

**GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY**



Julia Jacyna

**ANALIZY METABOLOMICZNE
W NOWOTWORACH PĘCZERZA MOCZOWEGO
Z ZASTOSOWANIEM TECHNIK ANALITYCZNYCH
SPRZEŻONYCH ZE SPEKTROMETRIĄ MAS
ORAZ ZAAWANSOWANYCH METOD STATYSTYCZNYCH**

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

Promotor:
Prof. dr hab. Michał Jan Markuszewski

Gdańsk 2023

STRESZCZENIE

Uważne i szczegółowe zaplanowanie badań odgrywa kluczową rolę w realizacji projektów badawczych. Aby móc odpowiedzieć na stawiane pytania i zweryfikować hipotezy badawcze należy dokładnie zaplanować każdy eksperyment.

Niniejsza praca doktorska opisuje wykorzystanie podejścia niecelowanej analizy metabolomicznej w nowotworach pęcherza moczowego (ang. *bladder cancer*, BCa). W ramach przeprowadzonych badań analizie poddano próbki moczu pochodzące od pacjentów, u których zdiagnozowano nowotwór pęcherza moczowego (ang. *bladder cancer patients*, BCaP) oraz od zdrowych ochotników (ang. *healthy volunteers*, HV). Aby kompleksowo ocenić różnice w profilach metabolicznych występujące pomiędzy badanymi grupami, zastosowano komplementarne techniki analityczne: wysokosprawną chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas z analizatorem czasu przelotu (ang. *high performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry*, HPLC-TOF/MS) z wykorzystaniem zarówno odwróconego układu faz, jak i chromatografii oddziaływań hydrofilowych, wysokosprawną chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas z kwadropolem-analizatorem czasu przelotu (ang. *high performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry*, HPLC-QTOF/MS), chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas z analizatorem typu potrójny kwadropol (ang. *gas chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry*, GC-QqQ/MS), w trybie przemiatania (ang. *scan*) oraz spektroskopię protonowego magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. *proton nuclear magnetic resonance*, ^1H NMR).

W ramach pierwszego eksperymentu przeprowadzono analizę metabolicznych odcisków palca (ang. *metabolic fingerprints*) próbek moczu pochodzących od BCaP oraz HV. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem wszystkich ww. technik analitycznych. Analiza statystyczna (jedno- i wielowymiarowa) pozwoliła na selekcję 17 związków, które w największym stopniu przyczyniły się do klasyfikacji badanych próbek.

Podczas kolejnego eksperymentu analizom poddano próbki moczu pobrane od BCaP w trzech punktach czasowych (badania panelowe). Pierwsza próbka moczu pobierana była od BCaP przed zabiegiem przezcewkowej elektroresekcji guza pęcherza moczowego (ang. *transurethral resection of bladder tumour*, TURBT), zaś kolejne dwie już po resekcji (odpowiednio 1 dzień i 2 tygodnie po zabiegu). Metaboliczne odciski palca

oznaczono przy pomocy HPLC-TOF/MS oraz GC-QqQ/MS. Analiza statystyczna dla próbek sparowanych pozwoliła na selekcję zmiennych różnicujących próbki pobrane przed TURBT oraz 2 tygodnie po zabiegu. Dodatkowo, ocenie poddano poziomy metabolitów wyselekcjonowanych w ramach pierwszego eksperymentu, walidując (potwierdzając istotność) 3 z nich.

W ramach ostatniego eksperymentu opisanego w niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono ocenę elastyczności (ang. *robustness*) stosowanej metody przygotowania próbek moczu do niecelowanych analiz metabolomicznych z użyciem GC-QqQ/MS. Ze względu na fakt, iż procedura ta jest długotrwała i wieloetapowa, a co tym idzie – podatna na błędy (większą zmienność analityczną), celem badania była weryfikacja w jakim stopniu niewielkie odchylenia w parametrach metody wpływają na uzyskiwane wyniki. Ponieważ ocenę elastyczności stosuje się dla celowanych, ilościowych analiz, jako ‘odpowiedź’ w badanym procesie posłużyły 3 zestawy zmiennych, wygenerowane w ramach 3 zastosowanych podejść statystycznych (obliczenie średniej intensywności sygnału w próbce, analiza głównych składowych oraz modelowanie hierarchiczne). Ostatecznie, wszystkie wykorzystane podejścia pozwoliły na ocenę wpływu zastosowanych zmian na oznaczane profile oraz selekcję zmiennych, które muszą być poddane bardziej rygorystycznej kontroli. Udowodniono także przydatność takiego podejścia w analizach niecelowanych.

Przeprowadzone badania potwierdziły, iż metabolity biorące udział w przemianach energetycznych, związane z metabolizmem aminokwasów, puryn i pirymidyn mają potencjalnie największe znaczenie w próbach wyjaśnienia patomechanizmu rozwoju i progresji BCa. Wyniki przeprowadzonych badań posłużyły natomiast do zaplanowania kolejnych eksperymentów, uwzględniających celowaną analizę metabolomiczną.

ABSTRACT

Careful and detailed experimental planning plays a key role in the implementation of research projects. In order to be able to answer the questions asked and verify the research hypotheses, each experiment must be properly designed.

The doctoral thesis presented, describes the use of an untargeted metabolomic analysis approach in bladder cancer (BCa). Urine samples were obtained from patients diagnosed with bladder cancer (BCaP) and healthy volunteers (HV). In order to comprehensively assess the differences in metabolic profiles between the studied groups, complementary analytical techniques were used: high performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry (HPLC-TOF/MS) using reversed phase and hydrophilic interaction chromatography, high performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (HPLC-QTOF/MS), gas chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry (GC-QqQ/MS) in scan mode and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H NMR).

In the first experiment, metabolic fingerprinting was performed on BCaP and HV urine samples. The research was carried out using all the above-mentioned analytical techniques. Statistical analysis (univariate and multivariate) allowed for the selection of 17 compounds that contributed most to the classification of the tested samples.

In another experiment, urine samples were collected from BCaP at three time points (longitudinal studies). The first urine sample was collected from BCaP before the transurethral resection of the bladder tumor (TURBT), and the next two – after the resection (1 day and 2 weeks after surgery, respectively). Metabolic fingerprints were determined by HPLC-TOF/MS and GC-QqQ/MS. Statistical analysis for paired samples allowed for the selection of variables differentiating samples taken before TURBT and 2 weeks after the procedure. In addition, the levels of metabolites selected in the first experiment were assessed, validating the significance of 3 of them.

As part of the last experiment described in this doctoral thesis, the robustness of the method used to prepare urine samples for untargeted metabolomics analysis using GC-QqQ/MS was assessed. Due to the fact that this procedure is time-consuming, multi-stage, and thus – prone to errors (enhanced analytical variability), the aim of the study was to verify the extent to which minor deviations in the method parameters affect the obtained

results. Due to the fact that the assessment of robustness is used for targeted, quantitative analyses, three sets of variables, generated using three applied statistical approaches, were used as the 'answer' in the studied process. Ultimately, all the approaches used allowed for the assessment of the impact of the applied changes on the determined profiles and the selection of variables that must be subjected to more rigorous control. The usefulness of such an approach in untargeted analysis has also been proven.

The conducted research confirmed that metabolites involved in energy transformations, metabolism of amino acids, purines and pyrimidines, are potentially the most important while attempting to explain the pathomechanism of BCa development and progression. The results of the performed studies were used to plan further experiments, involving targeted metabolomics analysis.