

Lek. Krzysztof Ossoliński

Metabolomiczna analiza tkanki, surowicy i moczu w poszukiwaniu potencjalnych biomarkerów raka pęcherza moczowego

Opracowanie jest rozprawą na stopień naukowy doktora nauk medycznych w dyscyplinie nauki medyczne na podstawie cyklu 5 publikacji.

Promotor: dr hab. n. med. Paweł Wiechno

Warszawa 2023

Spis treści

Wykaz skrótów	5
Wykaz publikacji stanowiących podstawę postępowania w sprawie o nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych	7
Aktywność naukowa	8
Dorobek publikacyjny	10
Rozdział 1: Wprowadzenie	13
1.1 Rak pęcherza moczowego: epidemiologia, czynniki ryzyka, histopatologia i aktualne metody diagnostyczne	13
1.1.1 Epidemiologia raka pęcherza moczowego	13
1.1.2 Czynniki ryzyka rozwoju raka pęcherza moczowego	13
1.1.3 Histopatologia nowotworów pęcherza moczowego	14
1.1.4 Grading i staging raka pęcherza moczowego	16
1.1.5 Diagnostyka raka pęcherza moczowego	19
1.1.6 Markery nowotworowe raka pęcherza moczowego	20
1.1.6.1 Wstęp	20
1.1.6.2 Cytologia moczu	21
1.2 Metabolomika: zastosowanie w badaniach nad nowotworami	24
1.3 Metody analizy chemicznej stosowane w metabolomice	24
1.3.1 Spektrometria mas (MS)	27
1.3.1.1 Obrazowanie MS (MSI)	27
1.3.2 Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)	29
1.3.3 Zalety oraz wady poszczególnych metod analizy chemicznej	29
1.3.4 Analiza danych	31
1.3.5 Analiza statystyczna w badaniach metabolomicznych	32
Rozdział 2: Założenia i cel pracy	37
Rozdział 3: Materiały i metody	39
3.1 Protokół badania, przygotowanie materiału	39
Rozdział 4: Wyniki i dyskusja	40
4.1 Analiza metabolomiczna tkanki	40
4.2 Analiza metabolomiczna surowicy	41
4.3 Analiza metabolomiczna moczu	46
Podsumowanie i wnioski	51
Streszczenie	54
Streszczenie po angielsku	56
Piśmiennictwo	58
Załączniki	61

Wykaz skrótów

Skrót	ENG	PL
1H NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance	Spektroskopia protonowa magnetycznego rezonansu jądrowego
AUC	Area Under Curve	Pole pod krzywą
BC	Bladder Cancer	Rak pęcherza moczowego
CIS	Carcinoma in situ	Rak <i>in situ</i>
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	Test immunoenzymatyczny
FC	Fold Change	Zmiana wielkości (w kontekście biologicznym)
FDA	Food and Drug Administration	Agencja Żywności i Leków
FISH	Fluorescent In Situ Hybridization	Fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i>
GC	Gas Chromatography	Chromatografia gazowa
HG	High Grade	Wysoki stopień złośliwości histopatologicznej
HILIC	Hydrophilic-Interaction Liquid Chromatography	Chromatografia cieczowa oddziaływań hydrofilowych
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography	Wysokosprawna chromatografia cieczowa
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry	Spektrometria mas wysokiej rozdzielczości
hTERT	Human Telomerase Reverse Transcriptase	Ludzka odwrotna transkryptaza telomerazy
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	Encyklopedia genów i genomów Kioto
LASIS	Laser Ablation Synthesis in Solution	Laserowa ablacja z syntezą w roztworze
LC	Liquid Chromatography	Chromatografia cieczowa
LG	Low Grade	Niski stopień złośliwości histopatologicznej
MIBC	Muscle Invasive Bladder Cancer	Rak pęcherza moczowego naciekający mięśniówkę
MS	Mass Spectrometry	Spektrometria mas
m/z	mass-to-charge ratio	Stosunek masy do ładunku
MSP	Methylation Specific PCR	Metylo-specyficzny PCR
NMIBC	Non-Muscle Invasive Bladder Cancer	Rak pęcherza moczowego nie naciekający mięśniówkę
NC	Normal Control	Próbka kontrolna (tkanka, mocz lub surowica)
OPLS-DA	Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis	Ortogonalna analiza dyskryminacyjna częściowych najmniejszych kwadratów
PCA	Principal Component Analysis	Analiza głównych składowych
PCR	Polymerase Chain Reaction	Reakcja łańcuchowa polimerazy
PLS-DA	Partial Least Squares Discriminant Analysis	Częściowa analiza dyskryminacyjna metodą najmniejszych kwadratów
ROC Curve	Receiver Operating Characteristic Curve	Krzywa charakterystyki operacyjnej odbiornika

RP-HPLC	Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography	Wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz
RPLC	Reversed Phase Liquid Chromatography	Chromatografia cieczowa odwróconej fazy
RT-PCR	Real-Time Polymerase Chain Reaction	Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym
SCC	Squamous Cell Carcinoma	Rak płaskonabłonkowy
SMPDB	The Small Molecule Pathway Database	Baza danych ścieżek małych cząsteczek
TOF	Time-Of-Flight	Analizator czasu przelotu
TRAP	Telomeric Repeat Amplification Protocol	Protokół powielania powtórzeń telomerowych
UC	Urothelial Carcinoma	Rak urotelialny
VIP	Variable Importance in Projection	Wpływ zmiennej na projekcję

Wykaz publikacji stanowiących podstawę postępowania w sprawie o nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych

1. Ossoliński, K., Ruman, T., Ossoliński, T., Ossolińska, A., Arendowski, A., Kołodziej, A., Płaza-Altamer, A., & Nizioł, J. (2023, March). Monoisotopic silver nanoparticles-based mass spectrometry imaging of human bladder cancer tissue: Biomarker discovery. *Advances in Medical Sciences*, 68(1), 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2022.12.002> **IF = 3.287, punkty MNISW = 100**
2. Nizioł, J., Ossoliński, K., Płaza-Altamer, A., Kołodziej, A., Ossolińska, A., Ossoliński, T., & Ruman, T. (2022, September 7). Untargeted ultra-high-resolution mass spectrometry metabolomic profiling of blood serum in bladder cancer. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19576-9> **IF = 4.997, punkty MNISW = 140**
3. Ossoliński, K., Ruman, T., Copié, V., Tripet, B. P., Nogueira, L. B., Nogueira, K. O., Kołodziej, A., Płaza-Altamer, A., Ossolińska, A., Ossoliński, T., & Nizioł, J. (2022, December). Metabolomic and elemental profiling of blood serum in bladder cancer. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 12(6), 889–900. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2022.08.004> **IF = 14.026, punkty MNISW = 140**
4. Ossoliński, K., Ruman, T., Copié, V., Tripet, B. P., Kołodziej, A., Płaza-Altamer, A., Ossolińska, A., Ossoliński, T., Nieczaj, A., & Nizioł, J. (2023, September). Targeted and untargeted urinary metabolic profiling of bladder cancer. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 233, 115473. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115473> **IF = 3.571, punkty MNISW = 100**
5. Nizioł, J., Ossoliński, K., Płaza-Altamer, A., Kołodziej, A., Ossolińska, A., Ossoliński, T., Nieczaj, A., & Ruman, T. (2023, June 16). Untargeted urinary metabolomics for bladder cancer biomarker screening with ultrahigh-resolution mass spectrometry. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36874-y> **IF = 4.997, punkty MNISW = 140**

Aktywność naukowa

Studia medyczne na kierunku lekarskim ukończyłem w 2013 roku. na Warszawskim Uniwersytecie Medycznym, gdzie podczas studiów stacjonarnych zdobyłem tytuł lekarza.

W trakcie nauki zyskałem niezwykle dobrą możliwość odbycia staży w renomowanych klinikach urologicznych za granicą. We wrześniu 2010 roku miałem przyjemność odbyć staż w Klinice Urologii Uniwersytetu Maksymiliana w Monachium. Rok później, we wrześniu 2011, odbyłem staż w Klinice Urologii Uniwersytetu Wiedeńskiego. W sierpniu i wrześniu 2012 roku miałem okazję odbyć trzeci staż, ponownie w Klinice Urologii Uniwersytetu Maksymiliana w Monachium

Po zakończeniu studiów medycznych rozpocząłem pracę jako lekarz stażysta w Samodzielnym Publicznym Centralnym Szpitalu Klinicznym w Warszawie, gdzie pracowałem od października 2013 do października 2014 roku. Następnie kontynuowałem swoją karierę jako lekarz rezydent urologii w Szpitalu Miejskim im. Jana Pawła II, w Klinicznym Oddziale Urologii i Urologii Onkologicznej w Rzeszowie, od lutego 2015 do lipca 2018 roku.

Kolejnym etapem mojej pracy było stanowisko lekarza rezydenta urologii w SP ZOZ, Szpitalu im. Jana Pawła II w Kolbuszowej, na Oddziale Urologii Ogólnej i Onkologicznej, gdzie pracuję do dziś.

Od 2015 roku jestem członkiem Polskiego, Europejskiego i Amerykańskiego Towarzystwa Urologicznego. To ważne dla mnie, aby być częścią społeczności naukowej i mieć możliwość wymiany wiedzy z innymi specjalistami z tej dziedziny.

W mojej karierze naukowej miałem również okazję uczestniczyć w badaniach naukowych. Od 2015 roku przy współpracy z Wydziałem Chemicznym Politechniki Rzeszowskiej zajmuję się badaniami nad biomarkerami metabolicznymi nowotworów układu moczowego. W badaniach biorą również udział naukowcy z Montana State University i Oklahoma University w Stanach Zjednoczonych oraz Federal University of Ouro Preto w Brazylii, gdzie prowadzone są pomiary z zastosowaniem NMR i ICP-OES.

Jestem współwykonawcą poniższych grantów naukowych finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz Narodowe Centrum Nauki, dotyczących metod poszukiwania biomarkerów raka nerki i raka pęcherza moczowego:

- "Poszukiwanie niskocząsteczkowych biomarkerów nowotworu nerki w osoczu krwi i w moczu z wykorzystaniem techniki AuNPET LDI MS" finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego - Diamentowy Grant nr. 0184/DIA/2016/45
- "Metody LDI MS oraz MSI w poszukiwaniu biomarkerów raka nerki" finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki - OPUS 12, nr UMO-2016/23/B/ST4/00062
- "Poszukiwanie oraz charakterystyka biomarkerów raka pęcherza." finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki - SONATA 14, nr UMO-2018/31/D/ST4/00109

Jestem autorem i współautorem 24 publikacji naukowych z dziedziny urologii cytowanych łącznie 270 razy. Mój h-index (indeks Hirscha) wynosi 10 (źródło: www.google.com/citations?user=...) a

sumaryczny impact factor wynosi 87.53 zaś sumaryczny impact factor publikacji będących przedmiotem pracy doktorskiej wynosi 30.878.

Posługuję się zarówno językiem angielskim jak i niemieckim co potwierdzają uzyskane certyfikaty językowe: First Certificate in English (B2), Certificate in Advanced English (C1) oraz Zertifikat Deutsch (B1). Moje zaangażowanie w rozwój nauki w dziedzinie urologii nie ogranicza się tylko do pracy badawczej. Biorę również udział w licznych szkoleniach i konferencjach w kraju i za granicą. Uważam, że ciągle doskonalenie i nauka są kluczowe dla zawodowego rozwoju.

Dorobek publikacyjny

2012

Ossoliński K., Leczenie kolki nerkowej oraz leczenie ułatwiające wydalanie złożu. Przegląd Urologiczny. 2012/6 (76)

Ossoliński, K; Peller, M; Gilarowska, A; Dybowski, B; Radziszewski, P; Borkowski, A; Total survival after radical cystectomy in patients with urothelial bladder cancer. European Urology Supplements,4,11,91,2012,

2015

Dybowski B, Ossoliński K, Ossolińska A, Peller M, Bres-Niewada E, Radziszewski P. Impact of stage and comorbidities on five-year survival after radical cystectomy in Poland: single centre experience. Cent European J Urol. 2015;68(3):278-83.

2016

Nizioł J, Ossoliński K, Ossoliński T, Ossolińska A, Bonifay V, Sekuła J, Dobrowolski Z, Sunner J, Beech I, Ruman T. Surface-Transfer Mass Spectrometry Imaging of Renal Tissue on Gold Nanoparticle Enhanced Target. Anal Chem. 2016 Jul 19;88(14):7365-71. **IF = 8.008**

Peller M, Balsam P, Głównczyńska R, Ossoliński K, Gilarowska A, Kołtowski Ł, Grabowski M, Filipiak KJ, Opolski G. The impact of physical training on endothelial function in myocardial infarction survivors: pilot study. Kardiol Pol. 2016;74(5):439-46. **IF = 3.71**

2017

Hus K.K., Ossoliński K., Jaromin M., Ossoliński T., Ossolińska A., Dobrowolski Z., Groszek G., Bocian A., Łyskowski A. Comparison of protein isolation methods from clear cell Renal Cell Carcinoma tissue. MicroMed. 2017; 5(1): 12- 16.

2018

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. **IF = 4.478**

Arendowski A, Nizioł J, Ossoliński K, Ossolińska A, Ossoliński T, Dobrowolski Z, Ruman T. Laser desorption/ionization MS imaging of cancer kidney tissue on silver nanoparticle-enhanced target. Bioanalysis. 2018 Jan;10(2):83-94. **IF = 2.695**

Wiechno P., Kucharz J., Sadowska M., Michalski W., Sikora-Kupis B., Jonska-Gmyrek J., Poniatońska G., Nietupski K., Ossolinski K., Demkow T. Contemporary treatment of metastatic renal cell carcinoma. Med Oncol. 2018;35(12):156. **IF = 3.738**

2019

Ossoliński K., Nizioł J., Arendowski A., Ossolińska A., Ossoliński T., Kucharz J., Wiechno P., Ruman T., Mass spectrometry-based metabolomic profiling of prostate cancer - a pilot study. Journal of Cancer Metastasis and Treatment. 2019;5:1 **IF = 1.9**

2020

Nizioł J., Sunner J., Beech I., Ossoliński K., Ossolińska A., Ossoliński T., Płaza A., Ruman T., Localization of Metabolites of Human Kidney Tissue with Infrared Laser-Based Selected Reaction Monitoring Mass Spectrometry Imaging and Silver-109 Nanoparticle-Based Surface Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging. *Anal Chem.* 2020 Mar 17;92(6):4251-4258. **IF = 8.008**

Nizioł J, Ossoliński K, Tripet BP, Copié V, Arendowski A, Ruman T. Nuclear magnetic resonance and surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-based serum metabolomics of kidney cancer. *Anal Bioanal Chem.* 2020;412(23):5827-5841. doi:10.1007/s00216-020-02807-1. **IF = 4.478**

Arendowski A, Ossolinski K, Nizioł J, Ruman T. Screening of urinary renal cancer metabolic biomarkers with gold nanoparticles - assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Sci.* 2020;10.2116/analsci.20P226. doi:10.2116/analsci.20P226. **IF = 1.967**

Wincewicz A, Hińcza K, Ossoliński K, et al. Evaluation of two different mutations in codon 12 of NRAS gene in ulcerated penile mucosal nodular malignant melanoma pT4b of the 90-year-old man in perspective of targeted therapy of NRAS-mutated advanced melanomas. *Dermatol Ther.* 2020;e14115. doi:10.1111/dth.14115. **IF = 3.858**

Arendowski, Adrian, Krzysztof Ossoliński, Joanna Nizioł, and Tomasz Ruman. "Gold Nanostructures - Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry for Kidney Cancer Blood Serum Biomarker Screening." *International Journal of Mass Spectrometry.* Elsevier, July 27, 2020. **IF = 1.934**

Kowalik A, Wincewicz A, Ossoliński K, Zięba S, Kopczyński J, Ossoliński T, Gózdź S, Koda M, Sulkowski S. Review on significance of GDNF, PTCH1 and RNF213 in chromophobe renal cell carcinoma illustrated by the case of 71-years-old man. *Pol J Pathol.* 2020;71(3):195-199. **IF = 0.909**

2021

Nizioł J, Ossoliński K, Tripet BP, Copié V, Arendowski A, Ruman T. Nuclear magnetic resonance and surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-based metabolome profiling of urine samples from kidney cancer patients. *J Pharm Biomed Anal.* 2021 Jan 30;193:113752. doi: 10.1016/j.jpba.2020.113752. Epub 2020 Nov 6. PMID: 33197834. **IF = 3.571**

Arendowski A, Ossoliński K, Ossolińska A, Ossoliński T, Nizioł J, Ruman T. Serum and urine analysis with gold nanoparticle-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for renal cell carcinoma metabolic biomarkers discovery. *Adv Med Sci.* 2021 Sep;66(2):326-335. doi: 10.1016/j.advms.2021.07.003. Epub 2021 Jul 14. PMID: 34273747. **IF = 2.852**

Nizioł J, Copié V, Tripet BP, Nogueira LB, Nogueira KOPC, Ossoliński K, Arendowski A, Ruman T. Metabolomic and elemental profiling of human tissue in kidney cancer. *Metabolomics.* 2021 Mar 4;17(3):30. doi: 10.1007/s11306-021-01779-2. PMID: 33661419; PMCID: PMC7932981. **IF = 4.747**

2022

Ossoliński, K., Ruman, T., Ossoliński, T., Ossolińska, A., Arendowski, A., Kołodziej, A., Płaza-Altamer, A., & Nizioł, J. (2023, March). Monoisotopic silver nanoparticles-based mass spectrometry imaging of human bladder cancer tissue: Biomarker discovery. *Advances in Medical Sciences*, 68(1), 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2022.12.002> **IF = 2.852**

Ossoliński, K., Ruman, T., Copié, V., Tripet, B. P., Nogueira, L. B., Nogueira, K. O., Kołodziej, A., Płaza-Altamer, A., Ossolińska, A., Ossoliński, T., & Nizioł, J. (2022, December). Metabolomic and elemental profiling of blood serum in bladder cancer. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 12(6), 889–900. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2022.08.004> **IF = 14.26**

Nizioł, J., Ossoliński, K., Płaza-Altamer, A., Kołodziej, A., Ossolińska, A., Ossoliński, T., & Ruman, T. (2022, September 7). Untargeted ultra-high-resolution mass spectrometry metabolomic profiling of blood serum in bladder cancer. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19576-9> **IF = 4.997**

2023

Nizioł, J., Ossoliński, K., Płaza-Altamer, A., Kołodziej, A., Ossolińska, A., Ossoliński, T., Nieczaj, A., & Ruman, T. (2023, June 16). Untargeted urinary metabolomics for bladder cancer biomarker screening with ultrahigh-resolution mass spectrometry. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36874-y> **IF = 4.997**

Ossoliński, K., Ruman, T., Copié, V., Tripet, B. P., Kołodziej, A., Płaza-Altamer, A., Ossolińska, A., Ossoliński, T., Nieczaj, A., & Nizioł, J. (2023, September). Targeted and untargeted urinary metabolic profiling of bladder cancer. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 233, 115473. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115473> **IF = 3.571**

Rozdział 1: Wprowadzenie

1.1 Rak pęcherza moczowego: epidemiologia, czynniki ryzyka, histopatologia i aktualne metody diagnostyczne

1.1.1 Epidemiologia raka pęcherza moczowego

Rak pęcherza moczowego (BC) jest drugą po raku prostaty najczęstszą chorobą nowotworową układu moczowego uwzględniając zarówno zapadalność jak i chorobowość. W 2018 roku zdiagnozowano 550 000 nowych przypadków raka pęcherza moczowego na świecie. Pod względem zapadalności jest szóstym najczęstszym nowotworem u mężczyzn, siedemnastym u kobiet oraz dziesiątą co do częstości chorobą nowotworową uwzględniając obie płcie. Standaryzowany wiekowo współczynnik zachorowalności na tę chorobę na świecie wynosi 9.6 na 100 000 dla mężczyzn i 2.4 na 100 000 dla kobiet. W 2018 roku z powodu raka pęcherza moczowego zmarło 200 000 osób, co uplasowało go na trzynastym miejscu pod względem śmiertelności spowodowanej chorobami nowotworowymi na świecie i na drugim miejscu (po raku prostaty) pod względem śmiertelności spowodowanej nowotworami układu moczowego. Standaryzowany wiekowo współczynnik śmiertelności wynosi 3.2 na 100 000 dla mężczyzn i 0.9 na 100 000 dla kobiet. W porównaniu z 2008 rokiem zapadalność na raka pęcherza wzrosła z 5.3 na 100 000 ludności do 5.7 na 100 000 ludności, zaś śmiertelność spadła z 2 na 100 000 ludności do 1.9 na 100 000 ludności [1,2].

1.1.2 Czynniki ryzyka rozwoju raka pęcherza moczowego

1.1.2.1 Wiek, płeć, rasa,

Według danych American Cancer Society mężczyźni są 3-4 razy bardziej narażeni na rozwój raka pęcherza moczowego niż kobiety, prawdopodobnie z powodu zwiększonego odsetka palaczy tytoniu oraz narażenia na działanie toksyn środowiskowych. W swoim życiu mężczyźni mają 3.8% szansy na rozwój raka pęcherza moczowego i jest to 3-krotnie większe prawdopodobieństwo niż w przypadku kobiet. Zapadalność osób z białym kolorem skóry jest 2-krotnie wyższa niż w przypadku Afroamerykanów i Azjatów. Najwyższa śmiertelność spowodowana rakiem pęcherza moczowego dotyczy białych mężczyzn. Średnio mężczyźni mają 3-krotnie większą śmiertelność niż kobiety a osoby z białym kolorem skóry 1.5 raza większą w porównaniu z Afroamerykanami i 3 razy większą w porównaniu z Azjatami.

Wiek również w istotnym stopniu wpływa na prawdopodobieństwo zachorowania na raka pęcherza moczowego. Osoby obu płci z przedziału 0-49 lat mają 0.1% ryzyka zachorowania, 50-59 lat - 0.2%, 60-69 lat - 0.5%, ponad 70 lat - 2.2%. W przeciwieństwie do wielu innych nowotworów u osób młodszych (poniżej 40 roku życia) występuje tendencja do rozwoju mniej agresywnego raka pęcherza moczowego [3,4].

1.1.2.2 Czynniki genetyczne

Obserwuje się 2-krotne zwiększone ryzyko rozwoju choroby u krewnych pierwszego stopnia chorych na raka pęcherza moczowego. Uważa się, że w przeciwieństwie do postaci dziedzicznych nowotworów, rak pęcherza moczowego jest wielogenową chorobą

nowotworową spowodowaną wieloma genami o niskiej penetracji bez wyraźnych cech dziedziczenia mendlowskiego [5].

1.1.2.3 Palenie tytoniu

Palenie tytoniu jest najważniejszym czynnikiem ryzyka rozwoju raka pęcherza moczowego i szacuje się, że odpowiada za 50 % jego wszystkich przypadków. Dym tytoniowy zawiera ponad 60 różnych substancji rakotwórczych i uważa się, że palenie ma związek z powstawaniem co najmniej 18 różnych nowotworów. Związki tj. aromatyczne aminy (β -naftyloamina) oraz policykliczne aromatyczne węglowodory wydalone są przez nerki i wywierają kancerogeny wpływ na cały układ moczowy. Ryzyko rozwoju raka pęcherza moczowego u palaczy jest 2-4 krotnie większe niż u nie-palaczy a intensywność i czas trwania palenia są wprost proporcjonalne do wzrostu ryzyka. Co istotne ryzyko rozwoju raka pęcherza moczowego zmniejsza się z czasem od momentu rzucenia nałogu jednak nie osiąga poziomu populacyjnego. Szacuje się, że nawet 20 lat po rzuceniu nałogu ryzyko nadal jest 2-krotnie większe. Palenie wpływa również na częstość nawrotów oraz ryzyko progresji do raka pęcherza naciekającego mięśniówkę [6,7].

1.1.2.4 Narażenie zawodowe

Zawodowe narażenie na kancerogeny, po paleniu tytoniu, uznawane jest za drugi najważniejszy czynnik etiologiczny powstawania raka pęcherza moczowego. Około 20% przypadków związane jest z narażeniem na takie czynniki jak aminy aromatyczne, policykliczne aromatyczne węglowodory, węglowodory chlorowane, które powstają w przemyśle barwiarskim, gumowym, metalowym, petrochemicznym i rafineryjnym [6]. Uważa się, że istnieje długi okres karencji wynoszący 10-20 lat pomiędzy narażeniem na kancerogeny przemysłowe a powstaniem raka pęcherza moczowego [6,8].

1.1.2.6 Zapalenie pęcherza moczowego

Najbardziej wyraźny związek pomiędzy przewlekłym zapaleniem pęcherza moczowego a ryzykiem rozwoju raka obserwuje się w wyniku zakażenia *Schistosoma haematobium* i *Schistosoma mansoni*. Endemicznym miejscem występowania tych przywr jest Egipt. W latach 60 XX wieku ogólna częstość występowania infekcji wynosiła 40% i zmniejszyła się w 2010 roku do poziomu <0.3% w efekcie rządowej kampanii antybilharzialnej [9]. Mechanizm kancerogenezy w przypadku zakażenia przywrami nie jest całkowicie poznany. Podejrzewa się, że główną rolę odgrywają przewlekły proces zapalny i narażenie na działanie czynników środowiskowych, które mogą generować genotoksyczne substancje w moczu tj. nitrozoaminy. Substancje te są wytwarzane w bardzo wysokiej ilości w moczu pacjentów przewlekle zakażonych *Schistosomą* i są znanym rakotwórczym czynnikiem rozwoju raka pęcherza moczowego.

1.1.3 Histopatologia nowotworów pęcherza moczowego

Prawidłowa budowa pęcherza moczowego składa się z czterech warstw: błony śluzowej, błony podśluzowej, warstwy mięśniowej oraz warstwy surowiczej. Błona śluzowa wyłożona jest przez wyspecjalizowany nabłonek przejściowy zwany urotelium. Jest on wynikiem adaptacji do drażniącego środowiska jakim jest moczu. Składa się z 3-6 warstw komórek.

Istnieją dwa podtypy komórek nabłonka urotelialnego: komórki baldaszkowate, które pokrywają powierzchnię i mają bezpośredni kontakt z moczem oraz komórki leżące u ich podstaw, które stanowią zewnętrzną warstwę. Szczytowa błona komórkowa komórek baldaszkowatych składa się z białkowych płytek zbudowanych z uroplakiny, połączonych zawiasowymi obszarami normalnej błony. Tworzy ona nieprzepuszczalną dla wody i jonów barierę osmotyczną. Warstwa podstawna urotelium opiera się na błonie podstawnej. Pod błoną podstawną znajduje się blaszka właściwa (*lamina propria*) błony śluzowej. Jest to luźna strefa składająca się z tkanki łącznej, zawierającej cienkie i delikatne naczynia krwionośne oraz wiązki gładkich włókien mięśniowych, zwanych warstwą mięśniową śluzówki (*muscularis mucosae*). Jest mocno zróżnicowana, w niektórych miejscach składa się z niekompletnej warstwy włókien mięśni gładkich aż do pełnej warstwy podobnej do tej w jelicie grubym. Tkanka łączna pod warstwą mięśniową śluzówki zawiera arkada większych naczyń krwionośnych. Pod spodem znajduje się właściwa warstwa mięśniowa (*muscularis propria*) składająca się z grubych wiązek włókien mięśniowych i niewielkiej ilości luźnej tkanki łącznej [10].

Rak pęcherza moczowego jest nowotworem złośliwym rozwijającym się zwykle w błonie śluzowej pęcherza moczowego. Najczęstsze typy histopatologiczne tego nowotworu to rak urotelialny, rak płaskonabłonkowy i gruczolakorak.

Rak urotelialny

Rak urotelialny jest najczęstszym typem raka pęcherza moczowego - stanowi około 90% wszystkich przypadków. Ten typ nowotworu powstaje z komórek urotelialnych wyściełających wewnątrz pęcherza moczowego. Głównym kryterium podziału nowotworów pęcherza moczowego jest głębokość naciekania na ścianę pęcherza moczowego. 75% przypadków stanowi tzw. rak pęcherza nienaciekający mięśniówki (non-muscle invasive bladder cancer, NMIBC) i obejmuje błonę śluzową (Ta, CIS) oraz podśluzową (T1). Pozostałe 25% stanowi rak pęcherza moczowego naciekający mięśniówkę (muscle invasive bladder cancer, MIBC). Głębokość naciekania ściany pęcherza jest istotna klinicznie ze względu na wybór metody leczenia oraz fakt, że pacjenci z MIBC znajdują się w grupie najwyższego ryzyka śmiertelności spowodowanej nowotworami złośliwymi. Istnieje kilka wzorców wzrostu raka urotelialnego w tym typ płaski, brodawkowaty (egzofityczny), odwrócony (endofityczny) oraz lity, uszypułowany. NMIBC obejmuje zmiany takie jak rak *in-situ* (Carcinoma in situ, CIS), brodawkczakowaty nowotwór urotelialny o niskim potencjale złośliwości (ang. Papillary Urothelial Neoplasm of Low Malignant Potential, PUNLMP), niskiego stopnia złośliwości rak brodawkczakowy (Low Grade Bladder Cancer, LG BC) oraz wysokiego stopnia złośliwości rak brodawkczakowy (High Grade Bladder Cancer, HG BC) [10,11,12].

Rak płaskonabłonkowy

Rak płaskonabłonkowy pęcherza moczowego jest rzadkim typem, stanowiącym około 1-2% wszystkich nowotworów pęcherza moczowego w Stanach Zjednoczonych i Europie. W Egipcie i Zimbabwie obserwuje się największy odetek płaskonabłonkowych raków pęcherza moczowego na świecie. Wiąże się to z przewlekłym, endemicznym zapaleniem pęcherza moczowego spowodowanym przez przywry z gatunku *Schistosoma*. Drugą populacją szczególnie narażoną na zwiększone ryzyko raka płaskonabłonkowego pęcherza

moczowego są pacjenci po urazie kręgosłupa. Podejrzewa się, że jest to wywołane drażnieniem ściany pęcherza moczowego poprzez przewlekłe cewnikowanie oraz nawracające infekcje [14].

Gruzołakorak

Gruzołakorak to kolejny rzadki typ raka pęcherza moczowego, stanowiący około 1% wszystkich przypadków. Ten typ wywodzi się z komórek gruczołowych pęcherza moczowego. Wyróżnia się dwa rodzaje raków gruczołowych pęcherza moczowego - wywodzące się z moczownika, pasmo tkanki łącznej będące pozostałością omocznia (1/3 przypadków), oraz pierwotne gruczołakoraki pęcherza moczowego (2/3 przypadków) [15,16,17].

Rak drobnokomórkowy

Rak drobnokomórkowy pęcherza moczowego jest bardzo rzadką i agresywną formą raka pęcherza moczowego, która stanowi mniej niż 1% wszystkich nowotworów pęcherza moczowego. Jest to nowotwór neuroendokryny, co oznacza, że zaczyna się w komórkach, które uwalniają hormony w odpowiedzi na sygnały z układu nerwowego. Komórki raka drobnokomórkowego są mniejsze niż większość innych komórek nowotworowych, a ten typ raka jest zwykle bardzo agresywny i często w momencie diagnozy obecne są przerzuty [13].

Inne podtypy histopatologiczne

Istnieje kilka innych podtypów histopatologicznych raka pęcherza moczowego, ale są one niezwykle rzadkie i z reguły bardzo agresywne. Należą do nich odmiany raka urotelialnego takie jak: rak urotelialny z gniazdami (nested variant of urothelial carcinoma), rak urotelialny mikrobrodawkowaty (micropapillary urothelial carcinoma) oraz rak plazmocytoidalny (plasmocytoid urothelial carcinoma) [10,13]. Wyróżnia się również raki sarkomatoidalne, limfoepitelialne, mięsaki i raki jasnokomórkowe [13]. W Tabeli 1 podsumowano wszystkie postacie histopatologiczne nowotworów pęcherza moczowego.

1.1.4 Grading i staging raka pęcherza moczowego

Celem oceny stopnia zaawansowania raka pęcherza moczowego stosuje się pochodzącą z 2002 roku i zaktualizowaną w 2009 roku klasyfikację TNM. Do oceny zróżnicowania histopatologicznego używa się klasyfikacji Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) z 1973 roku lub zaktualizowanej wersji WHO i International Society of Urological Pathology (IUSP), którą zaproponowano w 1998 roku i którą WHO przedstawiła w 2004 roku. Klasyfikacja ta uwzględnia zarówno zmiany płaskie (hiperplazja, atypia reaktywna, atypia nieznanego charakteru, dysplazja nabłonka urotelialnego i rak śródnabłonkowy CIS), jak i zmiany brodawkowate (brodawczak przejściowokomórkowy, brodawczakowy nowotwór nabłonka o niskim potencjale złośliwości, niskiego stopnia złośliwości brodawczakowy rak nabłonka, wysokiego stopnia złośliwości brodawczakowy rak nabłonka). Większość dotychczasowych badań nad rakiem pęcherza moczowego została przeprowadzona z zastosowaniem klasyfikacji WHO z 1973 roku, w związku z czym Europejskie Towarzystwo Urologiczne (European Association of Urology - EAU) zaleca stosowanie obydwu klasyfikacji WHO do czasu sprawdzenia prognostycznej roli klasyfikacji WHO z 2004 roku. W 2016 roku

opublikowano nową klasyfikację WHO nowotworów pęcherza moczowego z niewielkimi zmianami w stosunku do klasyfikacji z 2004 roku [18]. Tabele 2 i 3 podsumowują grading i staging raka pęcherza moczowego.

Tabela 1. Histopatologiczne postacie nowotworów pęcherza moczowego (WHO 2004).*

<p>Nowotwór urotelialny</p> <ul style="list-style-type: none"> - Łagodny <ul style="list-style-type: none"> Brodawczak urotelialny Odwrócony brodawczak - Brodawczakowy nowotwór urotelialny o niskim potencjale złośliwości - Brodawczak złośliwy <ul style="list-style-type: none"> Rak brodawczakowy, niski potencjał złośliwości Rak brodawczakowy, wysoki potencjał złośliwości Rak brodawczakowy z różnicowaniem płaskonabłonkowym lub gruczolowym - Złośliwy, nie-brodawczakowy <ul style="list-style-type: none"> Płaski rak in situ Rak naciekający Odmiany raka naciekającego <ul style="list-style-type: none"> Z gniazdami Drobnokanalikowy Mikrotorbielowaty Odwrócony Z różnicowaniem płaskonabłonkowym Z różnicowaniem gruczolowym Mikrobrodawkowaty Rak mięsakowaty Rak jasnokomórkowy Plazmocytoidalny Z syncytiotrofoblastem Z nietypowym odczynem zrębu Zrąb pseudomięsakowaty <ul style="list-style-type: none"> Zrąb kostny lub metaplasja chrzęstnokomórkowa Rak olbrzymiokomórkowy, typ osteoklastyczny Z zaznaczonym naciekiem limfoidalnym 	<p>Rak płaskonabłonkowy</p> <ul style="list-style-type: none"> Typ zwykły Odmiana Brodawkowaty Bazaloidalny Z cechami mięsaka <p>Gruczolakorak</p> <ul style="list-style-type: none"> Typ jelitowy Śluzowy Z komórek sygnetywowych Jasnokomórkowy <p>Rak hepatoidalny</p> <p>Gruczolakorak, niesklasyfikowany inaczej</p> <p>Guz składający się z mieszanych komórek</p> <p>Raki nieodróżnicowane</p> <ul style="list-style-type: none"> Rak drobnokomórkowy Rak wielkokomórkowy, neuroendokryny Rak typu nabłoniaka limfatycznego <p>Rak olbrzymiokomórkowy</p> <p>Raki nieodróżnicowane</p> <p>Przerzut</p>
<p>*Opracowano na podstawie: Lopez-Beltran A. Bladder cancer: clinical and pathological profile. Scand J Urol Nephrol Suppl 2008;218:95–109.</p>	

Tabela 2. Klasyfikacja WHO raka pęcherza moczowego*.

Klasyfikacja WHO z 1973 roku

Brodawczak urotelialny (*Urothelial papilloma*)

Stopień 1: dobrze zróżnicowany (*Grade 1: well differentiated*)

Stopień 2: średnio zróżnicowany (*Grade 2: moderately differentiated*)

Stopień 3: słabo zróżnicowany (*Grade 3: poorly differentiated*)

Klasyfikacja WHO z 2004 roku

Zmiany płaskie

Hiperplazja (zmiany płaskie bez atypii lub wyglądu brodawczakowatego)
(*Urothelial proliferation of uncertain malignant potential*)

Atypia reaktywna (płaskie zmiany z atypią) (*Reactive atypia*)

Atypia nieznanego charakteru (*Atypia of unknown significance*)

Dysplazja nabłonka urotelialnego (*Urothelial dysplasia*)

Rak śródnabłonkowy CIS (zawsze high grade) (*Urothelial CIS*)

Zmiany brodawczakowate

Brodawczak urotelialny (zmiana całkowicie łagodna) (*Urothelial papilloma*)

Brodawczakowaty nowotwór urotelialny o niskim potencjale złośliwości
(*Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential - PUNLMP*)

Niskiego stopnia złośliwości rak brodawczakowy (*Low grade (LG) papillary urothelial carcinoma*)

Wysokiego stopnia złośliwości rak brodawczakowy (*High grade (HG) papillary urothelial carcinoma*)

*Opracowano na podstawie wytycznych postępowania dotyczących raka pęcherza moczowego Europejskiego Towarzystwa Urologicznego, tłumaczenie Polskiego Towarzystwa Urologicznego.

Tabela 3. Klasyfikacja TNM raka pęcherza moczowego*.

T - Guz pierwotny

TX	Brak możliwości oceny guza pierwotnego
T0	Brak guza pierwotnego
Ta	Nienaciekający rak brodawczakowaty
Tis	Rak śródnabłonkowy (<i>in situ</i>)
T1	Guz nacieka podnabłonkową tkankę łączną
T2	T2a Guz nacieka połowę wewnętrznej warstwy mięśniowej
	T2b Guz nacieka całą mięśniówkę
T3	T3a Guz nacieka mikroskopowo tkankę okołopęcherzową
	T3b Guz nacieka makroskopowo tkankę okołopęcherzową
T4	T4a Guz nacieka stercz, macicę i pochwę
	T4b Guz nacieka ścianę miednicy lub powłoki brzuszne

N - Węzły chłonne

NX	Brak możliwości oceny regionalnych węzłów chłonnych
N0	Brak przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych
N1	Przerzut do pojedynczego węzła chłonnego w obrębie miednicy właściwej
N2	Przerzut do wielu węzłów chłonnych w obrębie miednicy właściwej
N3	Przerzut do jednego lub wielu węzłów chłonnych biodrowych wspólnych

M - Przerzuty

MX	Brak możliwości ocen odległego przerzutu
M0	Brak przerzutów odległych
M1	Przerzuty odległe

*Opracowano na podstawie wytycznych postępowania dotyczących raka pęcherza moczowego Europejskiego Towarzystwa Urologicznego, tłumaczenie Polskiego Towarzystwa Urologicznego.

1.1.5 Diagnostyka raka pęcherza moczowego

Najczęstszym objawem raka pęcherza moczowego jest krwimocz i występuje on u 85% pacjentów z nowo rozpoznany guzem pęcherza moczowego. Bezobjawowy krwinkomocz pojawia się niemal u wszystkich pacjentów. Definiowany jest przez Amerykańskie Towarzystwo Urologiczne (AUA) jako obecność ≥ 3 erytrocytów w mikroskopowej ocenie osadu moczu w dwóch z trzech prawidłowo pobranych próbek moczu. Ocenia się, że niesie ze sobą 5,4% ryzyka obecności nowotworu układu moczowego i 4,1% ryzyka obecności guza pęcherza moczowego [19]. Z tego względu AUA zaleca pełne badanie jak w przypadku krwimocz z uwzględnieniem tomografii komputerowej, cystoskopii i badania cytologicznego moczu [20]. Nowotwory pęcherza moczowego zwykle nie powodują bólu oraz rzadko współwystępują z objawami pochodzącymi z dolnych części układu moczowego. Wyjątkiem jest CIS, który może dawać podrażnieniowe objawy ze strony dolnych dróg moczowych, tj. parcia naglące i częstomocz.

Każda diagnostyka krwimocz powinna obejmować sumiennie zebrany wywiad dotyczący czynników ryzyka raka pęcherza moczowego, w tym palenia tytoniu, informacji na temat miesiączki, obecności dodatkowych objawów, tj. bólu czy pieczenia przy oddawaniu moczu oraz informacji na temat niedawno przebytych zabiegów urologicznych i ginekologicznych.

Celem wstępnej oceny pacjenta z krwimoczem wykorzystuje się przezbrzuszne badanie ultrasonograficzne. Pozwala ono na wykrycie zmian ogniskowych w nerkach, wpuklający się do światła pęcherza moczowego guzów oraz wodonercza jako objawu pośredniego w niektórych nowotworach układu moczowego. Ograniczenia diagnostyki przy użyciu ultrasonografu wynikają z braku możliwości wykluczenia raka urotelialnego górnych dróg moczowych. Pełna diagnostyka krwimocz powinna obejmować wziernikowanie pęcherza moczowego (cystoskopia), badanie cytologiczne moczu oraz badanie obrazowe górnych i dolnych dróg moczowych (urograficzną tomografię komputerową jamy brzusznej i miednicy). Badanie obrazowe wykonuje się głównie w celu wykrycia nowotworów urotelialnych górnego odcinka dróg moczowych (upper tract urothelial carcinoma, UTUC).

Podstawowym badaniem diagnostycznym w przypadku podejrzenia raka pęcherza moczowego jest cystoskopia. Pozwala ona na uwidocznienie zmiany i pobranie wycinka do badania histopatologicznego. Zwykle wykonywana jest w warunkach ambulatoryjnych przy użyciu sztywnego albo coraz częściej giętkiego cystoskopu. Badanie cystoskopowe uzależnione jest w dużym stopniu od doświadczenia lekarza przeprowadzającego badanie oraz jakości użytego sprzętu. Ocenia się, że 4-27% guzów zostaje pominiętych przy badaniu. Wartość ta wzrasta do 32-77% w przypadku zmian o charakterze CIS [21].

Wraz z postępowaniem technologii i lepszym zrozumieniem zmian metabolicznych zachodzących w nowotworach pęcherza moczowego wprowadzono kilka modyfikacji badania cystoskopowego, które zwiększają jego czułość. Przykładem jest tzw. cystoskopia fluorescencyjna/diagnostyka fotodynamiczna (photodynamic diagnosis, PDD). Metoda ta jest praktycznym przykładem na to, jak zmieniony metabolizm komórek nowotworowych może przyczynić się do poprawy diagnostyki i leczenia nowotworu.

Polega na wykorzystaniu w badaniu cystoskopowym światła niebieskiego po uprzednim wykonaniu wlewki dopęcherzowej ze środkiem fotouczulającym takim jak kwas 5-aminolewulinowy (5-ALA) lub kwas heksaminoalewulinowy (HAL). Wszystkie komórki nabłonka urotelialnego go pochłaniają, jest on jednak nadmiernie gromadzony przez szybko dzielące się komórki nowotworowe (10-krotnie wyższy poziom). Badania wykazały, że wskaźnik wykrywalności guza pęcherza moczowego wynosi 73-96% w przypadku cystoskopii w białym świetle w porównaniu z 90-96% w przypadku cystoskopii fluorescencyjnej. PDD jest szczególnie pomocne w wykrywaniu CIS -wskaźniki wykrywalności wynoszą 23-68% w przypadku cystoskopii w białym świetle w porównaniu z 91-97% w przypadku cystoskopii fluorescencyjnej [22,23].

1.1.6 Markery nowotworowe raka pęcherza moczowego

1.1.6.1 Wstęp

Obecne narzędzia diagnostyczne i prognostyczne stosowane w diagnostyce raka pęcherza moczowego, takie jak cystoskopia i cytologia, mają ograniczenia w zakresie czułości i swoistości. Markery nowotworowe mogłyby stanowić alternatywę dla tego inwazyjnego i kosztownego badania.

Wczesna diagnoza i dokładnie określenie stopnia zaawansowania klinicznego i złośliwości histopatologicznej są kluczowe dla skutecznego leczenia i poprawy wskaźników przeżycia każdego nowotworu w tym raka pęcherza moczowego. Jednym z obiecujących podejść do osiągnięcia tych celów jest identyfikacja i charakterystyka biomarkerów, które są mierzalnymi wskaźnikami procesów biologicznych związanych z chorobą. Biomarkery mogą dostarczyć ważnych informacji na temat mechanizmów rozwoju i progresji raka pęcherza moczowego, a także służyć jako narzędzia diagnostyczne i prognostyczne. Ich znaczenie obejmuje wczesne wykrywanie, gdzie mogą być używane jako nieinwazyjne narzędzia pomagające w identyfikacji raka pęcherza moczowego, nawet zanim pojawią się objawy lub staną się one widoczne w badaniach obrazowych. Wczesne wykrycie może znacznie poprawić wyniki leczenia pacjentów. Co więcej, biomarkery związane z agresywnymi formami raka pęcherza moczowego mogą pomóc klinicyście w stratyfikacji pacjentów na podstawie ich ryzyka, oferując spersonalizowane opcje leczenia. Biomarkery można również wykorzystywać w celu monitorowania skuteczności terapeutycznej i wykrywania wczesnych oznak nawrotu, co ma zastosowanie w nowotworach dróg moczowych, tj. raku prostaty czy rak jądra. Biorąc pod uwagę wysoki wskaźnik nawrotów raka pęcherza moczowego, ma to kluczowe znaczenie.

W erze medycyny spersonalizowanej biomarkery są kluczowe do podejmowania decyzji o wyborze odpowiedniej terapii celowanej. Wraz z głębszym zrozumieniem raka pęcherza moczowego na poziomie molekularnym, pojawiają się terapie ukierunkowane na określone mutacje genetyczne lub nieprawidłowości molekularne związane z rakiem pęcherza moczowego. Przykładem może być ekspresja ligandu programowanej śmierci 1 (PD-L1), którego ekspresja pozwala na dobór leczenia w przerzutowym raku pęcherza moczowego. W przypadku raka pęcherza moczowego zastosowanie biomarkerów może umożliwić wczesne wykrywanie, stratyfikację ryzyka, monitorowanie leczenia i personalizację terapii, prowadząc do poprawy wyników leczenia pacjentów.

Dobry marker nowotworowy powinien charakteryzować się małą inwazyjnością sposobu jego pobierania (najlepiej z moczu lub surowicy), powinien być szybki i łatwy do oznaczenia obiektywny do oceny i interpretacji, o wysokiej czułości i swoistości. Marker raka pęcherza moczowego byłby użyteczny zarówno do badań przesiewowych, jako element diagnostyki pacjentów z krwiomoczem lub innymi objawami sugerującymi raka pęcherza moczowego jak i w celu obserwacji pacjentów z rakiem pęcherza moczowego celem wczesnej identyfikacji nawrotów i zapobieganiu progresji choroby. Ze względu na stosunkowo niską zapadalność na raka pęcherza moczowego, badanie przesiewowe całej populacji nie byłoby opłacalne ekonomicznie [24]. Jednakże screening osób narażonych na znane czynniki rakotwórcze tj. palaczy, pracowników przemysłu barwiarskiego, gumowego, metalowego, petrochemicznego i rafineryjnego oraz osób po radioterapii w obrębie miednicy może być korzystny dla wczesnego wykrywania raka pęcherza moczowego. Taki biomarker miałby również potencjał do zredukowania liczby lub poprawy jakości kontrolnych cystoskopii.

Lokeshwar i wsp. sprecyzowali dokładnie jakie cechy powinien mieć klinicznie użyteczny marker raka pęcherza moczowego, powołując Międzynarodowy Panel Porozumienia ds. Markerów Raka Pęcherza Moczowego (International Consensus Panel on Bladder Tumor Markers) [25]. Po pierwsze idealny marker raka pęcherza moczowego powinien być technicznie prosty do pobrania. Następnie powinien cechować się odpowiednią dokładnością diagnostyczną, co jest określane za pomocą parametrów, takich jak: czułość, swoistość, pole pod krzywą ROC (Area Under Curve, AUC), wartość predykcyjna dodatnia i wartość predykcyjna ujemna. Ostatnim, ale nie mniej ważnym parametrem idealnego markera raka pęcherza moczowego jest jego koszt.

Szacuje się, że pod względem kosztów leczenia i diagnostyki rak pęcherza moczowego należy do najdroższych ze wszystkich nowotworów. Koszt leczenia od momentu diagnozy do śmierci wynosi od 89 000 USD do nawet 202 000 USD. Cystoskopia w połączeniu z badaniem cytologicznym jest podstawowym badaniem we wstępnej diagnostyce, a następnie kontroli pacjenta po leczeniu. W Polsce badanie to wyceniane jest na kwotę około 200 euro zaś w Wielkiej Brytanii to koszt nawet 600 euro [26]. W przypadku guzów o wysokim ryzyku follow-up obejmuje kontrolną cystoskopię co 3 miesiące przez okres 2 lat, a następnie co 6 miesięcy do zakończenia okresu 5-letniego, później raz w roku oraz regularne (co roku) wykonywanie badań obrazowych górnych dróg moczowych (tomografia komputerowa). Jest to więc duże obciążenie zarówno dla pacjenta jak i dla systemu opieki zdrowotnej.

1.1.6.2 Cytologia moczu

Cytologia moczu jest pierwszym i szeroko dostępnym klinicznie markerem raka urotelialnego. Została wprowadzona po raz pierwszy przez Papanicolaou w 1945 roku i polega na poszukiwaniu złuszczonych komórek nowotworowych w moczu lub popłuczynach z pęcherza moczowego. Czułość i swoistość tej metody wynosi odpowiednio 11-76% i >90%. Oznacza to, że dodatni wynik jest niemal diagnostyczny dla nowotworu nabłonkowego w obrębie układu moczowego. Nie wskazuje on jednak na miejsce rozwoju nowotworu - rak może się znajdować zarówno w układzie kielichowo-miedniczkowym, moczowodzie jak i pęcherzu moczowym. Z uwagi na niską czułość badania cytologicznego moczu w przypadku nowotworów o niskim stopniu złośliwości (4-31%) ujemny wynik nie wyklucza obecności nowotworu w drogach moczowych. Wartość cytologii jest duża w

przypadku guzów o wysokim stopniu złośliwości i CIS, ponieważ dochodzi do utraty spójności między komórkami nabłonka co prowadzi do złuszczenia się dużej ilości komórek. Na wynik badania cytologicznego moczu mają wpływ takie czynniki jak doświadczenie oceniającego patologa, łagodne schorzenia w obrębie dróg moczowych, tj. zakażenie dróg moczowych, kamica moczowa a także stan po leczeniu BCG [27].

1.1.6.3 Inne markery raka pęcherza moczowego

W celu zniwelowania ograniczeń aktualnych metod diagnostyki raka pęcherza moczowego prowadzone są badania mające na celu wykrycie biomarkerów występujących w surowicy lub moczu. Związki te mogą odzwierciedlać różne aspekty biologii raka pęcherza moczowego, takie jak zmiany w ekspresji genów, metylacji DNA, ekspresji białek, szlaków metabolicznych i mikrośrodowiska guza. W Tabeli 5 przedstawiono podsumowanie i przegląd komercyjnie dostępnych markerów raka pęcherza moczowego. Żaden z tych markerów nie został jednak zaakceptowany do rutynowej diagnostyki przez towarzystwa urologiczne. Europejskie Towarzystwo Urologiczne wylicza ich główne cechy:

- czułość jest zwykle wyższa kosztem niższej swoistości w porównaniu z cytologią moczu;
- łagodne schorzenia dróg moczowych, tj. infekcje, kamica moczowa i terapia BCG, mogą wpływać na wyniki tych testów;
- niska powtarzalność niektórych testów może być wyjaśniona przez dobór pacjentów oraz skomplikowanymi metodami laboratoryjnymi;
- dodatni wynik badań cytologicznych, UroVysion, NMP22, FGFR 3, TERT i analizy mikrosatelitarnej u pacjentów z negatywnym wynikiem badania cystoskopowego i badania obrazowego górnych dróg moczowych może zidentyfikować pacjentów z większym prawdopodobieństwem nawrotu i progresji choroby nowotworowej;
- cztery z komercyjnie dostępnych biomarkerów z moczu: Cx-Bladder, ADX-Bladder, Xpert Bladder i EpiCheck mają czułość i ujemne wartości predykcyjne porównywalne z badaniem cystoskopowym. Te cztery testy mogą być wykorzystane do zastąpienia i/lub odroczenia cystoskopii, ponieważ mogą zidentyfikować rzadkie nawroty raka pęcherza moczowego nie-naciekającym mięśniówki o wysokim stopniu złośliwości histopatologicznej.

Tabela 5. Komercyjnie dostępne markery nowotworowe raka pęcherza moczowego.

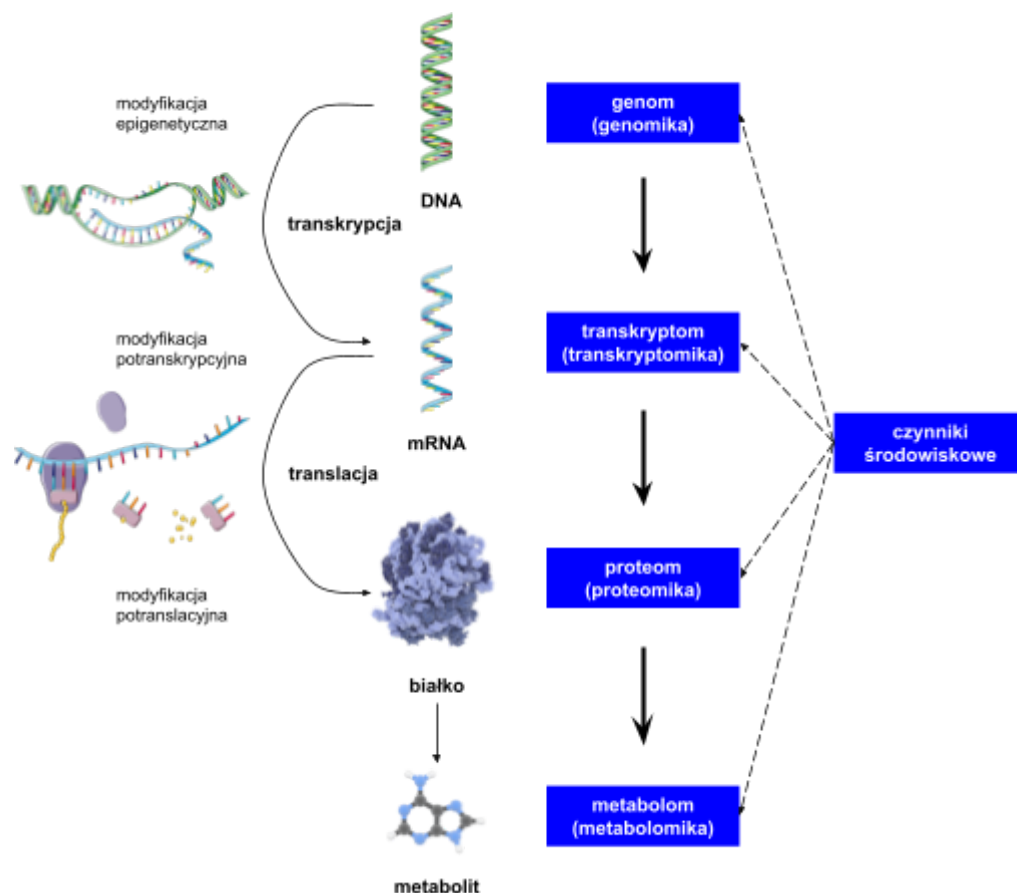
Rodzaj	Nośnik	Marker	Czułość (%)	Swoistość (%)	Wykrywany związek	Typ testu	Rejestracja FDA	Dostępny w Polsce?
białkowe	mocz	BTA-Stat	36-89	50-70	białko związane z czynnikiem H dopełniacza	test przyłóżkowy	follow-up	tak, 120zł
	mocz	BTA-TRAK	57-83	~90	białko związane z czynnikiem H dopełniacza	sandwich ELISA	-	-
	mocz	NMP-22	47-100	55-80	białko jądrowego aparatu mitotycznego (NuMA)	sandwich ELISA	follow-up	-
	mocz		56	86		test przyłóżkowy	diagnostyka follow-up	tak, 130zł
	mocz	BLCA-4	89-96	100	białko macierzy jądrowej	ELISA	-	-
	mocz	Surwiwina	64-100	87-100	białko z rodziny inhibitorów apoptozy	immunoblotting przy użyciu systemu mikrofiltracji BioDot	-	-
	mocz	UBC	36-79	88-92	cytokeratyna 8 i 18	test przyłóżkowy	-	tak, 150zł
	mocz					sandwich ELISA	-	-
	mocz	CYFRA 21-1	75-97	67-71	cytokeratyna 19	test immunoradiometryczny lub ELISA	-	tak, 50zł
oparte na badaniu cytologicznym	mocz	Cytologia	11-76	>90	komórki nowotworowe	badanie mikroskopowe	nd.	tak, 100zł
	mocz	DD23	73-100	33-67	antygen związany z nowotworem, 185-kDa	test immunocytochemiczny	-	-
	mocz	Immunocyt/uCyt+	38-90	73-80	CEA, dwie mucyny związane z komórkami nowotworu pęcherza moczowego	test immunocytochemiczny	follow-up	-
genetyczne	mocz	UroVysion	68-87	>90	aneuploidia chromosomu 3,7,17 delecja locus 9p21	wielokolorowy FISH	diagnostyka follow-up	tak, 1000zł
	mocz	Telomeraza (TRAP)	70-90	60-70	aktywność enzymu - telomerazy	TRAP	-	-
	mocz	CxBladder	82	85	5 fragmentów mRNA: MDK, HOXA13, CDC2, IGFBP5, CXCR2	RT-PCR	-	-
	mocz	AssureMDX	93-97%	83-86%	metylacja genów: OTX1, ONECUT2, TWIST1 mutacji genów: FGFR3, TERT, HRAS	MSP + sekwencjonowanie nowej generacji	-	-
Inne markery, niedostępne komercyjnie.								
genetyczne	mocz	Analiza mikrosatelitarna	72-97	>95	polimorfizm krótkich powtórzeń tandemowych	RT-PCR	-	-
	mocz	Telomeraza (hTERT)	83-95	60-70	hTERT	RT-PCR	-	-
	mocz	Cytokeratyna 20	82-87	55-70	mRNA cytokeratyny 20	RT-PCR	-	-
białkowe	mocz	HA-HAase	88-94	67-71	kwasy hialuronowy i hialuronidaza	ELISA	-	-

1.2 Metabolomika: zastosowanie w badaniach nad nowotworami

Metabolomika jest dziedziną nauki zajmująca się badaniem procesów metabolicznych zachodzących w organizmie poprzez analizę jakościową i ilościową małych cząsteczkowych związków, metabolitów i szlaków biologicznych w których występują. Metabolity zazwyczaj są związkami chemicznymi o masie cząsteczkowej poniżej 1500 Da i należą do nich węglowodany, lipidy, aminokwasy, kwasy tłuszczowe, kwasy organiczne, nukleotydy, sterydy, alkaloidy, witaminy, fenole i wiele innych. Metabolomika, będąca końcowym produktem procesów komórkowych, zapewnia funkcjonalny odczyt biochemii komórkowej i może zaoferować nieoceniony wgląd w fizjologiczny i patologiczny stan organizmu. W kontekście badań nad nowotworami - metabolomika stała się potężnym narzędziem do zrozumienia złożonego biochemicznego krajobrazu komórek nowotworowych i ich mikrośrodowiska. Profil metabolomiczny komórki nowotworowej odzwierciedla przeprogramowane szlaki metaboliczne, które napędzają jej niekontrolowany wzrost, przetrwanie i inwazję, a profile te mogą być wykorzystane do celów diagnostycznych, prognostycznych i terapeutycznych.

Metabolomika wraz z genomiką, transkryptomiką, proteomiką stanowią element tzw. biologii systemowej, zajmującej się badaniem złożonych i skomplikowanych oddziaływań zachodzących w systemach biologicznych (Schemat 1).

Schemat 1. Dziedziny biologii systemowej: genomika, transkryptomika, proteomika i metabolomika



Metabolomika ma szereg teoretycznych przewag nad innymi dziedzinami badania biologii systemów. Jest najszybszym systemem reakcji organizmu na bodźce i zmiany, co najlepiej pozwala na ocenę jego aktualnego stanu. Profil metaboliczny można traktować jako wypadkową reakcji organizmu na czynniki genetyczne, czynniki środowiskowe, aktywność fizyczną, dietę, choroby i zastosowane leczenie. W przeciwieństwie do genów i białek, których funkcje podlegają odpowiednio regulacji epigenetycznej i modyfikacjom potranslacyjnym, metabolity są bezpośrednią sygnaturą aktywności biochemicznej organizmu i są najdokładniejszą reprezentacją fenotypu. Dużą zaletą badań metabolomicznych jest ich stosunkowo niski koszt i możliwość szybkiej analizy.

1.3 Metody analizy chemicznej stosowane w metabolomice

W badaniach metabolomicznych stosowane są głównie dwie podstawowe metody analityczne: spektrometria mas (MS) i spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Obie techniki mają swoje unikalne zalety i ograniczenia, które wpływają na ich zastosowanie w konkretnych scenariuszach badawczych.

1.3.1 Spektrometria mas (MS)

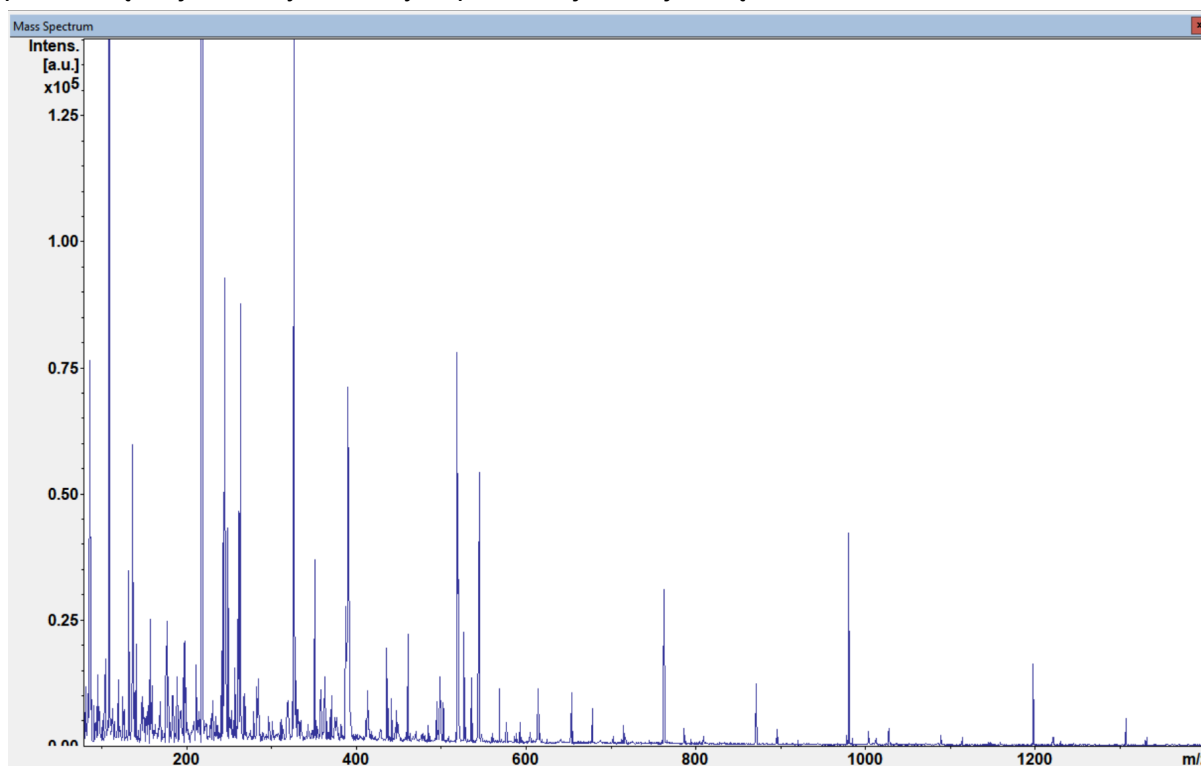
Spektrometria mas to technika powszechnie stosowana w badaniach metabolomicznych z racji na wysoką czułość, szeroki zakres dynamiczny oraz zdolność do analizy dużej liczby metabolitów. W spektrometrii mas metabolity w próbce są jonizowane a następnie rozdzielane na podstawie stosunku masy do ładunku (m/z). Kolejno rozdzielone jony są wykrywane, a powstałe widma masowe analizowane w celu ich identyfikacji i analizy ilościowej.

W spektrometrach mas można wyróżnić kilka etapów analizy spektrometrycznej [32]. Pierwszym jest jonizacja gdzie cząsteczki próbki są przekształcane w naładowane cząsteczki, czyli jony. Często stosowanymi metodami jonizacji są jonizacja w elektrospreju / jonizacja przez elektrorozpylanie (ESI), desorpcja/jonizacja laserowa (LDI) i jonizacja elektronowa (EI). Wybór techniki zależy od takich czynników jak polarność, masa cząsteczkowa i stabilność termiczna cząsteczek próbki. LDI-MS jest techniką najczęściej używaną do badań metabolomicznych - wykorzystuje laser do desorpcji i jonizacji cząsteczek z próbki do analizy. Jego główną zaletą jest możliwość badania próbek, których skuteczność jonizacji jest niska takie jak duże cząsteczki biologiczne. Można ją dostosować do szerokiego zakresu typów próbek i zwykle wymaga minimalnego przygotowania próbki.

Po zjonizowaniu cząsteczek próbki powstałe jony są wprowadzane do analizatora masy. Tam następuje ich rozdzielanie na podstawie stosunku masy do ładunku (m/z). Na rynku dostępne są różne typy analizatorów masy takie jak kwadrupolowy, czasu przelotu (TOF), pułapka jonowa czy też Orbitrap. Każdy ma unikalne zalety i ograniczenia w zakresie dokładności masy, zdolności rozdzielczej i szybkości skanowania. W TOF-MS (Time-of-Flight Mass Spectrometry) jony są przyspieszane do określonej energii kinetycznej i wprowadzane do analizatora masy, gdzie są rozdzielane na podstawie stosunku masy do ładunku (m/z). Po rozdzieleniu jonów w analizatorze masy są one wykrywane przez odpowiedni detektor jak powielacz elektronów lub kubek Faradaya. Detektor generuje sygnał elektryczny proporcjonalny do liczby trafiających do niego jonów. Sygnały te są następnie

przekształcane w widmo masowe które pokazuje intensywność (liczebność) jonów w funkcji wartości m/z . Na Rycinie 1 przedstawiono przykładowe widmo spektrometryczne z analizy tkanki nowotworowej raka pęcherza moczowego. Ostatnim etapem jest analiza danych. Otrzymane widma masowe są analizowane przy użyciu specjalistycznego oprogramowania w celu identyfikacji i analizy ilościowej metabolitów. Może to obejmować wykrywanie sygnałów i przeszukiwanie bazy danych w celu dopasowania obserwowanych wartości m/z wzorów izotopowych i wzorów fragmentacji (dla eksperymentów MS/MS) do znanych związków. Analiza ilościowa analitów jest zwykle osiągnięta przez porównanie intensywności albo powierzchni sygnałów próbki z intensywnością lub powierzchnią wewnętrznych bądź zewnętrznych wzorców.

Rycina 1. Przykładowe widmo spektrometryczne z analizy tkanki nowotworowej pęcherza moczowego. Oś pozioma przedstawia stosunek masy (m) do ładunku (z) jonu (m/z). Oś pionowa przedstawia intensywność (liczba zliczeń danego jonu przez detektor). Sygnały pochodzą od jonów wytworzonych podczas jonizacji związków.



Kluczowe cechy MS to wysoka czułość co oznacza że może wykrywać metabolity w bardzo niskich stężeniach, a to szczególnie przydatne w identyfikacji biomarkerów w stężeniach śladowych. Inną cechą jest szeroki zakres dynamiczny, mianowicie MS może jednocześnie analizować metabolity w szerokim zakresie stężeń w próbce. Dodatkowo MS cechuje wszechstronność co oznacza, że może być sprzężony z różnymi technikami separacji, takimi jak chromatografia cieczowa (LC-MS) lub chromatografia gazowa (GC-MS), w celu uzyskania rozdziału chromatograficznego metabolitów, co poprawia zdolność i parametry detekcji oraz identyfikacji złożonych mieszanin metabolitów.

1.3.1.1 Obrazowanie MS (Mass Spectrometry Imaging, MSI)

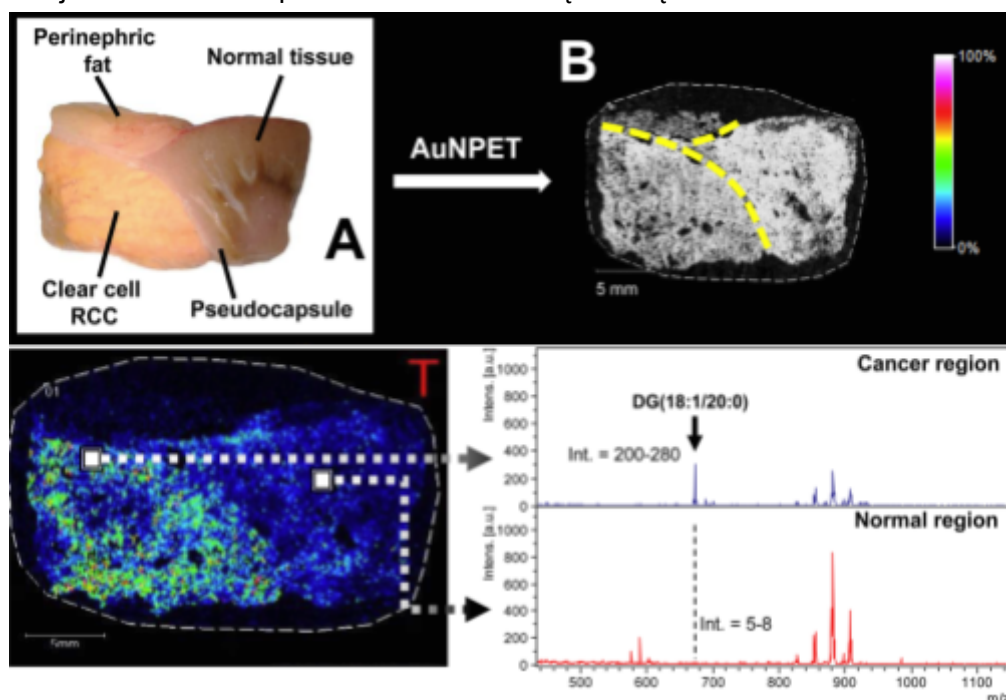
Spektrometria mas wykonywana w instrumentach ze źródłem jonów typu MALDI/SALDI umożliwia dodatkowo przedstawienie rozkładu powierzchniowego wykrytych związków próbki stałej (np. tkanki) w formie graficznej, w postaci tzw. obrazowania MS [33]. Desorpcja/ionizacja laserowa wspomagana matrycą (MALDI) i desorpcja/ionizacja laserowa wspomagana powierzchnią (SALDI) to techniki jonizacji stosowane w spektrometrii mas. Procedura MALDI polega na wykorzystaniu lasera do jonizacji cząsteczek w próbce za pomocą dodatkowo dodawanej do próbki matrycy. Analizowana próbka jest mieszana z odpowiednim materiałem matrycy, a następnie naświetlana laserem. Matryca pochłania energię lasera i pomaga w desorpcji oraz jonizacji cząsteczek próbki. Jony są kolejno przyspieszane do analizatora masy w celu ich wykrycia. Technika ta nadaje się do analizy biomolekuł, takich jak białka, peptydy i polimery, ponieważ powoduje niewielką fragmentację próbki. SALDI jest modyfikacją MALDI, w której zamiast matrycy organicznej do desorpcji/ionizacji laserowej wykorzystywane są powierzchnie nanostrukturalne. Nanostrukturalną powierzchnią mogą być nanocząstki metali, nanorurki węglowe lub inne nanostruktury. Podobnie jak w przypadku MALDI analizowana próbka jest umieszczana na nanostrukturalnej powierzchni, a promieniowanie laserowe powoduje desorpcję i jonizację cząsteczek próbki. Ze względu na zastosowanie nanostrukturalnych powierzchni SALDI często oferuje lepszą odtwarzalność, niższe tło chemiczne na widmie MS i wymaga mniejszych ilości próbek w porównaniu z MALDI [34].

