

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## **Lipidomická analýza u pacientok s karcinómom prsníkov**

### **DIPLOMOVÁ PRÁCA**

Autor: **Bc. Kristína Haršányiová**

Študijný program: N1406 Biochemie

Študijní obor: Biochemie

Forma štúdia: Prezenční

Vedúci práce: **Mgr. Radana Brumarová, Ph.D.**

Rok: 2020

## **Prehlásenie**

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstiev. Súhlasím so zverejnením práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som oboznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb. autorský zákon v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa .....

podpis diplomanta

## **Pod'akovanie**

Chcela by som pod'akovať hlavne vedúcej svojej diplomovej práce Mgr. Radane Brumarovej, Ph.D. a Mgr. Hane Janečkovej, Ph.D. za odborné konzultácie, všestrannú pomoc, podporu, ochotu a množstvo trpezlivosti pri spisovaní tejto záverečnej práce. Ďalšie pod'akovanie patrí tímu pod vedením prof. MUDr. Zdeňka Zadáka, CSc. z Centra pro výzkum a vývoj, Fakultní nemocnice Hradec Králové, za poskytnutie vzoriek, vďaka ktorým mohla byť táto štúdia realizovaná.

## Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Bc. Kristína Haršányiová
Názov práce	Lipidomická analýza u pacientok s karcinómom prsníkov
Typ práce	Diplomová
Pracovisko	Ústav molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, Laboratoř metabolomiky
Vedúci práce	Mgr. Radana Brumarová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

### Abstrakt

Táto diplomová práca bola zameraná na lipidomickú analýzu potu pacientok, u ktorých bola diagnostikovaná rakovina prsníkov. Rakovina prsníkov patrí k najzávažnejším zhubným nádorovým ochoreniam postihujúcim ženy. Toto ochorenie vzniká následkom zvýšenej proliferácie buniek v určitej oblasti prsníkov, pričom často napadá okolité uzliny a metastázuje. Do dnešnej doby neexistuje rýchla a efektívna diagnostika, ktorá by túto chorobu okamžite odhalila, a z tohto dôvodu sa intenzívne hľadajú biomarkery rakoviny v rôznych telových tekutinách ako napr. v krvnej plazme. V našom prípade sa jedná o pilotný experiment v tejto oblasti výskumu. Najskôr boli optimalizované metódy odberu potu a extrakcie lipidov. Následne boli vzorky potu merané lipidomickou analýzou pomocou ultravysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografii v kombinácii s hmotnostnou spektrometriou. Dáta boli štatisticky vyhodnotené viacrozmernými a jednorozmernými metódami. Boli pozorované zmeny v hladinách vybraných lipidov zo skupín ceramidov, hexaglykozylceramidov, mastných kyselín, lyzofosfatidylcholínov a lyzofosfatidyletanolamínov, a taktiež boli porovnávané rozdiely v určitých štádiách rakoviny v zrovnaní s kontrolami.

Kľúčové slová	rakovina prsníkov, pot, lipidomika, hmotnostná spektrometria
Počet strán	85
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

## Bibliographical identification

Name and surname of the author	Bc. Kristína Haršányiová
Title	Lipidomic analysis in female patients with breast carcinoma
Type of thesis	Diploma
Department	Institute of Molecular and Translational Medicine Faculty of Medicine and Dentistry Palacký University Olomouc, Laboratory of metabolomics
Supervisor	Mgr. Radana Brumarová, Ph.D.
The year of presentation	2020

### Abstract

This diploma thesis was focused on lipidomic analysis of sweat in female patients with diagnosed breast carcinoma. Breast carcinoma is one of the most serious malignancies affecting women. This disease is result of increased proliferation of cells in certain area of the breast, where it can spread to surrounding nodes and metastasize. To this day, there is no quick and effective diagnostic, which would immediately detect this disease, and for this reason there is intensive research of new biomarkers of cancer in various body fluids, for example in blood plasma. In our case, this was pilot experiment in this field of research. At first, the method of sweat collection and extraction of the lipids were optimized. Then, the samples were analyzed by lipidomic analysis by ultra high performance liquid chromatography in combination with mass spectrometry. Data were statistically evaluated with multidimensional and one-dimensional methods. Changes in levels of lipids in groups of ceramides, hexaglycosylceramides, fatty acids, lysophosphatidylcholines and lysophosphatidylethanolamines were observed. Also the differences in certain stages of cancer between patients and controls were compared.

Key words	breast cancer, sweat, lipidomics, mass spectrometry
Number of pages	85
Number of appendices	0
Language	Slovak

## Obsah

<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>10</b>
2.1 Karcinóm prsníkov .....	10
2.1.1 Anatómia prsníka .....	12
2.1.2 Diagnostika .....	14
2.1.3 TNM klasifikácia.....	15
2.1.4 Neinvazívny karcinóm.....	18
2.1.5 Invazívny karcinóm.....	19
2.1.6 Liečba .....	21
2.2 Pot.....	24
2.2.1 Ekrinné žľazy .....	26
2.2.2 Apokrinné žľazy.....	29
2.2.3 Apoekrinné žľazy .....	30
2.2.4 Využitie potu v súčasnej medicíne.....	31
2.3 Lipidomika .....	34
<b>3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ</b> .....	<b>37</b>
3.1 Materiál a chemikálie.....	37
3.1.1 Biologický materiál .....	37
3.1.2 Chemikálie .....	38
3.1.3 Prístrojové vybavenie .....	38
3.2 Optimalizácia odberu potu.....	38
3.3 Optimalizácia extrakcie potu.....	38
3.4 Lipidomická analýza potu.....	39
3.4.1 Príprava vzoriek .....	39
3.4.2 Analýza pomocou UHPLC-MS/MS.....	40

3.4.3 Spracovanie dát .....	42
<b>4 VÝSLEDKY .....</b>	<b>44</b>
4.1 Optimalizácia odberu potu .....	44
4.2 Optimalizácia extrakcie potu.....	46
4.3 Lipidomická analýza .....	47
4.3.1 Štatistická analýza .....	47
4.4 Finálna optimalizácia metódy odberu potu.....	68
4.4.1 Pomôcky .....	68
4.4.2 Chemikálie .....	68
4.4.3 Príprava frity pred odberom.....	68
4.4.4 Odber potu .....	68
<b>5 DISKUSIA.....</b>	<b>69</b>
<b>6 ZÁVER.....</b>	<b>76</b>
<b>7 LITERATÚRA.....</b>	<b>77</b>
<b>8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....</b>	<b>85</b>

## **Ciele práce**

### Teoretická časť:

Vypracovanie literárnej rešerše na tému karcinómu prsníkov (jeho rozdelenia, diagnostiky a liečby), potu (popis jednotlivých potných žliaz a využitie potu v diagnostike) a lipidomickej analýzy.

### Experimentálna časť:

Optimalizácie odberu a prípravy vzoriek potu.

Vykonanie lipidomickej analýzy pomocou UHPLC-MS/MS vzoriek potu u žien s karcinómom prsníkov.

Štatistické spracovanie získaných dát a následné vyhodnotenie získaných informácií.



# 1 ÚVOD

Rakovina prsníkov je najrozšírenejším invazívnym karcinómom, ktorý postihuje ženy po celom svete. V Českej republike dosahovala incidencia v rokoch 2003-2007 približne 8 pacientok na 100 000 žien, pričom na Slovensku bolo toto číslo o niečo nižšie, približne 6 pacientok na rovnaký počet žien (Forman *et al.*, 2014). Najviac postihovanou skupinou sú ženy okolo 60.-ho roku života, pričom nárast chorých je v dnešnej dobe pozorovaný už u žien od 40.-ho roku. Predpokladá sa, že sa táto veková hranica bude aj naďalej znižovať. Jedným z najdôležitejších faktorov, ktoré napomáhajú v boji proti tejto chorobe je včasná diagnostika. Medzi najčastejšie formy diagnostiky patrí samovyšetrenie, mamografia, a v prípade akéhokoľvek nálezu, biopsia. Práve posledná metóda patrí medzi najvýznamnejšie diagnostické techniky, ktoré môžu potvrdiť, alebo vyvrátiť, prítomnosť nádoru. Vzhľadom k tomu, že sa jedná o vysoko invazívnu metódu, prebieha v súčasnej dobe intenzívny výskum potencionálnych biomarkerov nachádzajúcich sa v rôznych telových tekutinách, ktoré by mohli indikovať nádor v skorších štádiách ochorenia a diagnostikovať túto chorobu nižšou invazívnosťou ako práve biopsia.

Jednou z telových tekutín, ktorú by bolo možné využívať k diagnostike rôznych ochorení, je pot. Pot obsahuje veľké množstvo rozpustených látok, pričom sa jedná prevažne o chloridové či sodné ióny, lipidy, aminokyseliny, peptidy a proteíny. Okrem látok bežne vyskytujúcich sa v organizme môže pot obsahovať aj rôzne xenobiotiká. Toto zloženie je závislé na druhu potnej žľazy, z ktorej je pot odoberaný. Medzi najdôležitejšie využitie potu v modernej diagnostike patrí detekcia drog, či stanovenie cystickej fibrózy v novorodeneckom screeningu.

Táto práca bola zameraná na optimalizáciu samotného odberu potu od pacientok a kontrol, a následnou extrakciou lipidov z tejto vzorky. Taktiež bola urobená lipidomická analýza pomocou ultravysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie v kombinácii s hmotnostnou spektrometriou. Pomocou štatistickej analýzy boli zistené rozdiely v lipidomickom profile pacientok a kontrol.

Táto štúdia je pilotnou prácou v danom obore a výsledky z nej budú využité k nadväzujúcej rozsiahlejšej štúdií.

## 2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

### 2.1 Karcinóm prsníkov

Rakovina prsníkov je spolu s rakovinou pľúc a rakovinou hrubého čreva najrozšírenejšou formou karcinómov, ktorá sa vyskytuje po celom svete. Ročne celosvetovo pribúda približne 1 milión nových prípadov, pričom u žien je táto choroba najčastejším nádorovým ochorením. Percentuálne to tvorí približne 18 % zo všetkých druhov rakovín, ktoré ženy postihujú (Siegel *et al.*, 2019). Úmrtnosť pri tomto ochorení je veľmi rôznorodá. Pri odhade 5-tich rokov od odhalenia ochorenia môže byť v rozvojových krajinách mortalita nad 60-timi percentami, zatiaľ čo u prípadov v rozvinutých krajinách to je menej ako 20 % (Coleman *et al.*, 2008). Incidencia v Českej a Slovenskej republike je popísaná v tabuľke č. 1 (Forman *et al.*, 2014).

Karcinóm prsníkov vzniká, keď sa bunka vo vývoji začne nekontrolovateľne deliť, čo v tkanive spôsobuje vznik nádoru. Tento nádor môže byť buď malígný alebo benígny. Benígne nádory sú nekarcinózne a nezhubné, čo znamená, že sa nešíria a netvorí metastázy. Malígne nádory sú karcinózne a zhubné. Tvorí sa hlavne v žľazách produkujúcich mlieko alebo v mliekovodoch. Karcinómy majú viacero delení. Jedným z nich je delenie na invazívne a neinvazívne. Ďalším typom je delenie podľa miesta vzniku karcinómu, a to na duktálne a lobulárne. Tieto dva typy karcinómov sú najbežnejšie, avšak vyskytujú sa tu aj vzácnejšie typy karcinómov, a to napríklad Pagetova choroba bradavky či angiosarkóm (Akram *et al.*, 2017).

**Tab. č. 1:** Počet nových pacientov s karcinómom prsníkov v Českej republike a Slovenskej republike v rokoch 2003-2007 spolu s vekovo štandardizovanou incidenciou a kumulovanou incidenciou prepočítanú na 100 000 obyvateľov (Forman *et al.*, 2014).

	<b>Muži (Česká republika)</b>	<b>Ženy (Česká republika)</b>	<b>Muži (Slovenská republika)</b>	<b>Ženy (Slovenská republika)</b>
<b>Počet prípadov</b>	215	29297	112	10887
<b>Vekovo štandardizovaná incidencia</b>	0,5±0,04	64,6±0,40	0,7±0,06	51,7±0,52
<b>Kumulovaná incidencia (%)</b>	0,07±0,01	7,49±0,05	0,08±0,01	5,89±0,06

Medzi symptómy, ktoré sprevádzajú prítomnosť karcinómu prsníkov, patrí zmena veľkosti a tvaru prsníka, či taktiež hocijaký viditeľný kontrast medzi oboma prsníkmi. Často sa stretávame so zmenou výzoru bradavky a dvorca, výtokom z bradavky, a veľakrát nastáva vznik hmatateľných hrčiek v oblasti uzlín. Ďalším symptómom môže byť aj nevysvetliteľná bolesť prsníka a jeho celkové začervenanie.

Faktorov, ktoré ovplyvňujú vznik karcinómu, je mnoho. Veľa z nich je neovplyvniteľných, avšak niekoľko z nich môže byť ovplyvnených zmenou životného štýlu. Ovplyvniteľné faktory je možné rozdeliť na negatívne a pozitívne. Medzi negatívne zaraďujeme napríklad pitie alkoholu a fajčenie tabakových výrobkov, zatiaľ čo medzi pozitívne patrí zdravá výživa, fitness, či dokonca vzdelanie jedinca. Ďalším pomerne ovplyvniteľným faktorom je aj vek prvého tehotenstva ženy. Ženy so skorým pôrodom a s vyšším počtom detí, majú znížené celkové riziko karcinómu prsníkov (Jandorf *et al.*, 2008).

Medzi neovplyvniteľné faktory patrí v prvom rade pohlavie osoby. Ženy bývajú týmto druhom karcinómu postihované mnohonásobne viac ako muži. Celosvetovo je karcinómom prsníkov postihnutý menej ako 1 zo 100 000 mužov, zatiaľ čo u opačného pohlavia je postihnutých približne 122 zo 100 000 žien (Ly *et al.*, 2013). Ďalším z faktorov je genetické vybavenie jedinca. Medzi najčastejšie poruchy genómu v tomto prípade patria mutácie génov *BRCA1* a *BRCA2* (BReast CAncer gén). Pri mutácií na týchto génoch môže dôjsť k zvýšenej proliferácii buniek nielen na prsníkoch, ale aj iných orgánoch, ako napríklad vo vaječníkoch, pankrease a prostate. Ďalší faktor je vek jedinca. Celosvetovo najpostihovanejší sú jedinci okolo 60.-ho roku života, pričom k nárastu postihnutých začína dochádzať už okolo 40.-ho roku. Etnikum je ďalším z faktorov, ktorý ovplyvňuje prítomnosť nádorov. Europoidná rasa je náchylnejšia k rôznorodým nádorom prsníkov, zatiaľ čo u negroidnej rasy je počet postihnutých nižší. Karcinómy, ktoré však negroidnú rasu postihujú, sú viacej agresívne, čo vedie k vyššej mortalite pacientov (Chlebowski *et al.*, 2005). Ďalším faktorom je skorá puberta jedinca, či naopak neskorá menopauza. U dievčat, ktoré dostali prvú menštruáciu pred 11.-tym rokom života, je v dospelosti o 20% vyššia pravdepodobnosť vzniku karcinómu prsníkov, ako u dievčat, ktoré dostali prvú menštruáciu až v 13.-tom roku života. Podobne u žien, ktoré si prešli menopauzou vo veku vyššom ako 55 rokov, je o 12% vyššia šanca na vznik karcinómu prsníkov, ako u žien, ktoré ňou prešli vo veku 50-54 rokov (Masi *et al.*, 2007).

