

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Lekarski
z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim

ROZPRAWA DOKTORSKA

Ocena profilu metabolomicznego u chorych na dyskrazje plazmocytowe

lek. Klaudia Cieśluk

Promotor:
dr hab. n. med. Jarosław Piszcz

Białystok 2023

Składam serdeczne podziękowania promotorowi pracy dr hab. n. med. Jarosławowi Piszczowi za opiekę naukową i cenne uwagi. Pragnę również podziękować dr hab. Michałowi Ciborowskiemu oraz dr Karolinie Pietrowskiej za nieocenioną pomoc techniczną, wskazówki oraz dostęp do niezbędnych materiałów.

*Niniejszy projekt badawczy uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej (uchwała nr: R-I-002/611/2018)
oraz wsparcie finansowe ze środków statutowych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku*

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	
1.1. Występowanie, patogeneza i klasyfikacja dyskracji plazmocytowych.....	9
1.2. Szpiczak plazmocytowy i gammapatia monoklonalna o nieokreślonym znaczeniu.....	10
1.3. Czynniki ryzyka rozwoju szpiczaka plazmocyтового.....	13
1.4. Objawy kliniczne u pacjentów ze szpiczakiem plazmocyтовым.....	14
1.5. Ocena stadium zaawansowania oraz czynniki prognostyczne w szpiczaku plazmocyтовым.....	17
1.6. Leczenie chorych na MGUS i szpiczaka plazmocyтового.....	20
1.7. Ocena rokowania u chorych na szpiczaka plazmocyтового.....	21
1.8. Metabolomika w chorobach nowotworowych.....	22
2. CELE PRACY.....	25
3. MATERIAŁ i METODY.....	25
3.1. Charakterystyka grup.....	25
3.2. Zebranie i zabezpieczenie materiału	26
3.3. Przygotowywanie materiału do oznaczeń metabolomicznych	27
3.4. Przygotowywanie próbek kontrolnych	27
3.5. Użyte związki chemiczne i odczynniki.....	27
3.6. Analiza metabolomiczna próbek	28
3.7. Opracowanie uzyskanych danych metodą LC-QTOF-MS.....	29
3.8. Analiza statystyczna	29
3.9. Identyfikacja metabolitów	30
4. WYNIKI	31
5. DYSKUSJA	67
6. WNIOSKI.....	78
7. STRESZCZENIE.....	79
8. SUMMARY.....	81
9. PIŚMIENNICTWO	84
10. SPIS RYCIN	93
11. SPIS TABEL	94

WYKAZ SKRÓTÓW

ACC – karboksylaza acetylo-CoA, ang. acetyl-CoA carboxylase

AIHA – autoimmunologiczna niedokrwistość hemolityczna, ang. autoimmune hemolytic anemia

APRIL – ligand indukujący proliferację, ang. a proliferation-inducing ligand

ASCT – autologiczne przeszczepienie komórek macierzystych, ang. autologous stem cell transplant

ASRI – wystandaryzowany w stosunku do wieku wskaźnik zapadalności, ang. age-standardized incidence rate

Białko M – białko monoklonalne, ang. M protein

BMI – wskaźnik masy ciała, ang. body mass index

CACT – translokaza karnityna-acylokarnityna, ang. carnitine-acylcarnitine-translocase

CMPF – 3-Karboksy-4-metylo-5-propylo-2-furanpropionian, ang. 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionate

CoA – koenzym A, ang. coenzyme A

CPT I, II – palmitoilotransferaza karnitynowa I, II, ang. carnitine palmitoyltransferase I, II

CRAB – hiperkalcemia, niewydolność nerek, niedokrwistość, uszkodzenia kości, ang. hypercalcemia, renal impairment, anemia, bony lesions

CraT – acetylotransferaza karnitynowa, ang. carnitine acetyltransferase

Del – delecja, ang. deletion

DIA – analiza niezależna od zbieranych danych, ang. data-independent acquisition

DKK1 – białko 1 związane z Dickkopf, ang. Dickkopf-related protein 1

DLBCL – chłoniak rozlany z dużych limfocytów B, ang. diffuse large B-Cell lymphoma

EPA – kwas eikozapentaenowy, ang. eicosapentaenoic acid

ESI – jonizacja typu elektrorozpylanie, ang. electrospray ionisation

FDR – odsetek wyników fałszywie dodatnich, ang. false discovery rate

FISH – fluorescencyjna hybrydyzacja in situ, ang. fluorescent in situ hybridization

GM-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów, ang. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

GPI-AP – białka zakotwiczone w glikozylofosfatydyloinozytolu, ang. glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins

GPR55 – receptor 55 sprzężony z białkiem G, ang. G protein-coupled receptor 55

IFE – immunofiksacja, ang. immunofixation electrophoresis

IL – interleukina, ang. interleukin

IMWG – Międzynarodowa Grupa Robocza do spraw Szpiczaka, ang. International Myeloma Working Group

IS – standard wewnętrzny, ang. Internal Standard

ISS – Międzynarodowy Indeks Prognostyczny, ang. International Staging System

KIV – kwas alfa-keto-izowalerianowy, ang. alpha-ketoisovalerate

LC-MS/MS - chromatograf cieczowy sprzężony z tandemową spektrometrią mas, ang. liquid chromatography with tandem mass spectrometry

LC-QTOF-MS – chromatograf cieczowy sprzężony ze spektrometrią mas z kwadrupolem i analizatorem czasu przelotu, ang. liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry

LDH – dehydrogenaza mleczanowa, ang. lactate dehydrogenase

LPC – lizofosfatydylocholina, ang. lysophosphatidylcholine

LPE – lizofosfatyfyloetanolamina, ang. lysophosphatidylethanolamine

LPI – lizofosfatydyloinozytol, ang. lysophosphatidylinositol

MAPK –kinazy aktywowane mitogenami, ang. mitogen-activated protein kinases

MFE – wyodrębnianie cech metabolicznych, ang. molecular feature extraction

MGUS – gammapatia monoklonalna o nieustalonym znaczeniu, ang. monoclonal gammopathy of undetermined significance

MIP-1 α – białko zapalne makrofagów, ang. macrophage inflammatory protein

MM – szpiczak plazmocytowy, ang. multiple myeloma

MS/MS – tandemowa spektrometria mas, ang. tandem mass spectrometry

m/z – stosunek masy do ładunku, ang. mass-to-charge ratio

NF- κ B – jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B, ang. nuclear-kappa B factor

NSMM – szpiczak niewydzielający, ang. non-secretory multiple myeloma

OPLS-DA – metoda ortogonalnych cząstkowych najmniejszych kwadratów, ang. orthogonal partial least square discriminant analysis

OS – mediana całkowitego przeżycia, ang. overall survival

p-value – wartość prawdopodobieństwa, ang. probability

PBL – przewlekła białaczka limfocytowa, ang. chronic lymphocytic leukemia

PC – fosfatydylocholina, ang. phosphatidylcholine

PCA – analiza głównych składowych, ang. principal component analysis

PCL – białaczka plazmocytoza, ang. plasma cell leukemia

PE – fosfatydyloetanoloamina, ang. phosphatidylethanolamine

PI – fosfatydyloinozytol, ang. phosphatidylinositol

POEMS – szpiczak osteosklerotyczny; zespół związany z polineuropatią, organomegalią, endokrynopatią, gammapatią monoklonalną i zmianami skórnymi, ang. osteosclerotic myeloma; polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, monoclonal gammopathy, skin changes syndrome

Q² – współczynnik przewidywania, ang. coefficient of prediction

QA – kontrola jakości, ang. quality assurance

QC – próbka kontrolująca jakość oznaczeń, ang. quality control

R² – współczynnik determinacji, ang. coefficient of determination

RANKL – ligand aktywatora receptora jądrowego czynnika κ B, ang. receptor activator of nuclear factor κ B ligand

R-ISS – Zmodyfikowany Międzynarodowy Indeks Prognostyczny, ang. Revised International Staging System

RSD – współczynnik zmienności, ang. Relative Standard Deviation

RT – czas retencji, ang. retention time

SLiM – sześćdziesiąt, łańcuchy lekkie, rezonans magnetyczny, ang. sixty, light chains, magnetic resonance

SM – sfingomielina, ang. sphingomyelin

SMM – szpiczak bezobjawowy, ang. smouldering multiple myeloma

SPEP – elektroforeza białek surowicy, ang. serum protein electrophoresis

t – translokacja, ang. translocation

TNF – czynnik martwicy nowotworów, ang. tumor necrosis factor

UPEP – elektroforeza białek w moczu, ang. urine protein electrophoresis

vs. – kontra, ang. versus

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia, ang. World Health Organisation

WSTĘP

1.1. Występowanie, patogenezą i klasyfikacja dyskracji plazmocytowych

Dyskracje plazmocytowe to grupa chorób, których wspólną cechą jest klonalny rozrost komórek plazmatycznych oraz zdolność tych komórek do produkcji monoklonalnego białka, tak zwanego białka M [1]. W skład tej paraproteiny może wchodzić kompletna cząsteczka immunoglobuliny zbudowana z łańcuchów polipeptydowych: dwóch łańcuchów ciężkich należących do jednego z pięciu wariantów - alfa (α), delta (δ), epsilon (ϵ), gamma (γ) lub mi (μ), oraz dwóch łańcuchów lekkich jednej z form - kappa (κ) lub lambda (λ), lub jedynie jej fragment. Obecność białka M można potwierdzić badaniem immunofiksacji białek w surowicy i/lub w moczu (ang. serum protein electrophoresis (SPEP), urine protein electrophoresis (UPEP)). Przebieg kliniczny dyskracji plazmocytowych jest zróżnicowany. Obserwujemy zarówno choroby rozwijające się powoli, niewywołujące objawów i niewymagające leczenia przeciwnowotworowego po rozpoznaniu jak i takie, których agresywność przebiegu wywołuje upośledzenie funkcji narządów, może zagrażać życiu oraz wymaga natychmiastowego leczenia. Klasyfikację dyskracji plazmocytowych zaproponowaną przez Światową Organizację Zdrowia (ang. World Health Organisation, WHO) przedstawiono w tabeli 1 [1].

Tab.1. Podział dyskracji plazmocytowych według klasyfikacji Światowej Organizacji Zdrowia (2016)

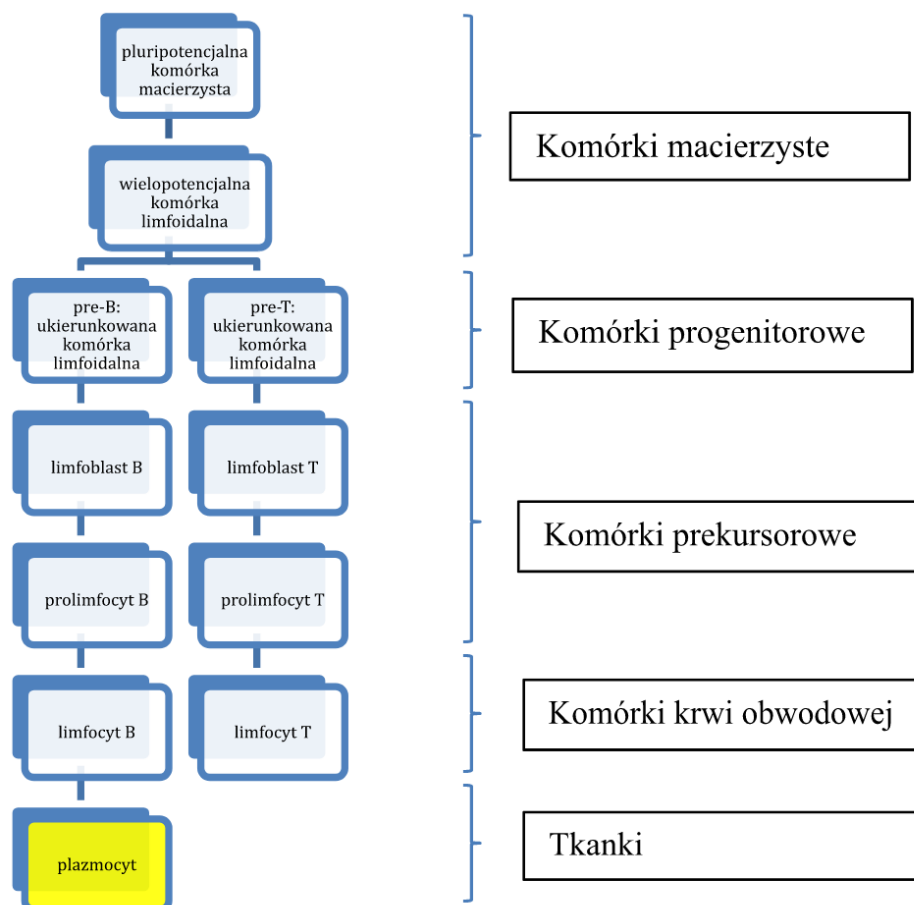
Gammapatia monoklonalna o nieustalonym znaczeniu (MGUS), IgG/IgA
Szpiczak plazmocytowy (tłący/niewydzielający/białaczka plazmocytoza)
Plazmocytoza (pojedynczy guz plazmocytowy kości/pozakostny)
Choroby z odkładania immunoglobulin (pierwotna amyloidoza/choroba łańcuchów lekkich/choroba łańcuchów ciężkich)
Szpiczak osteosklerotyczny (tzw. zespół POEMS, ang. polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, monoclonal gammopathy, skin changes syndrome) (polineuropatia, organomegalia, zaburzenia endokrynologiczne, gammapatia monoklonalna, zmiany skórne)

1.2. Szpiczak plazmocytowy i gammapatia monoklonalna o nieokreślonym znaczeniu

Jedną z częściej obserwowanych dyskrazji plazmocytowych jest szpiczak plazmocytowy (ang. multiple myeloma, MM). Według dostępnych danych wystandaryzowany w stosunku do wieku wskaźnik zapadalności na MM (ang. age-standardized incidence rate, ASIR) na świecie w 2019 roku wynosił 1,92/100 000 osób [2]. Biorąc pod uwagę lata 1990 – 2016, liczba chorych na MM wzrosła o 126% [3], a sama choroba stanowi obecnie do 2% wszystkich przypadków zachorowań na nowotwory złośliwe i 10% nowotworów hematologicznych. W Polsce rocznie obserwowanych jest ponad 2000 nowych przypadków, co czyni chorobę jednym z trzech najczęściej występujących nowotworów hematologicznych [4,5].

Pierwsze udokumentowane informacje dotyczące szpiczaka plazmocytoowego pochodzą z opisanego w 1844 przez Samuela Solly'ego przypadku klinicznego 39-letniej kobiety z nasilonymi dolegliwościami bólowymi w obrębie kręgosłupa oraz patologicznymi złamaniami. Termin „szpiczak mnogi” został zaproponowany w 1873 roku przez Osipa Rustickiego. W 1889 roku Otto Kahler opisał kolejny przypadek 46-letniego pacjenta z bólami kostnymi oraz charakterystycznymi zmianami w badaniach laboratoryjnych (niedokrwistość, albuminuria, nietypowe białko w badaniu ogólnym moczu), a choroba zyskała drugą nazwę - choroba Kahlera [6,7].

Etiologia szpiczaka plazmocytoowego nie została do końca poznana. U podłoża choroby leży klonalny rozrost komórek plazmatycznych w szpiku kostnym, czyli komórek wywodzących się z dojrzałych limfocytów B [8]. Komórki te, zamiast pełnić funkcje obronne w organizmie i produkować przeciwciała skierowane przeciwko konkretnemu antygenowi, np. polisacharydom wchodzącym w skład otoczki bakterii, proliferują w sposób niekontrolowany w szpiku kostnym oraz innych narządach. Dodatkowo produkują nieprawidłowe immunoglobuliny, przez co wywierają destrukcyjny wpływ na cały organizm i powodują występowanie charakterystycznych objawów oraz nieprawidłowości w badaniach laboratoryjnych. Prawidłowy proces powstawania komórki plazmatycznej przedstawia poniższa rycina 1.



Ryc.1. Różnicowanie i dojrzewanie szeregu limfocytarnego [9]

Proces powstawania nowotworowo zmienionej komórki plazmatycznej związany jest między innymi z wystąpieniem mutacji w obrębie genu łańcucha ciężkiego immunoglobulin, które w konsekwencji prowadzą do wytworzenia klonu nieśmiertelnych plazmocytołów [1,10].

Szpiczak plazmocytowy jest heterogennym biologicznie i klinicznie nowotworem. Obserwowane są postaci bezobjawowe, skąpo-wydzielające (oligosekrecyjne) lub nieprodukujące białka monoklonalnego, zlokalizowane poza szpikiem kostnym czy białaczkowe formy choroby. Uważa się, że każda z nich nie stanowi oddzielnej jednostki chorobowej, a kolejny stopień zaawansowania procesu nowotworowego [11]. Tabela nr 2 przedstawia kryteria diagnostyczne wymagane do rozpoznania poszczególnych wariantów szpiczaka plazmocytowego.

Tab.2. Kryteria diagnostyczne oraz warianty szpiczaka plazmocytoowego [5]

Szpiczak plazmocytoowy odosobniony (plasmacytoma)	Szpiczak bezobjawowy (tłący) (SMM, ang. smouldering MM)	Szpiczak niewydzielający (NSMM, ang. non secretory myeloma)	Szpiczak plazmocytoowy objawowy (ang. active multiple myeloma)	Białaczka plazmocytoowa (PCL, ang. plasma cell leukemia)
Pojedynczy guz zbudowany z nowotworowych komórek plazmatycznych; brak zajęcia szpiku; brak objawów uszkodzenia narządowego	Stwierdzenie 10-60% nowotworowych plazmocytołów w szpiku kostnym; białko monoklonalne w surowicy (IgG lub IgA) $\geq 30\text{g/l}$ lub białko monoklonalne w dobowej zbiorce moczu $\geq 500\text{ mg/24h}$; brak objawów uszkodzenia narządowego	Stwierdzenie 10-60% nowotworowych plazmocytołów w szpiku kostnym; brak białka monoklonalnego w surowicy i moczu; brak objawów uszkodzenia narządowego	Stwierdzenie 10-60% nowotworowych plazmocytołów w szpiku kostnym; białko monoklonalne w surowicy (IgG lub IgA) $\geq 30\text{g/l}$ lub białko monoklonalne w dobowej zbiorce moczu $\geq 500\text{ mg/24h}$; objawy uszkodzenia narządowego (CRAB SLiM)	Stwierdzenie $>2000/\text{ul}$ nowotworowych plazmocytołów we krwi lub klonalne plazmocyty stanowiące $>20\%$ krążących leukocytów

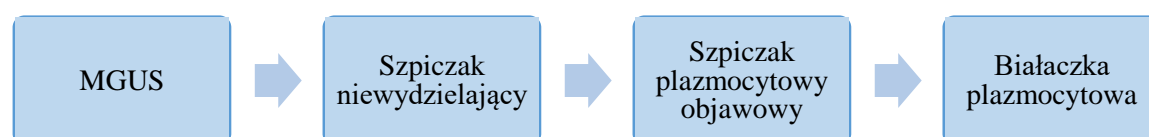
Powstanie postaci objawowej MM, wymagającej leczenia przeciwnowotworowego, poprzedzone jest występowaniem tzw. stanu przednowotworowego określonego jako gammopatia monoklonalna o nieustalonym znaczeniu (ang. monoclonal gammopathy of undetermined significance - MGUS), w którym stwierdza się $<10\%$ klonalnych plazmocytołów w szpiku kostnym oraz białko monoklonalne w surowicy w stężeniu mniejszym niż 30g/l [5]. Stan ten występuje u ponad 3% populacji powyżej 50. roku życia i u 5% w wieku powyżej 70 lat, przebiega bezobjawowo i często wykrywany jest przypadkowo podczas diagnostyki innych schorzeń. Mimo że wystąpienie MGUS poprzedza rozwój dyskrazji plazmocytoowej, z szacowanym ryzykiem transformacji w kierunku szpiczaka plazmocytoowego wynoszącym 1%/rok, jej stwierdzenie nie zawsze determinuje wystąpienie MM [7, 8]. Ryzyko progresji MGUS do MM jest zależne od stężenia białka monoklonalnego i ilości nowotworowo

zmienionych komórek plazmatycznych w szpiku. Próby opracowania modelu stratyfikacji ryzyka progresji zostały przedstawione w tabeli nr 3.

Tab.3. Stratyfikacja ryzyka progresji MGUS do MM [12]

% plazmocytołów w szpiku	Stężenie białka monoklonalnego w surowicy (g/dl)	Prawdopodobieństwo progresji MGUS do MM
≥10	≥3	87%
≥10	<3	70%
<10	≥3	39%

Warto zaznaczyć, że na podstawie obecnie obowiązujących kryteriów diagnostycznych [Tab.2] pacjenci, u których odsetek komórek plazmatycznych w szpiku wynosi ≥10% są klasyfikowani jako pacjenci ze szpiczakiem plazmatycznym – w przypadku braku objawów choroby rozpoznaje się szpiczaka bezobjawowego (ang. SMM, smouldering multiple myeloma), a w przypadku braku obecności białka M - niewydzielającego (ang. NSMM, non secretory myeloma); obecność wskaźników uszkodzenia narządowego kwalifikuje do rozpoznania objawowego MM. Proces transformacji MGUS do kolejnych stadiów szpiczaka plazmatycznego przedstawia rycina nr 2.



Ryc. 2. Etapy transformacji szpiczaka plazmatycznego

1.3. Czynniki ryzyka rozwoju szpiczaka plazmatycznego

Częstość występowania MM rośnie z wiekiem – w 90% przypadków choroba dotyczy osób powyżej 50. roku życia, w tym 40% to osoby powyżej 80. roku życia. Około 2% pacjentów diagnozowanych jest przed 40. rokiem życia, poniżej 30. roku życia – zaledwie 0,3% [13]. Nie stwierdzono przypadków szpiczaka plazmatycznego wśród dzieci [1]. Mediana wieku chorych w trakcie rozpoznania MM wynosi 70 lat [1,5].

Poza wiekiem, do czynników ryzyka wystąpienia choroby zaliczyć można płeć oraz rasę. Choroba nieco częściej obserwowana jest u mężczyzn niż kobiet (M/K = 1,21) oraz dwukrotnie częściej u Afroamerykanów w stosunku do rasy białej [5,14]. Mimo że choroba nie jest uznawana za chorobę genetyczną, zdarzają się przypadki rodzinnego występowania MGUS czy MM. Występowanie w najbliższej rodzinie chorób nowotworowych, przede wszystkim limfoproliferacyjnych, zwiększa ryzyko pojawienia się MM [15-17].