Metoda obrazowania LDI-MS ma kilka zalet, które czynią ją cennym narzędziem, szczególnie w dziedzinie badań biomedycznych. Kluczową siłą LDI-MSI jest jej wysoka rozdzielczość przestrzenna. Pozwala to na graficzne mapowanie rozkładu metabolitów w próbce tkanki, co jest szczególnie pomocne w badaniach nad nowotworami do identyfikacji granic guzów i potencjalnych obszarów przerzutów. LDI-MSI charakteryzuje się również zdolnością do wykrywania szerokiej gamy cząsteczek - od małych metabolitów do większych białek i polipeptydów. Ten szeroki zakres wykrywalności sprawia, że jest to wszechstronny instrument do badania złożonych systemów biologicznych. Kolejną zaletą LDI-MSI jest możliwość jednoczesnego obrazowania wielu cząsteczek w jednym eksperymencie. Ta zdolność jest szczególnie przydatna przy badaniu skomplikowanych układów biologicznych, w których wiele cząsteczek może wchodzić w interakcje. Co więcej, LDI-MSI może dostarczyć danych ilościowych na temat wykrywanych cząsteczek, umożliwiając porównanie pewnych poziomów molekularnych pomiędzy różnymi próbkami tkanek, takimi jak zdrowe i nowotworowe. Wreszcie, technika ta może być nieniszcząca dla próbki poprzez zastosowanie tzw. imprintów - do wykonania analizy tkanki wystarczy tylko odcisk tkanki. Daje to możliwość przeprowadzenia dalszych analiz lub walidacji przy użyciu innych metod na tej samej próbce. Na Schemacie 2 przedstawiono przykładowe zastosowanie obrazowania MS w raku nerki.

Obrazowanie MS może potencjalnie wspomóc w wielu aspektach badania histopatologiczne. Prawidłowa identyfikacja pochodzenia guza jest kluczowa dla spersonalizowanego leczenia. W znacznej liczbie przerzutów nowotworowych, nie udaje się ustalić na podstawie badania histopatologicznego w połączeniu z metodami immunohistochemicznymi pochodzenia guza pierwotnego. Meding i wsp. udowodnili, że za pomocą obrazowania MS, można rozróżnić sześć rodzajów gruczolakoraków (przełyk, piersć, jelito grube, wątroba, żołądek, tarczyca).

Udowodnili również, że dzięki niemu możliwe jest rozróżnienie między przerzutami raka jelita grubego, pierwotnym guzem jelita grubego oraz rakiem wątrobowokomórkowym [30].

Schemat 2. Obrazowanie MS raka jasnokomórkowego nerki i przylegającego zdrowego mięszu nerki z zastosowaniem metody AuNPET SALDI. Intensywność sygnału w przypadku związku zidentyfikowanego jako digliceryd (18:1/20:2) jest około 50 razy większa w rejonie z rakiem w porównaniu ze zdrową tkanką*.



*Nizioł J i wsp. Surface-Transfer Mass Spectrometry Imaging of Renal Tissue on Gold Nanoparticle Enhanced Target. Anal Chem. 2016;88(14):7365-7371.)

Z uwagi na szybkość badania tkanki przy użyciu technologii obrazowania MS (10-30 min) oraz brak potrzeby stosowania dodatkowych barwień, markerów i odczynników może mieć ona zastosowanie w ocenie marginesów chirurgicznych w badaniu śródoperacyjnym. Ocena marginesu chirurgicznego jest rzadko przeprowadzana śródoperacyjnie ze względu na ograniczenia czasowe i małą precyzję takiej oceny. Rutynowe, patologiczne badanie śródoperacyjne nie dostarcza także informacji molekularnych. Pirro i wsp. pokazali, że obrazowanie MS może być użyteczne w śródoperacyjnej ocenie marginesów chirurgicznych - w trakcie resekcji glejaka mózgu (czułość 93%), a pomiary molekularne mogą być szybko wykonywane na tkankach podczas operacji w celu identyfikacji typów tkanek, oceny naciekania nowotworu oraz identyfikacji obecności mutacji prognostycznych poprzez oznaczenie onkometabolitów i fosfolipidów [31].

1.3.2 Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)

Spektroskopia NMR jest kolejną techniką stosowaną w badaniach metabolomicznych. Opiera się na obserwacji zachowania jąder atomowych w polu magnetycznym, co pozwala na identyfikację oraz analizę ilościową metabolitów na podstawie ich odmiennego otoczenia chemicznego i częstotliwości rezonansowych [35].

Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego działa na zasadzie właściwości magnetycznych niektórych jąder, takich jak wodór-1 czy węgiel-13. Gdy próbka jest umieszczona w silnym i jednorodnym polu magnetycznym, jądra te ustawiają się zgodnie z kierunkiem pola magnetycznego, a każde z nich obraca się wokół własnej osi. Przyłożone pole magnetyczne rozdziela poziomy energetyczne wirujących jąder, tworząc różnicę między stanem o niższej energii (zgodnym z kierunkiem polem) a stanem o wyższej energii (niezgodnym z kierunkiem pola). Następnie stosowany jest impuls o częstotliwości radiowej, który odpowiada luce energetycznej między niższymi i wyższymi stanami energetycznymi. Energia ta powoduje, że jądra zmieniają swój stan spinowy, pochłaniając energię i przechodząc do stanu o wyższej energii. Po wyłączeniu impulsu jądra rozluźniają się z powrotem do pierwotnego stanu spinowego, uwalniając energię, którą wcześniej pochłonęły. Energia uwalniana podczas relaksacji, w formie fal radiowych, jest wykrywana przez NMR. Czas potrzebny na relaksację jąder i ilość energii, którą uwalniają, zależą od otoczenia chemicznego każdego jądra i dostarcza szczegółowych informacji o strukturze cząsteczki. Spektrometr NMR wykorzystuje te dane do wygenerowania widma, które można zinterpretować w celu określenia struktury molekularnej próbki. Należy zauważyć, że NMR jest techniką niedestrukcyjną, co oznacza, że próbkę można odzyskać w niezmienionej postaci po zakończeniu pomiarów. Technika ta ma szerokie zastosowanie w takich dziedzinach jak chemia organiczna, chemia medyczna i biochemia. Głównym ograniczeniem analizy NMR jest niższa czułość w porównaniu z MS, co może utrudniać wykrywanie metabolitów o niskim stężeniu.

1.3.3 Zalety i wady poszczególnych metod analizy chemicznej

Spektrometria masowa (MS) i spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) są szeroko stosowane w badaniach metabolomicznych, a każda z metod ma swoje zalety i wady [36,37]. Główną zaletą MS jest wysoka czułość, co oznacza, że może wykryć nawet niewielkie ilości metabolitów w próbce. Połączenie chromatografii ze spektrometrią lub zastosowanie nowoczesnych metod jonizacji, tj. MALDI/SALDI, pozwala na oznaczenie szerszego zakresu metabolitów, które może analizować, w tym polarne, niepolarne i lotne związki. Analiza metabolomiczna oparta na MS może być stosunkowo szybka, co czyni ją odpowiednią do badań na dużą skalę i z udziałem wielu próbek.

MS ma jednak pewne wady. Często wymaga złożonego przygotowania próbki, co może wprowadzić zmienność i potencjalne błędy. Wiele technik MS wymaga wstępnego etapu separacji chromatograficznej, takiego jak chromatografia gazowa lub chromatografia ciekłowa, a to może być czasochłonne i prowadzić do utraty bądź degradacji próbki. Obecność innych związków w matrycy próbki może wpływać na jonizację i wykrywanie metabolitów, powodując tłumienie lub wzmacnianie jonów. Ponadto, aby zidentyfikować i oznaczyć ilościowo metabolity, MS często wymaga znanych standardów referencyjnych. Stanowi to pewne ograniczenie, ponieważ nie wszystkie metabolity mają komercyjnie dostępne standardy.

Spektrometria masowa dostarcza danych o stosunku masy do ładunku (m/z) jonów, które mogą być wykorzystane do wnioskowania o masie cząsteczkowej i elementach strukturalnych związku. Jednak różne związki mogą czasami dawać podobne wartości m/z , co prowadzi do niejednoznaczności. Co więcej, baza danych używana do dopasowywania może nie być całkowicie wyczerpująca, co za tym idzie - mogą istnieć nieznanne związki,

które pasują do obserwowanych danych, ale nie są uwzględnione w bazie danych. Aby jednoznacznie zidentyfikować metabolit, często wymagane są dodatkowe metody identyfikacji. W tym celu stosowana jest tandemowa spektrometria mas (MS/MS) i/lub spektrometria mas o wysokiej albo ultrawysokiej rozdzielczości (HRMS). MS/MS dostarcza informacji strukturalnych o metabolitach, które mogą pomóc w jego identyfikacji, podczas gdy HRMS zapewnia dokładniejsze wartości m/z , które mogą pomóc zawęzić opcje identyfikacji. Eksperymenty tandemowe MS (MS/MS) mogą dostarczyć dodatkowych danych strukturalnych o metabolitach, wspomagając identyfikację i walidację. MS/MS jest dwuetapowym procesem, który pomaga zidentyfikować cząsteczki w oparciu o dodatkowe dane strukturalne niż pojedyncza analiza spektrometrii mas. Pierwszy etap jest podobny do typowego eksperymentu spektrometrii masowej, gdzie cząsteczki są jonizowane i sortowane na podstawie ich stosunku masy do ładunku. Jednakże, w przeciwieństwie do jednostopniowej spektrometrii mas, MS/MS na tym nie kończy. Wykorzystuje niektóre z posortowanych jonów i rozбивa je na mniejsze części, czyli fragmenty. Odbywa się to za pomocą procesu zwanego dysocjacją indukowaną zderzeniem, gdzie jony są przyspieszane i zderzają się z gazem obojętnym, powodując ich rozpad. Te pofragmentowane jony są następnie analizowane w drugim etapie procesu MS/MS. Otrzymane widma dostarczają informacji o strukturze cząsteczek, w tym sekwencji peptydów lub strukturze metabolitu, co może być cenne dla identyfikacji nieznanymi metabolitów albo potwierdzenia identyfikacji danych metabolitów. Dlatego MS/MS jest szeroko stosowany w badaniach proteomiki i metabolomiki.

Z drugiej strony, magnetyczny rezonans jądrowy ma swój unikalny zestaw zalet. Dostarcza szczegółowych informacji strukturalnych o metabolitach, co czyni go doskonałym narzędziem do identyfikacji i charakterystyki nieznanymi związków. NMR pozwala na analizę ilościową metabolitów bez potrzeby stosowania zewnętrznych lub wewnętrznych wzorców, ponieważ intensywność sygnału jest wprost proporcjonalna do stężenia analitu. NMR wymaga zwykle mniej złożonego przygotowania próbki w porównaniu z MS, co zmniejsza potencjał zmienności i błędów systematycznych. Ponadto NMR jest techniką nieniszczącą, co pozwala na odzyskanie próbki po analizie w celu dalszego badania lub zastosowania technik uzupełniających.

Jednakże NMR ma również ograniczenia, np. znacznie niższą czułość w porównaniu z MS, może nie wykryć metabolitów obecnych w niskich stężeniach [28,29]. W praktyce oznacza to możliwość oznaczenia w badanej próbce biologicznej zwykle do 100 związków chemicznych co może utrudniać wykrywanie metabolitów o niskim stężeniu w złożonych próbkach. Dla porównania MS pozwala na oznaczenie w tych samych próbkach ponad 1000 różnych związków [29]. NMR jest bardziej odpowiedni do analizy polarnych i nielotnych metabolitów, podczas gdy jego przydatność do związków niepolarnych i lotnych jest ograniczona. Nakładające się sygnały w złożonych próbkach biologicznych mogą sprawić, że analiza spektralna NMR będzie wyzwaniem, szczególnie w przypadku mieszanin zawierających liczne metabolity. Wysokopolowe spektrometry NMR są drogie w zakupie i wymagają specjalistycznej konserwacji, a to może ograniczać dostępność dla niektórych laboratoriów.

1.3.4 Analiza danych, identyfikacja metabolitów, mapowanie ścieżek metabolicznych

W badaniach metabolomicznych, analiza danych, identyfikacja metabolitów i wyznaczenie szlaków metabolicznych to kluczowe kroki do uzyskania wglądu w złożone systemy

biologiczne. Różne metody, oprogramowanie i bazy danych zostały opracowane w celu ułatwienia tych zadań, umożliwiając naukowcom odkrycie cennych informacji biologicznych z zawiłych danych metabolomicznych [38].

Analiza danych w metabolomice obejmuje kilka etapów, takich jak przetwarzanie wstępne, normalizacja, skalowanie i analiza statystyczna. Przetwarzanie wstępne obejmuje redukcję szumów, korekcję linii podstawowej, wykrywanie sygnałów i wyrównanie, podczas gdy normalizacja danych i skalowanie pomagają uwzględnić różnice w stężeniu próbki lub odpowiedzi urządzenia. Pozwala to na dokładniejsze porównania pomiędzy różnymi próbkami albo eksperymentami. Analizy metabolomiczne, a w szczególności niecelowana analiza metabolomiczna, prowadzą do powstania złożonych zbiorów danych. Dlatego też stworzono narzędzia analityczne, które są kluczowe dla przetwarzania i interpretacji tych wyników. Pomagają w rozwiązywaniu problemów z przetwarzaniem dużej ilości danych, analizami statystycznymi, identyfikacją metabolitów oraz umiejscowieniem ich w poszczególnych szlakach metabolicznych. Rodzaje analiz statystycznych, które można zastosować odnośnie do danych metabolomicznych są bardzo obszerne a wybór właściwego testu może stanowić wyzwanie. Przykłady oprogramowania do analizy danych obejmują MetaboAnalyst, platformę internetową do kompleksowej analizy, wizualizacji i interpretacji danych metabolomicznych, czy też oprogramowanie ogólne, np. SIMCA lub MatLAB.

Po wykryciu metabolitów i porównaniu ich poziomów pomiędzy grupami eksperymentalnymi, kolejnym krokiem jest identyfikacja konkretnych związków odpowiedzialnych za obserwowane zmiany. Często wymaga to porównania zmierzonego stosunku masy do ładunku (m/z), czasu retencji i wzorców fragmentacji (dla danych MS) lub przesunięć chemicznych i stałych sprzężenia (dla danych NMR) z danymi referencyjnymi dostępnymi w bibliotekach spektralnych albo bazach danych. Bazy danych do identyfikacji metabolitów obejmują Human Metabolome Database (HMDB), która oferuje szczegółowe informacje na temat ludzkich metabolitów, METLIN, bazę danych metabolitów zawierającą widma MS/MS i inne informacje dla wielu związków, MassBank, publiczne repozytorium danych widm masowych oraz Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB), bazę danych widm NMR dla różnych biomolekuł.

Mapowanie zidentyfikowanych metabolitów na szlaki metaboliczne jest kluczowe dla zrozumienia procesów biologicznych leżących u podstaw obserwowanych zmian. Może to pomóc w zidentyfikowaniu ścieżek metabolicznych, które uległy zmianie, i wygenerowaniu hipotez dotyczących mechanizmów napędzających różnice między grupami eksperymentalnymi. Narzędzia i bazy danych do mapowania ścieżek metabolicznych obejmują Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), wspomniany MetaboAnalyst Pathway Analysis, MetScape oraz Reactome.

1.3.5 Analiza statystyczna w badaniach metabolomicznych

Metodologia stosowana do interpretacji danych metabolomicznych została zaadaptowana od powstałych wcześniej analiz genomowej i transkryptomowej. Klasyczne podejście analityczne polega na ocenie różnic grupowych. W tym celu stosuje się analizy jednozmiennowe i wielozmiennowe [39,40,41]. Jednym z narzędzi wykorzystywanych w analizie statystycznej danych metabolomicznych jest MetaboAnalyst 5.0 [42]. To

kompleksowe narzędzie online do analizy danych metabolomicznych, które integruje szereg zaawansowanych metod statystycznych i uczenia maszynowego, obejmując wszystkie etapy analizy danych metabolomicznych. Proces ten zakłada wstępne przetwarzanie i normalizację danych, eksploracyjną analizę danych oraz interpretację funkcjonalną. Przetwarzanie i normalizacja danych są kluczowymi krokami wstępnymi, a narzędzie to oferuje szeroką gamę metod normalizacji, w tym normalizację według sumy, mediany, skalowania Pareta i automatycznego skalowania. MetaboAnalyst zapewnia odmienne sposoby wizualizacji danych wielowymiarowych, takie jak analiza głównych składowych, mapy cieplne i hierarchiczne grupowanie, które mają kluczowe znaczenie dla wstępnej kontroli danych, identyfikacji wartości odstających i rozróżniania grup. Jeśli chodzi o analizę statystyczną, obejmuje ono połączenie metod jedno- i wielowymiarowych. Techniki takie jak testy t, analiza wariancji i volcan plot pomagają w analizie jednowymiarowej, podczas gdy częściowa analiza dyskryminacyjna metodą najmniejszych kwadratów (PCA) i ortogonalna częściowa analiza dyskryminacyjna metodą najmniejszych kwadratów (OPLSDA) mogą być stosowane do analizy wielowymiarowej. Techniki te wspomagają identyfikację najbardziej dyskryminujących metabolitów, które różnicują odmienne grupy próbek. W przypadku bardziej złożonych projektów eksperymentalnych narzędzie obejmuje metody statystyczne, takie jak analiza szeregów czasowych i dwuczynnikowa ANOVA. Jeśli chodzi o uczenie maszynowe, jest kilka metod, takich jak vector machines, random forests i k-nearest neighbors, przydatnych do zadań klasyfikacji i przewidywania. W narzędziu tym dostępna jest również analiza ścieżek i analiza wzbogacenia ścieżek, które przy użyciu zidentyfikowanych metabolitów mogą podkreślić najistotniejsze szlaki metaboliczne i zapewnić wgląd w biologiczne mechanizmy stojące za obserwowanymi zmianami w metabolomie. Wreszcie, narzędzie zapewnia również też walidację modeli i ocenę istotności statystycznej za pomocą takich metod jak testy permutacyjne czy walidacja krzyżowa.

Jednowymiarowe metody statystyczne

Jednowymiarowe metody statystyczne analizują jedną zmienną jednocześnie i porównują poziomy każdego metabolitu indywidualnie pomiędzy grupami eksperymentalnymi. Przykłady tych metod obejmują test t-Studenta, który porównuje średnie dwóch grup; analiza wariancji (ANOVA), która porównuje średnie wielu grup. Jeśli ANOVA wykaże znaczące różnice, przeprowadzane są testy post-hoc w celu określenia, które konkretne grupy różnią się od siebie. Krotność zmiany (fold-change, FC), która jest stosunkiem średnich poziomów metabolitów między dwiema grupami eksperymentalnymi. Test U Manna-Whitneya lub test Kruskala-Wallisa to testy nieparametryczne, które mogą być stosowane, gdy dane nie spełniają założeń testu t-Studenta ani ANOVA (np. gdy dane nie mają rozkładu normalnego).

Wielowymiarowe analizy statystyczne

Z drugiej strony wielowymiarowe metody statystyczne obejmują równoczesną analizę wielu zmiennych, biorąc pod uwagę zależności między metabolitami i ogólne wzorce w danych. Wyróżnia się dwie główne grupy analiz statystycznych stosowanych w metabolomice: analizy nadzorowane i nienadzorowane.

- Metody nienadzorowane. W analizie statystycznej metody nienadzorowane koncentrują się na znajdowaniu wzorców, struktur lub związków w danych bez opierania się na znanych etykietach czy wynikach. Analiza składowych głównych

(Principal Component Analysis, PCA) to technika nienadzorowanej analizy, która jest często stosowana w metabolomice do redukcji wymiarowości danych i wizualizacji złożoności próbek. PCA identyfikuje główne składowe w danych, które wyjaśniają największą wariancję. Może być używana do analizy podobieństw i różnic między próbkami, bez uwzględniania żadnych z góry określonych grup próbek. Pozwala na zidentyfikowanie wzorców i tendencji w danych metabolomicznych, co może prowadzić do dalszych analiz i hipotez badawczych.

- Metody nadzorowane. W analizie statystycznej metody nadzorowane wykorzystują zbiory danych ze znanymi etykietami lub wynikami do budowy modeli, które mogą przewidzieć etykiety dla nowych, niewidzianych danych. Analiza dyskryminacyjna oparta na ortogonalnej projekcji do najmniejszych kwadratów (Orthogonal Projection to Latent Structures Discriminant Analysis, OPLS-DA) to przykład analizy nadzorowanej, która jest wykorzystywana do identyfikacji metabolitów różniących się między z góry zdefiniowanymi grupami próbek. OPLS-DA jest rozwinięciem PCA, które uwzględnia informacje o klasach próbek. Tworzy model dyskryminacyjny pozwalający na przewidywanie przynależności próbek do określonych grup na podstawie ich profili metabolomicznych. Może być stosowany do identyfikacji biomarkerów różnicujących odmienne grupy próbek, np. próbki zdrowych i chorych.

Podsumowując, PCA jest przykładem analizy nienadzorowanej w metabolomice, która służy do redukcji wymiarowości danych i wizualizacji złożoności próbek. OPLS-DA natomiast jest przykładem analizy nadzorowanej, która pozwala na identyfikację metabolitów różniących się między zdefiniowanymi grupami próbek. Zarówno PCA, jak i OPLS-DA są szeroko stosowane w metabolomice oraz dostarczają cennych informacji na temat wzorców i różnic w danych metabolomicznych.

Metody uczenia maszynowego

Techniki uczenia maszynowego są wykorzystywane do złożonych zadań, takich jak przewidywanie wyników lub klasyfikowanie próbek na podstawie zestawu cech, w tym przypadku metabolitów. Techniki te są szczególnie przydatne, gdy istnieje wiele zmiennych (tj. metabolitów) i zachodzą między nimi złożone relacje [43].

- Maszyny wektorów nośnych (support vector machines, SVM): popularna metoda uczenia maszynowego stosowana zarówno do klasyfikacji, jak i regresji. W metabolomice SVM może być wykorzystywana do rozróżniania odmiennych klas próbek (np. choroba vs. kontrola) na podstawie ich profili metabolitów. Główną ideą SVM jest znalezienie hiperpłaszczyzny, która najlepiej oddziela klasy, jednocześnie maksymalizując margines między najbliższymi próbkami każdej klasy (wektory wsparcia).
- Lasy losowe (random forest, RF): to wszechstronna metoda wykorzystująca zespół drzew decyzyjnych. Każde drzewo jest budowane przy użyciu próbki bootstrapowej danych, a ostateczna prognoza opiera się na większości głosów (w przypadku klasyfikacji) lub średniej (w przypadku regresji) wszystkich drzew [44]. Bootstrap to technika statystyczna polegająca na tworzeniu nowych próbek z istniejącego zbioru danych poprzez losowe wybieranie punktów danych z szansą na wielokrotne wybranie tego samego punktu danych. Lasy losowe mogą uchwycić złożone, nieliniowe zależności między zmiennymi, a także zapewniają miarę ważności

zmiennej, którą można wykorzystać do identyfikacji najbardziej wpływowych metabolitów.

- Algorytm k-najbliższych sąsiadów (k-nearest neighbours, KNN): prosta, ale skuteczną metodą klasyfikacji i regresji. W przypadku klasyfikacji w metabolomice próbka jest klasyfikowana na podstawie klasy większościowej jej k najbliższych sąsiadów w przestrzeni metabolitów.
- Uczenie głębokie (deep learning): algorytmy głębokiego uczenia, w szczególności sztuczne sieci neuronowe (ANN), są coraz częściej wykorzystywane do analizy danych metabolomicznych. Składają się z warstw połączonych węzłów lub "neuronów" i mogą modelować złożone, nieliniowe zależności. Konwolucyjne sieci neuronowe (CNN) i rekurencyjne sieci neuronowe (RNN) to inne formy modeli głębokiego uczenia wykorzystywane w konkretnych zastosowaniach.

Słownik pojęć statystycznych stosowanych w publikacjach

PCA (Principal Component Analysis - analiza głównych składowych) to technika statystyczna używana do redukcji wymiarowości danych. Często sięga się po nią w celu uproszczenia złożonych zestawów danych, jednocześnie starając się zachować jak najwięcej informacji zawartych w tych danych. PCA przekształca oryginalne zmienne, które mogą być ze sobą skorelowane, w nowe, niezależne "główne składowe". Pierwsza główna składowa (PCA1) wyjaśnia najwięcej zmienności w danych, a każda kolejna główna składowa (PCA2) wyjaśnia jak najwięcej pozostałej zmienności, będąc jednocześnie ortogonalną (prostopadłą) do poprzednich składowych. PCA jest używana do wizualizacji ogólnej struktury danych, identyfikacji grup lub klastrów oraz wykrywania obserwacji odstających (outlierów).

OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis - ortogonalna analiza dyskryminacyjna częściowych najmniejszych kwadratów) to metoda statystyczna używana do budowy modeli predykcyjnych dla danych z góry zdefiniowanych klas (np. zdrowy vs. chory). To nadzorowana metoda, która różni się od PCA tym, że nie tylko redukuje wymiarowość danych, lecz także maksymalizuje różnice między zdefiniowanymi klasami. Metoda ta jest często używana w metabolomice, gdy interesuje nas zidentyfikowanie metabolitów różniących się pomiędzy grupami. OPLS-DA separuje zmienność w danych, która jest bezpośrednio powiązana z wynikiem zainteresowania (tzw. zmienność predyktywną), od zmienności, która nie jest z tym wynikiem związana (tzw. zmienność ortogonalna). Dzięki temu łatwiej identyfikować metabolity, które są istotne w różnicowaniu grup.

Korekta Bonferroniego i współczynnik fałszywych odkryć (FDR) to techniki statystyczne służące do korekty porównań wielokrotnych. Biorąc pod uwagę, że badanie metabolomiczne może przeprowadzać testy na tysiącach metabolitów jednocześnie, kontrolowanie odsetka wyników fałszywie dodatnich ma kluczowe znaczenie.

Korekta Bonferroniego to metoda w której poziom istotności jest dzielony przez liczbę porównań (np. w przypadku testowania 20 metabolitów, wynik uznany będzie za istotny, gdy wartość p jest niższa niż $0,05/20 = 0,0025$). Może być jednak zbyt rygorystyczna w

sytuacjach, w których przeprowadzanych jest wiele testów, co prowadzi do wysokiego wskaźnika wyników fałszywie ujemnych.

Współczynnik fałszywych odkryć (FDR) to mniej rygorystyczna metoda niż korekta Bonferroniego i często stosowana podczas przeprowadzania dużej liczby testów. Kontroluje oczekiwany odsetek nieprawidłowo odrzuconych hipotez zerowych (fałszywych odkryć). Procedura Benjamini-Hochberg jest powszechnie stosowaną metodą kontroli FDR.

VIP (Variable Influence on Projection - wpływ zmiennej na projekcję) to parametr statystyczny używany w analizie wielowymiarowej, takich jak regresja cząstkowa najmniejszych kwadratów (PLS) i ortogonalna regresja cząstkowa najmniejszych kwadratów (OPLS). VIP mierzy znaczenie każdej zmiennej (w tym przypadku metabolitu) w projekcji lub rozróżnianiu między odmiennymi grupami albo klasami. Określa wkład każdej zmiennej w model predykcyjny. Zmienne o wyższych wartościach VIP są uważane za mające większy wpływ na model i są bardziej istotne w rozróżnieniu między grupami. W kontekście studiów metabolomicznych lub innych studiów omicznych, wartości VIP często są używane do wyboru istotnych zmiennych bądź biomarkerów, które znacząco przyczyniają się do separacji lub klasyfikacji różnych grup próbek (np. tkanka nowotworowa vs. zdrowa). Połączenie wartości VIP z innymi miarami statystycznymi, takimi jak analiza współczynnika zmiany, FC (fold change) i test t, pozwala na zidentyfikowanie metabolitów, które wykazują istotne różnice między grupami i mają potencjalną wartość diagnostyczną lub predykcyjną.

R²Y i Q² oraz test permutacji - to parametry statystyczne stosowane przy walidacji modeli wielowymiarowych, takich jak te generowane ortogonalną analizę dyskryminacyjną najmniejszych kwadratów częściowych (OPLS-DA).

R²Y: parametr często określony się jako "dopasowanie modelu". Reprezentuje proporcję wariacji zmiennej odpowiedzi (Y), którą można wyjaśnić za pomocą modelu. Jest to miara, jak dobrze model pasuje do zaobserwowanych danych. Wartość R²Y wynosząca 1 wskazuje na doskonałe dopasowanie, natomiast wartość bliżej 0 wskazuje na słabe dopasowanie.

Q²: miara "zdolności predykcyjnej" modelu. Oblicza się ją za pomocą metod walidacji krzyżowej i szacuje, jak dobrze model może przewidzieć nowe dane. Wartość Q² bliżej 1 wskazuje na doskonałą zdolność predykcyjną, podczas gdy wartość bliżej 0 sugeruje słabą zdolność predykcyjną. Ujemna wartość Q² może sygnalizować nadmierne dopasowanie modelu, co oznacza, że model może opisywać szum zamiast bazowy trend.

Test permutacji: technika statystyczna, która polega na przetasowaniu, czyli losowym przestawieniu danych, a następnie porównaniu przetasowanych danych z tymi oryginalnymi. Celem jest ustalenie, czy obserwowany efekt jest istotny, czy może wynika po prostu z losowości. Gdy wykonujemy test permutacji z 2000 powtórzeniami, przetasowujemy dane 2000 razy, za każdym razem obliczając interesującą nas statystykę (np. różnicę średnich). Każde przetasowanie daje jedno "symulowane" wyniki. Wyniki tych 2000 symulacji tworzą rozkład statystyki testowej pod hipotezą zerową (tj. hipotezą, że

obserwowany efekt jest wynikiem losowości). Możemy teraz porównać naszą rzeczywistą obserwację (statystykę obliczoną na oryginalnych, nieprzetaszowanych danych) z tym rozkładem. Jeżeli rzeczywista obserwacja jest ekstremalna z rozkładem z symulacji (np. jest w najmniejszym 5% lub największym 5% wyników), to należy odrzucić hipotezę zerową i uznać, że obserwowany efekt jest statystycznie istotny.

FC (Fold change - współczynnik zmiany) to wskaźnik używany do porównywania poziomu metabolitów między dwiema różnymi grupami próbek. Odnosi się do wielkości zmiany w stężeniu metabolitów między tymi grupami. Jest obliczany jako stosunek średniego stężenia metabolitu w jednej grupie do średniego stężenia w drugiej. Wartość fold change wyraża ilekroć stężenie metabolitu wzrasta lub maleje między grupami. Na przykład, fold change wynoszący 2 oznacza, że stężenie metabolitu jest dwukrotnie większe w jednej grupie w porównaniu z drugą.

Modelowanie random forest to popularny algorytm uczenia maszynowego, który należy do kategorii metod uczenia zespołowego. Nazwa pochodzi od lasu drzew decyzyjnych generowanych losowo, które łączą swoje wyniki, aby dokonać predykcji. Można to porównać z komitetem ekspertów, gdzie każde drzewo decyzyjne to jeden ekspert. Każdy ekspert (drzewo) wydaje swoją opinię (prognozę), a następnie decyzja komitetu (lasu) jest podejmowana na podstawie najczęściej występującej opinii (głosowania większościowego). Etapy modelowania:

1. Tworzenie drzew decyzyjnych: random forest tworzy wiele drzew decyzyjnych, każde z nich trenowane na różnych podzbiorach danych. To jakby mieć różnych ekspertów specjalizujących się w różnych obszarach.
2. Prognozowanie: kiedy mamy nowe dane do prognozowania, każde drzewo decyzyjne (ekspert) dokonuje swojej prognozy.
3. Głosowanie: wszystkie prognozy zostają zebrane i najczęściej występująca staje się prognozą random forest. To jakby zbierać opinie wszystkich ekspertów, a potem decydować, idąc za najpopularniejszą z nich.

ROC (Receiver Operating Characteristic - krzywa charakterystyki operacyjnej odbiornika) to wykres przedstawiający zależność między czułością (True Positive Rate) a 1-swoistością (False Positive Rate) w różnych punktach odcięcia dla danego modelu diagnostycznego. ROC jest szeroko stosowana w analizie diagnostycznej i ocenie skuteczności modeli klasyfikacyjnych.

AUC (Area Under the Curve - obszar pod krzywą) to parametr który ocenia zdolność modelu do rozróżnienia między dwiema klasami lub grupami. Mierzy powierzchnię pod krzywą ROC. Im większa wartość AUC, tym lepsza zdolność modelu do rozróżnienia między klasami. AUC równa 1 oznacza doskonałą zdolność rozróżniania, AUC równa 0,5 wskazuje na brak zdolności rozróżniania, a AUC poniżej 0,5 sugeruje przeciwną interpretację klasyfikacji.

Krzywa ROC i AUC są często stosowane w badaniach diagnostycznych, aby ocenić skuteczność modeli w rozpoznawaniu choroby. Są szczególnie przydatne, gdy modele generują wyniki binarne, takie jak choroba/niechoroba. Krzywa ROC i AUC dostarczają informacji o czułości i swoistości modelu oraz pozwalają na wybór optymalnego punktu

odcięcia, który zapewnia równowagę między tymi dwoma wskaźnikami. W badaniach metabolomicznych, ROC i AUC używane są w analizie biomarkerów. Oceniają skuteczność różnych metabolitów jako biomarkerów różnicujących tkankę nowotworową od tkanki zdrowej. AUC wykorzystuje się do określenia efektywności diagnostycznej tych metabolitów. Metabolity o wyższych wartościach AUC są uważane za bardziej obiecujące ze względu na lepsze rozróżnianie między grupami próbek nowotworowych i zdrowych.

Rozdział 2: Założenia i cel pracy

Założenia leżące u podstaw tej rozprawy obejmują przekonanie, że profil metaboliczny pacjentów z rakiem pęcherza moczowego wyraźnie różni się od profilu osób zdrowych. Zakłada się, że różnica ta może być wykryta w surowicy, tkance i moczu przy użyciu zaawansowanych technik analizy metabolomicznej. Uznano, że metody analizy chemicznej takie jak NMR i MS w połączeniu z rozbudowanymi narzędziami bioinformatycznymi oraz metodami analizy statystycznej pozwolą na wykrycie takich związków. Rozprawa zakłada, że wszelkie zidentyfikowane biomarkery mogą być stosowane jako wiarygodne wskaźniki do diagnozowania, prognozowania i monitorowania terapeutycznego raka pęcherza moczowego. Przyjmuje się również, że badana grupa chorych reprezentuje szerszą grupę demograficzną osób z rakiem pęcherza moczowego, co zapewnia szerokie zastosowanie wyników badań. Ponadto zakłada się, że metodologie i techniki zastosowane w badaniu, w oparciu o współczynniki statystyczne przyniosą dokładne i wiarygodne wyniki.

Rozprawa doktorska ma na celu wykorzystanie analizy metabolomicznej surowicy, tkanki i moczu do wskazania potencjalnych biomarkerów raka pęcherza moczowego. Poprzez analizę profili metabolicznych i porównanie pacjentów z rakiem pęcherza moczowego i osób zdrowych, badanie ma ujawnić określone metabolity lub szlaki metaboliczne, które mogłyby działać jako wczesne markery diagnostyczne, czynniki ryzyka albo cele terapeutyczne. Badania mają na celu poszerzenie istniejącej wiedzy na temat raka pęcherza moczowego i utworzenie drogi do bardziej precyzyjnych i mniej inwazyjnych metod diagnostycznych oraz ukierunkowanych opcji leczenia. Ostatecznym celem jest poprawa wyników leczenia pacjentów, zmniejszenie obciążenia chorobą i poprawa jakości życia osób, u których zdiagnozowano raka pęcherza moczowego.

Cele główne:

1. Analiza metabolomiczna tkanki, surowicy i moczu z zastosowaniem spektrometrii mas oraz spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego.
2. Identyfikacja pojedynczych metabolitów (biomarkerów) i/lub grup metabolitów które będą rozróżniać pomiędzy tkanką, surowicą oraz moczem nowotworowym i kontrolnym.
3. Ocena analitycznej wiarygodności wykrytych biomarkerów. Będzie się ona opierać na wielowymiarowej analizie statystycznej z zastosowaniem metod takich jak PCA i OPLS-DA oraz parametrach statystycznych takich jak: czułość, swoistość, AUC, FC i VIP, dla poszczególnych związków i grup związków.

Cele poboczne:

1. Identyfikacja szlaków metabolicznych w których występują zidentyfikowane metabolity.
2. Próba zidentyfikowania metabolitów różnicujących poszczególne stopnie zaawansowania klinicznego oraz stopnie złośliwości histopatologicznej.
3. Ustalenie czy metoda obrazowania MS (LDI-MSI) może wspomóc badanie histopatologiczne w postawieniu prawidłowej diagnozy w trudnych przypadkach oraz w wspomagać w wyznaczaniu marginesów resekcji guza nowotworowego.

Cele planuje się osiągnąć poprzez:

1. Zastosowanie nie-celowanej i celowanej analizy metabolomicznej tkanki, surowicy i moczu pobranych od grupy 100 pacjentów z rakiem pęcherza moczowego oraz 100 osób

zdrowych, z zastosowaniem spektrometrii mas oraz spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego.

2. Obrazowanie tkanki nowotworowej i zdrowej metodą LDI MSI.

3. Zastosowanie chemometrycznych metod analizy danych do identyfikacji statystycznie istotnych metabolitów/biomarkerów różnicujących próbki pochodzące od osób z rakiem pęcherza moczowego z próbkami kontrolnymi, planowane jest zastosowanie internetowych narzędzi, tj. MetaboAnalyst 4.0 i/lub XCMS Online do analizy statystycznej uzyskanych wyników: zarówno podstawowej analizy jednozmiennowej (np. za pomocą testu t-Studenta), jak i analiz wielozmiennowych, tj. analiza głównych składowych - PCA (Principal Component Analysis) oraz dyskryminacyjny wariant metody cząstkowych najmniejszych kwadratów - PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis).

4. Analizy szlaków metabolicznych związanych z nowymi markerami.

Rozdział 3: Materiały i metody

3.1 Protokół badania, przygotowanie materiału

Protokół badania został zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Rzeszowskim (pozwolenie nr 2018/04/10) i przeprowadzony zgodnie z odpowiednimi wytycznymi i przepisami, m.in. Deklaracją helsińską z 1964 roku i jej późniejszymi zmianami. Próbkę i dane kliniczne od pacjentów biorących udział w badaniu zostały pobrane za pisemną zgodą.

Do badań metabolomicznych raka pęcherza moczowego zgromadzono fragmenty tkanek, próbek surowicy i moczu od 100 pacjentów z rakiem pęcherza moczowego oraz 100 kontrolnych próbek surowicy i moczu. Tkanki kontrolne stanowiły fragmenty zdrowej śluzówki pęcherza moczowego pobrane w trakcie zabiegu TURBT od pacjentów z rakiem pęcherza moczowego. Od każdego pacjenta pobrano zarówno fragment tkanki nowotworowej jak i fragment zdrowej śluzówki pęcherza moczowego, każda o wymiarach około 6 x 6 mm (ok. 5 mg). Celem weryfikacji histopatologicznej preparatów (zarówno nowotworowej, jak i kontrolnej - prawidłowej) podzielono je na dwie części - jedna została poddana badaniu histopatologicznemu a drugą zamrożono w temperaturze -60°C . Mocze i surowice kontrolne pochodzą od pacjentów przyjętych na oddział urologii celem wykonania diagnostyki lub leczenia zabiegowego łagodnych schorzeń w obrębie układu moczowego, tj. przerost prostaty, zwężenie cewki moczowej i zwężenie podmiędniczkowe moczowodu, stulejka, wodniak jądra, żylaki powrózka nasiennego, nietrzymanie moczu i inne. Każdy pacjent z grupy kontrolnej miał wykonany w ramach hospitalizacji podstawowy pakiet badań laboratoryjnych (w tym badanie ogólne moczu) i obrazowych (USG jamy brzusznej). Stanowiło to podstawę do wykluczenia raka pęcherza moczowego w grupie kontrolnej. U każdego pacjenta, do badania pobrano około 2.6ml krwi oraz 50 ml moczu. Krew była odwirowana przy 3000 obr/min przez 10 minut w temperaturze pokojowej celem uzyskania surowicy. Po odwirowaniu oddzieloną surowicę i mocz zamrożono w temperaturze -60°C .

Poszczególne etapy przygotowania tkanki, surowicy i moczu do badania z zastosowaniem spektrometrii mas lub spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego przedstawiono ze szczegółami w publikacjach.

Rozdział 4: Wyniki i dyskusja

4.1 Analiza metabolomiczna tkanki

Monoisotopic silver nanoparticles-based mass spectrometry imaging of human bladder cancer tissue: Biomarker discovery, *Advances in Medical Sciences*, 2023,

K. Ossoliński, T. Ruman, T. Ossoliński, A. Ossolińska, A. Arendowski, A. Kołodziej, A. Płaza-Altamer, J. Nizioł

W publikacji przedstawiono metabolomiczną analizę tkanki nowotworowej pęcherza moczowego w porównaniu z tkanką prawidłową. Zastosowano metodę obrazowania LDI-MSI (obrazowanie metodą laserowej desorpcji/ionizacyjnej spektrometrii mas) opartą na nanocząstkach srebra ($^{109}\text{AgNPET}$) oraz LDI-MS i MS/MS do analizy ekstraktów tkankowych. Łącznie przeanalizowano materiał pochodzący od 6 pacjentów (pary tkanka nowotworowa i zdrowa). Analiza danych MSI doprowadziła do identyfikacji 28 związków, które wykazywały największe zróżnicowanie między obszarami tkanki nowotworowej i kontrolnej. Wśród nich 2 związki miały wyższą średnią intensywność w tkance nowotworowej, podczas gdy pozostałe 26 wykazywało wyższą intensywność w prawidłowej tkance pęcherza moczowego. Wybrane zostały tylko te związki, które wykazywały spójne trendy we wszystkich 6 eksperymentach.

Dane dotyczące różnic w intensywności zidentyfikowanych związków poddawano wielowymiarowej analizie statystycznej w tym analizie głównych składowych (PCA) i ortogonalnej analizie dyskryminacyjnej metodą najmniejszych kwadratów (OPLS-DA), w celu oceny separacji między obszarami nowotworowymi i normalnymi tkankami. Poprzez połączenie VIP (>1) z wynikami testu t (wartość p i FDR z testu t $<0,05$) oraz fold change ($0,5 < \text{FC} < 1,2$), wybrano 10 metabolitów różnicujących próbki tkanki nowotworowej i prawidłowej. Metabolity te obejmowały glicynę, hipotaurynę, 3-metylobutanal, etylofosforan, glutaminę, myosminę, PI(22:0/0:0), aminopentanal, betainę proliny i metyloguanidynę.

Dokładność diagnostyczną wybranych metabolitów oceniono za pomocą analizy krzywej ROC. Obszary pod krzywymi (AUC) zostały obliczone w celu określenia skuteczności diagnostycznej metabolitów. Analizy ROC wykazały, że wszystkie wybrane metabolity miały wartości AUC powyżej 0,81, przy czym hipotauryna i 3-metylobutanal wykazywały najwyższą wartość AUC = 0,94. Połączenie 10 wybranych metabolitów okazało się lepszym narzędziem diagnostycznym (AUC = 0,993) niż każdy z metabolitów oddzielnie.

4.2 Analiza metabolomiczna surowicy

Untargeted ultra-high-resolution mass spectrometry metabolomic profiling of blood serum in bladder cancer. *Scientific Reports*, 2022

J. Nizioł, K. Ossoliński, A. Płaza-Altamer, A. Kołodziej, A. Ossolińska, T. Ossoliński, T. Ruman

Badanie miało na celu identyfikację potencjalnych biomarkerów raka pęcherza moczowego w surowicy. W niecelowanym badaniu wykorzystano spektrometrię masową o ultrawysokiej rozdzielczości (UHRMS) i ultra wysokosprawną chromatografię cieczową (UHPLC) w ekstraktach surowiczych od 100 pacjentów z rakiem pęcherza moczowego (BC) i 100 osób z grupy kontrolnej (NC) z uwzględnieniem stopnia zaawansowania klinicznego i złośliwości histopatologicznej. Surowice zostały podzielone na dwie grupy: zestaw treningowy obejmujący 80% wszystkich próbek i zestaw walidacyjny obejmujący pozostałe 20% próbek. Profilowanie metaboliczne surowicy przeprowadzono niezależnie na dwóch zestawach danych. Zbiór treningowy został wykorzystany do identyfikacji markerów diagnostycznych w surowicy. Zbiór walidacyjny posłużył do niezależnej walidacji skuteczności diagnostycznej biomarkerów.

Analiza UHPLC-UHRMS wykazała łącznie 5498 wartości m/z (metabolitów) w treningowym i walidacyjnym zbiorze danych. Analiza PCA wykazała dobrą separację między surowicami bazując na ich różnych profilach metabolitów. Nadzorowana analiza statystyczna z wykorzystaniem OPLS-DA dodatkowo podkreśliła różnice metaboliczne między grupami BC i NC. Na podstawie wartości VIP (>1) z modelu OPLS-DA i niezależnych testów t (wartość p i FDR $<0,05$), zidentyfikowano 1012 zmiennych w zbiorze treningowym i 1052 w zbiorze walidacyjnym, które uznano za statystycznie istotne. Następnie wyselekcjonowano wspólny zestaw 864 wartości m/z , 121 wartości m/z przyporządkowano określonym związkom chemicznym. 85 spośród 121 wybranych metabolitów wykazywało wysokie wartości AUC ($>0,8$), co wskazuje na dobrą zdolność dyskryminacyjną między próbkami surowicy nowotworowej i kontrolnej. Analiza AUC dla kombinacji wykrytych metabolitów okazała się znakomitym dyskryminatorem próbek surowicy BC vs. NC (AUC $>0,99$). Ostatecznie wybrano 27 metabolitów na podstawie wartości odcięcia FC wynoszących >2 i $<0,5$.

Aby określić, czy analiza metabolomiczna próbek surowicy może pomóc w rozróżnieniu między różnymi stopniami złośliwości histopatologicznej, przeprowadzono kolejną serię analiz PCA i OPLS-DA na grupie treningowej (80 NC, 32 pacjentów z HG i 45 pacjentów z LG) i walidacyjnej (20 NC, 8 pacjentów z HG i 12 pacjentów z LG). Pacjentów z PUNLMP wykluczono z analizy. Analiza wykazała dobrą dyskryminację między grupami kontrolnymi i nowotworowymi z rozróżnieniem na raka low-grade (LG) i high grade (HG) zarówno w zestawach treningowych, jak i walidacyjnych. **Modele nie były jednak w stanie w statystycznie istotny sposób odróżnić surowice pochodzących od pacjentów z nowotworami LG vs HG.** Zidentyfikowano znaczną liczbę wartości m/z , które w istotny statystycznie sposób rozróżniały pomiędzy poszczególnymi stopniami złośliwości histopatologicznej a grupą kontrolną (1500 dla HG BC vs. NC i 1600 dla LG BC vs NC). 138 i 148 wartości m/z dla grup HG BC vs. NC i LG BC vs. NC zostało powiązanych z

określonymi związkami chemicznymi. Ponadto analizy krzywej ROC wykazały dobrą wydajność diagnostyczną modeli, przy wartościach AUC >0,75 dla pięciu metabolitów, co wskazuje na wysoki poziom dokładności. Ostatecznie wyselekcjonowano 23 potencjalne biomarkery dla podgrup LG i HG BC z wartościami FC >2 i <0,5.

W badaniu przeprowadzono także analizę surowicy w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego. Stadia obejmowały nieinwazyjnego raka brodawkowatego (pTa), raka naciekającego podnabłonkową tkankę łączną (pT1) i raka naciekającego błonę mięśniową (pT2), z łącznie 69 próbkami dla pTa, 19 dla pT1 i 12 dla pT2. Wyniki analizy głównych składowych (PCA) i ortogonalnej analizy dyskryminacyjnej metodą najmniejszych kwadratów (OPLS-DA) wykazały dobrą separację między kontrolnymi surowicami (NC) a poszczególnymi stadiami BC. **Nie stwierdzono jednak statystycznie istotnych różnic przy analizie porównawczej trzech grup stadiów raka względem siebie (pTa vs. pT1 vs. pT2).** Dalsza analiza modelu OPLS-DA, obejmująca analizę FC i VIP, ujawniła szereg wartości *m/z* najbardziej istotnych w rozróżnieniu próbek. Obejmowały one 63 wartości *m/z* dla pTa BC vs NCs, 66 wartości *m/z* dla pT1 BC vs. NCs i 69 wartości *m/z* dla pT2 BC vs. NCs. Analiza krzywej ROC pozwoliła na zidentyfikowanie 37 potencjalnych biomarkerów z wartościami FC >2 i <0,5, czułością i swoistością wynoszącą odpowiednio 74% i 62%.

Metabolomic and elemental profiling of blood serum in bladder cancer. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2022

K. Ossoliński, T. Ruman, V. Copié, B.P. Tripet, L. B. Nogueira, K.O.P.C. Nogueira, A. Kołodziej, A. Płaza-Altamer, A. Ossolińska, T. Ossoliński, J. Nizioł

Badanie dotyczyło analizy 200 próbek surowicy uzyskanych od 100 pacjentów z rakiem pęcherza moczowego (BC) i 100 zdrowych osób (NC), z wykorzystaniem celowanego i niecelowanego podejścia profilowania metabolomicznego. Zastosowane techniki analityczne obejmowały wysokiej rozdzielczości ¹H NMR, spektrometria atomowa emisyjna z indukcyjnie sprzężoną plazmą (ICP-OES) i wysokiej rozdzielczości laserową desorpcję/ionizację MS (LDI-MS) opartą na nanocząstkach złota i srebra (PFL-2D GS LASiS AuNPs LDI-MS oraz PFL-2D GS LASiS ¹⁰⁹AgNPs LDI-MS).

ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy - spektrometria emisyjna z indukcyjnie sprzężoną plazmą) to technika analityczna stosowana do analizy składu pierwiastkowego próbek [45]. Jest to metoda spektroskopii emisyjnej, która wykorzystuje zjawisko jonizacji w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP) oraz pomiar emisji światła przez jonizowane pierwiastki. Próbka wprowadzana jest do indukcyjnie sprzężonej plazmy w postaci aerozolu. Wysoka temperatura plazmy powoduje rozpad próbki na atomy składowe, które następnie zostają wzbudzone i emitują światło o charakterystycznych długościach fal. Mierząc intensywność tego światła, można określić stężenie pierwiastków w próbce. W kontekście metabolomiki, a dokładnie elementomiki, ICP-OES może być szczególnie przydatna do wykrywania i ilościowego oznaczania jonów metali i innych pierwiastków zaangażowanych w różne procesy biochemiczne.

PFL-2D GS LASiS to udoskonalona metoda generowania nanocząstek opracowana przez zespół T. Rumana polegająca na zastosowaniu do generowania nanocząstek lasera światłowodowego z galvoskanerem 2D która jest połączona jest z laserową jonizacją/desorpcją wspomaganą nanocząstkami złota (AuNPs) i srebra ($^{109}\text{AgNPs}$).

Surowice zostały podzielone na dwie grupy: zestaw treningowy obejmujący 80% wszystkich próbek (n=80) i zestaw walidacyjny obejmujący pozostałe 20% próbek (n=20). Profilowanie metaboliczne surowicy przeprowadzono niezależnie na obu zestawach danych. Zbiór treningowy został wykorzystany do identyfikacji markerów diagnostycznych w surowicy. Zbiór walidacyjny posłużył niezależnej walidacji skuteczności diagnostycznej biomarkerów.

200 ekstraktów surowicy (100 od pacjentów z rakiem i 100 z grupy kontrolnej) poddanych zostało analizie NMR, identyfikując 39 różnych związków w każdej próbce. Dwa metabolity, 3-hydroksymaślan i octan, wykazywały statystycznie znaczące różnice w stężeniu między grupą chorych na raka i grupą kontrolną. Poziomy 3-hydroksymaślanu były znacznie wyższe u pacjentów z rakiem, podczas gdy poziomy octanu były zauważalnie niższe. Następnie, zebrane dane dotyczące metabolitów zostały podzielone na dwie grupy: treningowy zbiór danych (80 pacjentów z rakiem i 80 kontroli) - w celu opracowania modelu oraz walidacyjny zbiór danych (20 pacjentów z rakiem i 20 kontroli) - w celu oceny wydajności modelu. Analiza głównych składowych (PCA) wykazała dobrą separację między grupami nowotworowymi i kontrolnymi w obu zestawach danych. Następnie zastosowano analizę OPLS-DA celem szkolenia modelu na zidentyfikowanych metabolitach. Model wykazał silną separację między grupami nowotworowymi i kontrolnymi. Dalsza analiza modelu OPLS-DA ujawniła szereg metabolitów o istotnej korelacji z separacją grup. Metabolity, takie jak octan, propionian, piroglutaminian i cholina, wykazywały dodatnie korelacje, podczas gdy izomaślan - ujemną. W zestawie walidacyjnym wszystkie metabolity poza piroglutaminianem wykazały istotność w zdolności do rozróżniania między grupami. Następnie przeprowadzono analizę krzywej charakterystyki operacyjnej odbiornika (ROC) na zestawach treningowych i walidacyjnych w celu oceny potencjału diagnostycznego wybranych metabolitów. Wszystkie cztery metabolity (octan, propionian, cholina i izomaślan) wykazywały wysokie wartości AUC (>0,82), przy czym izomaślan okazał się najbardziej znaczącym biomarkerem, uzyskując najwyższe wyniki w zakresie AUC (>0,953), swoistości (0,9) i czułości (0,9). Następnie skonstruowano model klasyfikacji ROC, zbudowany przy użyciu MetaboAnalyst 5.0 oparty na algorytmie random forest. Podejście to obejmowało połączone poziomy tych czterech metabolitów, okazując się lepszym dyskryminatorem (z AUC >0,999) niż każdy metabolit osobno.

W celu ustalenia czy analiza metabolomiczna NMR może rozróżnić surowice z pochodzącymi od pacjentów z nowotworami z różnymi stopniami złośliwości histopatologicznej, przeprowadzono analizy PCA i OPLS-DA na całym zbiorze danych metabolitów. Analiza obejmowała 95 próbek surowicy od pacjentów z rakiem pęcherza moczowego; wykluczono 3 próbki od pacjentów z PUNLMP i 2 próbki od pacjentów z guzem mieszanym HG + LG. Ostatecznie wykorzystano 41 ekstraktów surowicy od pacjentów z rakiem HG i 54 próbki od pacjentów z rakiem LG. **Zarówno analiza PCA jak i OPLS-DA wykazały niewielką, ale statystycznie istotną separację pomiędzy grupami LG vs. HG.** Następnie zidentyfikowano 15 następujących metabolitów przyczyniających się do tej niewielkiej separacji: leucyna, histydyna, alanina, 3-metylo-2-oksowalerianian, tyrozyna,

fenyloalanina, cholina, tryptofan, hipoksantyna, asparagina, walina, prolina, treonina, 2-hydroksymaślan i glutamina. Dalsza analiza ROC dla każdego metabolitu z osobną pozwoliła na selekcję 5 (leucyna, histydyna, alanina, 3-metylo-2-oksowalerianian i tyrozyna) o wartościach AUC większej niż 0,74. Następnie wyliczono AUC dla modelu opartego na połączeniu 5 wyselekcjonowanych metabolitów, które wynosiło 0,775.

Przeanalizowano również różnicę w profilach metabolicznych w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego z zastosowaniem NMR. Uwzględniono łącznie 88 próbek od pacjentów z rakiem nienaciekającym mięśniówki - NMIBC (pTa/pT1) i 12 próbek od pacjentów z rakiem naciekającym mięśniówkę - MIBC (pT2). **Wykresy PCA i OPLS-DA wykazały niewielką ale statystycznie istotną separację między pTa/pT1 a pT2 BC.** Wyselekcjonowano 12 metabolitów istotnych w różnicowaniu między stopniami zaawansowania raka pTa/pT1 i pT2: histydyna, alanina, tryptofan, glutamina, glicyna, metylohistydyna, cholina, izomaślan, treonina, fenyloalanina, leucyna i 3-metylo-2-oksowalerianian. Wszystkie miały wyższe stężenia w surowicach pTa/pT1. Dalsza analiza krzywej ROC pozwoliła na zawężenie listy do 9 metabolitów (histydyna, alanina, tryptofan, glutamina, glicyna, metylohistydyna, cholina, izomaślan i treonina), które wykazały największą zdolność dyskryminacyjną (AUC większe niż 0,75). Następnie obliczono nowe AUC dla tego udoskonalonego modelu (który teraz uwzględniał tylko te 9 metabolitów) - wynosiło 0,844. **Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w profilu metabolicznym pomiędzy surowicami pTa vs. pT1 vs. pT2.**

Dalsza analiza obejmowała badanie z zastosowaniem ICP-OES 116 próbek surowicy - 65 surowic nowotworowych i 51 kontrolnych. Określono stężenie łącznie dla 12 pierwiastków. Dane z analizy surowicy zostały podzielone losowo na dwa zestawy: treningowy (42 surowice kontrolne i 52 surowice nowotworowe) oraz walidacyjny (10 surowic kontrolnych i 13 surowic nowotworowych). Wykres PCA ujawnił tendencję do oddzielania obu grup w zestawie treningowym. Z kolei analiza OPLS-DA pozwoliła na nieco lepsze zróżnicowanie między pacjentami z rakiem a osobami kontrolnymi. Trzy pierwiastki - Cu, Fe, Li - wyróżniły się w rozróżnianiu grup badawczych. Po przeprowadzeniu walidacji modelu, tylko Cu i Fe zostały uznane za znaczące dyskryminatory obu grup. Wykres S analizy OPLS-DA dla zestawu treningowego pokazał, że Fe był ujemnie skorelowany z rozdzielaniem grup ($P(\text{corr})[1] < 0,5$), co wskazuje na znacznie wyższe stężenie tego pierwiastka w surowicy pacjentów z BC w porównaniu z grupą kontrolną. Li natomiast wykazał dodatnią korelację z rozdzielaniem grup ($P(\text{corr})[1] > 0,5$), co sugeruje wyższe stężenie tego pierwiastka w próbkach surowicy osób kontrolnych. Analiza ROC wskazała Fe jako najbardziej znaczący pierwiastek, z wartością AUC wynoszącą 0,850, czułością 0,8 i swoistością 0,8. Dla Li wartość AUC wyniosła 0,710, czułość - 0,8, a swoistość - 0,6. Wydajność modelu ICP-OES w rozróżnianiu próbek rakowych od kontrolnych oceniono na podstawie tych dwóch wybranych pierwiastków (Fe i Li). Model wykazał wartość AUC wynoszącą 0,807, co sugeruje dobrą moc dyskryminacyjną między grupą BC i NC.

Analizę surowicy z zastosowaniem LDI-MS przeprowadzono na 100 surowicach nowotworowych i 100 surowicach kontrolnych. W tym celu zastosowano dwie metody analityczne: PFL-2D GS LASiS AuNPs LDI-MS i PFL-2D GS LASiS ¹⁰⁹AgNPs LDI-MS, co pozwoliło na identyfikację odpowiednio 335 i 650 wartości *m/z*. Zebrane dane poddano analizie statystycznej, dzieląc je na dwa podzbiory: treningowy, zawierający 160 próbek (80 od osób z rozpoznaniem raka pęcherza moczowego (BC), 80 od osób zdrowych (NC)),

oraz walidacyjny składający się z 40 próbek (20 BC i 20 NC). Zastosowanie metod 2D-PCA i OPLS-DA dla danych uzyskanych za pomocą analizy ^{109}Ag NPs LDI-MS pozwoliło na wyraźne rozróżnienie między próbkami surowicy od osób z rozpoznaniem raka pęcherza moczowego i grupy kontrolnej w obu podzbiorach. Udało się zidentyfikować 216 wspólnych cech m/z . Spośród nich 96 wartości m/z było obecnych w większej ilości w surowicy pacjentów z BC, natomiast 119 cech prezentowało odwrotną tendencję. Co istotne, połączenie wartości m/z okazało się lepszym dyskriminatorem pomiędzy grupami BC i NC (AUC >0.99) niż niezależna ocena każdej cechy m/z (AUC >0,73). Następnie, zidentyfikowane cechy widma masowego porównano z bazami danych metabolitów, co umożliwiło domniemaną identyfikację 17 naturalnie występujących w organizmie człowieka metabolitów. Podobne wyniki przyniosła analiza danych uzyskanych za pomocą techniki PFL-2D GS LASiS AuNPs LDI-MS. W tym przypadku również zaobserwowano wyraźne różnice między surowicą od osób z rozpoznaniem raka pęcherza moczowego a surowicą od osób zdrowych przy zastosowaniu analizy PCA i OPLS-DA. Analiza pozwoliła na identyfikację 172 wspólnych cech. Spośród nich 44 wartości m/z były obecne w większej ilości w surowicy od osób z rozpoznaniem raka pęcherza moczowego, podczas gdy 128 cech prezentowało odwrotną tendencję. Tak jak w poprzednim przypadku, bardziej efektywne okazało się wykorzystanie połączonej oceny cech widma masowego (AUC >0.99), w porównaniu z wartościami AUC pojedynczych metabolitów. Kolejno zidentyfikowane cechy widma masowego porównano z bazami danych metabolitów, co umożliwiło identyfikację 8 metabolitów występujących w organizmie człowieka.

4.3 Analiza metabolomiczna moczu

Untargeted urinary metabolomics for bladder cancer biomarker screening with ultrahigh-resolution mass spectrometry. *Scientific Reports*, 2023.

J. Nizioł, K. Ossoliński, A. Płaza-Altamer, A. Kołodziej, A. Ossolińska, T. Ossoliński, A. Nieczaj, T. Ruman

Badanie miało na celu analizę metabolomiczną moczu na potrzeby poszukiwania potencjalnych biomarkerów raka pęcherza moczowego. Do analizy użyto spektrometrii mas o ultra-wysokiej rozdzielczości (UHRMS) w połączeniu z ultra-wysokosprawną chromatografią cieczową (UHPLC) na próbkach moczu pobranych od 100 chorych na raka pęcherza moczowego (BC) oraz 100 osób z grupy kontrolnej (NC), uwzględniając stopień zaawansowania klinicznego i stopień złośliwości histopatologicznej. Próbki moczu podzielono na dwie części: zestaw treningowy zawierający 70% wszystkich próbek oraz zestaw walidacyjny z pozostałymi 30%. Metaboliczne profilowanie moczu wykonano oddzielnie dla obu zestawów. Zestaw treningowy posłużył do wykrycia biomarkerów diagnostycznych w moczu, natomiast zestaw walidacyjny wykorzystano do niezależnego potwierdzenia skuteczności wykrytych biomarkerów.

Analiza spektrometryczna wykazała łącznie 2969 wartości m/z (metabolitów) w treningowym i walidacyjnym zbiorze danych. Analiza PCA wykazała dobrą separację między pacjentami z rakiem a grupą kontrolną bazując na różnych profilach metabolitów. Nadzorowana analiza wielowymiarowa z wykorzystaniem OPLS-DA dodatkowo podkreśliła różnice metaboliczne między grupami BC i kontrolnymi. Kolejne testy permutacyjne potwierdziły dokładność modelu OPLS-DA. Następnie przeprowadzono analizę ROC, zarówno na zestawach treningowych, jak i walidacyjnych, aby ocenić zdolność diagnostyczną modeli. Powierzchnia pod krzywą ROC (AUC) została wykorzystana do analizy czułości i swoistości biomarkerów. Na podstawie wartości AUC $>0,7$ w połączeniu z VIP >1 z modelu OPLS-DA i niezależnych testów t (wartość p i FDR $<0,05$), wybrano 464 zmienne w zbiorze treningowym i 548 zmiennych w zbiorze walidacyjnym, które uznano za istotne.

Następnie wyselekcjonowano wspólny zestaw 51 wartości m/z , z czego 20 udało się przyporządkować określonym związkom chemicznym. 5 z 51 wybranych metabolitów wykazywało bardzo wysokie wartości AUC ($>0,9$), co wskazuje na doskonałą zdolność dyskryminacyjną między próbkami moczu pochodzącego od pacjentów z nowotworem i kontrolnych. Połączenie metabolitów z zestawu treningowego i walidacyjnego świetnie różnicuje pomiędzy grupami BC vs. NC, z AUC $> 0,979$.

Dodatkowe analizy PCA i OPLS DA zostały wykonane na zbiorach danych treningowych (70 NC, 30 pacjentów z HG i 38 pacjentów z LG) oraz walidacyjnych (30 NC, 12 pacjentów z HG i 17 pacjentów z LG). Miały na celu zweryfikowanie, czy badanie metabolomiczne próbek moczu mogłoby służyć do rozróżniania stopni złośliwości histopatologicznej. Z analizy wyłączono pacjentów z PLUMP z powodu ich niewielkiej liczebności. W ramach zestawów treningowych i walidacyjnych, wykresy wyników PCA i OPLS-DA ujawniły wyraźną separację

między grupami kontrolnymi a grupami nowotworowymi o różnym stopniu złośliwości histopatologicznej (LG vs. NC i HG vs. NC). Kolejne testy permutacyjne potwierdziły dokładność modelu OPLS-DA. **Niemniej jednak na wykresie PCA nie zaobserwowano znaczących różnic pomiędzy pacjentami z LG vs. HG.** W modelu OPLS-DA porównującym LG BC z NC, uznano 26 wykrytych związków chemicznych za znaczące (VIP >1, wartość p <0,05) zarówno w zestawie treningowym, jak i walidacyjnym, zaś do analizy porównującej HG BC z NC wyselekcjonowano 63 związki spełniające te kryteria. 2 z 26 metabolitów w modelu LG vs. NC i 13 z 63 w modelu HG vs. NC miały wartości AUC powyżej 0,9.

Aby zidentyfikować różnice pomiędzy stopniami zaawansowania klinicznego raka pęcherza moczowego, stworzono modele PCA i OPLS-DA. 68 próbek moczu od pacjentów z pTa BC podzielono na grupy treningowe (70 NC, 47 pTa BC) i walidacyjne (30 NC, 21 pTa BC). 19 próbek moczu od pacjentów z pT1 BC również podzielono na grupy treningowe (70 NC, 15 pT1 BC) i walidacyjne (30 NC, 5 pT1 BC). W przypadku stadium pT2 BC ze względu na małą liczbę próbek przeprowadzono analizę bez podziału grupy treningowe i walidacyjne (30 NC, 12 pT2 BC). Wykresy wyników PCA i OPLS-DA wykazały wyraźną separację między NC a poszczególnymi stadiami BC (pTa vs. NC, pT1 vs. NC, i pT2 vs. NC). Testy permutacji potwierdziły duże zróżnicowanie profili metabolitów między tymi grupami. Skuteczność trzech modeli w różnicowaniu pomiędzy stopniami zaawansowania klinicznego pTa, pT1 i pT2 oraz NC oceniono za pomocą analizy krzywej ROC. Opierając się na kryteriach odcięcia (FC >2 lub <0,5, VIP >1; AUC >0.7, wartość p i FDR <0,05) wyselekcjonowano kolejno 19, 68 i 81 związków chemicznych, które najlepiej rozróżniały próbki moczu pomiędzy stadiami pTa BC vs. NC, pT1 BC vs. NC i pT2 BC vs. NC. **Porównanie trzech stopni zaawansowania nowotworu pomiędzy sobą (pT1 vs. pTa vs. pT2) nie wykazało istotnych różnic statystycznych.**

Targeted and untargeted urinary metabolic profiling of bladder cancer. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2023

K. Ossoliński, T. Ruman, V. Copié, B.P. Tripet, A. Kołodziej, A. Płaza-Altamer, A. Ossolińska, T. Ossoliński, A. Nieczaj, J. Nizioł

W niniejszej pracy zbadano profile metabolitów 200 próbek moczu uzyskanych od 100 pacjentek z rakiem pęcherza moczowego (BC) i 100 zdrowych osób (NC), z wykorzystaniem celowanego i niecelowanego podejścia profilowania metabolomicznego. Zastosowane techniki analityczne obejmowały wysokiej rozdzielczości ¹H NMR oraz spektrometrię mas opartą na nanocząstkach złota i srebra generowanych laserowo (PFL-2D GS LASiS AuNPs LDI-MS oraz PFL-2D GS LASiS ¹⁰⁹AgNPs LDI-MS). Do analizy statystycznej danych NMR wykorzystano 99 próbek moczu. W przypadku jednej próbki nie można było uzyskać odpowiednio wysokiej jakości widm NMR. Próbkę moczu zostały podzielone na dwie grupy, zestaw treningowy, obejmujący n = 70 próbek BC i NC oraz zestaw walidacyjny obejmujący pozostałe n=30 BC i NC. Profilowanie metaboliczne surowicy przeprowadzono niezależnie na obu zestawach danych. Zbiór treningowy został wykorzystany do identyfikacji markerów diagnostycznych w moczu. Zbiór walidacyjny posłużył niezależnej walidacji skuteczności diagnostycznej biomarkerów.

Analiza próbek moczu z zastosowaniem ^1H NMR o wysokiej rozdzielczości pozwoliła na zidentyfikowanie 39 metabolitów, które wykazywały znaczące różnice w stężeniach między próbkami BC i NC. Zebrane dane NMR podzielono na podzbiory treningowe i walidacyjne w celu skutecznej budowy i weryfikacji modelu. Analiza głównych składowych (PCA) obu zestawów danych wykazała wyraźną separację między grupami BC i NC. Następnie przeprowadzono analizę OPLS-DA na potrzeby zbadania zakresu różnic metabolicznych między grupami BC i NC, w wyniku której uzyskano znaczącą separację grup w obu zestawach danych. Analiza krzywej ROC wraz z określeniem VIP została przeprowadzona na obu zestawach w celu oceny skuteczności diagnostycznej modeli OPLS-DA. Wyselekcjonowano odpowiednio 15 i 16 metabolitów w zestawie treningowym i walidacyjnym na podstawie połączonej analizy wyników VIP (> 1), testów t (wartości p i FDR $< 0,05$) oraz analizy powierzchni pod krzywą ROC (AUC $> 0,7$). 12 z nich powtarzało się w obydwu zestawach. Ostatecznie 5 metabolitów zostało zidentyfikowanych jako istotne na podstawie parametru FC > 2 lub $< 0,5$ (trygonelina, hipuran, mocznik, mannitol i 4-hydroksyfenylooctan). Potencjał diagnostyczny tych 5 metabolitów oceniono za pomocą analiz krzywej ROC i modelowania random forest, które wykazały wysoki potencjał dyskryminacji (AUC $> 0,828$) między dwiema grupami w obydwu zestawach danych. Najbardziej obiecujące wyniki zaobserwowano dla trygoneliny, mocznika, mannitolu i 4-hydroksyfenylooctanu, z których wszystkie osiągnęły wartości AUC większe niż 0,8.