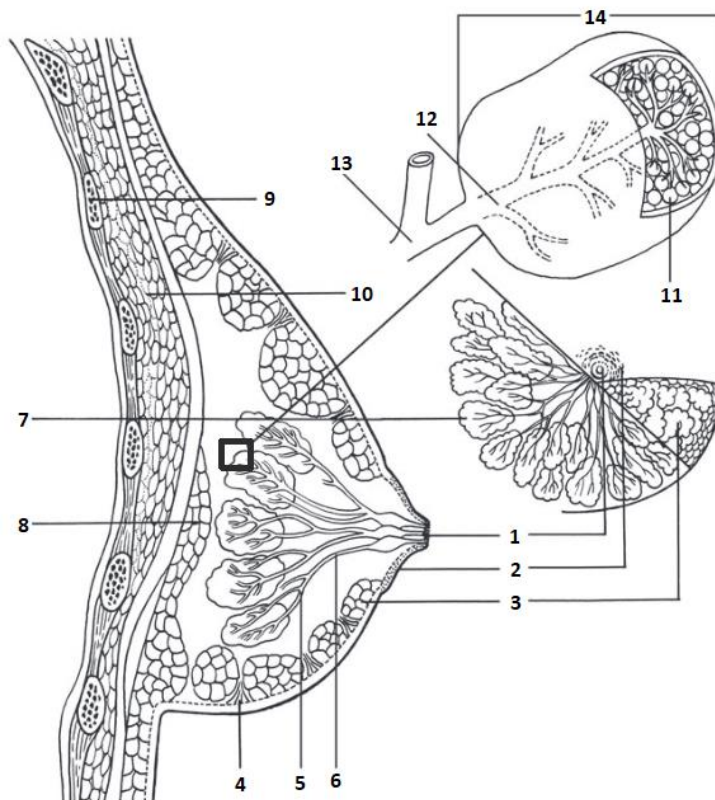
### 2.1.1 Anatómia prsníka

Prsníky sa nachádzajú na prednej časti hrudníka, z dvoch tretín uložené na veľkom prsnom svale (*musculus pectoralis major*), so zvyškom na prednom pílovitom svale (*musculus serratus anterior*). Zhora je základňa prsníka ohraničená druhým rebrom a na spodnej strane sa podprsňkový záhyb nachádza približne na šiestom rebre. Z vnútornej strany prsníky ohraničuje okraj hrudnej kosti a z vonkajšej to je predná axilárna čiara (Drew *et al.*, 2007).

Prsníky sú tvorené kožou a podkožným tkanivom, pričom ženské prsníky obsahujú spravidla viac žľazového tkaniva ako tie mužské. Prsníky obsahujú laloky (Obr. č. 1), ktoré sa postupne členia na menšie lalôčky, ktoré sú tvorené rozvetvenými alveolárnymi žľazami. Každý lalok postupne ústi do mliečnej žľazy, pričom každá žľaza je tvorená približne z 12-20 lalokov. Mliečna žľaza následne vyúsťuje do mliekovodu. Mliekovody sa spájajú a vedú do vrcholku bradavky v podobe drobného otvoru zvaného *porus lactiferus*. To je dôvod prečo počet pórov na povrchu kože býva menší ako počet mliekovodov. Týchto 7-15 otvorov na povrchu bradavky tvorí *area cribriformis papillae*. Všetky žľazy a laloky sú obklopené tukovým tkanivom, ktoré následne určuje veľkosť a tvar prsníka. Tukové tkanivo prsníkov je obklopené sieťou ciev, nervov, lymfatických ciev a uzlín, a taktiež spojivového tkaniva a väzov (Čihák, 2016).

Približne v strede prsníka sa nachádza prsný dvorec (*areola mammae*) s prsnou bradavkou (*papilla mammae*). Dvorec má v priemere približne 1,5-6 cm. Aj dvorec aj bradavka sú veľmi pigmentované a zvrásnené, pričom tesne pod povrchom sa nachádza niekoľko mazových a apokrinných žliaz, ktoré ústia do vlasového vačku. Z neho následne vyrastajú chlpy. Počas tehotenstva dochádza k tmavnutiu bradavky aj dvorca (Bland a Copeland, 2009). Taktiež sa tu nachádzajú Montgomeryho žľazy. Jedná sa o špecializované mazové žľazy, ktoré štrukturálne odpovedajú potným žľazám. Ich úlohou je vylučovať do svojho okolia maz, vďaka ktorému dochádza k hydratácii a ochrane dvorca i bradavky (Mullholland *et al.*, 2010). Vnútri dvorca sa nachádza množstvo hladkých svalov, ktoré sú uložené paralelne s mliekovodmi. Ich cieľom je vyprázdňovanie mlieka, pričom dochádza ku kontrakciám dvorca a erekciám bradaviek. Tieto svaly sú priamo ovplyvňované bohatým nervovým zakončením, ktorý sa nachádza v dvorci a bradavkách (Akram *et al.*, 2017).

Prsníky sú napájané z viacerých cievnych zdrojov. Najdôležitejším zásobovaním je krvné zásobenie pochádzajúce priamo z vnútornej hrudnej tepny (*arteriae thoracica interna*), ktorá sa nachádza hneď za hrudným košom. Zásobuje centrálnu časť prsníkov, čo tvorí približne 60% z celkovej plochy. Ďalším spôsobom napájania je zásobovanie z axilárnej tepny (*arteriae axillaris*). Jedná sa tu o zásobovanie vonkajších kvadrantov prsníkov, ktoré sa rozprestierajú asi na 30.-tich percentách celkovej plochy prsníka (Bland a Copeland, 2009). Zvyšok prsníkov je zásobovaný pomocou interkostálnych tepien (*arteriae intercostales*), ktoré vychádzajú z vnútornej hrudnej tepny. Takto sú napájané hlavne bradavky a dvorec (van Deventer, 2004). Všetko cievne zásobenie vedie pozdĺžne pri mliekovodoch, pričom sa lúčovito zbíha u bradavky.



**Obr. č. 1:** Anatómia ženských prsníkov. 1 – bradavka, 2 – dvorec, 3 – tukové tkanivo, 4 – podkožné väzivo, 5 a 6 – segmenty duktu, 7 – mliečny lalok, 8 – tukové tkanivo, 9 – rebro, 10 – sval, 11 – alveolárne žľazy, 12 – vývod z lobulu do duktu, 13 – koncový duktus mimo lobulus, 14 – lobulus (Abrahámová *et al.*, 2019).

Dôležité je aj lymfatické zásobenie prsníka. Priamo pod bradavkou sa nachádza Sappeyho plexus. Jedná sa o sieť lymfatických kapilár. Sú známe tri cesty odvádzania lymfy z prsníkov, pričom všetky vedú paralelne s cievnyim zásobením. Hlavnou cestou, ktorá odvádza lymfu zo 75% plochy, sú axilárne lymfatické uzliny. Tieto uzliny sa nachádzajú v počte približne 20-30 na jedno podpazušie. Lymfa z bočných kvadrantov prsníka je do nich odvádzaná priamo alebo cez Sappeyho plexus. Druhou možnosťou je zber lymfy cez vnútornú dráhu. Lymfa je tu zbieraná aj z vnútornej aj z laterálnej časti prsníkov, pričom uzliny prechádzajú cez medzirebrové priestory a veľkým prsným svalom do vnútorných lymfatických prsných žliaz. Poslednou cestou je odvod lymfy z najhlbších častí prsníka, ktorá vedie do subklavikulárnych uzlín (Drew *et al.*, 2007).

### **2.1.2 Diagnostika**

Prvotnou možnosťou diagnostiky u pacienta je samovyšetrenie. Pri pravidelnom vyšetrení sa ženy naučia spoznávať vlastné prsia, vďaka čomu je následne jednoduchšie vypozerovať zmenu vo veľkosti či zmene tvaru prsníka (Al-Naggar *et al.*, 2011). Samotnú správnu techniku vyšetrenia však ovláda iba malé množstvo žien, pričom tie, ktoré túto techniku ovládajú, sú schopné prísť ku gynekológovi s nádormi v nižšom štádiu. Samovyšetrenie zároveň nenahradzuje pravidelný screening u lekára. Taktiež bolo potvrdené, že pretrvávajúci edukačný program u mladých ľudí vedie k zvýšeniu povedomia o rakovine prsníkov v celej populácii (Ozkan *et al.*, 2010).

Ďalším štandardným testom pri diagnostike rakoviny prsníkov je mamografia, ktorá napomáha nájsť hrčky v tkanive pomocou mäkkého röntgenového žiarenia. Nevýhodou metódy je možnosť falošne negatívnych či falošne pozitívnych výsledkov u pacientok s hustým prsným tkanivom (Sardanelli *et al.*, 2004).

Najlepšou diagnostickou, avšak invazívnou, technikou je biopsia, ktorá je využívaná k zisteniu malignity nádoru. Existuje jej mnoho druhov. Najvýznamnejšie druhy sú biopsia jemnou ihlou, biopsia hrubou ihlou a chirurgická biopsia. Biopsia jemnou ihlou je využívaná u hrudiek, ktoré by potencionálne mohli byť naplnené tekutinou. Pri navádzaní ihly v prsníku sa často využíva ultrazvuk (Sotiriou *et al.*, 2002). Pri biopsií hrubou ihlou je využívaná k odobraní tkaniva z nádoru dutá ihla, pričom sa tento zákrok vykonáva pod lokálnou anestéziou. Pri navádzaní ihly sa využíva ultrazvuk, mamogram alebo MRI (Damera *et al.*, 2004). U chirurgickej biopsie je do prsníka

vkladaný lokalizačný drôtik, ktorý je vynímaný spolu s podozrivým tkanivom (Krag *et al.*, 1993).

Na zisťovanie markerov prognózy odpovede na terapiu sú využívané imunohistochemické vyšetrenia, kde sa primárne zisťuje prítomnosť hormonálnych receptorov a *HER2* génu („human epithelial growth receptor 2“). Pri hormonálnych receptoroch sa deteguje prítomnosť estrogénových a progesterónových receptorov na povrchu buniek. Pokiaľ sa tieto receptory nachádzajú na povrchu, tak tieto hormóny poháňajú vznik neoplázií v tkanive. Pokiaľ je nález pozitívny, tak je pacient vhodný na hormonálnu liečbu. V opačnom prípade by táto liečba nemala význam. *HER2* gén je jeden z prvých študovaných onkologických génov. Je markerom citlivosti nádoru voči látke trastuzumab a rezistencie voči tamoxifénu. Pri pozitívnych nálezoch *HER2* u karcinómu je tento gén nadexprimovaný. Tento gén je následne hodnotený od 0 po 3+. Hodnoty 0 a 1+ značia negatívny nález. U hodnoty 2+ sa jedná o hraničné hodnoty a hodnota 3+ je pozitívny nález (Zaha, 2014).

### **2.1.3 TNM klasifikácia**

Najrozšírenejším druhom klasifikácie karcinómov je TNM klasifikácia, ktorá dáva informácie o štádiu karcinómov v organizme.

Označenie T popisuje veľkosť nádoru. Vychádza z hmatového nálezu a taktiež zo zobrazovacích metód. Nálezy získané týmito metódami sa následne delia na niekoľko kategórií. Prvou je TX, kedy sa tumor nedá z určitých dôvodov vyhodnotiť. Kategória T1 obsahuje nádory, ktoré majú menej ako 2 cm. T2 zahŕňa nádory väčšie ako 2 cm ale zároveň menšie ako 5 cm. V T3 sú nádory, ktoré sú väčšie ako 5 cm. Pri kategórii T4 nezáleží na samotnej veľkosti nádoru, avšak na jeho prerastení okolitými tkanivami. Bližšie rozradenie do kategórií sa nachádza v tabuľke číslo 2 (Brierley *et al.*, 2017).

**Tab. č. 2:** Rozdelenie T klasifikácie (Brierley *et al.*, 2017).

Typ	
T1mi	Tumor menej ako 0,1 cm
T1a	Tumor viac ako 0,1 cm a menej ako 0,5 cm
T1b	Tumor viac ako 0,5 cm a menej ako 1 cm
T1c	Tumor viac ako 1 cm a menej ako 2 cm
T2	Tumor má viac ako 2 cm a menej ako 5 cm
T3	Tumor má viac ako 5 cm
T4a	Tumor prerastá do hrudnej steny
T4b	Tumor prerastá do kože
T4c	Tumor prerastá do hrudnej steny
T4d	Znamená zápalový karcinóm

Označenie N popisuje ako veľmi rakovinové bunky zasiahli lymfatické uzliny. V tejto charakteristike bolo potrebné vyjadriť nielen veľkosť rozsahu postihnutia, ale taktiež aj vzťah postihnutých uzlín voči okoliu, ich pohyblivosť, poprípade fixáciu k tkanivám. Kategória NX znamená, že uzliny neboli vyhodnotené, zatiaľ čo N0 znamená, že lymfatické uzliny neboli napadnuté rakovinovými bunkami. Nasledujúce kategórie N1, N2 a N3 sú bližšie popísané v tabuľke číslo 3 (Brierley *et al.*, 2017).



**Tab. č. 3:** Rozdelenie N klasifikácie (Brierley *et al.*, 2017).

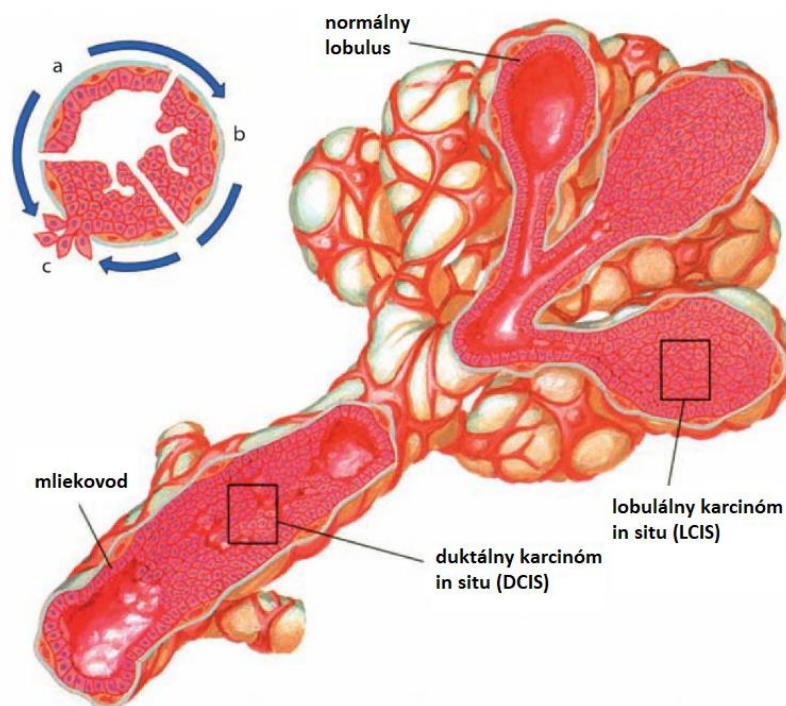
Typ	
N1mi	Jedna alebo dve lymfatické uzliny obsahujú mikrometastázy a tie sú väčšie ako 0,2 mm; alebo lymfatická uzlina obsahuje viac ako 200 rakovinových buniek, ktoré sú však menšie ako 2 mm
N1a	Rakovinové bunky metastázovali do 1 až 3 lymfatických uzlín; aspoň jedna je väčšia ako 2 mm
N1b	Rakovinové bunky sú v lymfatických uzlinách za hrudnou kosťou; ešte nehmatateľné
N1c	Rakovinové bunky sú v 1 až 3 lymfatických uzlinách v podpazuší a v lymfatických uzlinách za hrudnou kosťou; ešte nehmatateľné
N2a	Rakovinové bunky sú v lymfatických uzlinách v podpazuší, ktoré sú prilepené k sebe navzájom a aj k okolitému tkanivu
N2b	Rakovinové bunky sú v lymfatických uzlinách za hrudnou kosťou; sú viditeľné na skene a už sú hmatateľné; napadnuté nie sú lymfatické uzliny v podpazuší
N3a	Rakovinové bunky sú v lymfatických uzlinách pod kľúčnou kosťou
N3b	Rakovinové bunky sú v lymfatických uzlinách aj v podpazuší aj za hrudnou kosťou
N3c	Rakovinové bunky sú v lymfatických uzlinách nad kľúčnou kosťou

Posledným označením je M, ktoré popisuje, či sa karcinóm rozšíril aj do vzdialenejších orgánov od nádoru v tele. Kategória MX znamená, že metastázy neboli vyhodnotené, M0 značí bez príznakov rozšírenia metastáz a M1 znamená, že sa karcinóm rozšíril (Brierley *et al.*, 2017).