W badaniach dotyczących epidemiologii szpiczaka plazmocytoowego zaobserwowano również związek z otyłością, która zwiększa ryzyko wystąpienia choroby. Podwyższone ryzyko względne odnotowywano niezależnie od wykorzystywanego wskaźnika otyłości (BMI, obwód talii, obwód bioder) [17,18]. Wpływ otyłości na rozwój szpiczaka plazmocytoowego nie został w pełni wyjaśniony. Uważa się, że może to mieć związek z produkowaną przez adipocyty interleukiną 6, która posiada udowodnione działanie antyapoptotyczne i wpływ na możliwości proliferacji komórek szpiczakowych [18].

Nie udowodniono wpływu narażenia na promieniowanie i substancje chemiczne na ryzyko rozwoju MM czy MGUS [17].

1.4. Objawy kliniczne u pacjentów ze szpiczakiem plazmocytoowym

Jak już wcześniej wspomniano, obraz kliniczny szpiczaka plazmocytoowego może być bardzo zróżnicowany - od przypadków całkowicie bezobjawowych (SMM) do agresywnych, powodujących w krótkim czasie niewydolność wielonarządową i śmierć. Oprócz niespecyficznych objawów ogólnych, takich jak osłabienie i spadek masy ciała, obserwuje się kliniczne i laboratoryjne symptomy uszkodzenia narządowego, łącznie określane angielskim akronimem „CRAB” (ang. C - hypercalcemia, R - renal impairment, A - anemia, B - bony lesions (hiperkalcemia, niewydolność nerek, niedokrwistość, uszkodzenia kości)), których wystąpienie nie tylko znacznie nasila podejrzenie szpiczaka plazmocytoowego, lecz jest także brane pod uwagę podczas podejmowania decyzji odnośnie włączenia leczenia przeciwnowotworowego.

Tab.4. Kryteria uszkodzenia narządowego związanego ze szpiczakiem plazmocytowym (CRAB)

Objaw	Kryterium rozpoznania
Hiperkalcemia	Stężenie wapnia w surowicy > 2,75 mmol/l (>11 mg/dl) lub >0,25 mmol/l (>1 mg/dl) powyżej górnej granicy normy
Niewydolność nerek	Klirens kreatyniny poniżej 40 ml/min lub stężenie kreatyniny w surowicy przekraczające 177 μ mol/l (2 mg/dl)
Niedokrwistość	Hemoglobina <10 g/dl lub jej stężenie co najmniej 2 g/dl poniżej normy
Uszkodzenia kości	Stwierdzenie na podstawie badań obrazowych jednego lub więcej ognisk osteolizy

Hiperkalcemia i związane z nią objawy, takie jak na przykład wymioty, zaparcia, niemiarowość pracy serca, bóle głowy, osłabienie siły mięśniowej, senność czy śpiączka, obserwowana jest u około 13% chorych na MM [19]. Jest to najczęstsze powikłanie metaboliczne MM. Patogeneza hiperkalcemii w przebiegu tej choroby ma związek z interakcją komórek nowotworowych z tkanką kostną, a dokładniej zwiększoną ekspresją aktywatorów osteoklastów takich jak RANKL (ang. receptor activator of nuclear factor κ B ligand, ligand aktywatora receptora jądrowego czynnika κ B), MIP-1 α (ang. macrophage inflammatory protein, białko zapalne makrofagów) czy DKK1 (ang. Dickkopf-related protein 1, białko 1 związane z Dickkopf) będącego inhibitorem różnicowania osteoblastów oraz zmniejszeniem ekspresji inhibitorów osteoklastogenezy, takich jak osteoprotegeryna, co prowadzi do nadmiernej aktywacji osteoklastów, hamowania aktywności osteoblastów, a tym samym do zwiększonej osteolizy w stosunku do kościotworzenia [1, 20, 21]. Wzmocniona osteoliza może z kolei powodować bóle kostne i złamania, w tym złamania patologiczne.

Uszkodzenie nerek dotyka około 20-40% pacjentów z nowo rozpoznanym szpiczakiem plazmocytowym [19]. Najczęstszą przyczyną tego powikłania jest nefropatia wałeczkowa, będąca wynikiem nagromadzenia łańcuchów lekkich w kanalikach dystalnych gdzie, po połączeniu z wydzielanym przez kanalik dalszy nefronu białkiem Tamma-Horsfalla, powodują niedrożność kanalików. Łańcuchy lekkie mają również toksyczny wpływ na kanalik

proksymalny [1]. Czynnikiem sprzyjającym wystąpieniu uszkodzenia nerek są również hiperkalcemia, odwodnienie czy hiperurykemia [22].

Najczęściej obserwowanymi objawami szpiczaka plazmocytozy są niedokrwistość oraz wspomniane bóle kostne, stwierdzane odpowiednio u 40-75% i 70% chorych. Przyczyną anemii w MM jest zajęcie szpiku przez komórki nowotworowe oraz proapoptotyczne działanie wydzielanych przez plazmocyty interleukiny 1 i TNF (ang. tumor necrosis factor, czynnik martwicy nowotworów) na produkowane w szpiku erytroblasty [1]. Obserwowana niedokrwistość zaliczana jest do niedokrwistości normocytarnych, normochromicznych. U pacjentów z wysokim poziomem białka monoklonalnego w surowicy może wystąpić tak zwana rulonizacja erytrocytów, czyli skupiska czerwonych krwinek widoczne w rozmazie krwi obwodowej [22]. Bóle kostne, będące jedną z najczęstszych przyczyn zgłaszania się chorych do lekarza i rozpoczęcia diagnostyki w kierunku szpiczaka, zlokalizowane są głównie w kościach płaskich i kręgosłupie, szczególnie w odcinku lędźwiowym [1]. Główną przyczyną ich występowania jest wyżej wspomniana osteoliza. Dolegliwości bólowe zgłaszane przez chorych na MM mogą wynikać również z uszkodzenia układu nerwowego spowodowanego na przykład kompresją nerwu lub rdzenia kręgowego przez masy nowotworowe czy zniszczenie struktury kości. Są to również kolejne przyczyny, obok hiperkalcemii czy zespołu nadlepkoci spowodowanego nadprodukcją białka monoklonalnego, powodujące inne objawy neurologiczne wśród pacjentów z MM, takie jak osłabienie czucia, siły mięśniowej, nietrzymanie moczu, stolca czy nawet paraliż [23].

W 2014r. kryteria uszkodzenia narządowego CRAB poszerzono o biomarkery nowotworu wchodzące w skład akronimu SLiM (ang. S- sixty, Li – light chains, M – magnetic resonance; sześćdziesiąt, łańcuchy lekkie, rezonans magnetyczny), które przedstawia tabela 5. Stwierdzenie jednego lub więcej wymienionych czynników istotnie zwiększa ryzyko wystąpienia uszkodzenia narządowego u pacjentów z MM, w związku z czym Międzynarodowa Grupa Robocza do spraw Szpiczaka (ang. International Myeloma Working Group, IMWG) w tym samym roku oficjalnie włączyła SLiM do kryteriów kwalifikujących chorych do terapii przeciwnowotworowej.

Tab. 5. Biomarkery nowotworu (SLiM)

Kryterium	Opis
S	Klonalne plazmocyty stwierdzone w szpiku kostnym lub na podstawie biopsji tkanki $\geq 60\%$
Li	Stosunek wolnych łańcuchów lekkich w surowicy >100 , przy stężeniu łańcuchów monoklonalnych wynoszącym >100 mg/l
M	≥ 2 zmian ogniskowych o wymiarze ≥ 5 mm w obrazowaniu metodą rezonansu magnetycznego

Warto również wspomnieć o zwiększonym ryzyku infekcji wśród pacjentów z MM, które ma związek ze zmniejszoną produkcją prawidłowych immunoglobulin, zmniejszoną odpowiedzią wytworzonych przeciwciał i upośledzoną opsonizacją [22]. Infekcje wśród chorych na MM są jedną z częstszych przyczyn zgonów w tej populacji [24].

1.5. Ocena stadium zaawansowania oraz czynniki rokownicze w szpiczaku plazmocytowym

Jedną z pierwszych szeroko stosowanych klasyfikacji służących do oceny stadium zaawansowania choroby była zaproponowana w 1975 roku klasyfikacja Duriego-Salmona, która używana była do stratyfikacji pacjentów z MM i skupiała się na zmiennych związanych z masą szpiczaka [7]. Miała ona jednak pewne ograniczenia jeśli chodzi o kategoryzację zmian kostnych, w związku z czym w 2006 roku rozszerzono ją o obecność zmian w badaniach obrazowych (Durie-Salmon Plus Staging) [1, 25].

Tab. 6. Klasyfikacja Duriego-Salmona uzupełniona o zmiany w badaniach obrazowych (Durie-Salmon Plus Staging)

Stadium I
<ul style="list-style-type: none"> • stężenie hemoglobiny poniżej 10 g/dl • obecność białka monoklonalnego w surowicy: IgG < 50 g/l lub IgA <30 g/l • wapń w surowicy < 11 mg/dl (2,75 mmol/l) • wydalanie wapnia z moczem <150 mg/24h • wydalanie monoklonalnych łańcuchów lekkich w moczu <4 g/24h • brak zmian kostnych lub pojedyncze ogniska osteolizy
Stadium II
<ul style="list-style-type: none"> • brak spełnionych kryteriów dla stadium I i III
Stadium III
<p>Spełnione co najmniej jedno z poniższych kryteriów:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hgb <8,5g/dl • obecność białka monoklonalnego w surowicy: IgG > 70 g/l lub IgA >50g/l • wapń w surowicy >11 mg/dl (2,75 mmol/l) • wydalanie monoklonalnych łańcuchów lekkich w moczu >12g/24h • wydalanie wapnia z moczem >150 mg/24h • obecność licznych ognisk osteolizy
Ocena wydolności nerek
A: stężenie kreatyniny w surowicy < 2 mg/dl (< 1,73 mmol/l)
B: stężenie kreatyniny w surowicy > 2 mg/dl (> 1,73 mmol/l)
Obecność zmian w badaniach obrazowych
<p>Stopień I - ≤4 zmian ogniskowych</p> <p>Stopień II - 5-20 zmian ogniskowych lub umiarkowany rozlany naciek</p> <p>Stopień III - >20 zmian ogniskowych lub zaawansowany rozlany naciek</p>

W 2005 roku IMWG zaproponowała system służący do oceny przewidywanego czasu przeżycia pacjentów z nowo rozpoznany szpiczakiem plazmocytowym. Międzynarodowa klasyfikacja prognostyczna szpiczaka plazmocytowego (ang. International Staging System, ISS) bierze pod uwagę dwa parametry laboratoryjne: stężenie β 2-mikroglobuliny, będącej markerem chorób limfoproliferacyjnych, oraz stężenie albuminy w surowicy. W 2015 roku ta sama grupa opublikowała zaktualizowaną klasyfikację R-ISS (ang. Revised International Staging System), do której dodano czynniki genetyczne oraz poziom dehydrogenazy mleczanowej (LDH). Porównanie obu systemów wraz z przewidywanym czasem przeżycia pacjentów w poszczególnych stadiach przedstawia poniższa tabela 7.

Tab. 7. Międzynarodowy Indeks Prognostyczny (ISS) oraz jego zaktualizowana wersja (R-ISS)

Stadium	ISS	R-ISS
I	β 2-mikroglobulina <3,5 mg/l, albumina >3,5 g/dl <i>Mediana czasu przeżycia: 62 miesiące</i>	Dodatkowo: - brak aberracji z grupy wysokiego ryzyka - prawidłowe stężenie LDH <i>Odsetek 5-letniego przeżycia: 82%</i>
II	β 2-mikroglobulina <3,5 mg/l, albumina <3,5 g/dl lub β 2-mikroglobulina 3,5-5,5 mg/l <i>Mediana czasu przeżycia: 44 miesiące</i>	Brak spełnionych kryteriów dla R-ISS 1 lub R-ISS 3 <i>Odsetek 5-letniego przeżycia: 62%</i>
III	β 2-mikroglobulina >5,5 mg/l <i>Mediana czasu przeżycia: 29 miesięcy</i>	Dodatkowo: - obecność aberracji z grupy wysokiego ryzyka: del(17p), t(4;14), t(14;16) - stężenie LDH powyżej normy <i>Odsetek 5-letniego przeżycia: 40%</i>

Dużą rolę w ocenie rokowania pacjentów z MM odgrywają zaburzenia genetyczne. W badaniach przeprowadzanych przy pomocy fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (ang. fluorescent in situ hybridization, FISH) klonalnych plazmocytoów stwierdzano, że około 40-50% komórek nowotworowych charakteryzuje się obecnością trisomii, a w większości pozostałych przypadków obserwowano translokację obejmującą locus łańcucha ciężkiego immunoglobulin. Stwierdzono, że zarówno haploidalna liczba chromosomów, jak i trisomia chromosomów nieparzystych związana jest z korzystniejszą prognozą. Wyjątek stanowią

chromosomy 17, 18 i 21, których zaburzenia związane są z gorszym rokowaniem. Translokacje wysokiego ryzyka, takie jak t(14;20), t(14;16) oraz del(17p) mimo postępu w leczeniu przeciwnowotworowym wciąż są związane ze złym rokowaniem [26]. Podsumowanie korzystnych i niekorzystnych zmian genetycznych przedstawiają opracowane po raz pierwszy i uaktualniane co pół roku zalecenia Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy, w skrócie mSMART (Tab.8.) oraz przez wspomnianą International Myeloma Working Group (Tab.9.).

Tab.8. Stratyfikacja ryzyka w szpiczaku plazmocytowym opracowana przez ekspertów z Mayo Clinic (mSMART)

Ryzyko wysokie	Ryzyko standardowe
Del17p/mutacja p53 t(4;14) t(14;16) t(14;20) dodatkowy fragment 1q	Pozostałe, w tym: trisomie t(11;14) t(6;14)

Tab.9. Stratyfikacja ryzyka w szpiczaku plazmocytowym opracowana przez International Myeloma Working Group

Ryzyko wysokie	Ryzyko standardowe
niekorzystna sygnatura w metodzie badania profilu ekspresji genów FISH: t(4;14), t(14;16), t(14;20), del(17p), amp(1q) Cytogenetyka: del(13p) Kariotyp niehiperdiploidalny	Inne zmiany, w tym t(6;14), t(11;14)

1.6. Leczenie chorych na MGUS i szpiczaka plazmocytoowego

Pacjenci z rozpozną gammapatią monoklonalną o nieustalonym znaczeniu nie wymagają leczenia, a jedynie obserwacji. Elektroforezę białek surowicy należy powtórzyć 3–6 miesięcy po rozpoznaniu MGUS, a następnie co 6 miesięcy, aby wykluczyć progresję do szpiczaka plazmocytoowego. W przypadku stabilnej choroby kontrola stężenia białka monoklonalnego może odbywać się nawet co 2-3 lata. Wcześniejsze badania, w tym biopsja szpiku kostnego,

powinny być wykonywane w każdym przypadku pojawienia się objawów lub nieprawidłowości w badaniach laboratoryjnych sugerujących progresję do MM [12].

Leczenie szpiczaka plazmocytozy można podzielić na leczenie przyczynowe, czyli mające na celu zniszczenie komórek nowotworowych, oraz leczenie wspomagające, ukierunkowane na zwalczanie objawów towarzyszących chorobie. Należy jednak pamiętać, że nie każdy chory z rozpoznaniem MM wymaga leczenia przeciwnowotworowego w momencie rozpoznania. Do leczenia kwalifikują się pacjenci z objawowym szpiczakiem plazmocytozy, to jest chorzy, u których spełnione jest jedno lub więcej kryteriów CRAB SLiM [1]. Wybór terapii zależy od wieku pacjenta, chorób współistniejących, możliwości przeprowadzenia procedury ASCT (autologiczne przeszczepienie komórek macierzystych, ang. autologous stem cell transplant) i czynników ryzyka choroby (w tym zaburzeń genetycznych). Chorzy kwalifikujący się do ASCT powinni otrzymywać 3-4 cykle leczenia indukującego opartego na schematach zawierających odwracalny inhibitor proteasomu 26S jakim jest bortezomib, a następnie być poddani wysokodawkowej chemioterapii z następczą autologiczną transplantacją komórek krwiotwórczych [27, 28]. Leczenie pacjentów niekwalifikujących się do ASCT oparte jest na schematach z melfalanem w połączeniu z takimi lekami nowszej generacji jak bortezomib, talidomid i lenalidomid lub na schematach bazujących na lenalidomidzie [1, 28]. W obu przypadkach, po zakończeniu głównego leczenia choroby, stosuje się leczenie podtrzymujące oparte na talidomidzie lub lenalidomidzie [1, 27, 28].

W przypadku opornego, nawrotowego szpiczaka plazmocytozy ze względu na mnogość klas leków przeciwnowotworowych (inhibitory proteasomów, leki immunomodulujące, alkilujące, przeciwciała monoklonalne) preferuje się zindywidualizowane podejście do pacjenta. W wyborze odpowiedniego leczenia istotne znaczenie ma nie tylko wiek pacjenta i choroby współistniejące, lecz także ryzyko cytogenetyczne, wcześniej stosowane schematy chemioterapii i ilość dotychczasowych linii leczenia, występowanie powikłań poprzednich terapii, możliwość przeprowadzenia procedury ASCT i preferencje pacjenta [1, 27].

1.7. Ocena rokowania u chorych na szpiczaka plazmocytozy

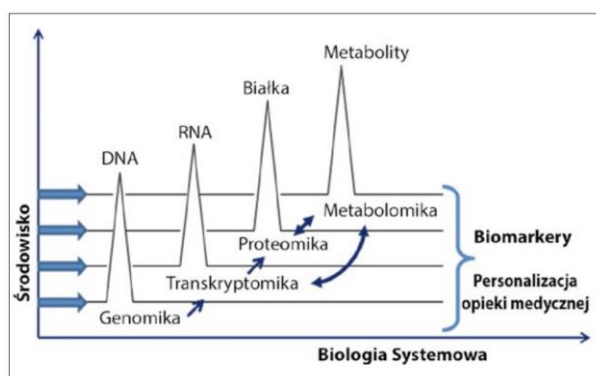
Postępy w leczeniu szpiczaka plazmocytozy, jakie zaszły w ciągu ostatnich 15 lat, spowodowały znaczną poprawę jakości i długości życia pacjentów z MM [27]. Dane z randomizowanych kontrolowanych badań z zastosowaniem nowoczesnej terapii pokazują, że mediana przeżycia w MM wynosi około 6 lat. W grupie pacjentów kwalifikujących się do

procedury autologicznego przeszczepienia komórek macierzystych mediana całkowitego przeżycia (ang. overall survival, OS) wynosi około 8 lat. Wśród pacjentów >75. roku życia mediana OS to około 5 lat. Wydaje się, że prawdopodobieństwo przeżycia może być zaniżone w związku z wprowadzonymi do schematów leczenia w ciągu ostatnich 3-5 lat przeciwciałami monoklonalnymi oraz lekami nowej generacji, które nie były powszechnie dostępne podczas prowadzenia powyższych badań [14]. Co więcej, obecnie prowadzonych jest 306 badań klinicznych skupiających się na leczeniu chorych na MM – 81 dotyczy chorych z nowo zdiagnozowaną chorobą, a 225 obejmuje opornego/nawrotowego szpiczaka plazmocytozowego [https://clinicaltrials.gov/; stan na 12.01.2023r.]. Daje to jeszcze większą szansę na poprawę OS wśród pacjentów z MM.

Mimo dużych postępów w leczeniu przeciwnowotworowym choroba ta wciąż uważana jest za nieuleczalną – u prawie wszystkich pacjentów z MM nastąpi nawrót choroby [27].

1.8. Metabolomika w chorobach nowotworowych

Względnie nową i wzbudzającą coraz większe zainteresowanie naukowców dziedziną jest metabolomika - najnowsza składowa biologii systemowej, tak zwanej systeomiki (ryc. 3), zajmującej się kompleksowym badaniem interakcji zachodzących w układach biologicznych od poziomu pojedynczej komórki po całe gatunki [29].



Ryc.3. Składowe systeomiki [29]

Metabolomika ma na celu scharakteryzować metabolom, czyli kompletny zbiór metabolitów lub drobnocząsteczkowych substancji chemicznych (<1-1,5 kDa) biorących udział w procesach biologicznych zachodzących w komórce, tkance, narządzie czy całym organizmie [30, 31]. Do związków tych zaliczyć można węglowodany, kwasy tłuszczowe, aminokwasy, nukleotydy, barwniki, witaminy i wiele innych.

W badaniach nad metabolomem wyróżnić można dwa główne podejścia - analizę celowaną oraz niecelowaną. Wariant celowany, zwany profilowaniem metabolicznym, skupia się na ilościowym lub półilościowym pomiarze konkretnej, dobrze scharakteryzowanej pod względem właściwości fizykochemicznych grupy metabolitów biorących udział w danym procesie biologicznym i badaniu zależności pomiędzy poziomami wszystkich analitów, które tworzą dany profil metaboliczny. W przypadku tego wariantu stosuje się techniki analityczne mające na celu zapewnienie maksymalnej czułości i selektywności. Analiza niecelowana z kolei, tak zwany metaboliczny odcisk palca (ang. metabolic fingerprinting), zajmuje się jakościowym oznaczeniem wszystkich drobnocząsteczkowych związków znajdujących się w analizowanej próbce, zarówno tych dobrze poznanych, jak i dotychczas niescharakteryzowanych, co czyni to podejście szczególnie istotnym przy identyfikacji nowych metabolitów. Podejście to wykorzystuje techniki analityczne, które zapewniają mniej złożone i bardziej odtwarzalne dane. Wariant niecelowany pozwala również wytypować potencjalnie istotne pod kątem przyjętej hipotezy badawczej metabolity, które mogą następnie zostać szczegółowo ocenione przy zastosowaniu metabolomiki celowanej [29, 31].

Charakterystyczną cechą każdego metabolomu jest jego dynamizm i zależność od wielu zmiennych zewnętrznych i wewnętrznych, takich jak wiek, płeć, środowisko, dieta, pora dnia czy własna genetyka [30]. Metabolomika zapewnia więc wgląd w aktualny stan zdrowia organizmu, a same metabolity są jego końcową odpowiedzią na zachodzące w nim zmiany [31]. Nauka ta jest również uważana za cenne narzędzie mogące posłużyć do odkrywania specyficznych biomarkerów chorób i rozwoju medycyny spersonalizowanej [31-33]. Zastosowanie metabolomiki badane jest zarówno w onkologii w celu określenia przydatności metody do wcześniejszego diagnozowania nowotworów, selekcji pacjentów do badań klinicznych, określania biomarkerów odpowiedzi na leczenie, jak również w hematologii, na przykład do identyfikacji potencjalnych markerów transformacji nowotworowej oraz agresywnego przebiegu choroby, które mogłyby odgrywać rolę przy kwalifikacji pacjentów do wcześniejszego rozpoczęcia leczenia [33, 34].