Celem identyfikacji metabolitów rozróżniających pomiędzy stopniem złośliwości histopatologicznej zastosowano analizę statystyczną, która obejmowała PCA, OPLS-DA i jednokierunkowe analizy ANOVA zarówno na zestawach danych treningowych, jak i walidacyjnych. Pula próbek składała się z 95 próbek moczu od pacjentów z rakiem o wysokim stopniu złośliwości (HG) i niskim stopniu złośliwości (LG), z wyłączeniem próbek od pacjentów z brodawkowatym nowotworem urotelialnym o niskim potencjale złośliwości (PUNLMP). Zbiory danych treningowych i walidacyjnych zostały wykorzystane odpowiednio do trenowania i walidacji modelu PCA. Zestaw treningowy składał się z 29 próbek HG, 36 LG i 69 NC, podczas gdy zestaw walidacyjny zawierał 11 próbek HG, 18 próbek LG i 30 NC. Zarówno w zestawie treningowym, jak i walidacyjnym, wykresy wyników PCA i OPLS-DA wykazały separację między grupami kontrolnymi i nowotworowymi (LG BC vs. NC i HG BC vs. NC). **Rozróżnienie pomiędzy LG vs HG na wykresie PCA było jedynie marginalne (nieistotne statystycznie)**. Trzy metabolity, a mianowicie trygonelina, hipuran i mannitol, okazały się statystycznie istotne (VIP > 1 , wartość p, FDR $< 0,05$, FC $< 0,5$ lub > 2 , AUC $> 0,7$) w modelu OPLS-DA dla grup LG BC vs. NC oraz HG BC vs. NC, zarówno w zestawie treningowym jak i walidacyjnym. Chociaż nienadzorowana analiza PCA nie zdołała rozróżnić grup na podstawie różnych stopni złośliwości histopatologicznej (LG vs. BC), z powodzeniem rozróżniała nowotworowe i kontrolne próbki moczu.

Następna analiza z zastosowaniem NMR posłużyła do próby identyfikacji metabolitów rozróżniających pomiędzy stopniami zaawansowania klinicznego. W tym celu zastosowano analizę statystyczną, która obejmowała PCA, OPLS-DA i jednokierunkowe analizy ANOVA zarówno na zestawach danych treningowych, jak i walidacyjnych.

Zbiór danych obejmował próbki moczu od 87 pacjentów z nieinwazyjnym rakiem pęcherza moczowego - NMIBC (pTa i pT1) oraz 12 pacjentów z naciekającym mięśniówką rakiem pęcherza moczowego - MIBC (pT2). Zostały one podzielone na zestaw treningowy (n=48 pTa i n=69 NC) i zestaw walidacyjny (n=20 pTa i n=30 NC). Ze względu na ograniczoną liczbę próbek w przypadku stadiów pT1 (n=34) i pT2 (n=12) analiza przeprowadzono jako jeden zestaw, bez podziału na treningowy i walidacyjny. Wykresy wyników PCA i OPLS-DA wykazały dobrą separację między próbkami kontrolnymi (NC) a różnymi stadiami BC (pTa vs. NC, pT1 vs. NC i pT2 vs. NC). Analiza krzywej ROC dodatkowo potwierdziła skuteczność modeli w rozróżnianiu stadiów pTa, pT1 i pT2 BC i NC. Bazując na ustalonych kryteriach odcięcia (FC >2 lub <0,5, VIP >1; AUC 0,7, wartość p i FDR <0,05), wyselekcjonowano metabolity mające największe znaczenie dla rozróżnienia między grupami pTa BC vs. NC (6 metabolitów), pT1 BC vs. NC (10 metabolitów) oraz pT2 BC vs. NC (7 metabolitów). **W badaniu nie stwierdzono jednak statystycznie istotnych różnic we wzorcach metabolitów, które mogłyby odróżnić między sobą trzy stopnie zaawansowania klinicznego (pT1 vs. pTa vs. pT2).**

Analiza metabolomiczna próbek moczu z zastosowaniem LDI-MS obejmowała metody PFL-2D GS LASiS AuNPs i PFL-2D GS LASiS ¹⁰⁹AgNPs LDI-MS. Do analizy wykorzystano 200 próbek moczu. Łącznie uzyskano 690 cech MS różnicujących grupy. Zbiór danych został podzielony na zestaw treningowy (n=70 BC i n=70 NC) i zestaw walidacyjny (n=30 BC i n=30 NC). Zarówno analizy PCA, jak i OPLS-DA doprowadziły do wyraźnej separacji między grupą z rakiem pęcherza moczowego a grupą kontrolną na podstawie ich profili metabolitów w moczu. Aby zidentyfikować najbardziej dyskryminujące cechy widma masowego między grupami BC i NC, wybrano metabolity charakteryzujące się wartością VIP >1 z modelu OPLS-DA.

- Analiza PFL-2D GS LASiS ¹⁰⁹AgNPs LDI-MS

Zidentyfikowano 74 cechy widma masowego (*m/z*) wspólne dla zbiorów danych treningowych i walidacyjnych, które spełniały określone kryteria (wartość VIP >1, wartość p <0,05, FC <0,5 lub >1,8 oraz AUC >0,7). Dalszą analizę eksploracyjną ROC, opartą na algorytmie random forest, przeprowadzono w celu zidentyfikowania najbardziej dyskryminujących cech spektralnych *m/z* między grupami BC i kontrolnymi. 50-cechowy panel w zestawie treningowym i 100-cechowy panel w zestawie walidacyjnym wykazały doskonałą siłę dyskryminacji (AUC >0,97).

- Analiza PFL-2D GS LASiS PFL-2D GS LASiS AuNPs

W analizie obu podzbiorów (treningowego i walidacyjnego) znaleziono 98 wspólnych cech z wynikami VIP >1, wartością p <0,05, FC <0,5 lub >1,8 i AUC >0,7. Spośród nich, 49 było bardziej obfitych w próbkach moczu pacjentów z rakiem pęcherza moczowego, a 49 cech wykazywało odwrotną tendencję. Identyfikację przypuszczalnych związków wybranych cech widma masowego przeprowadzono poprzez porównanie obserwowanych cech widmowych ze związkami obecnymi w bazach danych metabolitów. 25cech widma masowego przypisano do metabolitów występujących u ludzi.

Podsumowanie i wnioski

Badanie pt. "Metabolomiczna analiza tkanki, surowicy i moczu w poszukiwaniu potencjalnych biomarkerów raka pęcherza moczowego" miało na celu identyfikację biomarkerów raka pęcherza moczowego poprzez przeprowadzenie kompleksowego profilowania metabolomicznego próbek surowicy, moczu i tkanek. Według wiedzy autora jest to jedyne badanie łączące analizę zarówno wszystkich dostępnych próbek biologicznych jak i wszystkie dostępne metody analizy stosowanej w metabolomice. Obejmowało ono zaawansowane techniki, takie jak spektrometra mas, NMR do analizy profilu metabolomicznego raka pęcherza moczowego i rzadko stosowana metoda ICP-OES do analizy profilu elementomicznego. Badanie wykazało odmienne profile metabolomiczne pomiędzy pacjentami z rakiem pęcherza moczowego a grupą kontrolną. Zidentyfikowano metabolity, które na podstawie analizy statystycznej wykazują potencjał jako możliwe biomarkery diagnostyczne raka pęcherza moczowego.

Wyniki badania torują drogę do lepszego zrozumienia zmian metabolicznych związanych z rakiem pęcherza moczowego. Zidentyfikowane metabolity stanowią obiecujący kierunek rozwoju nieinwazyjnych narzędzi diagnostycznych i prognostycznych mogących poprawić wczesne wykrywanie raka pęcherza moczowego i wyniki jego leczenia. Konieczne są jednak dalsze badania walidacyjne w celu potwierdzenia tych ustaleń w większych i bardziej zróżnicowanych kohortach pacjentów.

Mocne strony badania:

- Kompleksowe podejście. W badaniu zastosowano kompleksowe podejście metabolomiczne i elementomiczne, badając próbki surowicy, moczu i tkanek, zapewniając w ten sposób całościowy obraz zmian metabolicznych zachodzących w raku pęcherza moczowego.
- Zaawansowane techniki. Zastosowanie zaawansowanych technik analitycznych (MS, NMR i ICP-OES) ułatwiło wykrycie i identyfikację szerokiego zakresu metabolitów, zwiększając szanse na znalezienie potencjalnych biomarkerów.
- Analiza ścieżek. Analiza zmienionych szlaków metabolicznych, a nie tylko poszczególnych metabolitów, zapewnia głębsze zrozumienie mechanizmu choroby i może pomóc w opracowaniu ukierunkowanych terapii.
- Potencjał dla testów nieinwazyjnych. Biorąc pod uwagę charakter zidentyfikowanych biomarkerów, istnieje możliwość opracowania nieinwazyjnych testów do diagnozowania i monitorowania raka pęcherza moczowego, co może poprawić dokładność diagnostyczną, obniżyć koszty diagnostyki i monitorowania pacjentów z rakiem pęcherza moczowego, jednocześnie zwiększając komfort i przestrzeganie zaleceń przez pacjentów.

W publikacji pt. **“Monoisotopic silver nanoparticles-based mass spectrometry imaging of human bladder cancer tissue: Biomarker discovery”** przeanalizowano fragmenty tkanek pochodzące od pacjentów z rakiem pęcherza moczowego. Poza zidentyfikowaniem poszczególnych metabolitów rozróżniających tkankę nowotworową i kontrolną przeanalizowano dodatkowo szlaki metaboliczne, w których występują, oraz określono ich związek z nowotworzeniem. Analiza ujawniła wyraźne różnice między nowotworową a prawidłową tkanką pęcherza moczowego, wskazując na potencjał tych metabolitów jako markerów diagnostycznych raka pęcherza moczowego. Lipidy odegrały znaczącą rolę wśród zidentyfikowanych biomarkerów, odzwierciedlając ich zaangażowanie w różne procesy komórkowe oraz podkreślając znaczenie w metabolizmie nowotworów i szlakach sygnałowych. Aminokwasy, takie jak glicyna i glutamina, wykazywały obniżone poziomy w tkance nowotworowej, co sugeruje ich potencjał jako wskaźników metabolizmu guza poprzez zwiększone zapotrzebowanie w procesie proliferacji komórek nowotworowych. Inne metabolity z różnych klas chemicznych, w tym aldehydy, osmoprotektanty i związki organiczne, zostały również zidentyfikowane jako potencjalne biomarkery. Integracja wielowymiarowej analizy statystycznej pozwoliła na kompleksową ocenę potencjału diagnostycznego zidentyfikowanych metabolitów. Wykazano również, że wartość AUC dla grupy metabolitów jest wyższa niż każdego z nich oddzielnie, wskazując na znaczenie uwzględnienia grupy metabolitów celem poprawy ich dokładności diagnostycznej. Wysokie wartości AUC uzyskane z analizy ROC sygnalizują na potencjalną użyteczność kliniczną tych metabolitów jako narzędzi diagnostycznych w przypadku raka pęcherza moczowego, mających potencjał choćby do wspomaganie analizy histopatologicznej - zastosowanie metody obrazowania LDI-MSI pozwoliło na graficzne zobrazowanie w przestrzeni dwuwymiarowej rozkładu poszczególnych metabolitów.

W publikacjach pt. **“Untargeted ultra-high-resolution mass spectrometry metabolomic profiling of blood serum in bladder cancer.”** oraz **“Metabolomic and elemental profiling of blood serum in bladder cancer.”** przeanalizowano surowice pochodzące od pacjentów z rakiem pęcherza moczowego oraz surowice kontrolne. W pierwszej publikacji zastosowano ultra-wysokowydajną chromatografię cieczową (UHPLC) połączoną z ultra-wysokorozdzielczą spektrometrią mas (UHRMS) do niecelowanego profilowania metabolomicznego 200 próbek ludzkiej surowicy, aby zidentyfikować sygnatury biochemiczne różnicujące raka pęcherza moczowego od surowic kontrolnych. Jedno- i wielozmiennowe analizy statystyczne z zewnętrzną walidacją wykazały 27 metabolitów różnicujących surowice pochodzące od pacjentów z rakiem pęcherza i kontrolne. Obfitość tych metabolitów wykazywała istotne różnice statystyczne w dwóch niezależnych zestawach szkoleniowych i walidacyjnych. Zidentyfikowano również 23 metabolity różnicujące surowice pochodzące od pacjentów z rakiem o niskim i wysokim stopniu złośliwości histopatologicznej w porównaniu z surowicami kontrolnymi. 37 metabolitów w surowicy różnicowało odmienne stadia zaawansowania klinicznego BC w porównaniu z surowicami kontrolnymi. Nie stwierdzono jednak statystycznie istotnych różnic w profilach metabolicznych w analizie porównawczej pomiędzy poszczególnymi stopniami złośliwości histopatologicznej i zaawansowania klinicznego. Poza zidentyfikowaniem poszczególnych metabolitów przeanalizowano również szlaki metaboliczne, w których dane związki występują, oraz określono ich korelację z nowotworzeniem. Wyniki sugerują, że pomiar metabolitów w surowicy z zastosowaniem spektrometrii może zapewnić dokładną i mało inwazyjną metodę diagnostyczną do wykrywania raka pęcherza moczowego.

W publikacji pt. **“Metabolomic and elemental profiling of blood serum in bladder cancer”** wykazano, że kompleksowy zestaw narzędzi obejmujący NMR o wysokiej rozdzielczości, ICP-OES i LDI-MS w połączeniu z wielowymiarową analizą statystyczną jest potężnym narzędziem do analizy zmian metabolomicznych i elementomicznych zachodzących w raku pęcherza moczowego. W kontekście identyfikacji biomarkerów za pomocą spektroskopii ^1H NMR, zidentyfikowano 4 potencjalne biomarkery metaboliczne, które wykazały potencjał predykcyjny z $\text{AUC} > 0,999$ do rozróżniania surowicy nowotworowej z kontrolną. Zaobserwowano również, że stężenia żelaza i litu różniły się znacząco w surowicy zdrowych osób w porównaniu z pacjentami z rakiem pęcherza moczowego. Co więcej, wyniki LDI-MS ujawniły 22 związki, głównie (glikosfingo)lipidy, które mogą różnicować próbki nowotworowe i kontrolne. Wyselekcjonowano 5 metabolitów, które mogą potencjalnie służyć jako biomarkery do rozróżniania raka pęcherza moczowego o niskim stopniu złośliwości (LG) i raka pęcherza moczowego o wysokim stopniu złośliwości (HG), a także 9 metabolitów, które mogą pomóc w rozróżnieniu stadiów zaawansowania choroby pTa/pT1 (NMIBC) i pT2 (MIBC). Nie stwierdzono jednak istotnych statystycznie różnic w profilu metabolicznym pomiędzy surowicami pTa vs. pT1 vs. pT2. Wyniki te podkreślają znaczenie zróżnicowanych profili metabolitów w surowicy nie tylko w procesie rozróżniania surowicy od pacjentów z rakiem pęcherza moczowego (BC) od surowicy zdrowych osób (NC), ale także w kontekście zdolności do rozróżniania pomiędzy rakiem NMIBC i MIBC oraz rozróżnieniem pomiędzy stopniami złośliwości histopatologicznej. Poza zidentyfikowaniem poszczególnych metabolitów, przeanalizowano szlaki metaboliczne w których występują oraz określono ich związek z nowotworzeniem. Badanie wykazało też, że wartość predykcyjna dla połączonych profili metabolitów jest wyższa w porównaniu z pojedynczymi związkami.

W publikacjach pt. **“Untargeted urinary metabolomics for bladder cancer biomarker screening with ultrahigh-resolution mass spectrometry”** oraz **“Targeted and untargeted urinary metabolic profiling of bladder cancer”** przeanalizowano próbki moczu pochodzące od pacjentów z rakiem pęcherza moczowego oraz próbki moczu kontrolne. W pierwszej publikacji zastosowano spektrometrię mas o ultra-wysokiej rozdzielczości w dokładnej identyfikacji różnic w metabolomie moczu pacjentów z rakiem pęcherza moczowego (BC). Zidentyfikowano liczne metabolity, które mogą potencjalnie w sposób bezinwazyjny różnicować próbki moczu pacjentów z rakiem pęcherza moczowego od próbek moczu osób zdrowych. Poza wskazaniem poszczególnych metabolitów, przeanalizowano szlaki metaboliczne w których występują. Nie udało się jednak zidentyfikować metabolitów, różnicujących próbki moczu pomiędzy odmiennymi stopniami zaawansowania klinicznego i stopniami złośliwości histopatologicznej. Odkrycia te mogą odegrać znaczącą rolę w opracowaniu prostych, nieinwazyjnych i wysoce czułych testów diagnostycznych zdolnych do wykrywania raka pęcherza moczowego.

W publikacji pt. **“Targeted and untargeted urinary metabolic profiling of bladder cancer”** zastosowano zaawansowane techniki analityczne, takie jak NMR o wysokiej rozdzielczości i LDI-MS do analizy profilu metabolomicznego moczu u pacjentów z rakiem pęcherza moczowego. Podejście to doprowadziło do wykrycia 5 potencjalnych biomarkerów raka pęcherza moczowego - 4-hydroksyfenylooctan, hipuran, mannitol, trygonelina i mocznik. Metabolity te łącznie wykazywały doskonałą zdolność predykcyjną do rozróżniania między moczem pochodzącym od pacjentów z rakiem pęcherza moczowego i kontrolnych, z wartościami AUC przekraczającymi 0,82. Dzięki zastosowaniu technik LDI-MS

zidentyfikowano szereg dodatkowych związków tj. związki aromatyczne, aminokwasy oraz kwasy karboksylowe i ich pochodne. Poza ujawnieniem poszczególnych metabolitów, przeanalizowano szlaki metaboliczne w których występują. Nie zidentyfikowano metabolitów różnicujących moczy pochodzących od pacjentów z różnymi stopniami zaawansowania klinicznego i stopniami złośliwości histopatologicznej. Zbierając powyższe w badaniu wykazano, że identyfikacja zmian metabolicznych w moczu może utworzyć drogę do opracowania nieinwazyjnej metody diagnostycznej do diagnozowania oraz monitorowania leczenia pacjentów z rakiem pęcherza moczowego.

Podsumowując, wszystkie główne i poboczne cele badawcze zostały zrealizowane. Jednym z ograniczeń badania jest stosunkowo mała grupa badawcza (12 pacjentów) z rakiem pęcherza moczowego naciekającego mięśniówkę (MIBC), co może się przekładać na niską istotność statystyczną wyników porównujących grupy pTa/pT1 (NMIBC) vs. MIBC (pT2). W planowaniu kolejnych badań ten element musi być uwzględniony. Dodatkowo zdefiniowano inne ograniczenia badania, które również należy uwzględnić w dalszych badaniach:

- Walidacja wyników. Biomarkery zidentyfikowane w tym badaniu wymagają walidacji w większych, niezależnych kohortach, a ich użyteczność kliniczna musi zostać oceniona w prospektywnych badaniach klinicznych, zanim zostaną one przyjęte do praktyki klinicznej.
- Potrzeba badań prospektywnych. Chociaż niniejsze badanie dostarcza istotnych informacji na temat potencjalnych biomarkerów raka pęcherza moczowego, wyniki te są zasadniczo wstępne. Zidentyfikowane potencjalne biomarkery wymagają dalszej walidacji w większych i bardziej zróżnicowanych populacjach pacjentów. Co więcej, skuteczność kliniczna tych biomarkerów musi zostać oceniona w badaniach prospektywnych, zanim zostaną one włączone do praktyki klinicznej. Konieczne jest wykazanie ich wartości w stosunku do istniejących metod diagnostycznych i prognostycznych poprzez badania porównujące różne metody.
- Potrzeba specjalistycznego sprzętu. Podczas gdy spektrometry mas stosowane są przez liczne laboratoria w Polsce i na świecie do mikrobiologii i toksykologii wdrożenie możliwości identyfikacji poszczególnych biomarkerów wymagałoby opracowania ustandaryzowanych wzorców do ich identyfikacji i kwantyfikacji. Spektroskopy jądrowego rezonansu magnetycznego to narzędzia bardzo drogie służące jak na razie tylko do celów badawczych i naukowych.
- Określenie dokładnych stężeń odkrytych biomarkerów. Podczas gdy MS jest bardziej czuła i może wykryć szerszy zakres metabolitów, często ma trudności z zapewnieniem bezwzględnej kwantyfikacji. Z drugiej strony, NMR, choć mniej czuły, zapewnia bardziej wiarygodne dane ilościowe. Dlatego też określenie konkretnych stężeń wykrytych biomarkerów może stanowić wyzwanie w zależności od zastosowanej metody analitycznej.
- Ograniczona przydatność kliniczna biomarkerów tkankowych. Mimo, że analiza metabolomiczna tkanek zapewnia cenny wgląd w biologię raka pęcherza moczowego, jej przełożenie na zastosowanie kliniczne stanowi wyzwanie. Inwazyjny charakter pobierania próbek tkanek, ich koszt i wymóg specjalistycznej infrastruktury do przechowywania i przetwarzania sprawiają, że biomarkery moczu i surowicy są bardziej pożądane do rutynowego stosowania klinicznego.

Streszczenie

Praca doktorska pt. "Metabolomiczna analiza tkanki, surowicy i moczu w poszukiwaniu biomarkerów raka pęcherza moczowego" stanowi cykl 5 artykułów opublikowanych w czasopismach posiadających wskaźnik impact factor. Jestem pierwszym autorem trzech publikacji oraz współautorem pozostałych dwóch. Temat pracy doktorskiej porusza zagadnienie metabolicznych biomarkerów nowotworowych raka pęcherza moczowego które mogłyby być potencjalnie wykorzystywane w praktyce klinicznej.

Artykuły przedstawiają metabolomiczną analizę tkanki nowotworowej, surowicy i moczu pochodzącej od 100 pacjentów z rakiem pęcherza moczowego w porównaniu z tkanką, surowicą i moczem kontrolnym pochodzących od 100 pacjentów z innymi, łagodnymi, schorzeniami w obrębie dróg moczowych. Zastosowane techniki analityczne obejmują wysokiej rozdzielczości ^1H NMR, ICP-OES i wysokiej rozdzielczości laserową desorpcję/ionizację MS (LDI-MS) opartą na nanocząstkach złota i srebra oraz spektrometrię mas o ultra-wysokiej rozdzielczości (UHRMS) w połączeniu z ultra-wysokosprawną chromatografią cieczową (UHPLC). Wielowymiarowa analiza statystyczna i analiza krzywej ROC pozwoliły na kompleksową ocenę potencjału diagnostycznego zidentyfikowanych metabolitów. Połączenie poziomów tych metabolitów poprawiło rozróżnienie między materiałem biologicznym pochodzącym od pacjentów z rakiem pęcherza moczowego w porównaniu z kontrolą, sugerując, że uwzględnienie wielu biomarkerów może być kluczowe dla precyzyjnej diagnozy. Dodatkowo analiza NMR próbek surowicy pozwoliła na wyselekcjonowanie metabolitów, które odróżniają raka NMIBC i MIBC oraz metabolitów różnicujących stopień złośliwości histopatologicznej (LG vs. HG). Wysokie wartości obszarów pod krzywymi ROC wskazują na potencjalne zastosowanie kliniczne tych metabolitów jako narzędzi diagnostycznych w przypadku raka pęcherza moczowego

Analizując dane z obrazowania MS, wyselekcjonowano 10 metabolitów różnicujących próbki tkanki nowotworowej od zdrowej, które wykazały wysoką dokładność diagnostyczną w analizie krzywej ROC, każdy z polem pod krzywą AUC >0.99 . Analiza szlaków pozwoliła na umiejscowienie tych metabolitów w 17 różnych szlakach metabolicznych.

Analiza surowicy z zastosowaniem metody ^1H NMR pozwoliła na identyfikację 4 metabolitów różnicujące surowice nowotworowe i kontrolne z doskonałą zdolnością predykcyjną określoną na podstawie pola pod krzywą AUC wynoszącą 0.999. Analiza z zastosowaniem ICP-OES zidentyfikowała dwa pierwiastki (Fe i Li) z polem pod krzywą AUC wynoszącą 0,807. Analiza z zastosowaniem spektrometrii mas LDI-MS oraz wysokorozdzielcza spektrometria mas UHRMS umożliwiła dodatkową identyfikację odpowiednio 25 i 27 metabolitów różnicujących obydwie grupy. Ponadto w analizie LDI-MS i UHRMS odpowiednio 5 i 23 metabolity wykazywały zdolność do rozróżnienia pomiędzy poszczególnymi stopniami złośliwości histopatologicznej (grade) a surowicą kontrolną oraz 9 i 37 metabolity, które rozróżniały pomiędzy poszczególnymi stopniami zaawansowania klinicznego (stage) a surowicą kontrolną. Wyselekcjonowano 5 metabolitów, które mogą potencjalnie służyć jako biomarkery do rozróżniania raka pęcherza moczowego o niskim stopniu złośliwości (LG) i raka pęcherza moczowego o wysokim stopniu złośliwości (HG), a także 9 metabolitów, które mogą pomóc w rozróżnieniu stadiów zaawansowania choroby

pTa/pT1 (NMIBC) i pT2 (MIBC). Analiza szlaków i wzbogacona analiza szlaków pozwoliły na umiejscowienie metabolitów w łącznie 24 różnych szlakach metabolicznych (17+7).

Próbki moczu poddano analizie ^1H NMR, LDI-MS oraz UHRMS. Zidentyfikowano odpowiednio 5, 25 i 51 metabolitów różnicujących mocz pochodzący od pacjentów z rakiem pęcherza moczowego w porównaniu z kontrolnymi próbkami moczu. Wszystkie metabolity z analizy ^1H NMR, LDI-MS charakteryzowały się wysoką wartością predykcyjną określoną na podstawie pola pod krzywą AUC > 0,87, zaś 5 z 51 metabolitów z analizy UHRMS charakteryzowało się bardzo wysokim wskaźnikiem AUC > 0,9. Udało się również zidentyfikować metabolity które rozróżniają pomiędzy poszczególnymi stopniami zaawansowania klinicznego i stopniami złośliwości histopatologicznej w porównaniu z kontrolnymi próbkami moczu. Nie zidentyfikowano jednak statystycznie istotnych różnic we wzorcach metabolitów, które rozróżniałyby między sobą poszczególne stopnie zaawansowania klinicznego (pTa vs. pT vs. pT2) lub stopnie złośliwości histopatologicznej (LG vs HG). Analiza szlaków i wzbogacona analiza szlaków obydwu publikacji dotyczących analizy metabolomicznej moczu pozwoliły na umiejscowienie metabolitów w łącznie 7 różnych szlakach metabolicznych (3+4).

Podsumowując wyniki tego badania dostarczają informacji na temat potencjalnych biomarkerów metabolicznych raka pęcherza moczowego oraz powiązanych z nim zmian metabolicznych zachodzących w raku pęcherza moczowego. Zidentyfikowane metabolity, na podstawie wyników analizy statystycznej, wykazują potencjał jako biomarkery diagnostyczne dla tego nowotworu. Analiza szlaków metabolicznych, w których występują te metabolity, oraz ich związek z procesami nowotworowymi dodatkowo umożliwiają lepsze zrozumienie patogenezy i biologii raka pęcherza moczowego. Dalsze badania i weryfikacja tych wyników może przyczynić się do rozwoju nowych strategii diagnostycznych i terapeutycznych z zakresu omawianej choroby.

Streszczenie po angielsku

The dissertation entitled: "Metabolomic analysis of tissue, serum and urine in the search for biomarkers of bladder cancer" is a series of 5 articles published in impact factor journals. I am the first author of three publications and co-author of the other two. The dissertation topic addresses the issue of metabolic tumor biomarkers for bladder cancer that could potentially be used in clinical practice.

The articles presents a metabolomic analysis of tumor tissue, serum and urine from 100 patients with bladder cancer compared to tissue, serum and control urine from 100 patients with other, benign, urinary tract conditions. Analytical techniques used include high-resolution ^1H NMR, ICP-OES and high-resolution laser desorption/ionization MS (LDI-MS) based on gold and silver nanoparticles, and ultra-high-resolution mass spectrometry (UHRMS) combined with ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC). Multivariate statistical analysis and ROC curve analysis allowed a comprehensive evaluation of the diagnostic potential of the identified metabolites. Combining the levels of these metabolites improved the distinction between biological material from bladder cancer patients compared to controls, suggesting that consideration of multiple biomarkers may be crucial for accurate diagnosis. In addition, NMR analysis of serum samples allowed the selection of metabolites that distinguish between NMIBC and MIBC cancers, as well as metabolites that differentiate cancer grades (LG vs. HG). The high values of the areas under the ROC curves indicate the potential clinical use of these metabolites as diagnostic tools for bladder cancer

Analyzing MS imaging data, 10 metabolites were found to differentiate samples of cancerous tissue from healthy tissue that showed high diagnostic accuracy in ROC curve analysis, each with an area under the curve AUC > 0,99. Pathway analysis placed these metabolites in 17 different metabolic pathways.

Serum analysis using ^1H NMR identified 4 metabolites differentiating tumor and control sera with excellent predictive ability as determined by the area under the AUC curve of 0.999. Analysis using ICP-OES identified 2 elements: Fe and Li with an area under the AUC curve of 0.807. Analysis using LDI-MS mass spectrometry and high-resolution UHRMS mass spectrometry allowed the additional identification of 25 and 27 metabolites, respectively, differentiating the two groups. In addition, in LDI-MS and UHRMS analysis, 5 and 23 metabolites, respectively, showed the ability to discriminate between different cancer grades and control serum, and 9 and 37 metabolites that discriminated between different cancer stage and control serum. 5 metabolites were selected that could potentially serve as biomarkers to distinguish between low-grade bladder cancer (LG) and high-grade bladder cancer (HG), as well as nine metabolites that could help distinguish between NMIBC (pTa/pT1) and MIBC (pT2). Pathway analysis and enriched pathway analysis located metabolites in a total of 24 different metabolic pathways (17+7).

Urine samples were subjected to ^1H NMR, LDI-MS and UHPLC-UHRMS analysis. A 5, 25 and 51 metabolites were identified, respectively, differentiating urine from bladder cancer patients compared to controls. All metabolites from the ^1H NMR, LDI-MS analysis had a high predictive value as determined by area under the curve AUC > 0,87, while 5 of the 51

metabolites from the UHPLC-UHRMS analysis had a very high AUC of more than 0,9. Moreover metabolites that discriminate between different clinical stages and grades in comparison to control urine samples were identified. However, no statistically significant differences in metabolite patterns were identified that distinguished between stages (pTa vs. pT1 vs. pT2) or grades (LG vs. HG). Pathway analysis and enriched pathway analysis of both publications on urine metabolomic analysis allowed us to locate metabolites in a total of 7 different metabolic pathways (3+4).

In summary, the results of this study provide information on potential metabolic biomarkers for bladder cancer and related metabolic changes occurring in bladder cancer. The identified metabolites, based on the results of statistical analysis, show potential as diagnostic biomarkers for this cancer. Analysis of the metabolic pathways involved in these metabolites and their association with tumorigenic processes further provides a better understanding of the pathogenesis and biology of bladder cancer. Further research and verification of these findings may contribute to the development of new diagnostic and therapeutic strategies for this disease.

Piśmiennictwo

1. *Cancer today*. (n.d.). Cancer Today. <http://gco.iarc.fr/today/home>
2. *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 - PubMed*. (2010, December 15). PubMed. <https://doi.org/10.1002/ijc.25516>
3. *American Cancer Society | Cancer Facts & Statistics*. (n.d.). American Cancer Society | Cancer Facts & Statistics. <http://cancerstatisticscenter.cancer.org/>
4. Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2018, January). Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21442>
5. Kiemeny, L. A. L. M. (2008, January 1). Hereditary bladder cancer. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, 42(sup218), 110–115. <https://doi.org/10.1080/03008880802283755>
6. Burger, M., Catto, J. W., Dalbagni, G., Grossman, H. B., Herr, H., Karakiewicz, P., Kassouf, W., Kiemeny, L. A., La Vecchia, C., Shariat, S., & Lotan, Y. (2013, February). Epidemiology and Risk Factors of Urothelial Bladder Cancer. *European Urology*, 63(2), 234–241. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.07.033>
7. Rink, M., Crivelli, J. J., Shariat, S. F., Chun, F. K., Messing, E. M., & Soloway, M. S. (2015, August). Smoking and Bladder Cancer: A Systematic Review of Risk and Outcomes. *European Urology Focus*, 1(1), 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2014.11.001>
8. Dryson, E., 't Mannetje, A., Walls, C., McLean, D., McKenzie, F., Maule, M., Cheng, S., Cunningham, C., Kromhout, H., Boffetta, P., Blair, A., & Pearce, N. (2007, November 20). Case-control study of high risk occupations for bladder cancer in New Zealand. *International Journal of Cancer*, 122(6), 1340–1346. <https://doi.org/10.1002/ijc.23194>
9. Rollinson, D., Knopp, S., Levitz, S., Stothard, J. R., Tchuem Tchuente, L. A., Garba, A., Mohammed, K. A., Schur, N., Person, B., Colley, D. G., & Utzinger, J. (2013, November). Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. *Acta Tropica*, 128(2), 423–440. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.04.013>
10. MacLennan, G. T., & Bostwick, D. G. (2019, April 15). *Urologic Surgical Pathology* (L. Cheng, Ed.). Saunders.
11. Humphrey, P. A., Moch, H., Cubilla, A. L., Ulbright, T. M., & Reuter, V. E. (2016, July). The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part B: Prostate and Bladder Tumours. *European Urology*, 70(1), 106–119. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.02.028>
12. Lopez-Beltran, A. (2008, January 1). Bladder cancer: Clinical and pathological profile. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, 42(sup218), 95–109. <https://doi.org/10.1080/03008880802325226>
13. Wein, A. J., Kavoussi, L. R., Partin, A. W., & Peters, C. A. (2015, November 5). *Campbell-Walsh Urology: 4-Volume Set*. Elsevier.
14. Shokeir, A. (2004, January). Squamous cell carcinoma of the bladder: pathology, diagnosis and treatment. *BJU International*, 93(2), 216–220. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410x.2004.04588.x>
15. EL-Mekresh, EL-Baz, Abol-Enein, & Ghoneim. (1998, August). Primary adenocarcinoma of the urinary bladder: *BJU International*, 82(2), 206–212. <https://doi.org/10.1046/j.1464-410x.1998.00718.x>

16. Abol-Enein, H., Kava, B. R., & Carmack, A. J. (2007, January). Nonurothelial Cancer of the Bladder. *Urology*, *69*(1), 93–104. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2006.08.1107>
17. Wright, J. L., Porter, M. P., Li, C. I., Lange, P. H., & Lin, D. W. (2006). Differences in survival among patients with urachal and nonurachal adenocarcinomas of the bladder. *Cancer*, *107*(4), 721–728. <https://doi.org/10.1002/cncr.22059>
18. Humphrey, P. A., Moch, H., Cubilla, A. L., Ulbright, T. M., & Reuter, V. E. (2016, July). The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part B: Prostate and Bladder Tumours. *European Urology*, *70*(1), 106–119. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.02.028>
19. Mishriki, S. F., Nabi, G., & Cohen, N. P. (2008, January). Diagnosis of Urologic Malignancies in Patients with Asymptomatic Dipstick Hematuria: Prospective Study with 13 Years' Follow-up. *Urology*, *71*(1), 13–16. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2007.08.031>
20. Grossfeld, G. D., Litwin, M. S., Wolf, J., Hricak, H., Shuler, C. L., Agerter, D. C., & Carroll, P. R. (2001, April). Evaluation of asymptomatic microscopic hematuria in adults: the American Urological Association best practice policy—part I: definition, detection, prevalence, and etiology. *Urology*, *57*(4), 599–603. [https://doi.org/10.1016/s0090-4295\(01\)00919-0](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(01)00919-0)
21. Kamat, A. M., Hegarty, P. K., Gee, J. R., Clark, P. E., Svatek, R. S., Hegarty, N., Shariat, S. F., Xylinas, E., Schmitz-Dräger, B. J., Lotan, Y., Jenkins, L. C., Droller, M., van Rhijn, B. W., & Karakiewicz, P. I. (2013, January). ICUD-EAU International Consultation on Bladder Cancer 2012: Screening, Diagnosis, and Molecular Markers. *European Urology*, *63*(1), 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.09.057>
22. Jocham, D., Stepp, H., & Waidelich, R. (2008, June). Photodynamic Diagnosis in Urology: State-of-the-Art. *European Urology*, *53*(6), 1138–1150. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2007.11.048>
23. Kamat, A. M., Hegarty, P. K., Gee, J. R., Clark, P. E., Svatek, R. S., Hegarty, N., Shariat, S. F., Xylinas, E., Schmitz-Dräger, B. J., Lotan, Y., Jenkins, L. C., Droller, M., van Rhijn, B. W., & Karakiewicz, P. I. (2013, January). ICUD-EAU International Consultation on Bladder Cancer 2012: Screening, Diagnosis, and Molecular Markers. *European Urology*, *63*(1), 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.09.057>
24. Svatek, R. S., Sagalowsky, A. I., & Lotan, Y. (2006, July). Economic impact of screening for bladder cancer using bladder tumor markers: A decision analysis. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, *24*(4), 338–343. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2005.11.025>
25. Lokeshwar, V. B., Habuchi, T., Grossman, H. B., Murphy, W. M., Hautmann, S. H., Hemstreet, G. P., Bono, A. V., Getzenberg, R. H., Goebell, P., Schmitz-Dräger, B. J., Schalken, J. A., Fradet, Y., Marberger, M., Messing, E., & Droller, M. J. (2005, December). Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology*, *66*(6), 35–63. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2005.08.064>
26. Sievert, K. D., Amend, B., Nagele, U., Schilling, D., Bedke, J., Horstmann, M., Hennenlotter, J., Kruck, S., & Stenzl, A. (2009, March 7). Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs? *World Journal of Urology*, *27*(3), 295–300. <https://doi.org/10.1007/s00345-009-0395-z>
27. Lokeshwar, V. B., Habuchi, T., Grossman, H. B., Murphy, W. M., Hautmann, S. H., Hemstreet, G. P., Bono, A. V., Getzenberg, R. H., Goebell, P., Schmitz-Dräger, B. J., Schalken, J. A., Fradet, Y., Marberger, M., Messing, E., & Droller, M. J. (2005,

- December). Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology*, 66(6), 35–63.
<https://doi.org/10.1016/j.urology.2005.08.064>
28. Kotarba. (n.d.). *Spektrometria mas w badaniu materiałów - wykład*.
 29. Veenstra, T. D. (2012). Metabolomics: the final frontier? *Genome Medicine*, 4(4), 40.
<https://doi.org/10.1186/gm339>
 30. Griffin, J. L., & Shockcor, J. P. (2004, July 1). Metabolic profiles of cancer cells. *Nature Reviews Cancer*, 4(7), 551–561. <https://doi.org/10.1038/nrc1390>
 31. Meding, S., Nitsche, U., Balluff, B., Elsner, M., Rauser, S., Schöne, C., Nipp, M., Maak, M., Feith, M., Ebert, M. P., Friess, H., Langer, R., Höfler, H., Zitzelsberger, H., Rosenberg, R., & Walch, A. (2012, February 3). Tumor Classification of Six Common Cancer Types Based on Proteomic Profiling by MALDI Imaging. *Journal of Proteome Research*, 11(3), 1996–2003. <https://doi.org/10.1021/pr200784p>
 32. *Beginner's Guide to Mass Spectrometry | Waters*. (n.d.). Beginner's Guide to Mass Spectrometry | Waters.
<https://www.waters.com/nextgen/en/education/primers/the-mass-spectrometry-primer.html>
 33. Buchberger, A. R., DeLaney, K., Johnson, J., & Li, L. (2017, December 13). Mass Spectrometry Imaging: A Review of Emerging Advancements and Future Insights. *Analytical Chemistry*, 90(1), 240–265. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04733>
 34. Müller, W. H., Verdin, A., De Pauw, E., Malherbe, C., & Eppe, G. (2020, November 10). Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging: A review. *Mass Spectrometry Reviews*, 41(3), 373–420.
<https://doi.org/10.1002/mas.21670>
 35. *NMR Spectroscopy Principles, Interpreting an NMR Spectrum and Common Problems*. (n.d.). Analysis & Separations From Technology Networks.
<http://www.technologynetworks.com/analysis/articles/nmr-spectroscopy-principles-interpreting-an-nmr-spectrum-and-common-problems-355891>
 36. Emwas, A. H. M. (2015). The Strengths and Weaknesses of NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry with Particular Focus on Metabolomics Research. *Methods in Molecular Biology*, 161–193. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2377-9_13
 37. Amberg, A., Riefke, B., Schlotterbeck, G., Ross, A., Senn, H., Dieterle, F., & Keck, M. (2017). NMR and MS Methods for Metabolomics. *Methods in Molecular Biology*, 229–258. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7172-5_13
 38. Chen, Y., Li, E. M., & Xu, L. Y. (2022, April 15). Guide to Metabolomics Analysis: A Bioinformatics Workflow. *Metabolites*, 12(4), 357.
<https://doi.org/10.3390/metabo12040357>
 39. Anwardeen, N. R., Diboun, I., Mokrab, Y., Althani, A. A., & Elrayess, M. A. (2023, June 15). Statistical methods and resources for biomarker discovery using metabolomics. *BMC Bioinformatics*, 24(1).
<https://doi.org/10.1186/s12859-023-05383-0>
 40. Xi, B., Gu, H., Baniasadi, H., & Raftery, D. (2014). Statistical Analysis and Modeling of Mass Spectrometry-Based Metabolomics Data. *Methods in Molecular Biology*, 333–353. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1258-2_22
 41. De Livera, A. M., Olshansky, M., & Speed, T. P. (2013). Statistical Analysis of Metabolomics Data. *Methods in Molecular Biology*, 291–307.
https://doi.org/10.1007/978-1-62703-577-4_20
 42. *MetaboAnalyst*. (n.d.). MetaboAnalyst. <https://www.metaboanalyst.ca/>

43. Galal, A., Talal, M., & Moustafa, A. (2022, November 24). Applications of machine learning in metabolomics: Disease modeling and classification. *Frontiers in Genetics*, 13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1017340>
44. Palmer, E. (2019, November 22). *Quick Guide to Random Forests*. Medium. <https://towardsdatascience.com/quick-guide-to-random-forests-5d2a6b233d1f>
45. *ICP-OES – ICP Chemistry, ICP-OES Analysis, Strengths and Limitations*. (n.d.). Analysis & Separations From Technology Networks. <http://www.technologynetworks.com/analysis/articles/icp-oes-icp-chemistry-icp-oes-analysis-strengths-and-limitations-342265>

Załączniki

7.1 Zgoda komisji Bioetycznej Uniwersytetu Rzeszowskiego na przeprowadzenie badania.



KOMISJA BIOETYCZNA UNIwersYTETU RZESZOWSKIEGO
UNIwersYTET RZESZOWSKI
ul. Warszawska 26 A, 35-205 Rzeszów
tel. (017) 872 19 25

UCHWAŁA Nr 2018/04/11

Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Rzeszowskim

2018/04/12

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Rzeszowskim, działając na podstawie art. 29 ust. 3 pkt 2 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz. U. z dnia 26 marca 1997 roku, Nr 28, poz.152), zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 roku (Dz. U. Nr 47 poz. 480 z 1999 roku) w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania Komisji Bioetycznych, po zapoznaniu się z wnioskiem obejmującym również zgłoszenie badania oraz po wysłuchaniu dodatkowych informacji złożonych przez wnioskodawcę, w wyniku przeprowadzonej dyskusji i głosowania,

postanawia

projekt badawczy: „Poszukiwanie nowych biomarkerów raka pęcherza moczowego z zastosowaniem nowoczesnych metod analizy chemicznej i genetycznej”

zaopiniować pozytywnie.

Uwagi: Uchwała jest ważna na okres objęty planem badań.

Do wiadomości:

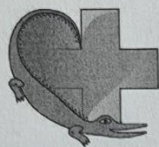
Wnioskodawca

Dr n med. Tadeusz Ossoliński, prof. dr hab. Zygmunt Dobrowolski, dr hab. inż. Tomasz Ruman, dr Joanna Nizioł, mgr inż. Adrian Arendowski, dr hab. n. med. Izabela Zawfik, lek Krzysztof Ossoliński, lek Anna Ossolińska

PRZEWODNICZĄCY
KOMISJI BIOETYCZNEJ UR

dr n. med. Mariusz Dąbrowski

7.2 Udział poszczególnych autorów i współautorów w powstanie publikacji.



SAMODZIELNY PUBLICZNY ZESPÓŁ OPIEKI ZDROWOTNEJ
w Kolbuszowej
36-100 Kolbuszowa, ul. Grunwaldzka 4
Centrala tel.: 17 2271-222, Sekretariat tel./fax: 17 2271-233
NIP: 8141468382, Regon: 000304504

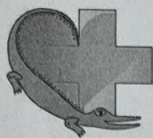
Lek. Krzysztof Ossoliński
Oddział Urologii Ogólnej i Onkologicznej
SPZOZ Szpital w Kolbuszowej
ul. Grunwaldzka 4, 36-100 Kolbuszowa

Rzeszów, 20.06.2023.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w niżej wymienionych pracach mój udział merytoryczny oraz procentowy był następujący:

Lp.	Tytuł publikacji oraz informacje bibliograficzne	Udział merytoryczny	Udział %
1	Joanna Nizioł, Krzysztof Ossoliński, Aneta Płaza-Altamer, Artur Kołodziej, Anna Ossolińska, Tadeusz Ossoliński, Tomasz Ruman Untargeted ultra-high-resolution mass spectrometry metabolomic profiling of blood serum in bladder cancer, Scientific Reports, 2022, 12, 1, DOI: 10.1038/s41598-022-19576-9	<ul style="list-style-type: none"> - Opracowanie założeń badania (określenie celów badawczych, opracowanie protokołu badawczego, ustalenie kryteriów doboru pacjentów) - Przygotowanie wniosku do komisji bioetycznej - Zebranie danych klinicznych pacjentów - Uzyskanie pisemnej zgody od pacjentów na udział w badaniu - Pobieranie tkanek, surowicy i moczu do badania, - Przygotowanie pobranego materiału do analizy chemicznej - Analiza danych medycznych, - Współprzygotowanie treści manuskryptu, - Odniesienie się do uwag recenzentów i współpracowanie końcowej formy pracy, - Nadzór medyczny nad badaniami 	14.29%
2	Krzysztof Ossoliński, Tomasz Ruman, Valérie Copié, Brian P. Tripet, Leonardo B. Nogueira, Katiane O.P.C. Nogueira, Artur Kołodziej, Aneta Płaza-Altamer, Anna Ossolińska, Tadeusz Ossoliński, Joanna Nizioł Metabolomic and elemental profiling of blood serum in bladder cancer Journal of Pharmaceutical Analysis, 2022, DOI: 10.1016/j.jpha.2022.08.004	<ul style="list-style-type: none"> - Opracowanie założeń badania (określenie celów badawczych, opracowanie protokołu badawczego, ustalenie kryteriów doboru pacjentów) - Przygotowanie wniosku do komisji bioetycznej - Zebranie danych klinicznych pacjentów - Uzyskanie pisemnej zgody od pacjentów na udział w badaniu - Pobieranie tkanek, surowicy i moczu do badania, - Przygotowanie pobranego materiału do analizy chemicznej - Analiza danych medycznych, - Współprzygotowanie treści manuskryptu, - Odniesienie się do uwag recenzentów i współpracowanie końcowej formy pracy, - Nadzór medyczny nad badaniami 	9.09%
3	Krzysztof Ossoliński, Tomasz Ruman, Tadeusz Ossoliński, Anna Ossolińska, Adrian Arendowski, Artur Kołodziej, Aneta Płaza-Altamer, Joanna Nizioł Monoisotopic silver nanoparticles-based	<ul style="list-style-type: none"> - Opracowanie założeń badania (określenie celów badawczych, opracowanie protokołu badawczego, ustalenie kryteriów doboru pacjentów) - Przygotowanie wniosku do komisji bioetycznej - Zebranie danych klinicznych pacjentów - Uzyskanie pisemnej zgody od pacjentów na udział w badaniu 	5%



SAMODZIELNY PUBLICZNY ZESPÓŁ OPIEKI ZDROWOTNEJ
w Kolbuszowej
36-100 Kolbuszowa, ul. Grunwaldzka 4
Centrala tel.: 17 2271-222, Sekretariat tel./fax: 17 2271-233
NIP: 8141468382, Regon: 000304504

	mass spectrometry imaging of human bladder cancer tissue: Biomarker discovery <i>Advances in Medical Sciences</i> , 2023, 68(1), 38-45, DOI: 10.1016/j.advms.2022.12.002	<ul style="list-style-type: none">- Pobieranie tkanek, surowicy i moczu do badania,- Przygotowanie pobranego materiału do analizy chemicznej- Analiza danych medycznych,- Współprzygotowanie treści manuskryptu,- Odniesienie się do uwag recenzentów i współpracowanie końcowej formy pracy,- Nadzór medyczny nad badaniami	
4	Ossoliński K, Ruman T, Copié V, Tripet BP, Kołodziej A, Płaza-Altamer A, Ossolińska A, Ossoliński T, Nieczaj A, Nizioł J., Targeted and untargeted urinary metabolic profiling of bladder cancer, <i>Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis</i> , 2023, 233, 115473 DOI: 10.1016/j.jpba.2023.115473	<ul style="list-style-type: none">- Opracowanie założeń badania (określenie celów badawczych, opracowanie protokołu badawczego, ustalenie kryteriów doboru pacjentów)- Przygotowanie wniosku do komisji bioetycznej- Zebranie danych klinicznych pacjentów- Uzyskanie pisemnej zgody od pacjentów na udział w badaniu- Pobieranie tkanek, surowicy i moczu do badania,- Przygotowanie pobranego materiału do analizy chemicznej- Analiza danych medycznych,- Współprzygotowanie treści manuskryptu,- Odniesienie się do uwag recenzentów i współpracowanie końcowej formy pracy,- Nadzór medyczny nad badaniami	40%
5	Ossoliński K, Ruman T, Copié V, Tripet BP, Kołodziej A, Płaza-Altamer A, Ossolińska A, Ossoliński T, Nieczaj A, Nizioł J., Untargeted urinary metabolomics for bladder cancer biomarker screening with ultrahigh-resolution mass spectrometry, <i>Scientific Reports</i> volume 13, Article number: 9802 (2023) DOI: 10.1038/s41598-023-36874-y	<ul style="list-style-type: none">- Opracowanie założeń badania (określenie celów badawczych, opracowanie protokołu badawczego, ustalenie kryteriów doboru pacjentów)- Przygotowanie wniosku do komisji bioetycznej- Zebranie danych klinicznych pacjentów- Uzyskanie pisemnej zgody od pacjentów na udział w badaniu- Pobieranie tkanek, surowicy i moczu do badania,- Przygotowanie pobranego materiału do analizy chemicznej- Analiza danych medycznych,- Współprzygotowanie treści manuskryptu,- Odniesienie się do uwag recenzentów i współpracowanie końcowej formy pracy,- Nadzór medyczny nad badaniami	30%

lek. Krzysztof Ossoliński
specjalista chorób FEBU
2960306

.....
Podpis



Dr hab. Joanna Nizioł, prof. PRz

Wydział Chemiczny, Politechnika Rzeszowska
Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej
al. Powstańców Warszawy 6, 35-959 Rzeszów
tel: (17) 743 13 10, e-mail: jnizioł@prz.edu.pl

Rzeszów, 10.06.2023r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w niżej wymienionych pracach mój udział merytoryczny oraz procentowy był następujący:

Lp.	Tytuł publikacji oraz informacje bibliograficzne	Udział merytoryczny	Udział %
1	Joanna Nizioł, Krzysztof Ossoliński, Aneta Płaza-Altamer, Artur Kołodziej, Anna Ossolińska, Tadeusz Ossoliński, Tomasz Ruman Untargeted ultra-high-resolution mass spectrometry metabolomic profiling of blood serum in bladder cancer, Scientific Reports, 2022, 12, 1, DOI: 10.1038/s41598-022-19576-9	<ul style="list-style-type: none">- współtworzenie koncepcji badań,- analiza statystyczna i wizualizacja uzyskanych wyników,- przygotowanie manuskryptu,- odniesienie się do uwag recenzentów i współpracowanie końcowej formy pracy,- pozyskanie środków na badania	14%
2	Krzysztof Ossoliński, Tomasz Ruman, Valérie Copié, Brian P. Tripet, Leonardo B. Nogueira, Katiane O.P.C. Nogueira, Artur Kołodziej, Aneta Płaza-Altamer, Anna Ossolińska, Tadeusz Ossoliński, Joanna Nizioł Metabolomic and elemental profiling of blood serum in bladder cancer Journal of Pharmaceutical Analysis, 2022, DOI: 10.1016/j.jpha.2022.08.004	<ul style="list-style-type: none">- współtworzenie koncepcji badań,- analiza statystyczna i wizualizacja uzyskanych wyników,- przygotowanie manuskryptu,- odniesienie się do uwag recenzentów i współpracowanie końcowej formy pracy,- pozyskanie środków na badania	9%
3	Krzysztof Ossoliński, Tomasz Ruman, Tadeusz Ossoliński, Anna Ossolińska, Adrian Arendowski, Artur Kołodziej, Aneta Płaza-Altamer, Joanna Nizioł Monoisotopic silver	<ul style="list-style-type: none">- współtworzenie koncepcji badań,- analiza statystyczna i wizualizacja uzyskanych wyników,- przygotowanie manuskryptu,	30%





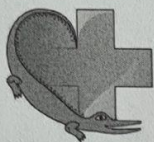
	nanoparticles-based mass spectrometry imaging of human bladder cancer tissue: Biomarker discovery, <i>Advances in Medical Sciences</i> , 2023, 68(1), 38-45, DOI: 10.1016/j.advms.2022.12.002	- pozyskanie środków na badania	
4	Krzysztof Ossoliński, Tomasz Ruman, Valérie Copié, Brian P. Tripet, Artur Kołodziej, Aneta Płaza-Altamer, Anna Ossolińska, Tadeusz Ossoliński, Anna Nieczaj, Joanna Nizioł, Targeted and untargeted urinary metabolic profiling of bladder cancer, <i>Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis</i> , 2023, 233, 115473 DOI: 10.1016/j.jpba.2023.115473	- współtworzenie koncepcji badań, - analiza statystyczna i wizualizacja uzyskanych wyników, - przygotowanie manuskryptu, - odniesienie się do uwag recenzentów i współpracowanie końcowej formy pracy, - pozyskanie środków na badania	20%
5	Joanna Nizioł, Krzysztof Ossoliński, Aneta Płaza-Altamer, Artur Kołodziej, Anna Ossolińska, Tadeusz Ossoliński, Anna Nieczaj, Tomasz Ruman, tak Untargeted urinary metabolomics for bladder cancer biomarker screening with ultrahigh-resolution mass spectrometry, <i>Scientific Reports</i> , 2023, 13, Article number: 9802 DOI: 10.1038/s41598-023-36874-y	- współtworzenie koncepcji badań, - analiza statystyczna i wizualizacja uzyskanych wyników, - przygotowanie manuskryptu, - odniesienie się do uwag recenzentów i współpracowanie końcowej formy pracy, - pozyskanie środków na badania	26%

dr hab. Joanna Nizioł, prof. PRz

Wydział Chemiczny PRz

Podpis





SAMODZIELNY PUBLICZNY ZESPÓŁ OPIEKI ZDROWOTNEJ
w Kolbuszowej
36-100 Kolbuszowa, ul. Grunwaldzka 4
Centrala tel.: 17 2271-222, Sekretariat tel./fax: 17 2271-233
NIP: 8141468382, Regon: 000304504

Dr n. med. Tadeusz Ossoliński

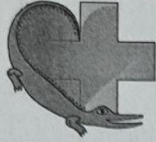
Oddział Urologii Ogólnej i Onkologicznej
SPZOZ Szpital w Kolbuszowej
ul. Grunwaldzka 4, 36-100 Kolbuszowa

Rzeszów, 20.06.2023.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w niżej wymienionych pracach mój udział merytoryczny oraz procentowy był następujący:

Lp.	Tytuł publikacji oraz informacje bibliograficzne	Udział merytoryczny	Udział %
1	Joanna Nizioł, Krzysztof Ossoliński, Aneta Płaza-Altamer, Artur Kołodziej, Anna Ossolińska, Tadeusz Ossoliński, Tomasz Ruman Untargeted ultra-high-resolution mass spectrometry metabolomic profiling of blood serum in bladder cancer, Scientific Reports, 2022, 12, 1, DOI: 10.1038/s41598-022-19576-9	<ul style="list-style-type: none">- Uzyskanie pisemnej zgody od pacjentów na udział w badaniu- Pobieranie tkanek do badania	14.29%
2	Krzysztof Ossoliński, Tomasz Ruman, Valérie Copié, Brian P. Tripet, Leonardo B. Nogueira, Katiane O.P.C. Nogueira, Artur Kołodziej, Aneta Płaza-Altamer, Anna Ossolińska, Tadeusz Ossoliński, Joanna Nizioł Metabolomic and elemental profiling of blood serum in bladder cancer Journal of Pharmaceutical Analysis, 2022, DOI: 10.1016/j.jpha.2022.08.004	<ul style="list-style-type: none">- Uzyskanie pisemnej zgody od pacjentów na udział w badaniu- Pobieranie tkanek do badania	9.09%
3	Krzysztof Ossoliński, Tomasz Ruman, Tadeusz Ossoliński, Anna Ossolińska, Adrian Arendowski, Artur Kołodziej, Aneta Płaza-Altamer, Joanna Nizioł Monoisotopic silver nanoparticles-based mass spectrometry imaging of human	<ul style="list-style-type: none">- Uzyskanie pisemnej zgody od pacjentów na udział w badaniu- Pobieranie tkanek do badania	3%



SAMODZIELNY PUBLICZNY ZESPÓŁ OPIEKI ZDROWOTNEJ
w Kolbuszowej
36-100 Kolbuszowa, ul. Grunwaldzka 4
Centrala tel.: 17 2271-222, Sekretariat tel./fax: 17 2271-233
NIP: 8141468382, Regon: 000304504

	bladder cancer tissue: Biomarker discovery Advances in Medical Sciences, 2023, 68(1), 38-45, DOI: 10.1016/j.advms.2022.12.002		
4	Ossoliński K, Ruman T, Copié V, Tripet BP, Kołodziej A, Płaza-Altamer A, Ossolińska A, Ossoliński T, Nieczaj A, Nizioł J., Targeted and untargeted urinary metabolic profiling of bladder cancer, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2023, 233, 115473 DOI: 10.1016/j.jpba.2023.115473	<ul style="list-style-type: none">- Uzyskanie pisemnej zgody od pacjentów na udział w badaniu- Pobieranie tkanek do badania	2%
5	Ossoliński K, Ruman T, Copié V, Tripet BP, Kołodziej A, Płaza-Altamer A, Ossolińska A, Ossoliński T, Nieczaj A, Nizioł J., Untargeted urinary metabolomics for bladder cancer biomarker screening with ultrahigh-resolution mass spectrometry, Scientific Reports volume 13, Article number: 9802 (2023) DOI: 10.1038/s41598-023-36874-y	<ul style="list-style-type: none">- Uzyskanie pisemnej zgody od pacjentów na udział w badaniu- Pobieranie tkanek do badania	2%

Dr n. med. Jacek Ossoliński
SPECJALISTA UROLOG FEBU
2177042

.....
Podpis



Prof. dr hab. inż. Tomasz Ruman

Wydział Chemiczny, Politechnika Rzeszowska
Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej
al. Powstańców Warszawy 6, 35-959 Rzeszów
tel: (17) 743 18 96, e-mail: tomruman@prz.edu.pl

Rzeszów, 20.06.2023.

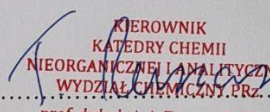
OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w niżej wymienionych pracach mój udział merytoryczny oraz procentowy był następujący:

Lp.	Tytuł publikacji oraz informacje bibliograficzne	Udział merytoryczny	Udział %
1	J. Nizioł, K. Ossoliński, A. Plaza-Altamer, A. Kołodziej, A. Ossolińska, T. Ossoliński, T. Ruman Untargeted ultra-high-resolution mass spectrometry metabolomic profiling of blood serum in bladder cancer, Scientific Reports, 2022, 12, 1, DOI: 10.1038/s41598-022-19576-9	<ul style="list-style-type: none">- wybór metodologii badań,- analiza uzyskanych danych,- przygotowanie treści manuskryptu,- odniesienie się do uwag recenzentów i współpracowanie końcowej formy pracy,- nadzór naukowy nad badaniami	14%
2	K. Ossoliński, T. Ruman, V. Copié, B. P. Tripet, L. B. Nogueira, K. O.P.C. Nogueira, A. Kołodziej, A. Plaza-Altamer, A. Ossolińska, T. Ossoliński, J. Nizioł, Metabolomic and elemental profiling of blood serum in bladder cancer Journal of Pharmaceutical Analysis, 2022, DOI: 10.1016/j.jpha.2022.08.004	<ul style="list-style-type: none">- wybór metodologii badań,- analiza uzyskanych danych,- przygotowanie treści manuskryptu,- odniesienie się do uwag recenzentów i współpracowanie końcowej formy pracy,- nadzór naukowy nad badaniami	9%
3	K. Ossoliński, T. Ruman, T. Ossoliński, A. Ossolińska, A. Arendowski, A. Kołodziej, A. Plaza-Altamer, J. Nizioł Monoisotopic silver nanoparticles-based mass spectrometry imaging of human bladder cancer tissue: Biomarker discovery Advances in Medical Sciences, 2023, 68(1), 38-45, DOI: 10.1016/j.advms.2022.12.002	<ul style="list-style-type: none">- tworzenie koncepcji badań,- analiza uzyskanych wyników,- korekta treści manuskryptu,- odniesienie się do uwag recenzentów i współpracowanie końcowej formy pracy,- nadzór naukowy nad badaniami	30%



4	K. Ossoliński, T. Ruman, V. Copié, B.P. Tripet, A. Kołodziej, A. Płaza-Altamer, A. Ossolińska, T. Ossoliński, A. Nieczaj, J. Nizioł, Targeted and untargeted urinary metabolic profiling of bladder cancer, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2023, 233, 115473 DOI: 10.1016/j.jpba.2023.115473	<ul style="list-style-type: none">- wybór metodologii badań,- analiza uzyskanych danych,- przygotowanie treści manuskryptu,- odniesienie się do uwag recenzentów i- współpracowanie końcowej formy pracy,- nadzór naukowy nad badaniami	15%
5	J. Nizioł, K. Ossoliński, A. Płaza-Altamer, A. Kołodziej, A. Ossolińska, T. Ossoliński, A. Nieczaj, T. Ruman, Untargeted urinary metabolomics for bladder cancer biomarker screening with ultrahigh-resolution mass spectrometry, Scientific Reports volume 13, Article number: 9802 (2023) DOI: 10.1038/s41598-023-36874-y	<ul style="list-style-type: none">- wybór metodologii badań,- analiza uzyskanych danych,- przygotowanie treści manuskryptu,- odniesienie się do uwag recenzentów i- współpracowanie końcowej formy pracy,- nadzór naukowy nad badaniami	26%


KIEROWNIK
KATEDRY CHEMII
NIEORGANICZNEJ I ANALITYCZNEJ
WYDZIAŁ CHEMICZNY PRZ
.....
prof. dr hab. inż. Tomasz Ruman
Podpis



Prof. dr hab. inż. Tomasz Ruman

Wydział Chemiczny, Politechnika Rzeszowska
Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej
al. Powstańców Warszawy 6, 35-959 Rzeszów
tel: (17) 743 18 96, e-mail: tomruman@prz.edu.pl

Rzeszów, 20.06.2023.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że łączny merytoryczny i procentowy udział osób:

- Aneta Płaza -Altamer
- Artur Kołodziej
- Valérie Copié
- Brian P. Tripet
- Leonardo B. Nogueira
- Katiane O.P.C. Nogueira
- Adrian Arendowski
- Nieczaj Anna

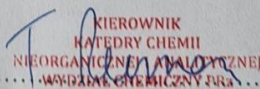
w niżej wymienionych pracach był następujący:

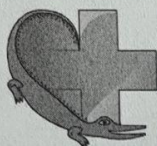
Lp.	Tytuł publikacji oraz informacje bibliograficzne	Udział merytoryczny	Udział %
1	Joanna Nizioł, Krzysztof Ossoliński, Aneta Płaza-Altamer, Artur Kołodziej, Anna Ossolińska, Tadeusz Ossoliński, Tomasz Ruman Untargeted ultra-high-resolution mass spectrometry metabolomic profiling of blood serum in bladder cancer, Scientific Reports, 2022, 12, 1, DOI: 10.1038/s41598-022-19576-9	- analiza uzyskanych danych, - przygotowanie treści manuskryptu, - odniesienie się do uwag recenzentów i współpracowanie końcowej formy pracy,	28.55%
2	Krzysztof Ossoliński, Tomasz Ruman, Valérie Copié, Brian P. Tripet, Leonardo B. Nogueira, Katiane O.P.C. Nogueira, Artur Kołodziej, Aneta Płaza-Altamer, Anna Ossolińska, Tadeusz Ossoliński, Joanna Nizioł Metabolomic and elemental profiling of blood serum in	- analiza uzyskanych danych, - przygotowanie treści manuskryptu, - odniesienie się do uwag recenzentów i współpracowanie końcowej formy pracy,	54.55%





	bladder cancer Journal of Pharmaceutical Analysis, 2022, DOI: 10.1016/j.jpha.2022.08.004		
3	Krzysztof Ossoliński, Tomasz Ruman, Tadeusz Ossoliński, Anna Ossolińska, Adrian Arendowski, Artur Kołodziej, Aneta Płaza-Altamer, Joanna Nizioł Monoisotopic silver nanoparticles-based mass spectrometry imaging of human bladder cancer tissue: Biomarker discovery Advances in Medical Sciences, 2023, 68(1), 38-45, DOI: 10.1016/j.advms.2022.12.002	<ul style="list-style-type: none">- analiza uzyskanych danych,- przygotowanie treści manuskryptu,- odniesienie się do uwag recenzentów i współpracowanie końcowej formy pracy,	29%
4	Ossoliński K, Ruman T, Copié V, Tripet BP, Kołodziej A, Płaza-Altamer A, Ossolińska A, Ossoliński T, Nieczaj A, Nizioł J., Targeted and untargeted urinary metabolic profiling of bladder cancer, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2023, 233, 115473 DOI: 10.1016/j.jpba.2023.115473	<ul style="list-style-type: none">- analiza uzyskanych danych,- przygotowanie treści manuskryptu,- odniesienie się do uwag recenzentów i współpracowanie końcowej formy pracy,	21%
5	Ossoliński K, Ruman T, Copié V, Tripet BP, Kołodziej A, Płaza-Altamer A, Ossolińska A, Ossoliński T, Nieczaj A, Nizioł J., Untargeted urinary metabolomics for bladder cancer biomarker screening with ultrahigh-resolution mass spectrometry, Scientific Reports volume 13, Article number: 9802 (2023) DOI: 10.1038/s41598-023-36874-y	<ul style="list-style-type: none">- analiza uzyskanych danych,- przygotowanie treści manuskryptu,- odniesienie się do uwag recenzentów i współpracowanie końcowej formy pracy,	14%


KIEROWNIK
KATEDRY CHEMII
NIEORGANICZNEJ I ANALITYCZNEJ
WYDZIAŁ CHEMICZNY
prof. dr hab. inż. Tomasz Ruman
Podpis



SAMODZIELNY PUBLICZNY ZESPÓŁ OPIEKI ZDROWOTNEJ
w Kolbuszowej
36-100 Kolbuszowa, ul. Grunwaldzka 4
Centrala tel.: 17 2271-222, Sekretariat tel./fax: 17 2271-233
NIP: 8141468382, Regon: 000304504

Lek. Anna Ossolińska

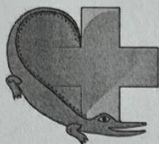
Oddział Urologii Ogólnej i Onkologicznej
SPZOZ Szpital w Kolbuszowej
ul. Grunwaldzka 4, 36-100 Kolbuszowa

Rzeszów, 20.06.2023.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w niżej wymienionych pracach mój udział merytoryczny oraz procentowy był następujący:

Lp.	Tytuł publikacji oraz informacje bibliograficzne	Udział merytoryczny	Udział %
1	Joanna Nizioł, Krzysztof Ossoliński, Aneta Płaza-Altamer, Artur Kołodziej, Anna Ossolińska, Tadeusz Ossoliński, Tomasz Ruman Untargeted ultra-high-resolution mass spectrometry metabolomic profiling of blood serum in bladder cancer, Scientific Reports, 2022, 12, 1, DOI: 10.1038/s41598-022-19576-9	- Uzyskanie pisemnej zgody od pacjentów na udział w badaniu - Pobieranie tkanek do badania	14.29%
2	Krzysztof Ossoliński, Tomasz Ruman, Valérie Copié, Brian P. Tripet, Leonardo B. Nogueira, Katiane O.P.C. Nogueira, Artur Kołodziej, Aneta Płaza-Altamer, Anna Ossolińska, Tadeusz Ossoliński, Joanna Nizioł Metabolomic and elemental profiling of blood serum in bladder cancer Journal of Pharmaceutical Analysis, 2022, DOI: 10.1016/j.jpha.2022.08.004	- Uzyskanie pisemnej zgody od pacjentów na udział w badaniu - Pobieranie tkanek do badania	9.09%
3	Krzysztof Ossoliński, Tomasz Ruman, Tadeusz Ossoliński, Anna Ossolińska, Adrian Arendowski, Artur Kołodziej, Aneta Płaza-Altamer, Joanna Nizioł Monoisotopic silver nanoparticles-based mass spectrometry imaging of human	- Uzyskanie pisemnej zgody od pacjentów na udział w badaniu - Pobieranie tkanek do badania	3%



SAMODZIELNY PUBLICZNY ZESPÓŁ OPIEKI ZDROWOTNEJ
w Kolbuszowej

36-100 Kolbuszowa, ul. Grunwaldzka 4
Centrala tel.: 17 2271-222, Sekretariat tel./fax: 17 2271-233
NIP: 8141468382, Regon: 000304504

	bladder cancer tissue: Biomarker discovery Advances in Medical Sciences, 2023, 68(1), 38-45, DOI: 10.1016/j.advms.2022.12.002		
4	Ossoliński K, Ruman T, Copié V, Tripet BP, Kołodziej A, Płaza-Altamer A, Ossolińska A, Ossoliński T, Nieczaj A, Nizioł J., Targeted and untargeted urinary metabolic profiling of bladder cancer, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2023, 233, 115473 DOI: 10.1016/j.jpba.2023.115473	<ul style="list-style-type: none">- Uzyskanie pisemnej zgody od pacjentów na udział w badaniu- Pobieranie tkanek do badania	2%
5	Ossoliński K, Ruman T, Copié V, Tripet BP, Kołodziej A, Płaza-Altamer A, Ossolińska A, Ossoliński T, Nieczaj A, Nizioł J., Untargeted urinary metabolomics for bladder cancer biomarker screening with ultrahigh-resolution mass spectrometry, Scientific Reports volume 13, Article number: 9802 (2023) DOI: 10.1038/s41598-023-36874-y	<ul style="list-style-type: none">- Uzyskanie pisemnej zgody od pacjentów na udział w badaniu- Pobieranie tkanek do badania	2%

Podpis



Monoisotopic silver nanoparticles-based mass spectrometry imaging of human bladder cancer tissue: Biomarker discovery



Krzysztof Ossoliński^a, Tomasz Ruman^b, Tadeusz Ossoliński^a, Anna Ossolińska^a, Adrian Arendowski^b, Artur Kołodziej^{b,c}, Aneta Płaza-Altamer^{b,c}, Joanna Nizioł^{b,*}

^a Department of Urology, John Paul II Hospital, Kolbuszowa, Poland

^b Rzeszów University of Technology, Faculty of Chemistry, Rzeszów, Poland

^c Doctoral School of Engineering and Technical Sciences at the Rzeszów University of Technology, Rzeszów, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Silver nanoparticles
LDI-MS
Biomarkers
Bladder cancer
Human tumor tissue

ABSTRACT

Purpose: Bladder cancer (BC) is the 10th most common form of cancer worldwide and the 2nd most common cancer of the urinary tract after prostate cancer, taking into account both incidence and prevalence.

