(3):260-72.
203. Mroczko B, Szmitkowski M, Niklinski J. Stem cell factor and granulocyte-macrophage-colony stimulating factor as candidates for tumour markers for non-small-cell lung cancer. *Clin Chem Lab Med.* 1999;37(10):959-62.
204. Thielemann A, Baszczuk A, Kopczynski Z, Kopczynski P, Grodecka-Gazdecka S. Clinical usefulness of assessing VEGF and soluble receptors sVEGFR-1 and sVEGFR-2 in women with breast cancer. *Ann Agr Env Med.* 2013;20(2):293-7.
205. Enjoji M, Nakamuta M, Yamaguchi K, Ohta S, Kotoh K, Fukushima M, i wsp. Clinical significance of serum levels of vascular endothelial growth factor and its receptor in biliary disease and carcinoma. *World J Gastroentero.* 2005;11(8):1167-71.
206. Korzeniewska M, Kolomecki K, Stepień H, Naze M, Stepień T, Kuzdak K. [Assessment of pro- and antiangiogenic factors blood serum concentrations in patients with hormonal inactive adrenal tumors]. *Endokrynol Pol.* 2005;56(1):39-44.
207. Kikuchi S, Obata Y, Yagyu K, Lin YS, Nakajima T, Kobayashi O, i wsp. Reduced serum vascular endothelial growth factor receptor-2 (sVEGFR-2) and sVEGFR-1 levels in gastric cancer patients. *Cancer Sci.* 2011;102(4):866-9.
208. Woollard DJ, Opeskin K, Coso S, Wu D, Baldwin ME, Williams ED. Differential expression of VEGF ligands and receptors in prostate cancer. *Prostate.* 2013;73(6):563-72.