Identyfikacja potencjalnych biomarkerów w hematoonkologii odbywa się najczęściej poprzez porównywanie osób zdrowych i pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą nowotworową (biomarkery transformacji nowotworowej), porównanie chorych przed i po rozpoczęciu leczenia przeciwnowotworowego (biomarkery oporności na leczenie) lub próbek pobranych retrospektywnie i podczas postępu choroby nowotworowej (biomarkery progresji) [35].

W opublikowanym w 2019 roku artykule na łamach PLOS ONE Park wraz ze współautorami podjął się próby identyfikacji potencjalnych biomarkerów raka piersi przy użyciu LC-QTOF-MS (chromatograf cieczowy sprzężony ze spektrometrią mas z kwadrupolem i analizatorem czasu przelotu, ang. liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry). W badaniu udało się ostatecznie zidentyfikować cztery potencjalne biomarkery (L-oktanoilokarnitynę, 5-oksoprolinę, hipoksantynę i kwas dokozaheksaenowy). L-oktanoilokarnityna wykazała najlepszą skuteczność diagnostyczną ze 100% dodatnią wartością predykcyjną. Dodatkowo jej poziom różnił się w zależności od wielkości guza i ekspresji receptorów hormonalnych. Zidentyfikowane w tym badaniu metabolity zostały uznane za potencjalne biomarkery umożliwiające wczesną diagnozę raka piersi [36]. Z kolei w badaniu przeprowadzonym przez F. Vahabi i współpracowników zidentyfikowano za pomocą spektroskopii rezonansu magnetycznego związki (pirydoksynę, glicynę, cholesterol, kwas taurocholowy, estry cholesterolu i deoksyinozynę) różnicujące kolejne stopnie zaawansowania raka jelita grubego [37].

Jak już wcześniej wspomniano, oprócz usprawniania diagnostyki chorób nowotworowych, metabolomika może również odgrywać rolę w rozwoju medycyny spersonalizowanej. W 2014 roku Navarette razem ze współautorami opublikowali badanie dotyczące skutecznej terapii mitomycyną C zaprojektowanej dla pacjenta z rakiem trzustki opornym na inne metody leczenia. Istotą powodzenia tego leczenia było odkrycie wpływu mitomycyny C na cykl Krebsa, metabolizm puryn i biosyntezę kwasów tłuszczowych, a także wiele znaczących zmian dotyczących lipidów i aminokwasów, co było odpowiedzialne za większą skuteczność tego leczenia w porównaniu z innymi metodami [38].

Przykładem zastosowania metabolomiki w nowotworach hematologicznych może być badanie Piszca i współautorów, w którym podjęto próbę identyfikacji nowych markerów prognostycznych zdolnych do przewidywania klinicznej agresywności przewlekłej białaczki limfocytowej (w skrócie PBL) w momencie jej rozpoznania. Uzyskane wyniki zasugerowały, że związki takie jak linoleamid i acylokarnityny mogą okazać się istotnymi biomarkerami agresywnej, a acetylokarnityna i heksanoilokarnityna indolentnej postaci PBL [39]. W opublikowanej w 2013 roku na łamach czasopisma PLOS ONE publikacji Lodi i współautorzy zidentyfikowali karnitynę i acetylokarnitynę jako nowe potencjalne biomarkery aktywnego szpiczaka plazmocytozy, zarówno w momencie diagnozy, jak i nawrotu choroby [40]. Z kolei w badaniu dotyczącym chemiowrażliwości w ostrej białaczce szpikowej Stockard i współautorzy zauważyli związek pomiędzy opornością na cytarabinę a metabolitami szlaku

metabolizmu puryn. Dodatkowo oporność na doksorubicynę powiązano między innymi ze wzrostem poziomu kwasu karboksylowego (1-aminocyklopropano-1-karboksylanu) i niektórych aminokwasów [41].

2. CELE PRACY

Celem pracy było określenie profili metabolicznych pacjentów z wybranymi dyskrazjami plazmocytowymi: MGUS oraz szpiczakiem plazmocytowym.

Dodatkowym celem była identyfikacja potencjalnych biomarkerów progresji MGUS do MM.

3. MATERIAŁ i METODY

3.1 Charakterystyka grup

W badaniu wzięło udział łącznie 100 osób. Grupę badaną stanowili pacjenci Kliniki Hematologii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Białymstoku hospitalizowani w latach 2015-2016, z nowo rozpoznanym MGUS (30 osób) oraz szpiczakiem plazmocytowym (50 chorych) w różnym stadium zaawansowania choroby. Obie grupy pacjentów z dyskrazjami plazmocytowymi były zbliżone pod względem mediany wieku. Kontrolę stanowiła dobrana pod względem struktury płci i wieku grupa osób zdrowych – dawców krwi i wolontariuszy (20 osób). Wszystkie osoby włączone do badania, po przedstawieniu założeń pracy, wyraziły świadomą, pisemną zgodę na udział w projekcie. Charakterystykę grup badanych przedstawiono w tabelach 10-11.

Tab. 10. Charakterystyka grupy kontrolnej i grup badanych (MGUS, MM) w odniesieniu do płci i mediany wieku

Grupy	Grupa kontrolna		MGUS		MM	
	Kobiety	Mężczyźni	Kobiety	Mężczyźni	Kobiety	Mężczyźni
Ilość uczestników	11	9	17	13	29	21
Liczba uczestników łącznie	20		30		50	
Mediana wieku łącznie	62,5 lat		61 lat		63 lata	

Tab. 11. Charakterystyka pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym (grupa badana MM) w odniesieniu do stopnia zaawansowania choroby wg ISS

ISS	1	2	3
Kobiety	8	7	14
Mężczyźni	3	6	12
Łącznie	11	13	26

3.2. Zebranie i zabezpieczenie materiału

Materiał do badania stanowiła krew żylna pobierana na czczo (ostatni posiłek spożyty minimum 6 godzin przed badaniem) w czasie rutynowych badań diagnostycznych. Materiał pobierany był jednorazowo do probówek o objętości 4,9 ml zawierających antykoagulant (cytrynian sodu). Próbkę następnie odwirowywano w temperaturze pokojowej przez 10 min z przyspieszeniem 4000 x g. Uzyskane w ten sposób 2 ml osocza było rozdzielane po 0,5 ml do 2 ml bezbarwnych eppendorfów oraz przechowywane w temperaturze -80°C do czasu wykonania analiz.

3.3. Przygotowywanie materiału do oznaczeń metabolomicznych

Zebrany materiał analizowano w Centrum Badań Klinicznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Precypitację białek, jak i ekstrakcję metabolitów przeprowadzano poprzez dodanie 1 objętości osocza do 4 objętości zimnej mieszaniny (temperatura mieszaniny: -20°C) metanolu i etanolu w stosunku 1:1 zawierającej sól zomepiraku o stężeniu 1 ppm jako standard wewnętrzny (ang. Internal Standard, IS). Próbkę mieszano przez minutę i schładzano na lodzie przez 10 minut. Następnie próbkę wirowano przez 20 minut przy $21\ 000 \times g$ w temperaturze 4°C . Uzyskany w ten sposób supernatant przefiltrowano przez nylonowy filtr ($0,22 \mu\text{m}$) do szklanych naczynek. Tak przygotowane próbki były wykorzystane w analizach.

3.4. Przygotowywanie próbek kontrolnych

W celu przygotowania próbek kontrolujących jakość oznaczeń (ang. quality control, QC) zmieszano jednakowe objętości osocza pobrane z każdej analizowanej próbki. Po wymieszanu QC poddawano wcześniej opisanemu procesowi ekstrakcji, który wykorzystano przy próbkach przeznaczonych do analiz. W celu osiągnięcia stabilności systemu próbki QC były badane na początku analiz, a następnie, w celu jej utrzymania oraz kontroli jakości i powtarzalności uzyskanych danych, po każdej dziewiątej próbce oraz po zakończeniu analiz wszystkich próbek.

3.5. Użyte związki chemiczne i odczynniki

Związki chemiczne takie jak metanol i etanol (użyte do procesu precypitacji białek), acetonitryl, kwas mrówkowy oraz sól zomepiraku zostały zakupione od Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Niemcy). Woda, którą wykorzystano do przygotowania roztworu A (woda z 0,1% kwasem mrówkowym) została uzyskana poprzez użycie systemu Milli-Q Integral 3 (Millipore SAS, Molsheim, Francja). Zestaw zawierający wzorce mas referencyjnych - API-TOF (G1969-850001) oraz roztwory kalibracyjne: ESI-L (G1969-85000) i ESI-TOF Biopolimer Analysis (G1969-850003) zakupiono od Agilent Technologies (Santa Clara, California, USA).

3.6. Analiza metabolomiczna próbek

Profil metabolitów mierzony był przy pomocy chromatografu cieczowego sprzężonego ze spektrometrią mas z kwadrupelem i analizatorem czasu przelotu (LC-QTOF-MS, model 6546, Agilent Technologies). Do analiz wykorzystana została wcześniej omówiona metoda metabolicznego odcisku palca.

Rozdział metabolitów przeprowadzono wykorzystując system chromatografii cieczowej (UHPLC 1290 Infinity II, Agilent Technologies). Składa się on z urządzenia odgazowującego rozpuszczalniki, dwóch pomp binarnych i automatycznego podajnika próbek, który stale utrzymuje zadaną temperaturę 4°C. System LC połączony jest ze spektrometrem mas QTOF działającym w trybie pełnego skanowania.

1 µL przygotowanej próbki nastrzykiwano na kolumnę chromatograficzną o temperaturze 60°C (Zorbax Extend-C18 RRHT, 2,1 x 50 mm, wielkość cząstek 1,8 µm; Agilent Technologies). Rozdział chromatograficzny następował przy prędkości przepływu 0,6 ml/min przy użyciu dwóch rozpuszczalników – wody z 0,1% kwasem mrówkowym (roztwór A) i acetonitrylu z 0,1% kwasem mrówkowym (roztwór B). Początkowy gradient chromatograficzny wynosił 5% roztworu B przez 1. minutę i wzrastał kolejno do 80% między 1. a 7. minutą i 100% między 7. a 11,5. minutą. Następnie w ciągu 30 sekund przywracano wyjściowy gradient, który utrzymywany był przez 3 minuty (między 12. a 15. minutą).

Próbki analizowane były w jonizacji dodatniej (ESI+) i ujemnej (ESI-). W celu zapewnienia dokładności pomiarów masy do systemu w sposób ciągły za pomocą pompy izokratycznej (Agilent Technologies) dostarczano roztwór mas referencyjnych, który zawierał cząsteczki dla jonizacji dodatniej o m/z 121,0509 (protonowana puryna) i m/z 922,0098 (protonowany heksakis [1H, 1H, 3H-tetrafluoropropoksy] fosfazyna - HP-921), dla jonizacji ujemnej m/z 119,0363 (deprotonowana puryna) i m/z 966,0007 (addukt mrówczanowy HP-921) i był dostarczany z prędkością przepływu 0,5 ml/min przy podziale strumienia 1:100. Dla jonizacji dodatniej napięcie na kapilarze ustawiono na 3000 V, dla ujemnej na -4000 V. Napięcie dyszy wynosiło 1000 V dla obu jonizacji. Napięcie fragmentora wynosiło 175V dla jonizacji dodatniej i 200V dla jonizacji ujemnej.

Analizy próbek wykonywano dwukrotnie w losowej kolejności przy prędkości skanowania 1,5 skana na sekundę – najpierw w dodatniej, następnie w ujemnej jonizacji. Zakres m/z uzyskanych danych wynosił od 50 do 1000.

3.7. Opracowanie uzyskanych danych metodą LC-QTOF-MS

W początkowym etapie obróbki danych usunięto szumy tła i jony niepowiązane wykorzystując algorytm MFE (Molecular Feature Extraction) w programie Mass Hunter Qualitative Analysis (wersja B.07.00, Agilent Technologies). W przetwarzaniu danych brano pod uwagę możliwość powstawania następujących jonów - dla jonizacji dodatniej: $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$; ujemnej: $[M+HCOO]^-$, $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$. Dodatkowo uwzględniono możliwość utraty neutralnej cząsteczki wody w obu jonizacjach. Próbkę wyrównywano oraz filtrowano na podstawie podobieństwa w zakresie czasu retencji (ang. retention time, RT) i m/z z zastosowaniem programu Mass Profiler Professional (wersja 12.6.1, Agilent Technologies). Dopuszczalne odchylenie RT ustawiono na 1%, a akceptowalną zmianę masy na 15 ppm.

Przed właściwą analizą dokonano wstępnej obróbki danych poprzez wykonanie procedury kontroli jakości (ang. quality assurance, QA) z wykorzystaniem próbek QC. Przeprowadzone zostało dwuetapowe filtrowanie danych, które miało na celu usunięcie cech metabolomicznych charakteryzujących się wysoką zmiennością analityczną. Odrzucono cechy wykryte w mniej niż 50% wszystkich próbek QC oraz ze współczynnikiem zmienności (ang. relative standard deviation, RSD) powyżej 20%. Dodatkowo dla każdego porównania wybrano tylko te cechy metabolomiczne, które były obecne w przynajmniej 80% próbek w co najmniej jednej z porównywanych grup. Filtrowanie danych wykonano w programie Mass Profiler Professional (wersja 12.6.2, Agilent Technologies).

3.8. Analiza statystyczna

W celu zidentyfikowania różnic pomiędzy metabolitami przeprowadzono analizę statystyczną osocza w trzech porównaniach - MM vs. grupa kontrolna, MGUS vs. grupa kontrolna, MM vs. MGUS. Dla poszczególnych metabolitów w każdym porównaniu przeprowadzono jednowymiarowe analizy statystyczne (t-test lub Mann Whitney U-test w zależności od normalności rozkładu). W celu dostosowania uzyskanych wartości prawdopodobieństwa (p -value) i skorygowania występowania wyników fałszywie dodatnich otrzymane p -value poddano procedurze kontroli współczynników błędów przy użyciu metody Benjamina-Hochberga. Do ostatecznej analizy wykorzystano cechy metaboliczne istotne statystycznie, czyli z $FDR \leq 0,05$. Obliczenia te wykonano przy pomocy programu MATLAB (wersja R2015a, MathWorks, MA, USA).

Do wielowymiarowych obliczeń statystycznych wykorzystano program SIMCA-P+ (wersja 13.0.3, Umetrics, Umea, Szwecja). Do oceny jakości uzyskanych modeli użyto współczynnika determinacji R^2 (modele PCA, OPLS-DA) oraz współczynnika przewidywania Q^2 (model OPLS-DA). Analiza głównych składowych (ang. principal component analysis, PCA) została wykorzystana w celu uzyskania ogólnego zarysu otrzymanych zestawów danych. Modele PCA zostały użyte do zlokalizowania próbek QC i potencjalnych próbek odstających.

3.9. Identyfikacja metabolitów

W celu identyfikacji metabolitów uzyskane powyższą analizą dane porównywano z danymi zawartymi w internetowym narzędziu CEU Mass Mediator (<http://ceumass.eps.uspceu.es>), które umożliwia wyszukiwanie informacji w wielu internetowych bazach metabolitów jednocześnie, takich jak HMDB (<http://hmdb.ca>), METLIN (<http://metlin.scripps.edu>) czy LIPID MAPS (<http://lipidmaps.org>), dopasowując otrzymane w badaniu masy eksperymentalne do mas zidentyfikowanych już związków. Wstępne trafienia zostały potwierdzone lub wykluczone poprzez analizę danych strukturalnych otrzymanych przy użyciu chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) wykonaną w takich samych warunkach chromatograficznych co analizy pierwotne. W tym celu wykorzystano analizę niezależną od zbieranych danych (ang. data independent acquisition - DIA).

Poprzez tak zwany rozpad pobudzony przez kolizję (ang. collision induced dissociation, CID) i opierając się na masie jonu oraz RT uzyskano widma fragmentacyjne, które następnie porównywano z wzorcowymi widmami w bazie METLIN. Grupy związków identyfikowane były na podstawie występowania charakterystycznych jonów potomnych (Tab. 12), z kolei uzyskane widma fragmentacyjne pozwoliły na identyfikację kwasów tłuszczowych będących składowymi danego lipidu.

Tab. 12. Jony potomne uzyskane w jonizacji pozytywnej i negatywnej charakterystyczne dla danej klasy związków - przykłady

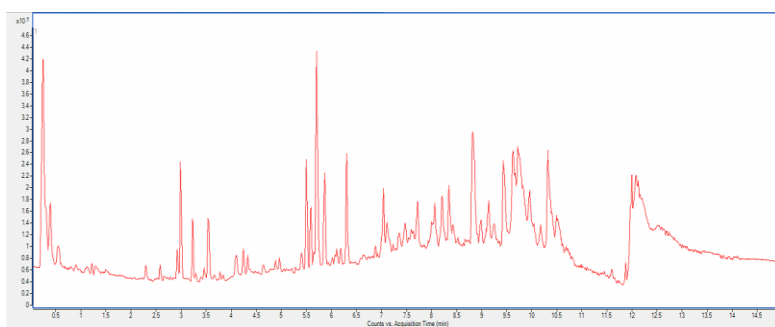
Klasa związku	Jony potomne w pozytywnej jonizacji	Jony potomne w negatywnej jonizacji
Fosfatydylocholino (PC)	86,10; 104,11 (LPC); 125,00; 184,07 strata neutralna (ang. neutral loss): 18,01 (LPC)	168,03; 224,07; 242,08 strata neutralna: 60,02 (dla adduktu mrówczanu)
Fosfatydyloetanolaminy (PE)	164,0083 straty neutralne: 141,02	140,01; 196,04 214,05 (LPE)
Sfingomieliny (SM)	184,07	168,03 strata neutralna: 60,02 (dla adduktu mrówczanu)
Karnityny	60,08; 85,02 strata neutralna: 59,07	niewykrywalne
Fosfatydyloinozytole (PI)	niewykrywalne	315,05; 241,01; 152,00; 78,96

4. WYNIKI

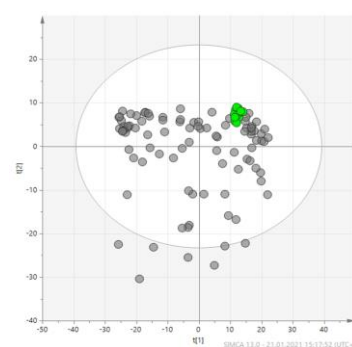
Ogólna charakterystyka pacjentów biorących udział w badaniu została przedstawiona w podrozdziale 3.1. Próbkę otrzymaną od dwójki pacjentów została wyłączone z badania ze względu na ich uszkodzenie w trakcie przechowywania materiału. Analiza przy pomocy LC-MS była przeprowadzana zarówno w jonizacji dodatniej, jak i ujemnej. Przykładowe chromatogramy dla obu jonizacji przedstawiają ryciny 4a i 5a. Przedstawione zostały również wykresy dla modelu PCA dla jonizacji dodatniej (Ryc. 4b) i ujemnej (Ryc. 5b).

Widoczne bliskie skupienie QC na obu wykresach PCA odzwierciedla stabilność systemu, a także wskazuje na dobrą powtarzalność procedury obróbki próbek. Przedstawiona analiza świadczy również o dobrej jakości testowanych próbek, która, wyrażana poprzez R^2 , była porównywalna dla obu jonizacji (wynosiła odpowiednio 0,399 dla jonizacji dodatniej i 0,458 dla jonizacji ujemnej). Dane, na podstawie których powstały modele PCA, zostały poddane transformacji logarytmicznej i skalowaniu Ctr.

a.

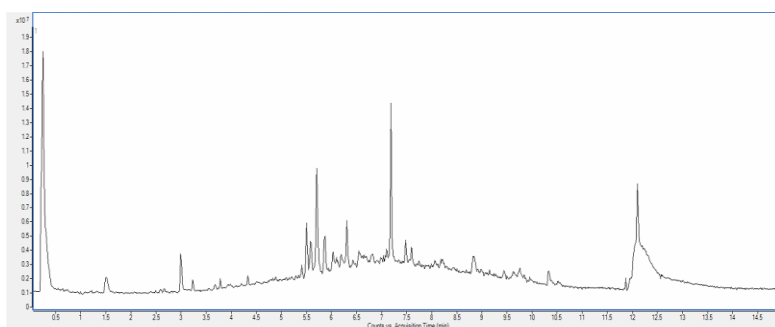


b.

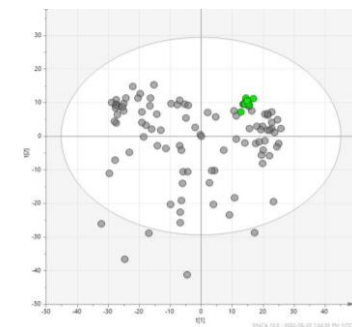


Ryc. 4. Chromatogram dla danych w jonizacji dodatniej (a) oraz rozmieszczenie QC w modelu PCA dla jonizacji dodatniej (b)

a.

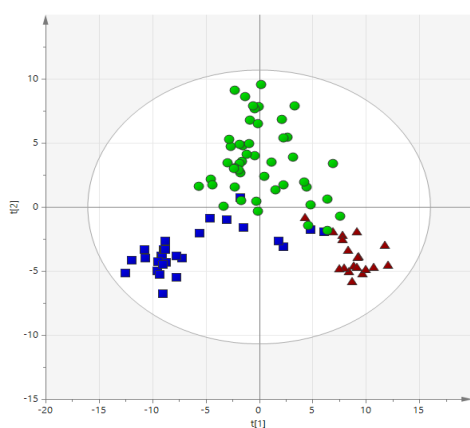


b.

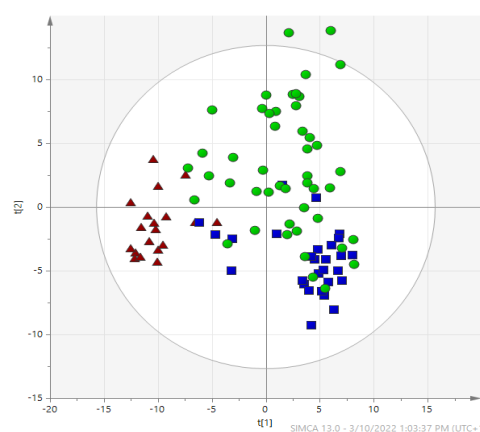


Ryc. 5. Chromatogram dla danych w jonizacji ujemnej (a) oraz rozmieszczenie QC w modelu PCA dla jonizacji ujemnej (b)

a.



b.



Ryc.6. Wykres OPLS-DA pokazujący podział grup ze względu na kategorię kliniczną - MGUS (niebieskie kwadraty), MM (zielone koła), grupa kontrolna (czerwone trójkąty). Dane zostały poddane transformacji logarytmicznej i skalowaniu Pareto oraz wygenerowane na podstawie przefiltrowanego zestawu zmiennych; a, jonizacja dodatnia ($R^2=0,883$, $Q^2=0,837$), b, jonizacja ujemna ($R^2=0,897$, $Q^2=0,805$).