## 2.1.4 Neinvazívny karcinóm

Pri tomto type karcinómu ostávajú zhubné bunky iba v jednej časti prsníka, a to v tej, kde došlo k proliferácii buniek. Tieto bunky sa nerozširujú na okolité lobuly, kanáliky, ani tkanivo a nemetastázujú (Inoue *et al.*, 2017). Lézie napádajú buď kanálik alebo lalok, a podľa tohto sú delené na duktálne a lobulárne karcinómy. Duktálny karcinóm je označovaný ako duktálna intraepiteliárna neoplázia (DIN), pričom v minulosti bol nazývaný prevažne duktálny karcinóm *in situ* (DCIS). U lobulárnych karcinómov sa jedná o lobulárnu intraepiteliárnu neopláziu (LIN), v minulosti prevažne lobulárny karcinóm *in situ* (LCIS). K vytvoreniu klasifikácie DIN a LIN došlo z dôvodu, kedy pojmy DCIS a LCIS neboli schopné zahrnúť všetku potrebnú problematiku karcinómov prsníkov (Houghton, 2003). Pojmy DCIS a LCIS však zostávajú jednou z možných terminológií naďalej používaných v lekárskej literatúre (Obr. č. 2).

DIN sa rozdeľuje do niekoľkých rôznych kategórií. Prvou z nich je DIN1A. Jedná sa o plochú epitelovú atypiu, ktorá ešte nie je radená do kategórie DCIS. Plochou epitelovou atypiou sa rozumie zmena pôvodného epitelu v koncových duktoch na jednu a viac vrstiev cytologicky rovnakých rakovinových buniek. Kategória DIN1B je totožná s atypickou duktálnou hyperpláziou, kedy sa jedná o lézie duktoch, ktoré však ešte nie sú tak rozšírené ako u DCIS. Rozdiely medzi atypickou duktálnou hyperpláziou a nerozvinutou DCIS sú veľmi malé. Nerozvinutá DCIS korešponduje s kategóriou DIN1C. Ďalšou kategóriou je DIN2, pričom sa jedná o strednú formu DCIS, ktorá môže byť kribriiformná alebo mikropapilárna s nekrózou a atypiou. Poslednou kategóriou je DIN3, kedy sa jedná o najťažšiu formu DCIS bez alebo s nekrózou (Tavassoli a Deville, 2003).



**Obr. č. 2:** Ukážka vzniku duktálneho a lobulárneho karcinómu *in situ*, ktorý môže prechádzať na invazívny karcinóm. a – normálne bunky, b – bunky karcinómu *in situ*, c – bunky invazívneho karcinómu (Abrahámová *et al.*, 2019).

LIN je tvorené proliferáciou uniformných buniek typu A na konci lobulárnych jednotiek, pričom tento typ buniek môže postupne prerastať do buniek B s prominentnejším jadrom. Typ B postupne nahrádza bunky typu A. Veľkosť nahradenia buniek A bunkami B určuje rozradenie do LIN kategórie. Prvou kategóriou je LIN1, ktorú tvorí atypická lobulárna hyperplázia. Táto kategória je charakterizovaná malými bunkami, ktoré vyplňajú, avšak zároveň nenaťahujú lobulárne lumeny. Tieto bunky taktiež čiastočne alebo kompletne nahrádzajú epitel lobulu. Do kategórie LIN2 sa radí klasický LCIS. Jedná sa o hojnejšiu proliferáciu uniformných buniek, ktoré naplňujú a naťahujú lumen, avšak samotný lobulus zostáva stále rovnakej veľkosti. Pri LIN3, ktorý je tvorený rozsiahlym alebo pleomorfným LCIS, sú lobuly kompletne nahradené bunkami B. Lobulus je úplne natiiahnutý a splýva so strómou (Moinfar, 2007).

### 2.1.5 Invazívny karcinóm

Pri tomto type karcinómu sa rakovinové bunky dostávajú cez tkanivo a napádajú bazálnu membránu priľahlej strómy. Napádajú okolité bunky, či iné časti tela, pričom často metastázujú. Rozšírenie nádorových buniek do organizmu prebieha cez lymfatickú a cievnu cestu (Chuang *et al.*, 2007). Pri metastázujúcich karcinómoch najčastejšie

dochádza k napadnutiu lymfatických uzlín, pľúc, pečene a kostí, hlavne chrbtice (Bland a Copeland, 2009). Z celkového počtu invazívnych karcinómov sa prevažne jedná o invazívne duktálne karcinómy a invazívne lobulárne karcinómy. Medzi ďalšie, vzácnejšie karcinómy, patrí tubulárny karcinóm, mucín produkujúci karcinóm, invazívny papilárny karcinóm, medulárny karcinóm, apokrinný karcinóm a podobne.

Invazívny duktálny karcinóm (IDC) je druh karcinómu, ktorý so svojimi variáciami tvorí 75% všetkých invazívnych karcinómov (Lakhani *et al.*, 2012). Jedná sa o heterogénnu kategóriu karcinómov, ktoré nemajú špecifickú histológiu, ako napríklad lobulárne karcinómy. Sú vzácnymi u žien do 40.-ho roku života bez genetickej predispozície, avšak so zvyšujúcim sa vekom sa pravdepodobnosť ich vzniku zväčšuje. Multifokálne ložiská sú pozorované v 20% prípadoch. Pri ultrazvuku sú pozorované hypoechogenné ložiská s nepravidelným tvarom a rozštiepenými a nejasnými okrajmi (Blaichman *et al.*, 2012). Jedná sa o bunky, ktoré sú 1,5-5x väčšie ako červené krvinky. V imunohistochemických rozboroch je pozorovaný pozitívny nález v hormonálnych receptoroch pre estrogén a progesterón, a to u 70-80% prípadov. Taktiež sa vyšetruje prítomnosť *HER2* génu, pričom nadexprimovaný je v 15% prípadov (Lakhani *et al.*, 2012).

Invazívny lobulárny karcinóm (ILC) je druhým najrozšírenejším invazívnym karcinómom (10-15% prípadov) (Fu *et al.*, 1998). Je charakterizovaný napádaním viacerých buniek lobulov na jednej strane prsníka, mnohokrát s prerastom do iných častí tela. Často sa však jedná o bilaterálny výskyt. Bunky bývajú malé (10-15  $\mu\text{m}$ ), veľmi často izolované a rozptýlené, či vyskytujúce sa v malých nesúdržných klastroch (Menet *et al.*, 2008). Lobulárne neoplázie sú mierne diferencované s pozitívnym nálezom hormonálnych receptorov na povrchu buniek. *HER2* býva negatívny alebo len mierne pozitívny. Tieto hodnoty platia pre všetky typy ILC, okrem jednej varianty, kedy je progesterón negatívny a *HER2* pozitívny (Arpino *et al.*, 2004). ILC je nachádzaný v kombinácií LIN2 u 70-80% prípadov (DiCostanzo *et al.*, 1990).

Tubulárny karcinóm tvorí približne 2% všetkých invazívnych karcinómov. Jedná sa o variantu IDC, ktorá pozostáva z dobre diferencovaných tubulárnych štruktúr s otvorenou luminou. Tieto bunky bývajú súdržné, ale chýba im prítomnosť myoepitelových buniek. Bunky bývajú malé a monomorfné (Goldstein *et al.*, 2004). O tubulárnom karcinóme sa hovorí v prípade, kedy minimálne 90% celkového karcinómu

je tvorených práve týmito štruktúrami. Pri ultrazvuku je tento nádor pozorovaný ako hyperechogenné lézie s nedefinovateľnými okrajmi a svetlým pozadím (Sheppard *et al.*, 2000). Pri imunohistochemických vyšetreniach je tento karcinóm vždy pozitívny na hormonálne receptory a negatívny pre *HER2* (Papadatos *et al.*, 2001).

Karcinómy produkujúce mucín tvoria 1-6% všetkých invazívnych nádorov (DiSaverio *et al.*, 2008), pričom sú charakterizované tvorbou veľkého množstva extracelulárneho mucínu. Tento druh karcinómu sa vyskytuje v čistej a zmiešanej forme, pričom čistá forma má pri liečbe lepšie prognózy. Zmiešaná forma má horšie prognózy ako IDC (Toikkanen *et al.*, 1988). Tento druh karcinómu málokedy metastázuje do lymfatických uzlín, či vzdialenejších častí tela. Makroskopicky sa jedná o tkanivo želatínovej konzistencie. Neoplázie čistej formy pozorované pri ultrazvuku bývajú okrúhle a dobre ohraničené. Pri zmiešanej forme tvoria neoplázie nepravidelnú hmotu. Pri histologických vyšetreniach sa tento karcinóm delí na dve varianty, bunkovú a hypocelulárnu. Bunkový variant rastie do pevných hniezd, zatiaľ čo hypocelulárny variant má tubulárnu, kribriformnú štruktúru (Zhang *et al.*, 2015). Imunohistochemicky sú v karcinóme produkujúci mucín z 96% preukázané pozitívne hormonálne receptory a *HER2* býva často negatívny (Kashiwagi *et al.*, 2013).

Invazívny papilárny karcinóm tvorí 0,3-2% všetkých malígnych nádorov, pričom je častejší u mužov ako u žien. Je definovaný ako papilárna neoplázia v rozšírenom kanáliku obalený vláknitou kapsulou. Tento typ karcinómu málokedy metastázuje (Fisher *et al.*, 1980). Často je hmatateľný a nachádza sa pri areole, kde môže spôsobovať výtok z bradavky. Histologicky sa pozoruje neprítomnosť myoepiteliálnych buniek. Čistý papilárny karcinóm je tvorený zreteľne diferenciovanými neopláziami a u imunohistochemie sú nájdené exprimované hormonálne receptory a gén *HER2* je negatívny (Reid-Nicholson *et al.*, 2006).

### **2.1.6 Liečba**

Na nastavenie správnej liečby je potrebné odhadnutie chovania nádoru, jeho charakteristika a schopnosť prenikať do okolia. Taktiež je potrebné správne určenie pozitivity či negativity hormonálnych receptorov a *HER2* génu. Všeobecne existujú tri druhy liečby, a to chirurgická, radiačná a systémová, do ktorej sa radí chemoterapia a hormonálna terapia.

Chirurgická liečba je najúčinnnejšou stratégiou pre pacientov, ktorým sa rakovina ešte nerozšírila, pričom sa jedná aj o často využívanú voľbu pri neskorších štádiách choroby (Pearson *et al.*, 2017). Veľkosť chirurgického zákroku u karcinómu prsníkov je veľmi variabilná na základe veľkosti operovaného karcinómu, jeho vlastností a zasiahnutia uzlín. Vo všeobecnosti sa rozoznávajú dva základné druhy chirurgických zákrokov, a to čiastočné odstránenie prsníka – lumpektómia, a kompletné odstránenie prsníka – mastektómia. Následne je často využívaná možnosť rekonštrukčných výkonov prsníkov (Rowland *et al.*, 2000).

Mastektómia je prsník odstraňujúca operácia, ktorá sa vykonáva kvôli zníženiu rizika vzniku karcinómu prsníkov. Avšak ani bilaterálna mastektómia nezaručuje kompletné vylúčenie rizika opätovného vzniku karcinómu (Rebbeck *et al.*, 2004). Mastektómia je však stále považovaná za najviac efektívnu metódu v prípade, kedy nie je vhodné odstrániť iba časť tkaniva. Samotné kompletné odstránenie prsníka však môže byť pre pacientku psychicky náročné a v mnohých prípadoch nastáva pocit asexuality, zníženie sebavedomia a závažne depresie (Keskin a Gumus, 2011).

Lumpektómia je prsník zachovávajúca operácia, kedy sa odstraňuje iba časť prsníka, ktorá obsahuje nádor spolu s trochou zdravého tkaniva a lymfatickými uzlinami z okolia. Väčšina prsníka však zostáva nedotknutá. V danom prípade je dôležité určenie presného miesta ložiska nádoru. Najčastejšie sa určuje pomocou lokalizačného drôtika (Fisher *et al.*, 1995). Lumpektómia sa väčšinou odporúča pacientkam v začiatkových fázach nádoru, poprípade vo vyšších štádiách v kombinácií s rôznymi terapiami. Väčšina pacientov preferuje vykonanie lumpektómie v skorších štádiách ako možnosť mastektómie v tých neskorších (Dorval *et al.*, 1998).

Radiačná terapia je užitočná v prípade, kedy je potrebné vykonať mastektómiu, avšak z rôznych príčin to nie je možné. Je využívaná v kombinácií s lumpektómiou v skorých štádiách nádoru. Využívané je fotónové alebo protónové ožarovanie (Hall a Brenner, 2008).

Chemoterapiou sa rozumie proces zabíjania rakovinových buniek pomocou určitých chemických látok využívaných ako liečivá. Jedná sa o cytostatiká, pričom v dnešnej dobe poznáme minimálne 40 účinných cytostatík. Samotná chemoterapia sa môže vykonávať pred aj po chirurgických zákrokoch. Cytostatiká sú delené do dvoch skupín. V prvej sa nachádzajú látky, ktoré sú účinné počas celej fázy bunkového cyklu,

zatiaľ čo v druhej sú látky účinné len v určitej fáze. Účinnosť jednotlivých cytostatík je násobená ich kombinovaním. Medzi dnes najpoužívanejšie cytostatiká patri docetaxel, paklitaxel, vinorelbín či cyklofosfamid (Benson *et al.*, 2004).

Hormonálna terapia je založená na prítomnosti hormonálnych receptorov na povrchu buniek. Pokiaľ v nádorovom tkanive nie sú tieto receptory prítomné, tak je liečba neúčinná. Pri tejto liečbe sa využíva niekoľko druhov látok. Prvou skupinou sú antiestrogény. Medzi ne patrí napríklad tamoxifén, ktorý je jeden z najlepšie tolerovaných liekov. Klinicky môže byť použitý aj ako preventívny liek pred karcinómom prsníkov, ktorý by bol ovplyvňovaný hormónmi. Jedná sa o prevenciu pacientok, ktoré sa z karcinómu prsníkov vyliečili, avšak majú šancu na opätovný výskyt choroby. Jeho primárnym cieľom sú estrogénové receptory (Ring a Dowsett, 2004). Druhou skupinou sú inhibítory aromatáz. Tieto látky blokujú syntézu estrogénu pomocou inhibície posledného kroku jeho biosyntézy. Sú známe dva druhy týchto látok, a to ireverzibilné steroidy a reverzibilné nesteroidné inhibítory založené na imidazole. Treťou skupinou sú regulátory estrogénového receptora. Jedná sa o kompetitívne látky viažuce sa na estrogén, kde vytvárajú konštitučné zmeny, ktoré vedú k inaktivácii molekuly. Znižuje sa tak celková prítomnosť aktívneho estrogénu v bunkách. Poslednou skupinou sú agonisti hormónu uvoľňujúci luteinizačný hormón. Využíva sa u žien pred menopauzou, kedy je v tele produkovaný hormón uvoľňujúci gonadotropín. Tento hormón vedie k tvorbe luteinizačného hormónu. Prítomnosť luteinizačného hormónu následne vedie k tvorbe estrogénu, a tak dlhodobá prítomnosť agonistov hormónu uvoľňujúci gonadotropín vedie k zníženiu luteinizačného hormónu a estrogénu (Robertson a Blamey, 2003).

## 2.2 Pot

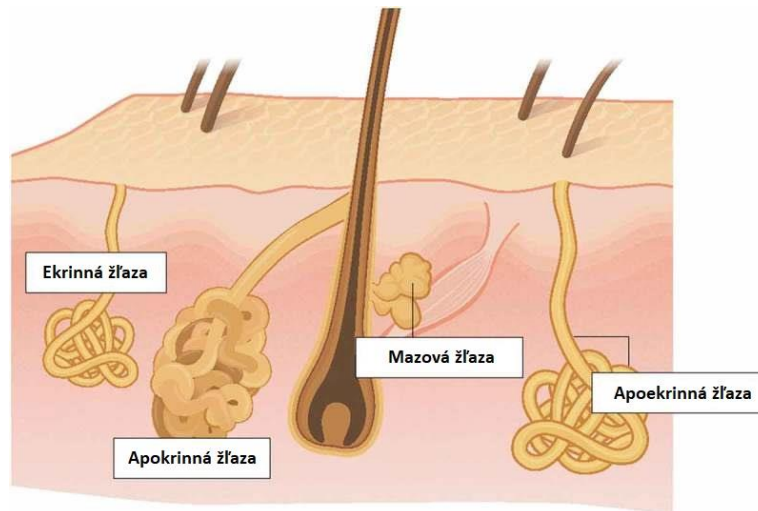
Koža je jedným z najväčších a najuniverzálnejších ľudských orgánov. V ľudskej koži nachádzame štyri rôzne žľazy. Prvým druhom z týchto žliaz sú mazové žľazy, ktoré vylučujú olejovitou hmotu pochádzajúcu z odumretých epitelových buniek. Táto hmota sa nazýva kožný maz a vytvára na koži ochrannú vrstvu. Ďalšie tri typy žliaz radíme medzi potné žľazy. Sú to ekrinné žľazy, apokrinné žľazy a apoekrinné žľazy (Obr. č. 3).