Materials/methods: Tissues from patients with BC and also tissue extracts were analyzed by laser desorption/ionization mass spectrometry imaging (LDI-MSI) with monoisotopic silver-109 nanoparticles-enhanced target (¹⁰⁹AgNPET).

Results: Univariate and multivariate statistical analyses revealed 10 metabolites that differentiated between tumor and normal tissues from six patients with diagnosed BC. Selected metabolites are discussed in detail in relation to their mass spectrometry (MS) imaging results. The pathway analysis enabled us to link these compounds with 17 metabolic pathways.

Conclusions: According to receiver operating characteristic (ROC) analysis of biomarkers, 10 known metabolites were identified as the new potential biomarkers with areas under the curve (AUC) higher than >0.99. In both univariate and multivariate analysis, it was predicted that these compounds could serve as useful discriminators of cancerous versus normal tissue in patients diagnosed with BC.

1. Introduction

Bladder cancer (BC) is the 12th most common form of cancer worldwide and the 2nd most common cancer of the urinary tract after prostate cancer, taking into account both incidence and prevalence [1]. Globally, 573,278 new cases of BC were diagnosed in 2020. In terms of incidence, it is the 6th most common cancer in men, the 17th in women and the 10th most frequent cancer in both sexes [1]. Cystoscopic examination of bladder remains the gold standard for BC diagnosis, but it is invasive, associated with discomfort, sometimes painful and costly. It is estimated that 4–27% of tumors are omitted during the examination. This value increases to 32–77% in the case of carcinoma *in situ* (CIS) [2].

In recent years, numerous urine-based BC biomarkers have been evaluated but currently there is no reliable diagnostic and prognostic BC biomarker that has been accepted for diagnosis and follow-up in routine practice or clinical guidelines and which could be an alternative to cystoscopy. Over the past decade, due to the molecular specificity and sensitivity mass spectrometry (MS) has been used as a main technique in

biomarker discovery field [3]. Two-dimensional variety of MS – mass spectrometry imaging (MSI) plays an increasingly important role in the field of molecular imaging because it allows direct mapping of the distribution of a variety of endogenous and exogenous compounds within biological tissues with high specificity and without the need for radioactive or fluorescent radioactive labelling normally used in histochemical protocols [4]. BC tissues were studied previously with MSI techniques such as matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) [5] and desorption electrospray ionization (DESI) [6]. It should be noted that there are no BC MS and MSI results made with the use of nanoparticle-based methods published to date. It is important to state that nanoparticle-based methods have many advantages with regard to other methods including very efficient cationization of low molecular weight compounds, relatively high sensitivity of analyte detection, very low chemical background and high mass accuracy due to internal calibration, unlike commonly used one - MALDI. They allow for higher lateral resolutions and higher sensitivity when compared to DESI. In our recent publications we presented new methods such as gold nanoparticle-enhanced target (AuNPET) [7], silver

* Corresponding author. University of Technology, Faculty of Chemistry, 6 Powstańców Warszawy Ave., 35-959, Rzeszów, Poland.

E-mail address: jnizioł@prz.edu.pl (J. Nizioł).

<https://doi.org/10.1016/j.advms.2022.12.002>

Received 21 May 2022; Received in revised form 5 September 2022; Accepted 8 December 2022

nanoparticle-enhanced target (AgNPET) [8] and monoisotopic silver-109 nanoparticles-enhanced target ($^{109}\text{AgNPET}$) [9] with results of their application for imaging of plant, animal and human tissues [10–12].

2. Materials and methods

2.1. Participants

Cancer and normal tissue samples were collected from 6 patients (Caucasian race, average age 65 years, 2 females and 4 males) with diagnosed BC at John Paul II Hospital in Kolbuszowa (Poland). All patients underwent transurethral resection of bladder tumor (TURBT) following a detailed clinical history and laboratory examination. Each of these patients had at least an abdominal ultrasound to exclude other tumors (patients with urolithiasis usually also had a CT scan) and a basic package of laboratory tests required for urological surgery to exclude inflammation. Whole tumor and a small fragment of adjacent healthy uroepithelium were resected (cancer and control tissue). The histopathological analysis of resected tumors from all patients, confirmed non-invasive (pTa) low-grade (LG) urothelial papillary carcinoma, according to 2004 WHO grading system [13,14]. Control tissues were free of cancer cells. The clinical characteristics of the patients are presented in [Supplementary Table S1](#).

2.2. Materials and equipment

Silver-109 (min. 99.75% of ^{109}Ag) isotope was purchased from BuyIsotope (Neonest AB, Stockholm, Sweden) and transformed to trifluoroacetate salt by commonly known methods (involving dissolving in HNO_3 , precipitation of $^{109}\text{AgOH}$ and reaction with trifluoroacetic acid) and recrystallized from tetrahydrofuran/hexane system. 2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Steel targets were locally machined from H17 stainless steel. All solvents were of high-performance liquid chromatography (HPLC) quality, except for water (18 M Ω water was produced locally) and methanol (liquid chromatography-mass spectrometry - LC MS - grade, FlukaTM, (Seelze, Germany). The silver-109 nanoparticles were synthesized on the surface of steel targets as described in our recent publication [9]. Optical photographs of tissue samples were made with the use of an Olympus SZ10 microscope equipped with an 8 MPix Olympus digital camera (Hamburg, Germany).

2.3. Preparation of monoisotopic silver suspension

Four milligrams of silver-109 trifluoroacetate ($^{109}\text{AgTFA}$) and 14 mg of DHB were quantitatively transferred to a glass tube by dissolving in 2 ml of isopropanol and 2 ml of acetonitrile. The prepared solution was placed in an ultrasonic bath set at 50 °C for about 30 min. After this time, the suspension was ready to use.

2.4. Imaging sample preparation

Tissues from 6 patients with the same tumor stage and grade were selected for LDI-MSI analysis. Three independent imaging experiments were performed to exclude possible random results, one for tissues from patient no. 1, another for patients no. 2–4 and the last for patients no. 5 and 6. The material examined was six pairs of BC and normal tissue fragments of average 3 × 3 mm size. MS imaging for patient no. 1 was carried out within about an hour after the material was collected after surgery. Until then, the tissue samples were stored at a temperature of approx. 2–4 °C. Tissues from patients no. 2–6 were stored at –60 °C and thawed to 4 °C before the MSI measurements. To remove excess liquid material, samples were touched to cellulose filter paper (3 times). Next, with the use of sterile needles and tweezers, a few imprints of the examined tissues were made on the previously prepared $^{109}\text{AgNPET}$ plate. The material was transferred from the BC patients to the

$^{109}\text{AgNPET}$ substrate by briefly touching (3 s) the tissue samples to steel surface with light pressure. Steel target with imprints was placed on a computer-controlled 3D positioning table and sprayed with nanoparticles using an electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) nebulizer with nitrogen as nebulizing gas (2 bar). Target was placed in a MALDI time-of-flight MS (MALDI-ToF/ToF MS) (Autoflex Speed ToF/ToF, Bruker, Bremen, Germany) and selected imprints were then directly analyzed.

2.5. LDI-MS imaging experiments

LDI-MSI experiments were performed using a Bruker Autoflex Speed ToF/ToF mass spectrometer (MALDI ToF/ToF, Bruker, Bremen, Germany) in positive-ion reflectron mode. FlexImaging 4.0 software was used for data processing and analysis. The apparatus was equipped with a SmartBeam II 1000 Hz 355 nm laser. Laser impulse energy was approximately 100–190 μJ , laser repetition rate was 1000 Hz, and deflection was set on m/z lower than 80 Da. The m/z range was 80–2000 Da, spatial resolution 250 × 250 μm . The experiments were made with 20,000 laser shots per individual spot with a default random walk applied (random points with 50 laser shots). All spectra were calibrated with the use of silver ions ($^{109}\text{Ag}^+$ to $^{109}\text{Ag}_{10}^+$). The first accelerating voltage was held at 19 kV, and the second ion source voltage was held at 16.7 kV. Reflector voltages used were 21 kV (the first) and 9.55 kV (the second). All of the ion images were within $\pm 0.05\%$ of m/z . Total ion current (TIC) normalization was used for all results shown.

2.6. Preparation of tissue extracts

Small portions of frozen neoplastic bladder tissue (n = 6) and normal control tissues (n = 6) of approximately 2 mg each were transferred to Eppendorf tubes and then homogenized by three cycles of freezing and thawing. Next to the homogenates 500 μl of 2:1 (v/v) chloroform/methanol were added and then extracted for 30 min in ultrasonic bath (at 2–4 °C.) The tubes were centrifuged for 5 min at an acceleration of 6000 $\times g$ and the phases were allowed to separate. The water-methanol and methanol-chloroform phases were transferred to separate tubes and then methanol-chloroform phases were diluted 100x whereas the water-methanol phases were measured without dilution. Volume of 0.3 μl of each sample was placed on $^{109}\text{AgNPET}$ and allowed to dry at room temperature and target placed in a MALDI ToF/ToF MS. Tissue extracts were made to confirm the structure of the identified compounds by MS/MS measurements.

2.7. LDI-MS and MS/MS of tissue extracts

LDI-MSI experiments were performed using a Bruker Autoflex Speed MALDI ToF/ToF MS (Autoflex Speed ToF/ToF, Bruker, Bremen, Germany) in positive-ion reflectron mode. The apparatus was equipped with a SmartBeam II 1000 Hz 355 nm laser. Laser impulse energy was approximately 100–190 μJ , laser repetition rate was 1000 Hz, and deflection was set on m/z lower than 80 Da. The m/z range was 80–2000 Da. Spectrum for each extract contained data from 20k laser shots with a default random walk applied (random points with 50 laser shots). All spectra were calibrated with the use of silver ions ($^{109}\text{Ag}^+$ to $^{109}\text{Ag}_{10}^+$). The first accelerating voltage was held at 19 kV, and the second ion source voltage was held at 16.7 kV. Reflector voltages used were 21 kV (the first) and 9.55 kV (the second). MS/MS measurements were performed using the LIFT (low mass) method [15]. The mass window for precursor ion selection used was ± 0 Da. FlexAnalysis (version 4.0, Bruker, Bremen, Germany) was used for data analysis.

2.8. Data processing

The average spectra of the imprint area of cancerous and normal tissue from patient no. 1 were generated and then compared in the using

the SCIls Lab software version 2016b (SCIls, Bremen, Germany) and FlexAnalysis (version 4.0, Bruker, Bremen, Germany). Statistical analysis was performed using the Cardinal MSI (R package) [16] with hotspot suppression and Gaussian smoothing applied and MetaboAnalyst 5.0 platform [17]. Database search of chemical compounds were carried out using a custom-made program. Theoretical m/z values were calculated using ChemCalc program available online [18].

Data of peak mean abundance from the entire area of the examined cancer ($n = 6$) and control ($n = 6$) tissue were formatted as comma separated values (.csv) files and uploaded to the MetaboAnalyst 5.0 server [17]. Metabolite data was checked for data integrity and normalized using MetaboAnalyst's normalization protocols (normalization by sum, log transformation and auto-scaling), both for biomarker and pathway analyses. Univariate analysis (t -test), fold-change analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were applied to calculate the statistical significance of the metabolites between the two groups (cancer over control). To identify the potential biomarkers associated with BC, the Receiver Operating Characteristic (ROC) curve was applied using biomarker analysis module of MetaboAnalyst v 5.0. The ROC curves were generated using an algorithm based on Monte-Carlo cross validation (MCCV) through balanced subsampling coupled with linear support vector machine (SVM) for the classification method and SVM built-in for the feature ranking method. To identify the most relevant metabolic pathways involved in BC, metabolic pathway analysis was performed using MetaboAnalyst with *Homo sapiens* pathway libraries.

3. Ethical issues

The study protocol was approved by local Bioethics Committee at the University of Rzeszow, Poland (permission no. 2018/04/10) and performed in accordance with relevant guidelines and regulations, including the 1964 Helsinki declaration and its later amendments. Specimens and clinical data from patients involved in the study were collected with written consent.

4. Results and discussion

$^{109}\text{AgNPET}$ method was used previously for LDI-MS analysis of low molecular weight (LMW) compounds and biological material and was shown to be a promising alternative to traditional MALDI method [9,19]. LDI-MSI experiments were performed by measuring series of high-resolution MS spectra with $250 \times 250 \mu\text{m}$ resolution of bladder tissue imprints of ca. $3 \times 3 \text{ mm}$ size made on $^{109}\text{AgNPET}$ target plate. In order to estimate whether there is a sample-related differentiation between cancer and normal tissue imprints, a statistical analysis was performed for patient no. 1 tissue pair. Data derived from MSI experiment were analyzed by comparison of average spectra of cancer and normal areas by spatial shrunken centroids with adaptive weights (SSCA). The mentioned method allows estimation of the probability that a location of interest belongs to a particular segment and was previously used among others for segmentation of data for whole-body MALDI MSI experiment [20]. Images of the major regions of the BC tissue from patient no. 1 were outlined by SSCA segmentation as shown in Supplementary Fig. S1. What is interesting, images generated with the aid of Cardinal MSI with SSCA method are very similar to the ion images obtained in MSI experiment and suggest that: (i) areas of imprints are clearly different from target area with no fuzzy boundaries and (ii) cancerous area is clearly different from the normal one.

4.1. Identification of metabolite biomarkers

The analysis of MSI data revealed a list of 28 compounds for which the highest abundance differences between the normal and cancerous areas. Only those ion images were selected for which the trend for a given m/z value was similar in all 6 experiments. As judged from generated ion

images 2 adducts have higher average intensities in cancer tissue, and the next 26 ions are of higher intensity in normal tissue. The list of identified compounds is presented in Supplementary Table S2. The identity of some of compounds was confirmed with LIFT® MS/MS experiments (Supplementary Table S3). Metabolite mean abundance data from both cancer and normal tissue regions of 28 identified compounds were further subjected to supervised and unsupervised multivariate statistical analysis using the MetaboAnalyst 5.0 online software. The 2D principal components analysis (PCA) score plots of both subsets indicated good separation between the cancer and the normal tissue regions (Fig. 1A).

The best separation of groups was obtained along principal components 1 and 2 (i.e. PC1 and PC2) which accounted for 61.2% and 18.8%, respectively. The separation between the BC and normal tissue samples was further examined using the supervised multivariate statistical analysis - Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA) (Fig. 1B). We conducted 2000 permutation tests to evaluate the statistical robustness of the OPLS-DA model (Supplementary Fig. S2). Good discrimination was observed between cancer and normal groups ($Q^2 = 0.774$, $R^2Y = 0.998$, P -value < 0.03 (0/2000)). Potential BC biomarkers were selected on the basis of the variable influence on projection (VIP) value resulting from the OPLS-DA model (Fig. 1C). By combining the VIP (> 1.0) with the results from the independent t -test (P -value from t -test < 0.05) and fold change analysis ($0.5 < FC < 1.2$) 10 metabolites were selected as differential for BC tissue and normal samples (Table 1). All data for identified compounds analyzed within this work are presented in Supplementary Table S2.

Next, univariate ROC curve analysis was separately performed to evaluate the diagnostic ability of the models. ROC curves analyses were used to estimate the accuracy of combined signatures model of imaging data. The areas under curves (AUC) of ROC curves were used to determine the diagnostic effectiveness of important metabolites. Applying a ROC approach to biomarker analysis allowed characterization of diagnostic accuracy, and evaluation of the predictive accuracy. The results indicated that all previously selected metabolites have AUC above 0.81 (Table 1). The best ROC analyses with the highest statistical significance were obtained for hypotaurine and 3-methylbutanal (AUC = 0.944, specificity = 1.0 and sensitivity = 0.8). The classification ROC model was based on a random forest algorithm. As shown in Fig. 1D, the combination of levels of 10 selected metabolites was a better discriminator (AUC = 0.993) than each metabolite separately. The results suggest that 10 specific metabolites: glycine, hypotaurine, 3-methylbutanal, ethylphosphate, glutamine, myosmine, PI(22:0/0:0), aminopentanal, proline betaine and methylguanidine could significantly increase the diagnostic potential and serve as useful discriminators of cancer tissues from normal tissues in patients diagnosed with BC. Ion images of all these compounds that differentiate the neoplastic and normal area to the greatest extent are presented in Figs. 2 and 3.

Ion images of 2 amino acids that play essential roles in human tissues were generated and the structure of one of them was confirmed with LIFT MS/MS method. One of the ion images of m/z 98.021 (Fig. 2 A) shows spatial distribution of the $[\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2 + \text{Na}]^+$ adduct (sodiated glycine). This ion was found to be present at a higher intensity in the normal tissue compared with the cancer tissue. The decreased levels of glycine were observed in lung cancer patients [21] and in serum of BC patients [22]. Similarly, ion assigned to potassium adduct of glutamine (m/z 185.032, Fig. 2 E) was found at a higher intensity in the normal tissue compared to the cancer tissue. NMR-based metabolomics studies have shown the decreased blood levels of glutamine in plasma samples from pancreatic cancer patients [23]. The decrease in the levels of the amino acids discussed above indicates an increased demand for these metabolites for tumor growth. This observation suggests that tumor's biochemistry may be associated with an increased glycolytic flux that has been found to be a major source of respiratory energy for tumor cells, and with the need for increased protein synthesis in tumor cells [24]. It has also been suggested that glycolysis is required to maintain lipogenesis and cholesterogenesis, that are essential for the growth and proliferation of tumor cells [25].

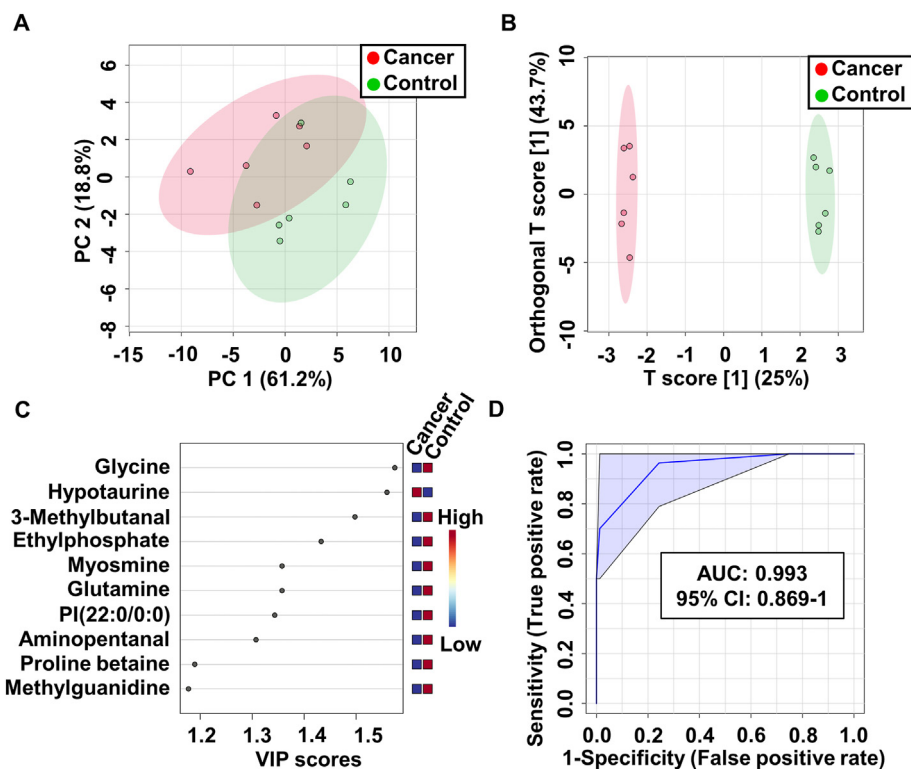


Fig. 1. Metabolomic analysis of tissue samples from bladder cancer (BC) patients. (A) PCA and (B) OPLS-DA scores plots of the cancer (red) and control (green) tissue samples. (C) VIP plot from OPLS-DA analysis. (D) The receiving operator characteristic (ROC) curves for the 10 selected metabolites.

Table 1

Mean metabolite abundance for controls vs. bladder cancer tissues. Bolded metabolites are considered statistically significantly different (P-value <0.05; VIP >1; FC < 0.5 and >1.2) between controls and cancer tissues.

No.	Compound name	Adduct type	m/z^c	P-value ^d	Fold Change ^e	VIP ^f	AUC	Power of the test	
								Sensitivity [%]	Specificity [%]
1	Glycine ^a	[C ₂ H ₅ NO ₂ +Na] ⁺	98.021	0.0025	0.30	1.56	0.92	100	83
2	Hypotaurine ^a	[C ₂ H ₇ NO ₂ S+ ¹⁰⁹ Ag] ⁺	217.924	0.0035	1.39	1.54	0.94	83	100
3	3-Methylbutanal ^a	[C ₅ H ₁₀ O + H] ⁺	87.080	0.0053	0.19	1.47	0.94	83	100
4	Ethylphosphate ^a	[C ₂ H ₇ O ₄ P + K] ⁺	164.971	0.0088	0.30	1.41	0.92	83	83
5	Glutamine ^b	[C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃ +K] ⁺	185.032	0.0147	0.29	1.35	0.92	83	83
6	Myosmine ^b	[C ₉ H ₁₀ N ₂ +H] ⁺	147.092	0.0147	0.29	1.35	0.92	83	83
7	PI(22:0/0:0) ^a	[C ₃₁ H ₆₁ O ₁₂ P+ ¹⁰⁹ Ag] ⁺	765.294	0.0171	0.19	1.32	0.92	100	83
8	Aminopentanal ^b	[C ₅ H ₁₁ NO + H] ⁺	102.091	0.0214	0.39	1.29	0.83	100	67
9	Proline betaine ^a	[C ₇ H ₁₃ NO ₂ +Na] ⁺	166.084	0.0417	0.44	1.17	0.83	100	67
10	Methylguanidine ^a	[C ₂ H ₇ N ₃ +Na] ⁺	96.053	0.0451	0.45	1.16	0.81	67	83

Abbreviations: AUC - area under the curve; FC - fold change; PI - phosphatidylinositol; PS - phosphatidylserine; VIP - variable influence on projection.

^a Putative identification.

^b Identity confirmed with LIFT MS/MS method.

^c Calculated m/z values.

^d P-value determined from Student's t-test.

^e Fold change between cancer and control tissue samples.

^f VIP scores derived from OPLS-DA model.

Moreover, it was found that glycine metabolism is necessary and sufficient for cell transformation and malignancy [26].

In the present study, 11 lipids that play essential roles in the human body showed a large differentiation between neoplastic and normal tissue, and their structures were in some cases successfully confirmed with LIFT MS/MS method (Supplementary Tables S2 and S3). We found, that 5 ions of ¹⁰⁹Ag isotope adducts of phosphoglycerol PG(32:1) (m/z 829.398), phosphoinositol PI(22:0/0:0) (m/z 765.294), phosphoserines PS(O-30:1) (m/z 800.383), PS(30:1) (m/z 814.362), phosphoethanolamine PE(34:4) (m/z 820.388), 4 sodium adducts of diacylglyceride DG(44:1) (m/z 757.668), phosphocholine PC(40:10) (m/z 848.520), phosphoglycerolphosphate PGP(32:1) (m/z 801.471), phosphoethanolamine PE(26:1)

(m/z 628.395), and 2 potassium adducts of phosphoserine PS(36:4) (m/z 822.468), sphingomyeline SM(d18:0/12:0) (m/z 689.499), dominated in the cancer tissue MSI region compared to normal tissue. However, only 1 lipid - PI(22:0/0:0) showed statistically significant differentiation between normal and neoplastic tissues (Fig. 3A). Lipids are the building blocks of cell membranes and play important roles in various biological processes, such as cellular signaling, chemical-energy storage, homeostasis, apoptosis, metabolism, cell adhesion and migration, neurotransmission, signal transduction, vesicular trafficking, post-translational modifications and cell-cell interactions in tissues. These cellular processes are associated with cellular transformations, cancer progression and metastasis. Lipids are linked to cancer at the metabolic level and are expected to be present in

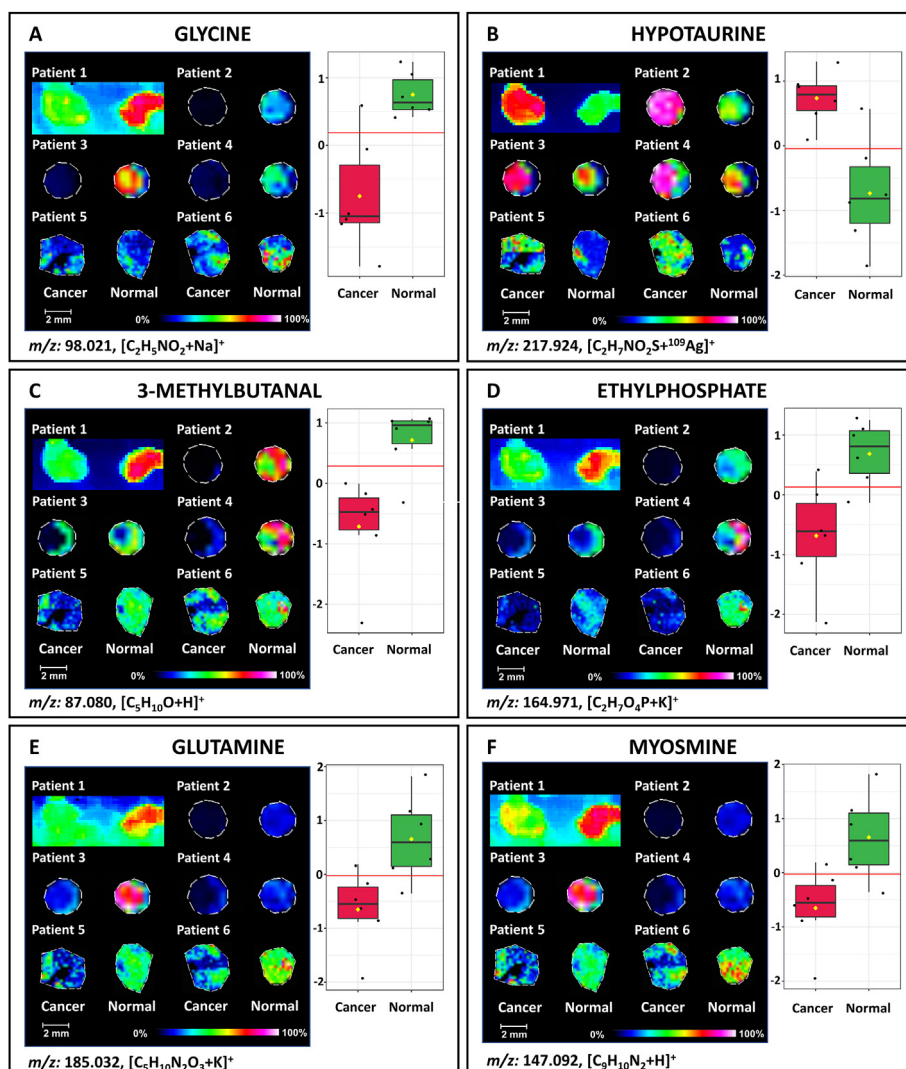


Fig. 2. Results of LDI-MSI analysis of the surface of the bladder cancer (BC) specimens on $^{109}\text{AgNPET}$. The left sides of the individual metabolite panel (A–F) present ion images (TIC normalization) for ions of m/z as stated below each image. The right sides contain plots of distribution of abundance values of metabolite in control and cancer samples with optimal cut-off as a horizontal dashed line. All ion images are within $\pm 0.05 m/z$.

cancer cells, tissues and biofluids. Multiple studies have demonstrated altered lipid profiles in biological samples that have been screened to identify biomarkers in cancer research [27,28]. Several reports have shown the spatial distributions of many potential lipid-based biomarkers in various malignant tumors such as lung [29], breast [30], ovarian [31], colorectal [32], prostate [33], kidney [34], renal [35], bladder [36] and thyroid cancers [37]. Dill et al. [38] demonstrated distributions of the multiple lipids and free fatty acids species between cancerous and noncancerous dog bladder tissue samples with desorption electrospray ionization MS (DESI-MS). The same group of researchers in another study used human BC tissue samples to visualize of glycerophospholipid (GP) distribution in cancerous and normal tissue. They found that tumor tissue shows increased intensities for different GPs such as phosphatidylserine (PS) and phosphatidylinositol (PI) when compared to the normal tissue [36]. Wittman et al. [39], measured multiple distinct compounds in human urine samples, that differentiate BC from non-cancer controls. They selected 25 potential biomarkers related to lipid metabolism.

Ion assigned to proton adduct of 3-methylbutanal (m/z 87.080; Fig. 2C) was found in higher intensity in normal tissue compared to cancer tissue. 3-Methylbutanal also known as isovaleraldehyde is an aldehyde that occurs naturally in all eukaryotes. In humans, this compound has been found to be associated with several diseases. Previous

research revealed significantly reduced level of 3-methylbutanal in urine samples from patients with clear cell renal cell carcinoma which may be associated with higher level of aldehyde dehydrogenase that converts aldehydes to their respective carboxylic acids and is often upregulated in cancer [40]. Furthermore, in the human lung cancer cell line, 3-methylbutanal was found at decreased concentrations [41].

One of the ion images of m/z 166.084 (Fig. 2C) shows spatial distribution of the sodium adduct of proline betaine. This secondary metabolite has been described previously as a highly effective osmoprotectant in many plants. In humans, proline betaine was at reduced levels in plasma samples from patients with esophageal squamous cell carcinoma compared to healthy controls which is also in line with our results [42]. Similar results were obtained in metabolomic analysis of serum samples from patients with preeclampsia [43]. Proline betaine was found to be up-regulated in urine samples from patients with uterine cervix cancer and renal cell carcinoma [44,45].

The MSI results of the bladder tissue imprint suggest, that the ion of m/z 96.053 (Fig. 3 D) corresponds to sodiated adduct of methylguanidine which was found in higher abundance in normal tissue. Methylguanidine is an organic compound containing a guanidine moiety in which one of the amino hydrogens is substituted by a methyl group. Endogenous methylguanidine is produced by conversion from creatinine and some

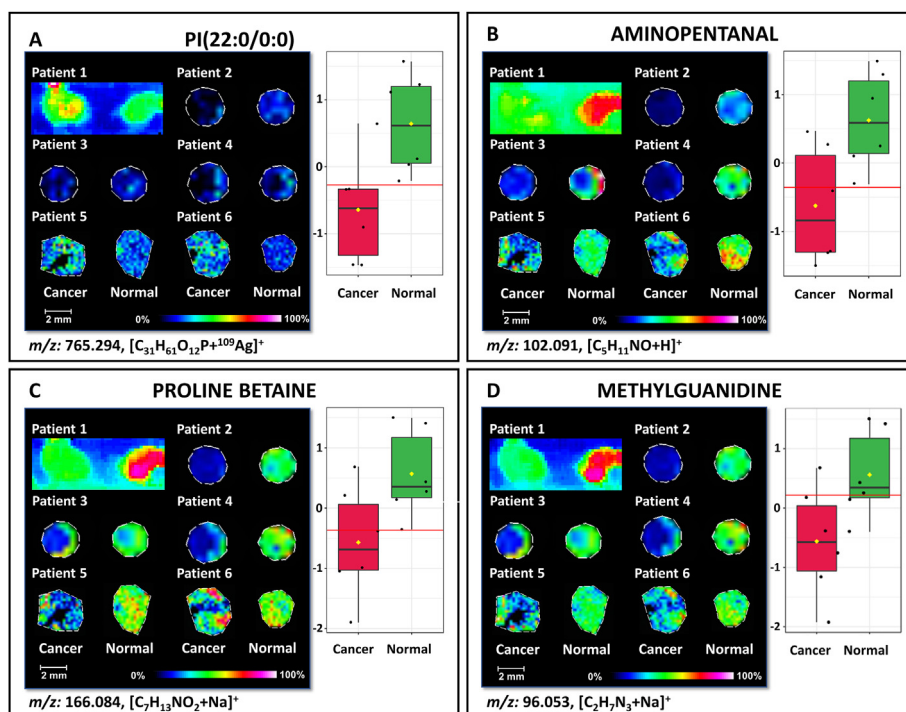


Fig. 3. Results of LDI-MSI analysis of the surface of the bladder cancer (BC) specimens on $^{109}\text{AgNPET}$. (A–D) The left sides of the individual metabolite panel (A–D) present ion images (TIC normalization) for ions of m/z as stated below each image. The right sides contain plots of distribution of abundance values of metabolite in control and cancer samples with optimal cut-off as a horizontal dashed line. All ion images are within $\pm 0.05 m/z$.

amino acids [46]. Previous studies reported the potential toxicity of methylguanidine [47]. Methylguanidine was proposed as a serum potential biomarker of pancreatic cancer based on LC/GC–MS analyses which revealed a higher abundance of this compound in serum of patients with this tumor compared to controls [48]. Higher level of methylguanidine was also observed in serum of patients with cholangiocarcinoma [49]. This metabolite was identified in higher concentration in urine samples from patients with chronic pancreatitis by NMR-based metabolomics [50]. Significantly increased level of methylguanidine was identified in urine samples from dogs with BC compared to controls in an NMR-based metabolomics study [51].

Ion images presenting higher average intensity in the area of normal tissue were recorded for proton adduct of myosmine (m/z 147.092; Fig. 2F). Myosmine is a derivative of pyridines which can be found in tobacco and in various foods. It is suspected that this compound may be related to esophageal cancer [52]. Ion assigned to potassium adduct of ethylphosphate (m/z 164.971; Fig. 2D) was found in higher intensity in normal tissue compared to cancer tissue. Ethylphosphate is an organic compound that belongs to the class of monoalkyl phosphates. This compound was identified in human saliva by LC-MS [53]. Also, the ion of m/z 102.091 (Fig. 3B) was found in higher abundance in normal tissue and was assigned to $[\text{M}+\text{H}]^+$ adduct of aminopentanal.

Ion image that shows higher intensity in the area of cancer tissue has been created for the m/z 217.924 which corresponds to the ^{109}Ag adduct of hypotaurine (Fig. 2B). Hypotaurine is a sulfonic acid that is an intermediate in the biosynthesis of taurine from cysteine sulphonic acid. Previous research has established that hypotaurine has antioxidant properties *in vivo* [54] and also acts as a neurotransmitter [55]. Previously, using ^1H NMR, hypotaurine was found in increased level in serum samples of BC patients resistant to neoadjuvant chemotherapy [56]. Elevated level of hypotaurine was found in saliva of patients with medication-related osteonecrosis of the jaw [57]. In addition, hypotaurine was found to be upregulated in tissue of patients with colorectal cancer and related to the progression of this tumor [58].

4.2. Pathway analysis

A metabolic pathway impact analysis was performed to identify the most relevant pathways involved in the observed changes of tissue metabolite levels. Ten most significant metabolites were subjected to pathway analysis and quantitative pathway enrichment analysis. Three of them were found to be relevant to human metabolism (Table 2). Seventeen metabolic pathways i.e., glyoxylate and dicarboxylate metabolism, aminoacyl-tRNA biosynthesis, D-glutamine and D-glutamate metabolism, nitrogen metabolism, taurine and hypotaurine metabolism, arginine biosynthesis, glutathione metabolism, alanine, aspartate and glutamate metabolism, porphyrin and chlorophyll metabolism, glycine, serine and threonine metabolism, pyrimidine metabolism, primary bile acid biosynthesis, purine metabolism, mercaptopurine action pathway, thioguanine action pathway, azathioprine action pathway and mercaptopurine metabolism pathway, were found to be significantly impacted when comparing BC to normal tissue. Results from pathway impact analysis are shown in Supplementary Tables S3 and S4. Glycine,

Table 2
Selected metabolites and their involvement in different pathways.

Compound name	Pathway involved
Glycine	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism, aminoacyl-tRNA biosynthesis, glutathione metabolism, porphyrin and chlorophyll metabolism, glycine, serine and threonine metabolism, primary bile acid biosynthesis, mercaptopurine action pathway, thioguanine action pathway, azathioprine action pathway
Glutamine	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism, aminoacyl-tRNA biosynthesis, D-glutamine and D-glutamate metabolism, nitrogen metabolism, arginine biosynthesis, alanine, aspartate and glutamate mercaptopurine action pathway metabolism, pyrimidine metabolism, purine metabolism, thioguanine action pathway, azathioprine action pathway, mercaptopurine metabolism pathway
Hypotaurine	Taurine and hypotaurine metabolism

glutamine and hypotaurine were found to be involved in these metabolic pathways (Table 2). These pathways are well known to be related to cancer, e.g. taurine and hypotaurine metabolism have been shown to be related to BC [59,60] and renal cell carcinoma [61], sulfur metabolism has been shown to be related to breast cancer [62], and aminoacyl-tRNA biosynthesis pathway has been shown to be related to prostate cancer [63].

4.3. Diagnostic value of nanoparticles for MSI of cancer tissues

The diagnosis of most cancers is based on a molecular pathology that is currently most often performed by immunohistochemical analysis (IHC) or fluorescence *in situ* hybridization (FISH) which most often uses macromolecules such as proteins or nucleic acids of varying lengths [64, 65]. These methods are complex, time-consuming, and require specialized and expensive antibodies or labeling. Surgical excision of the bladder tumor is currently a method of choice for treating patients suffering from BC, therefore it is important to quickly and precisely define the neoplastic tissue border during surgery in order to completely remove the tumor without damaging normal tissue. Numerous previous studies have shown that metabolites enable a more precise determination of pathology and may serve as potential diagnostic biomarkers in a variety of malignancies [66]. The use of MSI allows not only to identify potential tumor biomarkers but also to determine their location on the surface of the examined tissue. Nowadays almost all of MSI is made with the use of MALDI with many of its drawbacks including (i) abundant and numerous chemical background peaks in the low-mass region ($m/z < \approx 1000$) due to the presence of the applied matrix; (ii) the frequent need for external mass calibration; (iii) low mass resolution and accuracy due to the thickness of the tissue samples; (iv) low ionization efficiency for many organic compounds present in the samples in their non-charged states; (v) inhomogeneous matrix crystallization; and (vi) commonly observed acid-catalyzed hydrolysis of various biomolecules, and thus it is not suitable for metabolites. On the other hand, some nanoparticles such as silver and gold-based lacks most of above mentioned MALDI drawbacks and are one of the most interesting choices for studying of differentiation between cancer and normal tissues.

5. Conclusion

In this study, LDI-MSI technique with the use of nanoparticle-enhanced SALDI-type $^{109}\text{AgNPET}$ target was used for MSI of human bladder tissue. Ion images produced for few dozens of compounds of interest presented attention-grabbing differentiation of intensities. Univariate and multivariate statistical analyses revealed 10 metabolites that differentiated cancer from normal tissues. Among these metabolites, glycine, 3-methylbutanal, ethylphosphate, glutamine, myosmine, PI(22:0/0:0), aminopentanal, proline betaine and methylguanidine were found in higher abundance in normal tissue samples and hypotaurine was found at a higher level in cancer tissue samples. These compounds may significantly increase diagnostic potential and serve as useful discriminators of cancerous versus normal tissues in patients diagnosed with BC. Published results demonstrate that nanoparticle-based LDI-MSI must be considered as a powerful tool for analysis of biological objects and especially for biomarker discovery.

Financial disclosure

This work was supported by the National Science Centre (NCN), SONATA grant no. UMO-2018/31/D/ST4/00109.

The author contributions

Study design: Krzysztof Ossoliński Tomasz Ruman, Joanna Nizioł.

Data collection: Joanna Nizioł, Adrian Arendowski, Aneta Plaza-Altamer, Krzysztof Ossoliński, Anna Ossolińska, Tadeusz Ossoliński.

Statistical Analysis: Joanna Nizioł.

Data interpretation: Joanna Nizioł, Tomasz Ruman.

Manuscript preparation: Joanna Nizioł, Krzysztof Ossoliński, Artur Kołodziej, Tomasz Ruman.

Literature Search: Joanna Nizioł, Krzysztof Ossoliński.

Funds Collection: Joanna Nizioł.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interests.

Acknowledgements

Mr Dominik Ruman is acknowledged for creating MS search engine of chemical compounds.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.advms.2022.12.002>.

References

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA A Cancer J Clin* 2021;71:209–49. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>.
- [2] Kamat AM, Hegarty PK, Gee JR, Clark PE, Svatek RS, Hegarty N, et al. ICUD-EAU international consultation on bladder cancer 2012: screening, diagnosis, and molecular markers. *Eur Urol* 2013;63:4–15. <https://doi.org/10.1016/J.EURURO.2012.09.057>.
- [3] González de Vega R, Clases D, Fernández-Sánchez ML, Eiró N, González LO, Vizoso FJ, et al. MMP-11 as a biomarker for metastatic breast cancer by immunohistochemical-assisted imaging mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2019;411:639–46. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1365-3>.
- [4] Paine MRL, Kooijman PC, Fisher GL, Heeren RMA, Fernández FM, Ellis SR. Visualizing molecular distributions for biomaterials applications with mass spectrometry imaging: a review. *J Mater Chem B* 2017;5:7444–60. <https://doi.org/10.1039/C7TB01100H>.
- [5] Steurer S, Singer JM, Rink M, Chun F, Dahlem R, Simon R, et al. MALDI imaging-based identification of prognostically relevant signals in bladder cancer using large-scale tissue microarrays. *Urol Oncol Semin Orig Investig* 2014;32:1225–33. <https://doi.org/10.1016/J.UROLONC.2014.06.007>.
- [6] Ifa DR, Wiseman JM, Song Q, Cooks RG. Development of capabilities for imaging mass spectrometry under ambient conditions with desorption electrospray ionization (DESI). *Int J Mass Spectrom* 2007;259:8–15. <https://doi.org/10.1016/J.IJMS.2006.08.003>.
- [7] Sekula J, Nizioł J, Rode W, Ruman T. Gold nanoparticle-enhanced target (AuNPET) as universal solution for laser desorption/ionization mass spectrometry analysis and imaging of low molecular weight compounds. *Anal Chim Acta* 2015;875:61–72. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2015.01.046>.
- [8] Nizioł J, Rode W, Zieliński Z, Ruman T. Matrix-free laser desorption–ionization with silver nanoparticle-enhanced steel targets. *Int J Mass Spectrom* 2013;335:22–32. <https://doi.org/10.1016/J.IJMS.2012.10.009>.
- [9] Nizioł J, Rode W, Laskowska B, Ruman T. Novel monoisotopic $^{109}\text{AgNPET}$ for laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 2013;85:1926–31. <https://doi.org/10.1021/ac303770y>.
- [10] Nizioł J, Ruman T. Surface-transfer mass spectrometry imaging on a monoisotopic silver nanoparticle enhanced target. *Anal Chem* 2013;85. <https://doi.org/10.1021/ac4031658>.
- [11] Nizioł J, Ossoliński K, Ossoliński T, Ossolińska A, Bonifay V, Sekula J, et al. Surface-Transfer mass spectrometry imaging of renal tissue on gold nanoparticle enhanced target. *Anal Chem* 2016;88. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01859>.
- [12] Arendowski A, Nizioł J, Ossoliński K, Ossolińska A, Ossoliński T, Dobrowolski Z, et al. Laser desorption/ionization MS imaging of cancer kidney tissue on silver nanoparticle-enhanced target. *Bioanalysis* 2018;10:83–94. <https://doi.org/10.4155/bio-2017-0195>.
- [13] Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs—Part A: renal, penile, and testicular tumours. *Eur Urol* 2016;70:93–105. <https://doi.org/10.1016/J.EURURO.2016.02.029>.
- [14] Sauter G, Algaba F, Amin MB, Busch C, Chevillet J, Gasser T, et al. Tumours of the urinary system: non-invasive urothelial neoplasias. In: WHO classification of classification of tumours of the urinary system and male genital organs. IARC Press Lyon; 2004. p. 89–157.
- [15] Suckau D, Resemann A, Schuereberg M, Hufnagel P, Franzen J, Holle A. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal Bioanal Chem* 2003;376:952–65. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2057-0>.

- [16] Bemis KD, Harry A, Eberlin LS, Ferreira C, van de Ven SM, Mallick P, et al. Cardinal : an R package for statistical analysis of mass spectrometry-based imaging experiments. *Bioinformatics* 2015;31:2418–20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv146>.
- [17] Pang Z, Chong J, Zhou G, De Lima Morais DA, Chang L, Barrette M, et al. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Res* 2021;49:W388–96. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB382>.
- [18] Patiny L, Borel A. ChemCalc: a building block for tomorrow's chemical infrastructure. *J Chem Inf Model* 2013;53:1223–8. <https://doi.org/10.1021/ci300563h>.
- [19] Arendowski A, Nizioł J, Ruman T. Silver-109-based laser desorption/ionization mass spectrometry method for detection and quantification of amino acids. *J Mass Spectrom* 2018;53:369–78. <https://doi.org/10.1002/jms.4068>.
- [20] Luehr TC, Koide EM, Wang X, Han J, Borchers CH, Helbing CC. Metabolomic insights into the effects of thyroid hormone on Rana [Lithobates] catesbeiana metamorphosis using whole-body Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry Imaging (MALDI-MSI). *Gen Comp Endocrinol* 2018;265:237–45. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.02.012>.
- [21] Duarte IF, Rocha CM, Barros AS, Gil AM, Goodfellow BJ, Carreira IM, et al. Can nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy reveal different metabolic signatures for lung tumours? *Virchows Arch* 2010;457:715–25. <https://doi.org/10.1007/s00428-010-0993-6>.
- [22] Cao M, Zhao L, Chen H, Xue W, Lin D. NMR-Based metabolomic analysis of human bladder cancer. *Anal Sci* 2012;28:451–6. <https://doi.org/10.2116/ANALSCI.28.451>.
- [23] Owusu-Sarfo K M, Asiago V, Deng L, Gu H, Wei S, Shanaiah N, et al. NMR-Based metabolite profiling of pancreatic cancer n.d.
- [24] Moreadith RW, Lehninger AL. The pathways of glutamate and glutamine oxidation by tumor cell mitochondria. In: *Role of mitochondrial NAD(P)+-dependent malic enzyme*, 259; 1984. p. 6215–21.
- [25] Costello LC, Franklin RB. "Why do tumour cells glycolyse?": from glycolysis through citrate to lipogenesis. *Mol Cell Biochem* 2005;280:1–8. <https://doi.org/10.1007/s11010-005-8841-8>.
- [26] Possemato R, Marks KM, Shaul YD, Pacold ME, Kim D, Birsoy K, et al. Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature* 2011;476:346–50. <https://doi.org/10.1038/nature10350>.
- [27] Yoshioka Y, Tsutsumi T, Adachi M, Tokumura A. Altered phospholipid profile in urine of rats with unilateral ureteral obstruction. *Metabolomics* 2009;5:429–33. <https://doi.org/10.1007/s11306-009-0167-1>.
- [28] Lee GK, Lee HS, Park YS, Lee JH, Lee SC, Lee JH, et al. Lipid MALDI profile classifies non-small cell lung cancers according to the histologic type. *Lung Cancer* 2012;76:197–203. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2011.10.016>.
- [29] Marien E, Meister M, Muley T, Fieusws S, Bordel S, Derua R, et al. Non-small cell lung cancer is characterized by dramatic changes in phospholipid profiles. *Int J Cancer* 2015;137:1539–48. <https://doi.org/10.1002/ijc.29517>.
- [30] Guo S, Wang Y, Zhou D, Li Z. Significantly increased monounsaturated lipids relative to polyunsaturated lipids in six types of cancer microenvironment are observed by mass spectrometry imaging. *Sci Rep* 2015;4:5959. <https://doi.org/10.1038/srep05959>.
- [31] Kang S, Lee A, Park YS, Lee SC, Park SY, Han SY, et al. Alteration in lipid and protein profiles of ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2011;21:1566–72. <https://doi.org/10.1097/IGC.0b013e318226c5f5>.
- [32] Mirnezami R, Spagou K, Vorkas PA, Lewis MR, Kinross J, Want E, et al. Chemical mapping of the colorectal cancer microenvironment via MALDI imaging mass spectrometry (MALDI-MSI) reveals novel cancer-associated field effects. *Mol Oncol* 2014;8:39–49. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.08.010>.
- [33] Goto T, Terada N, Inoue T, Kobayashi T, Nakayama K, Okada Y, et al. Decreased expression of lysophosphatidylcholine (16:0/OH) in high resolution imaging mass spectrometry independently predicts biochemical recurrence after surgical treatment for prostate cancer. *Prostate* 2015;75:1821–30. <https://doi.org/10.1002/pros.23088>.
- [34] Lin L, Huang Z, Gao Y, Chen Y, Hang W, Xing J, et al. LC-MS-based serum metabolic profiling for genitourinary cancer classification and cancer type-specific biomarker discovery. *Proteomics* 2012;12:2238–46. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200016>.
- [35] Dill AL, Eberlin LS, Zheng C, Costa AB, Ifa DR, Cheng L, et al. Multivariate statistical differentiation of renal cell carcinomas based on lipidomic analysis by ambient ionization imaging mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2010;398:2969–78. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4259-6>.
- [36] Dill AL, Eberlin LS, Costa AB, Zheng C, Ifa DR, Cheng L, et al. Multivariate statistical identification of human bladder carcinomas using ambient ionization imaging mass spectrometry. *Chem Eur J* 2011;17:2897–902. <https://doi.org/10.1002/chem.201001692>.
- [37] Bandu R, Mok HJ, Kim KP. Phospholipids as cancer biomarkers: mass spectrometry-based analysis. *Mass Spectrom Rev* 2018;37:107–38. <https://doi.org/10.1002/mas.21510>.
- [38] Dill AL, Ifa DR, Manicke NE, Costa AB, Ramos-Vara JA, Knapp DW, et al. Lipid profiles of canine invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder and adjacent normal tissue by desorption electrospray ionization imaging mass spectrometry. *Anal Chem* 2009;81:8758–64. <https://doi.org/10.1021/ac901028b>.
- [39] Wittmann BM, Stirdivant SM, Mitchell MW, Wulff JE, McDunn JE, Li Z, et al. Bladder cancer biomarker discovery using global metabolomic profiling of urine. *PLoS One* 2014;9:e115870. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115870>.
- [40] Pinto J, Amaró F, Lima AR, Carvalho-Maia C, Jerónimo C, Henrique R, et al. Urinary volatiles unveils a candidate biomarker panel for noninvasive detection of clear cell renal cell carcinoma. *J Proteome Res* 2021;20:3068–77. <https://doi.org/10.1021/ACS.JPROTEOME.0C00936>.
- [41] Hanai Y, Shimono K, Oka H, Baba Y, Yamazaki K, Beauchamp GK. Analysis of volatile organic compounds released from human lung cancer cells and from the urine of tumor-bearing mice. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-12-7>; 2012.
- [42] Zhu ZJ, Qi Z, Zhang J, Xue WH, Li LF, Shen ZB, et al. Untargeted metabolomics analysis of esophageal squamous cell carcinoma discovers dysregulated metabolic pathways and potential diagnostic biomarkers. *J Cancer* 2020;11:3944. <https://doi.org/10.7150/JCA.41733>.
- [43] Chen T, He P, Tan Y, Xu D. Biomarker identification and pathway analysis of preeclampsia based on serum metabolomics. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;485:119–25. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.02.032>.
- [44] Chen Y, Xu J, Zhang R, Shen G, Yao C, Jiang YS. Methylguanidine cytotoxicity on HK-2 cells and protective effect of antioxidants against MG-induced apoptosis in renal proximal tubular cells in vitro, vol. 32; 2010. p. 85. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2010.501935>. <https://doi.org/10.1039/C3AN36818A>.
- [45] Oto J, Fernández-Pardo Á, Roca M, Plana E, Solmoirago MJ, Sánchez-González JV, et al. Urine metabolomic analysis in clear cell and papillary renal cell carcinoma: a pilot study. *J Proteomics* 2020;218:103723. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2020.103723>.
- [46] Perez G, Faluotico R. Creatinine: a precursor of methylguanidine. *Export* 1973 2912 1973;29:1473–4. <https://doi.org/10.1007/BF01943863>.
- [47] Wang F, Yang B, Ling GH, Yao C, Jiang YS. Methylguanidine cytotoxicity on HK-2 cells and protective effect of antioxidants against MG-induced apoptosis in renal proximal tubular cells in vitro, vol. 32; 2010. p. 85. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2010.501935>. https://doi.org/10.1031/PR501135F_SI_001.PDF.
- [48] Xie G, Lu L, Qiu Y, Ni Q, Zhang W, Gao YT, et al. Plasma metabolite biomarkers for the detection of pancreatic cancer. *J Proteome Res* 2015;14:1195–202. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b01135>.
- [49] Sukawat M, Phetcharaburanin J, Klanrit P, Namwat N, Khuntikeo N, Titapun A, et al. Metabolic phenotyping predicts gemcitabine and cisplatin chemosensitivity in patients with cholangiocarcinoma. *Front Public Health* 2022;10:766023. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.766023>.
- [50] Luszczyk ER, Paulo JA, Saltzman JR, Kadiyala V, Banks PA, Beilman G, et al. Urinary 1H-NMR metabolomics can distinguish pancreatitis patients from healthy controls. *JOP* 2013;14:161.
- [51] Zhang J, Wei S, Liu L, Nagana Gowda GA, Bonney P, Stewart J, et al. NMR-based metabolomics study of canine bladder cancer. *Biochim Biophys Acta, Mol Basis Dis* 2012;1822:1807–14. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.08.001>.
- [52] Wilp J, Zwickenpflug W, Richter E. Nitrosation of dietary myosmine as risk factor of human cancer. *Food Chem Toxicol* 2002;40:1223–8. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00039-X](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00039-X).
- [53] Álvarez-Sánchez B, Priego-Capote F, Luque de Castro MD. Study of sample preparation for metabolomic profiling of human saliva by liquid chromatography–time of flight/mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2012;1248:178–81. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.029>.
- [54] Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochem J* 1988;256:251. <https://doi.org/10.1042/BJ2560251>.
- [55] Kalir A, Kalir HH. Biological activity of sulfenic acid derivatives. *Sulphinic Acids, Esters Deriv* 2010:665–76. <https://doi.org/10.1002/9780470772270.CH23>.
- [56] Cicero DO, Zhuang J, Yang X, Zheng Q, Li K, Cai L, et al. Metabolic profiling of bladder cancer patients' serum reveals their sensitivity to neoadjuvant chemotherapy. *Metabolism* 2022;12:558. <https://doi.org/10.3390/METABO12060558>.
- [57] Yatsuoka W, Ueno T, Miyano K, Uezono Y, Enomoto A, Kaneko M, et al. Metabolomic profiling reveals salivary hypotaurine as a potential early detection marker for medication-related osteonecrosis of the jaw. *PLoS One* 2019;14:e0220712. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0220712>.
- [58] Hou X, Hu J, Zhao X, Wei Q, Zhao R, Li M, et al. Taurine attenuates the hypotaurine-induced progression of CRC via ERK/RSK signaling. *Front Cell Dev Biol* 2021;9:954. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.631163>.
- [59] Loras A, Suárez-Cabrera C, Martínez-Bisbal MC, Quintás G, Paramio JM, Martínez-Máñez R, et al. Integrative metabolomic and transcriptomic analysis for the study of bladder cancer. *Cancers* 2019;11:1–36. <https://doi.org/10.3390/cancers11050686>.
- [60] Loras A, Martínez-Bisbal MC, Quintás G, Gil S, Martínez-Máñez R, Ruiz-Cerdá JL. Urinary metabolic signatures detect recurrences in non-muscle invasive bladder cancer. *Cancers* 2019;11:914. <https://doi.org/10.3390/CANCERS11070914>; 2019; 11:914.
- [61] Yang W, Yoshigoe K, Qin X, Liu JS, Yang JY, Niemierko A, et al. Identification of genes and pathways involved in kidney renal clear cell carcinoma. *BMC Bioinf* 2014;15:S2. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-S1-52>.
- [62] Ryu CS, Kwak HC, Lee KS, Kang KW, Oh SJ, Lee KH, et al. Sulfur amino acid metabolism in doxorubicin-resistant breast cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011;255:94–102. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.06.004>.
- [63] Vellaichamy A, Sreekumar A, Strahler JR, Rajendiran T, Yu J, Varambally S, et al. Proteomic interrogation of androgen action in prostate cancer cells reveals roles of aminoacyl tRNA synthetases. *PLoS One* 2009;4:e7075. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007075>.
- [64] Naumova AV, Modo M, Moore A, Murry CE, Frank JA. Clinical imaging in regenerative medicine. *Nat Biotechnol* 2014 328 2014;32:804–18. <https://doi.org/10.1038/nbt.2993>.
- [65] Harris TJR, McCormick F. The molecular pathology of cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2010;7:251–65. <https://doi.org/10.1038/NRCLINONC.2010.41>.
- [66] Baker M. Metabolomics: from small molecules to big ideas. *Nat Methods* 2011 82 2011;8:117–21. <https://doi.org/10.1038/nmeth0211-117>.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical Analysis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpa

Original article

Metabolomic and elemental profiling of blood serum in bladder cancer

Krzysztof Ossoliński^a, Tomasz Ruman^b, Valérie Copié^c, Brian P. Tripet^c,
Leonardo B. Nogueira^d, Katiane O.P.C. Nogueira^e, Artur Kołodziej^f, Aneta Płaza-Altamer^f,
Anna Ossolińska^a, Tadeusz Ossoliński^a, Joanna Nizioł^{b,*}

^a Department of Urology, John Paul II Hospital, 36-100, Kolbuszowa, Poland^b Rzeszów University of Technology, Faculty of Chemistry, 35-959, Rzeszów, Poland^c The Department of Chemistry and Biochemistry, Montana State University, Bozeman, MT, 59717, USA^d Department of Geology, Federal University of Ouro Preto, 35400-000, Ouro Preto, Brazil^e Department of Biological Sciences, Federal University of Ouro Preto, 35400-000, Ouro Preto, Brazil^f Doctoral School of Engineering and Technical Sciences at the Rzeszów University of Technology, 35-959, Rzeszów, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 March 2022

Received in revised form

19 August 2022

Accepted 27 August 2022

Available online xxx

Keywords:

Bladder cancer

Biomarkers

Human serum

Metallomics

Metabolomics

ABSTRACT

Bladder cancer (BC) is one of the most frequently diagnosed types of urinary cancer. Despite advances in treatment methods, no specific biomarkers are currently in use. Targeted and untargeted profiling of metabolites and elements of human blood serum from 100 BC patients and the same number of normal controls (NCs), with external validation, was attempted using three analytical methods, i.e., nuclear magnetic resonance, gold and silver-109 nanoparticle-based laser desorption/ionization mass spectrometry (LDI-MS), and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). All results were subjected to multivariate statistical analysis. Four potential serum biomarkers of BC, namely, isobutyrate, pyroglutamate, choline, and acetate, were quantified with proton nuclear magnetic resonance, which had excellent predictive ability as judged by the area under the curve (AUC) value of 0.999. Two elements, Li and Fe, were also found to distinguish between cancer and control samples, as judged from ICP-OES data and AUC of 0.807 (in validation set). Twenty-five putatively identified compounds, mostly related to glycans and lipids, differentiated BC from NCs, as detected using LDI-MS. Five serum metabolites were found to discriminate between tumor grades and nine metabolites between tumor stages. The results from three different analytical platforms demonstrate that the identified distinct serum metabolites and metal elements have potential to be used for noninvasive detection, staging, and grading of BC.

© 2022 The Author(s). Published by Elsevier B.V. on behalf of Xi'an Jiaotong University. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Bladder cancer (BC) is the tenth most commonly diagnosed cancer in the world with approximately 570,000 new cases diagnosed each year. The incidence rate per 100,000 person per year varies from 2.4 for women to 9.5 for men, and the mortality rate varies from 0.86 for women to 3.3 for men [1]. Globally, urothelial carcinoma (UC) identified histopathologically constitutes more than 90% of all the cases of BC. In endemic regions such as Egypt with a high prevalence of schistosomiasis infection, squamous cell

carcinoma (SCC) accounts for the majority of BC. However, control over the *Schistosoma haematobium* infection has led to a shift from SCC to UC being the most prevalent type of BC [2]. The remaining 10% includes exposure to aromatic amines, hydrocarbons, dyes, some solvents, and coal tar [3]. The most common symptoms of BC include macroscopic and microscopic hematuria. The mainstay for BC diagnosis includes cystoscopy and urine cytology, and may include ultrasound and computed tomography urography. Unfortunately, cystoscopy is considered as an invasive procedure and the sensitivity of urine cytology is low. Therefore, to reduce the number of procedures, urinary markers have been proposed to track BC recurrence [4,5]. These urinary markers are associated with higher sensitivity, although at the expense of lower specificity, compared with the accuracy of urine cytology. However, these markers have

* Corresponding author.

E-mail address: jniziol@prz.edu.pl (J. Nizioł).<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2022.08.004>2095-1779/© 2022 The Author(s). Published by Elsevier B.V. on behalf of Xi'an Jiaotong University. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

not been incorporated into clinical guidelines regarding the diagnosis and surveillance of BC. Therefore, there is a significant need for noninvasive methods for the early detection of BC with high sensitivity, specificity, and low cost.

Instrumental analyses of small molecules in biofluids, such as blood, serum, and urine, are very powerful approaches to identify and characterize diagnostic metabolic biomarkers. Metabolite concentrations are reflective of the state of the organism and may be the indicators of disease states including cancer states [6]. In the past decade, numerous sensitive analytical methods have been developed to allow the study of the metabolic state of living system. The most frequently used analytical platforms for study of metabolites are nuclear magnetic resonance (NMR) [7] and mass spectrometry (MS), the latter usually coupled with liquid chromatography (LC) or gas chromatography (GC) [8–10].

Metabolomic methods have been used for study of BC with the aim of identifying potential biomarkers in urine, serum, and tissues [11,12]. The advantage of serum analysis is that it is much less susceptible to the dilution factor compared to urine [13]. Although from an application point of view, serum analysis is the best option, the published data are very limited. A majority of reports of BC serum metabolomics describe MS results. The first such study [14] was focused on human serum profiling of BC with LC-MS, and the authors proposed five potential biomarkers. Later, Zhou et al. [15] applied GC-MS to perform plasma metabolomics analyses of 92 patients and 48 controls. The results identified increased levels of metabolites associated with the pentose phosphate pathway, fatty acid synthesis, and nucleotide metabolism in BC samples compared with the controls. The authors focused on three metabolites that could discriminate between the BC and control groups. In the following years, several publications appeared that focused on identifying potential biomarkers of BC using LC-MS [16–20] and GC-MS [21,22]. To date, only three reports have reported metabolic differences in serum within BC with NMR. The first NMR serum metabolomics study of BC was published by Cao et al. [23] in 2012, and involved 67 BC patients and 25 healthy controls, and revealed a few metabolites for which concentrations differed significantly between these two groups. The metabolite changes were linked to impacted pathways of lipogenesis, aromatic amino acid metabolism, glycolysis, and the citrate cycle. In 2013, Bansal et al. [24] applied proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) spectroscopy to compare 36 low-grade (LG) and 31 high-grade (HG) BC samples with those of 32 healthy control patients. The study identified six metabolites that could, together, serve as differentiating biomarkers of LG versus HG BC. This same research team recently reported the use of NMR to identify variations in the concentration of previously selected potential serum BC biomarkers in 55 pre-operative and 53 post-operative BC patients, and 152 controls [25].

Various studies have established the connection between levels of metals, including trace-level metals and other trace elements, with an increased risk of developing cancer in humans [26]. Toxic elements are known risk factors for genetic and epigenetic effects, which enhance the risk of developing different cancers [27]. Inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) has emerged as one of the most frequently used methods for assessing the concentrations of metals in samples of biological origin [28] including BC serum [29]. Studies recruited 27 BC patients, 29 non-tumor patients with acute and chronic inflammation, and 30 healthy control patients, who were divided into validation and discovery cohorts. ICP-OES methods have also been used in the search for biomarkers of other cancers, including kidney cancer [30,31].

Herein, we report the results of the largest investigation to date, comprising the targeted and non-targeted, elemental- and metabolomics-based profiling of 200 serum samples obtained from

100 patients with BC and 100 healthy controls. This study has enabled the elucidation of the detailed metabolic and elemental changes resulting from BC, with a specific focus on the stage and grade of BC. The analytical platforms used were high-resolution ^1H NMR, ICP-OES, and high-resolution laser desorption/ionization MS (LDI-MS), and the associated data were subjected to robust validation by multivariate and univariate statistical analyses.

2. Materials and methods

2.1. Materials and instruments

High-resolution LDI-MSI experiments were performed on Autoflex Speed time-of-flight mass spectrometer (Bruker, Bremen, Germany) with a declared resolution of $>20,000$ for m/z values of $>1,000$ in positive-ion reflectron mode. The samples were placed on a stainless-steel target with automatic pipette and then covered by nebulization with a silver-109 nanoparticle ($^{109}\text{AgNP}$) suspension generated by pulsed fiber laser (PFL) two-dimensional (2D) galvoscanner (GS) laser synthesis in solution/suspension (LASiS) and nebulization of $^{109}\text{AgNPs}$ ($^{109}\text{AgNPs}$ LDI-MS) as described in our recent publication [32]. Gold nanoparticle (AuNP)-based LDI-MS (AuNPs LDI-MS) was prepared analogically as described above with the exception for PFL-2D GS LASiS material/substrate, which was gold foil of 1 mm thickness. All solvents were of minimum LC-MS grade and were acquired from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Deuterium oxide (D_2O) and 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid were purchased from Sigma Inc. (Boston, MA, USA). Nitric acid EMSURE ISO-grade 65% and hydrogen peroxide EMSURE ACS ISO-grade 30% were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

2.2. Collection of human serum samples

Serum samples were collected at John Paul II Hospital (Kolbuszowa, Poland). Control serum samples were collected from healthy volunteers after a medical examination focused on the detection of urinary cancers. Both types of serum samples from the original NMR, MS, and ICP-OES datasets were randomly divided every time into two groups, a training set, comprising 80% of all samples, and a validation set, corresponding to 20% of all samples. All the patients underwent transurethral resection of bladder tumor following detailed clinical questioning and laboratory testing. The local bioethics committee approved the study (Permission No.: 2018/04/10). Just over half of the patients ($n = 54$) had LG BC and papillary urothelial neoplasm of low malignant potential (PUNLMP) ($n = 3$), whereas the remaining patient group exhibited HG disease ($n = 41$). In two cases, both HG and LG neoplasms were detected. Most of these patients ($n = 69$) displayed noninvasive papillary carcinomas (pathologic stage Ta, pTa) stage disease, 19 had sub-mucosal invasive tumors (pathologic stage T1 (pT1)) stage, and 12 patients had muscle invasive BC (pathologic stage T2 (pT2)). The average age of patients diagnosed with BC and in the NC group was 74 ± 10 and 64 ± 12 years, respectively. The clinical characteristics of the patients are presented in Table S1. A 2.6 mL of blood sample was drawn from each participant and centrifuged (3,000 g, 10 min, room temperature), then separated and kept at -60°C .

2.3. Preparation of serum metabolite extracts for ^1H NMR metabolomics

Medium-to-high polarity metabolites were extracted from serum samples as stated in our recent publication [33] and detailed in Section S1 in the Supplementary data.

2.4. Preparation of serum samples for LDI-MS studies

Serum samples were thawed at room temperature and diluted 500 times with methanol. Then, 0.3 μL of serum sample was placed directly on target plates (^{109}Ag and Au PFL-2D GS LASiS [32]). After the solvent was evaporated in air, the plates with the samples were measured with Autoflex Speed apparatus.

2.5. Data processing and spectral acquisition

NMR and MS spectral acquisition and processing are shown in the Supplementary data (Sections S2–S4).

2.6. ICP-OES analysis

Determination of the concentrations of Ca, Fe, K, Na, Mg, as well as minor elements (Mn, P, and S) and trace elements (Cu and Zn) in serum, was performed for 116 samples (65 BC and 51 NC) as stated in our recent publication [31] and detailed in Section S5 in the Supplementary data and Table S2.

2.7. Multivariate statistical analysis

All metabolite datasets were analyzed using the MetaboAnalyst 5.0 [34]. The statistical analysis approach presented in this publication is similar to one we previously presented [31] and another unrelated study [35]; details are presented in the Supplementary data (Section S6).

3. Results

In this work, we studied the metabolic profiles of BC in an effort to propose serum-specific metabolic and/or elemental markers for the specific detection of BC. Two hundred (100 BC and 100 normal control (NC)) ^1H NMR spectra were recorded of metabolite extracts from patients and healthy control serum samples. Four hundred LDI mass spectra were recorded with the use of ^{109}Ag and Au PFL-2D GS LASiS targets. Additionally, 116 ICP-OES spectra of samples from 65 patients with BC and 51 NCs were studied.

3.1. Differences between BC and control serum by ^1H NMR

Two hundred extracts from sera (100 cancer and 100 control) were analyzed with ^1H NMR spectroscopy. Overall, 39 compounds were identified in each serum sample following standard protocols [36,37]. An overlay of control and cancer NMR spectra, presented as blue and red traces, respectively, in Figs. 1B and C, shows a relatively high degree of similarity in the raw NMR data. These spectral regions depict NMR signals observed from 3-hydroxybutyrate and acetate metabolites, respectively. The intensity-normalized spectral overlays shown in Figs. 1B and C clearly indicate that 3-hydroxybutyrate levels (Fig. 1B) are higher and acetate levels (Fig. 1C) are lower in the serum profiles of patients with BC (red) compared with healthy controls (blue). Detailed analysis of the spectra indicated significant differences in metabolite levels between serum samples from patients with BC and healthy controls.

Metabolite concentration datasets obtained by NMR metabolomics were randomly divided into two subsets: a training dataset to train the model ($n = 80$ BC and $n = 80$ NCs), and a validation dataset to assess the validity and robustness of the trained model ($n = 20$ BC and $n = 20$ NCs). Metabolite concentrations from both datasets were subjected to statistical analyses to assess differences in metabolite levels. The results of these analyses are summarized in Tables S3 and S4. The 2D principal components analysis (PCA) score plots of both subsets indicated good separation between the

cancer and the controls (Fig. 2A). In the validation set, separation between cancer and control serum samples was also observed along principal components 1 and 2 (Fig. 2B). The three-dimensional (3D) PCA plots for training and validation sets are provided in Figs. S1A and B.

A supervised multivariate analysis of the training set with the aid of orthogonal partial least-squares discriminant analysis (OPLS-DA) indicated the strong separation of the BC and NC groups (Fig. 2C). Two thousand permutation tests were conducted to evaluate the statistical robustness of the OPLS-DA model (Figs. S2A and B). Good discrimination was observed between the two groups ($Q^2 = 0.880$, $R^2Y = 0.914$, $P < 0.0005$ (0/2000)), revealing significant differences in the metabolic profiles of cancer versus control serum samples. Group separations were observed with OPLS-DA in the validation set (Fig. 2D) and were confirmed by the good results of the permutation test ($Q^2 = 0.780$, $R^2Y = 0.932$, $P < 0.0005$ (0/2000)) (Figs. S2C and D). Potential serum BC biomarkers were selected on the basis of the S-plot resulting from the OPLS-DA model. Variables with $|P(\text{corr})| > 0.5$ were considered significant. Four variables (acetate, propionate, pyroglutamate, and choline) were positively correlated with the group separation, as determined by a $P(\text{corr})$ [1] score of >0.5 , while one metabolite (isobutyrate) negatively correlated with the group separation, as assessed by $-P(\text{corr})$ [1] < -0.5 (Fig. S1C). The S-plot of the OPLS-DA model in the validation set confirmed almost all of the selected metabolites (except for propionate) as the most significant for the differentiation of the BC and NC groups (Fig. S1D). Finally, four metabolites were identified as significant discriminators: acetate, pyroglutamate, and choline, which all exhibited higher concentrations in the sera of NCs, and isobutyrate, which was significantly elevated in the sera of BC patients. The P -value of each variable was calculated using independent t -tests and only variables with P -values and false discovery rate < 0.05 were considered significant. Metabolite concentration information for a set of 39 significant metabolites is presented in Tables S3 and S4. Next, univariate receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was separately performed on both the training and validation sets to evaluate the diagnostic ability of the models. The quality of the ranking represents the area under the curve (AUC) above 0.7. The results indicated that in the serum samples, all four previously selected metabolites (acetate, choline, pyroglutamate, and isobutyrate) exhibited very high AUC (above 0.82). The best ROC analyses with the highest significance were obtained for isobutyrate (AUC = 0.953, specificity = 0.9, and sensitivity = 0.9), followed by pyroglutamate (AUC = 0.894, specificity = 0.8, and sensitivity = 0.9), propionate (AUC = 0.859, specificity = 1.0, and sensitivity = 0.7), choline (AUC = 0.828, specificity = 0.8, and sensitivity = 0.8), and acetate (AUC = 0.824, specificity = 0.8, and sensitivity = 1.0). The range of concentrations compared to all these metabolites in the serum samples of cancer patients compared to NCs is reported in Fig. S3. The most significant results from our statistical analyses of compounds identified as potential biomarkers of BC are presented in Table 1.