Po wstępnym opracowaniu danych (usunięciu tła, MFE, QA) uzyskano 1155 cech metabolicznych - 745 w jonizacji dodatniej i 410 w jonizacji ujemnej. W odniesieniu do modeli reprezentujących dyskryminację międzygrupową (Ryc. 6.a, b) próbki zostały pogrupowane według kategorii klinicznych: MGUS, MM, grupa kontrolna. Wygenerowane z modelu OPLS-DA parametry R^2 , Q^2 wyniosły odpowiednio 0,883 i 0,837 dla jonizacji dodatniej i 0,897 oraz 0,805 dla jonizacji ujemnej. Po przefiltrowaniu uzyskano łącznie (w obu polaryzacjach) 751 cech metabolicznych. Analiza statystyczna danych uzyskanych metodą odcisku palca została przeprowadzona zgodnie z opisem w rozdziale „Materiały i metody”. Przeprowadzono analizę statystyczną (p -value $\leq 0,05$) dla porównań MGUS vs. grupa kontrolna, MM vs. grupa kontrolna oraz MM vs. MGUS w obu trybach jonizacji. Biorąc pod uwagę masę eksperymentalną i uzyskane widma fragmentacyjne oraz porównując je do mas cząsteczkowych i widm wzorcowych w bazach internetowych, udało się ostatecznie zidentyfikować 104 związki różnicujące profile metabolomiczne pacjentów w poszczególnych grupach. Szczegółowe informacje dotyczące powyższych związków z podziałem na klasy, do których należą oraz tendencją zmian w konkretnych porównaniach grup (MGUS vs. grupa kontrolna, MM vs. grupa kontrolna, MM vs. MGUS) przedstawiono oddzielnie dla każdego porównania w tabelach 13 – 36.

W porównaniu MGUS vs. grupa kontrolna (Tab. 13) zidentyfikowano trzynaście związków z grupy karnityn istotnie statystycznie różnicujących profile metabolomiczne porównywanych grup. W przypadku każdego ze związków zaobserwowano wzrost stężenia wśród pacjentów z MGUS w stosunku do zdrowej kontroli. Największy wzrost dotyczył dekatrienoilkarnitiny (wzrost stężenia o 292,889%), tetradekadienokarnitiny (wzrost o 213,458%) i oktenoilokarnitiny (wzrost stężenia o 181,109%).

Porównując grupę MM z grupą kontrolną (Tab. 14), istotny statystycznie wzrost stężenia zaobserwowano w przypadku 8 karnityn. Tak jak przy poprzednim porównaniu, w grupie MM największy wzrost stwierdzono w przypadku dekatrienoilkarnitiny (wzrost stężenia o 120,699%) i tetradekadienokarnitiny (wzrost o 139,430%). Warto dodać, że w przypadku pięciu niewymienionych w tabeli karnityn, których wzrost stężenia obserwowany był wśród pacjentów z MGUS (stearoilokarnityna, palmitoilokarnityna, dodekanoilokarnityna, dekanoilokarnityna, oktanoilokarnityna), również występowała tendencja wzrostowa w grupie MM w porównaniu z grupą kontrolną, jednak nie była ona istotna statystycznie (p -value $> 0,05$).

W przypadku porównania profili metabolomicznych pacjentów z MM w stosunku do chorych z MGUS (Tab.15) odnotowano tendencję spadkową stężenia wszystkich 13 karnityn, jednak istotny statystycznie spadek stwierdzono wśród sześciu związków tej klasy.

Tab. 13. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MGUS od grupy kontrolnej – karnityny

KARNITYNY MGUS vs. grupa kontrolna						
Związek	%zmian	FDR	Masa cząsteczkowa/ eksperymentalna (Da)	RT (min)	Addukt	Rodzaj jonizacji
oktenoilokarnityna	+181,109	<0,001	285,1940/ 285,1943	2,71	M+H	pos
oktanoilokarnityna	+77,522	0,002	287,2097/ 287,2098	3,12	M+H	pos
dekatrienoilkarnitina	+292,889	<0,001	309,1940/ 309,1943	3,09	M+H	pos
dekanoilokarnityna	+96,112	<0,001	315,2410/ 315,2414	3,80	M+H	pos
trans-2-dodecenoilokarnityna	+111,376	<0,001	341,2566/ 341,2568	4,08	M+H	pos
dodekanoilokarnityna	+63,503	0,001	343,2723/ 343,2724	4,37	M+H	pos
tetradekadienokarnityna	+213,458	<0,001	367,2723/ 367,2725	4,34	M+H	pos
tetradecenoilokarnityna	+101,968	0,001	369,2879/ 369,2881	4,62	M+H	pos
tetradekanoilokarnityna	+115,911	<0,001	371,3036/ 371,3037	4,89	M+H	pos
palmitoilokarnityna	+39,304	0,001	399,3349/ 399,3352	5,38	M+H	pos
karnityna linoelaidyłowa	+87,965	<0,001	423,3349/ 423,3351	5,21	M+H	pos
karnityna CAR 18:1	+59,800	<0,001	425,3505/ 425,3507	5,50	M+H	pos
stearoilokarnityna	+47,397	0,005	427,3662/ 427,3665	5,84	M+H	pos

Kierunek zmiany wskazuje na podwyższony poziom metabolitu w grupie pacjentów MGUS w porównaniu z pacjentami z grupy kontrolnej.

Tab. 14. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od grupy kontrolnej – karnityny

KARNITYNY MM vs. grupa kontrolna						
Związek	%zmian	FDR	Masa cząsteczkowa/ eksperymentalna (Da)	RT (min)	Addukt	Rodzaj jonizacji
oktenoilokarnityna	+81,156	0,001	285,1940/ 285,1943	2,71	M+H	pos
dekatrienoilkarnitina	+120,699	<0,001	309,1940/ 309,1943	3,09	M+H	pos
trans-2-dodecenoilokarnityna	+56,362	0,004	341,2566/ 341,2568	4,08	M+H	pos
tetradekadienokarnityna	+139,430	0,001	367,2723/ 367,2725	4,34	M+H	pos
tetradecenoilokarnityna	+41,601	0,01	369,2879/ 369,2881	4,62	M+H	pos
tetradekanoilokarnityna	+78,950	0,003	371,3036/ 371,3037	4,89	M+H	pos
karnityna linoelaidylowa	+42,465	0,012	423,3349/ 423,3351	5,21	M+H	pos
karnityna CAR 18:1	+47,726	0,003	425,3505/ 425,3507	5,50	M+H	pos

Kierunek zmiany wskazuje na podwyższony poziom metabolitu w grupie pacjentów z MM w porównaniu z pacjentami z grupy kontrolnej.

Tab. 15. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od pacjentów z MGUS – karnityny

KARNITYNY MM vs. MGUS						
Związek	%zmian	FDR	Masa cząsteczkowa/ eksperymentalna (Da)	RT (min)	Addukt	Rodzaj jonizacji
oktanoilokarnityna	-35,557	0,018	285,1940/ 285,1943	2,71	M+H	pos
oktanoilokarnityna	-32,798	0,008	287,2097/ 287,2098	3,12	M+H	pos
dekatrienoilkarnitina	-43,827	0,002	309,1940/ 309,1943	3,09	M+H	pos
dekanoilokarnityna	-34,772	0,004	315,2410/ 315,2	3,80	M+H	pos
dodekanoilokarnityna	-29,964	0,011	343,2723/ 343,2724	4,37	M+H	pos
karnityna linoelaidyłowa	-24,206	0,034	423,3349/ 423,3351	5,21	M+H	pos

Kierunek zmiany wskazuje na obniżony poziom metabolitu w grupie pacjentów z MM w porównaniu z pacjentami z grupy MGUS.

Kolejną badaną klasą związków były sfingomieliny (SM). Łącznie zidentyfikowano 9 związków należących do tej grupy. W przypadku trzech z nich stwierdzono istotnie statystyczny wzrost stężenia w porównaniu MGUS vs. grupa kontrolna (Tab. 16). Odnotowane w tych przypadkach zmiany były na porównywalnym poziomie.

W przeciwieństwie do porównania MGUS vs. grupa kontrolna, wśród pacjentów z MM stwierdzano niższe stężenia sfingomielin niż w grupie osób zdrowych (Tab. 17). Tendencja ta była zauważalna we wszystkich dziewięciu zidentyfikowanych SM i w przypadku pięciu z nich była istotna statystycznie ($FDR < 0,05$). Procentowy spadek stężenia substancji we wszystkich przypadkach był porównywalny.

Spadek stężenia SM w grupie MM odnotowano nie tylko w stosunku do zdrowej grupy kontrolnej, lecz także do grupy pacjentów z MGUS (Tab. 18). W rezultacie wzrost stężenia SM obserwowany był jedynie w grupie MGUS.

Tab. 16. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MGUS od grupy kontrolnej - sfingomieliny

SFINGOMIELINY MGUS vs. grupa kontrolna						
Związek	%zmian	FDR	Masa cząsteczkowa/ eksperymentalna (Da)	RT (min)	Addukt	Rodzaj jonizacji
SM (d16:1/16:0)	+35,223	0,006	674,5363/ 696,5183	8,25	M+Na	pos
SM (d18:0/15:0)	+26,60	0,05	690,5676/ 736,5725	8,79	M+HCOOH-H	neg
SM (d18:1/14:0)/ SM(d16:1/16:0)	+30,69	0,01	674,5363/ 710,5125	8,14	M+Cl	neg

Kierunek zmiany wskazuje na podwyższony poziom metabolitu w grupie pacjentów MGUS w porównaniu z pacjentami z grupy kontrolnej.

Tab. 17. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od grupy kontrolnej - sfingomieliny

SFINGOMIELINY MM vs. grupa kontrolna						
Związek	%zmian	FDR	Masa cząsteczkowa/ eksperymentalna (Da)	RT (min)	Addukt	Rodzaj jonizacji
SM (32:1)	-32,203	0,008	674,5363/ 674,5374	8,14	M+H	pos
SM (33:1)	-22,032	0,036	688,5519/ 688,5526	8,53	M+H	pos
SM (d18:0/14:0)	-31,44	0,01	676,5519/ 773,6013	10,51	M+HCOOH-H	neg
SM (d18:1/12:0)	-31,658	0,049	646,5050/ 646,5053	7,48	M+H	pos
SM (d18:2/14:0)	-29,58	0,02	672,5206/ 718,5259	7,61	M+HCOOH-H	neg

Kierunek zmiany wskazuje na obniżony poziom metabolitu w grupie pacjentów z MM w porównaniu z pacjentami z grupy kontrolnej.

Tab. 18. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od pacjentów z MGUS - sfingomieliny

SFINGOMIELINY MM vs. MGUS						
Związek	%zmian	FDR	Masa cząsteczkowa/ eksperymentalna (Da)	RT (min)	Addukt	Rodzaj jonizacji
SM (32:1)	-32,523	0,013	674,5363/ 674,5374	8,14	M+H	pos
SM (d16:1/16:0)	-29,333	0,005	674,5363/ 696,5183	8,25	M+Na	pos
SM (d18:0/14:0)	-26,62	0,03	676,5519/ 773,6013	10,51	M+HCOOH-H	neg
SM (d18:1/12:0)	-41,755	0,001	646,5050/ 646,5053	7,48	M+H	pos
SM (d18:1/14:0)/ SM(d16:1/16:0)	-30,26	<0,01	674,5363/ 710,5125	8,14	M+Cl	neg
SM (d18:2/14:0)	-35,30	0,01	810,6615/ 810,6617	11,01	M+H	pos
SM (d18:2/24:1)	-29,000	0,005	705,5309/ 751,5360	9,62	M+HCOOH-H	neg

Kierunek zmiany wskazuje na obniżony poziom metabolitu w grupie pacjentów z MM w porównaniu z pacjentami z grupy MGUS.

Najliczniejszymi grupami związków różnicujących profile metabolomiczne grup pacjentów okazały się fosfatydylocholina (PC) i lizofosfatydylocholina (LPC). W przypadku PC istotne statystycznie różnice pomiędzy pacjentami z MGUS a grupą kontrolną zaobserwowano w 26 z 35 zidentyfikowanych związków tej klasy (Tab. 19). Poziomy stężenie 25 związków były wyższe wśród chorych z MGUS. Jeden zidentyfikowany związek charakteryzował się niższym poziomem w grupie MGUS - PC (34:3).

Zmiany poziomu stężeń PC w porównaniu MM vs. grupa kontrolna były niejednorodne (Tab. 20). Poziomy 17 związków były wyższe wśród pacjentów z rozpoznaniem szpiczakiem plazmocytowym. Największy wzrost zaobserwowano dla PC (42:10) (145,309%), co odnotowano również w porównaniu MGUS vs. kontrola (218,197%). Poziomy sześciu PC był istotnie niższy w grupie MM, zakres redukcji stężeń w stosunku do grupy kontrolnej wynosił od 21,97% dla PC (18:2/16:1) do 63,204% dla PC (34:3).

Porównując pacjentów z MM vs. MGUS (Tab. 21) można zauważyć wcześniej obserwowany w tym zestawieniu trend. Tak jak w przypadku karnityn i SM poziom stężeń zidentyfikowanych PC był niższy w grupie MM. Wyjątek stanowi PC (34:3), którego stężenie wzrasta jedynie w porównaniu z pacjentami z MGUS.

Tab. 19. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MGUS od grupy kontrolnej – fosfatydylocholiny

FOSFATYDYLOCHOLINY MGUS vs. grupa kontrolna						
Związek	%zmian	FDR	Masa cząsteczkowa/ eksperymentalna (Da)	RT (min)	Addukt	Rodzaj jonizacji
PC (16:0/20:5)	+70,94	<0,01	779,5465/ 825,5524	9,26	M+HCOOH-H	neg
PC (17:0/20:4)	+60,11	<0,01	795,5778/ 841,5827	10,07	M+HCOOH-H	neg
PC (18:1/22:6)	+86,20	<0,01	831,5778/ 877,5829	9,67	M+HCOOH-H	neg
PC (18:2/18:3)	+59,51	0,01	779,5465/ 825,5515	8,85	M+HCOOH-H	neg
PC (20:4/18:2)	+75,15	<0,01	805,5622/ 851,5673	9,27	M+HCOOH-H	neg
PC (20:5/18:2)	+134,41	<0,01	803,5465/ 849,5515	8,78	M+HCOOH-H	neg
PC (32:1)	+64,631	0,009	731,5465/ 753,5311	8,98	M+Na	pos
PC (34:3)	-63,204	<0,001	755,5465/ 755,5471	8,06	M+H	pos
PC (35:4)	+51,293	0,034	767,5465/ 767,5469	9,38	M+H	pos
PC (36:5)	+73,532	0,002	779,5465/ 779,5484	9,26	M+H	pos
PC (37:4)	+43,606	0,011	795,5778/ 795,5778	10,07	M+H	pos
PC (37:6)	+68,960	0,001	791,5465/791,5466	9,19	M+H	pos
PC (38:2)	+61,619	<0,001	813,6248/ 835,6095	10,61	M+Na	pos
PC (38:4)	+57,230	<0,001	809,5935/ 809,5951	10,57	M+H	pos
PC (38:5)	+55,373	<0,001	807,5778/ 807,5794	9,83	M+H	pos

PC (38:6)	+35,967	0,001	805,5622/ 805,5643	9,57	M+H	pos
PC (40:6)	+58,419	<0,001	833,5935/ 855,5761	10,48	M+Na	pos
PC (40:7)	+112,334	<0,001	831,5778/ 831,5786	9,67	M+H	pos
PC (42:10)	+218,197	<0,001	853,5622/ 853,5625	8,96	M+H	pos
PC (O-16:1/20:4) / PC(P-16:0/20:4)	+67,87	<0,01	765,5672/ 811,5723	10,02	M+HCOOH-H	neg
PC (O-38:5)/ PC(P-38:4)	+74,940	<0,001	793,5985/ 793,5995	10,23	M+H	pos
PC (P- 35:1)/ PC(O-35:2)	+92,303	<0,001	757,5985/ 779,5833	10,30	M+Na	pos
PC (P-38:4)/ PC(O-38:5)	+88,88	<0,01	793,5985/ 839,6038	10,23	M+HCOOH-H	neg
PC (P-38:5)/ PC(O-38:6)	+83,235	<0,01	791,5829/ 791,5831	10,09	M+H	pos
PC (P-38:6)	+66,783	0,002	789,5672/ 789,5677	9,80	M+H	pos
PC (P-40:6)	+124,305	0,001	817,5985/ 817,5990	10,00	M+H	pos

Kierunek zmiany wskazuje na podwyższony (+) lub obniżony (-) poziom metabolitu w grupie pacjentów MGUS w porównaniu z pacjentami z grupy kontrolnej.

Tab. 20. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od grupy kontrolnej – fosfatydylocholiny

FOSFATYDYLOCHOLINY MM vs. grupa kontrolna						
Związek	%zmian	FDR	Masa cząsteczkowa/ eksperymentalna (Da)	RT (min)	Addukt	Rodzaj jonizacji
PC (16:0/14:0)	-33,77	<0,01	705,5309/ 751,5360	9,62	M+HCOOH-H	neg
PC (17:0/20:4)	+48,37	0,02	795,5778/ 841,5827	10,07	M+HCOOH-H	neg
PC (18:1/22:6)	+52,46	<0,01	831,5778/ 877,5829	9,67	M+HCOOH-H	neg
PC (18:2/16:1)	-21,91	0,02	755,5465/ 801,5518	9,21	M+HCOOH-H	neg
PC (28:0)	-58,517	0,006	677,4996/ 677,4995	8,77	M+H	pos
PC (30:0)	-32,795	0,015	705,5309/ 705,5313	9,62	M+H	pos
PC (34:3)	-63,204	<0,001	755,5465/ 755,5471	8,06	M+H	pos
PC (35:4)	+51,293	0,034	767,5465/ 767,5469	9,38	M+H	pos
PC (37:4)	+45,467	0,005	795,5778/ 795,5778	10,07	M+H	pos
PC (38:3)	-27,605	0,006	811,6091/ 811,6099	10,97	M+H	pos
PC (38:4)	+29,648	0,036	809,5935/ 809,5951	10,57	M+H	pos
PC (38:5)	+26,656	0,020	807,5778/ 807,5794	9,83	M+H	pos
PC (38:6)	+26,680	0,047	805,5622/ 805,5643	9,57	M+H	pos
PC (40:6)	+33,064	0,025	833,5935/ 855,5761	10,48	M+Na	pos
PC (40:7)	+58,318	0,009	831,5778/ 831,5786	9,67	M+H	pos

PC (42:10)	+145,309	<0,001	853,5622/ 853,5625	8,96	M+H	pos
PC (O-16:1/20:4)/ PC(P-16:0/20:4)	+51,50	<0,01	765,5672/ 811,5723	10,02	M+HCOOH-H	neg
PC (O-38:5)/ PC(P-38:4)	+39,225	<0,001	793,5985/ 793,5995	10,23	M+H	pos
PC (P- 35:1)/ PC(O-35:2)	+92,436	<0,001	757,5985/ 779,5833	10,30	M+Na	pos
PC (P-38:4)/ PC(O-38:5)	+42,86	<0,01	793,5985/ 839,6038	10,23	M+H	pos
PC (P-38:5)/ PC(O-38:6)	+61,989	<0,001	791,5829/791,5831	10,09	M+HCOOH-H	neg
PC (P-38:6)	+44,002	0,002	789,5672/ 789,5677	9,80	M+H	pos
PC (P-40:6)	+77,797	0,001	817,5985/ 817,5990	10,00	M+H	pos

Kierunek zmiany wskazuje na podwyższony (+) lub obniżony (-) poziom metabolitu w grupie pacjentów z MM w porównaniu z pacjentami z grupy kontrolnej.

Tab. 21. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od pacjentów z MGUS – fosfatydylocholiny

FOSFATYDYLOCHOLINY MM vs. MGUS						
Związek	%zmian	FDR	Masa cząsteczkowa/ eksperymentalna (Da)	RT (min)	Addukt	Rodzaj jonizacji
PC (16:0/20:5)	-22,91	0,02	779,5465/ 825,5524	9,26	M+HCOOH-H	neg
PC (18:2/18:1)	-21,83	0,01	783,5778/ 829,5835	9,99	M+HCOOH-H	neg
PC (18:2/18:2)	-30,87	<0,01	781,5622/ 827,5676	9,39	M+HCOOH-H	neg
PC (18:2/18:3)	-39,35	<0,01	779,5465/ 825,5515	8,85	M+HCOOH-H	neg

PC (20:4/18:2)	-20,53	0,02	805,5622/ 851,5673	9,27	M+HCOOH-H	neg
PC (20:5/18:2)	-39,14	<0,01	803,5465/ 849,5515	8,78	M+HCOOH-H	neg
PC (28:0)	-28,312	0,034	677,4996/ 677,4995	8,77	M+H	pos
PC (32:1)	-36,040	0,01	731,5465/ 753,5311	8,98	M+Na	pos
PC (32:2)	-29,434	0,011	729,5309/ 729,5316	9,09	M+H	pos
PC (34:3)	+71,712	0,016	755,5465/ 755,5471	8,06	M+H	pos
PC (35:4)	-23,813	0,016	767,5465/ 767,5469	9,38	M+H	pos
PC (36:4)	-41,174	0,003	781,5622/ 803,5466	8,79	M+Na	pos
PC (36:5)	-26,043	0,013	779,5465/ 779,5471	9,26	M+H	pos
PC (38:2)	-26,532	0,002	813,6248/ 835,6095	10,61	M+Na	pos
PC (38:3)	-34,703	0,003	811,6091/ 811,6099	10,97	M+H	pos
PC (40:7)	-25,439	0,013	831,5778/ 831,5786	9,67	M+H	pos
PC (42:10)	-22,906	0,012	853,5622/ 853,5625	8,96	M+H	pos
PC (O-38:5)/ PC(P-38:4)	-20,416	0,014	793,5985/ 793,5995	10,23	M+H	pos
PC (P-38:4)/ PC(O-38:5)	-24,37	<0,01	793,5985/ 839,6038	10,23	M+H	pos
PC (P-40:6)	-20,734	0,020	817,5985/ 817,5990	10,00	M+H	pos

Kierunek zmiany wskazuje na podwyższony (+) lub obniżony (-) poziom metabolitu w grupie pacjentów z MM w porównaniu z pacjentami z grupy MGUS.

W przeprowadzonej analizie zidentyfikowano 28 lizofosfadytylocholin (LPC) różnicujących profile metabolomiczne porównywanych grup. W badaniu obserwowano głównie spadek stężenia związków w wykonywanych porównaniach. W przypadku dwóch LPC (LPC (20:5), LPC (22:5)) odnotowano wzrost stężenia jedynie w grupie MGUS. Jeden związek z grupy lizofosfadytylocholin, LPC (22:6), charakteryzował się wyższym w stosunku do osób zdrowych poziomem stężeń w przypadku zarówno pacjentów z MM jak i MGUS. Opisane wyniki przedstawione zostały w tabelach 22-24.