Hlavnou úlohou potných žliaz v organizme je udržiavanie stálej telesnej teploty. Pokiaľ by telesná teplota tela dlhodobo prevyšovala 40°C, proteíny nachádzajúce sa v organizme by pozvoľna denaturovali. Následne by dochádzalo k postupnej bunková smrti, čo by nakoniec spôsobilo zlyhávanie orgánov a smrť jedinca. Práve preto je dôležité, aby bola telesná teplota neustále udržiavaná na konštantnej teplote (u ľudského organizmu približne 36,5-37 °C). Pot tejto funkcií napomáha vďaka svojej evaporácii z povrchu tela, čím dochádza k ochladeniu organizmu. Termoregulácia je kontrolovaná pomocou centrálnej nervovej sústavy s centrom v hypotalame (Holzle, 2002).

Ďalšou úlohou potných žliaz je emočné potenie. Tento druh potenia je riadený emočnými podnetmi organizmu, ako napríklad stres, úzkosť, strach, či bolesť. Poteenie prebieha na celom tele, avšak najvýraznejšie je na dlaniach, chodidlách a v podpazuší. Poteenie v oblasti dlaní a chodidiel nastáva už u novorodencov (Chalmers a Keele, 1952), zatiaľ čo poteenie v podpazuší je spúšťané až v období puberty. Tento jav je spôsobený hormonálnymi zmenami v tele, ktoré sú spojené s aktiváciou apokrinných žliaz v podpazuší (Sato *et al.*, 1987). Toto potenie nie je ovplyvňované teplotou organizmu a počas spánku, či relaxácie klesá (Robinson a Robinson, 1954).

Posledným typom potenia je potenie spojené s konzumáciou potravy. Príjem potravy je so zmenou teploty v organizme spojený priamo i nepriamo. V prípade priameho zvýšenia teploty dochádza po požití jedla k zvýšeniu metabolizmu, čo následne spôsobuje okamžité zvýšenie potenia na základe potreby termoregulácie. K nepriamej zmene teploty dochádza pri požití ostrého jedla, napr. jedla obsahujúce zlúčeniny kapsaicínu. Táto molekula sa viaže na receptory tepla, ktoré vyšlú signál o zvýšení teploty organizmu, v dôsledku čoho nastáva zvýšenie potenia (Dunbar *et al.*, 2002).

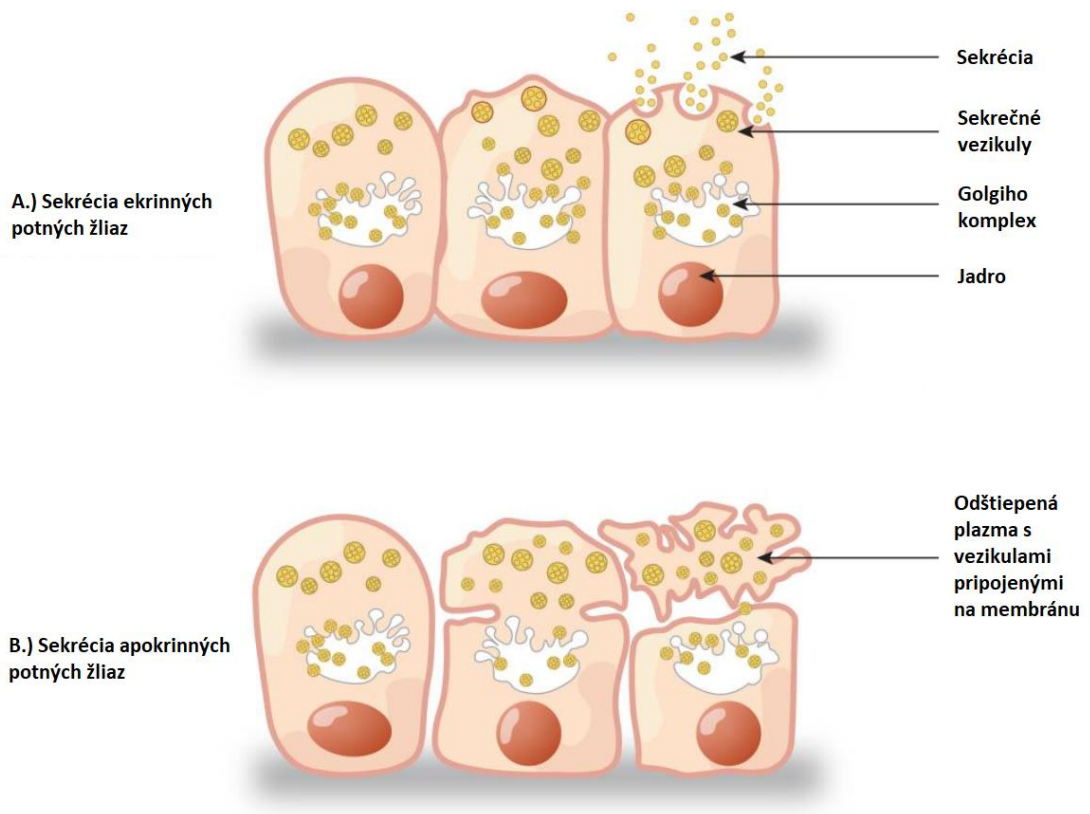




**Obr. 3:** Porovnanie ekrinnej, epokrinnej, apoekrinnej a mazovej žľazy a ich umiestnenia v pokožke (upravené podľa Baker, 2019).

Samotný pot je číra hypotonická tekutina s pH približne 6,8. Voda, ktorú pot obsahuje až z 99%, zahŕňa rozpustenú širokú škálu rôznorodých látok. Nachádzame tu rozličné elektrolyty, pričom sa prevažne jedná o kationy sodíka a draslíka a anióny chloridu. Ďalej sa tu taktiež nachádza napríklad močovina, laktát a pyruvát. V malých koncentráciách sú tu prítomné rôzne peptidy, proteíny, aminokyseliny, amíny, či dokonca kovové ióny. Jednou z najvariabilnejších zložiek, ktoré v pote môžu byť obsiahnuté, sú xenobiotiká (Sato *et al.*, 1989).

Potné žľazy delíme podľa typu produkcie potu a ich stavby na ekrinné, ktoré produkujú tekutinu obsahujúcu elektrolyty pochádzajúce z filtrovanej plazmy, a apokrinné, produkujúce proteínový sekrét vznikajúci v samotných bunkách žľazy (Obr. č. 4). Ďalším typom je pot apoekrinný, ktorý kombinuje funkcie oboch žliaz.



**Obr. č. 4:** Delenie potných žliaz na základe ich sekrécie na ekrinné (A) a apokrinné (B) (upravené podľa Hussain *et al.*, 2017).

### 2.2.1 Ekrinné žľazy

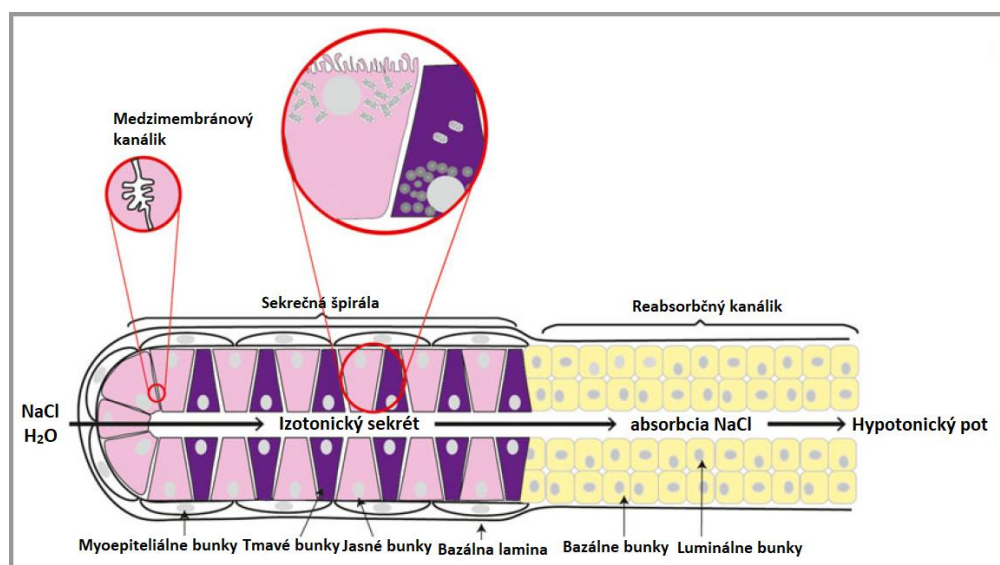
Ekrinné žľazy bývajú aktívne už pri narodení a pokrývajú celé telo okrem niekoľkých miest, a to pier, vonkajšieho zvukovodu, nechťových lôžok, klitorisu, malých pyskov ohanbia, predkožky a žalúdu penisu (Sato *et al.*, 1989). Na celom tele ich nájdeme v počte približne 1,6 – 5 miliónov, avšak priemerne to tvorí približne 200 potných žliaz na jeden centimeter štvorcový. Najviac ich nachádzame na dlaniach a chodidlách (cca 700 žliaz/cm<sup>2</sup>), zatiaľ čo najmenej ich nachádzame v koži na chrbte (cca 60 žliaz/cm<sup>2</sup>) (Szabo, 1967).

Samotné žľazy sa začínajú formovať v priebehu 12.-ho až 13.-ho týždňa vývoja jedinca, pričom primárne dochádza k vzniku žliaz nachádzajúcich sa v oblasti dlaní. Neskôr, v okolí 20.-ho týždňa, dochádza k rozvoju žliaz na chodidlách a v podpazuší, a nakoniec nastáva vznik ostatných žliaz na celom tele. Počas prenatálneho vývoja dosahuje ich počet až 3000 žliaz/cm<sup>2</sup>. Tento počet postupne klesá, a počas narodenia jedinca sa na tele nachádza už len približne polovica tohto počtu. Toto množstvo sa

pomaly znižuje, pričom u dospelých jedincov je až do konca života konštantné (Hashimoto *et al.*, 1966; Fawcett *et al.*, 1994).

Ekrinný pot je číra, hypotonická a nezapáchajúca tekutina. Úlohou ekrinných žliaz je filtrácia tekutiny odvodenej od plazmy a následná reabsorbcia sodných a chloridových iónov do nadbytku vody, ktoré vytvárajú tekutinu putujúcu na povrch kože. Pri extrémnych podmienkach môže dochádzať k produkcii až niekoľkých litrov potu za deň. Okrem vylučovania vody a ióny chloridu a sodíku, sa v tejto tekutine nachádza veľké množstvo iných látok, ako napríklad ióny draslíka a vápnika, močovina, laktát a aminokyseliny. Proteíny, ktoré sa nachádzajú v tomto typu potu, tvoria zanedbateľné percento (Mitsubayashi *et al.*, 1994; Yokozeki *et al.*, 1987).

Žľazu tvorí jeden stočený rúrkovitý systém, pričom ojedinele dochádza k spojeniu dvoch a viacerých žliaz. Táto potná žľaza sa skladá z dvoch častí, a to sekrécnej špirály a kanáliku (Obr. č. 5). Sekrečná špirála je umiestnená v zamši alebo podkožnom väzive a je lemovaná pseudostratifikovaným epitelom, ktorý je lokalizovaný na bazálnej lamíne. Od okolitého tkaniva je táto časť žľazy oddelená vláknitým plášťom (Sato, 1993). Špirála je tvorená tromi druhmi buniek. Prvé sú jasné (sekrečné) bunky, druhé sú tmavé (mukoidné) bunky, a posledné myoepiteliálne bunky. Jasné a tmavé bunky sú zodpovedné za sekréciu žľazy, zatiaľ čo funkcia myoepiteliálnych buniek je čisto podporná (Stenn, 1988).



**Obr. č. 5:** Bunková štruktúra ekrinnej žľazy so znázornením vylučovania potu (upravené podľa Hu *et al.*, 2018).

Jasné bunky ihlanovej štruktúry sú vsadené do bazálnej laminy alebo myoepitelových buniek, pričom ich vrch je prekrytý tmavými bunkami. Jadro buniek je veľké, okrúhle a zaberá takmer celú bunku. Bunka obsahuje membránové klky a vnútri sa nachádza mnoho mitochondrií. Je tu pozorovaná výrazná aktivita  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy. Pokiaľ dochádza ku kontaktu dvoch buniek, vzniká medzi nimi medzimembránový kanálik, ktorý nakoniec končí v lumene žľazy. Jasné bunky vytvárajú väčšinu sekrečnej tekutiny (Charles, 1960).

Tmavé bunky majú buď kvádrový tvar, alebo tvar obráteného ihlanu. V priestore sú uložené takým spôsobom, že sa vôbec nedotýkajú bazálnej laminy. Obsahujú Golgiho aparát, niekoľko drsných endoplazmatických retikul, vezikuly a voľné ribozómy, ktoré obsahujú PAS (Periodic Acid Schiff) pozitívne glykoproteíny. Tieto proteíny sa následne vyskytujú vo vylučovanom pote. Tmavé bunky obsahujú na rozdiel od jasných buniek málo mitochondrií a žiadne klky (Hashimoto, 1971).

Myoepiteliálne bunky tvoria nekompletnú vrstvu tenkých vretenných alebo hviezdicových buniek na povrchu bazálnej laminy, väčšinou sú paralelné so sekrečnou špirálou. Jedná sa o kontraktilné bunky, s veľkým množstvom aktínových vlákien. Dominantnou organelou nachádzajúcou sa vo vnútri, je sploštené jadro obklopené hustou sieťou mikrofilamentov. Hlavným charakteristickým znakom myoepiteliálnych buniek je prítomnosť keratínu a  $\alpha$ -aktínu hladkého svalstva. Ich funkciou je podpora jasných a tmavých buniek v žľaze, rovnako ako pomoc pri presune sekrétu z buniek na povrch pokožky (Sato *et al.*, 1979).

Funkcia kanálika spočíva v reabsorbcii iónov nachádzajúcich sa v primárnom pote. Tekutina, ktorá sa z kanálika dostane na povrch kože je konečný ekrinný pot. Kanálik je tvorený dvoma druhmi buniek, a to dvoma až troma vrstvami bazálnych buniek na vonkajšej strane a jednou vrstvou luminálnych buniek na vnútornej. Bazálne bunky obsahujú veľké množstvo mitochondrií a taktiež vykazujú aktivitu  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy (Hibbs, 1958).

Funkcia týchto žliaz spočíva hlavne v kontrole termoregulácie, avšak taktiež tu dochádza k sekrécii metabolizovaných xenobiotík a iných odpadných látok z organizmu.

Pri ochladzovaní tela pomocou ekrinného potu musí primárne dôjsť k zvýšeniu teploty hlbších tkanív organizmu. Takto zvýšená teplota spôsobuje pozvoľnú stimuláciu

hypotalamu, ktorá postupne vyvoláva vazodilatáciu, zrýchlené dýchanie a potenie. Samotnú kontrolu ekrinných žliaz majú na starosti nervy vychádzajúce z miechy v hrudnej časti chrbtice. Okrem toho, že ekrinné žľazy cez nervové zakončenia reagujú na acetylcholín, reagujú aj na iné cholinergné látky a  $\alpha$ - a  $\beta$ -adrenergné stimulanty (Hu *et al.*, 2018).