The classification ROC model was built with the use of MetaboAnalyst 5.0 online service and was based on a random forest algorithm. As shown in Figs. 2E and F, the combination of levels of these metabolites was a better discriminator (AUC >0.999) than each metabolite separately in both data sets. An excellent discriminating classification was found for four metabolites, i.e., acetate, propionate, choline, and isobutyrate, with an AUC of 0.999. For this model, the confidence interval ranged from 0.994 to 1.000 (Fig. 2E). The validation of the ROC model is shown in Fig. S4 and a permutation test with 1000 permutations yielded a P -value < 0.001 , supporting the validity of the ROC analysis. The average of the predicted class probabilities of each sample and the average accuracy of the ROC curve demonstrated good classification

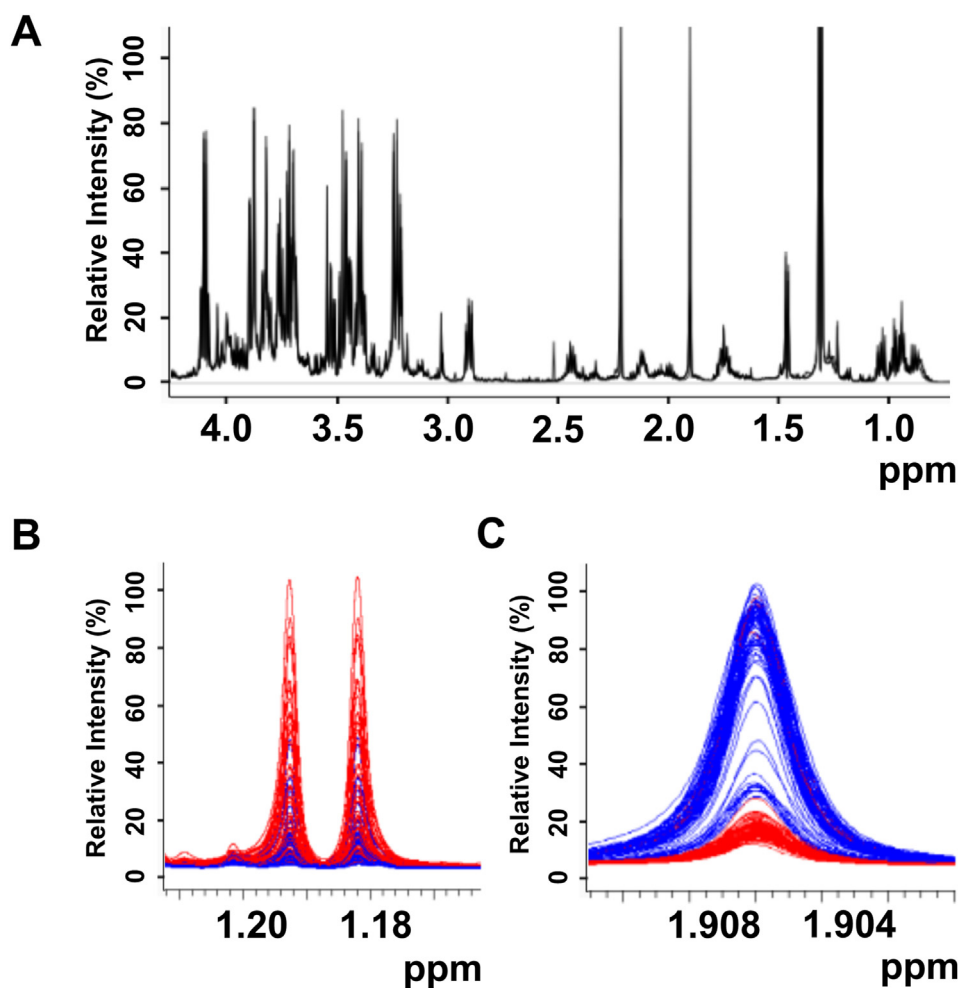


Fig. 1. (A) Characteristic proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) spectrum fragment (0.5–4.2 ppm) of a protein-free metabolite extract mixture obtained from serum sample from a patient with BC, recorded on a 600 MHz (14 T) solution NMR spectrometer. Expanded NMR spectral regions, corresponding to ^1H chemical shift ranges of (B) 1.16–1.21 ppm for 3-hydroxybutyrate and (C) 1.900–1.911 ppm for acetate, with a spectral overlay of 80 serum metabolic profiles obtained from healthy control patients depicted in blue (blue spectral traces) and BC patients in red (red spectral traces).

discriminatory power, with most of the samples classified accurately in their respective groups. The results suggested that four specific metabolites, namely, acetate, propionate, choline, and isobutyrate, could significantly increase diagnostic potential and serve as useful discriminators of cancerous versus healthy phenotypes in patients diagnosed with BC.

3.2. Differences between grades of BC with ^1H NMR

To determine whether metabolomics analysis of serum samples by ^1H NMR could help discriminate between different grades of BCs, PCA and OPLS-DA analyses were performed on the entire metabolite dataset. The analysis of BC included 95 serum samples from patients with a uniquely defined grade of cancer; three samples from patients with PUNLMP and two samples from patients with tumor only partially classified as HG were excluded. Finally, 41 serum extracts from patients with HG cancer and 54 samples from patients with LG cancer were used for analysis. The 2D and 3D PCA score plots, which revealed relatively low discrimination between LG and HG cases with a few outliers, are shown in Figs. S5A and B. Likewise, the OPLS-DA score plots highlighted little separation between the HG and LG cancer groups (Fig. S5C), yet yielded an acceptable P -value

($P = 0.002$). The statistical significance of the model was examined using Q^2 (0.192) and permutation tests ($n = 2000$), which yielded a P -value lower than 0.05. Detailed assessments of the quality of the OPLS-DA model are shown in Fig. S6. The S-plot analysis of the OPLS-DA model indicated that 15 metabolites were significant contributors to the small separation observed between LG vs. HG samples in the 2D and 3D OPLS-DA score plot (Fig. S7). Of these 15 metabolites, leucine, histidine, alanine, 3-methyl-2-oxovalerate, tyrosine, phenylalanine, choline, tryptophan, hypoxanthine, asparagine, valine, proline, threonine, 2-hydroxybutyrate, and glutamine were found to be positively correlated with group separation with a $P(\text{corr})$ [1] score > 0.5 . These biomarker candidates were subjected to a t -test to assess the significance of altered levels in LG versus HG. All 15 metabolites were found to exhibit statistically significant differences in concentration ($P < 0.05$; $q < 0.05$ and $|P(\text{corr})| > 0.5$), suggesting that examining the different levels of these metabolites in human sera may be an effective way to identify LG and discriminate LG from HG in patients with BC. AUC values for five of the 15 metabolites were found to be greater than 0.74 (Fig. S8). Additionally, ROC curve analysis of these five metabolites (i.e., leucine, histidine, alanine, 3-methyl-2-oxovalerate, and tyrosine) only yielded a satisfactory AUC value of 0.775 (Fig. S9A), and a

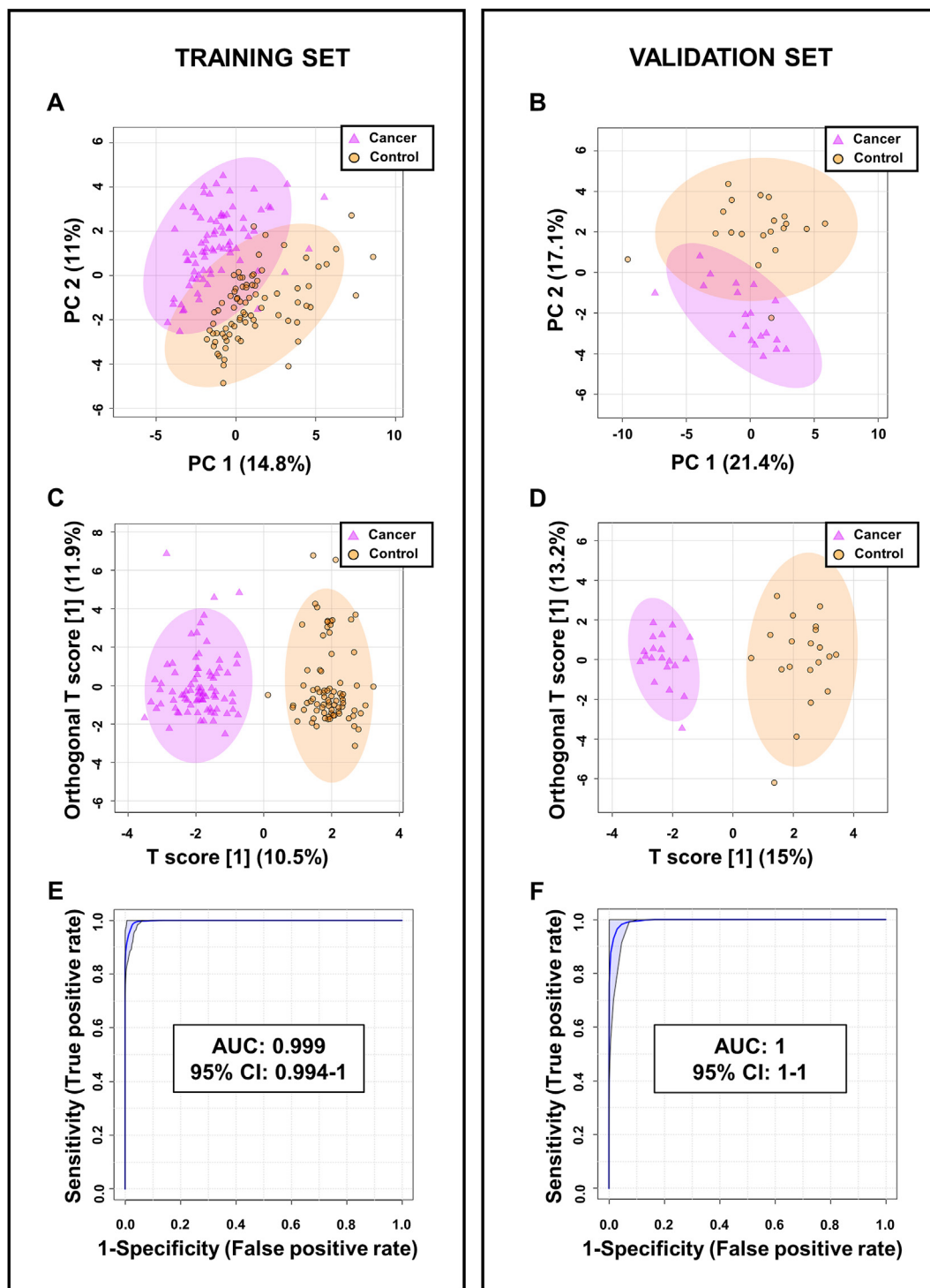


Fig. 2. Two-dimensional principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least-squares discriminant analysis (OPLS-DA) score plots of the tumor (violet) and control (orange) serum samples in the (A and C) training set and (B and D) validation set for ^1H NMR data. The receiving operator characteristic (ROC) curves of the combination of four differential metabolites, namely, isobutyrate, pyroglutamate, choline, and acetate, in the (E) training set and (F) validation set. AUC: area under the ROC curve; CI: confidence interval; PC: principal component.

valid permutation test with a P -value < 0.001 . The average accuracy based on 100 cross validations amounted to a value of 0.693 (Fig. S9D). These analyses support that leucine, histidine, alanine, 3-methyl-2-oxovalerate, and tyrosine may be good indicators discriminating bladder tumor grades.

3.3. Differences between stages of BC identified by ^1H NMR

Analysis of tumor stages was also performed for the entire ^1H NMR dataset of serum metabolite extracts. Metabolite profiling analysis included 88 serum samples from patients with non-muscle

Table 1

Summary of targeted quantitative analysis of potential biomarkers of BC from proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) spectral analyses of serum samples (P -value < 0.05 ; $|P(\text{corr})[1]| > 0.5$; area under the curve (AUC) > 0.75).

Comparison mode	Data set	Metabolite/element	AUC	VIP [t]	$P(\text{corr})[1]$	P -value ^a	Fold change ^b
Cancer vs. control	^1H NMR	Isobutyrate	0.95	2.2	-0.718	4.3×10^{-23}	1.9
		Pyroglutamate	0.89	1.9	0.626	7.8×10^{-18}	0.5
		Propionate	0.86	2.0	0.638	4.2×10^{-15}	0.8
		Choline	0.83	1.7	0.536	7.6×10^{-13}	0.7
	ICP-OES	Acetate	0.82	2.3	0.729	1.6×10^{-12}	0.4
		Li	0.71	1.4	0.512	5.8×10^{-4}	0.1
		Fe	0.85	2.0	-0.740	1.1×10^{-8}	1.9
Low-grade vs. high-grade	^1H NMR	Leucine	0.80	1.5	0.711	1.3×10^{-6}	0.8
		Histidine	0.79	1.7	0.830	2.2×10^{-6}	0.7
		Alanine	0.77	1.5	0.718	1.4×10^{-5}	0.8
		3-methyl-2-oxovalerate	0.77	1.4	0.690	2.2×10^{-5}	0.6
		Tyrosine	0.75	1.2	0.568	6.3×10^{-5}	0.8
		Histidine	0.80	1.9	-0.832	0.0001	1.9
pTa/pT1 vs. pT2	^1H NMR	Alanine	0.79	1.7	-0.732	0.0002	1.6
		Tryptophan	0.77	1.7	-0.718	0.0002	1.6
		Glutamine	0.77	1.5	-0.645	0.0017	1.4
		Glycine	0.75	1.4	-0.593	0.0069	1.4
		Methylhistidine	0.88	1.3	-0.580	0.0094	2.1
		Choline	0.88	1.3	-0.566	0.0015	1.5
		Isobutyrate	0.82	1.2	-0.537	0.0021	1.4
		Threonine	0.78	1.2	-0.531	0.0009	1.3

^a P -value determined from Student's t -test.

^b Fold change between cancer and control serum calculated from the concentration mean values for each group; pTa: noninvasive papillary carcinomas; pT1: submucosal invasive tumors; pT2: muscle invasive bladder cancer; VIP: variable influence on projection.

invasive BC (pTa/pT1) and 12 serum samples from patients with muscle invasive BC (pT2). Preliminary PCA analysis was performed using the entire dataset of metabolite concentrations. PCA and OPLS-DA score plots indicated relatively low separation between the pTa/pT1 and pT2 stage of BC, with a few outliers that were removed prior to the further OPLS-DA analysis. Figs. S5D–F contain the 2D, 3D-PCA, and OPLS-DA scores plots of the two groups that were classified by BC grades. The quality factors for the OPLS-DA model included Q^2 of 0.141 and R^2Y of 0.347 and permutation test P -value lower than 0.05 (Figs. S6C and D). The S-plot analysis of the OPLS-DA model revealed the 12 serum metabolites that appeared to be most relevant for sample differentiation between pTa/pT1 and pT2 cancer grade: histidine, alanine, tryptophan, glutamine, glycine, methylhistidine, choline, isobutyrate, threonine, phenylalanine, leucine, and 3-methyl-2-oxovalerate (Fig. S7C). All those compounds corresponded to $|P(\text{corr})| > 0.05$ and variable influence on projection (VIP) > 1.2 and were found to be at a higher concentration in the sera of patients with noninvasive pTa/pT1 BC stage (Fig. S7D). However, the ROC analysis narrowed this group down to nine metabolites with an AUC greater than 0.75: histidine, alanine, tryptophan, glutamine, glycine, methylhistidine, choline, isobutyrate, and threonine. The ROC curve analysis of nine potential biomarkers is shown in Fig. S10. For those nine selected metabolites, a ROC curve analysis was performed to assess the performance of this model in distinguishing between pTa/pT1 and pT2 BC stages, and yielded an AUC value of 0.844, which indicated the good discriminatory ability of the model (Fig. S9E). The permutation test based on the measured area under the ROC curve (AUC) for that model yielded a P -value < 0.01 (Fig. S9F). The average of the predicted class probabilities of each sample across 100 cross validations and the associated permutation tests are shown in Figs. S9G and H. Analysis of the changes in metabolite concentration for a given stage of BC, i.e., pTa/pT1 versus pT2, reveals higher levels of histidine, alanine, tryptophan, glutamine, glycine, methylhistidine, choline, isobutyrate, and threonine in the serum samples of BC patients with a pTa/pT1 stage of tumor compared to the sera of BC patients with a pT2 stage tumor. The comparison of the three groups of cancer stage (pT1 vs. pTa vs. pT2) did not reveal any statistically significant differences.

3.4. Elemental profile of serum in BC determined by ICP-OES

The concentrations of chemical elements obtained from ICP-OES analysis of 116 extracts of serum samples (65 BC and 51 NCs) were subjected to statistical data analysis. A total of 12 elements were identified and quantified. The mean concentration of each of these elements is summarized in Tables S5 and S6. Prior to statistical analysis, the data were randomly divided into two subsets: a training set (control, $n = 42$ and cancer, $n = 52$) and a validation set (control, $n = 10$ and cancer, $n = 13$). As shown in Fig. 3A, the PCA score plot revealed a trend for separation between the two groups in the training set. Results from the OPLS-DA analysis, shown in Fig. 3B, provided a slightly clearer separation (compared to the PCA analysis) between cancer and controls, and the validation parameters for the model were R^2X and Q^2 values of 0.334 and 0.476, respectively (Fig. S11). The analysis of the VIP scores of the OPLS-DA model in the training set is presented at Fig. 3C.

Three elements (Cu, Fe, and Li) could be used to distinguish between the two groups of study participants; however, only two of them (Cu and Fe) were confirmed to be the most significant discriminators following model validation assessments (Fig. S12). The loading S-plot of OPLS-DA of the training set revealed that Fe was negatively correlated with group separation, with $-P(\text{corr})[1] < -0.5$, and indicated that a significantly higher level of this element was found in the serum of patients diagnosed with BC compared with the control group. Subsequently, Li was found to be positively correlated with the group separation, with $P(\text{corr})[1] > 0.5$, indicating that it was found in higher levels in the serum samples of NCs. ROC analysis revealed that Fe was the most significant, with an associated AUC value of 0.850, sensitivity of 0.8, and specificity of 0.8, whereas for Li, the AUC value was 0.710, sensitivity was 0.8, and specificity was 0.6. In addition, ROC curve analysis assessing the performance of the ICP-OES model in distinguishing between cancer and control samples was performed using only two selected elements (Fe and Li). This analysis yielded an AUC value of 0.807 for the training set, which indicated good discriminatory power to separate the two (BC and NC) groups (Fig. 3D). The permutation test yielded a significant P -value of < 0.001 . The average accuracy amounted to a value of 0.728 (Fig. S13D).

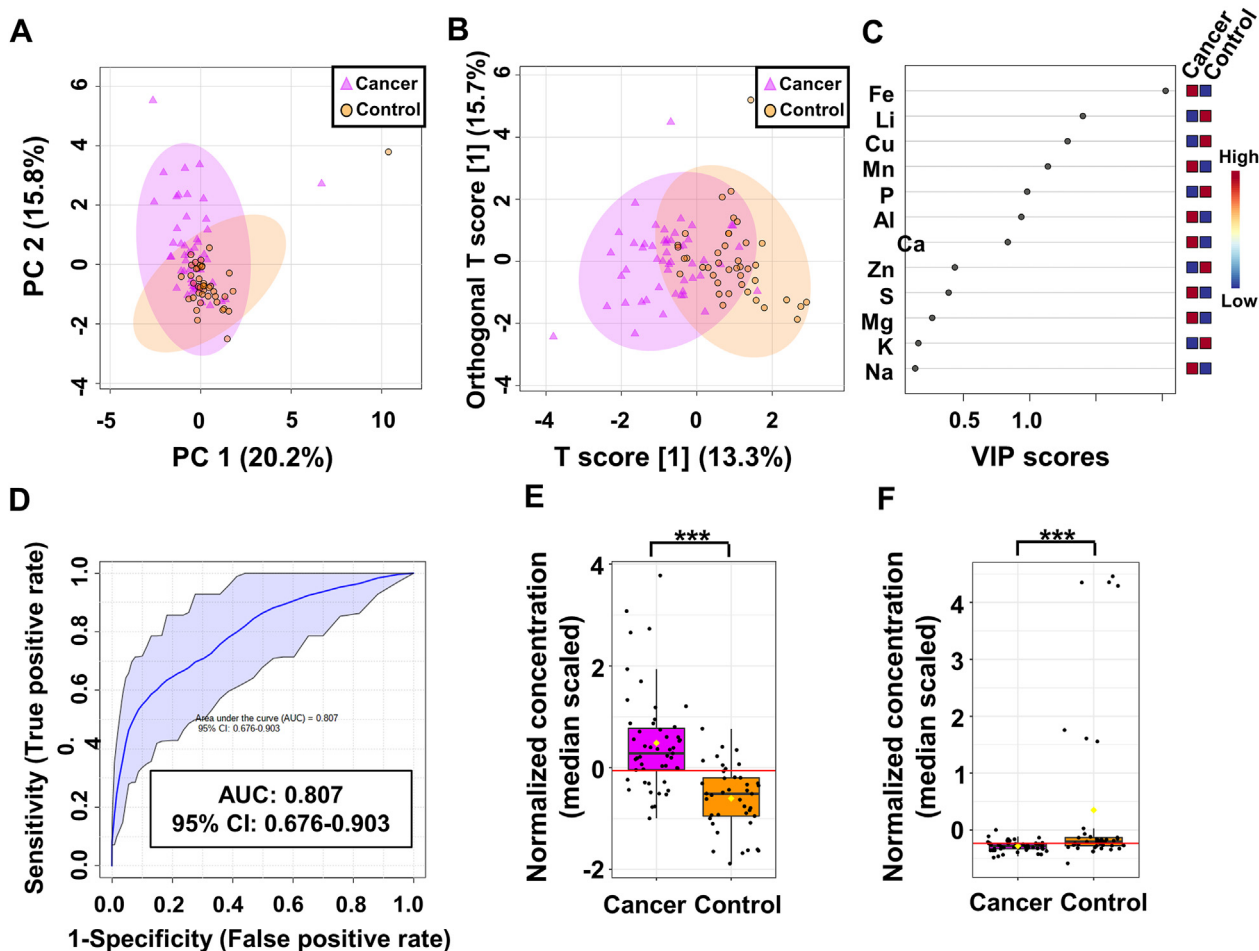


Fig. 3. Two-dimensional (A) principal component analysis and (B) orthogonal partial least-squares discriminant analysis (OPLS-DA) score plots of the tumor (violet) and control (orange) serum samples for ICP-OES data in the training set. (C) The potential discriminatory elements identified from the variable importance in projection (VIP) scores derived from the OPLS-DA model in the training set. (D) The receiving operator characteristic (ROC) curves of the combination of two differential elements, Fe and Li. (E and F) The box-and-whisker plots of Fe and Li level values observed in the control and BC serum samples. PC: principal component.

These statistical analyses demonstrated that differential levels of Fe and Li are potentially good indicators of BC in human serum. The results from the statistical analyses of these two selected elements are summarized in [Table 1](#).

3.5. Untargeted metabolic profiling by PFL-2D GS LASiS AuNPs and $^{109}\text{AgNPs}$ LDI-MS

In total, 335 and 650 features were detected in the serum samples of 200 participants analyzed with PFL-2D GS LASiS AuNPs and $^{109}\text{AgNPs}$ LDI-MS. Statistical analysis was performed using data randomly divided into two subsets: a training set ($n = 80$ BC and $n = 80$ NCs) and a validation dataset ($n = 20$ BC and $n = 20$ NCs).

2D-PCA and OPLS-DA score plots of mass spectral features created for PFL-2D GS LASiS $^{109}\text{AgNPs}$ LDI-MS data revealed clear discrimination between cancer and control serum samples in both subsets ([Fig. S14](#)). The analysis of both subsets (training and validation set) indicated 216 common features with $|p[1]|$ and $|p(\text{corr})|$ above 0.5, of which 96 m/z values were more abundant in serum from patients with BC compared with the control group, and 119 features displayed the opposite trend. The validation of the OPLS-DA model using 2000 permutations resulted in R^2Y and Q^2 values of 0.986 ($P < 0.0005$) and 0.982 ($P < 0.0005$) ([Fig. S15](#)). All 11 previously selected m/z mass spectral features were found to exhibit AUC values of >0.73 . [Figs. S16A and D](#) indicate the

combination of m/z values, which is a better discriminator (AUC $>99\%$ in the training and validation set) than independent evaluation of each feature, which reinforces the improved capacity of biomarker patterns to accurately distinguish between the BC and NC groups. In the next step, putative identification of mass spectral features was performed by searching various metabolite databases, i.e., Human Metabolome Database [38], MetaCyc Metabolic Pathway Database [39], LIPID MAPS® Lipidomics Gateway [40], and Metlin [41]. Seventeen mass spectral features were putatively identified as naturally occurring metabolites in the human body. Important mass spectral features and annotated metabolite IDs resulting from the PFL-2D GS LASiS $^{109}\text{AgNPs}$ LDI-MS analyses are reported in [Table S7](#). All statistical data with mean feature abundance for control versus cancer serum samples based on PFL-2D GS LASiS $^{109}\text{AgNPs}$ LDI-MS in the training and validation datasets are presented in [Tables S8 and S9](#).

The acquired data from untargeted PFL-2D GS LASiS AuNPs LDI-MS analysis were also analyzed using PCA and OPLS-DA to identify novel metabolites. In both cases, score plots showed clear separation in both subsets, suggesting that the PFL-2D GS LASiS AuNPs LDI-MS-based serum metabolomics model could be used to identify BC ([Fig. S17](#)). The S-plots derived from the OPLS-DA model using the training set ($R^2Y = 0.962$, $Q^2 = 0.955$) and the validation set ($R^2Y = 0.982$, $Q^2 = 0.964$) generated a list of mass spectral features (m/z) of interest that were found to be important for group

discrimination (Fig. S18). All relevant mass spectral features are reported in Tables S10 and S11. The analysis of both subsets (training and validation sets) identified 172 common features with $|p[1]|$ and $|P(\text{corr})|$ above 0.5, of which 44 m/z values were more abundant in the sera of BC patients compared to the control group, and 128 features exhibited the opposite trend. This analysis was followed by a multivariate ROC analysis. As shown in Fig. S19, the combination of mass spectral features in both subsets was found to be a more powerful discriminator between control and BC serum samples (AUC > 99%), compared with that of any individual mass spectral feature.

The results presented above suggest that selected mass spectral features can significantly increase the performance of the diagnostic model and can be used to distinguish cancer serum samples from controls. Putative identifications of selected features allowed for the identification of eight compounds that are often present in the human body (Table S7).

3.6. Pathway analysis of potential cancer biomarkers

Metabolic pathway impact analysis suggested that 14 out of 25 metabolites identified in the NMR and LDI-MS analyses were relevant to human metabolism. Seven pathways (glycine, serine and threonine metabolism, glycerophospholipid metabolism, propanoate metabolism, glutathione metabolism, pyruvate metabolism, glyoxylate and dicarboxylate metabolism, and glycolysis/gluconeogenesis) were significantly impacted in BC compared with the controls. The results from this pathway impact analysis are shown in Fig. 4A and Table S12. The bubble area (Fig. 4A) reveals the degree of impact on the pathway and the color represents the significance (highest in red and lowest in white). Quantitative enrichment analysis found 10 additional pathways relevant to BC, i.e., amino sugar metabolism, aspartate metabolism, betaine metabolism, ethanol degradation, fatty acid biosynthesis, methionine metabolism, phosphatidylcholine biosynthesis, phosphatidylethanolamine biosynthesis, phospholipid biosynthesis, and vitamin K (K1 and K2) metabolism (Fig. 4B and Table S13).

4. Discussion

In this study, NMR, ICP-OES, and LDI-MS with both $^{109}\text{AgNPs}$ and AuNPs-based targets were employed to evaluate changes in serum metabolite and element levels between patients with BC and controls. BC is characterized by several metabolic changes that

promote cancer cell proliferation and thus tumor growth [42]. These changes in metabolism provide an essential source of energy for intracellular metabolism and building blocks for rapidly dividing tumor cells. The Warburg effect, a hallmark of cancer cell metabolic activity, involves aerobic glycolysis in the presence of an aerobic environment and fully functioning mitochondria, and relies on increased glucose uptake and the conversion of glucose to lactate. This type of energy gain for cancer cells is much less energy efficient than mitochondrial respiration (2 adenosine triphosphate (ATP) vs. 36 ATP respectively) [43]. However, studies have shown that the rate of glucose-to-lactate conversion is 10–100 faster compared with that of the complete mitochondrial oxidation of glucose [44]. Moreover, the decoupling of glycolysis from oxidative phosphorylation offers a biosynthetic advantage for cancer cells by enabling the increased production of diverse biosynthetic precursors [45].

In this study, we investigated the serum metabolic profiles among LG BC, HG BC, non-muscle invasive bladder cancer (pTa/pT1), muscle invasive BC (MIBC, pT2), and healthy subjects. The OPLS-DA modeling of the ^1H NMR metabolomics data revealed a clear separation between the BC and control serum sample groups. Metabolites with the highest AUC values (>0.82) included isobutyrate, pyroglutamate, propionate, choline, and acetate. The differences in the concentration of pyroglutamate, acetate, propionate, and choline were statistically significantly and higher in the sera of healthy individuals, whereas isobutyrate concentrations were much higher in the sera of BC patients.

Negative charges of short-chain fatty acids are considered to be crucial metabolic and immune cell regulators [46]. Acetate plays a key role in the metabolism of acetyl coenzyme A (acetyl-CoA), bioenergetics, cell proliferation, and regulation [47]. In cells, acetate is mainly used to generate acetyl-CoA through an ATP-dependent reaction by acetyl-CoA synthetase. Tumor cells use acetate in the form of acetyl-CoA, primarily for fuel or as a carbon source for lipid synthesis [48]. Acetyl-CoA synthetase 2 (ACSS2), one of the enzymes capable of using acetate as a substrate, contributes to cancer cell growth and is highly upregulated in multiple cancer types [49]. Based on these studies, we surmise that the lower levels of acetate in the serum samples of patients with BC may be due to its significant uptake and utilization by ACSS2 in cancer cells. Recently, Lee et al. [50] reported that acetate in urine, along with four urine metabolites, may contribute to the discrimination of different urological cancers. Their research showed that acetate levels in urine were slightly elevated in kidney cancer patients compared to

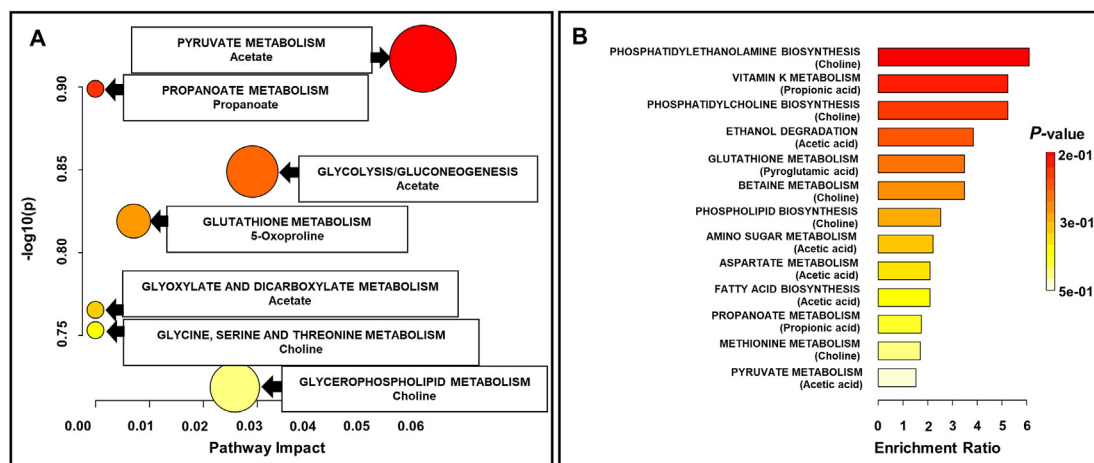


Fig. 4. Pathway topology analysis of statistically significant metabolites in BC that were found in the nuclear magnetic resonance and mass spectrometry (MS) datasets. (A) Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway analysis. (B) Quantitative enrichment analysis based on Small Molecule Pathway Database.

patients with bladder and prostate cancer. Unfortunately, these results were not directly compared to those of a healthy control group [50].

Other metabolites present at lower concentration in the sera of BC cancer patients compared with healthy controls include choline and propionate. Studies have shown that the consumption of choline may protect against cancer [51]. Propionate, a metabolite produced by the intestinal microbiota, reduces the proliferation of cancer cells in the liver and the lungs [52,53]. Acetate and propionate are the end-products of the indigestible carbohydrate fermentation in the human colon, and are distributed systemically via blood circulation. These compounds have been shown to exhibit anti-inflammatory properties in immune cells, inhibit colon cancer cell growth, and induce cancer cell death by apoptosis [53,54]. The levels of serum propionate are also associated with circulating immune cells in patients with multiple sclerosis, and lower serum propionate levels were found in patients with multiple sclerosis compared with the healthy controls [55]. In our study, the increased absorption of propionate by cancer cells is reflected by the lower propionate concentration in the sera of the patients with BC. However, no study to date has focused on the role of propionate in the progression of BC.

Choline is a water-soluble quaternary amine that is often grouped with vitamin B owing to its chemical similarities, and is a key nutrient for humans. This compound has various key functions in the human body, especially with respect to neurochemical processes [56]. Choline is involved in phospholipid production and triglyceride metabolism, and is therefore necessary for the proper structure and function of cell membranes. In this study, patients with BC had lower serum levels of choline compared with the controls, which could be a consequence of increased choline absorption by cancer cells. Our results are consistent with those of other studies that have shown that cancer cells often increase the synthesis of fatty acids; in turn, these can act as substrates for phosphatidylcholine synthesis, which is increased in tumor cells [57,58]. Furthermore, the increase in serum choline levels in cancer patients is consistent with our previous study results, where choline levels were found to be decreased in the sera of patients with renal cell carcinoma compared with controls [59]. The opposite situation was observed in urine, where urine choline levels were increased in patients with BC [60,61].

Ohara et al. [62] revealed that isobutyrate exerted an anticancer effect by suppressing the growth/metabolic networks supporting colorectal cancer. Previously, Wang et al. [63] showed that the levels of isobutyrate were lower in fecal samples of patients with colorectal cancer compared to those of healthy control individuals. To date, there is no report that isobutyrate is a potential biomarker of BC. In our research, isobutyrate levels were found to be significantly altered, as shown by the cancer-to-control mean concentration (fold change) ratio of 1.9.

Pyroglutamate is a cyclized derivative of L-glutamate and is related to the gamma-glutamyl cycle, which is the main pathway for glutathione synthesis [64]. Glutathione is a major antioxidant produced in the human body, the levels of which can drop significantly as a result of oxidative stress or chemical exposure. In the case of low glutathione levels, the level of pyroglutamate from which it is reconstituted is also decreased [65]. Pyroglutamate was found to be a promising biomarker for the diagnosis of nonalcoholic liver disease [64]. Several studies have observed elevated levels of pyroglutamate in the biofluids of patients with several genetic disorders and an acetaminophen-induced metabolic disorder [66]. Most of the research devoted to urinary or serum metabolomics of BC has suggested a higher level of pyroglutamate in patients with BC compared with healthy controls [22,67]. However, both of these cited publications are based on GC-MS

results with derivatization, which can be considered inferior in terms of quantitation compared to the measurement of unmodified extracts with NMR.

Fe is a crucial trace element in which the deficiency or excess is associated with numerous disease states [68]. ICP-OES analysis indicated an increase in serum Fe in patients with BC, which is surprising, given that these patients often have micro/macrohemia, so Fe deficiency would be expected [69]. However, the higher level of Fe in serum of patients with BC may be explained by the activation of mechanisms stimulating Fe absorption from the gastrointestinal tract, which provides a possible compensation for the level of Fe in the blood. Moreover, previous studies have suggested that excess Fe in the sera of patients with cancer may be associated with malignant transformation and cancer progression [70]. In tumor tissues, rapid cell proliferation and increased DNA synthesis are often observed, which require high Fe bioavailability. In the human body, the main source of Fe in the blood is heme, which is released following the breakdown of red blood cells [70]. Further, our results are consistent with earlier studies that reported elevated serum Fe levels in various types of diseases, such as hepatocellular carcinoma, lung cancer, and colorectal cancer [71].

Li is an alkali metal used to treat psychiatric disorders, and has potential benefits for the treatment of leukemia or thyroid disorders [72]. It inhibits several enzymes, including inositol monophosphatase and glycogen synthase kinase-3 [73]. However, the ingestion of Li causes many side effects, including hypercalcemia, cardiovascular, and gastrointestinal and parathyroid disorders [74]. Recent studies demonstrated that Li uptake is associated with reduced tumor incidence, probably through inhibited cell proliferation, which may be linked to reduced DNA replication and S-phase cell cycle arrest [75]. Wach et al. [29] detected significantly increased concentration of Li in the sera of patients with BC compared with healthy controls using ICP-OES.

Lower concentration of the serum amino acids histidine, alanine, tryptophan, glutamine, glycine, and threonine in patients with muscle invasive BC (pT2) in comparison to non-muscle invasive BC (pTa/pT1) may suggest the higher uptake of these amino acids and their potential role in protein synthesis underlying muscle cancer invasion. This inference is supported by proteomic studies that reported significant differences in tissue protein expression, which were correlated with BC ability to invade into muscle tissue [76]. Another possibility as to why these amino acids are present at lower concentrations may be due to general state of cachexia and malnutrition observed in patients with MIBC, which is usually a systemic disease and often manifests at a stage when metastases are present. Interestingly, lower concentrations of serum amino acids (leucine, histidine, alanine, and tyrosine) can be also observed in LG BC when compared to HG BC. In healthy organisms, de novo lipogenesis is limited to hepatocytes and adipocytes. Cancer cells may reactivate this anabolic pathway, which relies on glucose, glutamine, and acetate to synthesize citrate. Both acetate and citrate are substrates for extramitochondrial acetyl-CoA production, which is essential for fatty acid and cholesterol biosynthesis [57].

To date, several papers have focused on metabolite analyses in urine and blood from BC patients in an effort to potentially differentiate the different grades of this cancer. However, to our knowledge, only two studies have explored the relationships between changes in metabolite levels in urine and different tumor stages (Ta/Tis, T1, and >T2) [61,77]. At present, there are no reports of serum profiling in patients with different types of BC, probably owing to the fact that this type of analysis would require quite a large group of patients and healthy controls.

A pilot urine analysis conducted by Kim et al. [67] in 2010 studied a relatively small group of patients and revealed slightly

elevated levels of alanine, glutamine, leucine, tyrosine, and glycine and slightly decreased levels of threonine and tryptophan in patients with BC compared with controls. Subsequent studies also using GC-MS confirmed higher levels of alanine in the serum of the healthy controls compared to patients with BC, but the levels of alanine were not found to be potentially diagnostic of BC stages [22]. In our study, a slightly lower concentration of alanine in the serum of patients with BC was found compared to the control group; however, this trend was not found to be statistically significant in differentiating between the two groups. However, we measured significantly lower levels of alanine in the sera of patients with LG and pTa/pT1 BC, which has not been previously reported in the literature.

Troisi et al. [22] obtained comparable results to Kim et al. [67] study with respect to glutamine level changes, but also found higher levels of threonine in the sera samples from the LG group compared with the HG group, and a higher level of glycine in the HG group compared with the LG group. The results from our study indicated that differential concentrations of glycine, glutamine, and threonine in human sera may be used as diagnostic markers and may help distinguish between different stages of BC, as we have found that these metabolites were present at higher concentrations in the sera of patients with pTa/pT1 stage disease compared to those with pT2 stage. Bansal et al. [24] undertook an NMR-based study of serum metabolite profiles and identified glutamine as one of three metabolites that can differentiate between LG and HG BC, as it was reported to be slightly elevated in the sera of patients with HG BC [24]. Our results on serum glutamine levels are consistent with published studies, and suggest that elevated levels of glutamine in the pTa/pT1 stage of BC may be the result of increased glutaminolysis, which is observed in some types of tumors as an important mechanism to provide an additional source of cellular energy [78].

Bansal et al. [24] also reported histidine as one of the six metabolites that can distinguish patients with LG and HG BC from healthy controls, and was reported to be in higher concentrations in the sera of LG BC patients compared to HG BC patients and healthy controls. The authors' finding about serum histidine levels was consistent with that of our study, which found higher serum levels of histidine in LG and pTa/pT1 BC cancer [24,79]. The link between differential levels of serum histidine and BC progression, as well as concentration changes in methylhistidine, tyrosine, leucine, and tryptophan, has also been reported by Alberice et al. [80]. The authors' study reported elevated levels of these metabolites in the sera of patients with bladder tumors compared to those of patients with early stages of BC [80]. In contrast, an LC-MS-based study reported lower levels of histidine in the urine of patients with BC compared to healthy controls [56,81]. Moreover, Li et al. [60] indicated an increased level of L-methylhistidine in the urine of patients with BC. Histidine is a precursor for histamine synthesis in a reaction catalyzed by histidine decarboxylase (HDC). The over-expression of HDC has been observed in various cancers. Histidine via histamine is associated with inflammation in the urinary bladder, which is commonly associated with cancer development in this organ [82].

Our research has shown a significant difference in serum leucine levels in BC patients with LG compared to HG. In addition to the research of Kim et al. [67] and Alberice et al. [80], the level of leucine in patients with BC was also examined by Cao et al. [23], who reported, using NMR, lower levels of leucine/isoleucine as well as tyrosine and glycine in the sera of patients with HG BC compared to LG BC, which was consistent with our findings. Another study, conducted by Loras et al. [83], reported increased levels of tyrosine and tryptophan in the urine of patients with BC compared to

healthy controls. Our research results are also consistent with those of Yumba Mpanga et al. [84], which indicated significantly higher levels of tryptophan in the urine of patients with HG BC compared to LG BC group.

The use of the gold and silver-109-modified targets in LDI-MS experiments allowed for direct measurement of serum samples without analyte separation and extraction. Using this technique, serum analysis allowed the identification of 13 compounds that were found in greater concentrations in control serum samples compared to those of patients with BC, and 12 compounds that displayed the opposite trend; these included three compounds found independently using both silver-109- and gold-based MS methods. Most of these compounds were lipids, 12 of which belonged to the class of sphingolipids, and the remaining contained fatty acyls, saccharolipids, polyketides, nucleosides or nucleotides, and others.

Lipid metabolism plays a key role in various processes associated with cancer cells. Fatty acids are the building blocks of complex lipids, which are used for energy storage or as building blocks of cell membranes [85]. As reported by many authors, BC initiation and progression are associated with changes in lipid metabolism [86]. Sphingolipids are a group of lipids comprising sphingoid bases (i.e., set of aliphatic amino alcohols that include sphingosine) that play an important role in regulation of diverse cellular processes including cellular apoptosis, proliferation, angiogenesis, senescence, and transformation [87]. The importance of sphingolipids in the regulation of cancer growth and pathogenesis has been well described in the literature [88]. The sphingolipid metabolism may be responsible for the invasion and mobility of cancer cells in muscle-infiltrating BC [89]. Human BC cells have also been shown to upregulate the cannabinoid receptors 2, which induces cell apoptosis by stimulating de novo ceramide synthesis [90].

Lastly, the gold- and silver-109-based LDI-MS spectral analyses shown in this work have indicated a higher concentration of serum cyanidin in healthy individuals. Cyanidin is classified as a natural antioxidant present in both fruits and vegetables, and has confirmed with anticancer properties. It has been reported to induce apoptosis and differentiation in prostate and renal cancer cells [91,92].

5. Conclusion

We demonstrate that high-resolution NMR, ICP-OES, and gold- and silver-109-based LDI-MS, together with multivariate statistics, are powerful sets of tools for the characterization of the serum metabolome and elemental differences in BC. With regard to biomarker discovery using ¹H NMR spectroscopy, four potentially robust metabolic biomarkers were identified for 100 tumor serum samples from patients with BC patients after comparison against 100 healthy controls owing to the excellent predictive ability of AUC >0.999. Two elements (Fe and Li) exhibited significant concentration differences in the serum of NCs compared to that of patients with BC, suggesting that they may serve as useful biomarkers of BC. Additionally, 22 compounds (mainly lipids) were observed to differentiate between cancer and control samples, as judged from laser MS results. We also identified five metabolites that might be used as potential biomarkers to distinguish LG and HG and nine metabolites that may serve to differentiate between the pTa/pT1 and pT2 stages of BC. Our results suggest that differential serum metabolite profiles and elements can help identify patients with BC compared with NCs, with significant discriminating power between different stages and grades of BC. Moreover, our findings demonstrate that combining serum metabolite profiles and elements has a stronger predictive value than either compound/element alone to assess disease severity and progression in BC.

CRedit author statement

Krzysztof Ossoliński: Investigation, Resources, Writing - Original draft preparation; **Tomasz Ruman:** Methodology, Resources, Data curation, Writing - Reviewing and Editing, Supervision; **Valérie Copié:** Resources, Data curation, Writing - Reviewing and Editing, Funding acquisition; **Brian P. Tripet:** Resources, Data curation, Writing - Reviewing and Editing, Visualization, Funding acquisition; **Leonardo B. Nogueira:** Resources, Investigation, Data curation; Writing - Original draft preparation; **Katiane O.P.C. Nogueira:** Data curation, Writing - Original draft preparation; **Artur Kotodziej:** Investigation, Data curation; **Aneta Plaza-Altamer:** Investigation; **Anna Ossolińska:** Resources; **Tadeusz Ossoliński:** Resources; **Joanna Nizioł:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing - Original draft preparation, Reviewing and Editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of competing interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

Research was supported mainly by the National Science Center (Poland) (Project SONATA No.: UMO-2018/31/D/ST4/00109). ¹H NMR spectra were recorded at Montana State University (MSU), Bozeman, USA, on a cryoprobe-equipped 600 MHz (14 T) AVANCE III solution NMR spectrometer housed in MSU's NMR Center. Funding for MSU NMR Center's NMR instruments has been provided in part by the National Institutes of Health Shared Instrumentation Grant program (Grant Nos.: 1S10RR13878 and 1S10RR026659), the National Science Foundation (Grant Nos: NSF-MRI:DBI-1532078 and NSF-MRI CHE 2018388), the Murdock Charitable Trust Foundation (Grant No.: 2015066:MNL), and support from the office of the Vice President for Research, Economic Development, and Graduate Education at MSU.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2022.08.004>.

References

- [1] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, et al., Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J. Clin.* 71 (2021) 209–249.
- [2] H.A.A. Amin, M.H. Kobaisi, R.M. Samir, Schistosomiasis and bladder cancer in Egypt: Truths and myths, open access maced, *J. Med. Sci.* 7 (2019) 4023–4029.
- [3] M. Burger, J.W. Catto, G. Dalbagni, et al., Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer, *Eur. Urol.* 63 (2013) 234–241.
- [4] F.A. Yafi, F. Brimo, J. Steinberg, et al., Prospective analysis of sensitivity and specificity of urinary cytology and other urinary biomarkers for bladder cancer, *Urol. Oncol.* 33 (2015) 66.e25–66.e31.
- [5] F. Soria, M.J. Droller, Y. Lotan, et al., An up-to-date catalog of available urinary biomarkers for the surveillance of non-muscle invasive bladder cancer, *World J. Urol.* 36 (2018) 1981–1995.
- [6] Q. Yang, A.-H. Zhang, J.-H. Miao, et al., Metabolomics biotechnology, applications, and future trends: A systematic review, *RSC Adv.* 9 (2019) 37245–37257.
- [7] G. Raja, Y. Jung, S.H. Jung, et al., ¹H-NMR-based metabolomics for cancer targeting and metabolic engineering – A review, *Process Biochem.* 99 (2020) 112–122.
- [8] X.-W. Zhang, Q.-H. Li, Z.-D. Xu, et al., Mass spectrometry-based metabolomics in health and medical science: A systematic review, *RSC Adv.* 10 (2020) 3092–3104.
- [9] P.K. Cheung, M.H. Ma, H.F. Tse, et al., The applications of metabolomics in the molecular diagnostics of cancer, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 19 (2019) 785–793.
- [10] Z. Pan, D. Raftery, Comparing and combining NMR spectroscopy and mass spectrometry in metabolomics, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 525–527.
- [11] K. Ng, A. Stenzl, A. Sharma, et al., Urinary biomarkers in bladder cancer: A review of the current landscape and future directions, *Urol. Oncol.* 39 (2021) 41–51.
- [12] R. Batista, N. Vinagre, S. Meireles, et al., Biomarkers for bladder cancer diagnosis and surveillance: A comprehensive review, *Diagnostics (Basel)* 10 (2020), 39.
- [13] M.C. Walsh, L. Brennan, J.P. Malthouse, et al., Effect of acute dietary standardization on the urinary, plasma, and salivary metabolomic profiles of healthy humans, *Am. J. Clin. Nutr.* 84 (2006) 531–539.
- [14] L. Lin, Z. Huang, Y. Gao, et al., LC-MS-based serum metabolic profiling for genitourinary cancer classification and cancer type-specific biomarker discovery, *Proteomics* 12 (2012) 2238–2246.
- [15] Y. Zhou, R. Song, Z. Zhang, et al., The development of plasma pseudotargeted GC-MS metabolic profiling and its application in bladder cancer, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 6741–6749.
- [16] G. Tan, H. Wang, J. Yuan, et al., Three serum metabolite signatures for diagnosing low-grade and high-grade bladder cancer, *Sci. Rep.* 7 (2017), 46176.
- [17] D. Sahu, Y. Lotan, B. Wittmann, et al., Metabolomics analysis reveals distinct profiles of nonmuscle-invasive and muscle-invasive bladder cancer, *Cancer Med.* 6 (2017) 2106–2120.
- [18] V. Vantaku, S.R. Donepudi, D.W.B. Piyarathna, et al., Large-scale profiling of serum metabolites in African American and European American patients with bladder cancer reveals metabolic pathways associated with patient survival, *Cancer* 125 (2019) 921–932.
- [19] C.S. Amara, C.R. Ambati, V. Vantaku, et al., Serum metabolic profiling identified a distinct metabolic signature in bladder cancer smokers: A key metabolic enzyme associated with patient survival, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 28 (2019) 770–781.
- [20] X. Liu, M. Zhang, X. Cheng, et al., LC-MS-based plasma metabolomics and lipidomics analyses for differential diagnosis of bladder cancer and renal cell carcinoma, *Front. Oncol.* 10 (2020), 717.
- [21] Z. Lepara, O. Lepara, A. Fajkić, et al., Serum malondialdehyde (MDA) level as a potential biomarker of cancer progression for patients with bladder cancer, *Rom. J. Intern. Med.* 58 (2020) 146–152.
- [22] J. Troisi, A. Colucci, P. Cavallo, et al., A serum metabolomic signature for the detection and grading of bladder cancer, *Appl. Sci.* 11 (2021), 2835.
- [23] M. Cao, L. Zhao, H. Chen, et al., NMR-based metabolomic analysis of human bladder cancer, *Anal. Sci.* 28 (2012) 451–456.
- [24] N. Bansal, A. Gupta, N. Mitash, et al., Low- and high-grade bladder cancer determination via human serum-based metabolomics approach, *J. Proteome Res.* 12 (2013) 5839–5850.
- [25] A. Gupta, K. Nath, N. Bansal, et al., Role of metabolomics-derived biomarkers to identify renal cell carcinoma: A comprehensive perspective of the past ten years and advancements, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 20 (2020) 5–18.
- [26] S.J. Mulware, Trace elements and carcinogenicity: A subject in review, *3 Biotech* 3 (2013) 85–96.
- [27] S. Mishra, S.P. Dwivedi, R.B. Singh, A review on epigenetic effect of heavy metal carcinogens on human health, *Open Nutraceuticals* J. 3 (2010) 188–193.
- [28] R.S. Amasi, G.L. Donati, M.A. Zezzi Arruda, ICP-MS and trace element analysis as tools for better understanding medical conditions, *Trends Analyt. Chem.* 133 (2020), 116094.
- [29] S. Wach, K. Weigelt, B. Michalke, et al., Diagnostic potential of major and trace elements in the serum of bladder cancer patients, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 46 (2018) 150–155.
- [30] M. Abdel-Gawad, E. Elsobky, M. Abdel-Hameed, et al., Quantitative and qualitative evaluation of toxic metals and trace elements in the tissues of renal cell carcinoma compared with the adjacent non-cancerous and control kidney tissues, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 27 (2020) 30460–30467.
- [31] J. Nizioł, V. Copié, B.P. Tripet, et al., Metabolomic and elemental profiling of human tissue in kidney cancer, *Metabolomics* 17 (2021), 30.
- [32] A. Plaza, A. Kotodziej, J. Nizioł, et al., Laser ablation synthesis in solution and nebulization of silver-109 nanoparticles for mass spectrometry and mass spectrometry imaging, *ACS Meas. Sci. Au* 2 (2022) 14–22.
- [33] J. Nizioł, K. Ossoliński, B.P. Tripet, et al., Nuclear magnetic resonance and surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-based metabolome profiling of urine samples from kidney cancer patients, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 193 (2021), 113752.
- [34] Z. Pang, J. Chong, G. Zhou, et al., MetaboAnalyst 5.0: Narrowing the gap between raw spectra and functional insights, *Nucleic Acids Res.* 49 (2021) W388–W396.
- [35] S.Y. Ho, K. Phua, L. Wong, et al., Extensions of the external validation for checking learned model interpretability and generalizability, *Patterns (N Y)* 1 (2020), 100129.
- [36] A.H. Emwas, E. Saccenti, X. Gao, et al., Recommended strategies for spectral processing and post-processing of 1D ¹H-NMR data of biofluids with a particular focus on urine, *Metabolomics* 14 (2018), 31.
- [37] L. Yu, I.W. Liou, S.W. Biggins, et al., Copper deficiency in liver diseases: A case series and pathophysiological considerations, *Hepatol. Commun.* 3 (2019) 1159–1165.
- [38] D.S. Wishart, D. Tzur, C. Knox, et al., HMDB: The human metabolome database, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) D521–D526.
- [39] R. Caspi, R. Billington, C.A. Fulcher, et al., The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes, *Nucleic Acids Res.* 46 (2017) D633–D639.
- [40] M. Sud, E. Fahy, D. Cotter, et al., LIPID MAPS-nature lipidomics Gateway: An online resource for students and educators interested in lipids, *J. Chem. Educ.* 89 (2012) 291–292.

- [41] C.A. Smith, G. O'Maille, E.J. Want, et al., METLIN A metabolite mass spectral database, *Ther. Drug Monit.* 27 (2005) 747–751.
- [42] F. Massari, C. Ciccarese, M. Santoni, et al., Metabolic phenotype of bladder cancer, *Cancer Treat. Rev.* 45 (2016) 46–57.
- [43] W. Jones, K. Bianchi, Aerobic glycolysis: Beyond proliferation, *Front. Immunol.* 6 (2015), 227.
- [44] M.V. Liberti, J.W. Locasale, The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? *Trends Biochem. Sci.* 41 (2016) 211–218.
- [45] M.G. Vander Heiden, L.C. Cantley, C.B. Thompson, Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation, *Science* 324 (2009) 1029–1033.
- [46] J. Frampton, K.G. Murphy, G. Frost, et al., Short-chain fatty acids as potential regulators of skeletal muscle metabolism and function, *Nat. Metab.* 2 (2020) 840–848.
- [47] S.A. Comerford, Z. Huang, X. Du, et al., Acetate dependence of tumors, *Cell* 159 (2014) 1591–1602.
- [48] A.M. Hosios, M.G. Vander Heiden, Acetate metabolism in cancer cells, *Cancer Metabol.* 2 (2014), 27.
- [49] Z.T. Schug, J. Vande Voorde, E. Gottlieb, The metabolic fate of acetate in cancer, *Nat. Rev. Cancer* 16 (2016) 708–717.
- [50] S. Lee, J.Y. Ku, B.J. Kang, et al., A unique urinary metabolic feature for the determination of bladder cancer, prostate cancer, and renal cell carcinoma, *Metabolites* 11 (2021), 591.
- [51] S. Sun, X. Li, A. Ren, et al., Choline and betaine consumption lowers cancer risk: A meta-analysis of epidemiologic studies, *Sci. Rep.* 6 (2016), 35547.
- [52] L.B. Bindels, P. Porporato, E.M. Dewulf, et al., Gut microbiota-derived propionate reduces cancer cell proliferation in the liver, *Br. J. Cancer* 107 (2012) 1337–1344.
- [53] K. Kim, O. Kwon, T.Y. Ryu, et al., Propionate of a microbiota metabolite induces cell apoptosis and cell cycle arrest in lung cancer, *Mol. Med. Rep.* 20 (2019) 1569–1574.
- [54] K.M. Maslowski, A.T. Vieira, A. Ng, et al., Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43, *Nature* 461 (2009) 1282–1286.
- [55] S. Trendl, J. Jeffler, A.P. Jones, et al., Associations of serum short-chain fatty acids with circulating immune cells and serum biomarkers in patients with multiple sclerosis, *Sci. Rep.* 11 (2021), 5244.
- [56] S.K. Tayebati, I. Martinelli, M. Moruzzi, et al., Choline and choline alphoscerate do not modulate inflammatory processes in the rat brain, *Nutrients* 9 (2017), 1084.
- [57] N. Koundouros, G. Poulgiannis, Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer, *Br. J. Cancer* 122 (2020) 4–22.
- [58] R.F. Saito, L.N.S. Andrade, S.O. Bustos, et al., Phosphatidylcholine-derived lipid mediators: The crosstalk between cancer cells and immune cells, *Front. Immunol.* 13 (2022), 768606.
- [59] J. Niziot, K. Ossoliński, B.P. Tripet, et al., Nuclear magnetic resonance and surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-based serum metabolomics of kidney cancer, *Anal. Bioanal. Chem.* 412 (2020) 5827–5841.
- [60] J. Li, B. Cheng, H. Xie, et al., Bladder cancer biomarker screening based on non-targeted urine metabolomics, *Int. Urol. Nephrol.* 54 (2022) 23–29.
- [61] A. Loras, C. Suárez-Cabrera, M.C. Martínez-Bisbal, et al., Integrative metabolomic and transcriptomic analysis for the study of bladder cancer, *Cancers* 11 (2019), 686.
- [62] T. Ohara, T. Mori, Antiproliferative effects of short-chain fatty acids on human colorectal cancer cells via gene expression inhibition, *Anticancer Res.* 39 (2019) 4659–4666.
- [63] X. Wang, J. Wang, B. Rao, et al., Gut flora profiling and fecal metabolite composition of colorectal cancer patients and healthy individuals, *Exp. Ther. Med.* 23 (2022), 250.
- [64] S. Qi, D. Xu, Q. Li, et al., Metabonomics screening of serum identifies pyroglutamate as a diagnostic biomarker for nonalcoholic steatohepatitis, *Clin. Chim. Acta* 473 (2017) 89–95.
- [65] T.W. Sedlak, B.D. Paul, G.M. Parker, et al., The glutathione cycle shapes synaptic glutamate activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 116 (2019) 2701–2706.
- [66] J.A. Eckstein, G.M. Ammerman, J.M. Reveles, et al., Analysis of glutamine, glutamate, pyroglutamate, and GABA in cerebrospinal fluid using ion pairing HPLC with positive electrospray LC/MS/MS, *J. Neurosci. Methods* 171 (2008) 190–196.
- [67] J.W. Kim, G. Lee, S.M. Moon, et al., Metabolomic screening and star pattern recognition by urinary amino acid profile analysis from bladder cancer patients, *Metabolomics* 6 (2010) 202–206.
- [68] A. Yiannikourides, G.O. Latunde-Dada, A short review of iron metabolism and pathophysiology of iron disorders, *Medicines (Basel)* 6 (2019), 85.
- [69] H. Mazdak, F. Yazdekhesti, A. Movahedian, et al., The comparative study of serum iron, copper, and zinc levels between bladder cancer patients and a control group, *Int. Urol. Nephrol.* 42 (2010) 89–93.
- [70] R.A.M. Brown, K.L. Richardson, T.D. Kabir, et al., Altered iron metabolism and impact in cancer biology, metastasis, and immunology, *Front. Oncol.* 10 (2020), 476.
- [71] S.V. Torti, D.H. Manz, B.T. Paul, et al., Iron and cancer, *Annu. Rev. Nutr.* 38 (2018) 97–125.
- [72] W. Young, Review of lithium effects on brain and blood, *Cell Transplant.* 18 (2009) 951–975.
- [73] S.Y. Aghdam, S. Barger, Glycogen synthase kinase-3 in neurodegeneration and neuroprotection: Lessons from lithium, *Curr. Alzheimer Res.* 4 (2007) 21–31.
- [74] M. Kieczykowska, M. Polz-Dacewicz, E. Kopciat, et al., Selenium prevents lithium accumulation and does not disturb basic microelement homeostasis in liver and kidney of rats exposed to lithium, *Ann. Agric. Environ. Med.* 27 (2020) 129–133.
- [75] A. Sun, I. Shanmugam, J. Song, et al., Lithium suppresses cell proliferation by interrupting E2F-DNA interaction and subsequently reducing S-phase gene expression in prostate cancer, *Prostate* 67 (2007) 976–988.
- [76] A. Latosinska, M. Mokou, M. Makridakis, et al., Proteomics analysis of bladder cancer invasion: Targeting EIF3D for therapeutic intervention, *Oncotarget* 8 (2017) 69435–69455.
- [77] J. Pinto, A. Carapito, F. Amaro, et al., Discovery of volatile biomarkers for bladder cancer detection and staging through urine metabolomics, *Metabolites* 11 (2021), 199.
- [78] M. Meng, S. Chen, T. Lao, et al., Nitrogen anabolism underlies the importance of glutaminolysis in proliferating cells, *Cell Cycle* 9 (2010) 3921–3932.
- [79] A. Gupta, N. Bansal, N. Mitash, et al., NMR-derived targeted serum metabolic biomarkers appraisal of bladder cancer: A pre- and post-operative evaluation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 183 (2020), 113134.
- [80] J.V. Alberice, A.F. Amaral, E.G. Armitage, et al., Searching for urine biomarkers of bladder cancer recurrence using a liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis-mass spectrometry metabolomics approach, *J. Chromatogr. A* 1318 (2013) 163–170.
- [81] K. Łuczynowski, N. Warmuzińska, S. Operacz, et al., Metabolic evaluation of urine from patients diagnosed with high grade (HG) bladder cancer by SPME-LC-MS method, *Molecules* 26 (2021), 2194.
- [82] L. Graff, M. Frungieri, R. Zanner, et al., Expression of histidine decarboxylase and synthesis of histamine by human small cell lung carcinoma, *Am. J. Pathol.* 160 (2002) 1561–1565.
- [83] A. Loras, M. Trassierra, D. Sanjuan-Herráez, et al., Bladder cancer recurrence surveillance by urine metabolomics analysis, *Sci. Rep.* 8 (2018), 9172.
- [84] A. Yumba Mpanga, D. Siluk, J. Jacyna, et al., Targeted metabolomics in bladder cancer: From analytical methods development and validation towards application to clinical samples, *Anal. Chim. Acta* 1037 (2018) 188–199.
- [85] C.R. Santos, A. Schulze, Lipid metabolism in cancer, *FEBS J.* 279 (2012) 2610–2623.
- [86] M.Y. Lee, A. Yeon, M. Shahid, et al., Reprogrammed lipid metabolism in bladder cancer with cisplatin resistance, *Oncotarget* 9 (2018) 13231–13243.
- [87] H. Furuya, Y. Shimizu, T. Kawamori, Sphingolipids in cancer, *Cancer Metastasis Rev.* 30 (2011) 567–576.
- [88] B. Ogretmen, Sphingolipids in cancer: Regulation of pathogenesis and therapy, *FEBS Lett.* 580 (2006) 5467–5476.
- [89] S. Kawamura, C. Ohyama, R. Watanabe, et al., Glycolipid composition in bladder tumor: A crucial role of GM3 ganglioside in tumor invasion, *Int. J. Cancer* 94 (2001) 343–347.
- [90] A. Bettiga, M. Aureli, G. Colciago, et al., Bladder cancer cell growth and motility implicate cannabinoid 2 receptor-mediated modifications of sphingolipids metabolism, *Sci. Rep.* 7 (2017), 42157.
- [91] V. Sorrenti, L. Vanella, R. Acquaviva, et al., Cyanidin induces apoptosis and differentiation in prostate cancer cells, *Int. J. Oncol.* 47 (2015) 1303–1310.
- [92] X. Liu, D. Zhang, Y. Hao, et al., Cyanidin curtails renal cell carcinoma tumorigenesis, *Cell. Physiol. Biochem.* 46 (2018) 2517–2531.



OPEN

Untargeted ultra-high-resolution mass spectrometry metabolomic profiling of blood serum in bladder cancer

Joanna Nizioł^{1✉}, Krzysztof Ossoliński², Aneta Płaza-Altamer³, Artur Kołodziej³, Anna Ossolińska², Tadeusz Ossoliński² & Tomasz Ruman¹

Bladder cancer (BC) is a common urological cancer of high mortality and recurrence rates. Currently, cystoscopy is performed as standard examination for the diagnosis and subsequent monitoring for recurrence of the patients. Frequent expensive and invasive procedures may deter patients from regular follow-up screening, therefore it is important to look for new non-invasive methods to aid in the detection of recurrent and/or primary BC. In this study, ultra-high-performance liquid chromatography coupled with ultra-high-resolution mass spectrometry was employed for non-targeted metabolomic profiling of 200 human serum samples to identify biochemical signatures that differentiate BC from non-cancer controls (NCs). Univariate and multivariate statistical analyses with external validation revealed twenty-seven metabolites that differentiate between BC patients from NCs. Abundances of these metabolites displayed statistically significant differences in two independent training and validation sets. Twenty-three serum metabolites were also found to be distinguishing between low- and high-grade of BC patients and controls. Thirty-seven serum metabolites were found to differentiate between different stages of BC. The results suggest that measurement of serum metabolites may provide more facile and less invasive diagnostic methodology for detection of bladder cancer and recurrent disease management.

Bladder cancer (BC) is the second most frequently diagnosed cancer of the urinary tract after prostate cancer in the world. In 2020, this disease affected over 473,000 individuals worldwide and was responsible for 212 536 deaths¹. According to TNM Classification of Malignant Tumors system proposed by American Joint Committee on Cancer (AJCC), bladder cancer can be classified according to whether the tumor infiltrates into or out of the muscular tissue as muscle-invasive bladder cancer (MIBC) and non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) respectively². NMIBC is the most common type of BC and includes noninvasive papillary carcinomas (pathologic stage Ta), submucosal invasive tumors (T1) and carcinoma in situ (CIS). MIBC includes tumor which extends into the muscle (stage T2), into the perivisceral fat layer (stage T3) or nearby organs (stage T4). Statistically, in case of 80% of patients tumor do not spread outside of the bladder wall. BC can also be classified by histology as low-grade (LG) tumor that rarely spread from their primary site, and high-grade ones (HG) that are more aggressive and invasive³.

Generally, the first treatment for early BC is a trans urethral resection of bladder tumor (TURBT) sometimes followed by intravesical instillation of mitomycin or *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) therapy. On the other hand, standard treatment for MIBC is a radical cystectomy with pelvic lymph-node dissection. This is combined with neoadjuvant or adjuvant cisplatin based chemotherapy⁴. Despite such aggressive type of treatment, the survival rate of bladder cancer patients is low. Thus, it is essential to combine local and systemic therapies to improve outcomes. High-grade tumors are usually detected by cytology with high specificity and selectivity, but in the case of low-grade tumors, their determination is very difficult.

Metabolomic instrumental analysis is powerful family of tools mainly often used for study of biofluids. Small molecules levels in biofluids such as serum reflects the current state of the organism allowing for identification and characterization of potential disease biomarkers. The number of metabolomics studies in the diagnosis and

¹Faculty of Chemistry, Rzeszów University of Technology, 6 Powstańców Warszawy Ave., 35-959 Rzeszow, Poland. ²Department of Urology, John Paul II Hospital, Grunwaldzka 4 St., 36-100 Kolbuszowa, Poland. ³Doctoral School of Engineering and Technical Sciences at the Rzeszów University of Technology, 8 Powstańców Warszawy Ave., 35-959 Rzeszow, Poland. ✉email: jnizioł@prz.edu.pl

understanding of many diseases is rapidly growing in recent years⁵. Numerous analytical methods have been used to better understand the metabolic changes occurring in living systems and especially cancer phenotypic changes. However, two analytical platforms including nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy⁶ and mass spectrometry (MS) often coupled with liquid chromatography (LC)⁷ allow to achieve the most comprehensive screening of cancer metabolomes. MS in comparison to NMR, allows the detection of much broader range of compounds with much higher sensitivity, resolution, and precision using very small amount of sample⁸. Over the past fifteen years, metabolomic analytical methods have been used extensively to investigate BC and to identify potential biomarkers of this cancer in urine, serum, and tissues^{9,10}. Compared to urine, serum metabolomics is less prone to be affected by dilution factor. Serum is also more readily available than tissue and procedure less invasive¹¹. Despite the advantages of examining the metabolomes of human sera, there are only a few studies on serum metabolomics focused on BC biomarker discovery. So far, most studies related to the analysis of serum of patients with bladder cancer have been carried out using NMR^{12–14} or mass spectrometry coupled with liquid^{7,15–19} and gas chromatography (GC)^{3,20,21}. The first such study of serum from BC patients with LC–MS is from 2012, when Lin et al.²² analyzed serum profiles of BC with LC–MS, and revealed five potential biomarkers for diagnosis of different types of genitourinary cancer. Five years later Tan et al. (Tan 2017) analyzed serum metabolites of 120 BC patients and 52 healthy persons using ultrahigh performance liquid chromatography (UHPLC) coupled with quadrupole time-of-flight (Q-TOF) mass spectrometry in conjunction with univariate and multivariate statistical analyses. They selected and validated 3 differential metabolites including inosine, acetyl-*N*-formyl-5-methoxykynurenamine and phosphatidylserine, PS(*O*-18:0/0:0) that could discriminate HG and LG BC patients and also LG BC and healthy controls. In the same year, Sahu et al. applied GC and LC–MS to identify metabolite associated with urothelial carcinoma in 72 patients and 7 patients without urothelial neoplasia¹⁷. Their research indicated potential metabolic pathways altered in NMIBC and MIBC BC. In 2019, Vantaku et al. presented serum targeted metabolomic analysis based on LC–MS to investigate to investigate the molecular differences in BC patients from different parts of the world. The study included two independent cohorts of 54 European Americans and 18 African Americans patients and corresponding healthy controls¹⁶. In the same year, Amara et al.¹⁵ applied LC–MS for targeted analysis of serum metabolites of 67 BC smokers and 53 post-operative BC patients and 152 healthy controls. Their research showed that serum analysis before and after tumor resection can reveal progressive and significant changes of concentration of selected metabolites. In 2021, Troisi et al. applied LC–MS to profile serum metabolites of 64 patients with BC, 74 patients with RCC, and 141 healthy controls. They used different ensemble machine learning models in order to identify metabolites that differentiate cancer patients from controls and allow to classify the tumor in terms of its stage and grade (Troisi 2021).