Tab. 22. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MGUS od grupy kontrolnej – lizofosfatydylocholiny

LIZOFOSFATYDYLOCHOLINY MGUS vs. grupa kontrolna						
Związek	%zmian	FDR	Masa cząsteczkowa/ eksperymentalna (Da)	RT (min)	Addukt	Rodzaj jonizacji
LPC (15:0)	-27,587	0,044	481,3168/ 481,3173	5,40	M+H	pos
LPC (16:0)	-23,22	<0,01	495,3325/ 541,3390	5,58	M+HCOOH-H	neg
LPC (16:1)	-49,093	<0,001	493,3168/ 493,3172	5,28	M+H	pos
LPC (17:0)	-35,882	0,001	509,3481/ 509,3485	6,00	M+H	pos
LPC (17:1)	-28,981	0,005	507,3325/ 507,3327	5,57	M+H	pos
LPC (18:0)	-25,499	0,009	523,3638/ 523,3643	6,19	M+H	pos
LPC (18:1)	-27,942	0,026	521,3481/ 521,3490	5,75	M+H	pos
LPC (19:0)	-28,471	0,001	537,3794/ 537,3797	6,62	M+H	pos
LPC (19:1)	-22,372	0,001	535,3638/ 535,3638	6,14	M+H	pos
LPC (20:2)	-29,229	0,004	547,3638/ 547,3640	6,03	M+H	pos
LPC (20:5)	+56,26	0,02	541,3168/ 587,3220	5,12	M+HCOOH-H	neg

LPC (22:5)	+25,191	0,031	569,3481/ 569,3485	5,65	M+H	pos
LPC (22:6)	+37,69	<0,01	567,3325/ 613,3378	5,41	M+HCOOH-H	neg
LPC (O-16:0)	-44,597	<0,001	481,3532/ 481,3535	5,87	M+H	pos
LPC (O-18:0)	-49,442	<0,01	509,3845/ 509,3847	6,49	M+H	pos
LPC (O-18:1)/ LPC(P-18:0)	-43,31	<0,001	507,3689/ 553,3743	6,01	M+HCOOH-H	neg
LPC (O-20:0)	-52,137	<0,001	537,4158/ 537,4162	7,12	M+H	pos
LPC (P-16:0)/LPC (O-16:1)	-28,54	<0,01	479,3376/ 525,3430	5,87	M+HCOOH-H	neg
LPC (P-18:0)/ LPC(O-18:1)	-56,280	<0,001	507,3689/ 507,3691	6,02	M+H	pos
LPC (P-18:1)/LPC (O-18:2)	-55,210	<0,001	505,3532/ 505,3535	6,02	M+H	pos
LPC (P-20:0)/ LPC(O-20:1)	-59,457	<0,001	535,4002/ 535,4003	6,60	M+H	pos

Kierunek zmiany wskazuje na podwyższony (+) lub obniżony (-) poziom metabolitu w grupie pacjentów MGUS w porównaniu z pacjentami z grupy kontrolnej.

Tab. 23. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od grupy kontrolnej – lizofosfatydylocholiny

LIZOFOSFATYDYLOCHOLINY MM vs. grupa kontrolna						
Związek	%zmian	FDR	Masa cząsteczkowa/ eksperymentalna (Da)	RT (min)	Addukt	Rodzaj jonizacji
LPC (14:0)	-49,901	<0,001	467,3012/ 467,3016	5,10	M+H	pos
LPC (15:0)	-41,206	0,001	481,3168/ 481,3173	5,40	M+H	pos
LPC (16:0)	-36,71	<0,01	495,3325/ 541,3390	5,58	M+HCOOH-H	neg
LPC (16:1)	-61,032	<0,01	493,3168/ 493,3172	5,28	M+H	pos
LPC (17:0)	-42,731	<0,001	509,3481/ 509,3485	6,00	M+H	pos
LPC (17:1)	-41,037	<0,001	507,3325/ 507,3327	5,57	M+H	pos
LPC (18:0)	-42,465	<0,001	523,3638/ 523,3643	6,19	M+H	pos
LPC (18:1)	-37,281	<0,001	521,3481/ 521,3490	5,75	M+H	pos
LPC (18:2)	-28,154	0,009	519,3325/ 519,3336	5,39	M+H	pos
LPC (19:0)	-35,525	<0,001	537,3794/ 537,3797	6,62	M+H	pos
LPC (19:1)	-29,704	<0,001	535,3638/ 535,3638	6,14	M+H	pos
LPC (20:0)	-40,606	<0,001	551,3951/ 551,3950	6,93	M+H	pos
LPC (20:1)	-28,190	<0,001	549,3794/ 549,3796	6,43	M+H	pos
LPC (20:2)	-45,557	<0,001	547,3638/ 547,3640	6,03	M+H	pos
LPC (22:4)	-26,044	0,047	571,3638/ 571,3641	5,95	M+H	pos

LPC (22:6)	+32,51	0,01	567,3325/ 613,3378	5,41	M+HCOOH-H	neg
LPC (24:1)	-25,92	<0,01	605,4420/ 651,4470	7,58	M+HCOOH-H	neg
LPC (O-16:0)	-56,982	<0,001	481,3532/ 481,3535	5,87	M+H	pos
LPC (O-18:0)	-57,966	<0,001	509,3845/ 509,3847	6,49	M+H	pos
LPC (O-18:1)/ LPC(P-18:0)	-48,51	<0,01	507,3689/ 553,3743	6,01	M+HCOOH-H	neg
LPC (O-20:0)	-58,554	<0,001	537,4158/ 537,4162	7,12	M+H	pos
LPC (O-24:0)	-50,653	<0,001	593,4784/ 593,4784	8,54	M+H	pos
LPC (P-16:0)/LPC (O-16:1)	-31,92	<0,01	479,3376/ 525,3430	5,87	M+HCOOH-H	neg
LPC (P-18:0)/ LPC(O-18:1)	-60,423	<0,001	507,3689/ 507,3691	6,02	M+H	pos
LPC (P-18:1)/ LPC (O-18:2)	-54,137	<0,001	505,3532/ 505,3535	6,02	M+H	pos
LPC (P-20:0)/ LPC(O-20:1)	-66,316	<0,001	535,4002/ 535,4003	6,60	M+H	pos

Kierunek zmiany wskazuje na podwyższony (+) lub obniżony (-) poziom metabolitu w grupie pacjentów z MM w porównaniu z pacjentami z grupy kontrolnej.

Tab. 24. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od pacjentów z MGUS – lizofosfatydylocholiny

LIZOFOSFATYDYLOCHOLINY MM vs. MGUS						
Związek	%zmian	FDR	Masa cząsteczkowa/ eksperymentalna (Da)	RT (min)	Addukt	Rodzaj jonizacji
LPC (14:0)	-31,496	0,002	467,3012/ 467,3016	5,10	M+H	pos
LPC (16:1)	-23,452	0,011	493,3168/ 493,3172	5,28	M+H	pos
LPC (18:0)	-22,773	0,005	523,3638/ 523,3643	6,19	M+H	pos
LPC (18:2)	-21,700	0,02	519,3325/ 519,3336	5,39	M+H	pos
LPC (20:0)	-28,099	0,001	551,3951/ 551,3950	6,93	M+H	pos
LPC (20:2)	-23,072	0,007	547,3638/ 547,3640	6,03	M+H	pos
LPC (20:5)	-24,84	0,02	541,3168/ 587,3220	5,12	M+HCOOH-H	neg
LPC (22:4)	-24,350	0,022	571,3638/ 571,3641	5,95	M+H	pos
LPC (22:5)	-18,071	0,013	569,3481/ 569,3485	5,65	M+H	pos
LPC (O-16:0)	-22,354	0,031	481,3532/ 481,3535	5,87	M+H	pos
LPC (O-24:0)	-40,493	<0,001	593,4784/ 593,4784	8,54	M+H	pos

Kierunek zmiany wskazuje na obniżony poziom metabolitu w grupie pacjentów z MM w porównaniu z pacjentami z grupy MGUS.

Kolejną analizowaną klasą związków były fosfatydyloetanolaminy (PE). Przy pomocy omówionych metod zidentyfikowano osiem związków różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MGUS, MM oraz osób zdrowych (Tab. 25-27).

W grupie MGUS poziom stężeń sześciu PE był istotnie statystycznie wyższy niż w grupie kontrolnej (Tab. 25). Spośród wszystkich związków tylko jeden, PE (16:0/18:2), charakteryzował się redukcją stężenia w porównaniu MGUS vs. grupa kontrolna.

Porównując grupę MM z grupą kontrolną (Tab. 26) można zauważyć istotny statystycznie wzrost poziomu stężeń sześciu z ośmiu PE. Warto dodać, że obserwowany w porównaniu MGUS vs. grupa kontrolna spadek stężenia PE (16:0/18:2) odnotowano również w przypadku pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym, nie był on jednak istotny statystycznie (FDR = 0,33).

W porównaniu MM vs MGUS (Tab. 27) wyższe poziomy stężeń PE obserwowano w grupie pacjentów z MGUS. Tak jak w przypadku poprzednich porównań związkiem, który wykazuje odmienną od reszty klasy tendencję jest PE (16:0/18:2). Jedyne ten związek charakteryzuje się zwiększonym stężeniem w grupie MM w stosunku do grupy MGUS.

Tab. 25. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MGUS od grupy kontrolnej – fosfatydyloetanolaminy

FOSFATYDYLOETANOLOAMINY MGUS vs. grupa kontrolna						
Związek	%zmian	FDR	Masa cząsteczkowa/ eksperymentalna (Da)	RT (min)	Addukt	Rodzaj jonizacji
PE (P-18:1/22:6)	+194,25	<0,01	773,5359/ 773,5355	9,98	M-H	neg
PE (16:0/18:2)	-43,46	<0,01	715,5152/ 783,5019	9,99	M-H+HCOONa	neg
PE (P-16:0/20:4)	+138,12	<0,01	723,5203/ 723,5198	10,11	M-H	neg
PE (P-16:0/22:6)	+170,24	<0,01	747,5203/ 747,5199	9,88	M-H	neg
PE (P-34:2)/ PE(O-34:3)	+43,613	0,013	699,5203/ 699,5203	10,28	M+H	pos
PE (P-36:4)/ PE(O-36:5)	+134,787	<0,001	723,5203/ 723,5206	10,11	M+H	pos
PE (P-38:5)/ PE (O-38:6)	+143,411	<0,001	749,5359/ 749,5360	10,20	M+H	pos

Kierunek zmiany wskazuje na podwyższony (+) lub obniżony (-) poziom metabolitu w grupie pacjentów MGUS w porównaniu z pacjentami z grupy kontrolnej.

Tab. 26. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od grupy kontrolnej – fosfatydyloetanolaminy

FOSFATYDYLOETANOLOAMINY MM vs. grupa kontrolna						
Związek	%zmian	FDR	Masa cząsteczkowa/ eksperymentalna (Da)	RT (min)	Addukt	Rodzaj jonizacji
PE (P-18:1/22:6)	+133,82	<0,01	773,5359/ 773,5355	9,98	M-H	neg
PE (16:0/22:6)	+61,10	0,01	763,5152/ 763,5150	9,63	M-H	neg
PE (P-16:0/20:4)	+79,08	<0,01	723,5203/ 723,5198	10,11	M-H	neg
PE (P-16:0/22:6)	+90,64	<0,01	747,5203/ 747,5199	9,88	M-H	neg
PE (P-36:4)/ PE(O-36:5)	+75,638	<0,001	723,5203/ 723,5206	10,11	M+H	pos
PE (P-38:5)/ PE (O-38:6)	+69,378	0,004	749,5359/ 749,5360	10,20	M+H	pos

Kierunek zmiany wskazuje na podwyższony poziom metabolitu w grupie pacjentów z MM w porównaniu z pacjentami z grupy kontrolnej.

Tab. 27. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od pacjentów z MGUS – fosfatydyloetanolaminy

FOSFATYDYLOETANOLOAMINY MM vs. MGUS						
Związek	%zmian	FDR	Masa cząsteczkowa/ eksperymentalna (Da)	RT (min)	Addukt	Rodzaj jonizacji
PE (P-18:1/22:6)	-20,54	0,02	773,5359/ 773,5355	9,98	M-H	neg
PE (16:0/18:2)	+44,73	0,01	715,5152/ 783,5019	9,99	M-H+HCOONa	neg
PE (P-16:0/22:6)	-29,46	0,01	747,5203/ 747,5199	9,88	M-H	neg
PE (P-34:2)/ PE(O-34:3)	-21,645	0,041	699,5203/ 699,5203	10,28	M+H	pos
PE (P-38:5)/ PE (O-38:6)	-30,415	0,011	749,5359/ 749,5360	10,20	M+H	pos

Kierunek zmiany wskazuje na podwyższony (+) lub obniżony (-) poziom metabolitu w grupie pacjentów z MM w porównaniu z pacjentami z grupy MGUS.

Sześć z dziesięciu zidentyfikowanych związków z klasy lizofosfatydyloetanolamin (LPE) różnicowało w istotny sposób profile metabolomiczne pacjentów z MGUS od grupy kontrolnej (Tab. 28). W przypadku trzech z nich – LPE (16:0), LPE (18:0), LPE (18:1) obserwowano niższe stężenia w grupie MGUS niż w grupie kontrolnej. Kolejne trzy związki – LPE (20:4), LPE (20:5), LPE (22:6) charakteryzowały się wyższym poziomem stężeń wśród chorych z gammopatią monoklonalną niż osób zdrowych.

W porównaniu MM vs. grupa kontrolna (Tab. 29) zidentyfikowano 9 z 10 różnicujących LPE. Większość z nich, 7, charakteryzowała redukcja poziomu stężeń w stosunku do grupy kontrolnej. Dwa związki, LPE (20:4) oraz LPE (22:6), tak jak w przypadku porównania MGUS vs. grupa kontrolna, wykazywały wyższy poziom w grupie MM.

W porównaniu MM vs. MGUS (Tab. 30) tylko jedna LPE wykazała istotną różnicę poziomów stężeń. Mimo obserwowanego w dwóch poprzednich porównaniach spadku poziomu LPE (16:0), w przypadku bezpośredniego porównania MM z grupą MGUS stwierdzono wzrost stężenia tego związku w grupie pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym.

Tab. 28. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MGUS od grupy kontrolnej – lizofosfatydyloetanolaminy

LIZOFOSFATYDYLOETANOLOAMINY MGUS vs. grupa kontrolna						
Związek	%zmian	FDR	Masa cząsteczkowa/ eksperymentalna (Da)	RT (min)	Addukt	Rodzaj jonizacji
LPE (16:0)	-40,52	<0,01	453,2855/ 453,2854	5,55	M-H	neg
LPE (18:0)	-38,888	0,002	481,3168/ 481,3170	6,17	M+H	pos
LPE (18:1)	-30,43	0,03	479,3012/ 479,3011	5,83	M-H	neg
LPE (20:4)	+42,57	<0,01	501,2855/ 501,2854	5,39	M-H	neg
LPE (20:5)	+56,23	<0,01	499,2699/ 499,2695	5,09	M-H	neg
LPE (22:6)	+46,22	<0,01	525,2855/ 525,2853	5,39	M-H	neg

Kierunek zmiany wskazuje na podwyższony (+) lub obniżony (-) poziom metabolitu w grupie pacjentów MGUS w porównaniu z pacjentami z grupy kontrolnej.

Tab. 29. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od grupy kontrolnej – lizofosfatydyloetanolaminy

LIZOFOSFATYDYLOETANOLOAMINY MM vs. grupa kontrolna						
Związek	%zmian	FDR	Masa cząsteczkowa/ eksperymentalna (Da)	RT (min)	Addukt	Rodzaj jonizacji
LPE (P-16:0)	-27,074	0,006	437,2906/ 437,2908	5,85	M+H	pos

LPE (16:0)	-28,14	0,04	453,2855/ 453,2854	5,55	M-H	neg
LPE (18:0)	-33,466	0,005	481,3168/ 481,3170	6,17	M+H	pos
LPE (18:1)	-35,51	<0,01	479,3012/ 479,3011	5,83	M-H	neg
LPE (18:2)	-36,349	0,001	477,2855/ 477,2859	5,46	M+H	pos
LPE (20:4)	+31,60	0,02	501,2855/ 501,2854	5,39	M-H	neg
LPE (22:6)	+56,78	<0,01	525,2855/ 525,2853	5,39	M-H	neg
LPE (O-18:1)/ LPE(P-18:0)	-24,749	0,006	465,3219/ 465,3221	6,47	M+H	pos
LPE (P-18:0)/ LPE (O-18:1)	-21,45	0,05	465,3219/ 465,3218	6,46	M-H	neg

Kierunek zmiany wskazuje na podwyższony (+) lub obniżony (-) poziom metabolitu w grupie pacjentów z MM w porównaniu z pacjentami z grupy kontrolnej.

Tab. 30. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od pacjentów z MGUS – lizofosfatydyloetanolaminy

LIZOFOSFATYDYLOETANOLOAMINY MM vs. MGUS						
Związek	%zmian	FDR	Masa cząsteczkowa/ eksperymentalna (Da)	RT (min)	Addukt	Rodzaj jonizacji
LPE (16:0)	+20,81	0,05	453,2855/ 453,2854	5,55	M-H	neg

Kierunek zmiany wskazuje na podwyższony poziom metabolitu w grupie pacjentów z MM w porównaniu z pacjentami z grupy MGUS.

W przypadku lizofosfatydyloinozytoli (LPI) udało się zidentyfikować cztery związki różnicujące profile metabolomiczne pacjentów z MGUS, MM oraz osób z grupy kontrolnej (Tab. 31-33). Związki charakteryzuje spadek poziomu stężeń w grupie MGUS (3 związki) oraz MM (4 związki) w stosunku do osób zdrowych. Dodatkowo, w przypadku dwóch LPI (LPI (16:1), LPI (18:1)) odnotowano niższe stężenie w grupie MM w porównaniu z grupą MGUS. Wszystkie zmiany były istotne statystycznie ($FDR < 0,05$).

Tab. 31. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MGUS od grupy kontrolnej – lizofosfatydylinozytyle

LIZOFOSFATYDYLOINOZYTOLE MGUS vs. grupa kontrolna						
Związek	%zmian	FDR	Masa cząsteczkowa/ eksperymentalna (Da)	RT (min)	Addukt	Rodzaj jonizacji
LPI (18:0)	-53,70	<0,01	600,3275/ 600,3272	6,81	M-H	neg
LPI (18:1)	-34,53	0,03	598,3118/ 598,3114	6,08	M-H	neg
sfingozyno-1-fosforan	-28,355	0,004	379,2488/ 379,2490	5,04	M+H	pos

Kierunek zmiany wskazuje na obniżony poziom metabolitu w grupie pacjentów MGUS w porównaniu z pacjentami z grupy kontrolnej.

Tab. 32. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od grupy kontrolnej – lizofosfatydylinozytyle

LIZOFOSFATYDYLOINOZYTOLE MM vs. grupa kontrolna						
Związek	%zmian	FDR	Masa cząsteczkowa/ eksperymentalna (Da)	RT (min)	Addukt	Rodzaj jonizacji
LPI (16:1)	-62,51	<0,01	570,2805/ 570,2803	5,44	M-H	neg
LPI (18:0)	-53,30	<0,01	600,3275/ 600,3272	6,81	M-H	neg
LPI (18:1)	-48,48	<0,01	598,3118/ 598,3114	6,08	M-H	neg

sfingozyno-1-fosforan	-31,368	<0,001	379,2488/ 379,2490	5,04	M+H	pos
-----------------------	---------	--------	--------------------	------	-----	-----

Kierunek zmiany wskazuje na obniżony poziom metabolitu w grupie pacjentów z MM w porównaniu z pacjentami z grupy kontrolnej.

Tab. 33. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od pacjentów z MGUS – lizofosfatydylinozytole

LIZOFOSFATYDYLOINOZYTOLE MM vs. MGUS						
Związek	%zmian	FDR	Masa cząsteczkowa/ eksperymentalna (Da)	RT (min)	Addukt	Rodzaj jonizacji
LPI (16:1)	-38,74	<0,01	570,2805/ 570,2803	5,44	M-H	neg
LPI (18:1)	-21,31	0,01	598,3118/ 598,3114	6,08	M-H	neg

Kierunek zmiany wskazuje na obniżony poziom metabolitu w grupie pacjentów z MM w porównaniu z pacjentami z grupy MGUS.

W tabelach 34-36 przedstawiono pojedyncze zidentyfikowane związki istotnie różnicujące profile metabolomiczne grup (MM, MGUS, grupa kontrolna), których nie można zakwalifikować do głównych klas związków, takich jak karnityny, PC, LPC, PE, LPE, LPI czy SM. W przypadku dwóch związków (kwas eikozapentaenowy - EPA, kwas arachidonowy) zaobserwowano spadek ich poziomu stężeń w stosunku do grupy kontrolnej zarówno w przypadku grupy pacjentów z MM jak i MGUS. Kolejne związki: bilirubina, kwas karboksymetylo-propylo-furanopropanowy oraz benzotiazolein wykazywały tendencję odwrotną – wzrost poziomu stężeń związków w grupie MGUS i MM w stosunku do osób zdrowych (Tab. 34-35).

Tab. 34. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MGUS od grupy kontrolnej – pozostałe związki

POZOSTAŁE ZWIĄZKI MGUS vs. grupa kontrolna						
Związek	%zmian	FDR	Masa cząsteczkowa/ eksperymentalna (Da)	RT (min)	Addukt	Rodzaj jonizacji
bilirubina	+181,942	<0,001	584,2635/ 584,2630	8,02	M+H	pos
benzotiazoleion	+146,92	<0,001	166,9863/ 166,9864	3,05	M-H	neg
piperyna	+83,645	0,007	285,1365/ 285,1367	4,62	M+H	pos
kwas arachidonowy	-41,534	<0,001	304,2402/ 304,2405	7,14	M+H	pos
kwas karboksy-metylo-propylo- furanopropanowy	+180,20	<0,01	240,0998/ 240,0998	3,8	M-H	neg
EPA (kwas eikozapentaenowy)	-42,30	<0,01	302,2246/ 302,2245	6,78	M-H	neg
piperyna	+83,645	0,007	285,1365/ 285,1367	4,62	M+H	pos

Kierunek zmiany wskazuje na podwyższony (+) lub obniżony (-) poziom metabolitu w grupie pacjentów MGUS w porównaniu z pacjentami z grupy kontrolnej.