### 2.2.2 Apokrinné žľazy

Apokrinné žľazy sa tvoria už počas embryonálneho vývoja jedinca. Na rozdiel od ekrinných žliaz sú žľazy omnoho väčšie a ich výskyt nie je situovaný po celom tele, avšak iba na jeho určitých častiach. Jedná sa o ochlpené časti ľudského tela, keďže vývod žliaz je umiestnený vo vlasovej folikule. Medzi tieto oblasti patrí hlavne podpazušie, dvorec prsníka, perigenitálna a perianálna oblasť (Sato, 1993). Žľazy sa tu nachádzajú v hustote približne 43 žliaz na centimeter štvorcový. V daných oblastiach sa s ekrinnými žľazami nachádzajú v pomere 1:1, pričom na zvyšku tela je tento pomer iba 1:10 v prospech ekrinných žliaz (Bang *et al.*, 1996).

Formovanie týchto žliaz prebieha zároveň s ekrinnými, avšak na rozdiel od nich dochádza tu ku vzniku pevnej vydutiny v pilosebaceóznej jednotke. V tomto období sa nachádzajú na celom tele človeka, avšak po 5.-tom mesiaci sa ich výskyt zužuje iba na dané časti tela. Až do puberty sú tieto žľazy neaktívne. Ich aktivácia je spôsobená vplyvom pohlavných hormónov, a to hlavne testosterónu (Bologna *et al.*, 2012).

Apokrinný pot je hustá, mliečna tekutina bez zápachu. Tento sekret obsahuje hlavne proteíny, lipidy, masťné kyseliny, steroidy, amoniak a sacharidy. Tekutina vychádzajúca na povrch slúži ako živný materiál pre baktérie, ktoré ju rozkladajú a vzniká tak charakteristický pach potu. Vylučovanie tohto typu potu je periodické a počas spánku je tento proces neaktívny (Labors *et al.*, 1979).

Apokrinné žľazy majú podobnú stavbu ako tie ekrinné, pričom sekrčná špirála prechádza do rovného kanáliku, ktorý následne vedie do pilosebaceóznej jednotky. Na povrch pokožky vedie kanálik iba veľmi výnimočne. Sekrečný región špirály sa nachádza v zamši a podkožnom tkanive (Ackermann, 1997).

Špirálu tvorí veľké množstvo rúrok, ktoré medzi sebou bývajú poprepájané. Rúrky sa skladajú z dvoch typov buniek, a to sekrečných a myoepitelových. Myoepitelové

bunky sú totožné s tými, ktoré sa nachádzajú u ekrinných žliaz. Nachádzajú sa v okolí sekrečných buniek, ktoré tvoria jednovrstvový epitel na vnútornej strane rúrok (Hurley Jr a Shelley, 1954). Tvar sekrečných buniek je rôzny a mení sa na základe veku samotnej bunky, a to od kubického po valcovitý. V týchto bunkách sa jadro vyskytuje pri bazálnej membráne. Bunky obsahujú veľa mitochondrií a rôznych granúlí. Tieto granule obsahujú veľké množstvo PAS pozitívnych glykoproteínov. Bunky sú rôzne stočené, a pri lumene sú prítomné klky. Pri lumene sa tiež nachádzajú apikálne čiapočky cytoplazmy, ktoré sa postupne odtrhávajú. Táto cytoplazma obsahuje vakuoly, vezikuly a granuly. Práve látky, ktoré sa nachádzajú v týchto organelách, sú hlavnou zložkou apokrinného potu (Montes *et al.*, 1960).

Kanálik je veľmi krátky a morfológicky je podobný kanáliku v ekrinných žľazách. Je lemovaný dvoma vrstvami kubických buniek. Tieto bunky nespôsobujú samotnú apokrinnú sekréciu. Na rozdiel od ekrinných kanálikov nemajú apokrinné kanáliky žiadnu reabsorbčnú funkciu a sekret je vypúšťaný priamo nad mazovou žľazou (Hibbs, 1962).

Inerváciu apokrinných žliaz zabezpečujú sympatetické nervy vychádzajúce z hrudných stavcov zhodnými s tými u ekrinných potných žliaz. Medzi hlavné neurotransmitery v tomto prípade patrí acetylcholín a katecholamín. Sú senzitívnejšie na epinefrín ako na norepinefrín, a na rozdiel od ekrinných žliaz sú priamo ovplyvňované hormonálnou stimuláciou. Starutím organizmu dochádza k útlmu týchto žliaz (Sato *et al.*, 1987; Sato, 1993).

Vyššia aktivita týchto žliaz je pozorovaná u mužov ako u žien, pričom ich hlavnou funkciou je odpoveď organizmu na emočné stimulácie, ako napríklad úzkosť, strach, bolesť, či sexuálne vzrušenie. Vzhľadom k tomu, že tento pot obsahuje veľké množstvo rôznorodých látok vrátane hormónov, zápach spôsobený týmto potom je u väčšiny živočíchov využívaný ako feromón a sexuálny atraktant (Aumüller *et al.*, 1999).

### **2.2.3 Apokrinné žľazy**

Apokrinné žľazy boli po prvý krát popísané až v roku 1987, pričom tieto žľazy kombinujú vlastnosti ekrinných aj apokrinných žliaz. Sú situované v rovnakých oblastiach ako apokrinné žľazy, avšak ich výskyt prevažuje v axilárnych regiónoch. Ich vznik má pôvod pravdepodobne v ekrinných bunkách, ktoré zanikajú počas puberty. Zo

všetkých žliaz nachádzajúcich sa v axilárnych regiónoch je u dospelého jedinca až 50% z nich apoekrinných (Sato *et al.*, 1987).

Ich veľkosť sa pohybuje medzi ekrinnými a apokrinnými. Štruktúra žliaz je nepravidelná a tvorená tromi typmi buniek, a to myoepiteliálnymi bunkami, jasnými ekrinnými bunkami a bazálnymi apokrinnými bunkami. Sekréciou potu sú podobné ekrinným žľazám. Sekrécia je kontinuálna a je vylučovaná na povrch pokožky. Pot je tvorený elektrolytickým roztokom takmer totožným s ekrinným potom (Sato a Sato, 1987).

Samotná funkcia týchto žliaz nebola doposiaľ dostatočne študovaná. Predpokladá sa, že hlavná funkcia nebude termoregulačná, vzhľadom k tomu, že potenie v podpazuší nie je z pohľadu termoregulácie príliš efektívne. Rovnako neznáma zostáva aj inervácia týchto žliaz. Doteraz bolo zistené, že apoekrinné žľazy sú náchylné viac k cholinergným než k adrenergným zlúčeninám. Cholinergné zlúčeniny dokonca ovplyvňujú tieto žľazy omnoho viac ako ekrinné žľazy (Sato *et al.*, 1987).

#### **2.2.4 Využitie potu v súčasnej medicíne**

Okrem niekoľkých veľkých molekúl, ktoré sa v pote nachádzajú, sa väčšinou jedná o malé molekuly z rôznych metabolických dráh. Práve tento fakt spolu s rozvojom metabolomiky podnietil zvýšený záujem o výskum v tomto odvetví. Hlavnou výhodou potu je jeho neinvazívny odber, čo môže byť kľúčové pri niektorých chorobách vo vyšších štádiách, kde je už napríklad odber krvi problematický. V takýchto prípadoch je potrebné stav pacienta kontrolovať čoraz častejšie, pričom častý odber krvi môže viesť k zvýšenému riziku infekcie. Ďalším pozitívom je jednoduchá úprava vzorky, kedy je v mnohých prípadoch možné využiť na analýzu samotný pot bez akejkoľvek úpravy.

Nevýhodou potu je malý objem získanej vzorky, väčšinou v rádoch mikrolitrov. Taktiež zloženie potu medzi jedincami je vysoko variabilné. Medzi ostatné negatíva patrí nedostatok analytických protokolov, ktoré by sa zaoberali súvislosťami medzi zložením potu a fyziologickým stavom organizmu. Práve kvôli tomuto nedostatku protokolov je náročné zaradiť pot medzi bežne skúmané vzorky, ako napríklad krv či moč.

Dôvod, prečo by mal byť pot zaradený medzi skúmané telové tekutiny, je ten, že niektoré choroby majú vplyv na zloženie potu. Mení sa hlavne koncentrácia známych

komponentov nachádzajúcich sa v pote. Tieto látky následne prechádzajú do apokrinného či ekrinného potu, kde je možné ich pozorovať ako biomarkery jednotlivých chorôb (Jadoon *et al.*, 2015).

Najvýznamnejšími testami, pri ktorých sa využíva pot ako vyšetřovaný materiál, je v dnešnej dobe stanovenie cystickej fibrózy u novorodencov a detekcia drog.

#### **2.2.4.1 Cystická fibróza**

Cystická fibróza (CF; OMIM 219700) je autozomálne recesívne dedičné ochorenie spôsobené mutáciami na siedmom chromozóme v géne *CFTR* („cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“). V minulosti bolo toto ochorenie letálne, avšak vďaka pochopeniu mechanizmu CF a objavenia možnosti liečby, dĺžka života pacientov vzrástla až na 50 rokov (Hurley *et al.*, 2014). Na začiatku bola táto choroba zamieňaná s celiakiou, pričom v roku 1938 došlo k jej osamostatneniu. Samotný *CFTR* gén bol objavený až v roku 1989 (Rommens *et al.*, 1989).

Od objavenia príčiny CF bolo identifikovaných vyše 2000 mutácií, ktoré ju spôsobujú. Aj napriek veľkej rôznorodosti mutácií, až u 70% pacientov sa jedná o mutáciu aminokyseliny na pozícií 508 ( $\Delta F508$ ). Základom tejto mutácie je delécia troch párov báz kódujúcich fenylalanín (Wainwright *et al.*, 2015). Mutácie v géne boli doteraz rozdelené do šiestich kategórií na základe mechanizmu dysfunkcie. Tieto kategórie sú popísané v tabuľke číslo 4 (Rafeeq a Murad, 2017).

Gén *CFTR* je exprimovaný v mnohých telesných orgánoch, predovšetkým v dýchacej a tráviacej sústave. *CFTR* proteín plní funkciu chloridového kanálu a dovoľuje chloridovým iónom prechádzať na povrch buniek, kde sa nachádza hlien. Po chloridových iónov sa vďaka osmóze nepriamo resorbuje aj voda a samotný hlien tak získava riedku konzistenciu. V prípade mutácie *CFTR* génu dochádza k zvýšenej koncentrácii chloridových iónov v bunke. Táto zmena vedie k zvýšenej reabsorbcii sodíku a sekundárne tiež vody, čo spôsobuje dehydratáciu hlienu. Tak dochádza k upchávaniu dýchacích ciest, vzniku zápalov a chronickým bakteriálnym infekciám dýchacej sústavy predovšetkým baktériami *Pseudomonas aeruginosa* alebo *Staphylococcus aureus*. V prípade potných žliaz je *CFTR* proteín zodpovedný za reabsorbciu chloridových iónov z kanálka do obehu. Pokiaľ nastane na *CFTR* géne defekt, tento proteín stráca svoju funkciu reabsorbovať ióny, ktoré sú spolu s vodou



vylučované na povrch pokožky, čím dochádza k produkcii slaného potu a dehydratácií organizmu (Bombieri *et al.*, 2011).

Na určenie diagnózy cystickej fibrózy u novorodencov je využívaná metóda merkurimetrickej titrácie. Pot je pridávaný do roztoku difenylkarbazónu, ktorý je okyslený pomocou kyseliny sírovej. Následne nastáva titrácia chloridových iónov z potu pomocou dusičnanu ortuťnatého, až pokiaľ nevznikne slabo fialové sfarbenie. Toto sfarbenie je vytvorené tvorbou komplexu difenylkarbazónu ortuťnatého, ktorý sa tvorí až po zreagovaní všetkých chloridových iónov v roztoku. K porovnaniu sa využíva roztok štandardu chloridových iónov o koncentrácií 100 mmol/l, ktorý sa riedi na kalibračnú krivku 10-60 mmol/l. Za pozitívny nález sa považuje koncentrácia chloridových iónov vo vzorke nad hranicou 60 mmol/l (Huckelmann a Oster, 2002).

**Tab. č. 4:** Rozdelenie mutácií CFTR do kategórií, ich defekt a jeho dôsledok (upravené podľa Rafeeq a Murad, 2017).

Kategória	Defekt	Dôsledok
I	Chybná produkcia proteínov	Úplná absencia proteínu z dôvodu predčasného ukončenia mRNA
II	Chybné spracovanie proteínov	Neschopnosť proteínu lokalizovať správnu bunkovú lokácia kvôli postranslačným úpravám
III	Chybná regulácia proteínov	Znížená aktivita proteínu pri odpovedi na ATP kvôli abnormalitám v jadrovej oblasti
IV	Chybné vedenie proteínov	Frekvencia toku iónov a doba otvorenia kanálu sú znížené, aj napriek tomu, že pri stimulácií s cAMP dochádza k posunu chloridových iónov
V	Znížený počet funkčných CFTR	Stabilita mRNA a/alebo konečného proteínu je nízka
VI	Normálny počet funkčných CFTR	Zvýšený obrat chloridových iónov na základe abnormalít na C-konci

## 2.3 Lipidomika

Lipidy sú jedným z najdôležitejších elementov, ktoré sa nachádzajú v bunke. Jedná sa o hydrofóbne alebo amfipatické molekuly s unikátnou štruktúrou a unikátnymi biologickými vlastnosťami. Jednou z ich funkcií je uchovávanie energie. Ďalej sú dôležitým štrukturálnym komponentom biologických membrán, pričom sa často podieľajú na bunkovej komunikácii a signalizácii, kde pôsobia ako poslovia a interagujú s okolitými proteínmi. Bioaktívne lipidy sú taktiež dôležité aj vo svojej funkcii v imunitnom systéme, kedy interagujú s bakteriálnymi a vírusovými infekciami (van Meer, 2005; Saliba *et al.*, 2015; Morita *et al.*, 2013). Lipidy sa delia do skupín na základe ich funkčnej štruktúry. Je známych osem skupín, a to masné kyseliny, glycerolipidy, glycerolfosfolipidy, sfingolipidy, sterolové lipidy, prenolové lipidy, glykolipidy a polyketídy. Tieto hlavné skupiny sa ďalej delia do podskupín na základe ich štrukturálnych zmien a chemických vlastností (Fahy *et al.*, 2005).

S pojmom lipidomika sa prvý krát stretávame v roku 2003 v dvoch výskumoch, a to výskumoch, ktoré vypracovali Spener *et al.* a Han a Gross. Lipidomika je charakterizovaná ako kvalitatívna alebo kvantitatívna determinácia lipidov, ktoré sa v určitom čase nachádzajú v bunkovom systéme, telových tekutinách, či v celom organizme. Podľa stratégie pri detegovaní lipidov sa lipidomika delí na dva samostatné prístupy, a to na cielenú a necielenú. Necielená lipidomika sa sústreďí na všetky detekovateľné analyty, ktoré sa vo vzorke nachádzajú. Jedná sa o množinu lipidov spolu s neznámymi chemickými látkami. Výhodou je detekcia veľkého množstva analytov a nevýhodou je nutnosť ich spätnej identifikácie. Cielená lipidomika sa zaoberá meraním predom definovaných lipidov. Je detegovaných menej analytov, avšak výsledky sú presnejšie s vyššou spoľahlivosťou metódy.

V rámci lipidomickej analýzy je potrebné vykonanie niekoľkých rôznych krokov. Ako prvé je treba získať potrebnú vzorku, pričom sa môže jednať o bunkovú kultúru, jednotlivé bunkové organely, telové tekutiny, tkanivo, celé organizmy a podobne. Nasleduje extrakcia lipidov zo vzorky, separácia jednotlivých lipidov, ich detekcia a nakoniec samotná identifikácia lipidov. Výber konečnej metódy musí byť precízne prispôbený jednotlivým vzorkám a analytom, ktoré majú byť merané.

Pri extrakcii lipidov sa primárne využíva extrakcia na princípe kvapalina-kvapalina. V minulosti sa prevažne využívali extračné prístupy na základe delenia systému chloroformu, metanolu a vody podľa Folcha *et al.* (1957) alebo Bligha a Dyera (1959). Tieto metódy sa v mnohých laboratóriách používajú dodnes. V dnešnej dobe sa však začínajú využívať aj iné organické rozpúšťadlá, ako napríklad metyltercbutyléter (MTBE), ktorý je menej toxický a dosahuje sa vďaka nemu kvalitnejšieho spracovania vzorky (rýchlejšia a čistejšia návratnosť väčšiny lipidov) (Matyash *et al.*, 2008). Ďalšími možnosťami extrakcie sú extrakcia na pevnej fáze a mikroextrakcia na pevnej fáze (Raterink *et al.*, 2014). Žiadna metóda extrakcie nie je vhodná pre všetky známe kategórie lipidov, a preto je potrebné každú extrakčnú metódu prispôbiť analytom, ktoré sa budú pri danom experimente sledovať (Reis *et al.*, 2013).

