



**GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY**  
**WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY**

**Marta Ewa Kordalewska**

**OCENA ZMIAN METABOLICZNYCH W RAKU NERKI**  
**Z WYKORZYSTANIEM KOMPLEMENTARNYCH TECHNIK ANALITYCZNYCH**  
**I NIECELOWANEJ ANALIZY METABOLOMICZNEJ**

Zakład Biofarmacji i Farmakokinetyki  
Katedry Biofarmacji i Farmakodynamiki

**Promotor:**

**Prof. dr hab. Michał Jan Markuszewski**

**Promotor pomocniczy:**

**Dr Renata Wawrzyniak**

**Gdańsk 2020**

## STRESZCZENIE

Komplementarność technik analitycznych ma kluczowe znaczenie w niecelowanej analizie metabolomicznej. Zastosowanie kilku technik rozdzielania wraz z czułymi metodami detekcji pozwala na kompleksową ocenę zmian metabolicznych związanych z rozwojem procesu patofizjologicznego na poziomie molekularnym.

W niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono analizę metabolicznych „odcisków palca” próbek moczu pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem nerkowokomórkowym (ang. *renal cell carcinoma*, RCC) oraz od zdrowych ochotników. RCC oraz jego najczęściej występujący podtyp, jasnokomórkowy rak nerki (ang. *clear cell renal cell carcinoma*, ccRCC), ze względu na brak specyficznych objawów najczęściej wykrywany jest dopiero w zaawansowanym stopniu rozwoju. W celu określenia zmian zachodzących w różnych procesach biochemicznych związanych z występowaniem RCC oraz ccRCC, w badaniach wykorzystano cztery komplementarne techniki analityczne: wysokosprawną chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrem mas z analizatorem czasu przelotu (ang. *high performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry*, HPLC-TOF/MS), chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrem mas z analizatorem typu potrójny kwadrupol (ang. *gas chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry*, GC-QqQ/MS), elektroforezę kapilarną sprzężoną ze spektrometrem mas z analizatorem czasu przelotu (ang. *capillary electrophoresis coupled with time-of-flight mass spectrometry*, CE-TOF/MS) oraz spektroskopię protonowego magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. *proton nuclear magnetic resonance*,  $^1\text{H}$  NMR). Uzyskane dane pomiarowe po odpowiednim przetworzeniu poddano jedno- (test t-Studenta i U Manna-Whitney'a) i wielowymiarowej (analiza składowych głównych, analiza dyskryminacyjna cząstkowych najmniejszych kwadratów) analizie statystycznej. Zmienne różnicujące badane grupy na poziomie istotnym statystycznie poddano wstępnej identyfikacji, a następnie interpretacji ich roli biologicznej.

W wyniku badań przeprowadzonych z zastosowaniem komplementarnych technik analitycznych potwierdzono potencjalne znaczenie metabolitów biorących udział w cyklu Krebsa, przemianach energetycznych, metabolizmie aminokwasów, puryn, pirymidyn i węglowodanów w wyjaśnieniu patomechanizmów rozwoju RCC oraz ccRCC. Ciekawymi

w kontekście dostępnej literatury naukowej i braku wyjaśnienia ich roli w przebiegu tych chorób wydają się być zaobserwowane zmiany w poziomach modyfikowanych nukleozydów (np. pseudourydyny, metyloguanozyny). Opracowany na podstawie przeprowadzonych badań obszerny panel metabolitów stanowi podstawę do dalszych oznaczeń analitycznych z zastosowaniem celowanej analizy metabolicznej.

## ABSTRACT

Application of complementary analytical techniques is of great importance in untargeted metabolomic research. Complex evaluation of variety of molecular processes involved in disease development and progression requires analytical measurements to be performed with the use of several different separation techniques hyphenated to advanced detection methods.

In the presented doctoral thesis, urine metabolic fingerprinting was successfully applied for analysis of samples collected from patients with diagnosed renal cell carcinoma (RCC) and healthy volunteers. The diagnosis of RCC, and its most common subtype, clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), is quite challenging, due to the lack of specific disease symptoms up to the advanced stage. In order to characterize the alterations in metabolic processes underlying RCC and ccRCC development, four complementary analytical techniques were applied: high performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry (HPLC-TOF/MS), gas chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry (GC-QqQ/MS), capillary electrophoresis coupled with time-of-flight mass spectrometry (CE-TOF/MS) and proton nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$  NMR). Pretreated datasets were subjected to uni- and multivariate analyses, *i.e.* Student t test, U Mann-Whitney test, principal component analysis and partial least squares discriminant analysis. Variables that contributed the most into group classification were selected and putatively annotated. The interpretation of the role of selected metabolites in biochemical pathways underlying RCC development was performed.

The changes in amino acid, carbohydrate, pyrimidine and purine metabolism, as well as disturbances in energy metabolism, and TCA cycle were confirmed to be involved in RCC pathomechanism with the use of complementary analytical platforms. Observed changes in modified nucleosides composition are worth further studies due to their confirmed role in other cancers progression and lack of literature data in the context of RCC development. Created list of metabolites constitutes a great base for quantitative targeted metabolic analysis.