Tab. 35. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od grupy kontrolnej – pozostałe związki

POZOSTAŁE ZWIĄZKI MM vs. grupa kontrolna						
Związek	%zmian	FDR	Masa cząsteczkowa/ eksperymentalna (Da)	RT (min)	Addukt	Rodzaj jonizacji
bilirubina	+114,232	0,002	584,2635/ 584,2630	8,02	M+H	pos
benzotiazoleion	+82,51	<0,01	166,9863/ 166,9864	3,05	M-H	neg
kwasy arachidonowy	-50,867	<0,001	304,2402/ 304,2405	7,14	M+H	pos
kwasy karboksy-metylo-propylo-furanopropanowy	+98,02	0,01	240,0998/ 240,0998	3,8	M-H	neg
EPA (kwasy eikozapentaenowy)	-57,97	<0,01	302,2246/ 302,2245	6,78	M-H	neg

Kierunek zmiany wskazuje na podwyższony (+) lub obniżony (-) poziom metabolitu w grupie pacjentów z MM w porównaniu z pacjentami z grupy kontrolnej.

Tab. 36. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od pacjentów z MGUS – pozostałe związki

POZOSTAŁE ZWIĄZKI MM vs. MGUS						
Związek	%zmian	FDR	Masa cząsteczkowa/ eksperymentalna (Da)	RT (min)	Addukt	Rodzaj jonizacji
bilirubina	-24,015	0,033	584,2635/ 584,2630	8,02	M+H	pos
EPA (kwas eikozapentaenowy)	-27,16	0,05	302,2246/ 302,2245	6,78	M-H	neg

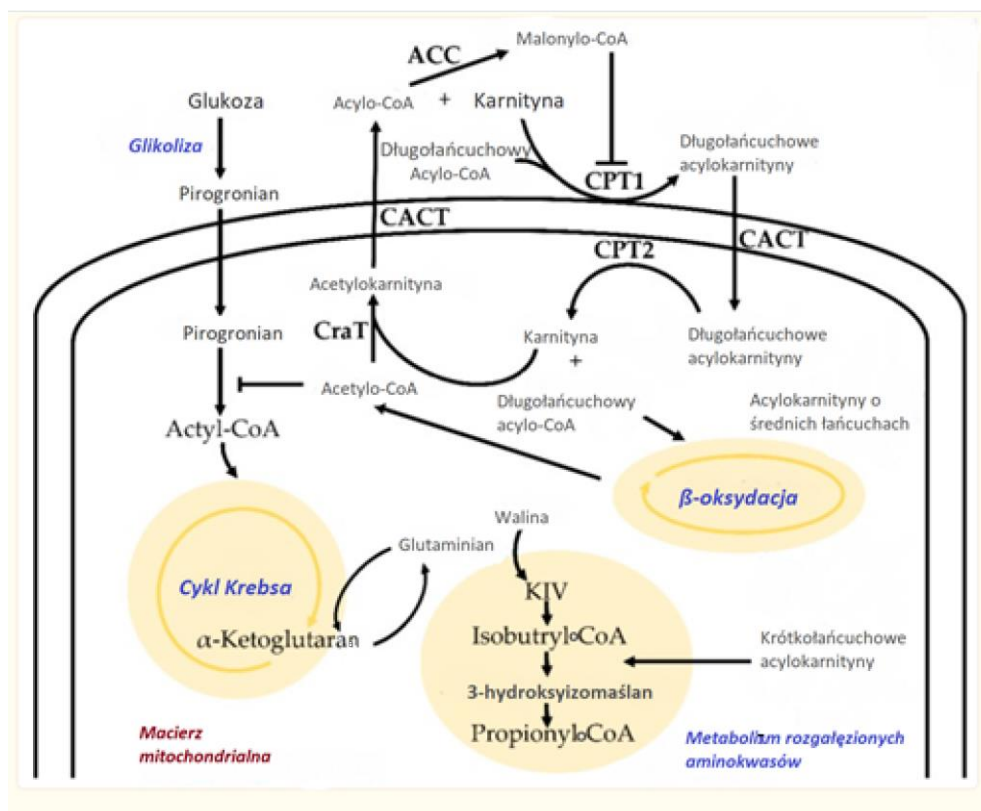
Kierunek zmiany wskazuje na obniżony poziom metabolitu w grupie pacjentów z MM w porównaniu z pacjentami z grupy MGUS.

DYSKUSJA

Przeprowadzone analizy pozwoliły na zidentyfikowanie związków różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MGUS, szpiczakiem plazmocytowym oraz biorących udział w badaniu osób zdrowych. Stwierdzono istotne statystycznie różnice w następujących grupach związków: karnityny, sfingomieliny, fosfatydylocholiny, lizofosfatydylocholiny, fosfatydyloetanolaminy, lizofosfatydyloetanolaminy, lizofosfatydyloinozytole oraz w stężeniu takich związków jak kwas arachidonowy, eikozapentaenowy, karboksy-metylopropylo-furanopropanowy i benzotiazolein.

Karnityny

Najwyraźniejsze różnice pomiędzy profilami metabolomicznymi porównywanych grup dotyczą poziomu stężeń karnityn. Karnityny, a właściwie acylokarnityny, czyli estry l-karnityny i kwasów tłuszczowych, są nośnikami długołańcuchowych kwasów tłuszczowych niezbędnymi do ich transportu do macierzy mitochondrialnej [42]. Wewnątrz mitochondrium kwasy tłuszczowe mogą z kolei zostać rozłożone do acetylo-CoA w procesie zwanym β -oksydacją, dzięki czemu po wejściu do cyklu Krebsa mogą posłużyć do produkcji energii. Metabolizm acylokarnityn jest związany nie tylko z transportem kwasów tłuszczowych, ale również odgrywa kluczową rolę w regulacji równowagi wewnątrzkomórkowego metabolizmu cukrów i lipidów (Ryc.7).



Ryc. 7. Udział acylokarnityn w metabolizmie komórkowym. CoA - koenzym A, ACC - karboksylaza acetylo-CoA, CACT - translokaza karnityna-acylokarnityna, CraT - acetylotransferaza karnitynowa, CPT I, II - palmitoilotransferaza karnitynowa I, II, KIV - kwas alfa-keto-izowalerianowy [42].

Podobnie jak kwasy tłuszczowe, ze względu na długość grup acylowych, acylokarnityny klasyfikuje się jako acylokarnityny o krótkich, średnich i długich łańcuchach [42]. Estry o długim łańcuchu (posiadające grupy acylowe o czternastu lub więcej atomach węgla) transportują tłuszczowe grupy acylowe do mitochondriów. Estry o krótkim (dwa do pięciu atomów węgla w grupie acylowej) i średnim łańcuchu (od sześciu do trzynastu atomów węgla w grupie acylowej) z kolei powstają w mitochondriach oraz peroksysomach i uczestniczą w usuwaniu kwasów organicznych [43]. Wzrost stężenia karnityn w grupach MM oraz MGUS może mieć związek ze zwiększoną peroksydacją lipidów w wysoce aktywnych metabolicznie klonalnych plazmocytach. Podobne wnioski można odszukać w dostępnej literaturze [39, 40]. Co więcej, autorzy niektórych publikacji odradzają suplementację karnityny podczas leczenia przeciwnowotworowego w związku ze zwiększonym zapotrzebowaniem komórek nowotworowych na produkty utleniania lipidów [44].

Warto zaznaczyć, że w przedstawionym badaniu istotnie statystycznie zmiany zaobserwowano głównie dla długołańcuchowych acylokarnityn transportujących grupy tłuszczowe do

wnętrza mitochondriów. Proces ten jest możliwy dzięki translokazie karnityna-acylokarnityna (ang. carnitine-acylcarnitine-translocase, CACT), która odpowiada za transport bierny kompleksów karnityna-kwasy tłuszczowe przez wewnętrzną błonę mitochondrialną oraz palmitoilotransferazie karnitynowej II (ang. carnitine palmitoyltransferase II, CPT II), która pośredniczy w ostatnim etapie transportu kwasów tłuszczowych do macierzy mitochondrium [43, 45] (Ryc.7). Wiedza ta może zostać w przyszłości wykorzystana przy opracowywaniu nowych celowanych strategii terapeutycznych. Wzrost stężenia dwóch ze zidentyfikowanych średniołańcuchowych acetylokarnityn - dodekanoilokarnityny oraz dekanoilokarnityny obserwowano również w przypadku pacjentów z rakiem nerki [46].

Ciekawym wnioskiem wynikającym z przedstawionego badania jest występowanie wyższego stężenia karnityn w grupie MGUS w stosunku do pacjentów z rozpoznaniem szpiczakiem plazmocytowym. Mechanizm obserwowanych zmian nie został dotychczas poznany, może jednak stanowić przedmiot badań dotyczących patomechanizmu transformacji MGUS do MM.

Sfingomieliny

Sfingomielina jest rodzajem sfingolipidu znajdującego się w błonach komórek zwierzęcych, zwykle składającym się z fosforylocholiną i ceramidem. U ludzi sfingomielina jest jedynym fosfolipidem błonowym nieutworzonym z glicerolu. Istotną rolą SM w komórkach jest oddziaływanie z sąsiednimi cząsteczkami i cząsteczkami wody w celu wytworzenia sieci międzycząsteczkowych wiązań wodorowych, co odróżnia je od głównej rodziny lipidów w komórkach zwierzęcych, czyli glicerolipidów [47, 48]. Udowodniono, że nadmierny wzrost zawartości SM w błonie komórkowej zmniejsza jej przepuszczalność, zwiększa jej sztywność i wytrzymałość, prowadząc do zmniejszenia komunikacji między komórkami, zmniejszenia lub zahamowania ekspresji cząsteczek na powierzchni komórki i koordynacji szlaków sygnałowych [47].

Prace dotyczące udziału sfingomielin w karcynogenezie wskazują na związek pomiędzy wysokim poziomem SM a inicjacją procesu nowotworowego czy opornością na leczenie. Szczególnie bogate w sfingomieliny są egzosomy komórek nowotworowych, które, poprzez pełnią rolę w komunikacji międzykomórkowej, przyczyniają się do neoangiogenezy, jak też do lekooporności poprzez transport leków przeciwnowotworowych z wnętrza komórek nowotworowych. Krytyczne znaczenie metabolizmu SM w progresji raka wynika dodatkowo

z roli SM w wytwarzaniu ceramidu. Zmniejszona degradacja sfingomielin prowadzi do zmniejszonego wytwarzania ceramidu, ważnej cząsteczki sygnałowej kontrolującej proces migracji, proliferacji, starzenia i apoptozy komórek [47, 48]. Jednym z enzymów biorących udział w degradacji sfingomieliny do ceramidu jest sfingomielinaza [49]. Udowodniono, że aktywność sfingomielinazy maleje w przypadku szpiczaka plazmocytoowego, co z kolei prowadzi do zwiększonego poziomu SM, zmniejszonego wytwarzania ceramidu i ostatecznie do zwiększonego przeżycia komórek szpiczaka plazmocytoowego i oporności na stosowane leczenie [49, 50]. Biorąc pod uwagę powyższe wyniki badań można wnioskować, że wzrost stężeń sfingomielin w MGUS może być związany z zachodzącą transformacją do MM. Z kolei poziom stężeń SM u pacjentów z noworozpoznanym MM może być w przyszłości wykorzystany przy wyborze schematu leczenia oraz do wyodrębnienia pacjentów z potencjalną opornością na standardowe leki przeciwnowotworowe.

Fosfatydylocholino

Fosfatydylocholino to grupa lipidów, które zawierają cholinę jako grupę główną. Metabolizm lipidów, do których należą fosfatydylocholino, związany jest z regulacją wielu istotnych procesów komórkowych, takich jak wzrost komórek, proliferacja, różnicowanie, przeżycie, apoptoza, homeostaza błon, odpowiedź na chemioterapię i lekooporność [51].

Obserwowany w badaniu niejednoznaczny trend dotyczący stężeń PC znajduje swoje odzwierciedlenie w literaturze. Steiner w swojej pracy opisuje wzrost poziomu stężeń większości zidentyfikowanych przez niego PC w stosunku do grupy kontrolnej zarówno w MGUS, jak i noworozpoznanym MM, a spadek w przypadku chorych z oporną i nawrotową chorobą [52]. Z kolei de Silva i współautorzy w swoim badaniu zaobserwowali niższy poziom PC u chorych z MM i był on tym niższy, im wyższe było stadium zaawansowania choroby wg ISS. Co więcej, spadek stężeń lipidów strukturalnych obserwowany był również w przypadkach MGUS i poprzedzał transformację do MM [51]. Podobne dane można odszukać w innych publikacjach [53].

W publikacji z 2019r. dla Cancer Science, Maekawa i współautorzy sugerują, że wzrost poziomu stężeń PC (dokładniej PC (38:3) i PC (38:5)) w MM może być związany z lepszą odpowiedzią na leczenie przeciwnowotworowe [54]. Zebrane informacje odnośnie PC mogą być wykorzystane w przyszłości jako dodatkowy czynnik stratyfikacji pacjentów zarówno z MM, jak i MGUS.

Lizofosfatydylocholiny

Lizofosfatydylocholiny to związki powstające w wyniku częściowej hydrolizy fosfatydylocholin, w której enzymatycznemu usunięciu przez fosfolipazę A2 ulega jedna grupa kwasów tłuszczowych [53, 55]. Uzyskany w wyniku hydrolizy wolny kwas tłuszczowy może być dalej przetwarzany do wtórnych przekazników, takich jak kwas arachidonowy, prostaglandyny i leukotrieny, które z kolei odgrywają rolę w karcynogenezie i tworzeniu przerzutów [53, 56, 57]. Co więcej, LPC mogą zostać ponownie przekształcone do PC w obecności Acylo-CoA przez acylotransferazę lizofosfatydylocholiny. Oba procesy powstawania LPC i ponownego przekształcania do PC wchodzi w skład cyklu Landsa, który jest jednym z mechanizmów organizmu odpowiedzialnym za cykliczną syntezę i degradację PC [58].

W przypadku większości zidentyfikowanych LPC zarówno w grupie MM, jak i MGUS zaobserwowano spadek poziomu stężeń LPC w stosunku do grupy kontrolnej, co pokrywa się z danymi znalezionymi w literaturze [51, 55]. Podobne obserwacje odnotowywano w badaniach dotyczących innych chorób nowotworowych. W pracy opublikowanej w *Journal of Clinical Oncology* Zhao i współautorzy opisują zmniejszenie stężeń LPC wśród chorych na raka jelita grubego, szczególnie LPC (18:1) i LPC (18:2) (które zidentyfikowano również wśród pacjentów z MM i MGUS) i sugerują, że mogą one stanowić potencjalne biomarkery raka jelita grubego [59].

Przyczyna wzrostu stężeń trzech konkretnych LPC w badaniu - (22:6), (22:5) i (20:5) - nie jest znana. Wiadomo, że LPC są w stanie stymulować uwalnianie czynnika wzrostu fibroblastów, czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF), interleukiny 6 i 8, a ich podwyższony poziom może działać jak bodziec zapalny, który z kolei może mieć wpływ na progresję MM [51, 60]. Udowodniono, że Il-6 przyczynia się do proliferacji, migracji i lekooporności nowotworowych komórek plazmatycznych. Dodatkowo promuje ona angiogenezę i wzrost masy nowotworowej przez indukcję ekspresji genu czynnika wzrostu śródbłoka naczyniowego (VEGF), a poprzez aktywację makrofagów i indukcję dojrzewania osteoklastów nasila osteoklastogenezę i niszczenie kości. Co więcej, również komórki szpiku indukowane przez Il-6 mogą promować wzrost komórek MM poprzez wytwarzanie ligandu indukującego proliferację (APRIL) należącego do nadrodziny ligandów czynnika martwicy nowotworu (TNF) [61 – 63]. Z kolei w pracy opublikowanej w 2014 r. na łamach *Acta Poloniae Pharmaceutica* autorzy na podstawie dostępnej im literatury opisują

przeciwwzapalne działanie niektórych LPC, w tym zidentyfikowanych LPC (20:5) i (22:6), które hamują powstawanie leukotrienów i cytokin [64], co z kolei świadczyłoby o ich hamującym wpływie na proces karcynogenezy.

Fosfatydyloetanolaminy

Fosfatydyloetanolaminy, czyli związki z grupy lipidów, występują głównie w wewnętrznym fragmencie błon komórkowych i szczególnie obficie w mitochondriach. PE, które stanowią około 25% wszystkich fosfolipidów komórkowych, mają kluczowe znaczenie w tworzeniu błon komórkowych. Dodatkowo są one niezbędne do syntezy białek zakotwiczonych w glikozylofosfatydyloinozytolu (ang. glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins, GPI-AP), które z kolei są konieczne do przeżycia komórek, a kowalencyjne przyłączenie PE do białka związanego z autofagią Atg8 powoduje tworzenie autofagosomów [65]. PE są również prekursorami innych lipidów. Badania wskazują, że PE związane z arachidonowymi łańcuchami acylowymi są utleniane przez lipooksygenazę, promując w ten sposób ferroptozę, czyli zaprogramowaną śmierć komórki za pośrednictwem żelaza w odpowiedzi na akumulację nadtlenków lipidów [66].

Informacje dotyczące funkcji PE w komórkach są już wykorzystywane w badaniach dotyczących nowych terapii przeciwnowotworowych opartych na celowaniu w lipidy błonowe. Wykorzystywany jest głównie fakt, że w przeciwieństwie do zdrowych komórek, w przypadku komórek nowotworowych PE występują głównie na zewnętrznej części błony komórkowej [67].

Na podstawie badań dotyczących lipidomiki w chorobach nowotworowych stwierdzono, że osoby z chorobą nowotworową posiadają wyższe stężenia PE niż osoby zdrowe, co może być wykorzystane jako potencjalny marker nowotworowy [68, 69]. Co więcej, tak jak w przedstawionym projekcie, w dotychczas opublikowanych badaniach również wykryto spadek poziomu stężeń PE w próbkach pacjentów z MM w porównaniu z pacjentami z MGUS, co może sugerować zwiększone zużycie PE do syntezy błon komórkowych w przypadku MM w związku z szybszą proliferacją klonalnych komórek plazmatycznych [65].

Lizofosfatydyloetanolaminy

Lizofosfatydyloetanolamina, produkt hydrolizy fosfatydyloetanolaminy indukowanej przez fosfolipazę A1/A2, należy do grupy lizofosfolipidów. LPE, w przeciwieństwie do wcześniejszych grup lipidów, są składnikiem błony komórkowej występującym w małej ilości [70]. Dokładna rola LPE nie została jeszcze opisana. Uważa się, że LPE biorą udział w sygnalizacji komórkowej i aktywacji innych enzymów [71]. Poprzez aktywację kinazy białkowej aktywowanej mitogenami (MAPK) lizofosfatydyloetanolamina zwiększa wewnątrzkomórkowy poziom wapnia i stymuluje migrację komórek nowotworowych oraz inwazję komórkową [72]. W publikacji Mohameda i współpracowników podwyższone stężenia LPE obserwowano wśród pacjentów z MM wysokiego ryzyka wg R-ISS [73]. Z kolei Wei i współautorzy w swojej pracy zauważyli, że niższy poziom stężenia LPE (16:0) i podwyższony poziom LPE (18:2) były związane z progresją MM [74]. Być może zmiany dotyczące konkretnych zidentyfikowanych w projekcie LPE będą mogły w przyszłości posłużyć jako kolejne kryterium stratyfikacji pacjentów z MM i MGUS oraz do oceny rokowania pacjentów.

Lizofosfatydyloinozytyle

Lizofosfatydyloinozytol to bioaktywny lipid wytwarzany przez fosfolipazy, który bierze udział w wielu procesach zachodzących w komórce, takich jak na przykład wzrost czy różnicowanie zarówno prawidłowych, jak też nowotworowo zmienionych komórek [75]. LPI pełnią rolę cząsteczek sygnałowych, a poprzez swoiste receptory istniejące na powierzchni komórek są w stanie regulować takie procesy jak stany zapalne, angiogeneza, powstawanie blaszek miażdżycowych czy metabolizm glukozy [75, 76]. Ponadto we krwi pacjentów onkologicznych stwierdzono wyższe poziomy LPI niż wśród zdrowej populacji. Jednym z najlepiej poznanych LPI jest sfingozyno-1-fosforan [77]. Liczne badania pokazują, że poziomy tkankowe sfingozyno-1-fosforanu są zwiększone w wielu nowotworach, wpływając na przeżycie, proliferację, angiogenezę i rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych [78, 79].

Aktywność biologiczna LPI może być zarówno niereceptorowa, jak też receptorowa [75]. Jednym z ważniejszych receptorów LPI okazał się GPR55 - receptor należący do grupy receptorów sprzężonych z białkiem G (ang. G protein-coupled receptors, GPCRs). Udowodniono, że receptor ten jest silnie związany z karcynogenezą - jego ekspresja zwiększa się w niektórych nowotworach, a jego aktywacja przez LPI zwiększa migrację, inwazję i proliferację komórek rakowych. W oparciu o te wyniki dużą uwagę w badaniach dotyczących

nowych terapii przeciwnowotworowych poświęca się obecnie identyfikacji antagonistów GPR55, którzy mogliby regulować funkcje komórek nowotworowych [77, 80].

Co ciekawe, w obecnym badaniu poziom stężeń LPI, w tym sfingozyno-1-fosforanu, w przeciwieństwie do znanych publikacji dotyczących wpływu LPI na karcynogenezę był niższy wśród pacjentów z MGUS i MM w stosunku do osób zdrowych, co należałoby zweryfikować w badaniach na większej grupie uczestników.

Pozostałe związki

Kwas arachidonowy

Kwas arachidonowy, jeden ze zidentyfikowanych związków różnicujących profile metaboliczne badanych grup, jest wielonienasyconym, niezbędnym kwasem tłuszczowym, który ma 20-węglowy łańcuch jako szkielet i cztery podwójne wiązania cis w pozycjach C5, C8, C11 i C14. Kwas ten jest obecny w fosfolipidach błon komórkowych i jest z nich uwalniany przez cytozolową fosfolipazę A2 w odpowiedzi na szereg bodźców, a następnie przekształcany w mediatory eikozanoidowe w celu wygenerowania metabolitów o różnej aktywności biologicznej [81-83]. Metabolity te mogą modulować funkcję nerek, płuc i układu sercowo-naczyniowego, napięcie naczyniowe i reakcje zapalne. Niektóre ze znanych metabolitów, na przykład prostaglandyna D2, E2, prostacyklina i tromboksan A2 biorą udział w procesach zapalnych związanych z chorobą nowotworową, angiogenezie, progresji guza i powstawaniu przerzutów [56, 57]. Obserwowany w badaniu spadek stężenia kwasu arachidonowego w grupie MGUS i MM może mieć zatem związek z jego zwiększoną degradacją i produkcją aktywnych metabolitów sprzyjających karcynogenezie. Udowodniono, że komórki nowotworowe wykazują nadekspresję enzymów metabolizujących kwas arachidonowy, co jest szczególnie widoczne w przypadku opornego, nawrotowego szpiczaka plazmocytozy i może stanowić potencjalny punkt uchwytu nowych leków przeciwnowotworowych [53]. Dodatkowo, sam kwas arachidonowy indukuje wcześniej omówioną ferroptozę, co jest wykorzystywane w badaniach dotyczących przeciwdziałaniu procesom nowotworowym, w tym również MM [81, 84].