In this work we report the first results of untargeted analysis of human sera with ultra-high-resolution mass spectrometry coupled to ultra-high-performance liquid chromatography. This study employed the large number of patients—100 cancer patients and 100 controls. Untargeted analysis was focused on serum metabolic changes generated by bladder cancer but also stratifying the disease by stage and grade. Our study reveals potential BC biomarkers for early detection, screening and differential diagnosis.

Materials and methods

All chemicals were of analytical reagent grade. Deionized water (18 M Ω cm) was produced locally. LC–MS-grade methanol was bought from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Instrumentation. Instrumental configuration consisted of a Bruker Elute UHPLC system operated by Hystar 3.3 software and a ultra-high-resolution mass spectrometer Bruker Impact II (60,000+ resolution version; Bruker Daltonik GmbH) ESI QTOF-MS equipped with Data Analysis 4.2 (Bruker Daltonik GmbH), and Metaboscape (2021b). A Waters UPLC column ACQUITY BEH (C18 silica, 1.7 μ m particles, 50 \times 2.1 mm) with compatible column guard was used for all analyses. Two mobile phases were: A = Water with 0.1% formic acid, B = acetonitrile with 0.1% formic acid (v/v). Samples in autosampler were thermostated at 4 $^{\circ}$ C temperature. Volume of 5 μ L of extract was loaded on the column at a flow rate of 200 μ L min⁻¹, using 4% B. B percentage was changed with time as follows: 0 min—1%, 0.56 min—1% B, 4.72 min—99%, 5.56 min—99%, 5.6 min—1%, 9.45 min—1%. Solvent flow was 450 μ L min⁻¹. Column was thermostated at 40 $^{\circ}$ C temperature. Internal calibration on 10 mM sodium formate (water: isopropanol 1:1 v/v) ions was performed automatically in Metaboscape with the use of syringe pump at an infusion flow rate of 0.12 mL h⁻¹, using a high precision calibration (HPC) mode. Analyses in positive autoMSMS mode were carried out using the following parameters: *m/z* 50–1200; capillary voltage: 4.5 kV; nebulizer: 2.7 bar; dry gas: 12 L min⁻¹; drying gas temperature: 220 $^{\circ}$ C; hexapole voltage: 50 Vpp; funnel 1: 200 Vpp; funnel 2: 200 Vpp; pre-pulse storage time: 5 μ s; transfer time: 60 μ s. Collision-Induced Dissociation (CID) was used with following settings: absolute threshold (per 100 sum): 200 cts; absolute threshold 88 cts; active exclusion 3 spectra; release after 0.3 min, isolation mass: for *m/z* = 100, width was 3, for 500 width was 4, for 1000 was 6 and for 1300 was 8); collision energy value was 30 eV. MS frequency was 20 Hz and MSMS from 5 to 30. The untargeted annotations were performed in Metaboscape (ver. 2021b) with a criterion of mass deviation ($\Delta m/z$) under 2 ppm and mSigma value under 15 as the maximum acceptable deviation of the mass of the compound and the isotopic pattern respectively. For identification and molecular formula generation, exact mass of parent ions was matched with < 3 ppm error and mSigma value < 50 in most cases. All the molecular formulas were obtained using the Smart Formula tool and the C, H, N, O, P, S, Cl, Br, I and F elements. MSMS spectra was automatically matched against MSMS libraries: Bruker HMDB 2.0 library, MassBank of North America (MoNA)²³ library and NIST ver. 2020 MSMS library²⁴. The quality control (QC) sample were prepared from 100 different serum extracts and were measured every ten samples throughout the analytical run

to provide a set of data from which method stability and repeatability can be assessed. All measurements were made in technical triplicates.

Collection of human blood samples. Serum samples were collected from one hundred bladder cancer patients (average age 73, Caucasian race) at John Paul II Hospital in Kolbuszowa (Poland). Control serum samples were collected from healthy volunteers after medical examination focused on detection of urinary cancers. All the patients underwent transurethral resection of bladder tumor (TURBT) following detailed clinical questioning and laboratory testing. The study was approved by local Bioethics Committee at the University of Rzeszow (Poland, permission no. 2018/04/10) and performed in accordance with relevant guidelines and regulations. All patients involved in the study were informed about the purpose of this research and planned procedures, and signed an informed consent form. Just over half of the patients ($n = 54$) had low-grade bladder cancer and papillary urothelial neoplasm of low malignant potential (PUNLMP) ($n = 3$), while the remaining patient group exhibited high-grade disease ($n = 41$). In two cases, both high- and low-grade neoplasms were detected. The majority of these patients ($n = 69$) displayed noninvasive papillary carcinomas (pathologic stage Ta, pTa) stage disease, nineteen had submucosal invasive tumors (pathologic stage T1, pT1) stage and twelve patients had muscle invasive bladder cancer (pathologic stage T2, pT2). The average age for diagnosed patients with BC was 74 ± 10 years while in NCs group the average age was 64 ± 12 . The entire NCs group consists of patients admitted to the urology department for surgical treatment of benign urological conditions (urolithiasis, benign prostate hyperplasia, testicular hydrocele, varicocele, phimosis, ureteropelvic junction stenosis, urinary incontinence, urethral stricture). Each of these patients has had performed at least an abdominal ultrasound to rule out neoplasms (patients with urolithiasis usually also had a computed tomography (CT) scan) and a basic bundle of lab tests required for urological surgery that rule out inflammation. Patients were selected according to a similar age range. After familiarizing patients with the research program, patients from the control group gave written consent to donate residual serum for study (no additional blood was drawn for the purpose of this study, except that taken before urological surgery). The clinical characteristics of the patients are presented in supplementary information 1, table S1. Approximately 2.6 ml of blood was drawn from each participant. Samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 min at room temperature. The serum was then separated and kept at $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further use.

Sample preparation. Polar metabolites were extracted from serum samples as described in our recent publication (Nizioł, Ossoliński, et al. 2021). In brief, deep frozen blood plasma samples (300 μL) were thawed on ice to $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ before use. Samples were then centrifuged at $12,000\times g$ for 5 min also at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperature. Volume of 300 μL of serum was pipetted into sterile 2.0 mL Eppendorf tubes and room-temperature acetone (900 μL) was added and vial vortexed for 1 min. Resulting suspension was incubated at room temperature for 20 min followed by 30 min at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tubes was then centrifuged at $6000\times g$ for 5 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperature to sediment serum precipitated proteins and phospholipids and then clarified supernatant A (800 μL) was transferred to a new 2 ml microcentrifuge tube. Volume of 500 μL of a 3:1 acetone/ H_2O solution was added to the pellet and vortexed vigorously until the pellet was resuspended, this tube was then centrifuged at $12,000\times g$ for 10 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ to sediment serum precipitated proteins again. Resulting supernatant B was then combined with supernatant A. Volume of 260 μL of combined supernatants were vacuum dried in speedvac-type concentrator and dissolved in 400 μL of methanol, vortexed and centrifuged ($12,000\times g$ for 5 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Supernatant volume of 100 μL was transferred into HPLC vial insert of 130 μL capacity and inserted into Elute autosampler.

Multivariate statistical analysis. All metabolite datasets exported from Metaboscope v.2021b were analyzed using the MetaboAnalyst 5.0 online software²⁵. Prior to analysis, data was log-transformed, auto-scaled and normalized by sum. Resulting metabolite profiles were then subjected to unsupervised Principal Component Analysis (PCA). The separation between the BC and control groups observed in the 2D and 3D PCA scores plot was further examined using the supervised multivariate statistical analysis such as Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA). The quality of the OPLS-DA models was assessed by the goodness of fit (R^2Y) and the predictive ability of the models (Q^2). VIP plots were generated to recognize metabolites most significantly responsible for groups separation. Metabolites with VIP value higher than 1.0 were considered potential biomarker candidates. To test the accuracy of the multivariate statistical models, and to rule out that the observed separation in the OPLS-DA is due to chance ($p < 0.05$), permutation tests were performed with 2000-fold repetition. Statistical significance of metabolite level differences was assessed with paired parametric t-test using Mann–Witney and Bonferroni correction. P values and false discovery rates (FDR; q -value) less than 0.05 were considered statistically significant. Receiver operating characteristic curve (ROC) analyses together with random forest modeling were commenced to evaluate the diagnostic value of all selected metabolites. The performance of the metabolites was estimated using the area under the curve (AUC), 95% confidence interval, specificity and selectivity. Only variables with an AUC value higher than 0.75 were considered to be relevant. Multivariate statistical analyses were performed independently for the training and validation datasets. Compounds differentiating between tumor and control serum samples were selected based on external validation, which uses two independent datasets (here called training and validation dataset) to validate the performance of a model²⁶. The final set of potential BC biomarkers selected fulfilled all criteria in both testing and validation data sets. Chemometric tools such as 2D PCA, OPLS-DA and ROC analysis were also used to assess metabolic profile similarities and differences between different grades and stages of bladder cancer. To identify metabolic pathways impacted by bladder cancer, a metabolic pathway impact analysis was made in MetaboAnalyst 5.0 and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway library for *Homo sapiens*²⁷. Quantitative pathway enrichment analysis was conducted based on Small Molecule Pathway Database (SMPD). Each impacted

pathway was classified according to statistical p value, Holm p (p value adjusted by Holm–Bonferroni method) and FDR (p value adjusted using False Discovery Rate), calculated from pathway topology analysis.

Ethics approval. The study protocol was approved by local Bioethics Committee at the University of Rzeszow (Poland) (permission no. 2018/04/10).

Results

In this study, we characterized the metabolic profiles of one-hundred patients suffering from bladder cancer, in an effort to develop serum-specific metabolic signatures for early and specific detection of bladder cancer. For this purpose, we recorded ultra-high-resolution LC–MS spectra of 200 total (100 BC and 100 control = NCs) metabolite extracts from patient and healthy control serum samples in an effort to identify potential discriminant biomarkers of bladder cancer. Datasets from the BC patients and NCs were divided into two groups, a training set, comprising 80% of all samples and a validation set, corresponding to 20% of all samples. Patient samples of a given stage of BC in the training set accounted for 80% of all samples of that stage. Serum metabolic profiling was performed independently on the two datasets. The training set was used to identify serum diagnostic markers for cancer and stage of its malignancy and, in turn, the validation set was used to independently validate the diagnostic performance of serum metabolite biomarkers.

Distinguishing between bladder cancer and control serum samples. In total, 5498 m/z features were found in each serum sample in both training and validation set with applied filtration that required that software show only features that were in at least nine samples. Unsupervised 2D PCA score plots of both subsets indicated a good separation between cancer patients and controls based on distinct and characteristic metabolite profiles. The best separation of groups in the training set was obtained along principal components 1 and 2 (i.e. PC1 and PC2) which accounted for 27.8% and 5.5% respectively. Only a few outliers were detected in the central 95% of the field of view (Fig. 1a). In turn, in the validation set, the best separation between cancer and control serum samples was also observed along PC1 (28.2%) and PC2 and (6.6%) (Fig. 1b).

A supervised multivariate analysis using OPLS-DA analysis was carried out to explore the metabolic differences between the BC and NC groups. In the training set, the score plot indicated a clear separation between those two groups (Fig. 1c). Two thousand permutation tests were conducted to validate the OPLS-DA model (Fig. S1 A). Good discrimination was observed between the two groups ($Q^2 = 0.971$, $R^2Y = 0.992$, p value $< 5E-04$ (0/2000)), revealing substantial differences in the metabolic profiles of cancer versus control serum samples. Model overview showing high R^2Y and Q^2 indicating good interpretability and predictability by this OPLS-DA model (Fig. S1 B). A similar tendency to discriminate BC patients and NCs was observed in OPLS-DA model of the validation set (Fig. 1d), which was confirmed by the very good results of the permutation test ($Q^2 = 0.929$, $R^2Y = 0.995$, p value $< 5E-04$ (0/2000)) (Fig. S1C). Potential serum bladder cancer biomarkers were selected on the basis of the VIP plot resulting from the OPLS-DA model. By combining the VIP (> 1.0) with the results from the independent t -test (p value and FDR from t -test < 0.05) 1012 variables were selected in training set as differential for BC patients and NCs (Table 1, Supplementary information 2). In turn, in validation set 1052 variables were considered as significant (Table 2, Supplementary information 2). Finally, 864 common m/z and rt values were indicated, both in the training and validation sets. Among these features, to 121 m/z values were assigned to a specific chemical compound (Table 1). Next, univariate ROC analysis was separately performed on both training and validation sets to evaluate the diagnostic ability of the models. The results indicated that in the serum samples all 85 out of previously selected 121 metabolites exhibit very high area under the curve (AUC) above 0.8. As shown in Fig. 1e,f, the combination of mass features in both subsets was found to be a powerful discriminator of control versus bladder cancer serum samples (AUC $> 99\%$). Finally, set of twenty-seven potential BC biomarkers were selected with cut-off criteria of $FC > 2$ and < 0.5 , $\Delta m/z < 2$ ppm and $mSigma < 50$ in both testing and validation data sets. The sensitivity and specificity of the selected 27 metabolites were also determined and all metabolites disclosed sensitivity and specificity greater than 77 and 85%, respectively (Table 1 and S1, Supplementary information 2).

Distinguishing between low- and high- grade bladder cancer and control serum samples. To determine whether metabolomics analysis of serum samples could help discriminate between different grades of BC, another series of PCA and OPLS DA analyses were performed on the training (80 NCs, 32 patients with HG and 45 patients with LG,) and validation (20 NCs, 8 patients with HG and 12 patients with LG,) data sets (Table S1) excluding three samples from patients with PUNLMP. PCA and OPLS-DA scores plots revealed good discrimination between separately control and cancer groups of varying grades of tumors (LG vs NCs and HG vs NCs) in both training and validation set (Fig. 2, S2). Quality factors for those models amounted to $Q^2 > 0.89$ and $R^2Y > 0.982$, with p values based on permutation tests ($n = 2000$) smaller than $5E-4$ (Fig. S3, S4) indicating a perfect discrimination of metabolites profiles between those groups. However, we did not observe a substantial difference between the LG and HG BC patients in the PCA scores plot (data not shown).

In HG BC vs NCs OPLS-DA model 1500 variables were considered as significant ($VIP > 1$, p value < 0.05) in both training and validation set. Among these features, 138 m/z values were assigned to a specific chemical compound. Analysis of LG BC vs NCs in OPLS-DA model in training and validation set revealed common 1600 m/z values as significant contributors to the separation between those two groups of which 148 were assigned to specific compound. Univariate ROC curve analyses indicated that these models have a good diagnostic performance (Fig. 2, S2). AUC values for five out of fifteen metabolites were found to be greater than 0.75. Finally, set of twenty-three potential LG and HG BC biomarkers were selected with cut-off criteria of $FC > 2$ and < 0.5 , $\Delta m/z < 2$ ppm and $mSigma < 50$ in both testing and validation data sets. The sensitivity and specificity of the

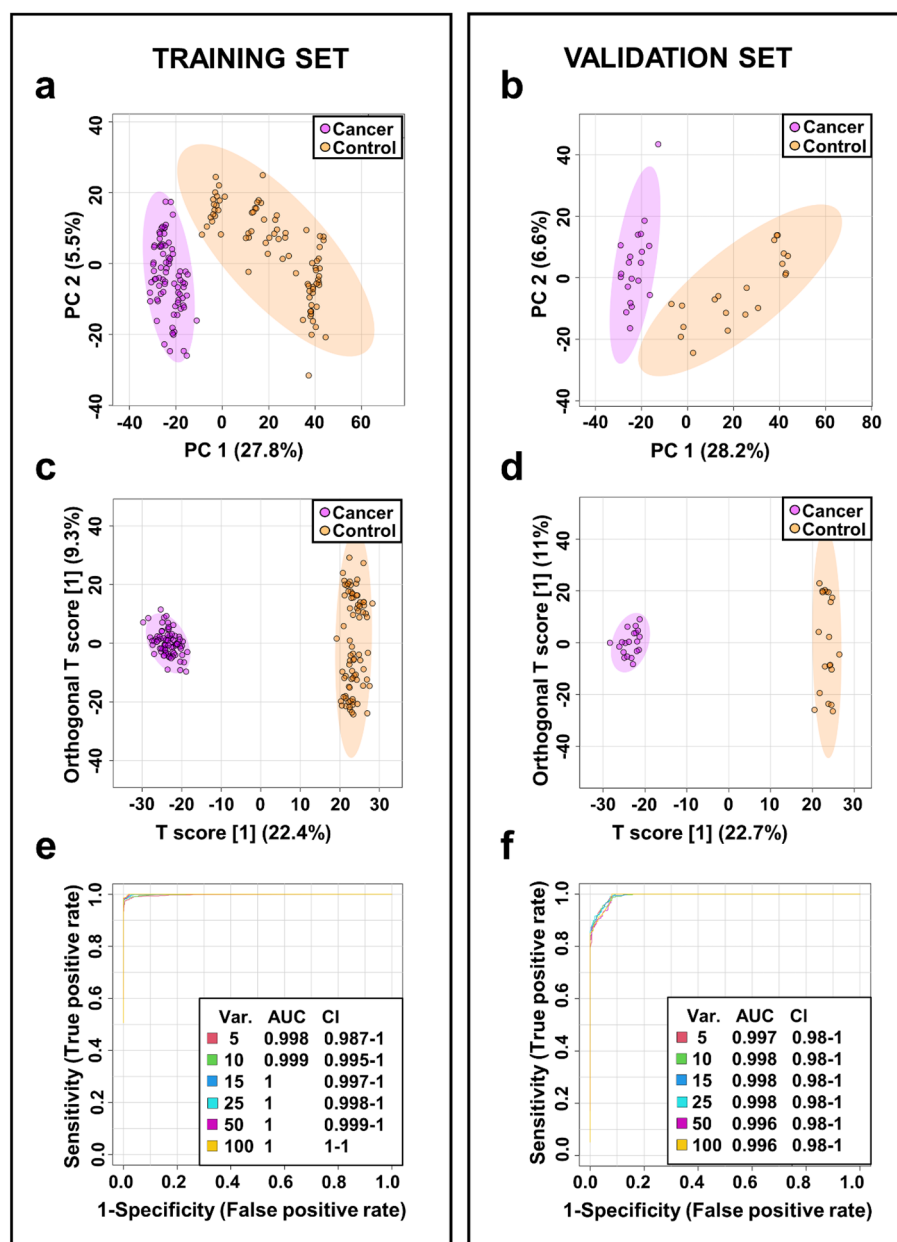


Figure 1. Metabolomic analysis of serum samples from BC and NCs. PCA and OPLS-DA scores plots of the tumor (violet) and control (orange) serum samples in the training set (a,c) and validation set (b,d). The receiving operator characteristic (ROC) curves in the training set (e) and validation set (f).

selected 23 metabolites were also determined and all metabolites disclosed sensitivity and specificity greater than 78% (Table 2 and S2, Supplementary information 2).

Distinguishing between different stages of bladder cancer and control serum samples. Analysis of tumor stages was performed for the entire LC-MS dataset of serum metabolite extracts from patients diagnosed with bladder cancer. Metabolite profiling analysis included 69 serum samples from patients with noninvasive papillary carcinomas (pTa) 19 samples from pT1 stage and 12 from patients with muscle invasive bladder cancer (pT2).

PCA and OPLS-DA scores plot indicated good separation between NCs and different stages of BC (pTa vs NCs, pT1 vs NCs and pT2 vs NCs, Fig. 3). Quality factors for those models were $Q^2 > 0.904$ and $R^2Y > 0.988$, with p values based on permutation tests ($n = 2000$) smaller than $5E-4$ (Fig. S5) indicating a very good discrimination of metabolites profiles between those groups. Fold Change and VIP plot analysis of the OPLS-DA model indicated 63, 66 and 69 m/z values that appeared to be most relevant for sample differentiation between pTa BC vs NCs, pT1 BC vs NCs and pT2 BC vs NCs respectively out of pool of features assigned to specific chemical compounds. Next, ROC curve analysis was performed to assess the performance of three models in distinguishing

No	Name	Structure	m/z ^a	$\Delta m/z$ [ppm]	RT [s]	VIP ^b	FC ^c	p value	FDR	AUC	Spec. [%] ^d	Sens. [%] ^d
1	Aureonitol ^{e,g,h}	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	207.1378	-0.7	173.2	1.82	0.20	5.00E-27	3.20E-25	0.993	96	98
2	Norcamphor ^{e,g,h}	C ₇ H ₁₀ O	111.0803	-1.0	143.2	1.79	0.29	5.80E-27	3.30E-25	0.992	96	100
3	Perillyl alcohol ^{e,g}	C ₁₀ H ₁₆ O	153.1273	-0.8	210.3	1.83	0.25	6.30E-27	3.30E-25	0.992	96	100
4	Thymol ^{e,f,g}	C ₁₀ H ₁₄ O	151.1116	-0.8	204.2	1.78	0.39	7.30E-27	3.40E-25	0.991	94	99
5	Methyl 2-octynoate ^{e,g,h}	C ₉ H ₁₄ O ₂	155.1065	-1.3	177.7	1.72	0.31	8.40E-27	3.40E-25	0.991	95	98
6	3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one ^{e,g,h}	C ₉ H ₁₄ O	139.1116	-0.9	193.2	1.83	0.17	9.80E-27	3.50E-25	0.990	96	99
7	Alantolactone ^{e,g,h}	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	233.1535	-0.3	194.6	1.80	0.23	9.80E-27	3.50E-25	0.990	94	98
8	4-Heptanone ^{e,f,g}	C ₇ H ₁₄ O	115.1116	-0.9	206.7	1.79	0.24	1.00E-26	3.50E-25	0.990	94	96
9	7-Epi-Jasmonic acid ^{e,g,h}	C ₁₂ H ₁₈ O ₃	211.1328	-0.2	160.9	1.80	0.19	1.50E-26	4.10E-25	0.988	96	96
10	Dihydrojasmonone ^{e,g,h}	C ₁₁ H ₁₈ O	167.1429	-0.8	228.3	1.78	0.41	1.60E-26	4.20E-25	0.988	94	94
11	Valeric acid ^{e,f,g}	C ₅ H ₁₀ O ₂	103.0753	-0.8	132.2	1.75	0.41	2.30E-26	5.10E-25	0.987	91	96
12	4,4,7a-trimethyl-3a,5,6,7-tetrahydro-3H-indene-1-carboxylic acid ^{e,g,h}	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	209.1534	-0.8	197.8	1.75	0.4	5.50E-26	9.20E-25	0.983	94	95
13	1-Acetylindole ^{e,g,h}	C ₁₀ H ₉ NO	160.0757	0.1	131.1	1.65	2.13	1.50E-25	2.20E-24	0.978	93	98
14	Linoleic acid ^{e,g}	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	281.2473	-0.8	258.6	1.52	2.55	3.50E-25	4.40E-24	0.975	94	94
15	1-Phenyl-1-pentanone ^{e,g,h}	C ₁₁ H ₁₄ O	163.1116	-0.8	200.5	1.73	0.34	7.50E-25	8.30E-24	0.971	94	86
16	Umbelliferone ^{e,g,h}	C ₉ H ₆ O ₃	163.0389	-0.6	182.1	1.69	0.49	1.10E-24	1.10E-23	0.970	91	90
17	Elaidic acid ^{e,g}	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	283.2629	-0.9	278.4	1.67	3.33	1.20E-24	1.30E-23	0.969	95	94
18	3-Ethylphenol ^{e,g,h}	C ₈ H ₁₀ O	123.0803	-0.9	122.9	1.72	0.36	1.30E-24	1.30E-23	0.969	96	95
19	D-Limonene ^{e,g}	C ₁₀ H ₁₆	137.1324	-0.7	143.9	1.72	0.30	2.90E-24	2.60E-23	0.965	91	90
20	6-Hydroxy-4,4,7a-trimethyl-5,6,7,7a-tetrahydrobenzofuran-2(4H)-one ^{e,h}	C ₁₁ H ₁₆ O ₃	197.1171	-0.8	143.2	1.60	0.41	8.60E-23	6.00E-22	0.950	89	90
21	LysoPE(P-18:0/0:0) ^{e,g,h}	C ₂₃ H ₄₈ NO ₆ P	466.3288	-1.0	294.2	1.58	0.38	1.30E-22	8.40E-22	0.948	86	91
22	Palmitoleoyl Ethanolamide ^{e,g,h}	C ₁₈ H ₃₅ NO ₂	298.2738	-0.9	236.5	1.41	2.08	1.50E-22	1.00E-21	0.947	90	91
23	PE(P-16:0e/0:0) ^{e,g,h}	C ₂₁ H ₄₄ NO ₆ P	438.2977	-0.6	267.5	1.48	0.48	4.70E-20	2.30E-19	0.920	85	88
24	3-Hexanone ^{e,g,h}	C ₆ H ₁₂ O	211.1328	-0.2	160.9	1.40	0.50	5.20E-18	2.10E-17	0.896	86	96
25	Epsilon-caprolactam ^{e,f,g,h}	C ₆ H ₁₁ NO	114.0914	-0.2	114.5	1.16	2.35	5.70E-18	2.30E-17	0.896	85	81
26	L-Acetylcarnitine ^{e,f,g}	C ₉ H ₁₇ NO ₄	204.1230	-0.3	22.9	1.37	2.36	1.50E-16	5.40E-16	0.878	85	78
27	LysoPC(18:3) ^{e,g,h}	C ₂₆ H ₄₈ NO ₇ P	518.3236	-1.0	237.9	1.25	0.48	1.30E-15	4.60E-15	0.866	86	78

Table 1. Differential metabolites for discrimination between BC patients and NCs (p value < 0.05; FDR < 0.05; VIP > 1; FC < 0.5 and > 2). ^aExperimental monoisotopic mass; ^bVIP scores derived from OPLS-DA model; ^cfold change between cancer and control serum calculated from the abundance mean values for each group—cancer-to-normal ratio; ^dROC curve analysis for individual biomarkers; ^ethe metabolites identified by high precursor mass accuracy; ^fthe metabolites identified by matching retention time; ^gthe metabolites identified by matching isotopic pattern; ^hthe metabolites identified by matching MS/MS fragment spectra; AUC: area under the curve; CI: confidence interval; FC: fold change; FDR: false discovery rate; m/z : mass-to-charge ratio; RT: retention time; Sens.: Sensitivity; Spec.: Specificity; VIP: variable influence on projection.

between pTa; pT1 and pT2 bladder cancer stages and NCs. Finally, set of thirty-seven potential pTa, pT1 and pT2 BC biomarkers were selected with cut-off criteria of FC > 2 and < 0.5, $\Delta m/z$ < 2 ppm and $m\sigma$ < 50 in both testing and validation data sets (Table 3). The sensitivity and specificity of the selected 37 metabolites were also determined and all metabolites disclosed sensitivity and specificity greater than 74 and 62%, respectively S3, Supplementary information 2). Comparison of the three groups of cancer stage (pT1 vs. pTa vs. pT2) did not reveal any statistically significant differences (data not shown).

Pathway analysis of potential biomarkers. A metabolic pathway impact analysis was performed using MetaboAnalyst 5.0 to identify the most relevant pathways involved in the observed changes of serum metabolite levels. Forty-five metabolites identified in the UHPLC-UHRMS analysis were subjected to pathway analysis and quantitative pathway enrichment analysis. Forty-nine compounds were found to be relevant to human metabolism. Five metabolic pathways, including linoleic acid metabolism, glycerophospholipid metabolism, alpha-linolenic acid metabolism, arachidonic acid metabolism and biosynthesis of unsaturated fatty acids were found to be significantly impacted comparing BC to controls. Results from pathway impact analysis is shown in Fig. 4a and Table S2 (supplementary information 1).

To expand the metabolomic analysis of pathways related to bladder cancer, we performed a quantitative enrichment analysis using the MetaboAnalyst 5.0 pathway enrichment module and its associated Small Molecule Pathway Database (SMPDB). Two additional pathways were found to be relevant to bladder cancer: beta oxidation of very long chain fatty acids, phospholipid biosynthesis and oxidation of branched chain fatty acids (Fig. 4b and Table S3).

No	Metabolites	Formula	m/z ^a	RT [s]	HG versus control				LG versus control			
					VIP ^b	FC ^c	Spec. [%] ^d	Sens. [%] ^d	VIP ^b	FC ^c	Spec. [%] ^d	Sens. [%] ^d
1	Aureonitol ^{e,g,h}	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	207.1378	173.22	1.82	0.20	98	97	1.84	0.20	100	96
2	7-Epi-Jasmonic acid ^{e,g,h}	C ₁₂ H ₁₈ O ₃	211.1328	160.86	1.80	0.19	96	97	1.83	0.19	96	96
3	3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one ^{e,g,h}	C ₉ H ₁₄ O	139.1116	193.16	1.86	0.17	95	94	1.87	0.17	98	93
4	Alantolactone ^{e,g,h}	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	233.1535	194.63	1.80	0.25	95	94	1.84	0.22	98	93
5	Valeric acid ^{e,f,g}	C ₅ H ₁₀ O ₂	103.0753	132.22	1.78	0.41	98	94	1.79	0.41	95	93
6	4-Heptanone ^{e,g,h}	C ₇ H ₁₄ O	115.1116	206.71	1.78	0.24	96	97	1.81	0.23	96	93
7	Methyl 2-octanoate ^{e,g,h}	C ₉ H ₁₄ O ₂	155.1065	177.72	1.77	0.30	98	91	1.84	0.32	98	98
8	4,4,7a-trimethyl-3a,5,6,7-tetrahydro-3H-indene-1-carboxylic acid ^{e,g,h}	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	209.1534	197.75	1.74	0.40	98	91	1.75	0.40	96	89
9	Thymol ^{e,g,h}	C ₁₀ H ₁₄ O	151.1116	204.15	1.74	0.39	99	94	1.76	0.39	99	93
10	Umbelliferone ^{e,g,h}	C ₉ H ₆ O ₃	163.0389	182.05	–	–	–	–	1.74	0.49	94	91
11	4,7-Dimethyl-1,3-benzothiazol-2-ylamine ^{e,g,h}	C ₉ H ₁₀ N ₂ S	179.0638	142.04	1.66	2.00	93	88	–	–	–	–
12	D-Limonene ^{e,g}	C ₁₀ H ₁₆	137.1324	143.88	1.66	0.30	89	94	1.70	0.31	86	93
13	LysoPE(P-18:0/0:0) ^{e,g,h}	C ₂₃ H ₄₈ NO ₆ P	466.3288	294.22	1.63	0.36	91	91	1.55	0.39	86	87
14	1-Acetylnadole ^{e,g,h}	C ₁₀ H ₉ NO	160.0757	131.14	1.58	2.14	93	94	1.61	2.13	98	93
15	6-Hydroxy-4,4,7a-trimethyl-5,6,7,7a-tetrahydro-2H-benzofuran-2(4H)-one ^{e,h}	C ₁₁ H ₁₆ O ₃	197.1171	143.16	1.57	0.43	94	81	1.64	0.40	91	89
16	PE(P-16:0e/0:0) ^{e,g,h}	C ₂₁ H ₄₄ NO ₆ P	438.2977	267.49	1.56	0.44	88	88	–	–	–	–
17	LysoPC(20:3) ^{e,g,h}	C ₂₈ H ₅₂ NO ₇ P	546.3545	259.45	1.48	0.45	84	81	–	–	–	–
18	Linoleic acid ^{e,g}	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	281.2473	258.56	1.43	2.64	94	94	1.39	2.44	93	93
19	LysoPC(18:3) ^{e,g,h}	C ₂₆ H ₄₈ NO ₇ P	518.3236	237.91	1.33	0.45	78	78	–	–	–	–
20	L-Acetylcarnitine ^{e,f,g}	C ₉ H ₁₇ NO ₄	204.1230	22.91	1.33	2.39	79	84	1.35	2.29	86	80
21	Epsilon-caprolactam ^{e,f,g,h}	C ₆ H ₁₁ NO	114.0914	114.47	1.19	2.08	89	94	1.32	2.58	89	82
22	3-Hexanone ^{e,g,h}	C ₆ H ₁₂ O	101.0960	152.86	–	–	–	–	1.42	0.49	79	93
23	Elaidic acid ^{e,g}	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	283.2629	278.39	–	–	–	–	1.67	3.36	91	98

Table 2. Differential metabolites for discrimination between LG and HG BC patients and NCs (p value < 0.05; FDR < 0.05; VIP > 1; FC < 0.5 and > 2). ^aExperimental monoisotopic mass; ^bVIP scores derived from OPLS-DA model; ^cfold change between cancer and control serum calculated from the abundance mean values for each group—cancer-to-normal ratio; ^dROC curve analysis for individual biomarkers; ^ethe metabolites identified by high precursor mass accuracy; ^fthe metabolites identified by matching retention time; ^gthe metabolites identified by matching isotopic pattern; ^hthe metabolites identified by matching MS/MS fragment spectra; AUC: area under the curve; CI: confidence interval; FC: fold change; FDR: false discovery rate; HG: high-grade; LG: low-grade; m/z : mass-to-charge ratio; RT: retention time; Sens.: Sensitivity; Spec.: Specificity; VIP: variable influence on projection.

Discussion

Over the past decade, metabolomics studies have provided valuable information on the metabolic profile of patients suffering from various diseases, including cancer, and identified potential markers of developing or recurring disease. Cancer cells have the ability to reprogram their metabolism in order to support the increased need for energy caused by rapid proliferation. Monitoring of changes in the levels of various metabolites in cancer cells or body fluids may be a potential source of new cancer biomarkers. To date, many studies have been published indicating the high potential of metabolomic markers in the diagnosis of various cancers and in understanding of the mechanisms of cancer initiation and development²⁸.

In this study UHPLC-UHRMS and -UHRMS/MS methods were employed to evaluate changes in serum metabolite levels between 100 bladder cancer patients and 100 normal controls. The largest class of compounds differentiating the NCs group from the BC patients were lipids and lipid-like molecules. Lipids are the fundamental building blocks of all cell membranes and serve as a long-term energy storage. Furthermore, lipids have many other important functions within living organisms including transmit nerve impulses, production and regulation of certain hormones, cushion vital organs, intracellular signal transmission and cell transporting systems. Lipid metabolism is involved in various processes associated with cancer cells. Over the past decade, numerous studies have demonstrated that lipids and metabolites associated with lipid metabolism may be potential markers in human cancers including bladder cancer²⁹. We found that the plasma content of 10 glycerophospholipids including PE(P-16:0e/0:0), PC(16:1/16:1), PC(16:0/18:3), LPE(P-18:0/0:0), LPC(14:0/0:0), LPC(P-18:0), LPC(18:3), LPC(18:2), LPC(20:3), LPC(22:5) were significantly higher in the serum of NCs than in the BC subjects. This finding is in line with previous metabolomic studies that demonstrated an association of changes in the levels of these lipids in the blood with various cancers³⁰. Thus, alterations in these lipids' metabolism may, therefore, play important roles in the development and progression of bladder cancer.

Glycerophospholipids (GPs), also called phospholipids include phosphatidylethanolamines (PE), phosphatidylcholines (PC) and phosphatidylethanolamines (PE), all of which are glycerol-based phospholipids. These compounds are a major component of the membranes of animal cells in which they are asymmetrically distributed

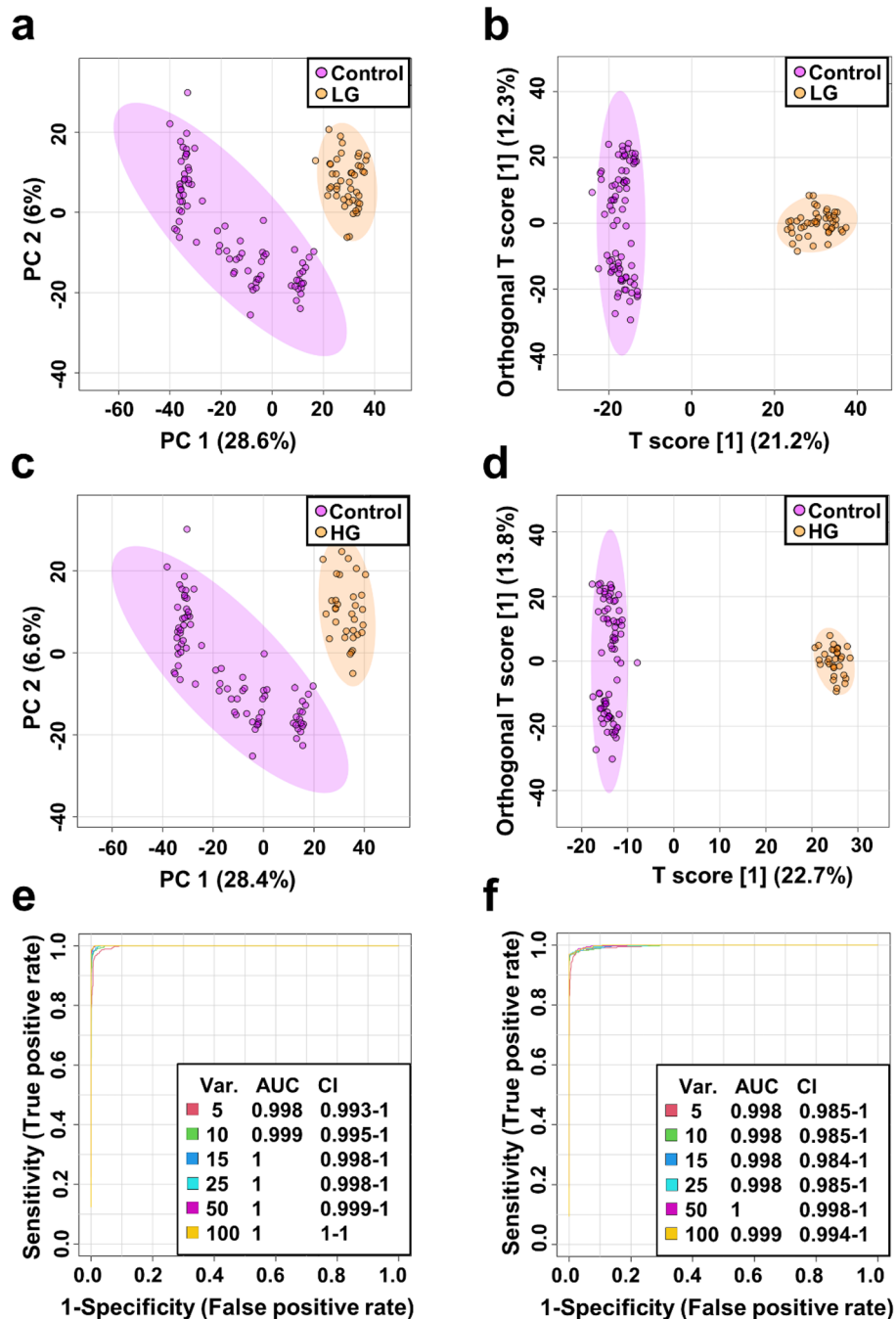


Figure 2. Metabolomic differentiation between different grades of BC and NCs in training set. PCA (a) and OPLS-DA (b) scores plots of the control (violet) and low-grade (orange). PCA (c) and OPLS-DA (d) scores plots of the control (violet) and high-grade (orange). ROC curves for LG (e) and HG (f) BC serum samples vs NCs.

acting as the matrix of different membrane proteins. Many previous studies have found low serum PE levels in various cancers including colon, prostate, lung, and breast cancers indicating these compounds as potential tumor markers^{31,32}. Serum levels of PE(P-16:0e/0:0) were found by Lin et. al significantly lower in patients with kidney cancer compared to controls²². Some studies have provided evidence that translocation of PE from the inner to the outer leaflet of the plasma membrane indicating a loss of asymmetric distribution of aminophospholipids has been shown as the first sign of impending apoptosis. Thus, lower levels of PE(P-16:0e/0:0) in serum may be an early symptom of apoptotic cell death³³. Moreover, human phosphatidylethanolamine-binding protein is associated with resistance to apoptosis of tumor cells³⁴. It has been reported that exogenous PEs inhibits the growth and indicates an apoptosis of human hepatoma HepG2 cells³⁵. Lysophosphatidylethanolamine LPC, LysoPC, LysoPE (P-18:0/0:0) also known as LPE(18:0) was found in lower level in plasma of patients with liver, gastric colorectal, ovarian and lung cancer compared to the control group^{32,36,37}. Lysophosphatidylcholines (LPC, lysoPC)

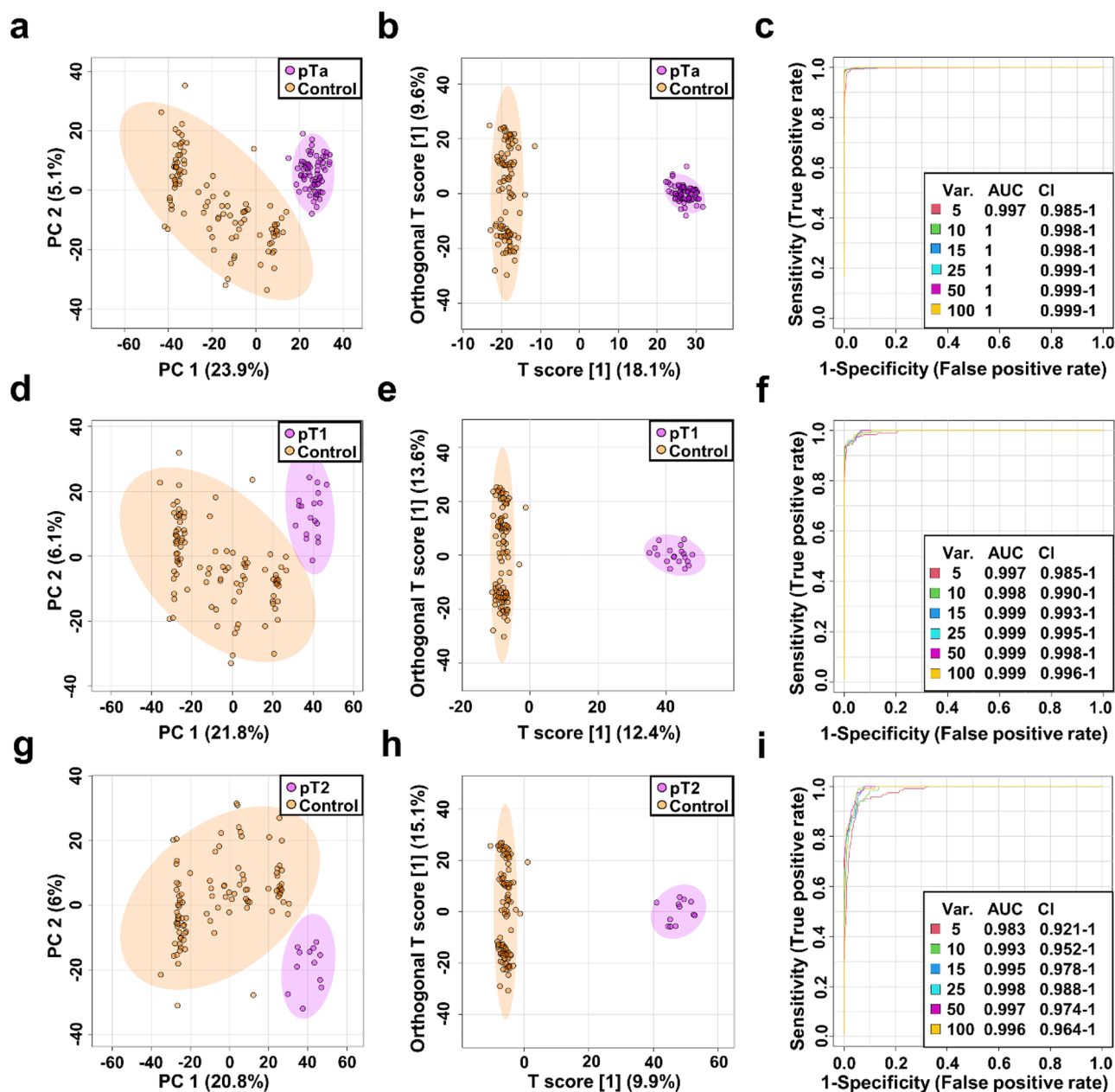


Figure 3. Metabolomic differentiation between different stages of BC and NCs. PCA (a), OPLS-DA (b) scores plots and ROC curve (c) of the pTa (violet) and control (orange). PCA (d), OPLS-DA (e) scores plots and ROC curve (f) of the pT1 (violet) and control (orange). PCA (g), OPLS-DA (h) scores plots and ROC curve (i) of the pT2 (violet) and control (orange).

are an important endogenous signaling phospholipids involved in a variety of important processes, including cell migration, cell proliferation, inflammation and angiogenesis. Decreased LPC plasma level in cancer was also observed in previous study and was associated with body weight loss and increased inflammation. Level of these compounds is inversely correlated with C-reactive protein levels in plasma (CRP)³⁸. LPCs were found to be disturbed in several diseases including cancer. Previous metabolomic studies have reported lower level of PC(34:4), LysoPC(20:3) and LPC(P-18:0) in plasma of patients with ovarian cancer (EOC) compared to control³⁹. Zhang et al.⁴⁰ have reported that LPC(14:0) was down-regulated in patients with recurrent EOC. Lower level of lysophospholipids have been associated with high activity of specific cell-surface G protein-coupled receptors which may cause apoptosis. Tan et al.⁴¹ observed significantly lower of LPC(14:0) in the serum of patients with colorectal cancer compared with healthy controls. LPC(18:1), LPC(18:2) and LPC(18:3) were significantly decreasing in plasma of patients with colorectal cancer compared with healthy controls^{42,43}. Lee et al.³² showed that the levels of LPC(18:2) were lower in plasma samples of patients with colorectal cancer and higher in plasma samples of patients with liver, gastric, lung and thyroid compared to those of healthy control individuals using UHPLC-MS/MS. LPC(18:2) was also found in lower level in plasma of patients with ovarian cancer compared to the control group³⁶. Previous metabolomic studies have demonstrated that LysoPC(18:1), LysoPC(20:3) were

No	Metabolites	Formula	<i>m/z</i> ^a	RT [s]	pTa versus control		pT1 versus control		pT2 versus control	
					VIP ^b	FC ^c	VIP ^b	FC ^c	VIP ^b	FC ^c
1	Alpha-hydroxyisobutyric acid ^{d,e}	C ₄ H ₈ O ₃	87.0439	49.21	–	–	1.20	2.66	1.05	3.92
2	Valeric acid ^{d,e,f}	C ₅ H ₁₀ O ₂	103.0753	132.22	1.90	0.41	1.99	0.41	2.05	0.40
3	Creatinine ^{d,e,f}	C ₄ H ₇ N ₃ O	114.0661	21.28	–	–	–	–	1.48	2.02
4	Epsilon-caprolactam ^{d,e,f,g}	C ₆ H ₁₁ NO	114.0914	114.47	1.28	2.30	1.51	2.33	1.34	2.46
5	4-Heptanone ^{d,e,f}	C ₇ H ₁₄ O	115.1116	206.71	1.96	0.23	1.99	0.25	2.05	0.23
6	3-Ethylphenol ^{d,f,g}	C ₈ H ₁₀ O	123.0803	122.87	1.88	0.36	1.94	0.35	1.95	0.35
7	D-Limonene ^{d,f}	C ₁₀ H ₁₆	137.1324	143.88	1.86	0.30	1.74	0.33	1.87	0.28
8	3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one ^{d,f,g}	C ₉ H ₁₄ O	139.1116	193.16	2.00	0.17	2.11	0.17	2.17	0.17
9	Thymol ^{d,e,f}	C ₁₀ H ₁₄ O	151.1116	204.15	1.91	0.39	1.82	0.41	1.84	0.40
10	Perillyl alcohol ^{d,f}	C ₁₀ H ₁₆ O	153.1273	210.29	2.03	0.25	2.20	0.26	2.31	0.24
11	Methyl 2-octynoate ^{d,f,g}	C ₉ H ₁₄ O ₂	155.1065	177.72	1.89	0.31	1.99	0.32	2.23	0.29
12	1-Acetylnadole ^{d,f,g}	C ₁₀ H ₉ NO	160.0757	131.14	1.78	2.09	1.75	2.19	1.70	2.08
13	Umbelliferone ^{d,f,g}	C ₉ H ₆ O ₃	163.0389	182.05	1.84	0.49			2.06	0.46
14	1-Phenyl-1-pentanone ^{d,f,g}	C ₁₁ H ₁₄ O	163.1116	200.50	1.94	0.33	2.04	0.36	2.04	0.37
15	4,7-Dimethyl-1,3-benzothiazol-2-ylamine ^{d,f,g}	C ₉ H ₁₀ N ₂ S	179.0638	142.04	–	–	1.82	2.02	–	–
16	Benzophenone ^{d,f,g}	C ₁₃ H ₁₀ O	183.0809	226.43	1.56	2.00	1.45	2.14	–	–
17	L-Acetylcarnitine ^{d,e,f}	C ₉ H ₁₇ NO ₄	204.1230	22.91	1.46	2.15	1.48	2.37	1.53	2.81
18	Aureonit ^{d,f,g}	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	207.1378	173.22	1.97	0.20	2.00	0.22	2.11	0.20
19	4,4,7a-trimethyl-3a,5,6,7-tetrahydro-3H-indene-1-carboxylic acid ^{d,f,g}	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	209.1534	197.75	1.89	0.40	1.87	0.42	1.99	0.38
20	7-Epi-Jasmonic acid ^{d,f,g}	C ₁₂ H ₁₈ O ₃	211.1328	160.86	1.97	0.19	2.03	0.20	1.99	0.21
21	Cys-Pro ^{d,f,g}	C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₃ S	219.0797	91.87	1.03	2.34	–	–	–	–
22	Pro-Leu ^{d,f,g}	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₃	229.1546	46.53	–	–	–	–	1.14	2.35
23	Alantolactone ^{d,f,g}	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	233.1535	194.63	1.95	0.23	1.99	0.25	1.94	0.27
24	Curcumin ^{d,f,g}	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	237.1848	226.69	1.12	0.23				
25	Isovalerylcarnitine ^{d,e,f}	C ₁₂ H ₂₃ NO ₄	246.1697	121.55	1.16	2.18	1.11	2.49	1.07	2.45
26	Linoleic acid ^{d,f}	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	281.2473	258.56	1.59	2.35	1.53	2.62	1.49	2.73
27	Elaidic acid ^{d,f}	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	283.2629	278.39	1.87	3.35	2.02	3.86	1.73	2.91
28	PE(P-16:0e/0:0) ^{d,f,g}	C ₂₁ H ₄₄ NO ₆ P	438.2977	267.49	1.59	0.49	1.95	0.39	2.08	0.36
29	Cefazolin ^{d,f,g}	C ₁₄ H ₁₄ N ₈ O ₄ S ₃	455.0371	135.59	–	–	1.02	288.76	1.30	62.93
30	LysoPE(P-18:0/0:0) ^{d,f,g}	C ₂₃ H ₄₈ NO ₆ P	466.3288	294.22	1.72	0.39	1.90	0.34	2.16	0.28
31	LysoPC(14:0/0:0) ^{d,f,g}	C ₂₂ H ₄₆ NO ₇ P	468.3080	236.23	–	–	–	–	1.96	0.33
32	LysoPC(P-18:0) ^{d,g}	C ₂₆ H ₅₄ NO ₆ P	508.3756	294.32	–	–	–	–	1.60	0.48
33	LysoPC(18:2) ^{d,f,g}	C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P	520.3393	246.39	–	–	–	–	1.80	0.44
34	LysoPC(20:3) ^{d,f,g}	C ₂₈ H ₅₂ NO ₇ P	546.3545	259.45	–	–	1.57	0.45	1.76	0.39
35	LysoPC(22:5) ^{d,f,g}	C ₃₀ H ₅₂ NO ₇ P	570.3546	255.47	–	–	–	–	1.48	0.45
36	PC(16:1/16:1) ^{d,g}	C ₄₀ H ₇₆ NO ₈ P	730.5380	312.51	–	–	1.61	0.15	–	–
37	PC(16:0/18:3) ^{d,g}	C ₄₂ H ₇₈ NO ₈ P	756.5535	313.85	–	–	1.19	0.42	–	–

Table 3. Differential metabolites for discrimination between pTa, pT1 and pT2 BC patients and NCs (*p* value < 0.05; FDR < 0.05; VIP > 1; FC < 0.5 and > 2). ^a Experimental monoisotopic mass; ^bVIP scores derived from OPLS-DA model; ^cfold change between cancer and control serum calculated from the abundance mean values for each group—cancer-to-normal ratio; ^dthe metabolites identified by high precursor mass accuracy; ^ethe metabolites identified by matching retention time; ^fthe metabolites identified by matching isotopic pattern; ^gthe metabolites identified by matching MS/MS fragment spectra; AUC: area under the curve; FC: fold change; FDR: false discovery rate; *m/z*: mass-to-charge ratio; pT1 and pTa—high risk non-muscle invasive bladder cancer; pT2—muscle invasive bladder cancer; RT: retention time; VIP: variable influence on projection.

down-regulated in patients with ovarian cancer. Four of these compounds including LPC(14:0), LPC(18:3), LPC(20:3), LPC(22:5) were previously related to kidney injury. Metabolic profiling of plasma from patients with cancer cachexia revealed significantly lower levels of LPC(14:0), LPC(P-18:0), LPC(18:2), LPC(20:3), LPC(22:5) and LPE(18:0) compared to healthy controls⁴⁴. Three of these six LPC including LPC(18:1), LPC(18:3), LPC(22:5) we identified previously at lower levels in serum of patients with thyroid carcinoma⁴⁵. To our knowledge, only one lipid out of the ten most differentiating both groups cancer and control we indicated has been previously associated with bladder cancer. Tan et al.¹⁸ indicated slightly higher level of LPC(18:2) in serum of patients with BC compared to controls using UHPLC-Q-ToF MS.

Lower levels of four prenyl lipids including perillyl alcohol, D-limonene, thymol, alantolactone were found in serum of BC compared to controls. These monoterpenoids commonly occurring in many plants are known

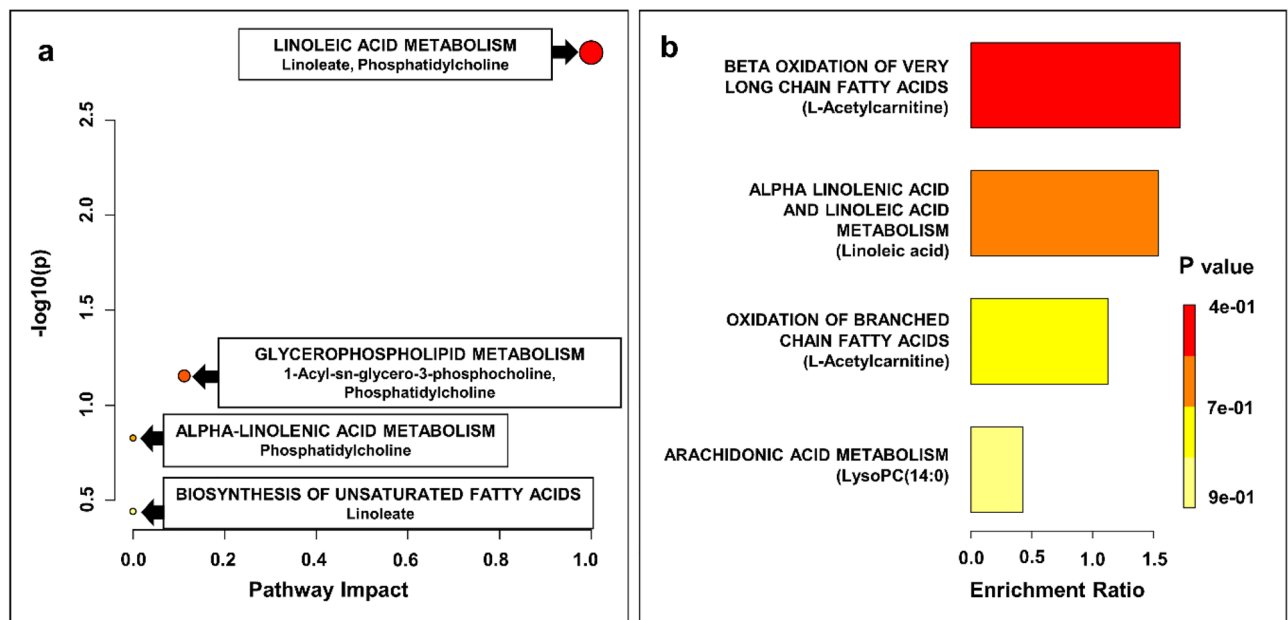


Figure 4. Results of pathway topology analysis of selected statistically significant metabolites in BC. A Pathway analysis based on KEGG (a); bubble area donating to the impact of each pathway with color representing the significance from highest in red to lowest in white; (b) Quantitative enrichment analysis based on SMPDB.

for their anti-tumor, antioxidant, anti-inflammatory and anti-fungal activity. Thymol and limonene have been shown to inhibit bladder cancer cell proliferation and induces these cells apoptosis^{46,47}.

We found that serum levels of metabolites: L-acetylcarnitine, linoleic acid and elaidic acid were higher and three others: valeric acid and 7-epi-jasmonic acid lower in BC patients compared to NCs. The levels of linoleic and elaidic acid were also found as significantly higher in patients with colorectal cancer⁴⁸. Increased serum activity of acetylcarnitine have been previously pointed out as a potential tumor biomarkers^{49,50}. Acetylcarnitine is a naturally occurring acetic acid ester of carnitine, important in mitochondrial tricarboxylic acid (TCA) cycle activity. Increased urine levels of this compound have previously been reported in patients with BC⁵¹. Elevation of acetylcarnitine may be an indication of decreased carbon flow into the TCA cycle or excess production of acetyl-CoA⁵². Previous studies revealed elevated urine level of acetylcarnitine and isovalerylcarnitine in BC patients compared to controls^{53,54}. However, the association between isovalerylcarnitine and bladder cancer has not yet been explained.

In order to apply the correct treatment regimens for BC patients, in addition to indicating the neoplasm, it is necessary to precisely and accurately indicate the stage and grade of this cancer. In total, 23 differential metabolites were identified as potential marker for discriminating between LG and HG BC patients and NCs. Among these metabolites, 18 metabolites were the common characteristic of both LG and HG BC patients. Three metabolites including lysoPC(20:3), PE(P-16:0e/0:0) and 2(4H)-benzofuranone, 6-Hydroxy-4,4,7a-trimethyl-5,6,7,7a-tetrahydrobenzofuran-2(4H)-one were identified in much higher level only in the serum of patients with HG BC, while four metabolites including 3-hexanone, diethylene glycol 2-ethylhexyl ether, elaidic acid, umbelliferone were found in significant higher level only in the serum of patients with LG BC patients.

In total, 38 differential metabolites were identified as potential marker for discriminating between pTa, pT1 and pT2 BC patients and NCs. Among these metabolites, 22 metabolites were the common to all three stages of BC. Two metabolites including Cys-Pro and curcumol were identified in much higher levels only in the serum of patients with pTa BC, while two metabolites including LysoPC(20:3) and alpha-hydroxyisobutyric acid were found in significant higher level only in the serum of patients with pT1 BC patients. Moreover, five metabolites including norcamphor, creatinine, dihydrojasnone, pro-leu, palmitoleoyl ethanolamide were found in significant higher level only in the serum of patients with pT2 BC patients.

We demonstrate that ultra-high-resolution mass spectrometry is a powerful tool for the characterization of the serum metabolome differences in BC. Twenty-seven potentially robust metabolic biomarkers were identified for 100 tumor serum samples from patients with BC patients after comparison against 100 healthy controls owing to the excellent predictive ability of AUC > 0.99. We also identified twenty-three metabolites that might be used as potential biomarkers to distinguish LG and HG and thirty-seven metabolites that may serve to differentiate between the pTa/pT1 and pT2 stages of BC. Our results suggest that differential serum metabolite profiles and can help identify patients with BC compared with NCs, with significant discriminating power between different stages and grades of bladder cancer. Our findings, may potentially provide facile and less invasive diagnostic methodology for detection of different stages and grades of bladder cancer and recurrent disease management. In the future, a new class of biomarkers of BC could contribute to development of non-invasive, highly specific and sensitive diagnostic tests that could be employed to aid the detection of new tumors and also predict recurrences.

Data availability

The data that support the findings of this study is available from the corresponding author upon reasonable request.

Received: 12 June 2022; Accepted: 31 August 2022

Published online: 07 September 2022

References

- Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 209–249 (2021).
- Robins, D. J. *et al.* Mp86-17 the 2017 American joint committee on cancer eighth edition cancer staging manual: changes in staging guidelines for cancers of the kidney, renal pelvis and ureter, bladder, and urethra. *J. Urol.* **197**, e1163 (2017).
- Troisi, J. *et al.* A serum metabolomic signature for the detection and grading of bladder cancer. *Appl. Sci.* **11**, 2835 (2021).
- Lee, H. H. & Ham, W. S. Perioperative immunotherapy in muscle-invasive bladder cancer. *Transl. Cancer Res.* **9**, 6546–6553 (2020).
- Yang, Q. *et al.* Metabolomics biotechnology, applications, and future trends: a systematic review. *RSC Adv.* **9**, 37245–37257 (2019).
- Raja, G., Jung, Y., Jung, S. H. & Kim, T. J. 1H-NMR-based metabolomics for cancer targeting and metabolic engineering—a review. *Process Biochem.* **99**, 112–122 (2020).
- Liu, X. *et al.* LC-MS-based plasma metabolomics and lipidomics analyses for differential diagnosis of bladder cancer and renal cell carcinoma. *Front. Oncol.* **10**, 717 (2020).
- Pan, Z. & Raftery, D. Comparing and combining NMR spectroscopy and mass spectrometry in metabolomics. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 525–527 (2007).
- Ng, K., Stenzl, A., Sharma, A. & Vasdev, N. Urinary biomarkers in bladder cancer: A review of the current landscape and future directions. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **39**, 41–51 (2021).
- Batista, R. *et al.* Biomarkers for bladder cancer diagnosis and surveillance: A comprehensive review. *Diagnostics* **10**, 39 (2020).
- Walsh, M. C., Brennan, L., Malthouse, P. G., Roche, H. M. & Gibney, M. J. Effect of acute dietary standardization on the urinary, plasma, and salivary metabolomic profiles of healthy humans 13. *Am. J. Clin. Nutr.* **84**, 531–539 (2006).
- Gupta, A. *et al.* NMR-derived targeted serum metabolic biomarkers appraisal of bladder cancer: A pre- and post-operative evaluation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **183**, 113134 (2020).
- Bansal, N. *et al.* Low- and high-grade bladder cancer determination via human serum-based metabolomics approach. *J. Proteome Res.* **12**, 5839–5850 (2013).
- Cao, M., Zhao, L., Chen, H., Xue, W. & Lin, D. NMR-based metabolomic analysis of human bladder cancer. *Anal. Sci.* **28**, 451–456 (2012).
- Amaral, C. S. *et al.* Serum metabolic profiling identified a distinct metabolic signature in bladder cancer smokers: A key metabolic enzyme associated with patient survival. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **28**, 770–781 (2019).
- Vantaku, V. *et al.* Large-scale profiling of serum metabolites in African American and European American patients with bladder cancer reveals metabolic pathways associated with patient survival. *Cancer* **125**, 921–932 (2019).
- Sahu, D., Lotan, Y., Wittmann, B., Neri, B. & Hansel, D. E. Metabolomics analysis reveals distinct profiles of nonmuscle-invasive and muscle-invasive bladder cancer. *Cancer Med.* **6**, 2106–2120 (2017).
- Tan, G. *et al.* Three serum metabolite signatures for diagnosing low-grade and high-grade bladder cancer. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
- Lin, L. *et al.* LC-MS based serum metabolomic analysis for renal cell carcinoma diagnosis, staging, and biomarker discovery. *J. Proteome Res.* **10**, 1396–1405 (2011).
- Zhou, Y. *et al.* The development of plasma pseudotargeted GC-MS metabolic profiling and its application in bladder cancer. *Anal. Bioanal. Chem.* **408**, 6741–6749 (2016).
- Lepara, Z. *et al.* Serum malondialdehyde (MDA) level as a potential biomarker of cancer progression for patients with bladder cancer. *Rom. J. Intern. Med.* **58**, 146–152 (2020).
- Lin, L. *et al.* LC-MS-based serum metabolic profiling for genitourinary cancer classification and cancer type-specific biomarker discovery. *Proteomics* **12**, 2238–2246 (2012).
- MassBank of North America. Available at: <https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>. Accessed: 8th June 2022
- Mass Spectrometry Data Center, NIST. *ass Spectral Library* Available at: <https://chemdata.nist.gov/>. Accessed 1st April 2022.
- Pang, Z. *et al.* MetaboAnalyst 50: Narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Res.* **49**, W388–W396 (2021).
- Ho, S. Y., Phua, K., Wong, L. & Bin Goh, W. W. Extensions of the external validation for checking learned model interpretability and generalizability. *Patterns* **1**, 100129 (2020).
- Okuda, S. *et al.* KEGG Atlas mapping for global analysis of metabolic pathways. *Nucleic Acids Res.* **36**, W423–W426 (2008).
- Han, J., Li, Q., Chen, Y. & Yang, Y. Recent metabolomics analysis in tumor metabolism reprogramming. *Front. Mol. Biosci.* **8**, 763902 (2021).
- Besiroglu, H. Lipid metabolism profiling and bladder cancer. *Metabolomics Open Access* **5**, 1–4 (2015).
- Wolrab, D., Jirásko, R., Chocholeušková, M., Peterka, O. & Holčápek, M. Oncolipidomics: Mass spectrometric quantitation of lipids in cancer research. *TrAC Trends Anal. Chem.* **120**, 10 (2019).
- Lu, Y. *et al.* Comparison of hepatic and serum lipid signatures in hepatocellular carcinoma patients leads to the discovery of diagnostic and prognostic biomarkers. *Oncotarget* **9**, 5032 (2018).
- Lee, G. B., Lee, J. C. & Moon, H. Plasma lipid profile comparison of five different cancers by nanoflow ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.02.021> (2019).
- Wang, X. *et al.* A novel human phosphatidylethanolamine-binding protein resists tumor necrosis factor α -induced apoptosis by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathway activation and phosphatidylethanolamine externalization*. *J. Biol. Chem.* **279**, 45855–45864 (2004).
- Wang, X. *et al.* Silencing of human phosphatidylethanolamine-binding protein 4 sensitizes breast cancer cells to tumor necrosis factor- α -induced apoptosis and cell growth arrest. *Clin. Cancer Res.* **11**, 7545–7553 (2005).
- Yao, Y. *et al.* Exogenous phosphatidylethanolamine induces apoptosis of human hepatoma HepG2 cells via the bcl-2/bax pathway. *World J. Gastroenterol.* **15**, 1751 (2009).
- Yagi, T. *et al.* Challenges and inconsistencies in using lysophosphatidic acid as a biomarker for ovarian cancer. *Cancers* **11**, 520 (2019).
- Ravipati, S., Baldwin, D. R., Barr, H. L., Fogarty, A. W. & Barrett, D. A. Plasma lipid biomarker signatures in squamous carcinoma and adenocarcinoma lung cancer patients. *Metabolomics* **11**, 1600–1611 (2015).
- Taylor, L. A., Arends, J., Hodina, A. K., Unger, C. & Massing, U. Plasma lyso-phosphatidylcholine concentration is decreased in cancer patients with weight loss and activated inflammatory status. *Lipids Health Dis.* **6**, 1–8 (2007).
- Li, J. *et al.* Distinct plasma lipids profiles of recurrent ovarian cancer by liquid chromatography-mass spectrometry. *Oncotarget* **8**, 46834 (2017).

40. Zhang, F. *et al.* The predictive and prognostic values of serum amino acid levels for clear cell renal cell carcinoma. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **35**, 392–400 (2017).
41. Tan, B. *et al.* Metabonomics identifies serum metabolite markers of colorectal cancer. *J. Proteome Res.* <https://doi.org/10.1021/pr400337b> (2013).
42. Shen, S. *et al.* A plasma lipidomics strategy reveals perturbed lipid metabolic pathways and potential lipid biomarkers of human colorectal cancer. *J. Chromatogr. B* **1068–1069**, 41–48 (2017).
43. Zhao, Z. *et al.* Plasma lysophosphatidylcholine levels: potential biomarkers for colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **25**, 2696–2701 (2007).
44. Cala, M. P. *et al.* Multiplatform plasma fingerprinting in cancer cachexia: a pilot observational and translational study. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **9**, 348–357 (2018).
45. Yao, Z. *et al.* Serum metabolic profiling and features of papillary thyroid carcinoma and nodular goiter. *Mol. Biosyst.* **7**, 2608–2614 (2011).
46. Li, Y. *et al.* Thymol inhibits bladder cancer cell proliferation via inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **491**, 530–536 (2017).
47. Ye, Z., Liang, Z., Mi, Q. & Guo, Y. Limonene terpenoid obstructs human bladder cancer cell (T24 cell line) growth by inducing cellular apoptosis, caspase activation, G2/M phase cell cycle arrest and stops cancer metastasis. *JBUON* **25**, 280–285 (2020).
48. Wang, X., Wang, J., Rao, B. & Deng, L. I. Gut flora profiling and fecal metabolite composition of colorectal cancer patients and healthy individuals. *Exp. Ther. Med.* **13**, 2848–2854 (2017).
49. Nizioł, J. *et al.* Metabolomic study of human tissue and urine in clear cell renal carcinoma by LC-HRMS and PLS-DA. *Anal. Bioanal. Chem.* **410**, 3859–3869 (2018).
50. Ganti, S. *et al.* Urinary acylcarnitines are altered in human kidney cancer. *Int. J. Cancer* **130**, 2791–2800 (2012).
51. Wittmann, B. M. *et al.* Bladder cancer biomarker discovery using global metabolomic profiling of urine. *PLoS ONE* **9**, e115870 (2014).
52. Schroeder, M. A. *et al.* The cycling of acetyl-coenzyme A through acetylcarnitine buffers cardiac substrate supply: A hyperpolarized ¹³C magnetic resonance study. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **5**, 201–209 (2012).
53. Jin, X. *et al.* Diagnosis of bladder cancer and prediction of survival by urinary metabolomics. *Oncotarget* **5**, 1635–1645 (2014).
54. Rodrigues, D. *et al.* Biomarkers in bladder cancer: A metabolomic approach using in vitro and ex vivo model systems. *Int. J. Cancer* **139**, 256–268 (2016).

Acknowledgements

Research was supported mainly by National Science Centre (Poland), research project SONATA Number UMO-2018/31/D/ST4/00109.

Author contributions

J.N.: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Resources, Data Curation, Writing—Original draft, Writing—Review & Editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition, K.O.: Investigation, Resources; Writing—Original draft; A.P.: Investigation; Data Curation; A.K.: Investigation, Data Curation; A.O.: Resources; T.O.: Resources; T.R.: Methodology, Resources, Data Curation, Writing—Review & Editing, Supervision.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19576-9>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.N.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022



Targeted and untargeted urinary metabolic profiling of bladder cancer

Krzysztof Ossoliński^a, Tomasz Ruman^b, Valérie Copié^c, Brian P. Triplet^c, Artur Kołodziej^d, Aneta Płaza-Altamer^d, Anna Ossolińska^a, Tadeusz Ossoliński^a, Anna Nieczaj^b, Joanna Nizioł^{b,*}

^a Department of Urology, John Paul II Hospital, Grunwaldzka 4 St., 36-100 Kolbuszowa, Poland

^b Rzeszów University of Technology, Faculty of Chemistry, 6 Powstańców Warszawy Ave., 35-959 Rzeszów, Poland

^c The Department of Chemistry and Biochemistry, Montana State University, Bozeman, MT 59717, United States

^d Doctoral School of Engineering and Technical Sciences at the Rzeszów University of Technology, 8 Powstańców Warszawy Ave., 35-959 Rzeszów, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Bladder cancer
Biomarker
Human urine
Metabolomics
NMR
Laser mass. spectrometry

ABSTRACT

Bladder cancer (BC) is frequent cancer affecting the urinary tract and is one of the most prevalent malignancies worldwide. No biomarkers that can be used for effective monitoring of therapeutic interventions for this cancer have been identified to date. This study investigated polar metabolite profiles in urine samples from 100 BC patients and 100 normal controls (NCs) using nuclear magnetic resonance (NMR) and two methods of high-resolution nanoparticle-based laser desorption/ionization mass spectrometry (LDI-MS). Five urine metabolites were identified and quantified using NMR spectroscopy to be potential indicators of bladder cancer. Twenty-five LDI-MS-detected compounds, predominantly peptides and lipids, distinguished urine samples from BC and NCs individuals. Level changes of three characteristic urine metabolites enabled BC tumor grades to be distinguished, and ten metabolites were reported to correlate with tumor stages. Receiver-Operating Characteristics analysis showed high predictive power for all three types of metabolomics data, with the area under the curve (AUC) values greater than 0.87. These findings suggest that metabolite markers identified in this study may be useful for the non-invasive detection and monitoring of bladder cancer stages and grades.