Po extrakcii sa k separácii využívajú rôzne chromatografické metódy, ako napríklad chromatografia na tenkej vrstve, plynová chromatografia či kvapalinová chromatografia. Najpopulárnejšou metódou k samotnej detekcii lipidov sa vďaka svojej vysokej citlivosti využíva hlavne hmotnostná spektrometria (MS) (Gross a Han, 2011). Hmotnostná spektrometria je často kombinovaná s kvapalinovou (LC) alebo plynovou chromatografiou. Je známa aj shotgun metóda, kedy sa lipidy neseparujú, a priamym nástrekom v MS detegujú. Táto metóda sa ukázala účinná napríklad pri detekcii zmien sfingolipidov v plazme v skorých štádiách Alzheimerovej choroby (Han *et al.*, 2011). V porovnaní s priamym nástrekom má ale hmotnostná spektrometria v spojení s kvapalinou chromatografiou mnohé výhody, ako napríklad detekcia izobarov a izomérov, znižuje sa supresia iónov a vzniká možnosť delenia látok vo vzorke na základe jej fyzikálnochemických vlastností (Astarita a Yu, 2012; Blanksby a Mitchell, 2010). Samotné delenie nastáva na základe rozdielnych chemických a fyzikálnych interakcií medzi lipidmi, pevnou fázou a mobilnou fázou, v ktorej sú rozpustené. Kolóny, ktoré sa využívajú k separácii lipidov, sú najčastejšie založené na obrátenej fáze (RP) LC (C<sub>18</sub> alebo C<sub>8</sub>) a niekedy tiež na normálnej fáze (NP) LC, pričom NPLC delí lipidy na základe ich polárnych skupín a RPLC zahŕňa delenie na základe rozdielnej dĺžky ich acylových reťazcov mastných kyselín. Okrem výberu kolóny je dôležité sa zaoberať aj výberom ionizačného módu u MS. Bolo vyvinutých mnoho ionizačných techník, ktoré s LC môžu byť v tandemovom usporiadaní, pričom najčastejšie sa jedná o ionizáciu elektrosprejom, MALDI (matrix assisted laser desorption/ionization), ionizáciu

desorbčným elektrosprejom, chemickú ionizáciu za atmosférického tlaku, či fotoionizáciu za atmosférického tlaku (Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2009).

Po zmeraní vzoriek je nutné nespracované dáta z prístroja upraviť. Jedná sa o rôzne filtrovanie dát, detekciu píkov, úpravu správnosti jednotlivých píkov, či normalizáciu dát. Konečným výsledkom sú  $m/z$  hodnoty, retenčné časy analytov a intenzita píkov (Katajamaa a Orešič, 2007). Je známe veľké množstvo programov na spracovanie dát a samotné vyhodnotenie (Orešič, 2011; Castillo *et al.*, 2011). Jednou z databáz, ktorá sa využíva čisto pre účely lipidomických analýz je databáza LIPIS MAPS z domény <https://www.lipidmaps.org>. Ďalej sú k spracovaniu dát často využívané rôzne metabolomické databázy, ako napríklad XCMS (Tautenhahn *et al.*, 2011) či MS-DIAL (Tsugawa *et al.*, 2015).

## 3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 3.1 Materiál a chemikálie

#### 3.1.1 Biologický materiál

K experimentu boli využité odobrané vzorky potov od sedemnástich pacientok z roku 2018, štyroch pacientok z roku 2017 a od 24 kontrol z roku 2017. Charakteristika postihnutia jednotlivých pacientok z rokov 2017 aj 2018 je popísaná v tabuľke č. 5. Vzorky boli získané z Centra pro výzkum a vývoj, Fakultní nemocnice Hradec Králové, pod vedením prof. MUDr. Zdeňka Zadáka, CSc.

Tab. č. 5: Charakteristika jednotlivých pacientok.

Pacientka	Vek v dobe odberu	Klasifikácia nádoru	Hormonálne receptory	<i>HER2</i>
1	77	T1c N3a G2	E-90, P-0	3+
2	64	T1c N0 G3	E-95, P-10	1+
3	43	T2 N1 G2	E-60, P-30	1+
4	63	T2 N0 G2	E-0, P-0	0
5	65	T1 N0 G2	E-100, P-55	0
6	67	T2 N0 G2	E-90, P-20	1+
7	74	T2 N1 G2	E-0, P-0	3+
8	53	T1 N0 G2	E-0, P-0	0
9	78	T2 N1a G1	E-100, P-100	1+
10	73	T3 N2 G3	E-100, P-90	1+
11	79	T1b N0 G3	E-0, P-0	0
12	84	T4b N0 G2	E-70, P-25	0
13	63	T1c N1 G1	E-100, P-60	1+
14	59	T1b N0 G1	E-100, P-90	1+
15	41	T3 N1 G2	E-95, P-50	2+
16	53	T1c N0 G3	E-0, P-0	2+
17	74	T4c N3a G3	E-85, P-35	1+
18	77	T1b N0 G1	E-90, P-0	2+
19	66	T1c N0 G2	E-95, P-90	2+
20	46	T1c N0 G1	E-90, P-80	1+
21	61	T1b N0 G1	E-100, P-100	2+

T – označenie veľkosti nádoru; T1 – nádor > 0,1 cm ale < 2 cm; T1b – nádor > 0,5 cm ale < 1 cm; T1c – nádor > 1 cm ale < 2 cm; T2 – nádor > 2 cm ale < 5 cm; T3 – nádor > 5 cm; T4b – nádor prerastá do kože; T4c – nádor prerastá do hrudnej steny a kože; N – označenie napadnutia uzlín; N0 – uzliny neboli napadnuté; N1 – uzliny boli napadnuté; N1a – rakovinné bunky metastázovali do 1 až 3 lymfatických uzlín, pričom aspoň jedna je väčšia ako 2 mm; N2 – rakovinné bunky metastázovali lymfatických uzlín v podpazuší či za hrudnou kosťou; N3a – rakovinné bunky sú v lymfatických uzlinách pod kľúčnou kosťou; G – určenie stupňa diferencovanosti nádoru; G1 – dobre diferencovaný nádor; G2 – stredne diferencovaný nádor; G3 – málo diferencovaný nádor; E – estrogén; P – progesterón; *HER2* – receptor ľudského rastového faktora 2

### 3.1.2 Chemikálie

Acetát amónny (AmAc), acetonitril (ACN), izopropylalkohol (IPA), metanol (MeOH), metyltercbutyléter (MTBE), voda (H<sub>2</sub>O). Všetky chemikálie boli LC-MS kvality a zakúpené boli u firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### 3.1.3 Prístrojové vybavenie

Chladená centrifúga (Rotina 410, Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Nemecko); hmotnostný spektrometer Triple Quad 6500 (AB Sciex, Foster City, CA, USA); kvapalinový chromatograf UltiMate 3000RS (Dionex, Sunnyvale, CA, USA); lyofilizátor (Freezone, Labconco, USA); ultrazvuková kúpeľ (PS-40A, Jeken, Guangdong, Čína); vortex (V-1 plus, Biosan, Riga, Lotyšsko).

## 3.2 Optimalizácia odberu potu

K optimalizácií odberu potu boli využité tri metódy. Prvou bol odber potu pomocou čistiackej tyčinky na MS, ktorá bola vopred namočená do IPA. Koniec tyčinky s potom bol následne extrahovaný pomocou IPA. Extrakt bol lyofilizovaný, opätovne rozpustený v IPA a analyzovaný. Druhou metódou bol odber pomocou kovovej špachtle, ktorá bola po odbere zmytá IPA (150 µl) a analyzovaná. Treťou metódou bol odber pomocou malej frity, ktorá pred samotným odberom bola namočená v IPA. Po odbere bola fritá daná do nádoby s 1 ml IPA a cez noc lyofilizovaná. Odparok bol rozpustený v IPA a potom analyzovaný.

K analýze bola využitá ultravysokoúčinná kvapalinová chromatografia v kombinácii s hmotnostnou spektrometriou bližšie popísanou v kapitole 3.4.2.

## 3.3 Optimalizácia extrakcie potu

Ďalším krokom bola optimalizácia extrakcie lipidov z potu. K optimalizácií extrakcie boli využité dve rôzne extrakčné činidlá, a to extrakcia pomocou metyltercbutyléteru a izopropylalkoholu.

V prvom type extrakcie sa k frite s potom pridalo 2,6 ml zmesi MTBE:MeOH v pomere 5:1, pričom bola nádobka umiestnená na 10 min na ultrazvuk. Následne bola nádobka daná na 1h na trepačku pri laboratórnej teplote. Po uplynutí tejto doby bolo do

nádobky pridaných 0,4 ml vody a opäť trepaná (30 min, laboratórna teplota). Zmes bola následne prepitovaná do ependorfky a centrifugovaná 10 minút pri 14000g a 4°C. Bol odpipetovaný 1 ml hornej vrstvy, ktorý sa následne cez noc lyofilizoval. Ďalší deň bol odparok rozpustený v 100 µl IPA:ACN:H<sub>2</sub>O v pomere 2:1:1.

V druhej extrakcii sa k potu v odberovej nádobke pridali 3 ml 80 % izopropylalkoholu, pričom nádobka bola umiestnená na 10 min na ultrazvuk. Potom bola nádobka 10 min trepaná. Boli odobraté 2 ml a cez noc lyofilizované. Ďalší deň boli lipidy rozpustené v 100 µl IPA:ACN:H<sub>2</sub>O v pomere 2:1:1.

K analýze bola využitá ultravysokoúčinná kvapalinová chromatografia v kombinácii s hmotnostnou spektrometriou bližšie popísanou v kapitole 3.4.2.

### **3.4 Lipidomická analýza potu**

#### **3.4.1 Príprava vzoriek**

##### **3.4.1.1 Odber potu**

Deň pred odberom si pacientka oholila axily podľa svojich zvyklostí a následne až do odberu potu nevyužívala prípravky s aplikáciou do podpazušia.

Samotný odber potu prebiehal nasledovne. Odberové nádobky boli označené menom pacientky a stranou podpazušia. Odber bol vykonávaný v rukaviciach. Axilárny apokrinny pot bol odoberaný prechádzaním sterilnej frity po povrchu kože odchlpenej časti axily, kde ústia apokrinné potné žľazy. Apokrinny pot vo vývodoch bol exprimovaný miernym tlakom na fritu a okamžite odsatý kapilaritou do vnútra frity. Doba odberu bola približne pol minúty. Po odbere bola fritu ihneď vložená do odberovej nádobky a zamrazená (- 80°C).

Vzorky potu boli odobraté pacientkam s karcinómom prsníkov a zdravým pacientkam. V oboch prípadoch sa pot odoberal z pravého aj ľavého podpazušia. Celkom to tvorilo 90 vzoriek.

### 3.4.1.2 Extrakcia potu a vytvorenie QC (Quality Control) vzoriek

Vzorky potov boli extrahované pomocou MTBE, MeOH a vody, t.j. extrakcia kvapalina-kvapalina (Matyash *et al.*, 2008), a to nasledujúcim spôsobom. K frite s potom boli pridané 2,6 ml zmesi MTBE:MeOH v pomere 5:1. Zmes bola sonifikovaná po dobu 10 min a potom inkubovaná na trepačke po dobu 1 hodiny pri laboratórnej teplote. Následne boli pridané 0,4 ml vody a frita bola opäť inkubovaná na trepačke 30 min pri laboratórnej teplote. Zmes bola kompletne prepipetovaná do ependorfky, a na 10 min centrifugovaná pri 14000g a 4°C. Horná vrstva (2 ml) bola odpipetovaná a cez noc lyofilizovaná. Nasledujúci deň bol odparok rozpustený v 100 µl IPA:ACN:H<sub>2</sub>O (2:1:1; izopropylalkohol : acetonitril : voda).

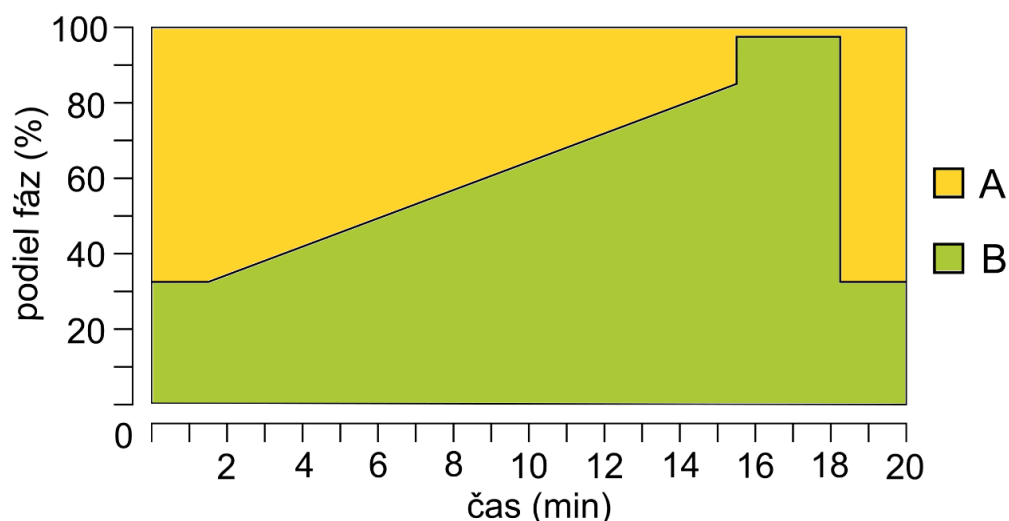
Časť z každej vzorky (15 µl) bola prepipetovaná do spoločnej vialky, a bola využitá ako kontrola kvality (QC). Zvyšok vzorky bol prepipetovaný do jednotlivých vialok.

### 3.4.2 Analýza pomocou UHPLC-MS/MS

Vzorky potov, vrátane QC vzoriek, boli náhodne analyzované pomocou metódy založenej na ultravysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografii v kombinácii s MS optimalizovanej podľa Xuan *et al.* (2018).

Na separáciu jednotlivých lipidov bola využitá kolóna obrátenej fázy BEH C<sub>8</sub> (2,1 mm; 100 mm; 1,7 mm; Waters, Milford, MA, USA). Mobilná fáza A pozostávala z ACN/H<sub>2</sub>O v pomere 60:40 (v/v) a mobilná fáza B pozostávala z IPA/ACN v pomere 90:10 (v/v). Obe obsahovali 10 mM AmAc. Prietok bol 0,35 ml/min. Vyhrievanie kolóny bolo nastavené na 55°C. Elučný gradient začínal s 32 % mobilnej fázy B po dobu 1,5 min, pričom až po 15,5 min lineárne stúpil na 85 % B a následne pri 15,6 min vystúpil na 97 % B. Takto udržiavaný bol po dobu 2,4 min. Následne sa gradient vrátil na 32 % B v 18,1 min a bol udržiavaný po dobu 1,9 min. Celá doba analýzy bola 20 min (Obr. č. 6).