Tak jak w przypadku karnityn istnieje wśród niektórych badaczy pogląd, że ograniczenie spożycia produktów będących źródłem kwasu arachidonowego, takich jak na przykład drób,

jajka czy produkty mleczne może pomóc w zapobieganiu i kontrolowaniu niektórych chorób nowotworowych [85].

Kwas eikozapentaenowy

Ciekawym związkiem, który udało się zidentyfikować w badaniu jest kwas eikozapentaenowy. Jest to długołańcuchowy wielonienasycony kwas tłuszczowy, obecny na przykład w oleju rybnym, który przez niektórych badaczy jest wykorzystywany jako leczenie wspomagające kacheksji nowotworowej. Związek ten może mieć również pewne działanie przeciwnowotworowe poprzez zmniejszenie produkcji cytokin prozapalnych i hamowanie konwersji kwasu arachidonowego do związków z rodzin tromboksanów-2 i prostaglandyn-2 [86-88]. Co więcej, istnieją badania sugerujące, że dieta bogata w świeże ryby (źródło kwasu eikozapentaenowego) pomaga spowolnić rozwój MM [86]. Okazuje się również, że wysoki stosunek kwasu arachidonowego do eikozapentaenowego silnie koreluje z chorobą nowotworową, co zostało już udokumentowane w przypadku raka jelita grubego i piersi [89].

Zmniejszone stężenie kwasu eikozapentaenowego wśród pacjentów MM i MGUS stwierdzone w badaniu może sugerować większy udział degradacji tego kwasu i produkcji pronowotworowych metabolitów. Z praktycznego punktu widzenia z kolei istnieje możliwość wykorzystania obliczeń stosunku kwasu arachidonowego do eikozapentaenowego do oceny ryzyka transformacji pacjentów z MGUS do MM. Wiedza dotycząca wpływu kwasu eikozapentaenowego na nowotworowe plazmocyty może być również wykorzystana w codziennej praktyce w celu modyfikacji nawyków żywieniowych tak, aby wspomagały walkę z nowotworem.

Bilirubina

Jak już wcześniej wspomniano, zarówno w grupie MM, jak i MGUS obserwowano wyższe niż w grupie kontrolnej stężenia bilirubiny. Wzrost stężenia tego związku został opisany na przykład w pracach dotyczących analizy profilu metabolomicznego pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową, co według autorów może mieć związek z częstym występowaniem u pacjentów z PBL autooprzeciwciał i związanej z tym autoimmunologicznej niedokrwistości hemolitycznej (ang. autoimmune hemolytic anemia, AIHA) [34]. Mimo że AIHA może

występować u pacjentów z MM, jej współwystępowanie ze szpiczakiem plazmocytowym jest rzadkie [90]. Dutta w swojej publikacji opisał wzrost stężenia bilirubiny u pacjenta z MM spowodowany reakcją immunoglobulin chorego ze składnikiem odczynników wykorzystywanych do oznaczenia bilirubiny całkowitej w surowicy [91], jednak nie tłumaczy to wystąpienia opisywanych zaburzeń w projekcie, ponieważ w niniejszym badaniu materiałem wykorzystywanym do analiz było osocze. Być może wyjaśnienie zaobserwowanych zmian uda się przedstawić w badaniach przeprowadzonych na większej populacji chorych.

Kwas karboksy-metylo-propylo-furanopropanowy

3-Karboksy-4-metylo-5-propylo-2-furanpropionian (ang. 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionate, CMPF) jest jednym z głównych endogennych metabolitów furanowych kwasów tłuszczowych. Kwasy te są włączane do fosfolipidów i estrów cholesterolu, a następnie katabolizowane do wydalanych z moczem dwuzasadowych kwasów urofuranowych. Funkcje CMPF nie zostały poznane. Wykazano, że podwyższone stężenie CMPF jest związane z rozwojem cukrzycy ciężowej, zespołu metabolicznego lub cukrzycy typu 2 oraz prowadzi do uszkodzenia komórek nerkowych [92]. Nie udało się natomiast znaleźć informacji pomocnych do wytłumaczenia wzrostu stężenia tego związku wśród pacjentów z MM i MGUS.

Benzotiazolein

Benzotiazolein należy do klasy związków organicznych znanych jako benzotiazole. Są to związki zawierające benzen skondensowany z pierścieniem tiazolowym. Benzotiazolein jest metabolitem wtórnym o nieokreślonej roli w organizmie, aczkolwiek pochodne benzotiazoli posiadają udowodnione szerokie spektrum działania biologicznego, w tym przeciwnowotworowego [93], co w pewnym sensie mogłoby stanowić potencjalne wytłumaczenie spadku stężenia tego związku w grupie MM w stosunku do pacjentów z MGUS.

Piperyna

Analizując wyniki, warto zwrócić uwagę na piperynę, której istotną statystycznie zmianę

stężenia zaobserwowano wyłącznie w porównaniu MGUS vs. grupa kontrolna. Związek ten jest metabolitem roślinnym - występuje głównie w pieprzu i jest odpowiedzialny za jego ostry smak, dodatkowo ma działanie m.in. przeciwutleniające, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, hepatoprotekcyjne i neuroprotekcyjne [94]. W związku ze swoim plejotropowym działaniem jest wykorzystywana w wielu badaniach klinicznych, w tym tych związanych z MM. Badanie przeprowadzone przez Vadhan-Raj i współpracowników miało na celu ocenę tolerancji klinicznej i odpowiedzi na samą kurkuminę oraz w połączeniu z piperyną u pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym. Kurkumina, pozyskiwana z rośliny *Curcuma longa*, jest popularnym barwnikiem spożywczym, któremu swój kolor zawdzięcza między innymi kurkuma. Udowodniono, że kurkumina obniża poziom NF- κ B w ludzkich komórkach szpiczaka plazmocytoowego, prowadząc do zahamowania proliferacji i indukcji apoptozy. Związek ten ma jednak niską biodostępność przy doustnym przyjmowaniu. Wykazano, że piperyna z kolei zwiększa poziom leków i składników odżywczych w surowicy, co może spowodować zwiększenie przyswajalności kurkuminy. Stwierdzono, że doustne podawanie kurkuminy i piperyny wiązało się ze znacznym zmniejszeniem aktywacji NF- κ B [95].

Ograniczenia projektu

Analizując wyniki pracy należy brać pod uwagę fakt, że badanie zostało przeprowadzone na ograniczonej liczbie przypadków, a poszczególne grupy badane (grupa MGUS, grupa MM) dotyczyły dwóch odrębnych populacji chorych. Mimo że szpiczak plazmocytowy jest drugim co do częstości występowania nowotworem hematologicznym, trudno jest zgromadzić grupę chorych z MGUS, u których rozwinię się pełnoobjawowy MM. Jak wspomniano wcześniej, w populacji pacjentów z MGUS jedynie 1% chorych rocznie transformuje do choroby nowotworowej. Analiza metabolomu w tak dobranej grupie mogłaby zweryfikować wyniki przedstawionego projektu i zmiany zachodzące w metabolizmie komórek toczące się podczas transformacji nowotworowej.

Kolejnym istotnym czynnikiem ograniczającym pracę jest sam metabolom. Profile metabolomiczne nie są stabilne - są istotnie wrażliwe na zewnętrz- i wewnętrzne zmiany zachodzące w danym przedziale czasowym. Należy brać pod uwagę fakt, że wykrywane metabolity to nie zawsze produkty szlaków metabolicznych, lecz także przyjmowane przez daną osobę leki, stosowana dieta czy zanieczyszczenia środowiska, które mogą być typowe dla danego obszaru lub wrażliwe na zmiany pór roku.

WNIOSKI

1. Przeprowadzona analiza statystyczna niecelowaną metodą metabolomicznego odcisku palca pozwoliła na określenie istotnych różnic w profilach metabolomicznych w poszczególnych grupach badanych (MGUS, MM, grupa kontrolna).
2. Zmiany w stężeniu karnityn oraz fosfatydyloetanolamin zachodzące w grupie pacjentów z MGUS oraz MM mogą mieć związek z intensywną proliferacją, a co za tym idzie - zwiększonym zapotrzebowaniem energetycznym wysoce aktywnych metabolicznie klonalnych plazmocytozów.
3. Spadek stężenia kwasu arachidonowego w grupie MGUS i MM może mieć związek z jego zwiększoną degradacją i produkcją aktywnych metabolitów sprzyjających karcynogenezie, czemu może dodatkowo sprzyjać obniżony poziom kwasu eikozapentaenowego.
4. Obserwowane zmniejszenie stężeń metabolitów z grupy sfingomielin i fosfatydylocholin oraz wzrost stężeń związków takich jak PC (34:3) czy LPE (16:0) u pacjentów z MM w porównaniu do grupy MGUS może świadczyć o udziale tych szlaków w transformacji MGUS do MM.
5. Poznanie zachodzących zmian w zakresie metabolomiki w trakcie transformacji MGUS do pełnoobjawowego MM może zostać w przyszłości wykorzystane do opracowania nowych markerów nowotworowych, ulepszenia stratyfikacji, wyodrębnienia grupy pacjentów z MGUS, u których należałoby rozważyć wcześniejsze włączenie leczenia w celu prewencji uszkodzenia narządowego związanego z progresją do MM oraz może ujawnić nowe cele terapeutyczne przy opracowywaniu nowych terapii przeciwszpizakowych.

STRESZCZENIE

Dyskrazje plazmocytowe to grupa chorób, których wspólną cechą jest produkcja przez pojedynczy klon komórek plazmatycznych jednorodnego białka, tak zwanego białka monoklonalnego. Jedną z częściej obserwowanych jednostek chorobowych z tej grupy jest szpiczak plazmocytowy (ang. multiple myeloma, MM), nowotwór związany z klonalnym rozrostem plazmocytów. Przebieg kliniczny MM wykazuje znaczną zmienność. Wprowadzenie do standardów leczenia nowych leków pozwoliło na zwiększenie odsetka pacjentów odpowiadających na leczenie. Mimo to, choroba ta jest nadal uznawana za nieuleczalną.

Rozwój wymagającego leczenia objawowego MM poprzedzony bywa występowaniem stanu przednowotworowego określonego jako gammopatia monoklonalna o nieokreślonym znaczeniu (ang. monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS). Stan ten przebiega bezobjawowo i często wykrywany jest przypadkowo podczas diagnostyki innych schorzeń. Mimo że wystąpienie MGUS poprzedza rozwój dyskrazji plazmocytovej, jego stwierdzenie nie zawsze determinuje wystąpienie choroby.

Względnie nową dziedziną nauki jest metabolomika, która ma na celu scharakteryzować metabolom, czyli kompletny zbiór metabolitów lub drobnocząsteczkowych substancji chemicznych biorących udział w procesach biologicznych zachodzących w komórce. Badania metabolomiczne stosuje się w hematologii w celu określenia przydatności metody do wcześniejszego diagnozowania nowotworów, selekcji pacjentów do badań klinicznych, określania biomarkerów odpowiedzi na leczenie, jak również identyfikacji potencjalnych markerów transformacji nowotworowej oraz agresywnego przebiegu choroby, które mogłyby odgrywać rolę przy kwalifikacji pacjentów do wcześniejszego rozpoczęcia leczenia.

Celem pracy było określenie profili metabolomicznych pacjentów z wybranymi dyskrazjami plazmocytowymi: MGUS oraz szpiczakiem plazmocytowym. Dodatkowym celem była identyfikacja potencjalnych biomarkerów progresji MGUS do MM.

W badaniu wzięło udział łącznie 100 osób. Grupę badaną stanowili pacjenci Kliniki Hematologii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Białymstoku z nowo rozpoznany MGUS (30 osób) oraz szpiczakiem plazmocytowym (50 chorych) w różnym stadium zaawansowania choroby podczas pobierania materiału. Obie grupy były zbliżone pod względem mediany wieku. Kontrolę stanowiła dobrana pod względem struktury płci i wieku grupa osób zdrowych – dawców krwi i wolontariuszy (20 osób).

Plan badania zakładał uzyskanie od pacjentów będących na czczo próbki krwi żyłnej w czasie rutynowych, porannych badań diagnostycznych. Uzyskany materiał, po wstępnej obróbce, oceniano przy pomocy chromatografu cieczowego sprzężonego z czułym detektorem masowym (LC-QTOF-MS), wykorzystując metodę analizy niecelowanej (metabolomiczny odcisk palca).

Po wstępnym opracowaniu danych metodą LC-MS uzyskano 751 cech metabolicznych. Biorąc pod uwagę masę eksperymentalną i uzyskane widma fragmentacyjne oraz porównując je do mas cząsteczkowych i widm wzorcowych w bazach internetowych udało się ostatecznie zidentyfikować 104 związki różnicujące profile metabolomiczne pacjentów w poszczególnych grupach.

W grupie MGUS, porównując do grupy kontrolnej, obserwowano wzrost poziomu zidentyfikowanych związków z grupy karnityn i sfingomielin (SM) oraz związków takich jak bilirubina, kwas karboksy-metylo-propylo-furanopropanowy, benzotiazolein i piperyna. Z kolei w porównaniu z grupą kontrolną w grupie pacjentów z MM odnotowano wzrost poziomu karnityn, fosfatydyloetanoloamin (PE) oraz związków takich jak bilirubina, kwas karboksy-metylo-propylo-furanopropanowy i benzotiazolein. W obu grupach (MGUS i MM), gdy porównywano je ze zdrowymi uczestnikami badania, obserwowano zmniejszone poziomy związków z grupy lizofosfatydyloinozytoli (LPI), kwasu eikozapentaenowego (EPA), kwasu arachidonowego oraz niejednoznaczną tendencję zmian w poziomie fosfatydylocholin (PC), lizofosfatydylocholin (LPC) i lizofosfatydyloetanoloamin (LPE). Dodatkowo, w przeciwieństwie do porównania MGUS vs. grupa kontrolna, w grupie MM odnotowano spadek poziomu SM. W ostatnim porównaniu (MM vs. MGUS) stwierdzono zmniejszenie poziomu karnityn, SM, LPI, LPC, PC, PE, bilirubiny oraz EPA – wyjątek stanowiły PC (34:3), PE (16:0/18:2), LPE (16:0), których poziom wzrastał wśród chorych z MM w porównaniu z pacjentami z MGUS.

Obserwowane zmiany poziomu zidentyfikowanych metabolitów związane są ze zmianami metabolizmu komórkowego klonalnych plazmocytoów, na przykład ze zwiększonym zapotrzebowaniem energetycznym, syntezą błon komórkowych, aktywacją enzymów i produkcją pronowotworowych metabolitów czy procesami zapalnymi sprzyjającymi karcynogenezie i lekoopornością komórek nowotworowych.

Powyższe badanie pozwoliło na określenie istotnych różnic w profilach metabolomicznych w poszczególnych grupach badanych (MGUS, MM, grupa kontrolna). Informacje te nie tylko mogą zostać wykorzystane w procesie diagnostyki i monitorowania pacjentów oraz ich stratyfikacji, lecz także mogą w przyszłości umożliwić wyodrębnienie grupy pacjentów z MGUS, u których należałoby rozważyć wcześniejsze włączenie leczenia przeciwnowotworowego oraz posłużyć do określenia nowych punktów uchwytu leków w terapii MM.

SUMMARY

Plasma cell dyscrasias are a group of diseases whose common feature is production of a homogeneous protein known as monoclonal protein by a single clone of plasma cells. One of the more frequently observed diseases from this group is multiple myeloma (MM), a neoplasm associated with a clonal proliferation of plasma cells. Clinical course of MM varies considerably. The introduction of new drugs into the treatment standards caused an increase in the percentage of patients responding to treatment. Nevertheless, the disease is still considered incurable.

The development of symptomatic MM that requires treatment is preceded by the occurrence of a premalignant condition defined as monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). This condition is asymptomatic and often discovered incidentally during the diagnostic process of other diseases. Although occurrence of MGUS precedes development of plasma cell dyscrasia, its presence does not always determine the onset of the disease.

A relatively new field of science is metabolomics, which aims to characterize the metabolome, i.e. the complete set of metabolites or small molecule chemicals involved in biological processes occurring in the cell. Metabolomic studies are used in hemato-oncology to determine the usefulness of the method for earlier diagnosis of cancer, selection of patients for clinical trials, determination of biomarkers of response to treatment, as well as identification of potential markers of malignant transformation and aggressive course of the disease, which could play a role in qualifying patients for early treatment.

The aim of the study was to determine the metabolic profiles of patients with selected plasma cell dyscrasias: MGUS and multiple myeloma. An additional objective was to identify potential biomarkers of MGUS progression to MM.

A total of 100 people participated in the study. The study group consisted of patients of the Hematology Department of the University Clinical Hospital in Białystok with newly diagnosed MGUS (30 patients) and multiple myeloma (50 patients) at various stages of the disease during the collection of the material. Both groups were similar in terms of median age. The control was a group of healthy people matched in terms of sex and age - blood donors and volunteers (20 people).

The study design was to obtain a venous blood sample from fasting patients during routine morning diagnostic examinations. The obtained material, after initial processing, was evaluated using a liquid chromatograph coupled with a sensitive mass detector (LC-QTOF-MS) using a non-targeted analysis method (metabolomic fingerprinting).

After initial data processing by LC-MS, 751 metabolic features were obtained. Taking into account the experimental weight and obtained fragmentation spectra and comparing them to the molecular weights and reference spectra in Internet databases it was possible to identify 104 compounds that differentiated metabolomic profiles of patients in particular groups.

In the MGUS group, compared to the control group, an increase in the level of identified compounds from the group of carnitines and sphingomyelins (SM) and compounds such as bilirubin, carboxy-methyl-propyl-furanopropanoic acid, benzothiazolethion and piperine was observed. Compared to the control group, in the group of patients with MM, an increase in the level of carnitines, phosphatidylethanolamines (PE) and compounds such as bilirubin, carboxy-methyl-propyl-furanopropanoic acid and benzothiazolethion was observed. In both groups (MGUS and MM) when compared with healthy study participants decreased levels of lysophosphatidylinositols (LPI), eicosapentaenoic acid (EPA), arachidonic acid and an inconclusive trend of changes in the levels of phosphatidylcholines (PC), lysophosphatidylcholines (LPC) and lysophosphatidylethanolamines (LPE) were observed. Additionally, unlike MGUS vs. control group, in the MM group there was a decrease in the level of SM. In the last comparison (MM vs. MGUS), a decrease in the level of carnitines, SM, LPI, LPC, PC, PE, bilirubin and EPA was found - the exceptions were PC (34:3), PE (16:0/18:2), LPE (16:0), the level of which increased among patients with MM compared to patients with MGUS.

The observed changes in the level of identified metabolites are associated with changes in the cellular metabolism of clonal plasma cells, for example with increased energy demand,

synthesis of cell membranes, activation of enzymes and production of pro-cancer metabolites or inflammatory processes that promote carcinogenesis and drug resistance of cancer cells.

The above study allowed to determine significant differences in metabolomic profiles in individual study groups (MGUS, MM, control group). This information can not only be used in the process of diagnosing and monitoring patients and their stratification, but also enable the identification of a group of patients with MGUS among whom early anti-cancer treatment should be considered as well as be used to determine new targets for drugs in MM therapy.

PIŚMIENNICTWO

1. Dmoszyńska A: Dyskrazje plazmocytowe. Medical Tribune Polska; https://podyplomie.pl/wiedza/wielka-interna/697,dyskrazje-plazmocytowe#Szpiczak_plazmocytowy (accessed 24.05.2022).
2. Zhou L, Yu Q, Wei G, Wang L, Huang Y, Hu K et al. Measuring the global, regional, and national burden of multiple myeloma from 1990 to 2019. *BMC Cancer*. 2021 May 25;21(1):606.
3. Lawrence L: Multiple Myeloma Incidence Increasing Worldwide, Especially in the US. Cancer Network; <https://www.cancernetwork.com/view/multiple-myeloma-incidence-increasing-worldwide-especially-us> (accessed 24.05.2022).
4. Ludwig H, Novis Durie S, Meckl A, Hinke A, Durie B. Multiple Myeloma Incidence and Mortality Around the Globe; Interrelations Between Health Access and Quality, Economic Resources, and Patient Empowerment. *Oncologist*. 2020 Sep;25(9):e1406-e1413.
5. Giannopoulos K, Jamroziak K, Usnarska-Zubkiewicz L, Dominik D, Jurczyszyn A, Walewski J et al: Zalecenia Polskiej Grupy Szpiczakowej dotyczące rozpoznawania i leczenia szpiczaka plazmocytoowego oraz innych dyskrazji plazmocytoowych na rok 2021. Polska Grupa Szpiczakowa; <http://szpiczak.org/wp-content/uploads/aktualnosci/2021/ZALECENIA-2021-PGSZ.pdf> (accessed 24.05.2022).
6. Ribatti D. A historical perspective on milestones in multiple myeloma research. *Eur J Haematol*. 2018 Mar;100(3):221-228.
7. Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, van Duin M, Sonneveld P, Mateos MV et al. Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Jul 20;3:17046.
8. Kazandjian D. Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy. *Semin Oncol*. 2016 Dec;43(6):676-681.
9. Carr JH, Rodak BF: Różnicowanie i dojrzewanie szeregu limfocytarnego. In: Dąbrowska M, editor. Atlas hematologii klinicznej. 1st ed. Wrocław: Elsevier Urban & Partner; 2011. 81-90.
10. Pawlyn C, Davies FE. Toward personalized treatment in multiple myeloma based on molecular characteristics. *Blood*. 2019 Feb 14;133(7):660-675.