1. Introduction

Over the past decades, cancer mortality has been increasing. According to GLOBOCAN 2020, the number of new cancer cases diagnosed in 2020 will be 19.3 million, with over 10.0 million dying as a result of cancer [1]. Bladder cancer (BC) remains one of the most common types of cancer worldwide, and the most common malignancy of the urinary tract [1]. The scale of the problem is so high that, in 2020, nearly 200,000 people died of bladder cancer and three times more suffered from the disease [1]. This type of cancer is also more common in men. To date, data indicate that BC in females are 70% less frequent than in males, and among male and female BC patients, the mortality rate is reduced by one-third in females compared to males [2]. The increasing incidence and high mortality rate due to bladder cancer is a significant burden on health systems worldwide [3].

Another challenge is the high frequency of disease recurrence and recurrent progression following transurethral resection. This challenge is compounded by the high costs of cystoscopy examinations which are needed for early detection and to monitor BC patients following cancer

treatment. Moreover, early detection of the disease depends significantly on the knowledge and experience of the pathologist, especially in the case of early stages of BC, which may not be readily apparent in cystoscopic examination [4]. Early detection has another advantage, as it reduces health care costs compared to the costs of treating BC patients in the advanced stages of the disease.

Currently, the primary methods to detect BC include urine cytology, cystoscopy, biopsy, and computed tomography, all displaying low sensitivity for cancer detection. Based on worldwide reports, the most common symptoms of BC involve hematuria, pain and burning, painful frequent urination, feeling of an incompletely empty bladder. Cystoscopy is the most common detection method for patients suffering from these conditions. Given the invasive character of these procedures, there exists a strong need for less aggressive and more quantitative approaches to detect, diagnose, and monitor disease progression of bladder cancer [5].

Fortunately, research activities aimed at identifying new biomarkers of BC have increased recently [6]. The Food and Drugs Administration has approved a few biomarker kits for disease detection so far, which

* Corresponding author.

E-mail address: jnizioł@prz.edu.pl (J. Nizioł).

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115473>

Received 24 April 2023; Received in revised form 18 May 2023; Accepted 20 May 2023

Available online 22 May 2023

0731-7085/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

consist mainly of protein detection [7]. Regrettably, due to the high costs of identifying these markers in new patients and the relatively low predictable power for BC, none of these approved kits have been employed for general use, despite the fact that some of them are used to monitor the recurrence of bladder cancer, including the UroVysion bladder cancer kit. The problem is compounded by the fact that many of procedures needed to identify these protein markers are cumbersome and difficult to use in the clinic [8]. In addition, identification and quantification of these recently approved BC protein markers require sophisticated instrumentation which is not readily available to most clinicians. Due to growing knowledge in the field of oncology, many studies have focused on biomarker discovery to facilitate the diagnosis, screening, and follow-up of communities susceptible to bladder cancer [4].

Metabolomics is part of the field of systems biology, which aims to characterize metabolic changes at a global level, and to inform on metabolome changes, i.e., small molecule profiles, of complex organisms underlying their cellular phenotypes [9]. Metabolomics studies on human subjects focus primarily of metabolites measured in body fluids or extracted from cells or tissues. The development and progression of many types of cancer is reflected in changes of the metabolomes analyzed from human biospecimens, including urine and serum [10]. In cases of BC, the most useful analyses may be from the analysis of urine. Although urine metabolomics may be influenced by dilution, it is more readily available and non-invasive than serum or tissue analysis. [11]. In recent years, numerous comprehensive reviews have been published that provide detailed information on the various metabolomics approaches utilized for the detection and identification of biomarkers in bladder cancer [12–15]. However, none of the identified biomarkers to date can ensure 100% detection of cancer at an early stage, and their high detection characteristics come with a substantial cost that global health services cannot afford. Nonetheless, scientists should continue researching new biomarkers to increase the proportion of early bladder cancer detection cases.

Most metabolomics studies of BC patient urine samples have used non-targeted approaches including gas chromatography (GC)- or liquid chromatography (LC)- coupled MS [16–19]. Only few of these studies have used NMR [20,21] approaches.

In 2010, one of the initial reports on metabolomic profiling of urine from patients with BC using NMR was published [20]. The research included samples from 33 non-muscle invasive BC patients, 31 individuals with benign conditions such as urinary tract infection, 2 with bladder stones, and 37 healthy individuals. The study identified five metabolites including citrate, dimethylamine, phenylalanine, taurine and hippurate that specifically reflected biochemical changes in cancer cell metabolism. The findings suggested that NMR-based urine analysis had the potential to serve as a non-invasive early detection test for a range of pathological conditions, including BC. Another NMR-based study was published in 2019 that focused on urine and tissue profiling. [21]. The study analyzed urine samples collected from 35 patients before and after transurethral resection. The results showed a correlation between taurine and other amino acid metabolic pathways perturbed in bladder cancer tissue samples and those observed in the urine samples.

There are many publications in the literature regarding the untargeted analysis of urine extracts using mass spectrometry to identify potential small-molecule biomarkers for early detection of BC [16, 22–24]. However, to date, only two papers have been published that include a large group of more than one-hundred patients and have undergone external validation [18,25]. Additionally, there is a limited number of reports on the analysis of urine from patients with BC, taking into account the division into different stages and grades of cancer, as well as gender and age [26,27].

To the best of our knowledge, there are currently no published metabolomics studies that have employed both NMR and laser desorption/ionization mass spectrometry (LDI-MS) to analyze the metabolite

profiles of urine samples of BC patients. NMR provides information about the molecular structure of metabolites and can identify a wide range of metabolites with high accuracy and reproducibility with easy and reliable quantification. On the other hand, LDI-MS provides complementary information to NMR as it is much more sensitive and can detect a wider range of metabolites. In addition, the use of silver nanoparticles (AgNPs) in laser desorption/ionization mass spectrometry (LDI-MS) has been reported to enhance the detection of lipids. AgNPs can interact with the lipid molecules in the sample, increasing their ionization efficiency and sensitivity. By combining these two techniques, the study can obtain a more comprehensive view of the metabolite profile of BC patients' urine samples. This can provide a more accurate and detailed understanding of the metabolic changes associated with BC, which can lead to the development of more specific and sensitive biomarkers for early detection, diagnosis, and treatment of BC [28,29].

Herein, we report results from targeted and non-targeted metabolomics analyses of 199 urine samples acquired from 99 patients diagnosed with BC and 100 healthy controls. This study successfully identified specific alterations in the urine metabolomes of BC patients compared to those of control individuals. In addition, metabolite profile changes were found to be informative reporters of the stage and grade of bladder cancer. This study was conducted using high-resolution ^1H NMR and two laser desorption/ionization mass spectrometry (LDI-MS) techniques, and resulting data were validated using both multivariate and univariate statistical analyses.

2. Materials and methods

2.1. Materials and equipment

All solvents were of high quality 'LC-MS' grade and purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Deuterium oxide (D_2O) and DSS (4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid) were purchased from Sigma Inc. (Boston, MA, USA).

2.2. Collection of human urine samples

Urine samples were collected from BC patients and normal controls at Kolbuszowa's John Paul II Hospital (Poland). NMR and MS metabolite profile datasets collected on cancer and control urine samples were each randomly divided into two groups for analysis. The two groups consisted of a training set which included 70% of the data (either NMR or MS), and a validation set which included the remaining 30% of the data. Following detailed clinical questioning and laboratory testing, all patients underwent transurethral resection of bladder tumor (TURBT). The study was approved by the local Bioethics Committee (permission no. 2018/04/10). A little more than half of the patients ($n = 54$) displayed low-grade bladder cancer and papillary urothelial neoplasm of low malignant potential (PUNLMP) ($n = 3$), while the remaining patients ($n = 41$) had high-grade disease. Both high- and low-grade neoplasms were found in two cases. Most of these patients ($n = 69$) had noninvasive papillary carcinomas (pathologic stage Ta, pTa), 19 had submucosal invasive tumors (pathologic stage T1, pT1), and 12 had muscle invasive bladder cancer (pathologic stage T2, pT2). The average age of diagnosed BC patients was 74 ± 10 years, while the average age of NCs was 64 ± 12 . Each participant provided 10 ml of urine which was stored at -60°C until further use. The sample collection period extended from October 2020 to November 2021. Subsequently, in December 2021, NMR and MS measurements were performed on the collected urine samples. [Table 1](#) and [table S1](#) in [supplementary data](#) provides an overview of the clinical characteristics of the patients included in the study.

2.3. Analysis of tissue samples

Urine extracts were analyzed using high-resolution ^1H NMR and gold

Table 1
Participant characteristics.

	BC		Control	
	Training	Validation	Training	Validation
Number				
General	69	30	70	30
Male	54	26	46	24
Female	15	4	24	6
Age (mean/SD)	71(9)	74(11)	60(14)	62(12)
Grade^a				
High grade	30	11	-	-
Low grade	34	19	-	-
LG (70%) and HG (30%)	1	-	-	-
LG (85%) and HG (15%)	1	-	-	-
PUNLMP	3	-	-	-
Stage				
pT1	13	6	-	-
pT2	9	3	-	-
pTa	47	21	-	-
Type of surgery				
TURBT	68	29	-	-
Cystectomy	1	1	-	-
Tumor origin				
Primary	41	15	-	-
Recurrent	28	15	-	-
Hematuria				
At diagnosis	68	30	-	-
At sampling	44	26	-	-
Tumor size				
< 1	7	0	-	-
2-3	27	18	-	-
> 3	14	7	-	-
Multifocal/flat	11/2	5/0	-	-
Multifocality				
0	1	0	-	-
1	47	21	-	-
2-3	8	3	-	-
> 3	13	7	-	-
Previous treatment				
BCG	10	4	-	-
Tumor histology				
Papillary	67	29	-	-
Concomitant CIS	1	0	-	-
Solid, non-papillary	1	1	-	-
Tobacco smoking				
Non smoking	47	25	-	-
Currently smoking	12	2	-	-
Previous smoking	9	3	-	-

^a Tumors were classified according World Health Organization (WHO)/International Society of Urological Pathology (ISUP) classification criteria; BC – bladder cancer; LG – low-grade; HG – high-grade; PUNLMP – papillary urothelial neoplasm of low malignant potential; pT1 and pTa – high risk non-muscle invasive bladder cancer; pT2 – muscle invasive bladder cancer; pT- the stage has been based on pathological or microscopic findings; SD: standard deviation.

and silver-109 nanoparticle-based laser desorption/ionization mass spectrometry (AuNPs- and ¹⁰⁹AgNPs-LDI-MS). Gold and silver-109 nanoparticles (AuNPs and ¹⁰⁹AgNPs) were generated with pulsed fiber laser (PFL) 2D galvoscaner (2D GS) laser synthesis in solution/suspension (LASiS) as described in our previous publication [30]. [Supplementary data](#) detail the acquisition and processing of NMR and MS spectra (S1-S4).

2.4. Preparation of urine metabolite extracts for ¹H NMR metabolomics

As stated in our recent publication (and detailed in the [Supplementary data](#)), metabolites whose polarity ranged from medium-to-high were analyzed from urine samples ([Supplementary data](#), section S1) [31–33].

2.5. Preparation of urine samples for LDI-MS studies

Thawed urine samples were diluted in methanol 500 times (v/v).

After that, 0.3 µl volumes were directly placed on target plates: ¹⁰⁹Ag and Au PFL-2D GS LASiS [30]. Following solvent evaporation in air, the Autoflex Speed apparatus was used to measure the plates containing the samples.

2.6. Data processing and spectral acquisition

A comprehensive explanation of the acquisition and processing of NMR and MS spectra can be found in the [supplementary material](#), specifically in sections S2 to S4.

2.7. Multivariate statistical analysis

MetaboAnalyst version 5.0 online software was used to analyze all metabolite datasets [34]. The statistical multivariate analysis used here is similar to the one described in our recent publications [27,32,35]. Briefly the metabolite data obtained from each analytical technique was log-transformed and auto-scaled. The resulting metabolite profiles were then subjected to unsupervised Principal Component Analysis (PCA) and Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA). To identify metabolites that differentiated between the groups, we utilized a comprehensive approach. Specifically, we applied (i) variable importance in projection (VIP) from OPLS-DA model (VIP > 1.0), (ii) two-sample t-tests & Wilcoxon Rank-Sum Tests with Mann-Whitney and Bonferroni correction (FDR < 0.05, p-values < 0.05), (iii) fold change (FC) analysis (FC > 2.0 or < 0.5), and (iv) area under the curve (AUC) receiver operating characteristics (ROC) analysis with random forest modeling (AUC > 0.7). Subsequently, we validated the potential biomarkers meeting these criteria in an independent cohort (validation set) to confirm their reproducibility. In the validation set, we used the same statistical criteria as in the training set to test for significance. Importantly, the potential biomarkers that were significant in the training set were also significant in the validation set, confirming their reproducibility. To test the robustness and avoid overfitting of the OPLS-DA model we performed random permutation analysis with 2000 repeats and 7-fold cross-validation. The overall performance of the OPLS-DA model was assessed by evaluating the goodness of fit (R²Y) and the predictive ability of the model (Q²). A metabolic pathway impact analysis was performed using MetaboAnalyst version 5.0 [34] and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [36] to identify metabolic pathways that are in all likelihood impacted by bladder cancer. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare differences between different stages and grades of BC, with Tukey's post-hoc testing used if the ANOVA revealed significant differences. MS and NMR data were analyzed using the same statistical method.

3. Results

In this work, the urine metabolite profiles of BC patients were examined to identify urine-specific metabolic indicators of BC. The study involved 100 patients diagnosed with BC and 100 patients in whom urinary tract cancers were excluded. However, data from 99 urine samples from BC patients were used for the statistical analysis of the NMR results. For one sample, readable NMR spectra could not be obtained. With the much more sensitive laser desorption/ionization mass spectrometry (LDI-MS), this was no longer a problem and data from all 100 BC samples were included in the statistical analysis. In this case 400 of LDI-MS spectra were collected using ¹⁰⁹Ag and Au PFL-2D GS LASiS targets.

3.1. Differentiation between BC and control urine based on ¹H NMR data

Urine metabolites from patients with BC (99 samples) and controls (100 samples) were analyzed using high-resolution 1D ¹H NMR. Altogether, 39 metabolites were identified and quantified in each urine sample following published protocols [31]. [Fig. 1](#) depicts an overlay of

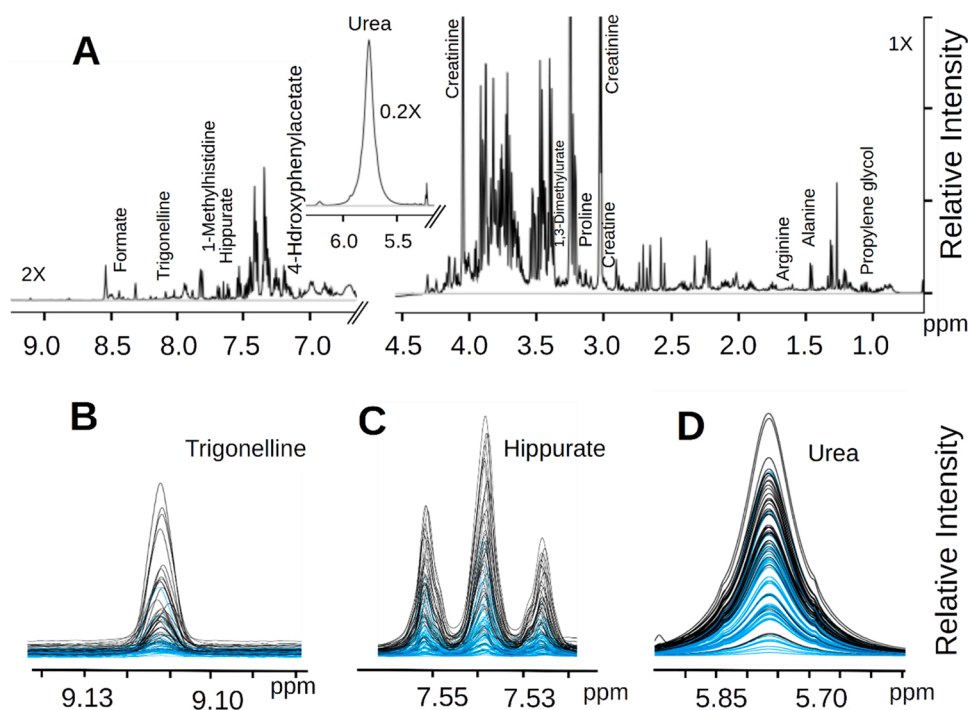


Fig. 1. $1D$ 1H NMR spectra of Human Urine Metabolite Mixtures. (A) Representative $1D$ 1H NMR spectrum of urine metabolites obtained from a bladder cancer (BC) patient and recorded on a 600 MHz (14 Tesla) solution NMR spectrometer. The NMR signals of metabolites whose levels differ significantly and separate the BC patient group from the healthy (normal) control group in PLS-DA scores plots (i.e., VIP scores > 1) are labeled. Overlays of the $1D$ 1H NMR spectra from BC patient urine samples (blue) and control urine samples (black) are shown in (B) for the chemical shift region 9.15–9.07 ppm, which includes the NMR signals of trigonelline, (C) for the chemical shift region 7.57–7.51 ppm corresponding to hippurate, and (D) for the chemical shift region 5.95–5.55 ppm corresponding to urea. The intensity-normalized spectral overlays clearly indicate that the concentrations of these metabolites are lower in the urine metabolite profiles of BC patients compared to healthy controls.

NMR spectra of controls and cancer samples. Detailed analysis of the NMR spectra revealed significant differences in metabolite levels between BC and NCs urine samples.

NMR datasets were randomly divided into two subsets: a training data set to train a model ($n = 69$ BC and $n = 70$ NCs) and a validation data set to assess the validity and robustness of the learned model

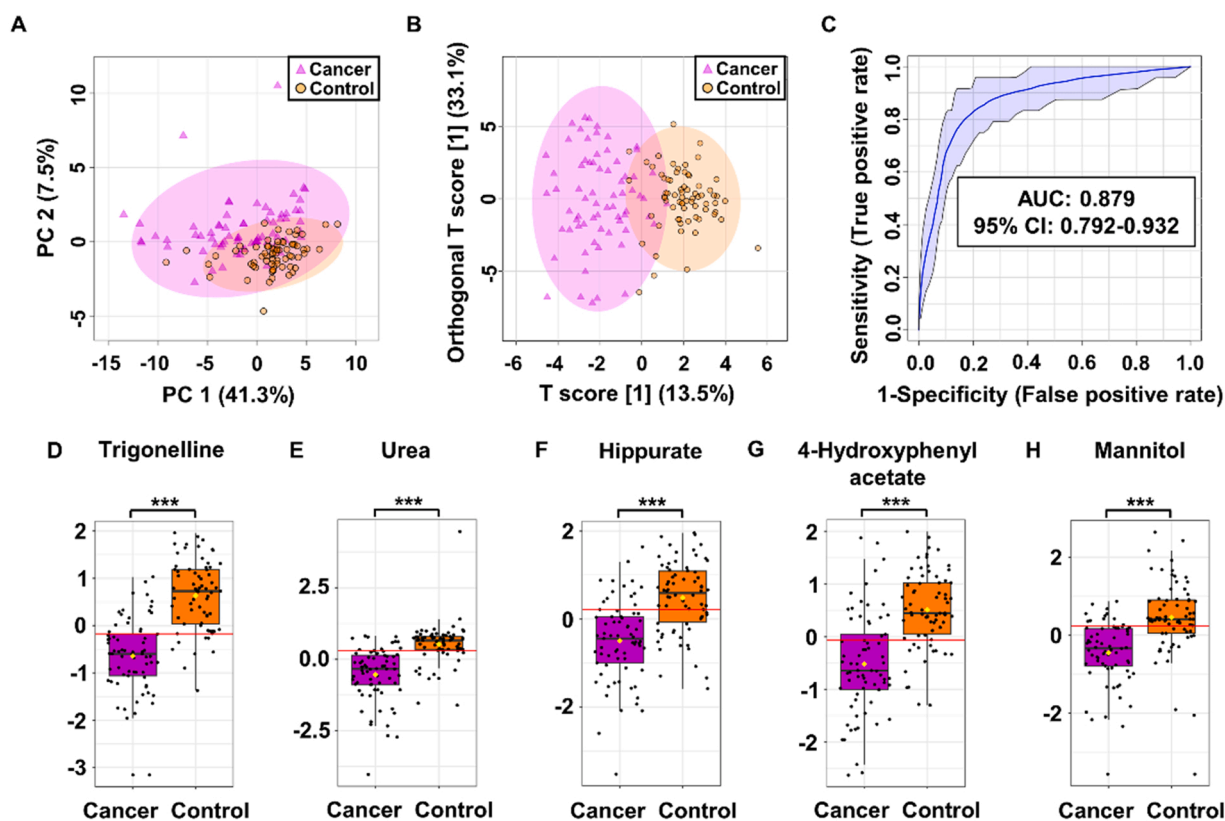


Fig. 2. Cancer and control urine metabolite profiles obtained from 1H NMR data distinguish BC and NCs samples in the training set. (A,B) The tumor (violet) and control (orange) urine samples were evaluated using (A) 2D PCA, and (B) OPLS-DA scores. (C) ROC curves of five distinct metabolites: trigonelline, hippurate, urea, mannitol and 4-hydroxyphenylacetate. (D–H) Box-whisker plots of selected metabolites levels in urine samples from NCs and BCs. AUC: area under the curve; PC: primary component; ROC: the receiver operator characteristic.

(n = 30 BC and n = 30 NCs). Metabolite concentrations from both groups were statistically analyzed to assess whether differences in metabolite levels between the patient and control groups were significant. Findings from this analysis are reported in [Supplementary data Tables S2 and S3](#). 2D PCA score plots from both subsets of data revealed a clear distinction between BC and NC patient groups. In the training set, the best group separation was observed along principal components 1 and 2 (i.e., PC1 and PC2), which accounted for 41.3% and 7.5% of the variance, respectively ([Fig. 2 A](#)). Separation of cancer and control urine samples was also observed in validation set, with PC1 and PC2 accounting for 44.6% and 6.5% of the variance, respectively ([Fig. S1A](#)). [Fig. 2B](#) and [S1B](#) ([Supplementary data](#)) show the corresponding 3D PCA plots for the training and validation sets, respectively. Next, a supervised OPLS-DA analysis was performed to investigate the extent of the metabolic differences between the BC and NC groups in both the training ([Fig. 2 C](#)) and validation ([Fig. S1C](#)) data sets. Resulting score plots indicated significant separate clustering of the two groups in the OPLS-DA modeling conducted using both the training and validation data sets. To evaluate the statistical robustness of the OPLS-DA modeling, two thousand permutation tests were performed ([Fig. S2](#)). In the training set, good discrimination was detected between the two groups ($Q^2 = 0.633$, $R^2Y = 0.728$, P-value $5E-04$ ($0/2000$)), revealing substantial differences in the metabolic profiles of BC versus NC urine samples ([Fig. S2A](#), [Supplementary data](#)). The permutation test validated that the group separations observed in the OPLS-DA modeling of the validation NMR metabolite dataset is not overfit ($Q^2 = 0.412$, $R^2Y = 0.603$, P-value $5E-04$ ($0/2000$)) ([Fig. S2 C](#), [Supplementary data](#)).

Area under the curve AUROC analysis was performed on both the training and validation data sets to assess the diagnostic performance of

the OPLS-DA models, together with the examination of VIP plots resulting from the OPLS-DA modeling. These analyses were used to identify potential urine metabolite biomarkers of bladder cancer. Next, to examine the statistical significance of metabolite level differences, the paired parametric t-test with Mann-Whitney and Bonferroni correction was utilized. Fifteen urine metabolites were found to be significant discriminators of BC versus NC, and were identified from a combined analysis of VIP scores (> 1.0), t-tests (FDR corrected p-values < 0.05), and area under the curve ROC analysis ($AUC > 0.7$) of training set metabolite data ([Table 2](#), [Supplementary data](#)). In turn, sixteen metabolites were deemed significant from a similar analysis of the validation data set ([Supplementary data](#), [Table S2](#)). In both the training and validation sets, these analyses revealed twelve metabolites that were consistently found to be significant discriminators of the BC versus NC groups. Finally, 5 metabolites were identified as being statistically significant based on fold change ratios greater than 2 or less than 0.5. These included trigonelline, hippurate, urea, mannitol and 4-hydroxyphenylacetate. The diagnostic value of these five identified metabolites was evaluated using receiver operating characteristic curve (ROC) analyses and random forest modeling. The classification ROC model, ([Fig. 2E](#) and [Supplementary data Fig. S1E](#)) indicated that including these five metabolites was a good discriminator ($AUC > 0.828$) of the two groups in both data sets. The ROC model was validated (See [Supplementary data Fig. S3](#)) and a permutation test using 1000 permutation steps provided a p-value of 0.009, supporting the validity of the ROC analysis. The best ROC analyses with the highest significance ($AUC > 0.8$) were obtained in the training set for trigonelline ($AUC = 0.887$, specificity = 75%, and sensitivity = 80%), urea ($AUC = 0.858$, specificity = 86, and sensitivity = 80), mannitol ($AUC = 0.806$, specificity = 84, and sensitivity = 69)

Table 2

Results of targeted quantitative study of potential BC biomarkers derived from 1H NMR data of urine samples (P-value 0.05; VIP > 1.0 ; AUC > 0.70 , FC > 2.0 or < 0.5).

Comparison mode	Metabolite	VIP ^a	P-value ^b	FDR ^b	FC ^c	AUC	Spec. [%] ^d	Sens. [%] ^d
BC vs. NCs	4-Hydroxyphenylacetate	1.57	5.32E-10	5.45E-09	0.485	0.805	72	80
	Hippurate	1.59	4.03E-09	2.75E-08	0.360	0.789	81	67
	Mannitol	1.46	4.53E-10	5.45E-09	0.238	0.807	84	69
	Trigonelline	2.09	3.28E-15	1.34E-13	0.196	0.887	75	89
HG BC vs. NCs	Urea	1.62	3.41E-13	6.98E-12	0.390	0.858	86	80
	Trigonelline	1.88	6.74E-10	2.76E-08	0.179	0.897	81	79
	Hippurate	1.37	1.46E-05	5.43E-05	0.342	0.779	67	76
	Mannitol	1.29	1.10E-06	9.05E-06	0.222	0.813	80	72
LG BC vs. NCs	Trigonelline	1.94	6.53E-10	2.68E-08	0.226	0.869	88	75
	Hippurate	1.55	2.58E-06	1.76E-05	0.400	0.781	71	81
	Mannitol	1.41	1.21E-06	1.24E-05	0.254	0.790	68	83
	Trigonelline	1.98	9.37E-12	3.84E-10	0.234	0.872	88	77
pTa BC vs. NCs	4-Hydroxyphenylacetate	1.56	8.79E-08	8.02E-07	0.499	0.792	80	71
	Hippurate	1.56	2.76E-07	1.61E-06	0.395	0.780	68	81
	Mannitol	1.45	9.74E-09	1.33E-07	0.228	0.813	68	85
	1-Methylhistidine	1.41	9.79E-08	8.02E-07	0.494	0.791	71	79
pT1 BC vs. NCs	Creatine	1.28	1.07E-06	4.37E-06	0.476	0.766	75	73
	Trigonelline	1.85	7.61E-09	3.12E-07	0.130	0.920	91	84
	1,3-Dimethylurate	1.66	1.08E-07	2.22E-06	0.210	0.886	81	90
	Urea	1.59	2.09E-07	2.86E-06	0.455	0.877	82	79
	Hippurate	1.52	1.81E-06	1.48E-05	0.248	0.847	79	79
	4-Hydroxyphenylacetate	1.43	1.74E-06	1.48E-05	0.368	0.847	80	79
	Glycine	1.31	0.0002	0.0007	0.461	0.775	81	74
	Citrate	1.30	1.97E-05	0.0001	0.436	0.810	88	68
	Acetate	1.25	0.0003	0.0008	4.930	0.762	71	74
	Formate	1.24	0.0002	0.0007	0.499	0.768	75	74
	Mannitol	1.15	2.21E-05	0.0001	0.209	0.808	79	68
	Urea	2.21	2.53E-05	0.0008	0.454	0.874	87	83
pT2 BC vs. NCs	1-Methylhistidine	2.11	0.0012	0.0097	0.420	0.788	71	75
	Creatinine	1.82	0.0019	0.0132	0.497	0.775	90	67
	Trigonelline	1.77	3.92E-05	0.0008	0.201	0.865	76	83
	Hippurate	1.50	0.0009	0.0093	0.323	0.795	80	67
	Creatine	1.32	0.0065	0.0297	0.469	0.742	89	58
	Mannitol	1.23	0.0009	0.0093	0.215	0.795	82	67

^a VIP scores derived from OPLS-DA model; ^bP-value and FDR determined from Student's t-test; ^cfold change between cancer and control urine calculated from the concentration mean values for each group – cancer-to-normal ratio; ^dROC curve analysis for individual biomarkers. AUC: area under the curve; FC: fold change; FDR: false discovery rate; NCs: normal controls; pT1 and pTa – high risk non-muscle invasive bladder cancer; pT2 – muscle invasive bladder cancer; Sens.: sensitivity; Spec.: specificity; VIP: variable importance in projection scores.

and 4-hydroxyphenylacetate (AUC = 0.805, specificity = 72, and sensitivity = 80). Fig. 2D-H present the box-whisker plots for all five selected metabolites whose levels differed significantly in the urine samples of BC versus NC individuals. Table 2 reports the statistical parameters for these 5 metabolites identified by ^1H NMR as potential biomarkers of BC. These results indicate that, when considered together, these five metabolites have increased diagnostic potential and may be useful discriminators of malignant versus healthy phenotypes for individuals with bladder cancer.

3.2. Differentiation between grades of BC and control urine based on ^1H NMR metabolite profiles

PCA, non-parametric OPLS-DA, and one-way ANOVA analyses were performed on training and validation data sets to investigate whether ^1H

NMR metabolite profiles of urine extracts could differentiate between bladder cancer tumor grades and controls. The BC grade analysis included 95 urine samples from patients with high-grade (HG) and low-grade (LG) cancer, with three samples from papillary urothelial neoplasm of low malignant potential (PUNLMP) patients excluded. NMR datasets were divided like previously into two subsets: a training data set to train a model ($n = 29$ HG, $n = 36$ LG, and $n = 69$ NCs) and a validation data set to assess the validity and robustness of the learned model ($n = 11$ HG, $n = 18$ LG and $n = 30$ NCs). In both the training and validation sets, PCA and OPLS-DA scores plots indicated a good separation between control and cancer groups with different grades of tumors (LG vs. NCs and HG vs. NCs) (Fig. 2). However, in the PCA scores plot, the difference between the LG and HG BC patients was marginal (data not shown). In the LG BC vs. NCs OPLS-DA model, 3 metabolites were considered significant ($\text{VIP} > 1$, P -value, $\text{FDR} < 0.05$, $\text{FC} < 0.5$ or > 2.0 ,

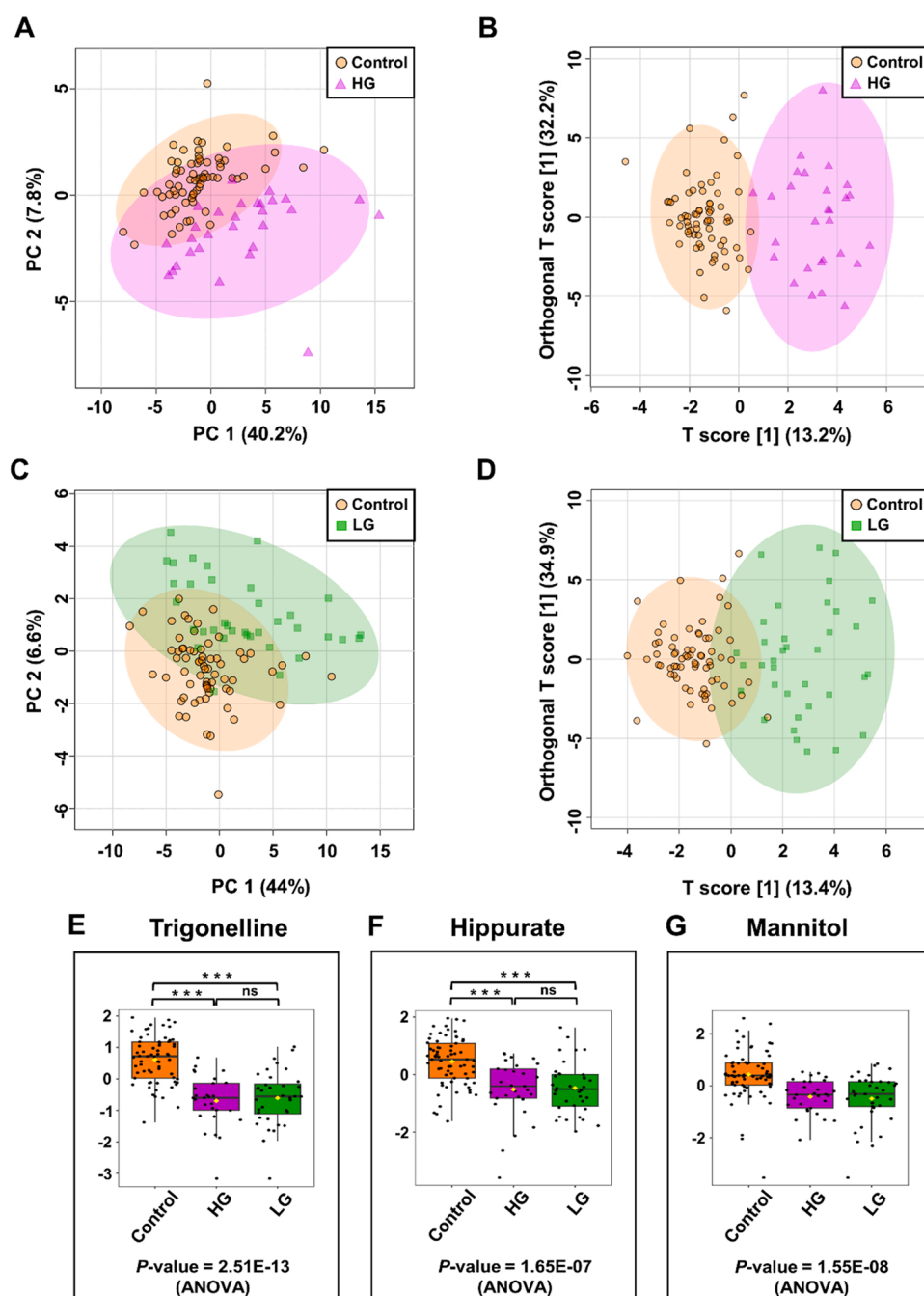


Fig. 3. Analysis of the urine metabolite profiles obtained from the ^1H NMR training dataset and assessment of whether metabolite differences can be used to differentiate between various grades of bladder cancer and control samples. (A) PCA and (B) OPLS-DA score plots of HG BC (violet) and control (orange) urine samples. (C) PCA and (D) OPLS-DA score plots of LG BC (green) and control (orange) urine samples. (E - G) The box-and-whisker plots of selected metabolites were observed in the control, HG, and LG BC urine samples. HG: high-grade; LG: low-grade; PC: primary component.

AUC > 0.7) including trigonelline, hippurate, mannitol, for both the training set and the validation set (Table 2). All three metabolites were found in higher concentrations in the urines of NCs group compared to the BC patients. Analysis of HG BC vs. NCs in the training and validation sets of the OPLS-DA model indicated that these three metabolites were significant to separating the HG BC from the NC group (Table 2). Fig. 3 displays PCA and OPLS-DA scores plots resulting from this analysis, and illustrates the extent of the separation of HG, LG, from NCs, resulting from the differential urine metabolite profiles in the training and in validation datasets. Although unsupervised PCA analysis did not clearly separate the groups based on distinct tumor grades, the cancer groups separated clearly from the NC group.

3.3. Differentiation between stages of BC and control based on ^1H NMR metabolite profile analyses of patient and control urine samples

To differentiate between the various stages of bladder cancer, the complete metabolite concentration dataset obtained from the NMR studies and measured in the urine samples of patients with different stages of BC and normal controls was subjected to PCA, OPLS-DA, and non-parametric one-way ANOVA analyses. The complete set of metabolite profiles was used to evaluate whether differences in metabolite concentrations could be used to separate urine samples based on distinct BC tumor stages. 87 patients with non-muscle invasive bladder cancer (pTa and pT1) and 12 patients with muscle invasive bladder cancer (pT2) provided urine samples that were used in this analysis. A training data set was created with $n = 48$ pTa and $n = 69$ NCs. A validation data

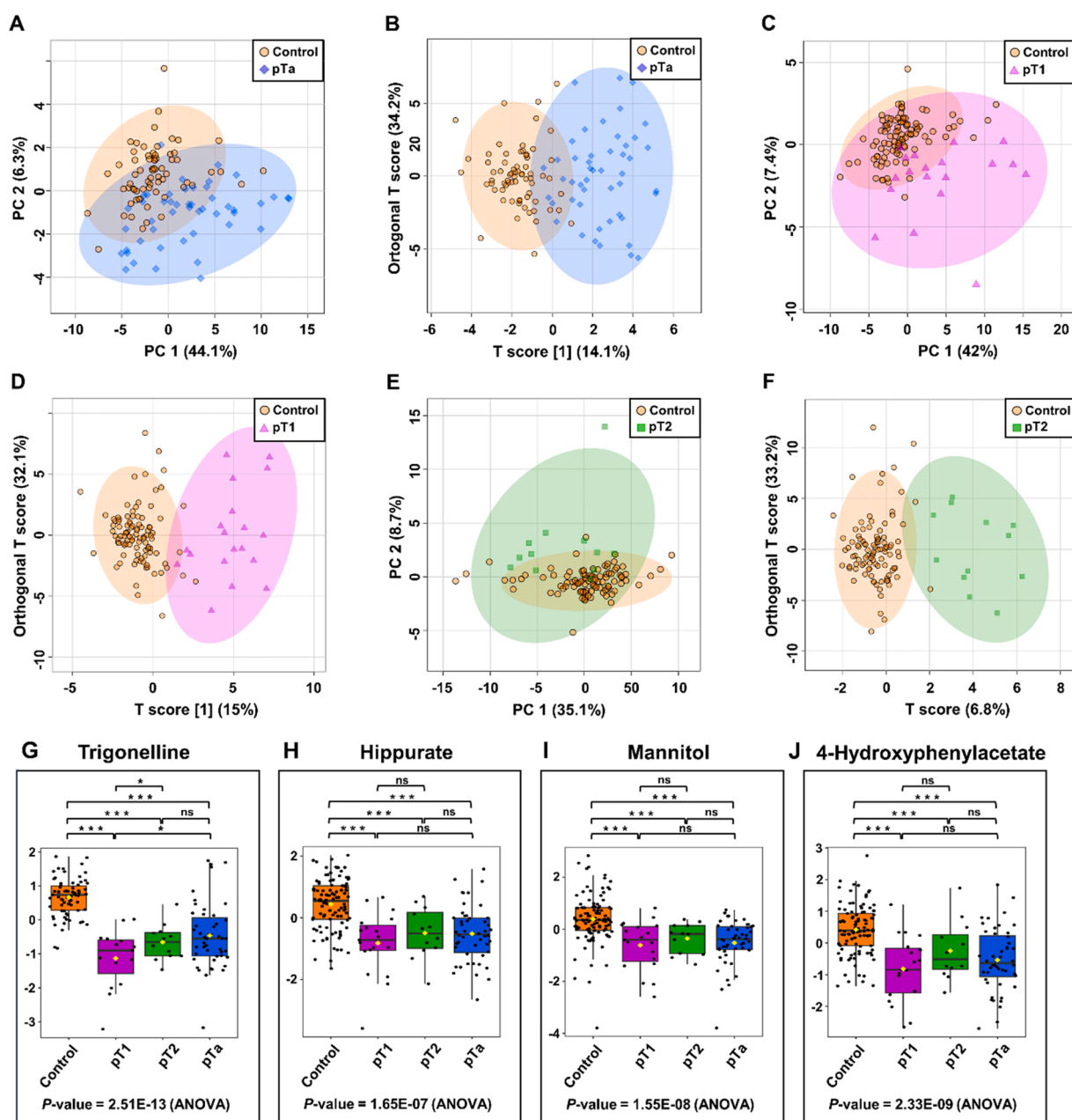


Fig. 4. Analysis of training set urine metabolite profiles obtained from ^1H NMR to evaluate whether distinct metabolite patterns separate urine sample groups based on distinct stages of bladder cancer and control. (A) PCA and (B) OPLS-DA score plots of pTa BC (blue) and control (orange) urine samples. (C) PCA and (D) OPLS-DA score plots of pT1 BC (violet) and control (orange) urine samples. (E) PCA and (F) OPLS-DA score plots of pT2 BC (green) and control (orange) urine samples. (G - J) The box-and-whisker plots of selected metabolites were observed in control, pTa, pT1, and pT2 BC urine samples.

set with $n = 20$ pTa, and $n = 30$ NCs was then used to evaluate the validity and robustness of the trained model. Due to the limited number of samples, analysis of the pT1 and pT2 stage of BC was performed without dividing it into two sets (70 NCs, 12 patients with pT2 and 34 with pT1). The PCA and OPLS-DA score plots indicated a good separation between NCs and the various stages of BC (pTa vs. NCs, pT1 vs. NCs, and pT2 vs. NCs, Fig. 4). The performance of three models to differentiate between pTa, pT1, and pT2 bladder cancer stages and NCs was then evaluated using ROC curve analysis. Based on the cut-off criteria ($FC > 2$ or < 0.5 , $VIP > 1$; $AUC > 0.7$, P -value and $FDR < 0.05$), 6, 10, and 7 metabolites were found to be most significant for sample distinction between pTa BC vs. NCs, pT1 BC vs. NCs, and pT2 BC vs. NCs, respectively (Table 2). However, the urine metabolomes could not themselves distinguish between the three cancer stage groups (pT1 versus pTa versus pT2), as no metabolite pattern differences were found to be statistically significant (Fig. 4G–4 J).

3.4. Untargeted metabolic profiling of urine with PFL-2D GS LASiS AuNPs and $^{109}\text{AgNPs}$ LDI-MS

Both gold and silver-109 nanoparticle-coated targets were utilized for laser mass spectrometry-based profiling of urine metabolites collected from patients diagnosed with bladder cancer and control individuals. PFL-2D GS LASiS AuNPs and $^{109}\text{AgNPs}$ LDI-MS (pulsed fiber laser ablation synthesis of gold and silver-109 nanoparticles in solution with the use of a 2D galvoscan) were employed for the analysis of 200 urine samples, which resulted in the identification of 690 differentially regulated mass spectral features. The data was randomly split into two subsets for statistical analysis. The training data set consisted of $n = 70$ BC and $n = 70$ NCs and the validation data set was comprised of $n = 30$ BC and $n = 30$ NCs. 2D-PCA and OPLS-DA scores plots were generated from multivariate statistical analysis of PFL-2D GS LASiS AuNPs and $^{109}\text{AgNPs}$ LDI-MS mass spectral features. These analyses provided a clear separation of the BC group from the NC control group, as a result of their distinct MS-based urine metabolite profiles (see Supplementary data Figs. S6, S7). OPLS-DA VIP scores > 1.0 , associated with the OPLS-DA models, were selected to identify mass spectral features that were most discriminatory of the BC and NC groups. For the training dataset, the validation of the OPLS-DA model using 2000 permutations resulted in R^2Y and Q^2 values of 0.926 ($p < 5E04$) and 0.971 ($p < 5E04$) (Fig. S6), while R^2Y and Q^2 values of 0.867 ($p < 5E04$) and 0.965 ($p < 5E04$), respectively, were measured when analyzing the MS metabolomics data present in the validation dataset. This analysis was followed by univariate ROC analysis for both training and validation datasets. Only m/z values with an AUC greater than 0.7 were chosen for the next step of the analysis. Seventy-four features were common between the training and the validation datasets, and exhibited VIP values > 1.0 , FDR-corrected p -values < 0.05 , fold change (FC) less than 0.5 or greater than 1.8, and $AUC > 0.7$. Of these 74 common mass spectral features, were more abundant in the urine of BC patients to control individual, while 48 exhibited the opposite trend. Multivariate ROC plot-based exploratory analysis, based on Random Forest algorithm, was then carried out to identify which m/z spectral features were most discriminatory between the BC and control groups. Supplementary data Fig. S10 presents a summary of all the ROC curves generated from analysis of the training and validation datasets, using a range of feature counts (five, ten, fifteen, twenty-five, fifty, and one hundred), together with associated AUC values and confidence intervals. The 50-feature panel of model 5 in the training set and the 100-feature panel of model 6 in the validation set provided a very good discrimination power for BC diagnosis ($AUC > 0.97$) (Fig. S8, Supplementary material).

The data generated from untargeted PFL-2D GS LASiS AuNPs LDI-MS experiments were also analyzed using PCA and OPLS-DA to identify the mass spectral features that most differentiated control from BC tumor groups, using both training and validation datasets. In both instances, PCA and OPLS-DA scores plots separated clearly BC from control, in both

training and validation data subsets, suggesting that PFL-2D GS LASiS AuNPs LDI-MS-based metabolite profiling of urine can also be used to effectively to identify characteristic metabolic differences that separate bladder cancer from control groups (see Supplementary data Fig. S11 and S12). Validation of the OPLS-DA model using 2000 random permutation steps resulted in R^2Y and Q^2 values of 0.836 ($p < 5E04$) and 0.881 ($p < 5E04$), respectively for the training dataset (see e Supplementary data Fig. S9, and values of 0.720 ($p < 5E04$) and 0.879 ($p < 5E04$) for the validation dataset (Supplementary data Fig. S10). After completing this analysis, univariate as well as multivariate ROC analyses were carried out. In the analysis of both subsets (training and validation sets), 98 common features were found with VIP scores > 1.0 , FDR-corrected P -value < 0.05 , an $FC < 0.5$ or > 1.8 , and $AUC > 0.7$. Of these 98 features, 49 spectral features were more abundant in urine samples of bladder cancer patients compared to control individuals, and 49 features exhibited the opposite trend (less abundant in BCs than NCs). Fig. S11 provides a comprehensive summary of all the ROC curves generated from the training and validation datasets using a range of feature counts (five, ten, fifteen, twenty-five, fifty, and one hundred), along with corresponding AUC values and confidence intervals for each curve. The 100-feature panel of model 6 of the training dataset yielded the highest accuracy, while the 10-feature panel of model 2 of the validation dataset displayed the highest accuracy. Next, putative compound identification of select mass spectral features observed in the PFL-2D GS LASiS ^{109}Ag and AuNPs LDI-MS spectra were performed by searching against various metabolite databases, such as the Human Metabolome Database (HMDB) [37], the MetaCyc Metabolic Pathway Database [38], and the LIPID MAPS® Lipidomics Gateway [39]. Twenty-five mass spectral features were assigned to putative metabolite IDs by comparing the spectral features observed in PFL-2D GS LASiS $^{109}\text{AgNPs}$ and AuNPs LDI-MS mass spectra with those of compounds present the databases mentioned above. All this information is reported in Supplementary data Table S4.

3.5. Biomarker candidates in cancer: a pathway analysis

A metabolic pathway impact analysis was conducted using MetaboAnalyst 5.0 to identify metabolic pathways that are most likely implicated in the observed differences in urine metabolite levels between BCs and NCs. Pathway analysis and quantitative pathway enrichment analysis were performed on thirty-nine metabolites that were identified by NMR or LDI MS. Sixteen of these metabolites were found in the KEGG database and determined to be endogenous, while others may have come from various exogenous sources or gut microbe activity. Two different metabolic pathways were found to be significantly impacted, and included pathways involved in glyoxylate and dicarboxylate metabolism, and glycine, serine and threonine metabolism. Each of these pathways displayed an impact value > 0.1 and a p -value < 0.05 . Fig. 5A and Supplementary data Table S5 summarize the findings resulting from these metabolic pathway impact analyses.

In order to broaden the extent of metabolic pathways impacted in bladder cancer, a quantitative enrichment analysis was employed using the MetaboAnalyst 5.0 metabolite route enrichment module and its associated Small Molecule Pathway Database (SMPDB). The pathway involved in arginine and proline metabolism was found to be third impacted pathway with p -values < 0.05 and to be relevant to bladder cancer (Fig. 4B and Table S6 in Supplementary data).

4. Discussion

Analysis of the metabolite profiles of urine samples obtained from BC patients and control individuals using NMR, ICP-OES, and LDI-MS with both $^{109}\text{AgNPs}$ and AuNPs-based targets indicated significant changes in metabolite levels between patients with BC and controls. In this study, 39 small molecules were identified that may serve as diagnostic indicators of bladder cancer. Twelve of these compounds were present in

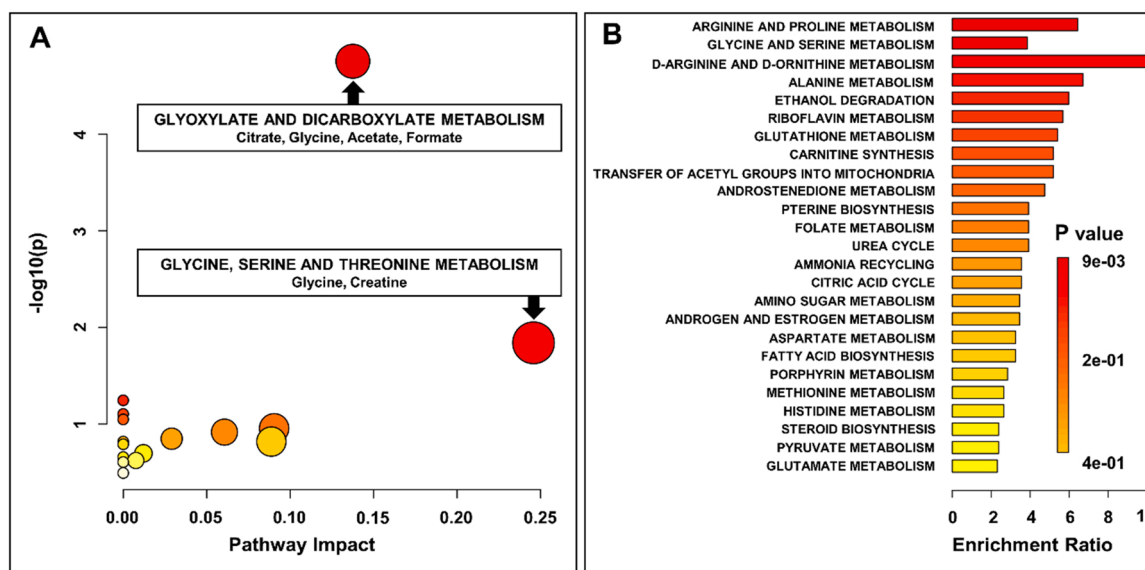


Fig. 5. The findings of a pathway topology study on the most statistically significant metabolites found in NMR and MS analyses. (A) Pathway analysis using the KEGG database; circle size is correlated with influence of pathway; color indicate the relevance ranging from the highest in red to the lowest in white. (B) A quantitative examination of enrichment from Small Molecule Pathway Database.

higher concentrations and twenty-seven at lower concentrations in the urine of BC patients compared to controls (see [Tables S2,3 in Supplementary data](#)). The higher concentration of these 15 metabolites may reflect the increased production of tumor metabolites that are secreted into the urine or may arise from the breakdown or change in the structure of non-malignant tissue caused by tumor invasion through the epithelial wall. Inflammatory responses due to the presence of the tumor may also lead to increased levels of some urine metabolites. The ^1H NMR metabolomics data revealed 5 compounds that were in higher concentration in the urine of NCs than in the BC subjects and significantly discriminated between BC and NC groups. These included 4-hydroxyphenylacetate, hippurate, mannitol, trigonelline and urea,

One of the metabolites that separated the NC and BC groups, and exhibited a high VIP value included trigonelline, a product of niacin (vitamin B3) metabolism which is excreted in the urine. This compound occurs also in plants and many foods [40]. Trigonelline has been shown to affect the activity of crucial glucose and lipid metabolism enzymes. Moreover, this compound has been tested for anticancer activity. Trigonelline had an inhibitory effect on the invasion of hepatoma cancer cells [41]. Trigonelline is also an effective Nrf2 inhibitor in anticancer activity and increases the sensitivity of chemoresistant pancreatic cell lines to anticancer drugs [42]. Research has shown that almost 50% of the dietary intake of trigonelline is excreted in urine within 8 h following food ingestion [43]. In our studies, the urine level of trigonelline was lower in BC patients compared to NCs. This compound has also been previously detected in lower amounts in the urine of BC patients and suggested to be a potential bladder cancer biomarker [44–46]. Analogous results, whereby trigonelline levels were found to be reduced, have been reported in metabolomics studies of urine samples obtained from lung cancer patients and individuals suffering from acute kidney injury [47,48].

Urea, formed in the liver from ammonia via the urea cycle, was another metabolite whose level differences contributed to the separation of the BC group from the NC group. Urea is also the end product of protein catabolism and is excreted in the urine. High urea concentrations can cause gastrointestinal bleeding and dehydration in the human body, while lower urea levels can cause liver failure, nephrotic syndrome, and cachexia [49]. Furthermore, it was found that supplying urea to cancer cells and blocking the breakdown of urea while accumulating ammonium can effectively kill cancer cells. Our research found

a significantly lower amount of urea in the urine of BC patients compared to controls. Similar results were obtained in blood serum analysis from patients with BC, where urea was found to be a good discriminator of BC versus control sample groups, and was present in much greater amounts in the control group [50].

Hippuric acid is a product of the aromatic compound metabolism and also excreted in the urine. Hippuric acid negatively affects blood pressure, liver ailments, and Crohn's disease [51]. In our study, the levels of hippuric acid were reduced in the urine of BC patients compared to the levels found in NCs, which is consistent with previous reports [20]. This relation has also been confirmed by several untargeted metabolomic profiling studies of BC urine and serum samples [44,50,52, 53].

4-Hydroxyphenylacetate is a common human, fungal, and plant metabolite. In our study the urine level of 4-hydroxyphenylacetate was lower in BC patients, which is consistent with a prior NMR study [54]. Furthermore, 4-hydroxyphenylacetate has also been shown to be excreted at lower levels in the urine of kidney cancer patients compared to the amount excreted by control individuals [55,56].

Another potentially important marker of BC is the polyhydroxy sugar alcohol, mannitol. Urine mannitol levels have been measured using various analytical methods [57–59]. In one study, human plasma and urine samples were collected from individuals suffering from impaired GI function, where mannitol was reported to be a potential biomarker of impaired intestinal permeability [60]. Our analysis found that the urine level of mannitol is higher in NC patients than BCs. Similarly, Lee et al. has shown that mannitol levels differ significantly in patients with urinary cancers compared levels found in urine samples of control individuals [54]. Mannitol has previously been reported to be in much lower concentrations in the urine of patients with various stages of BC [61], which is consistent with our findings.

Using modified gold and silver-109 targets in LDI-MS experiments made it possible to measure urine samples directly without separating and extracting analytes first. Using these methods, MS analysis of urine metabolites identified 16 compounds that were in higher concentration in urine samples of BC patients compared to controls, and 10 compounds that were lower in concentration. Most of these compounds were putatively identified as peptides and lipids. Two of the four lipids found to be elevated in the urine of BC patients belonged to the fatty acyl class, while the other two lipids belong to the class of sphingolipids and were found

in higher concentrations in the urine of NCs. These findings validate our earlier research results, which focused on the metabolite profiling of blood serum samples from BC patients and NC individuals [32].

In many processes associated with cancer cells, lipid metabolism plays an important role. Fatty acids are the fundamental components of complex lipids, which can be utilized for energy storage or can serve as fundamental components of cellular membranes [62]. Changes in lipid metabolism have been linked to both the early stages and progression of BC [63], as documented by a number of investigators [64]. Sphingolipids are lipids comprised of sphingoid bases, which are aliphatic amino alcohols and include sphingosine. Sphingolipids are known to play a significant role in the regulation of a variety of cellular processes, including cellular apoptosis, proliferation, angiogenesis, senescence, and cellular transformation [65]. The significance of sphingolipids in the control of cancer growth and the development of cancerous pathology has been extensively discussed in the scientific literature [88]. It has been suggested that sphingolipids metabolism plays a role in cancer aggressiveness and motility of cancer cells in muscle-infiltrating bladder cancer [66].

In an effort to identify cellular markers that could distinguish between the various grades of BC, several articles have been published that report on the metabolomics studies of urine and blood of BC patients [12,13]. To our knowledge, however, only three studies have investigated the connections between changes in metabolite levels in urine and the distinct stages of tumor development (Ta/Tis, T1, and >T2) [18,19,67]. In our study, slightly higher concentrations of trigonelline, hippurate, and mannitol were measured in the urine of NCs compared to the levels found in HG and LG BC groups (Fig. 3, Table 2).

Our study demonstrated that urine-based metabolite profiling can accurately discriminate different stages of BC (pTa, pT1, and pT2) from NCs (Table 2, Fig. 4). In the urine of patients with pTa, pT1, and pT2 stages of BC, we identified 13 significant metabolites that were good discriminators of the different cancer stage groups from the control group. Our research identified 6 compounds that distinguished BC patients with pTa from the control group, which included trigonelline, 4-hydroxyphenylacetate, hippurate, mannitol, 1-methylhistidine, creatine. In addition to the previously described compounds, 1-methylhistidine and creatine deserves attention. Differential levels of 1-methylhistidine in the urine of BC patients compared to healthy controls has been associated with increased risk of BC recurrence [61,68]. Previous studies have shown that creatinine levels are lower in the serum and urine of BC patients compared to healthy controls [50,53]. However, there have been studies suggesting that this compound is present in elevated level in the urine and tissues of BC patients compared to controls [69,70]. The reason for these contradictory findings is unclear, although our results are consistent with previous studies that found lower levels of this compound in the urine of BC patients.

Of all ten potential urine-derived bladder cancer of pT1 stage markers identified by our team, acetate deserves attention. Recent studies have shown that acetate is a key substrate in tumor bioenergetics. At the heart of acetate utilization in cancer is the enzyme ACS2, responsible for converting acetate to acetyl-CoA. Acetyl-CoA production is critical for maintaining fatty acid synthesis in cancer cells. Fatty acid metabolism is a critical aspect of cancer metabolism because cancer cell proliferation requires the synthesis of numerous cellular building blocks. It is also interesting to note that in bladder cancer there may also be changes in lipid or fatty acid metabolism. Glucose-derived endogenous acetate contributes to fatty acid synthesis in cisplatin-resistant cells [71]. In addition, the increasing use of ¹¹C-acetate positron emission tomography in clinics provides supporting evidence for the importance of acetate metabolism in cancer. ¹¹C-acetate is used in PET/MRI imaging and displays moderate accuracy in primary BC staging and limited sensitivity in detecting metastatic lymph nodes and response to neoadjuvant chemotherapy [72]. Moreover, PET/MRI imaging is able to reach specificity and sensitivity levels of 50% and 80%, respectively, for detecting lymph node metastasis [73]. Our study

reports a clear correlation between the level of acetate in the urine and grade of bladder cancer tumor malignancy.

5. Conclusion

We have demonstrated that multivariate statistics, together with high-resolution NMR and gold/silver-109-based high-resolution LDI-MS metabolomics, are powerful analytical techniques to investigate urine metabolomes and changes in metabolite profiles in BC patients. ¹H NMR metabolomics was employed to assess the urine metabolite patterns of 99 patients with BC and 100 NCs. This led to the identification of five potentially robust metabolic indicators of BC, which include 4-hydroxyphenylacetate, hippurate, mannitol, trigonelline, and urea. The combination of these metabolites predicted BC with potentially excellent predictive power as revealed by AUC values greater than 0.82. Most of these compounds have been previously linked with bladder cancer, however until now, they have not been reported in such a combination as a potential set of discriminating markers of this disease. In addition, metabolite profiling using gold and silver-109 nanoparticle-based laser desorption/ionization mass spectrometry (LDI-MS) identified 26 additional compounds, the majority of which were lipids, which helped differentiate between cancer and control urine samples. In addition, three additional metabolites were found to be potentially valuable discriminators of LG versus HG bladder cancer, and thirteen were potential reporters of pTa/pT1 and pT2 phases of BC. The distinct metabolite profiles observed in the urine of patients with BC compared to those of NCs may thus serve as diagnostic markers of BC and may help distinguish between the various stages and grades of BC. Results of this study also suggest that evaluating disease severity and progression in BC using a combination of urine metabolites has better predictive potential than using either metabolite alone.

CRedit authorship contribution statement

Krzysztof Ossoliński: Investigation, Resources, Writing – original draft. **Tomasz Ruman:** Methodology, Investigation, Resources, Data curation, Writing – review & editing, Supervision. **Valérie Copié:** Resources, Data curation, Writing – review & editing, Funding acquisition. **Brian P. Triplet:** Resources, Data curation, Writing – review & editing, Visualization, Funding acquisition. **Artur Kołodziej:** Investigation, Data curation. **Aneta Piąza-Altamer:** Investigation, Data curation. **Anna Ossolińska:** Resources. **Tadeusz Ossoliński:** Resources. **Anna Nieczaj:** Writing – original draft. **Joanna Nizioł:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

Research was supported mainly by National Science Centre (Poland), research project SONATA Number UMO-2018/31/D/ST4/00109. ¹H NMR spectra were recorded at Montana State University-Bozeman on a cryoprobe-equipped 600 MHz (14 Tesla) AVANCE III solution NMR spectrometer housed in MSU's NMR Center. Funding for MSU NMR Center's NMR instruments has been provided in part by the NIH SIG program (1S10RR13878 and 1S10RR026659), the National Science Foundation (NSF-MRI:DBI-1532078, NSF-MRI CHE: 2018388), the Murdock Charitable Trust Foundation (2015066:MNL), and support from the office of the Vice President for Research, Economic Development, and Graduate Education at MSU.



OPEN

Untargeted urinary metabolomics for bladder cancer biomarker screening with ultrahigh-resolution mass spectrometry

Joanna Nizioł^{1✉}, Krzysztof Ossoliński², Aneta Płaza-Altamer^{1,3}, Artur Kołodziej^{1,3}, Anna Ossolińska², Tadeusz Ossoliński², Anna Nieczaj¹ & Tomasz Ruman¹

Bladder cancer (BC) is a common urological malignancy with a high probability of death and recurrence. Cystoscopy is used as a routine examination for diagnosis and following patient monitoring for recurrence. Repeated costly and intrusive treatments may discourage patients from having frequent follow-up screenings. Hence, exploring novel non-invasive ways to help identify recurrent and/or primary BC is critical. In this work, 200 human urine samples were profiled using ultra-high-performance liquid chromatography and ultra-high-resolution mass spectrometry (UHPLC-UHRMS) to uncover molecular markers differentiating BC from non-cancer controls (NCs). Univariate and multivariate statistical analyses with external validation identified metabolites that distinguish BC patients from NCs disease. More detailed divisions for the stage, grade, age, and gender are also discussed. Findings indicate that monitoring urine metabolites may provide a non-invasive and more straightforward diagnostic method for identifying BC and treating recurrent diseases.

Cancer is one of the humanity's most significant problems in the twenty-first century that also occupy thousands of scientists. Cancer is the leading cause of death among people under 70. Recent trends show that cancer may be the leading cause of premature death in most countries this century¹. Urological cancers constitute a large part of all types of cancers worldwide. Their incidence and mortality are still increasing, which places a significant burden on healthcare worldwide¹. The early detection of cancer contributes to early diagnosis and subsequent treatment².

Bladder cancer (BC) is one of the most common urinary tract cancers affecting men and women³. The incidence of this cancer depends mainly on age, sex, carcinogenic factors, diet, and alcohol consumption or smoking⁴. Based on the histological classification, several types of bladder cancer were classified, including non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC), which accounts for about 70–85% of all bladder tumors, and muscle-invasive BC (MIBC). NMIBC comprises noninvasive papillary carcinomas (pathologic stage Ta), submucosal invasive tumors (T1), and carcinoma in situ (CIS). MIBC contains tumors that have spread into muscle (stage T2), perivisceral fat (stage T3), or adjacent organs (stage T4). Histology classifies BC as low-grade (LG) tumors that seldom expand from their source location and high-grade (HG) tumors that are more aggressive and invasive. Moreover, about 50% of NMIBC cases aft, after all, recur despite radical treatment, and about 30% experience disease progression to MIBC⁵. This is why cancer patients are screened mainly for recurrence of the disease and metastasis of the disease to other sites³.

Transurethral resection of bladder tumor (TURBT), occasionally followed by intravesical instillation of mitomycin or Bacillus Calmette-Guerin (BCG) therapy, is the standard first-line treatment for early BC. The conventional therapy for MIBC, on the other hand, is a radical cystectomy with pelvic lymph node dissection. This is used with neoadjuvant or adjuvant cisplatin-based chemotherapy⁶. Despite such rigorous therapy, BC patients have a dismal survival rate. It is widely known that the sooner the cancer is detected, the greater the chance of treating the patient⁷. Some of the varieties of cancer are undetectable at an early stage using cystoscopy. Incredibly, flat, non-invasive with high-grade cancer is practically invisible in cystoscopy. Moreover, it is often mistakenly interpreted as a common inflammatory area because of its appearance. Therefore, metabolomics can be the most suitable way to achieve this. Due to the direct contact of the tumor with the urine, specific disease

¹Faculty of Chemistry, Rzeszów University of Technology, 6 Powstańców Warszawy Ave., 35-959 Rzeszów, Poland. ²Department of Urology, John Paul II Hospital, Grunwaldzka 4 St., 36-100 Kolbuszowa, Poland. ³Doctoral School of Engineering and Technical Sciences at the Rzeszów University of Technology, 8 Powstańców Warszawy Ave., 35-959 Rzeszów, Poland. ✉email: jnizioł@prz.edu.pl

biomarkers may be present in this fluid. In recent years, metabolomics research in diagnosing and understanding numerous illnesses has increased dramatically⁸.

Several analytical approaches have been developed to understand better the metabolic alterations in biological systems, including cancer phenotypic changes. Nevertheless, two analytical platforms—nuclear magnetic resonance (NMR)⁹ spectroscopy and mass spectrometry (MS), which are frequently combined with liquid chromatography (LC)¹⁰, provide the complete screening of cancer metabolomes. MS, compared to NMR, detects far wider variety of molecules with much greater sensitivity, resolution, and accuracy using much less material¹¹. During the last fifteen years, metabolomic analytical approaches have been extensively employed to explore BC and find possible biomarkers in urine, serum, and tissues^{4,5,12,13}. Compared to serum and tissue, urine metabolomics may be affected by dilution factor, but urine is more available than tissue or serum, and the procedure non-invasive. Recently, many detailed articles have been published on potential urinary markers of BC, demonstrating significant interest in this field^{14,15}. Unfortunately, none of the biomarkers invented and tested so far guarantee 100% detection of cancer at an early stage. Even though their detection characteristics are still high, they are associated with enormous costs that the global health service cannot afford¹⁶. This is still desirable for scientists to research subsequent biomarkers, thanks to which we will increase the percentage of cases with early detection of bladder cancer.

Most investigations of urine from patients with bladder cancer were based on NMR¹⁷ or mass spectrometry coupled to liquid chromatography (LC)^{18–21} and gas chromatography (GC)^{22,23}. One of the first report of metabolomic profiling of urine from BC patients using high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry appeared in 2008²⁴. The study was conducted on samples from 41 bladder cancer patients and 48 healthy individuals. The results indicated that metabolomics using HPLC–MS had the potential to become a noninvasive early detection test for BC. Similar conclusions were drawn in 2011 by Huang and coworkers, who indicated fourteen compounds differentiating these two groups based on the urine analysis of 27 patients with BC and 32 healthy volunteers²⁵. In the same year, urine profiling with external validation was performed by Putluri and coworkers²⁶ on a much larger group of 85 BC patients and 51 controls, indicating 35 potential BC biomarkers. In 2013, two more urine profiling works were published that were based on a relatively small groups of BC patients^{27,28}. The first profiling of urine metabolites of a larger group of 138 BC patients and 121 controls using HPLC–QToF–MS was performed in 2014 by Jin and coworkers²⁹. The research identified 12 differential metabolites that may be useful for the distinction between the BC and control groups. However, mentioned research was based on mass spectrometer of 20,000 resolution that is three-times lower value that for instrument used in our report. Also, authors used 2.6 micron HPLC column that have inferior resolving power compared to our 1.7 micron one. In later years, several publications indicated potential small-molecule biomarkers for early detection of bladder cancer; however^{30–33}, to our knowledge, only two papers using a group of more than one-hundred patients and with external validation have been published so far^{16,20}. Similarly, there are very few reports on the analysis of urine of patients with BC, considering the division into different stages and grades of cancer, as well as gender and age^{21,34}. There are no reports published that combine large cohorts of patients and also controls with ultrahigh performance liquid chromatography combined with ultrahigh resolution mass spectrometry system.

In this work, we report the results of an untargeted analysis of human urine with ultra-high-resolution mass spectrometry coupled with ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC–UHRMS) with external validation. This study employed a large number of patients—100 cancer patients and 100 controls. The untargeted analysis focused on urine metabolic changes generated by bladder cancer and stratified the disease by stage, grade, age, and gender. Our study reveals potential urinary BC biomarkers for early detection, screening, and differential diagnosis.

Materials and methods

All chemicals were of LCMS- or analytical reagent-grade. Deionized water (18 MΩ cm) was produced locally. LC–MS-grade methanol was bought from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Instrumentation. The untargeted analysis was performed using a Bruker Elute UHPLC system with Hystar 3.3 software and an ultra-high-resolution mass spectrometer Bruker Impact II (60,000+ resolution version; Bruker Daltonik GmbH) ESI QTOF-MS with Data Analysis 4.2 (Bruker Daltonik GmbH) and Metaboscape (ver. 2022b). Metabolite separation was achieved with a gradient of mobile phases using a Waters UPLC column ACQUITY BEH (C18 silica, 1.7 μm particles, 50×2.1 mm) with a compatible column guard was used for all analyses. Further details are described in our previous publication³⁵ and supplementary information 1 (section S1).

Collection of human urine samples. Urine samples were taken from 100 BC patients at John Paul II Hospital in Kolbuszowa, Poland (average age 73, white ethnicity). Control group consisted of age and sex matched patients admitted to the Urology Department for surgery of benign urological conditions including benign prostatic hyperplasia (BPH), urine stones, phimosis, UPJO (Ureteropelvic Junction Obstruction), and stress urinary incontinence. Prior to the procedure (day before) each patient, underwent a comprehensive set of laboratory tests, including a blood count, electrolyte analysis, coagulation panel, creatinine measurement, glomerular filtration rate (GFR) assessment, urinalysis, lung X-ray, and ultrasound of the cavity as a part of standard protocol before each surgery. After extensive clinical questioning and laboratory testing, all patients with cancer had transurethral resection of bladder tumor (TURBT). The study was authorized by the University of Rzeszow's local Bioethics Committee (Poland, permit number. 2018/04/10) and complied with relevant rules and legislation. All methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations. Written informed consent was obtained from all subjects. All patients who participated in the trial were told about the

study's goal and methods, and they completed an informed permission form. Patients hospitalized in the urology department for surgical treatment of benign urological diseases include the whole NCs group (urolithiasis, benign prostate hyperplasia, testicular hydrocele, varicocele, phimosis, ureteropelvic junction stenosis, urinary incontinence, urethral stricture). Each individual has received at least one abdominal ultrasound to rule out neoplasms (patients with urolithiasis frequently get a CT scan) and a basic set of lab tests necessary for urological surgery to rule out inflammation. Patients in the control group received written authorization to give leftover urine for investigation after being informed about the research program. Each participant had 10 ml of urine collected from them. At room temperature, samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The samples were then stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. The clinical characteristics of the patients are presented in supplementary information 1, table S1.