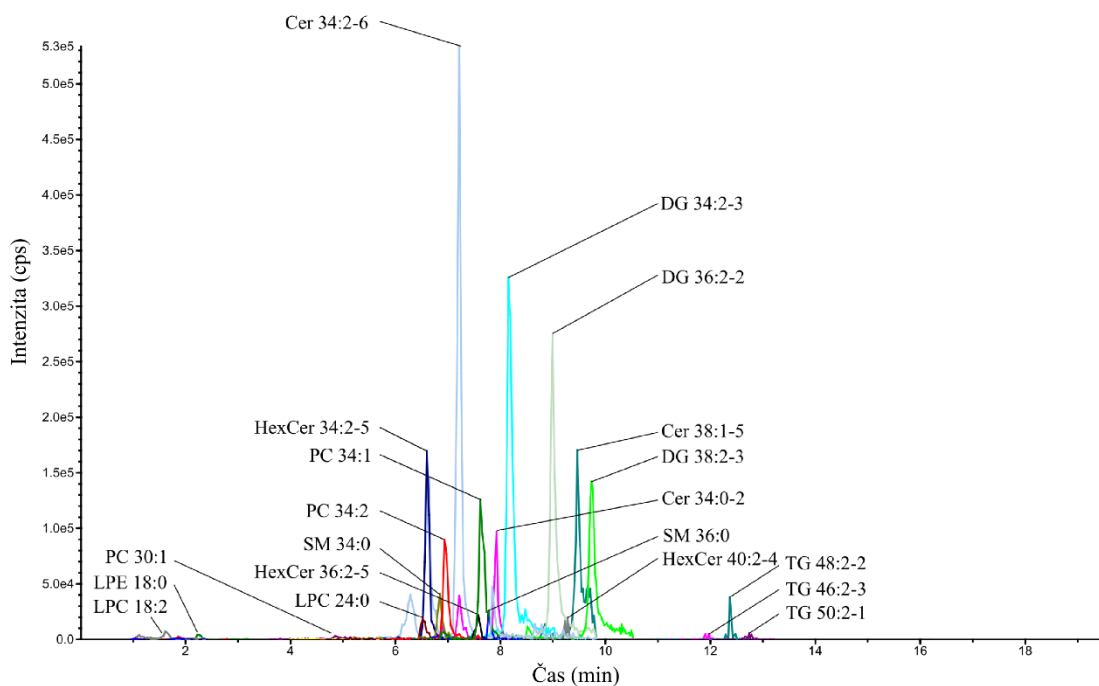
**Obr. č. 6:** Záznam elučného gradientu pri separácii lipidov u UHPLC-MS/MS.

Detekcia prebehla pomocou Triple Quad 6500 tandemovej MS (AB Sciex, Foster City, CA, USA) ionizáciou elektrosprejom v pozitívnom aj negatívnom móde. Analyty boli pozorované v móde MRM („multiple reaction monitoring mode“). Parametre v IonDrive™ Turbo V zdroji boli nasledovné: tlak „curtain gas“ 40 psi; tlak kolízneho plynu, 6/8 psi; napätie na kapiláre v iónovom zdroji 5,500 V/- 4,500 V; tlak plynu v zdroji 1, 50 psi; tlak plynu v zdroji 2, 60 psi; teplota zdroja – 500°C. Prístroj bol kontrolovaný pomocou softvéru Analyst v1.6.2 (SCIEX, Framingham, MA, USA).

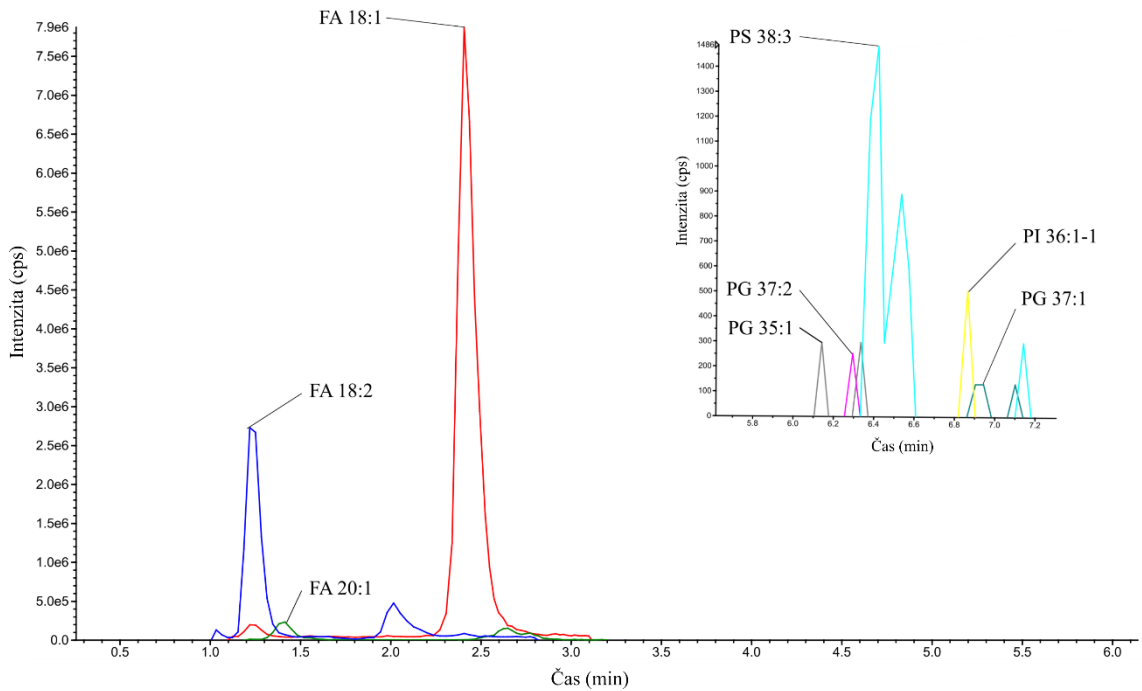
Analyzované lipidy boli zo skupín ceramidov (Cer), diacylglycerolov (DG), mastných kyselín (FA), dihexaglykozylceramidov (Hex2Cer), hexaglykozylceramidov (HexCer), lyzofosfatidylcholínov (LPC), lyzofosfatidyletanolamínov (LPE), fosfatidylcholínov (PC), alkylových a alkenylových substituentov PC (PC O), fosfatidyletanolamínov (PE), alkylových a alkenylových substituentov PE (PE O), fosfatidylglycerolov (PG), fosfatidylinozitolov (PI), fosfatidylserínov (PS), sfingomyelínov (SM) a triacylglycerolov (TG). Všetky lipidy v analýzach sú zapísané nasledujúcim spôsobom. Prvé písmená v názve (napr. lipid Cer.32\_0\_2) označujú skupinu lipidov, z ktorej tento lipid pochádza (tzn. Cer – ceramidy); prvé číslo (tzn. 32) vyjadruje celkový počet uhlíkov v reťazci daného lipidu; druhé číslo (tzn. 0) popisuje počet dvojných väzieb v lipide; a tretie číslo (tzn. 2) značí o ktorý izomér lipidu sa jedná.

### 3.4.3 Spracovanie dát

Analyty boli detegované a identifikované pomocou MRM prechodov a retenčných časov prostredníctvom softvéru MultiQuant 3.0 (SCIEX, Framingham, MA, USA). Ukážkové chromatogramy z pozitívneho a negatívneho módu sú zobrazené na obrázku číslo 7 a 8. Plocha píkov jednotlivých lipidov bola extrahovaná a následne spracovaná.



**Obr. č. 7:** Ukážkový chromatogram lipidov analyzovaných v pozitívnom móde v rámci lipidomickej analýzy u pacientky s karcinómom prsníkov veľkosti T4.



**Obr. č. 8:** Ukázkový chromatogram lipidov analyzovaných v negatívnom móde v rámci lipidomickej analýzy u pacientky s karcinómom prsníkov veľkosti T4.

Namerané dáta boli spracované a štatisticky vyhodnotené pomocou programu „R“ (verzia 3.1.2.) s využitím metabolického štatistického balíčka Metabol (Gardlo *et al.*, 2019). V rámci spracovania bola vykonaná interpolácia dát pomocou metódy LOESS („Locally Weighted Regression“), ktorá odstránila systematické chyby. Z QC vzoriek bol vypočítaný variačný koeficient (CV), pričom všetky lipidy, ktoré mali túto hodnotu nad 30 %, boli z ďalšej analýzy vylúčené. Na dáta, ktoré boli ďalej analyzované, bola aplikovaná „clr“ transformácia („centred log ratio“) a centrovanie na nulu. Konečným štatistickým výstupom boli PCA, VIP grafy OPLS-DA, skórové grafy OPLS-DA, heatmapa, krabicové grafy a mapy v programe Cytoscape.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Optimalizácia odberu potu

Pri optimalizácii odberu potu bolo pomocou UHPLC-MS/MS hľadaných dohromady 2222 lipidov rozdelených do 15-tich skupín v pozitívnom a 4 skupín v negatívnom móde. Boli využívané tri techniky odberu, a to odber prostredníctvom čistiacej tyčinky na MS, kovovou špachtľou a fritou. Celkový počet detegovaných lipidov u jednotlivých odberov je znázornený v tabuľke č. 6. Ďalej bola sledovaná celková suma nameranej plochy jednotlivých skupín lipidov (Tab. č. 7), pričom zistená plocha bola porovnávaná s množstvom lipidov, ktoré boli nájdené v blanku odberov.

**Tab. č. 6:** Počet lipidov, ktoré boli pri optimalizácii hľadané a detegované. MS – čistiaca tyčinka na MS; K – kovová špachtľa; FR – fritá

		Všetky hľadané lipidy	Detegované pri odbere s MS	Detegované pri odbere s K	Detegované pri odbere s FR
Pozitívny mód	CE	16	3	3	3
	Cer	140	97	50	98
	DG	389	111	47	113
	Hex2Cer	25	3	2	3
	HexCer	63	34	23	31
	LPC	24	16	13	16
	LPC O	6	4	1	4
	LPE	22	19	12	19
	LPE O	3	1	1	1
	PC	90	56	45	51
	PC O	77	41	35	39
	PE	87	33	27	31
	PE O	154	44	15	39
	SM	47	37	34	37
TG	380	184	184	183	
Negatívny mód	FA	43	43	43	43
	PG	219	6	3	5
	PI	218	17	9	17
	PS	219	25	14	26
Súčet		2222	774	561	759

**Tab. č. 7:** Nameraná plocha jednotlivých skupín lipidov v pote v porovnaní s nameranou plochou lipidov detegovaných v blanku. MS – čistiaca tyčinka na MS; K – kovová špachtľa; FR – fritá

		Priemerná suma plochy skupiny lipidov pri meraní s MS	Priemerná suma plochy MS blank	Podiel blanku a priemeru (%)	Priemerná suma plochy skupiny lipidov pri meraní s K	Priemerná suma plochy K blank	Podiel blanku a priemeru (%)	Priemerná suma plochy skupiny lipidov pri meraní s FR	Priemerná suma plochy FR blank	Podiel blanku a priemeru (%)
Pozitívny mód	CE	7,283E+04	4,530E+03	6,22	1,282E+05	4,019E+03	3,14	1,074E+05	3,334E+03	3,10
	Cer	2,615E+08	7,788E+06	2,98	1,318E+07	2,782E+05	2,11	2,629E+08	6,852E+06	2,61
	DG	1,400E+08	1,137E+06	0,81	6,314E+06	4,160E+05	6,59	1,929E+08	3,214E+06	1,67
	Hex2Cer	3,407E+06	9,072E+02	0,03	3,766E+05	1,153E+03	0,31	2,335E+06	1,345E+04	0,58
	HexCer	3,447E+07	9,856E+04	0,29	3,680E+06	2,168E+04	0,59	1,511E+07	1,343E+05	0,89
	LPC	1,469E+07	6,370E+04	0,43	1,188E+06	1,514E+04	1,27	1,170E+07	4,936E+04	0,42
	LPC O	4,321E+05	1,440E+04	3,33	3,619E+04	1,734E+03	4,79	3,035E+05	1,168E+04	3,85
	LPE	5,621E+06	3,595E+05	6,40	1,205E+06	2,672E+04	2,22	6,389E+06	4,159E+05	6,51
	LPE O	9,379E+04	5,061E+01	0,05	3,627E+04	5,499E+02	1,52	6,985E+04	9,148E+02	1,31
	PC	1,669E+09	1,177E+05	0,01	9,131E+07	4,664E+04	0,05	7,445E+08	2,648E+05	0,04
	PC O	7,098E+07	3,967E+04	0,06	4,342E+06	2,635E+04	0,61	4,076E+07	1,849E+05	0,45
	PE	1,146E+08	3,645E+04	0,03	3,598E+06	2,439E+04	0,68	4,388E+07	4,202E+04	0,10
	PE O	5,932E+06	4,205E+04	0,71	1,166E+05	9,500E+03	8,14	2,056E+06	3,157E+04	1,54
	SM	2,689E+08	4,477E+04	0,02	2,378E+07	2,356E+04	0,10	1,650E+08	5,046E+05	0,31
TG	1,402E+08	1,476E+06	1,05	1,028E+08	1,342E+06	1,31	2,145E+08	1,794E+06	0,84	
Negatívny mód	FA	1,013E+10	2,511E+08	2,48	1,214E+09	9,577E+07	7,89	7,957E+09	6,944E+08	8,73
	PG	8,280E+04	0,000E+00	0,00	8,130E+03	0,000E+00	0,00	1,084E+05	0,000E+00	0,00
	PI	3,404E+05	2,741E+02	0,08	3,483E+04	2,642E+02	0,76	3,597E+05	2,390E+03	0,66
	PS	4,521E+06	1,566E+03	0,03	6,751E+05	0,000E+00	0,00	8,710E+06	1,260E+04	0,14

## 4.2 Optimalizácia extrakcie potu

Táto optimalizácia bola uskutočnená dvoma činidlami, a to extrakciou lipidov z potu pomocou MTBE a pomocou IPA. Ako aj pri predchádzajúcej optimalizácii, boli znovu použité oba módy, negatívny i pozitívny. Avšak, zatiaľ čo pri predošlom meraní bola využitá metóda pre jeden negatívny a jeden pozitívny mód, v tomto boli aplikované dve metódy pozitívnych módov. Tentoraz tak bolo sledovaných 3377 lipidov rozdelených do 14-tich skupín. V tabuľke č. 8 je zobrazený počet detegovaných lipidov v jednotlivých skupinách, rovnako ako hodnoty celkovo zmeraných plôch skupín.

**Tab. č. 8:** Počet lipidov a plocha jednotlivých skupín lipidov, ktoré boli detegované pri extrakciách potu pomocou MTBE a IPA

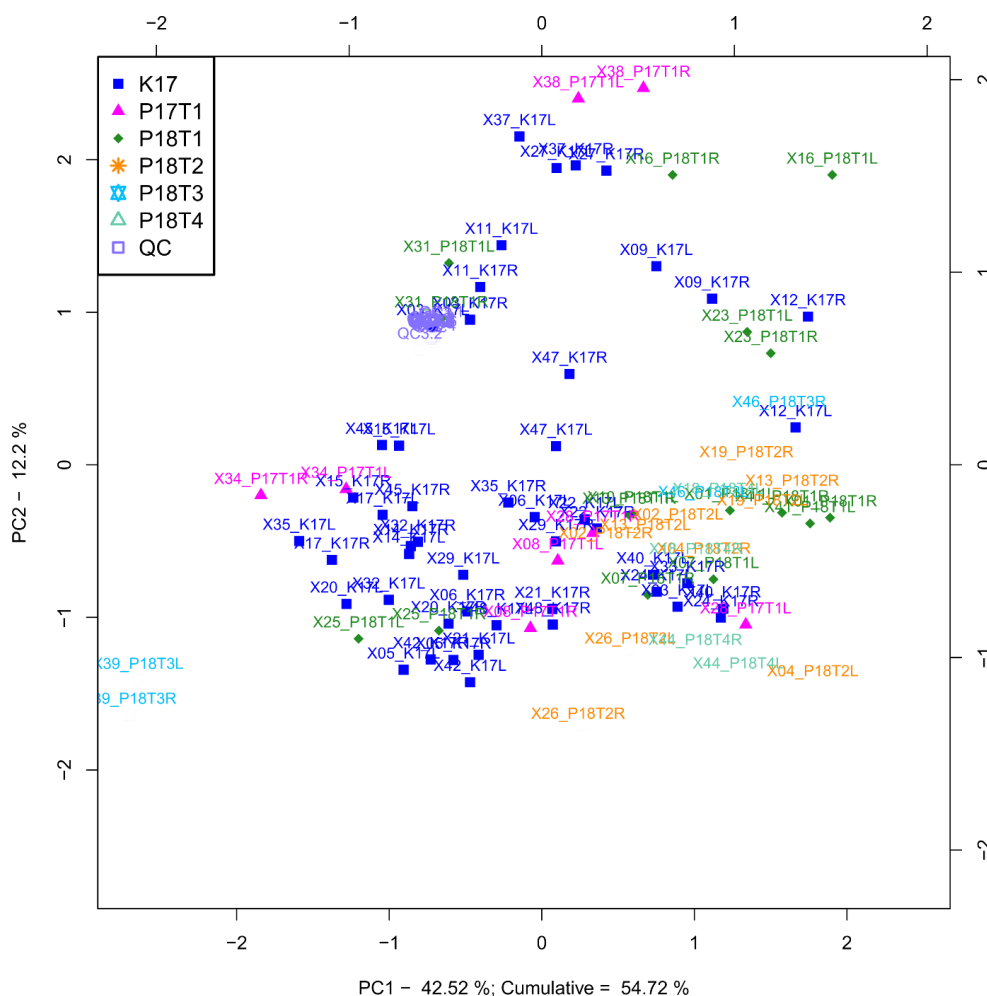
		Všetky hľadané lipidy	Detegované pri extrakcií s IPA	Detegované pri extrakcií s MTBE	Suma plochy IPA	Suma plochy MTBE
Pozitívny mód	CE	48	0	0	0,000E+00	0,000E+00
	Cer	284	115	129	8,650E+07	1,079E+08
	DG	777	46	48	1,090E+07	1,054E+07
	Hex2Cer, HexCer	167	9	11	5,381E+06	3,775E+06
	LPC - LPC O	55	20	19	1,318E+07	1,141E+07
	LPE - LPE O	50	6	6	6,623E+05	4,147E+05
	PC - PC O	365	84	95	1,144E+08	9,505E+07
	PE - PE O	503	13	15	3,658E+06	3,897E+06
	SM	89	30	36	3,754E+07	3,373E+07
	TG	508	12	5	9,323E+05	2,294E+05
Negatívny mód	FA	43	43	43	2,541E+09	3,868E+09
	PG	156	0	0	0,000E+00	1,086E+04
	PI	167	0	0	0,000E+00	0,000E+00
	PS	165	5	9	6,603E+05	1,313E+06
<b>Spolu</b>		3377	382	416	2,815E+09	4,14E+09