11. Rajkumar SV. Updated Diagnostic Criteria and Staging System for Multiple Myeloma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2016;35:e418-23.
12. Kyle RA, Durie BG, Rajkumar SV, Landgren O, Blade J, Merlini G et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia*. 2010 Jun;24(6):1121-7.
13. Jurczynszyn A, Davila J, Kortüm KM, Jayabalan DS, Vij R, Fiala M et al. Multiple myeloma in patients up to 30 years of age: a multicenter retrospective study of 52 cases. *Leuk Lymphoma*. 2019 Feb;60(2):471-476.
14. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2020 May;95(5):548-567.
15. Sobol H, Vey N, Sauvan R, Philip N, Noguchi T, Eisinger F. Re: familial multiple myeloma: a family study and review of the literature. *J Natl Cancer Inst*. 2002 Mar 20;94(6):461-2; author reply 463.
16. Schinasi LH, Brown EE, Camp NJ, Wang SS, Hofmann JN, Chiu BC et al. Multiple myeloma and family history of lymphohaematopoietic cancers: Results from the International Multiple Myeloma Consortium. *Br J Haematol*. 2016 Oct;175(1):87-101.
17. Alexander DD, Mink PJ, Adami HO, Cole P, Mandel JS et al. Multiple myeloma: a review of the epidemiologic literature. *Int J Cancer*. 2007;120 Suppl 12:40-61.
18. Birmann BM, Giovannucci E, Rosner B, Anderson KC, Colditz GA. Body mass index, physical activity, and risk of multiple myeloma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007 Jul;16(7):1474-8.
19. Eslick R, Talaulikar D. Multiple myeloma: from diagnosis to treatment. *Aust Fam Physician*. 2013 Oct;42(10):684-8.
20. Oyajobi BO. Multiple myeloma/hypercalcemia. *Arthritis Res Ther*. 2007;9 (Suppl 1):S4.
21. Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Gavriatopoulou M, Dimopoulos MA. Pathogenesis of bone disease in multiple myeloma: from bench to bedside. *Blood Cancer J*. 2018 Jan 12;8(1):7.

22. Nassar S, Kaufman GP, Taher A, Madewell JE, Mujtaba B: Myeloma and Leukemia. In: Silverman P, editor. *Oncologic Imaging: A Multidisciplinary Approach*. 2nd ed. Elsevier; 2022. 502-528.
23. Dispenzieri A, Kyle RA. Neurological aspects of multiple myeloma and related disorders. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2005;18(4):673-88.
24. Mai EK, Haas EM, Lücke S, Löpprich M, Kunz C, Pritsch M et al. A systematic classification of death causes in multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2018 Mar 8;8(3):30.
25. Hari PN, Zhang MJ, Roy V, Pérez WS, Bashey A, To LB et al. Is the International Staging System superior to the Durie-Salmon staging system? A comparison in multiple myeloma patients undergoing autologous transplant. *Leukemia*. 2009 Aug;23(8):1528-34.
26. Wallington-Beddoe CT, Mynott RL. Prognostic and predictive biomarker developments in multiple myeloma. *J Hematol Oncol*. 2021 Sep 23;14(1):151.
27. Rajkumar SV. Multiple myeloma: Every year a new standard? *Hematol Oncol*. 2019 Jun;37 Suppl 1(Suppl 1):62-65.
28. Dimopoulos MA, Moreau P, Terpos E, Mateos MV, Zweegman S, Cook G et al. Multiple Myeloma: EHA-ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-up. *Hemasphere*. 2021 Feb 3;5(2):e528.
29. Wawrzyniak R, Waszczuk-Jankowska M, Struck-Lewicka W, Kaliszan R, Markuszewski MJ. Metabolomika – współczesny trend badawczy w medycynie i farmacji. *Gazeta AMG*. 2018;28(1):14-7.
30. Wishart DS. Metabolomics for Investigating Physiological and Pathophysiological Processes. *Physiol Rev*. 2019 Oct 1;99(4):1819-1875.
31. Klupczyńska A, Dereziński P, Kokot ZJ. Metabolomics in medical sciences - trends, challenges and perspectives. *Acta Pol Pharm*. 2015 Jul-Aug;72(4):629-41.
32. Jacob M, Lopata AL, Dasouki M, Abdel Rahman AM. Metabolomics toward personalized medicine. *Mass Spectrom Rev*. 2019 May;38(3):221-238.
33. Schmidt DR, Patel R, Kirsch DG, Lewis CA, Vander Heiden MG, Locasale JW. Metabolomics in cancer research and emerging applications in clinical oncology. *CA Cancer J Clin*. 2021 Jul;71(4):333-358.

34. Piszcz J, Lemancewicz D, Dudzik D, Ciborowski M. Differences and similarities between LC-MS derived serum fingerprints of patients with B-cell malignancies. *Electrophoresis* 2013; 34(19): 2857-64.
35. Armitage EG, Ciborowski M. Applications of Metabolomics in Cancer Studies. *Adv Exp Med Biol.* 2017;965:209-234.
36. Park J, Shin Y, Kim TH, Kim DH, Lee A. Plasma metabolites as possible biomarkers for diagnosis of breast cancer. *PLoS One.* 2019 Dec 3;14(12):e0225129.
37. Vahabi F, Sadeghi S, Arjmand M, Mirkhani F, Hosseini E, Mehrabanfar M, Hajhosseini R, Iravani A, Bayat P, Zamani Z. Staging of colorectal cancer using serum metabolomics with ¹HNMR Spectroscopy. *Iran J Basic Med Sci.* 2017 Jul;20(7):835-840.
38. Navarrete A, Armitage EG, Musteanu M, García A, Mastrangelo A, Bujak R, López-Casas PP, Hidalgo M, Barbas C. Metabolomic evaluation of Mitomycin C and rapamycin in a personalized treatment of pancreatic cancer. *Pharmacol Res Perspect.* 2014 Dec;2(6):e00067.
39. Piszcz J, Armitage EG, Ferrarini A, Rupérez FJ, Kulczynska A, Bolkun L et al. To treat or not to treat: metabolomics reveals biomarkers for treatment indication in chronic lymphocytic leukaemia patients. *Oncotarget.* 2016 Apr 19;7(16):22324-38.
40. Lodi A, Tiziani S, Khanim FL, Günther UL, Viant MR, Morgan GJ, Bunce CM, Drayson MT. Proton NMR-based metabolite analyses of archived serial paired serum and urine samples from myeloma patients at different stages of disease activity identifies acetylcarnitine as a novel marker of active disease. *PLoS One.* 2013;8(2):e56422.
41. Stockard B, Bhise N, Shin M, Guingab-Cagmat J, Garrett TJ, Pounds S, Lamba JK. Cellular Metabolomics Profiles Associated With Drug Chemosensitivity in AML. *FrontOncol.* 2021 Jun 10;11:678008.
42. Li S, Gao D, Jiang Y. Function, Detection and Alteration of Acylcarnitine Metabolism in Hepatocellular Carcinoma. *Metabolites.* 2019 Feb 21;9(2):36.
43. Flanagan JL, Simmons PA, Vehige J et al. Role of carnitine in disease. *Nutr Metab.* 2010 Apr 7;30.
44. Radin NS. Killing tumours by ceramide-induced apoptosis: a critique of available drugs. *Biochem J.* 2003 Apr 15;371(Pt 2):243-56.

45. Kępka A, Szajda SD, Waszkiewicz N, Płudowski P, Chojnowska S, Rudy M et al. Karnityna: funkcja, metabolizm i znaczenie w niewydolności wątroby u pacjentów w przewlekłym zatruciu alkoholem. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2011 Oct 7;65:645-53.
46. Nizioł J, Bonifay V, Ossoliński K, Ossoliński T, Ossolińska A, Sunner J, Beech I, Arendowski A, Ruman T. Metabolomic study of human tissue and urine in clear cell renal carcinoma by LC-HRMS and PLS-DA. *Anal Bioanal Chem*. 2018 Jun;410(16):3859-3869.
47. Tallima H, Azzazy HME, El Ridi R. Cell surface sphingomyelin: key role in cancer initiation, progression, and immune evasion. *Lipids Health Dis*. 2021 Oct 31;20(1):150.
48. Companioni O, Mir C, Garcia-Mayea Y, LLeonart ME. Targeting Sphingolipids for Cancer Therapy. *Front Oncol*. 2021 Oct 19;11:745092.
49. Wątek M, Piktel E, Barankiewicz J, Sierlecka E, Kościołek-Zgódka S, Chabowska A et al. Decreased Activity of Blood Acid Sphingomyelinase in the Course of Multiple Myeloma. *Int J Mol Sci*. 2019 Nov 30;20(23):6048.
50. Besse L, Besse A, Mendez-Lopez M, Vasickova K, Sedlackova M, Vanhara P et al. A metabolic switch in proteasome inhibitor-resistant multiple myeloma ensures higher mitochondrial metabolism, protein folding and sphingomyelin synthesis. *Haematologica*. 2019 Sep;104(9):e415-e419.
51. Da Silva IDC, de Castro Levatti EV, Pedroso AP, Marchioni DML, Carioca AAF, Colleoni GWB. Biochemical phenotyping of multiple myeloma patients at diagnosis reveals a disorder of mitochondrial complexes I and II and a Hartnup-like disturbance as underlying conditions, also influencing different stages of the disease. *Sci Rep*. 2020 Dec 14;10(1):21836.
52. Steiner N, Müller U, Hajek R, Sevcikova S, Borjan B, Jöhrer K, et al. The metabolomic plasma profile of myeloma patients is considerably different from healthy subjects and reveals potential new therapeutic targets. *PLoS One*. 2018 Aug 10;13(8):e0202045.
53. Mohamed A, Collins J, Jiang H, Molendijk J, Stoll T, Torta F et al. Concurrent lipidomics and proteomics on malignant plasma cells from multiple myeloma patients: Probing the lipid metabolome. *PLoS One*. 2020 Jan 8;15(1):e0227455.
54. Maekawa K, Ri M, Nakajima M, Sekine A, Ueda R, Tohkin M et al. Serum lipidomics for exploring biomarkers of bortezomib therapy in patients with multiple myeloma. *Cancer Sci*. 2019 Oct;110(10):3267-3274.

55. Steiner N, Müller U, Hajek R, Sevcikova S, Borjan B, Jöhrer K et al. The metabolomic plasma profile of myeloma patients is considerably different from healthy subjects and reveals potential new therapeutic targets. *PLoS One*. 2018 Aug 10;13(8):e0202045.
56. Borin TF, Angara K, Rashid MH, Achyut BR, Arbab AS. Arachidonic Acid Metabolite as a Novel Therapeutic Target in Breast Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci*. 2017 Dec 8;18(12):2661.
57. Wang B, Wu L, Chen J, Dong L, Chen C, Wen Z et al. Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther*. 2021 Feb 26;6(1):94.
58. Law SH, Chan ML, Marathe GK, Parveen F, Chen CH, Ke LY. An Updated Review of Lysophosphatidylcholine Metabolism in Human Diseases. *Int J Mol Sci*. 2019 Mar 6;20(5):1149.
59. Zhao Z, Xiao Y, Elson P, Tan H, Plummer SJ, Berk M, Aung PP, Lavery IC, Achkar JP, Li L, Casey G, Xu Y. Plasma lysophosphatidylcholine levels: potential biomarkers for colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Jul 1;25(19):2696-701.
60. Du H, Wang L, Liu B, Wang J, Su H, Zhang T, Huang Z. Analysis of the Metabolic Characteristics of Serum Samples in Patients With Multiple Myeloma. *Front Pharmacol*. 2018 Aug 22;9:884.
61. Lazaris V, Hatziri A, Symeonidis A, Kypreos KE. The Lipoprotein Transport System in the Pathogenesis of Multiple Myeloma: Advances and Challenges. *Front Oncol*. 2021 Mar 26;11:638288.
62. Musolino C, Allegra A, Innao V, Allegra AG, Pioggia G, Gangemi S. Inflammatory and Anti-Inflammatory Equilibrium, Proliferative and Antiproliferative Balance: The Role of Cytokines in Multiple Myeloma. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:1852517.
63. Shah N, Chari A, Scott E, Mezzi K, Usmani SZ. B-cell maturation antigen (BCMA) in multiple myeloma: rationale for targeting and current therapeutic approaches. *Leukemia*. 2020 Apr;34(4):985-1005.
64. Drzazga A, Sowińska A, Koziolkiewicz M. Lysophosphatidylcholine and lysophosphatidylinositol--novel promising signaling molecules and their possible therapeutic activity. *Acta Pol Pharm*. 2014 Nov-Dec;71(6):887-99.

65. Patel D, Witt SN. Ethanolamine and Phosphatidylethanolamine: Partners in Health and Disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:4829180.
66. Dawaliby R, Trubbia C, Delporte C, Noyon C, Ruyschaert JM, Van Antwerpen P, Govaerts C. Phosphatidylethanolamine Is a Key Regulator of Membrane Fluidity in Eukaryotic Cells. *J Biol Chem*. 2016 Feb 12;291(7):3658-67.
67. Tan LT, Chan KG, Pusparajah P, Lee WL, Chuah LH, Khan TM et al. Targeting Membrane Lipid a Potential Cancer Cure? *Front Pharmacol*. 2017 Jan 23;8:12.
68. Stafford JH, Thorpe PE. Increased exposure of phosphatidylethanolamine on the Surface of tumor vascular endothelium. *Neoplasia*. 2011 Apr;13(4):299-308.
69. Yu B, Wang J. Lipidomics Identified Lyso-Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine as Potential Biomarkers for Diagnosis of Laryngeal Cancer. *Front Oncol*. 2021 Jun 28;11:646779.
70. Yamamoto Y, Sakurai T, Chen Z, Inoue N, Chiba H, Hui SP. Lysophosphatidylethanolamine Affects Lipid Accumulation and Metabolism in a Human Liver-Derived Cell Line. *Nutrients*. 2022 Jan 28;14(3):579.
71. Xing J, Zhang L, Duan Z, Lin J. Coordination of Phospholipid-Based Signaling and Membrane Trafficking in Plant Immunity. *Trends Plant Sci*. 2021 Apr;26(4):407-420.
72. Yamamoto Y, Sakurai T, Chen Z, Furukawa T, Gowda SGB, Wu Y et al. Analysis of serum lysophosphatidylethanolamine levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2021 Jan;413(1):245-254.
73. Mohamed A, Collins J, Jiang H, Molendijk J, Stoll T, Torta F et al. Concurrent lipidomics and proteomics on malignant plasma cells from multiple myeloma patients: Probing the lipid metabolome. *PLoS One*. 2020 Jan 8;15(1):e0227455.
74. Wei Y, Wang J, Chen F, Li X, Zhang J, Shen M et al. Serum Abnormal Metabolites for Evaluating Therapeutic Response and Prognosis of Patients With Multiple Myeloma. *Front Oncol*. 2022 Feb 28;12:808290.
75. Arifin SA, Falasca M. Lysophosphatidylinositol Signaling and Metabolic Diseases. *Metabolites*. 2016 Jan 15;6(1):6.

76. Piñeiro R, Falasca M. Lysophosphatidylinositol signaling: new wine from an old bottle. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Apr;1821(4):694-705.
77. Anavi-Goffer S, Irving AJ, Ross RA. Modulation of 1- α -lysophosphatidylinositol/GPR55 MAP kinase signaling by CB2 receptor agonists: identifying novel GPR55 inhibitors. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2016 May 1;27(3):303-10.
78. Rodriguez YI, Campos LE, Castro MG, Aladhami A, Oskeritzian CA, Alvarez SE. Sphingosine-1 Phosphate: A New Modulator of Immune Plasticity in the Tumor Microenvironment. *Front Oncol*. 2016 Oct 17;6:218.
79. Wang P, Yuan Y, Lin W, Zhong H, Xu K, Qi X. Roles of sphingosine-1-phosphate signaling in cancer. *Cancer Cell Int*. 2019 Nov 14;19:295.
80. Andradas C, Blasco-Benito S, Castillo-Lluva S, Dillenburg-Pilla P, Diez-Alarcia R et al. Activation of the orphan receptor GPR55 by lysophosphatidylinositol promotes metastasis in triple-negative breast cancer. *Oncotarget*. 2016 Jul 26;7(30):47565-47575.
81. Sakai M, Kakutani S, Horikawa C, Tokuda H, Kawashima H, Shibata H et al. Arachidonic acid and cancer risk: a systematic review of observational studies. *BMC Cancer*. 2012 Dec 19;12:606.
82. Angelucci A, Garofalo S, Specca S, Bovadilla A, Gravina GL, Muzi P, Vicentini C, Bologna M. Arachidonic acid modulates the crosstalk between prostate carcinoma and bone stromal cells. *Endocr Relat Cancer*. 2008 Mar;15(1):91-100.
83. Shao J, Wang H, Yuan G, Chen Z, Li Q. Involvement of the arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway in the proliferation and invasion of human multiple myeloma cells. *PeerJ*. 2016 Apr 11;4:e1925.
84. Panaroni C, Fulzele K, Soucy R, Mukaihara K, Huang C, Chattopadhyay S et al. Arachidonic Acid Induces Ferroptosis-Mediated Cell-Death in Multiple Myeloma. *Blood* 2018; 132 (Supplement 1): 4498.
85. McCarty MF, DiNicolantonio JJ. Minimizing Membrane Arachidonic Acid Content as a Strategy for Controlling Cancer: A Review. *Nutr Cancer*. 2018 Aug-Sep;70(6):840-850.
86. Fritschi L, Ambrosini GL, Kliewer EV, Johnson KC; Canadian Cancer Registries Epidemiologic Research Group. Dietary fish intake and risk of leukaemia, multiple myeloma, and non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004 Apr;13(4):532-7.

87. Aktaş S, Ercetin P, Altun Z, Kantar M, Olgun N. Safety of Eicosapentaenoic Acid in Cancer Treatment: Effect on Cancer Cells and Chemotherapy in Vitro. *Nutr Cancer*. 2021;73(4):568-571.
88. Rondanelli A, Giacosa A. The Role of Eicosapentaenoic Acid in the Treatment of Cancer Patients. *European Oncological Disease*. 2006;1(2):110-112.
89. Tutino V, De Nunzio V, Caruso MG, Veronese N, Lorusso D, Di Masi M et al. Elevated AA/EPA Ratio Represents an Inflammatory Biomarker in Tumor Tissue of Metastatic Colorectal Cancer Patients. *Int J Mol Sci*. 2019 Apr 25;20(8):2050.
90. Shah BK, Uprety D, Tretheway D. Multiple myeloma presenting with autoimmune hemolytic anemia. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2014 Sep;30(Suppl 1):38-9.
91. Dutta AK. A curious case of hyperbilirubinemia. *Indian J Clin Biochem*. 2012 Apr;27(2):200-1.
92. Luce M, Bouchara A, Pastural M, Granjon S, Szelag JC, Laville M et al. Is 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionate (CMPF) a Clinically Relevant Uremic Toxin in Haemodialysis Patients? *Toxins (Basel)*. 2018 May 18;10(5):205.
93. Irfan A, Batool F, Zahra Naqvi SA, Islam A, Osman SM, Nocentini A et al. Benzothiazole derivatives as anticancer agents. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2020 Dec;35(1):265-279.
94. Tripathi AK, Ray AK, Mishra SK. Molecular and pharmacological aspects of piperine as a potential molecule for disease prevention and management: evidence from clinical trials. *Beni Suef Univ J Basic Appl Sci*. 2022;11(1):16.
95. Gupta SC, Patchva S, Aggarwal BB. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. *AAPS J*. 2013 Jan;15(1):195-218.

SPIS RYCIN

Ryc. 1. Różnicowanie i dojrzewanie szeregu limfocytarnego

Ryc. 2. Etapy transformacji szpiczaka plazmocytoowego

Ryc. 3. Składowe systemy

Ryc. 4. Chromatogram dla danych w jonizacji dodatniej oraz rozmieszczenie QC w modelu PCA dla jonizacji dodatniej

Ryc. 5. Chromatogram dla danych w jonizacji ujemnej oraz rozmieszczenie QC w modelu PCA dla jonizacji ujemnej

Ryc. 6. Wykres OPLS-DA pokazujący podział grup ze względu na kategorię kliniczną

Ryc. 7. Udział acylokarnityn w metabolizmie komórkowym

SPIS TABEL

Tab. 1. Podział dyskrazji plazmocytowych według klasyfikacji Światowej Organizacji Zdrowia (2016)

Tab. 2. Kryteria diagnostyczne oraz warianty szpiczaka plazmocyтового

Tab. 3. Stratyfikacja ryzyka progresji MGUS do MM

Tab. 4. Kryteria uszkodzenia narządowego związanego ze szpiczakiem plazmocyтовым (CRAB)

Tab. 5. Biomarkery nowotworu (SLiM)

Tab. 6. Klasyfikacja Duriego-Salmona uzupełniona o zmiany w badaniach obrazowych (Durie-Salmon Plus Staging)

Tab. 7. Międzynarodowy Indeks Progностyczny (ISS) oraz jego zaktualizowana wersja (R-ISS)

Tab. 8. Stratyfikacja ryzyka w szpiczaku plazmocyтовым opracowana przez ekspertów z Mayo Clinic (mSMART)

Tab. 9. Stratyfikacja ryzyka w szpiczaku plazmocyтовым opracowana przez International Myeloma Working Group

Tab. 10. Charakterystyka grupy kontrolnej i grup badanych w odniesieniu do płci i mediany wieku

Tab. 11. Charakterystyka pacjentów ze szpiczakiem plazmocyтовым (grupa badana MM) w odniesieniu do stopnia zaawansowania choroby wg ISS

Tab. 12. Jony potomne uzyskane w jonizacji pozytywnej i negatywnej charakterystyczne dla danej klasy związków - przykłady

Tab. 13. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MGUS od grupy kontrolnej – karnityny

Tab. 14. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od grupy kontrolnej – karnityny

Tab. 15. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od pacjentów z MGUS – karnityny

Tab. 16. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MGUS od grupy kontrolnej – sfingomieliny

Tab. 17. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od grupy kontrolnej - sfingomieliny

Tab. 18. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od pacjentów z MGUS - sfingomieliny

Tab. 19. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MGUS od grupy kontrolnej – fosfatydylocholiny

Tab. 20. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od grupy kontrolnej – fosfatydylocholiny

Tab. 21. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od pacjentów z MGUS – fosfatydylocholiny

Tab. 22. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MGUS od grupy kontrolnej – lizofosfatydylocholiny

Tab. 23. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od grupy kontrolnej – lizofosfatydylocholiny

Tab. 24. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od pacjentów z MGUS – lizofosfatydylocholiny

Tab. 25. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MGUS od grupy kontrolnej – fosfatydyloetanolaminy

Tab. 26. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od grupy kontrolnej – fosfatydyloetanolaminy

Tab. 27. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od pacjentów z MGUS – fosfatydyloetanolaminy

Tab. 28. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MGUS od grupy kontrolnej – lizofosfatydyloetanolaminy

Tab. 29. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od grupy kontrolnej – lizofosfatydyloetanolaminy

Tab. 30. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od pacjentów z MGUS – lizofosfatydyloetanolaminy

Tab. 31. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MGUS od grupy kontrolnej – lizofosfatydyloinozytole

Tab. 32. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od grupy kontrolnej – lizofosfatydyloinozytole

Tab. 33. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od pacjentów z MGUS – lizofosfatydyloinozytyle

Tab. 34. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MGUS od grupy kontrolnej – pozostałe związki

Tab. 35. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od grupy kontrolnej – pozostałe związki

Tab. 36. Identyfikacja związków istotnych statystycznie różnicujących profile metabolomiczne pacjentów z MM od pacjentów z MGUS – pozostałe związki