Sample preparation. As detailed in our recent work, medium-to-high polarity metabolites were isolated from urine samples³⁶. In summary, urine samples were thawed at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ and then centrifuged at $12,000\times g$ for 5 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. A total of 900 μL of acetone was added to 300 μL of supernatants. After vortexing for 1 min, the solutions were incubated at room temperature for 20 min, followed by 20 min at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, and then centrifuged at $6000\times g$ for 5 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Then, 800 μL of supernatants were transferred to a fresh polypropylene tube. The pellets were resuspended in 500 μL of an acetone- H_2O (3:1 v/v) combination and vortexed extensively. Samples were centrifuged at $12,000\times g$ for 10 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The supernatants from the pellet washes were mixed with those from the first spin. 260 μL of mixed supernatants were vacuum dried in a speedvac-type concentrator, dissolved in 900 μL of methanol, vortexed, and centrifuged ($12,000\times g$ for 5 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). A 800 μL supernatant volume was placed into an HPLC vial and put into the Elute autosampler.

Data analysis. In this study, we characterized the metabolic profile of urine from 100 patients with diagnosed BC and also from 100 normal control subjects (NCs) to develop potentially discriminant biomarkers for early, specific, and sensitive detection of this disease using ultra-high-resolution LC-MS. Two datasets from BC patients and NCs have been created: a training set, which contained 70% of all samples, and a validation set, which had 30% of all samples. In the training set, samples from a patients with certain stages and grades of BC made up 80% of all samples for a particular stage and grade of this disease. On the two datasets, urine metabolic profiling was carried out separately. The training data set was used to identify urine diagnostic markers differentiating the control group from cancer, high- and low-grade, pTa and pT1 stage. In turn, the validation set was used to validate the diagnostic performance of urine metabolite biomarkers independently. In the case of the analysis of samples from patients with pT2 stage of BC, in different age groups, and from women, the number of samples was insufficient to conduct a reliable statistical analysis divided into two independent sets. Therefore, the study was performed for the entire data set. In comparing patients of different sex and age, the control group consisted of people of a given sex and from a specific age group.

Multivariate statistical analysis. For raw data, we have used Metaboscape v.2022b program recommended filtration of recorded features that removes the ones that for given m/z and retention time are not detected in samples from minimum 10 patients. This amount of patients is correlated with smallest group of given medical condition. Then data were exported and saved in CSV format. Subsequently, the data was imported into the Metaboanalyst 5.0 online software³⁷ for further analysis. Within the Metaboanalyst platform, the data was normalized using log-transformed, auto-scaled, and sum-normalized before analysis. The resulting metabolite profiles were then submitted to unsupervised Principal Component Analysis (PCA). The separation identified in the 2D and 3D PCA score plots between the BC and control groups was further investigated utilizing supervised multivariate statistical analysis such as Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA). The goodness of fit (R^2Y) and predictive ability of the OPLS-DA models were used to evaluate their quality (Q^2). VIP plots were created to identify the metabolites most substantially responsible for group separation. VIP values of more than 1.0 were considered promising biomarker candidates. Permutation tests with 2000-fold repetition were used to assess the correctness of the multivariate statistical models and rule out the possibility that the observed separation in the OPLS-DA is attributable to chance (P -value < 0.05). The t -test with Mann-Whitney and Bonferroni correction was used to determine the statistical significance of metabolite level differences. Less than 0.05 P -values and false discovery rates (FDR; q -value) were considered statistically significant. The diagnostic value of the identified metabolites was evaluated using receiver operating characteristic curve (ROC) studies and random forest modeling. The metabolites' performance was calculated using the area under the curve (AUC), 95% confidence interval, specificity, and selectivity. AUC values greater than 0.9 indicate that the model is highly dependable, AUC values between 0.7 and 0.9 suggest moderate reliability, AUC values between 0.5 and 0.7 indicate low reliability, and AUC 0.5 shows that the model prediction is no better than chance. Only variables with an AUC greater than 0.70 were deemed meaningful. The training and validation datasets were subjected to separate multivariate statistical analyses. Chemicals that distinguish between tumor and control urine samples were chosen via external validation, which involves using two different datasets (here referred to as the training and validation datasets) to validate the performance of a model. The final collection of possible BC biomarkers met all testing and validation data set requirements. Chemometric methods such as 2D PCA, OPLS-DA, and ROC analysis were also employed to compare and contrast metabolic profiles between various grades and stages of bladder cancer. A metabolic pathway impact study was performed in MetaboAnalyst 5.0 utilizing the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway library for Homo sapiens³⁸ to discover metabolic pathways influenced by bladder cancer. The Small Molecule Pathway Database performed quantitative pathway enrichment analysis (SMPD). Each affected pathway was identified using statistical P -values, Holm p (P -value

corrected using the Holm-Bonferroni technique), and FDR (P -value adjusted using the False Discovery Rate), computed using pathway topology analysis.

Ethical approval. The local Bioethics Committee approved the study protocol at the University of Rzeszow (Poland) (permission no. 2018/04/10). Written informed consent was obtained from all subjects and/or their legal guardian(s).

Results

Distinguishing between bladder cancer and control urine samples. In total, 2969 m/z features were detected in each urine sample, with the condition that feature is found in at least nine samples corresponding to the smallest group of cancer subtype. Both subsets' unsupervised 2D PCA score plots clearly distinguished between cancer patients and controls. The principal components 1 and 2 (i.e., PC1 and PC2), which accounted for 22.2% and 10.7%, respectively, provided the best group separation in the training set. In the middle 95% of the field of view, just a few outliers were found (Fig. 1a). Additionally, in the validation set, PC1 (26.2%) and PC2 (9.4%) showed the best separation between cancer and control urine samples (Fig. S1A, information 1).

To investigate the metabolic differences between the BC and NC groups, a supervised multivariate OPLS-DA analysis was performed. The score plot in the training set showed a clear divergence between the two groups (Fig. 1b). The OPLS-DA model was validated using 2000 permutation tests (Table S2, supplementary information). There was good discrimination between the two groups ($Q^2 = 0.960$, $R^2Y = 0.991$, p -value $5E-04$ (0/2000)), revealing significant differences in the metabolic profiles of cancer urine samples versus control urine samples. This OPLS-DA model has a high R^2Y and Q^2 , indicating good interpretability and predictability. A similar tendency to discriminate BC patients and NCs was observed in the validation set's OPLS-DA model (Table S2), which was confirmed by the excellent permutation test results ($Q^2 = 0.918$, $R^2Y = 0.984$, p -value $5E-04$ (0/2000)). Volcano plot and PCA biplot of the most significant metabolite changes comparing cancer and control group was shown in supplementary information in the Figure S2. The VIP plot generated by the OPLS-DA model was used to select potential urine bladder cancer biomarkers. Then, univariate ROC analysis was performed on both the training and validation sets to assess the models' diagnostic ability. The area under the ROC curve (AUC), an adequate measure of model performance, was utilized as a metric to analyze the biomarkers' sensitivity and specificity. Only m/z with an AUC value higher than 0.70 were considered to be relevant by combining the VIP (> 1.0) and AUC (> 0.7) with the independent t-test results (p -value and FDR from t-test under 0.05), 464 variables in the training set were chosen as differential in urine for BC patients and NCs. In turn, 548 variables were considered significant in the validation set. Finally, 51 m/z features common to both sets were left for which a

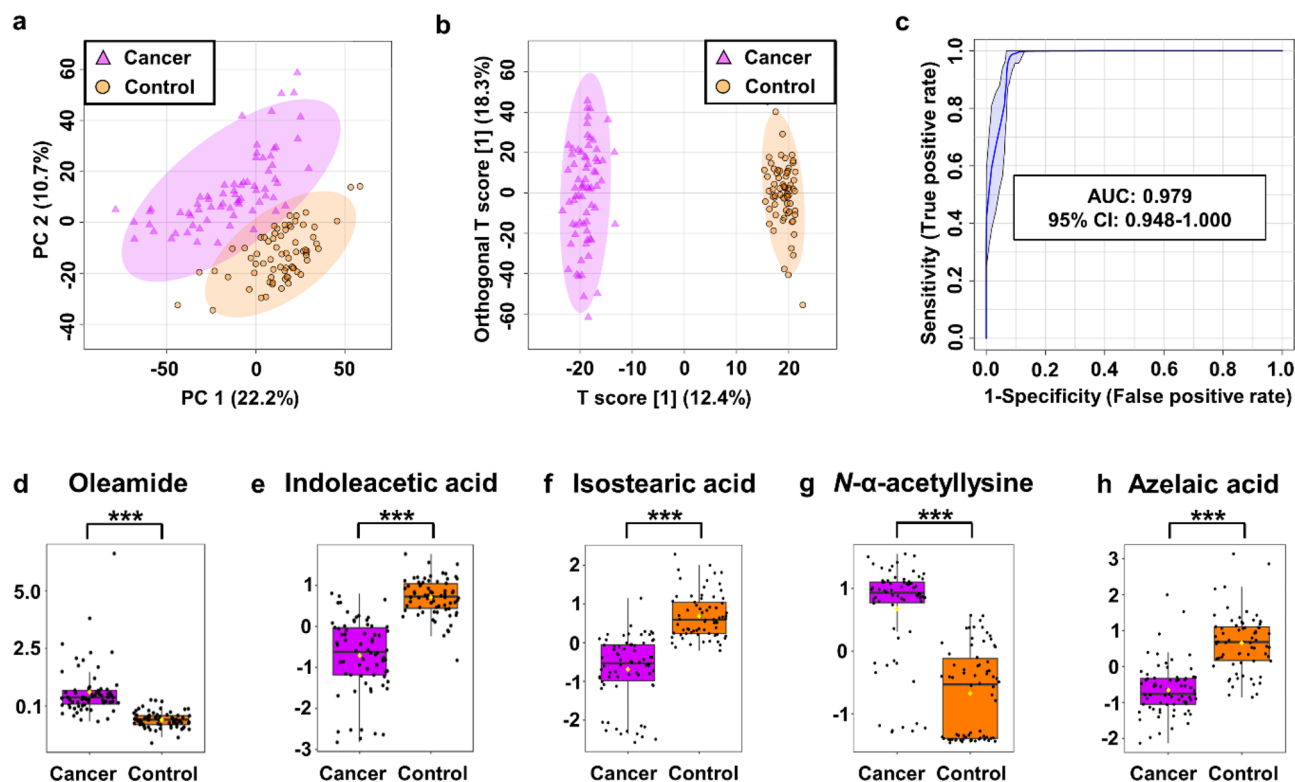


Figure 1. Metabolomic analysis of BC and NC urine samples in the training set. (a) PCA and (b) OPLS-DA score plots of tumor (violet) and control (orange) urine samples. (c) The receiver operator characteristic (ROC) curves. (D–G) The box-and-whisker plots of selected metabolites were observed in the control and BC urine samples.

specific chemical compound was assigned (Table 1, supplementary information 2). The results showed that in urine samples, 5 of the previously selected 51 metabolites have a very high AUC value of more than 0.9 and high parameters of specificity and sensitivity of more than 80 and 81%, respectively (Table 1 and S1, supplementary information 2). The combination of mass features in the validation and training set was a robust discriminator of control versus bladder cancer urine samples (AUC > 979%), as illustrated in Fig. 1c and S1C.

Determination of low- and high-grade bladder cancer and control urine samples. Another series of PCA and OPLS DA analyses were performed on the training (70 NCs, 30 patients with HG, and 38 patients with LG) and validation (30 NCs, 12 patients with HG, and 17 patients with LG) data sets (Table S1) to see if metabolomics analysis of urine samples could help discriminate between different grades of BC. Patients with PLUMP were excluded from this analysis due to their small number.

In both the training and validation sets, PCA and OPLS-DA scores plots showed good separation between control groups and cancer groups with different grades of tumors (LG vs. NCs and HG vs. NCs) (Fig. 2a–d, S3). The quality factors for these models were $Q^2 > 0.879$ and $R^2Y > 0.983$, and the P -values from permutation tests ($n = 2000$) were less than $5E-4$ (Table S3), which means that the metabolites profiles of these two groups could not be more different. But in the PCA scores plot, we didn't see a big difference between the LG and HG BC patients (data not shown). In the LG BC vs. NCs OPLS-DA model, 26 identified chemical compounds were considered significant ($VIP > 1$, P -value 0.05) in both the training set and the validation set (Table S2, supplementary information 2).

Analysis of HG BC vs. NCs in the training and validation sets of the OPLS-DA model showed that 63 commonly identified compounds were important in separating the two groups (Table S3, supplementary information 2). Based on the results of univariate ROC curve analyses, it was determined that these models have satisfactory diagnostic performance. Two of the twenty-six metabolites in the LG versus NCs model and thirteen of the sixty-three in the HG vs. NCs model had AUC values higher than 0.90 with sensitivity and specificity of more than 80 and 87%, respectively (Table 1). Selected metabolites most differentiating different grades of BC and NCs are shown in Fig. 2e–h.

Determination of different stages of bladder cancer and control urine samples. To differentiate between the various stages of bladder cancer, PCA and OPLS-DA models were developed. The 68 urine samples

No.	Name	Formula	m/z ^a	RT [min]	VIP ^b	FC ^c	P-value	FDR	AUC	Spec. [%] ^d	Sens. [%] ^d
1	Oleamide ^{e,g,h}	C ₁₈ H ₃₅ NO	282.2790	5.08	1.70	3.00	2.34E-20	1.73E-18	0.953	90	89
2	Indoleacetic acid ^{e,f,g}	C ₁₀ H ₉ NO ₂	217.0974	2.02	2.08	0.15	1.14E-19	5.43E-18	0.944	90	90
3	Isostearic acid ^{e,g,h}	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	285.2785	0.20	1.95	0.16	1.28E-19	5.99E-18	0.944	86	89
4	N-Alpha-acetyllysine ^{e,f,g}	C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₃	268.1056	0.14	1.96	14.89	4.17E-17	9.94E-16	0.912	80	90
5	Azelaic acid ^{e,f,g,h}	C ₉ H ₁₆ O ₄	171.1014	2.54	1.94	0.35	2.97E-16	6.01E-15	0.900	87	81
6	Indoleacetic acid ^{e,f,g}	C ₁₀ H ₉ NO ₂	217.0974	2.02	2.12	0.18	1.16E-13	4.19E-12	0.934	87	96
7	Isostearic acid ^{e,g,h}	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	285.2785	0.20	1.97	0.18	4.91E-13	1.50E-11	0.923	89	82
8	Isostearic acid ^{e,g,h}	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	285.2785	0.20	1.94	0.13	1.64E-13	1.43E-11	0.967	97	87
9	Oleamide ^{e,g,h}	C ₁₈ H ₃₅ NO	282.2790	5.08	1.73	4.65	2.88E-13	1.85E-11	0.962	96	87
10	Indoleacetic acid ^{e,f,g}	C ₁₀ H ₉ NO ₂	217.0974	2.02	2.12	0.12	5.02E-13	2.75E-11	0.958	96	93
11	2-Furoylglycine ^{e,f,g,h}	C ₇ H ₇ NO ₄	170.0447	1.60	2.00	0.11	7.81E-13	3.66E-11	0.954	96	87
12	Azelaic acid ^{e,f,g,h}	C ₉ H ₁₆ O ₄	171.1014	2.54	1.87	0.27	1.87E-12	7.16E-11	0.946	90	87
13	Cis,cis-Muconic acid ^{e,f,h}	C ₆ H ₆ O ₄	125.0232	1.53	1.97	0.09	3.03E-12	1.08E-10	0.942	91	87
14	Phenylglyoxylic acid ^{e,f,g}	C ₈ H ₆ O ₃	151.0386	1.85	1.89	0.18	5.16E-12	1.62E-10	0.937	96	83
15	N-Alpha-acetyllysine ^{e,f,g}	C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₃	268.1056	0.14	1.85	15.22	1.47E-11	3.85E-10	0.928	100	80
16	Methylmalonic acid ^e	C ₄ H ₆ O ₄	119.0344	0.03	2.12	0.13	1.55E-11	3.95E-10	0.927	93	90
17	3,4-Dihydroxymandelic acid ^e	C ₈ H ₈ O ₃	226.0709	1.85	1.79	0.19	4.10E-11	8.36E-10	0.918	90	83
18	N-Acetylserotonin ^{e,f}	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂	175.1227	1.75	1.81	0.21	8.73E-11	1.57E-09	0.911	87	90
19	3-Hydroxy-4-methoxycinnamic acid ^e	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	195.0654	1.79	1.87	0.15	1.06E-10	1.87E-09	0.909	86	87
20	Tiglylglycine ^{e,f}	C ₇ H ₁₁ NO ₃	199.1076	1.56	1.69	0.32	1.66E-10	2.74E-09	0.905	81	87

Table 1. Differential metabolites for discrimination between BC patients and NCs (P -value and $FDR < 0.001$; $VIP > 1$; $FC < 0.5$ and > 2 ; $AUC > 0.9$). ^aExperimental monoisotopic mass of ion; ^bVIP scores derived from OPLS-DA model; ^cfold change between cancer and control serum calculated from the abundance mean values for each group – cancer-to-normal ratio; ^dROC curve analysis for individual biomarkers; ^ethe metabolites identified by high precursor mass accuracy; ^fthe metabolites identified by matching retention time; ^gthe metabolites identified by matching isotopic pattern; ^hthe metabolites identified by matching MS/MS fragment spectra; AUC: area under the curve; FC: fold change; FDR: false discovery rate; m/z : mass-to-charge ratio; RT: retention time; Sens.: Sensitivity; Spec.: Specificity; VIP: variable influence on projection.

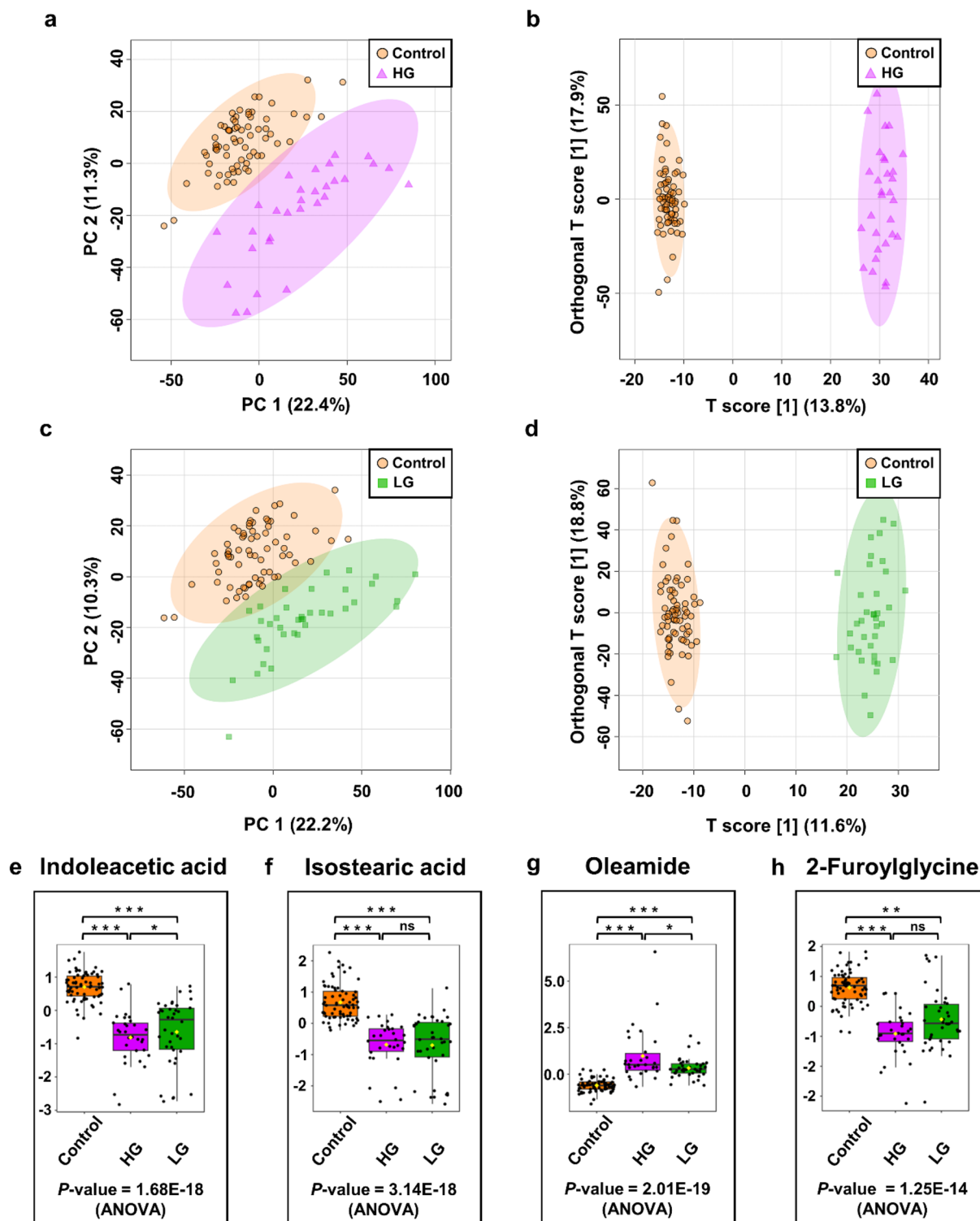


Figure 2. Metabolomic analysis of HG/LG BC and NCs of urine samples in the training set. (a) PCA and (b) OPLS-DA score plots of HG BC (violet) and control (orange) urine samples. (c) PCA and (d) OPLS-DA score plots of LG BC (green) and control (orange) urine samples. (e, h) The box-and-whisker plots of selected metabolites were observed in the control, HG, and LG BC urine samples.

from patients with noninvasive papillary carcinomas (pTa) were divided into training (70 NCs, 47 patients with pTa) and validation (30 NCs, 21 patients with pTa) sets. The 19 urine samples from patients with the pT1 stage of BC were divided into training (70 NCs, 15 patients with pT1) and validation (30 NCs, 5 patients with pT1)

sets. In the case of the pT2 stage of BC, the analysis was performed without dividing it into two sets (30 NCs, 12 patients with pT2). The PCA and OPLS-DA score plots demonstrated a decent separation between NCs and the various stages of BC (pTa vs. NCs, pT1 vs. NCs, and pT2 vs. NCs, Fig. 3 a-f).

Quality factors for these models were $Q^2 > 0.836$ and $R^2Y > 0.985$, and P -values derived from permutation tests ($n = 2000$) were less than $5E-4$ (Table S2), suggesting very strong discrimination of metabolite profiles between these groups. The performance of three models in differentiating between pTa, pT1, and pT2 bladder cancer stages and NCs was then evaluated using ROC curve analysis. Based on the cut-off criteria ($FC > 2 < 0.5$, $VIP > 1$; $AUC > 0.7$, P -value and $FDR < 0.05$), finally, 19, 68, and 81 chemical compounds appeared to be most relevant for sample distinction between pTa BC vs. NCs, pT1 BC vs. NCs, and pT2 BC vs. NCs, respectively (Table S4-S6, supplementary information 2). Comparing the three cancer stage groups (pT1 versus pTa versus pT2) revealed

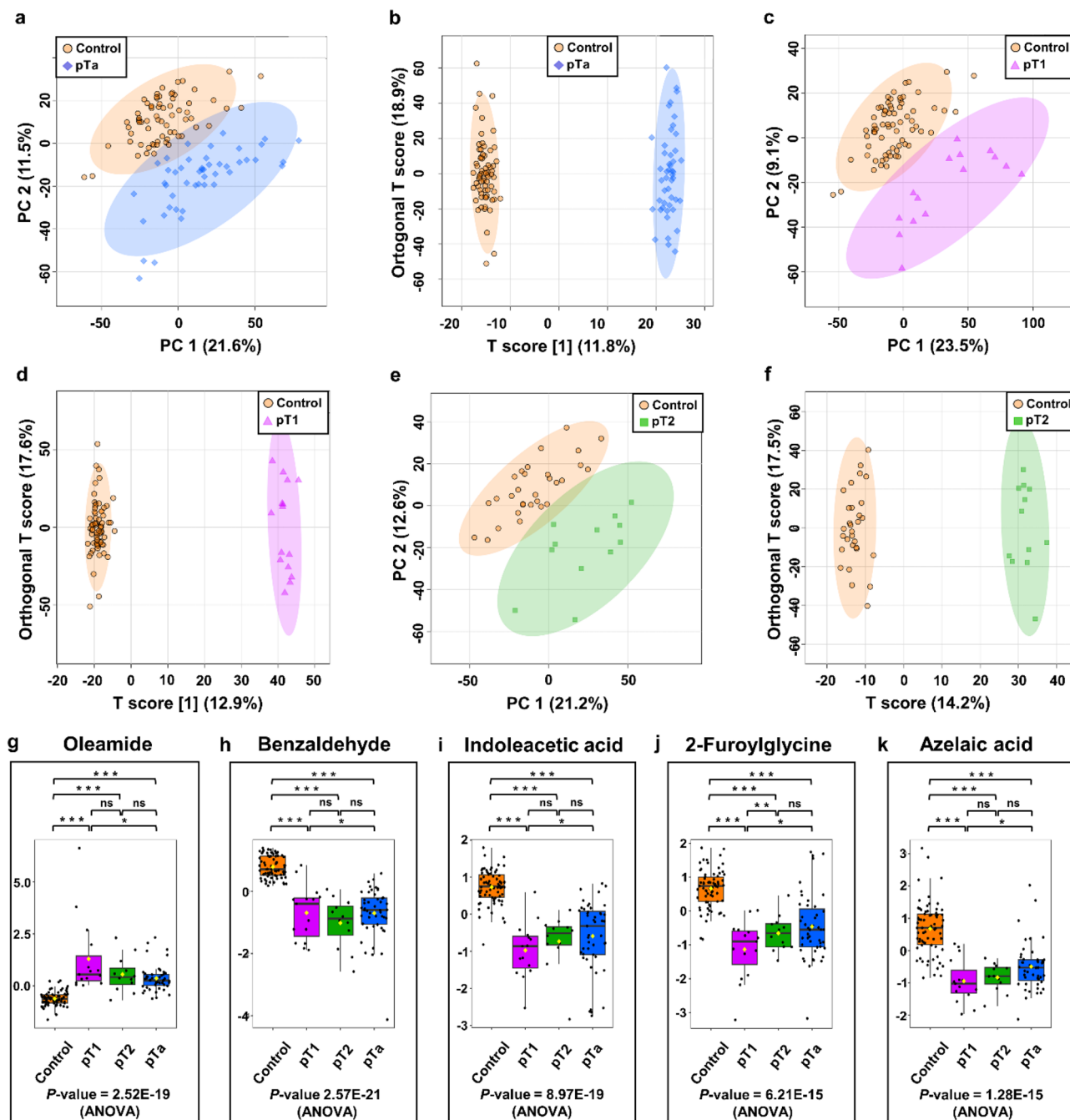


Figure 3. Metabolomic analysis of pTa/pT1/pT2 BC and NCs of urine samples in the training set. (a) PCA and (b) OPLS-DA score plots of pTa BC (blue) and control (orange) urine samples. (c) PCA and (d) OPLS-DA score plots of pT1 BC (violet) and control (orange) urine samples. (e) PCA and (f) OPLS-DA score plots of pT2 BC (green) and control (orange) urine samples. (g–k) The box-and-whisker plots of selected metabolites were observed in control, pTa, pT1, and pT2 BC urine samples.

no statistically significant differences (data not shown). Selected metabolites most differentiating different stages of BC and NCs are shown in Fig. 3g–k.

Sex-related differentiation of metabolomic profiles. The differentiation of metabolites in urine extracts from patients of different sexes was studied. The control group consisted of people matched to a given sex. The comparison of the male BC patients with the male control group was performed with a division into the training (55 male BC, 51 male control) and validation (26 male BC, 19 male control) sets. The group of female patients was compared on the whole data set (19 female BC, 30 female control).

In both the training and validation sets, PCA and OPLS-DA score plots revealed good discrimination between separate control and cancer groups of different sex (Fig. 4a–d).

The quality factors for those models amounted to $Q^2 > 0.907$ and $R^2Y > 0.986$, and the *P*-values derived from the permutation tests indicated perfect discrimination of metabolite profiles between those groups. However, we did not find a significant difference between the two groups when comparing the male and female patients using the PCA scores plot (data not shown).

The performance of two models in differentiating between male and female BC patients and male and female NCs was then evaluated using ROC curve analysis. Based on the cut-off criteria ($FC > 2 < 0.5$, $VIP > 1$; $AUC > 0.7$, *P*-value and $FDR < 0.05$), finally, 79 and 48 chemical compounds appeared to be most relevant for sample distinction between male BC vs. male NCs, and female BC versus female NCs, respectively (Table S7–S8, supplementary information 2). Selected metabolites that differentiate BC patients with different gender from NCs are shown in Fig. 4e–h.

Age-related differentiation of metabolomic profiles. The difference in metabolites in urine extracts from patients of various ages was examined. The control group was made up of people of the same age. The entire set of LC–MS data from urine samples from BC and NCs patients was divided into three age groups. The first group consisted of 11 samples from BC patients aged 40 to 60 and 49 controls of the same age. The second group included 24 samples from BC patients aged 40 to 60 and 13 controls of the same age. The third group consisted of 65 samples from BC patients aged 40 to 60 and 13 controls of the same age. PCA and OPLS-DA score plots indicated strong age-specific identification of distinct NCs and BC groups (Fig. 5a–f).

The quality factors for those models amounted to $Q^2 > 0.867$ and $R^2Y > 0.990$, and the *P*-values derived from the permutation tests indicated perfect discrimination of metabolite profiles between those groups. The performance of three models in differentiating between BC patients of different ages and NCs was then evaluated using ROC curve analysis. Based on the cut-off criteria ($FC > 2 < 0.5$, $VIP > 1$; $AUC > 0.7$, *P*-value and $FDR < 0.05$), finally, 65, 55, and 66 chemical compounds appeared to be most relevant for sample distinction between BC patients aged 40 to 60 vs. NCs aged 40 to 60, BC patients aged 61 to 70 versus NCs aged 61 to 70 and BC patients aged 71 to 90 vs. NCs aged 71 to 90 (Table S9–S11, supplementary information 2). Selected metabolites that differentiate BC patients with different age from NCs are shown in Fig. 5g–j.

Pathway analysis of potential biomarkers. MetaboAnalyst 5.0 was used to perform a metabolic pathway impact analysis to identify the most relevant pathways involved in the observed changes in urine metabolite levels. Pathway and quantitative pathway enrichment analyses were performed on 116 metabolites identified in the UHPLC–UHRMS analysis. A total of 100 compounds were discovered to be relevant to human metabolism. When comparing BC to NCs, four metabolic pathways were significantly impacted (*P*-value): tryptophan metabolism, pantothenate and CoA biosynthesis, tyrosine metabolism and vitamin B6 metabolism. Figure 6a and Table S2 show the results of the pathway impact analysis (supplementary information 1).

We conducted a quantitative enrichment analysis with the MetaboAnalyst 5.0 pathway enrichment module and its associated Small Molecule Pathway Database (SMPDB) to expand the metabolomic study of bladder cancer-related pathways. Figure 6b and Table S3 show two significant pathways associated with bladder cancer: tryptophan metabolism, and vitamin B6 metabolism.

Discussion

Over the last ten years, metabolomics studies have revealed potentially valuable information regarding the metabolic profiles of individuals afflicted with various diseases, including cancer, and possible disease progression or recurrence markers. Rapidly proliferating cancer cells have the potential to change their metabolism to suit their increased energy demands. Monitoring variations in the concentrations of various metabolites in cancer cells or bodily fluids could be a source of novel cancer biomarkers. Several studies have demonstrated the significant potential of metabolomic markers in diagnosing multiple cancers and the comprehension of the mechanisms behind cancer onset and progression³⁹.

This investigation compares changes in urine metabolite levels between 100 patients with BC and 100 NCs. The 51 metabolites that distinguished these two groups the most were identified. A large group of compounds differentiating the NCs group from the BC patients (table S1, supplementary information 1) was lipids and its derivatives. Lipids serve as long-term energy storage and are the fundamental building blocks of all cell membranes. Furthermore, lipids play essential roles in living organisms, including nerve impulse transmission, hormone production and regulation, cushioning vital organs, intracellular signal transmission, and cell transporting systems. Lipid metabolism is involved in several processes related to cancer cells. Numerous studies over the last decade have shown that lipids and metabolites associated with lipid metabolism may be potential markers in human cancers, including bladder cancer⁴⁰. We found that the urine content of 10 lipids, including four medium-chain fatty acids (2-hydroxyapric acid, sebacic acid, azelaic acid, cis,cis-muconic acid), three acylcarnitines (3-methylglutaryl carnitine, isovaleryl carnitine, L-acetylcarnitine), two long-chain fatty acids (isostearic acid,

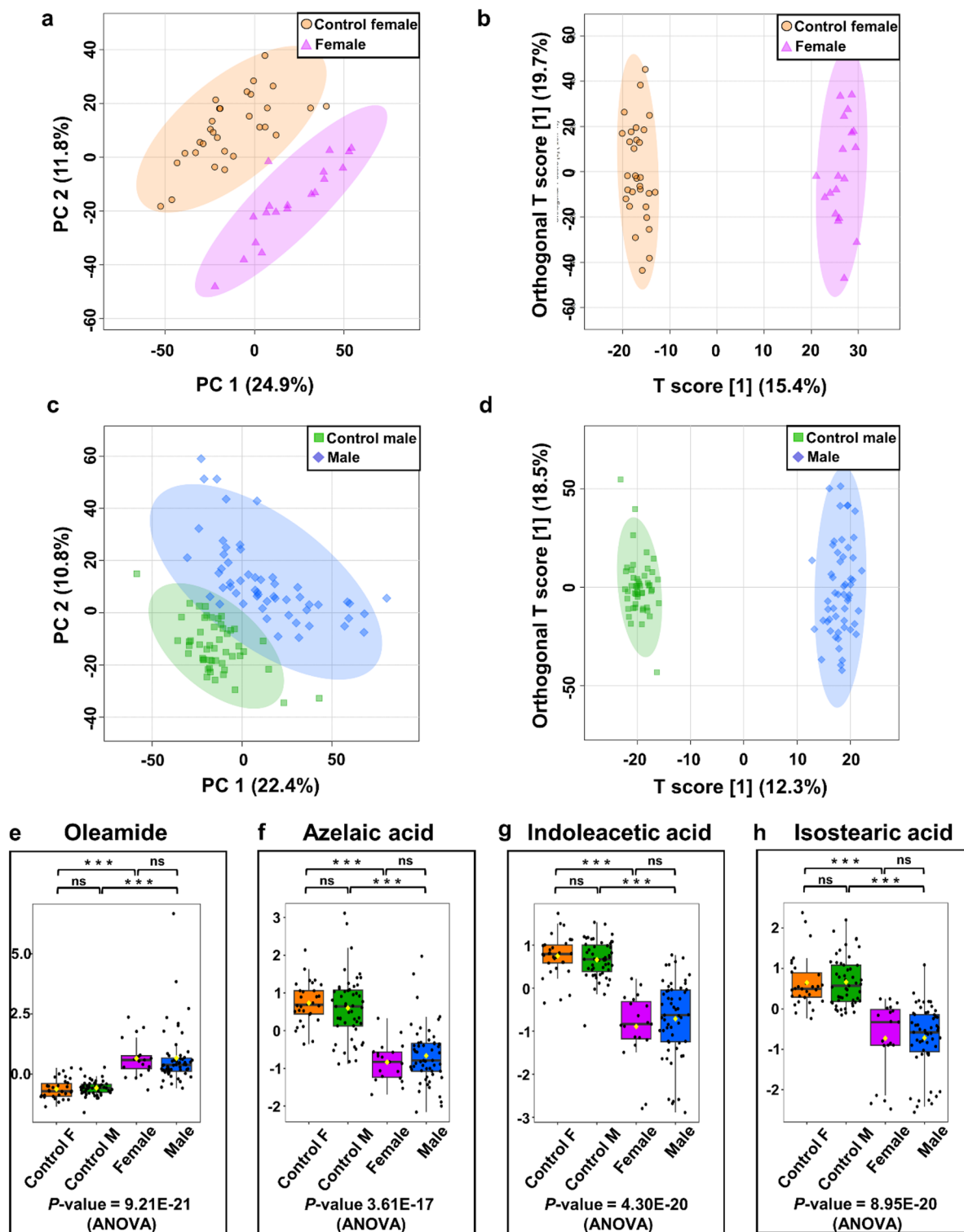


Figure 4. Metabolomic analysis of female/male BC and NCs of urine samples. (a) PCA and (b) OPLS-DA score plots of female BC (violet) and control female (orange) urine samples in the training set. (c) PCA and (d) OPLS-DA score plots of male BC (blue) and control male (green) urine samples. (e–h) The box-and-whisker plots of selected metabolites were observed in control, male, and female BC urine samples.

palmitic acid) and one hydroxy fatty acid (3-hydroxymethylglutaric acid) was significantly higher in the urine of NCs than in the BC subjects. The opposite trend was observed for oleamide (Fig. 1d), which was found in much higher concentrations in the urine of BC patients compared to the NCs group, and which turned out to be the

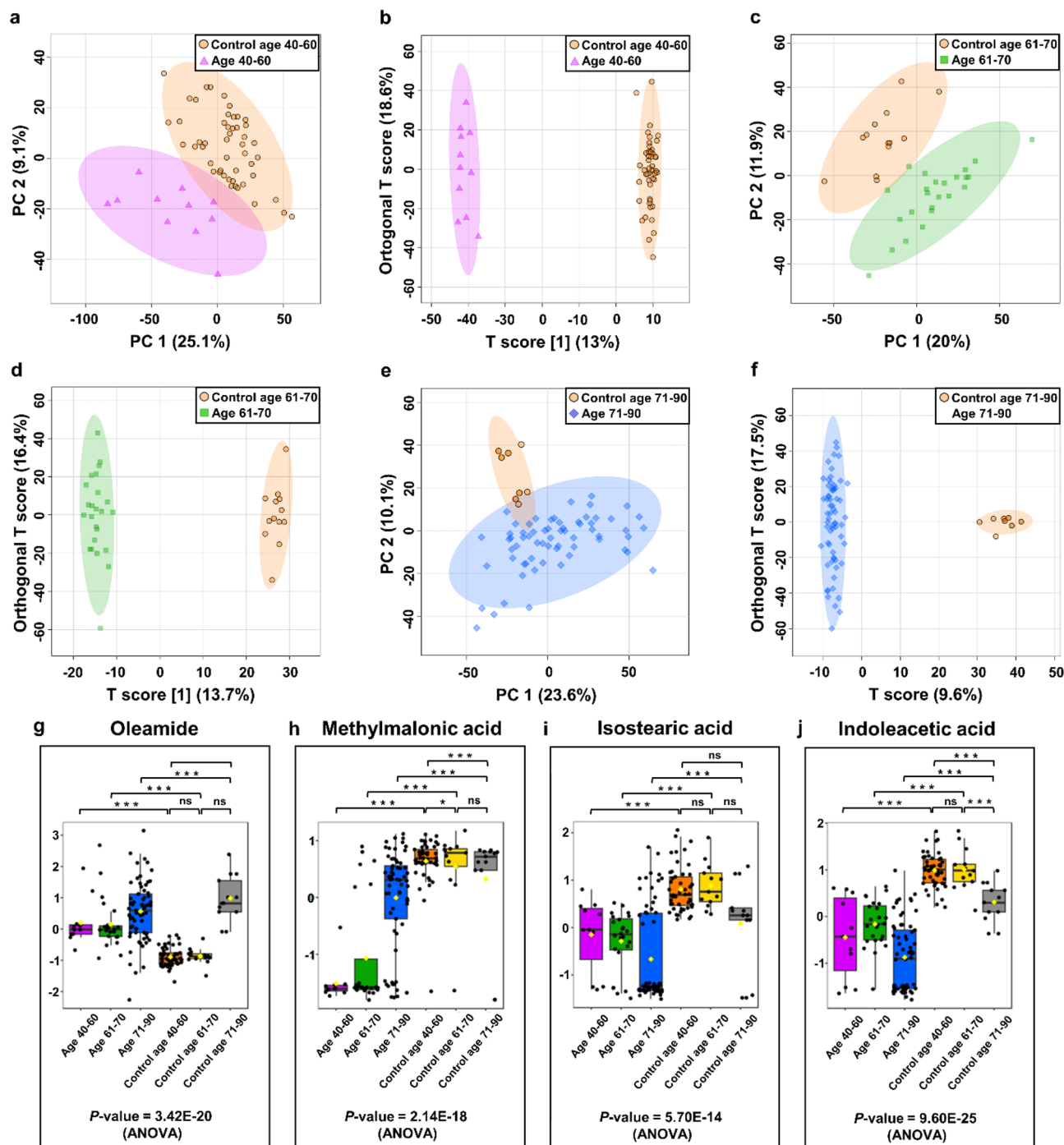


Figure 5. Metabolomic analysis of female/male BC and NCs of urine samples. (a) PCA and (b) OPLS-DA score plots of BC patients aged 40 to 60 (violet) and the control group aged 40 to 60 (orange) of urine samples. (c) PCA and (d) OPLS-DA score plots of BC patients aged 61 to 70 (green) and the control group aged 61 to 70 (orange) of urine samples. (e) PCA and (b) OPLS-DA score plots of BC patients aged 71 to 90 (blue) and the control group aged 71 to 90 (orange) of urine samples. (g–j) The box-and-whisker plots of selected metabolites were observed in control BC urine samples from people of different ages.

most distinguishing compound between these two groups. Of all the lipids recognized as the most differentiating, oleamide, isostearic acid, and azelaic acid with AUC > 0.9 were the most important.

Oleamide is a member of the fatty amides class of organic compounds. It is an endogenous chemical compound found naturally in blood and urine. This compound has been demonstrated to have a wide variety of neuropharmacological effects on many neurochemical systems, and it is recognized as a fatty acid amide that induces sleep⁴¹. Oleamide is an agonist of cannabinoid 1 and 2 (CB1 and CB2) receptors that promote cell growth and migration via adhesion and/or ionic signals at Gap junctions. Recent studies have shown that oleamide

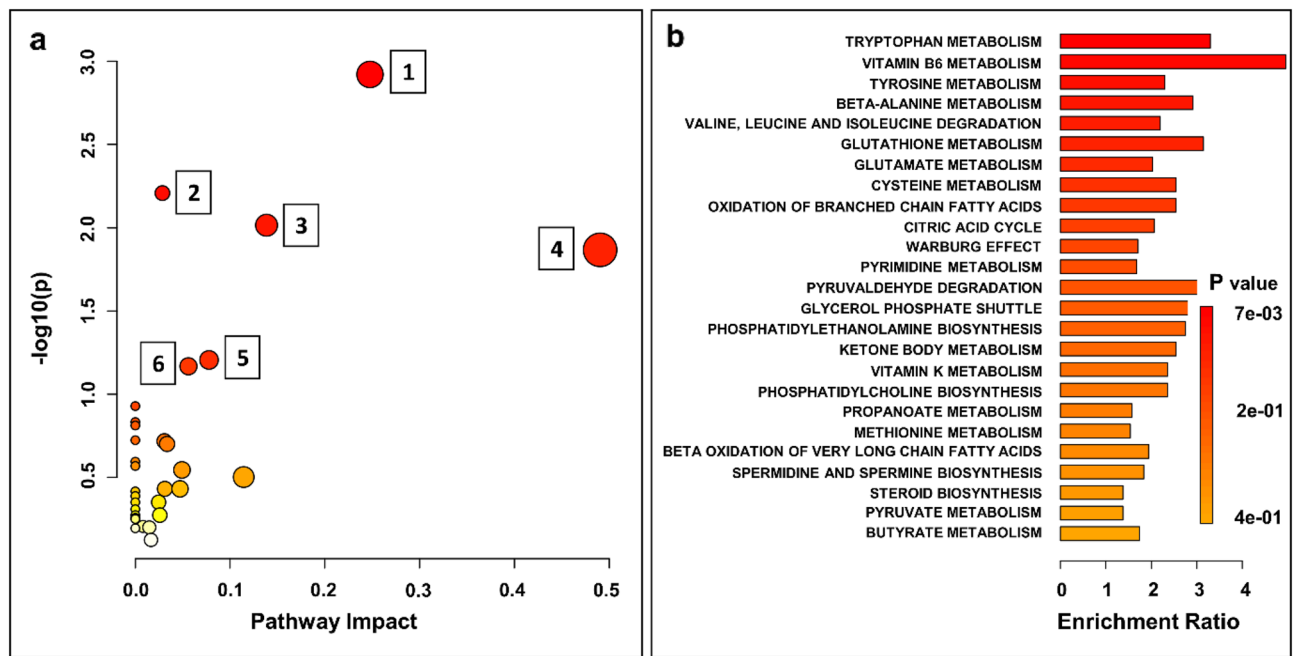


Figure 6. Analysis of the topology of selected statistically significant metabolites in BC. (a) Pathway analysis based on KEGG, with bubble area corresponding to the impact of each pathway and color representing significance from red to white, from greatest to least. (1) tryptophan metabolism; (2) pantothenate and CoA biosynthesis; (3) tyrosine metabolism (4) vitamin B6 metabolism (5) citrate cycle (TCA cycle); (6) beta-alanine metabolism; (b) Quantitative enrichment analysis based on SMPDB.

induces cell death in glioblastoma RG2 cells⁴² and inhibits Caco-2 colon cancer cell proliferation⁴³. Moreover, it was also demonstrated that oleamide increases calcium ions in T24 bladder cancer cell lines, suggesting that this compound may alter the cellular function in the urinary system⁴⁴. Oleamide has not yet been found as a possible biomarker for BC. Yet, an earlier study has revealed that the content of oleamide in the urine of patients with kidney and laryngeal cancer is greater than that of healthy people serving as controls^{45,46} and in the serum of patients with colorectal cancer⁴⁷.

Among the lipids most differentiating cancer and the control group, there were also isostearic (Fig. 1f) and azelaic acids (Fig. 1h). Azelaic acid is a saturated nine-carbon dicarboxylic acid generated from fatty acid oxidation that suppresses neutrophil reactive oxygen species formation. Azelaic acid has been identified as a potential biomarker for colorectal cancer, with significantly lower levels in the urine of patients with this tumor compared to healthy controls⁴⁸. Similarly, in our studies, the urine level of azelaic acid was more deficient in BC patients than NCs (Fig. 1h).

Indoleacetic acid (IAA) was the second compound, after oleamide, to differentiate the BC group from the NCs group (Fig. 1e). IAA is a breakdown product of tryptophan metabolism in mammalian tissues that may be produced by the decarboxylation of tryptamine or the oxidative deamination of tryptophan. Some studies indicated an elevated level of IAA in the urine of patients with cervical cancer⁴⁹ compared to controls, which may be associated with increased secretion of this compound by tumor tissues. IAA was also detected at a high level in serum samples of BC patients compared to healthy controls⁵⁰. Our research shows a significantly lower amount of IAA in BC patients' urine than NCs. Similar results were obtained in analyzing urinary metabolites in patients with breast cancer⁵¹. Moreover, indoleacetic acid is a metabolite of gut bacteria. It is possible that the changes in this metabolite were due to changes in the gut microbiome in BC patients, as previously suggested by Tan et al.⁵⁰.

N-Alpha-acetyllysine is involved in DNA transcriptional activities, including the acetylation of lysine catalyzed by histone acetyltransferase enzymes by adding acetyl groups from acetyl-CoA onto lysine residues histones and nonhistone proteins. In this investigation, the level of *N*-alpha-acetyllysine in urine was higher in the BC group than in NCs individuals (Fig. 1g). This aligns with previous studies conducted by Yumba Mpanga and coworkers, 58, who identified and quantified this compound in the urine of patients with BC. Interestingly, acetyllysine was among the most statistically significant metabolites discriminating against patients with prostate cancer (PC) and healthy individuals at high-significantly lower concentrations in urine from PCa patients⁵².

To implement the proper treatment regimens for BC patients, it is required to clearly and adequately define the stage and grade of this malignancy and indicate the neoplasm. In total, 51 differential metabolites were identified as a potential markers for discriminating between LG BC patients and NCs. Indoleacetic acid (specificity—96%, sensitivity—93%) and isostearic acid (specificity—97%, sensitivity—87%) were found to be the most differentiating compounds in this model, with AUC > 0.9. Fifty-nine differential metabolites were identified as a potential marker for discriminating between HG BC patients and NCs. Among these metabolites, 5 had tremendous discriminant significance with an AUC greater than 0.95, including isostearic acid, oleamide, indoleacetic acid, 2-furoylglycine, and azelaic acid. Apart from oleamide, other compounds were identified in significantly lower

levels in the urine of HG BC patients compared to NCs. 2-Furoylglycine belongs to the *N*-acyl- α amino acids class and is a product of fatty acid catabolism linked to mitochondrial fatty acid beta-oxidation. Earlier urine analysis of prostate cancer patients also showed significantly decreased levels of this compound in the cancer group compared to controls⁵³.

Our study shows that a urine-based metabolite profile could accurately discriminate different stages of BC (pTa, pT1, and pT2) and NCs (Table 2). In the urine of patients with pTa, pT1, and pT2 stages of BC, we identified 22 the most differentiating compounds (with AUC > 0.91). One of the compounds that determined stages of BC from NCs to the greatest extent was benzaldehyde, which was identified in a much higher amount in the urine of patients from the control group. Benzaldehyde is a simple alkane whose levels rise during inflammation and oxidative stress, both of which are hallmarks of cancer⁵⁴. In previous studies benzaldehyde was found significantly increased in BC cells lines⁵⁵. Aldehydes are established indicators of oxidative stress and tissue damage, however in our study this does not explain the substantially lower quantities found in BC patients' urine.

Many studies have found that clinical conditions, genetic background, race, age, sex, lifestyle, diet, and medicines strongly impact the urine metabolic profile^{32,56}. Age and gender are significant determinants that influence the urine metabolome, according to inter-individual variance analyses. Knowing the specific differences in metabolites linked with age and gender can give a foundation for comparative studies as well as insight into the metabolic systems of a healthy body. In literature there are evidences to suggest that sex-related differentiation can influence metabolomic profiles. Several studies have demonstrated differences in metabolomic profiles between males and females in various physiological and pathological conditions⁵⁷. For example, a study published by Fan et al.⁵⁸ analyzed the urine metabolome of healthy individuals and found significant sex-related differences in metabolic profiles. The study identified several metabolites that showed sex-specific variations, suggesting inherent metabolic distinctions between males and females. Another example of report of this kind was published recently⁵⁹. The researchers identified sex-specific metabolic signatures and found that certain metabolites were significantly different between males and females, indicating potential sex-related metabolic variations. Furthermore, sex-related differences in metabolomic profiles have been observed in various diseases and conditions, including cardiovascular diseases, cancer, diabetes, and obesity. These differences may arise from variations in hormonal levels, genetic factors, and sex-specific physiological processes. However, sex-related differentiation of

No	Metabolites	Formula	<i>m/z</i> ^a	RT [min]	pTa versus control			pT1 versus control			pT2 versus control		
					FC ^b	Spec. [%] ^c	Sens. [%] ^c	FC ^b	Spec. [%] ^c	Sens. [%] ^c	FC ^b	Spec. [%] ^c	Sens. [%] ^c
1	2,5-Furandicarboxylic acid ^{d,e,g}	C ₆ H ₄ O ₅	157.0130	1.28	–	–	–	0.19	83	100	–	–	–
2	2-Furoylglycine ^{d,e,f,g}	C ₇ H ₇ NO ₄	170.0447	1.60	–	–	–	0.07	97	87	0.13	93	92
3	3,4-Dihydroxymandelic acid ^d	C ₈ H ₈ O ₅	226.0709	1.85	–	–	–	–	–	–	0.20	90	83
4	Azelaic acid ^{d,e,f,g}	C ₉ H ₁₆ O ₄	171.1014	2.54	–	–	–	0.26	79	93	0.30	93	100
5	Benzaldehyde ^d	C ₇ H ₆ O	107.0490	3.30	0.29	100	94	0.32	100	87	0.27	87	92
6	Choline ^d	C ₅ H ₁₄ NO	143.0702	1.81	–	–	–	0.19	81	87	–	–	–
7	<i>Cis,cis</i> -Muconic acid ^{d,e,g}	C ₆ H ₆ O ₄	125.0232	1.53	–	–	–	0.09	91	93	0.08	83	92
8	Indoleacetic acid ^{d,e,f}	C ₁₀ H ₉ NO ₂	217.0974	2.02	0.18	87	87	0.09	96	93	0.08	90	100
9	Isostearic acid ^{d,f,g}	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	285.2785	0.20	0.14	87	87	0.20	87	87	0.47	93	92
10	Methylmalonic acid ^d	C ₄ H ₆ O ₄	119.0344	0.03	–	–	–	0.19	94	87	–	–	–
11	Mevalonic acid ^d	C ₆ H ₁₂ O ₄	190.1069	2.03	–	–	–	–	–	–	0.28	90	83
12	<i>N</i> -Acetylserotonin ^{d,e}	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂	175.1227	1.75	–	–	–	0.17	90	93	0.18	97	83
13	<i>N</i> -Alpha-acetyllysine ^{d,e,f}	C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₃	268.1056	0.14	–	–	–	14.06	87	87	–	–	–
14	Oleamide ^{d,f,g}	C ₁₈ H ₃₅ NO	282.2790	5.08	–	–	–	6.99	96	100	2.14	83	83
15	Palmitamide ^{d,f,g}	C ₁₆ H ₃₃ NO	256.2633	5.02	–	–	–	4.04	93	93	–	–	–
16	Pantothenic acid ^{d,f,g}	C ₉ H ₁₇ NO ₅	220.1179	1.68	–	–	–	–	–	–	0.44	90	92
17	Phenylacetylglutamine ^{d,e,g}	C ₁₀ H ₁₁ NO ₃	194.0811	2.19	–	–	–	–	–	–	0.24	83	83
18	Phenylglyoxylic acid ^{d,e,f}	C ₈ H ₆ O ₃	151.0387	1.85	–	–	–	–	–	–	0.15	90	92
19	Picolinic acid ^{d,f,g}	C ₈ H ₈ N ₂ O ₃	181.0607	1.88	–	–	–	0.40	90	80	–	–	–
20	Sebacic acid ^{d,e,f}	C ₁₀ H ₁₈ O ₄	203.1275	2.22	–	–	–	0.28	81	93	0.38	83	92
21	Succinic acid ^{d,e,f}	C ₄ H ₆ O ₄	119.0344	0.26	–	–	–	0.46	94	80	–	–	–
22	Vanillic acid ^{d,e,g}	C ₈ H ₈ O ₄	169.0491	1.79	–	–	–	–	–	–	0.27	87	92

Table 2. Differential metabolites for discrimination between pTa, pT1 and pT2 BC patients and NCs (P -value < 0.05; FDR < 0.05; VIP > 1; FC < 0.5 and > 2; AUC > 0.91). ^aExperimental monoisotopic mass of ion; ^bfold change between cancer and control serum calculated from the abundance mean values for each group – cancer-to-normal ratio; ^cROC curve analysis for individual biomarkers; ^dthe metabolites identified by high precursor mass accuracy; ^ethe metabolites identified by matching retention time; ^fthe metabolites identified by matching isotopic pattern; ^gthe metabolites identified by matching MS/MS fragment spectra; FC: fold change; *m/z*: mass-to-charge ratio; RT: retention time; Sens.: Sensitivity; Spec.: Specificity.

metabolomic profiles is a complex phenomenon influenced by multiple factors, and further research is needed to fully understand its underlying mechanisms and implications especially in BC.

Our research further explored the detailed urinary metabolites associated with BC patients of different sex. As presented in Table S3 (supplementary information 1), we have identified 19 of the most differentiating metabolites (AUC > 0.9) that most significantly determine the urine of males and females with BC from NCs. One of the compounds that the most differentiate males from the control group is tryptophan, which was found in significantly more significant amounts in urine samples from males with BC patients compared to females with BC and NCs. Tryptophan is involved in several mechanisms, including synthesizing biogenic amines such as serotonin, melatonin, and tryptamine. It contributes to the formation of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺), an essential coenzyme for energy metabolism in animals (such as the citrate cycle). Prior research suggested that tryptophan metabolism may influence human lifespan regulation.

Tryptophan metabolism has been extensively studied in relation to bladder cancer, and its significance has been consistently reported in the literature⁶⁰. Previous studies have observed significant increases in tryptophan levels in urine, serum, and tissue samples from bladder cancer patients compared to control groups^{18,61–63}. Sex-related differences have been identified in the metabolism of tryptophan, suggesting a potential link between sex hormones and tryptophan-related pathways in the context of bladder cancer^{32,61}. The disruption of tryptophan metabolism in bladder cancer patients involves various mechanisms affecting enzymes and pathways. One explanation is the increased degradation of tryptophan. Bladder cancer cells may upregulate enzymes like tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) or indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), leading to heightened tryptophan degradation. This depletion reduces the availability of tryptophan for vital cellular functions⁶⁴. Additionally, the activation of the kynurenine pathway was implicated. In bladder cancer, this pathway can become activated, resulting in the production of immunosuppressive and tumor-promoting metabolites like kynurenine, 3-hydroxykynurenine, and kynurenic acid⁶⁵. Alterations in enzyme expression also contribute to tryptophan metabolism disruption. Changes in the levels of enzymes involved in tryptophan metabolism, such as tryptophan hydroxylase, kynurenine aminotransferases, and kynureninase, can impact the conversion of tryptophan into downstream metabolites, leading to metabolic dysregulation⁶⁶. Immune cells like tumor-associated macrophages or regulatory T cells can stimulate the expression of IDO or TDO, resulting in tryptophan depletion and immune evasion⁶⁷. These various mechanisms collectively contribute to the disruption of tryptophan metabolism in bladder cancer, highlighting the complexity of its involvement in the disease.

In conclusion, we show that ultra-high-resolution mass spectrometry is an effective method for characterizing urine metabolome variations in BC. We have indicated several dozen metabolites that have the potential to distinguish urine from BC patients from the urine of healthy volunteers, considering the division into different grades and stages of BC cancer as well as gender and age. To date, there is no published research indicating the specific combinations of metabolites like these proposed by our study that could potentially serve as important markers for early detection of BC. Furthermore, it was crucial to consider factors such as the stage and grade of malignancy, as well as the influence of sex and age, which can further contribute to the complexity of identifying relevant metabolomic signatures in BC. Future investigations are needed to explore these potential associations and provide a deeper understanding of the intricate interplay between metabolites, disease characteristics, and individual factors in the context of BC. Our results have the potential to help develop simple, non-invasive specific, and sensitive diagnostic tests to detect different stages and grades of BC, as well as to monitor disease recurrence.

Data availability

The corresponding author's data supporting this study's findings are available upon reasonable request.

Received: 24 March 2023; Accepted: 12 June 2023

Published online: 16 June 2023

References

1. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
2. Li, M. *et al.* Recent progress in biosensors for detection of tumor biomarkers. *Molecules* **27**, 7327 (2022).
3. Steinestel, K. *et al.* Detection of urinary molecular marker test in urothelial cell carcinoma: A review of methods and accuracy. *Diagnostics* **12**, 2696 (2022).
4. Di Meo, N. A. *et al.* Metabolomic approaches for detection and identification of biomarkers and altered pathways in bladder cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 4173 (2022).
5. Ng, K., Stenzl, A., Sharma, A. & Vasdev, N. Urinary biomarkers in bladder cancer: A review of the current landscape and future directions. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **39**, 41–51 (2021).
6. Lee, H. H. & Ham, W. S. Perioperative immunotherapy in muscle-invasive bladder cancer. *Transl. Cancer Res.* **9**, 6546–6553 (2020).
7. Petrella, G., Ciufolini, G., Vago, R. & Cicero, D. O. Urinary metabolic markers of bladder cancer: A reflection of the tumor or the response of the body?. *Metabolites* **11**, 756 (2021).
8. Yang, Q. *et al.* Metabolomics biotechnology, applications, and future trends: A systematic review. *RSC Adv.* **9**, 37245–37257 (2019).
9. Raja, G., Jung, Y., Jung, S. H. & Kim, T. J. 1H-NMR-based metabolomics for cancer targeting and metabolic engineering – A review. *Process. Biochem.* **99**, 112–122 (2020).
10. Liu, X. *et al.* LC-MS-based plasma metabolomics and lipidomics analyses for differential diagnosis of bladder cancer and renal cell carcinoma. *Front. Oncol.* **10**, 717 (2020).
11. Pan, Z. & Raftery, D. Comparing and combining NMR spectroscopy and mass spectrometry in metabolomics. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 525–527 (2007).
12. Batista, R. *et al.* Biomarkers for bladder cancer diagnosis and surveillance: A comprehensive review. *Diagnostics* **10**, 39 (2020).
13. Lokeshwar, S. D. *et al.* Molecular oncology of bladder cancer from inception to modern perspective. *Cancers* **14**, 2578 (2022).
14. Soorojebally, Y. *et al.* Urinary biomarkers for bladder cancer diagnosis and NMIBC follow-up: A systematic review. *World J. Urol.* **41**, 345–359 (2023).

15. Rasteiro, A. M., Sá e Lemos, E., Oliveira, P. A. & Gil da Costa, R. M. Molecular markers in urinary bladder cancer: Applications for diagnosis, prognosis and therapy. *Vet. Sci.* **9**, 107 (2022).
16. Oto, J. *et al.* LC–MS metabolomics of urine reveals distinct profiles for non-muscle-invasive and muscle-invasive bladder cancer. *World J. Urol.* **40**, 2387–2398 (2022).
17. Loras, A. *et al.* Integrative metabolomic and transcriptomic analysis for the study of bladder cancer. *Cancers* **11**, 686 (2019).
18. Wittmann, B. M. *et al.* Bladder cancer biomarker discovery using global metabolomic profiling of urine. *PLoS ONE* **9**, e115870 (2014).
19. Peng, J., Chen, Y. T., Chen, C. L. & Li, L. Development of a universal metabolome-standard method for long-term LC-MS metabolome profiling and its application for bladder cancer urine-metabolite- biomarker discovery. *Anal. Chem.* **86**, 6540–6547 (2014).
20. Shao, C. H. *et al.* Metabolite marker discovery for the detection of bladder cancer by comparative metabolomics. *Oncotarget* **8**, 38802–38810 (2017).
21. Cheng, X. *et al.* Metabolomics of non-muscle invasive bladder cancer: Biomarkers for early detection of bladder cancer. *Front. Oncol.* **8**, 1–11 (2018).
22. Zhou, Y. *et al.* Discovery and validation of potential urinary biomarkers for bladder cancer diagnosis using a pseudotargeted GC-MS metabolomics method. *Oncotarget* **8**, 20719–20728 (2017).
23. Lett, L. *et al.* Investigation of urinary volatile organic compounds as novel diagnostic and surveillance biomarkers of bladder cancer. *Br. J. Cancer* **127**, 329–336 (2022).
24. Issaq, H. J. *et al.* Detection of bladder cancer in human urine by metabolomic profiling using high performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Urol.* **179**, 2422–2426 (2008).
25. Huang, Z. *et al.* Bladder cancer determination via two urinary metabolites: A biomarker pattern approach. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, M111.007922 (2011).
26. Putluri, N. *et al.* Metabolomic profiling reveals potential markers and bioprocesses altered in bladder cancer progression. *Cancer Res.* **71**, 7376–7386 (2011).
27. Huang, Z. *et al.* Holistic metabolomic profiling of urine affords potential early diagnosis for bladder and kidney cancers. *Metabolomics* **9**, 119–129 (2013).
28. Alberice, J. V. *et al.* Searching for urine biomarkers of bladder cancer recurrence using a liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis-mass spectrometry metabolomics approach. *J. Chromatogr. A* **1318**, 163–170 (2013).
29. Jin, X. *et al.* Diagnosis of bladder cancer and prediction of survival by urinary metabolomics. *Oncotarget* **5**, 1635–1645 (2014).
30. Li, J. *et al.* Bladder cancer biomarker screening based on non-targeted urine metabolomics. *Int. Urol. Nephrol.* **54**, 23–29 (2021).
31. Plyushchenko, I. V. *et al.* Omics untargeted key script: R-based software toolbox for untargeted metabolomics with bladder cancer biomarkers discovery case study. *J. Proteome Res.* <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00392> (2021).
32. Liu, X. *et al.* Investigation of the urinary metabolic variations and the application in bladder cancer biomarker discovery. *Int. J. Cancer* **143**, 408–418 (2018).
33. Shen, C. *et al.* Developing urinary metabolomic signatures as early bladder cancer diagnostic markers. *OMICS* **19**, 1–11 (2015).
34. Łuczynowski, K. *et al.* Metabolic evaluation of urine from patients diagnosed with high grade (HG) bladder cancer by SPME-LC-MS method. *Molecules* **26**, 2194 (2021).
35. Nizioł, J. *et al.* Untargeted ultra-high-resolution mass spectrometry metabolomic profiling of blood serum in bladder cancer. *Sci. Rep.* **12**, 1–13 (2022).
36. Nizioł, J. *et al.* Nuclear magnetic resonance and surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-based metabolome profiling of urine samples from kidney cancer patients. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **193**, 113752 (2021).
37. Pang, Z. *et al.* MetaboAnalyst 5.0: Narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Res.* **49**, W388–W396 (2021).
38. Ho, S. Y., Phua, K., Wong, L. & Bin Goh, W. W. Extensions of the external validation for checking learned model interpretability and generalizability. *Patterns* **1**, 100129 (2020).
39. Han, J., Li, Q., Chen, Y. & Yang, Y. Recent metabolomics analysis in tumor metabolism reprogramming. *Front. Mol. Biosci.* **8**, 763902 (2021).
40. Besiroglu, H. Lipid metabolism profiling and bladder cancer. *Metabolomics (Los Angel)* **5**, 1–4 (2015).
41. Cravatt, B. F. *et al.* Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. *Science* **268**, 1506–1509 (1995).
42. Torres-Román, A. L. *et al.* Oleamide induces cell death in glioblastoma RG2 cells by a cannabinoid receptor-independent mechanism. *Neurotox. Res.* **38**, 941–956 (2020).
43. Han, J., Park, Y., Kim, E. J., Jin, H. & Jun, J.-G. Isolation and identification of oleamide as a growth inhibitory compound from the medium conditioned by colon cancer cells treated with conjugated linoleic acid. *Bull. Korean Chem. Soc* **23**, 1373 (2002).
44. Lo, Y. K. *et al.* Effect of oleamide on Ca²⁺ signaling in human bladder cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* **62**, 1363–1369 (2001).
45. Chen, J. *et al.* Urinary metabolomics for discovering metabolic biomarkers of laryngeal cancer using UPLC-QTOF/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **167**, 83–89 (2019).
46. Arendowski, A., Ossoliński, K., Nizioł, J. & Ruman, T. Screening of urinary renal cancer metabolic biomarkers with gold nanoparticles-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Sci.* **36**, 1521–1527 (2020).
47. Ni, Y., Xie, G. & Jia, W. Metabonomics of human colorectal cancer: New approaches for early diagnosis and biomarker discovery. *J. Proteome Res.* **13**, 3857–3870 (2014).
48. Zhu, C. *et al.* Distinct urinary metabolic biomarkers of human colorectal cancer. *Dis. Mark.* <https://doi.org/10.1155/2022/1758113> (2022).
49. Liang, Q., Yu, Q., Wu, H., Zhu, Y.-Z. & Zhang, A.-H. Metabolite fingerprint analysis of cervical cancer using LC-QTOF/MS and multivariate data analysis. *Anal. Methods* **6**, 3937–3942 (2014).
50. Tan, G. *et al.* Three serum metabolite signatures for diagnosing low-grade and high-grade bladder cancer. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
51. Cala, M., Aldana, J., Sánchez, J., Guio, J. & Meesters, R. J. W. Urinary metabolite and lipid alterations in Colombian Hispanic women with breast cancer: A pilot study. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **152**, 234–241 (2018).
52. Fernández-Peralbo, M. A. *et al.* Prostate cancer patients-negative biopsy controls discrimination by untargeted metabolomics analysis of urine by LC-QTOF: Upstream information on other omics. *Sci. Rep.* **6**, 1–11 (2016).
53. Lima, A. R. *et al.* New findings on urinary prostate cancer metabolome through combined GC–MS and 1H NMR analytical platforms. *Metabolomics* **16**, 1–9 (2020).
54. Poli, D. *et al.* Determination of aldehydes in exhaled breath of patients with lung cancer by means of on-fiber-derivatization SPME–GC/MS. *J. Chromatogr. B* **878**, 2643–2651 (2010).
55. Rodrigues, D. *et al.* Volatile metabolomic signature of bladder cancer cell lines based on gas chromatography–mass spectrometry. *Metabolomics* **14**, 1–15 (2018).
56. Slupsky, C. M. *et al.* Investigations of the effects of gender, diurnal variation, and age in human urinary metabolomic profiles. *Anal. Chem.* **79**, 6995–7004 (2007).
57. Costanzo, M. *et al.* Sex differences in the human metabolome. *Biol. Sex Differ.* **13**, 1–18 (2022).
58. Fan, S. *et al.* Sex-associated differences in baseline urinary metabolites of healthy adults. *Sci. Rep.* **8**, 1–11 (2018).
59. Vignoli, A., Tenori, L., Luchinat, C. & Saccenti, E. Age and sex effects on plasma metabolite association networks in healthy subjects. *J. Proteome Res.* **17**, 97–107 (2018).
60. Bryan, G. T. The role of urinary tryptophan metabolites in the etiology of bladder cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* **24**, 841–847 (1971).

61. Alberice, J. V. *et al.* Searching for urine biomarkers of bladder cancer recurrence using a liquid chromatography–mass spectrometry and capillary electrophoresis–mass spectrometry metabolomics approach. *J. Chromatogr. A* **1318**, 163–170 (2013).
62. Kim, J. W. *et al.* Metabolomic screening and star pattern recognition by urinary amino acid profile analysis from bladder cancer patients. *Metabolomics* **6**, 202–206 (2010).
63. Ossoliński, K. *et al.* Metabolomic and elemental profiling of blood serum in bladder cancer. *J. Pharm. Anal.* **12**, 889–900 (2022).
64. Lee, S. H. *et al.* Tryptophan–kynurenine ratio as a biomarker of bladder cancer. *BJU Int.* **127**, 445–453 (2021).
65. Park, S. Y. & Nam, J. S. Kynurenine pathway enzyme KMO in cancer progression: A tip of the Iceberg. *EBioMedicine* <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102762> (2020).
66. Platten, M., Nollen, E. A. A., Röhrig, U. F., Fallarino, F. & Opitz, C. A. Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.* **18**, 379–401 (2019).
67. Fattahi, M. J., Haghshenas, M. R. & Ghaderi, A. Immunometabolism in the bladder cancer microenvironment. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targ.* **22**, 1201–1216 (2022).

Acknowledgements

Research was supported mainly by National Science Centre (Poland), research project SONATA Number UMO-2018/31/D/ST4/00109.

Author contributions

J.N.: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Resources, Data Curation, Writing—Original draft, Writing—Review & Editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition, K.O.: Investigation, Resources; Writing—Original draft; A. P.: Investigation; Data Curation; A.K.: Investigation, Data Curation; A.O.: Resources; T.O.: Resources; A. N.: Writing—Original draft T.R.: Methodology, Resources, Data Curation, Writing—Review & Editing, Supervision.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36874-y>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.N.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023