## 4.3 Lipidomická analýza potu

### 4.3.1 Štatistická analýza

Vzhľadom ku koncentračným rozdielom jednotlivých látok naprieč jednotlivými vzorkami odobraných potov, bola na dátový súbor aplikovaná „clr“ transformácia. Tieto dáta sú tak zobrazené ako dáta kompozičné, a relevantné informácie sú obsiahnuté v podieloch medzi zložkami v rámci každej vzorky.

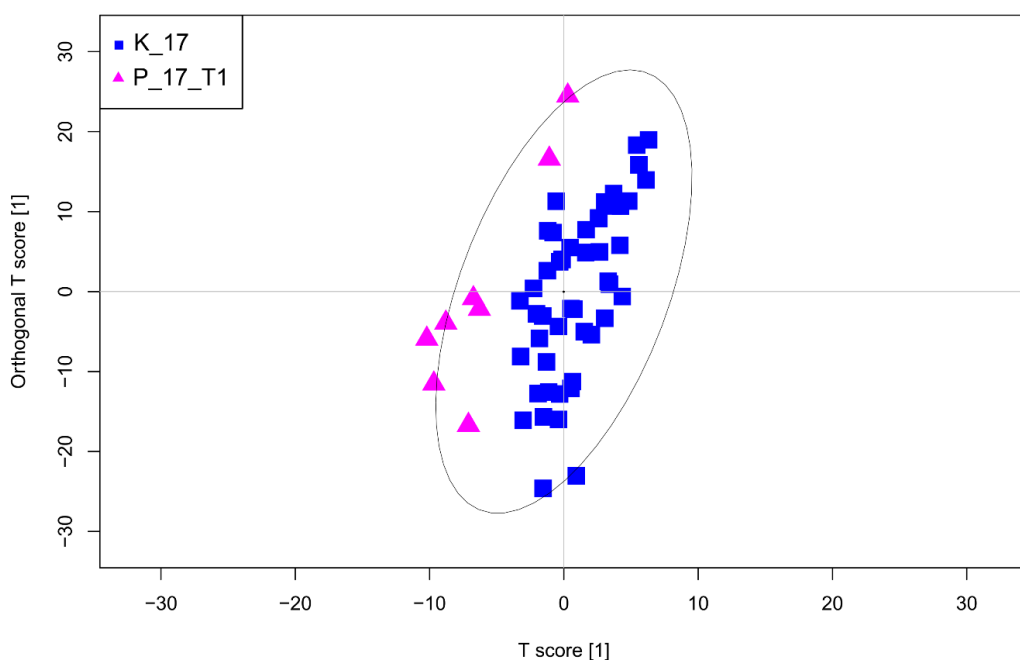
Nesupervizovaná metóda analýzy hlavných komponentov, PCA (Obr. č. 9), by za ideálnych podmienok rozdelila vzorky kontrol od pacientov a zároveň jednotlivé štádia karcinómu do samostatných skupín, avšak v našom prípade dochádzalo k prekrývaniu jednotlivých skupín. V grafe sme však pozorovali klastrovanie vzoriek potu od jedného pacienta. Súčet vysvetlenej variability komponent PC1 a PC2 bol 54,72%.



**Obr. č. 9:** PCA vzoriek potu s farebnou vizualizáciou jednotlivých skupín. K – kontrola; P – pacient; 17, 18 – rok odberu potu; T1, T2, T3, T4 – veľkosť nádoru; R – pravá strana postihnuta; L – ľavá strana postihnuta; QC – vzorky kontroly kvality.

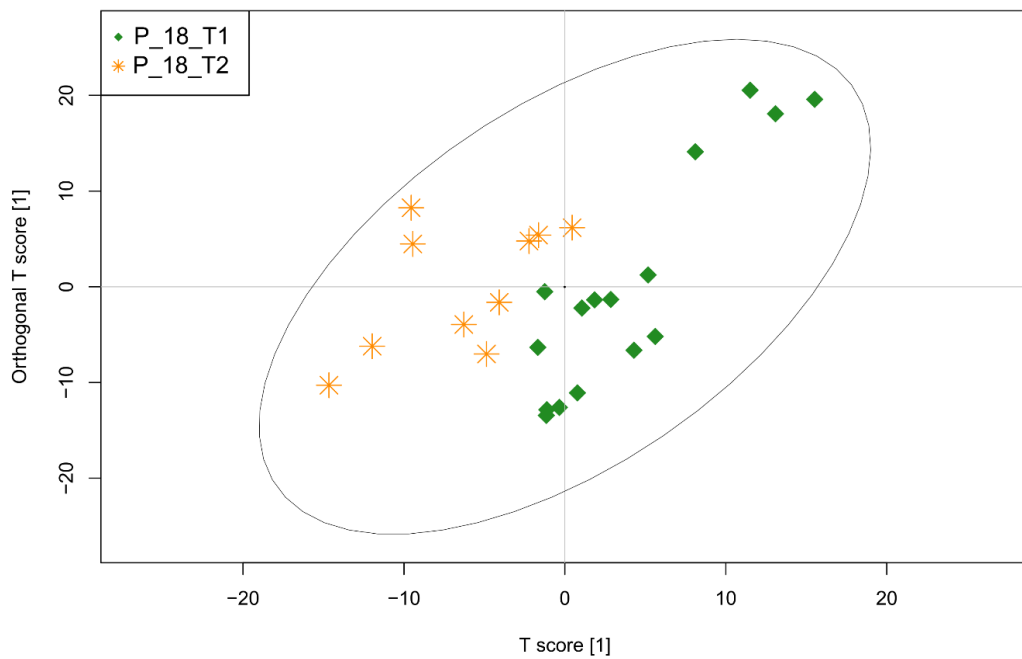
Ďalším vyhodnotením bola supervizovaná ortogonálna diskriminačná analýza najmenších štvorcov (OPLS-DA). Z tejto analýzy boli využité skórové grafy a VIP grafy (z angl. „Variable Importance in the Projection), ktoré zobrazujú VIP skóre jednotlivých lipidov. V rámci roku 2017 boli k vytvoreniu týchto grafov porovnávané kontroly s pacientmi s karcinómom veľkosti T1. Vzhľadom k tomu, že sa v roku 2018 nenachádzali žiadne kontroly, bolo potrebné porovnávať vyššie štádiá choroby (T2, T3, T4) s prvotným štádiom, a to s pacientmi s karcinómom veľkosti T1.

U prvého skórového grafu (Obr. č. 10) dochádzalo len k jemnému prekryvaniu skupín kontrol s pacientmi T1. V nasledujúcich grafov (Obr. č. 11, 12, 13) dochádzalo pri jednotlivých skupinách k rozdeleniu vzoriek pacientov jednotlivých skupín. Najvýraznejšia zmena bola viditeľná v poslednom grafe (Obr. č. 13), kedy bolo medzi vzorkami pacientov T1 a T4 pozorované najzreteľnejšie oddelenie, a vďaka tomu aj najväčšie rozdiely v lipidovom profile.

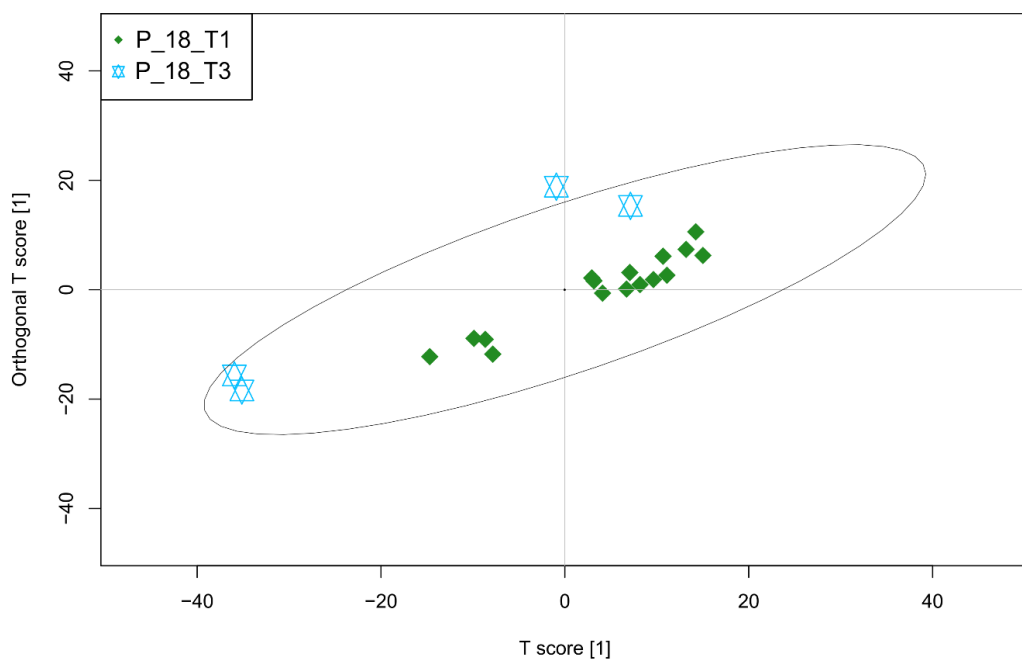


**Obr. č. 10:** Skórový graf analýzy OPLS-DA pre kontroly z roku 2017 a pacientov s T1 2017.

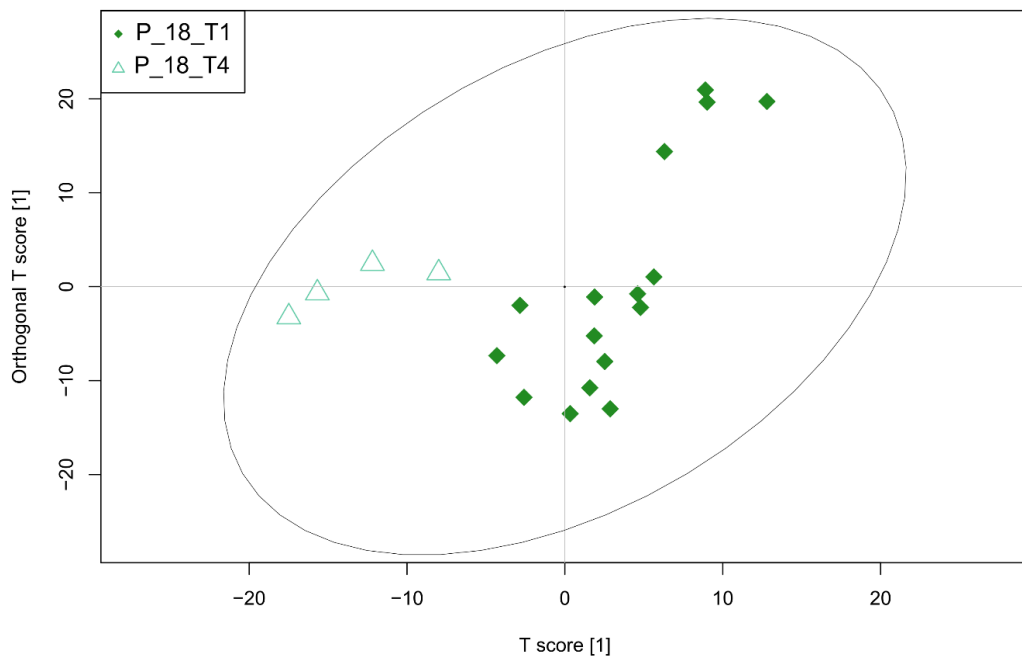




**Obr. č. 11:** Skórový graf analýzy OPLS-DA pre pacientov s T1 2018 a pacientov T2 2018.

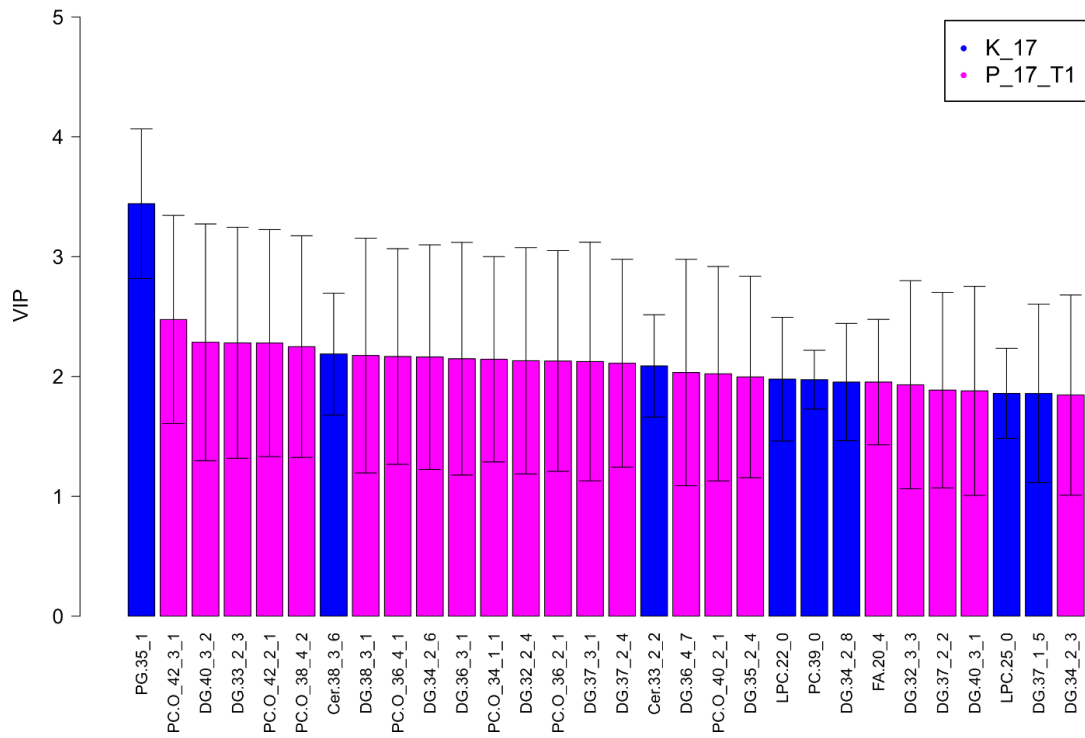


**Obr. č. 12:** Skórový graf analýzy OPLS-DA pre pacientov s T1 2018 a pacientov T3 2018.

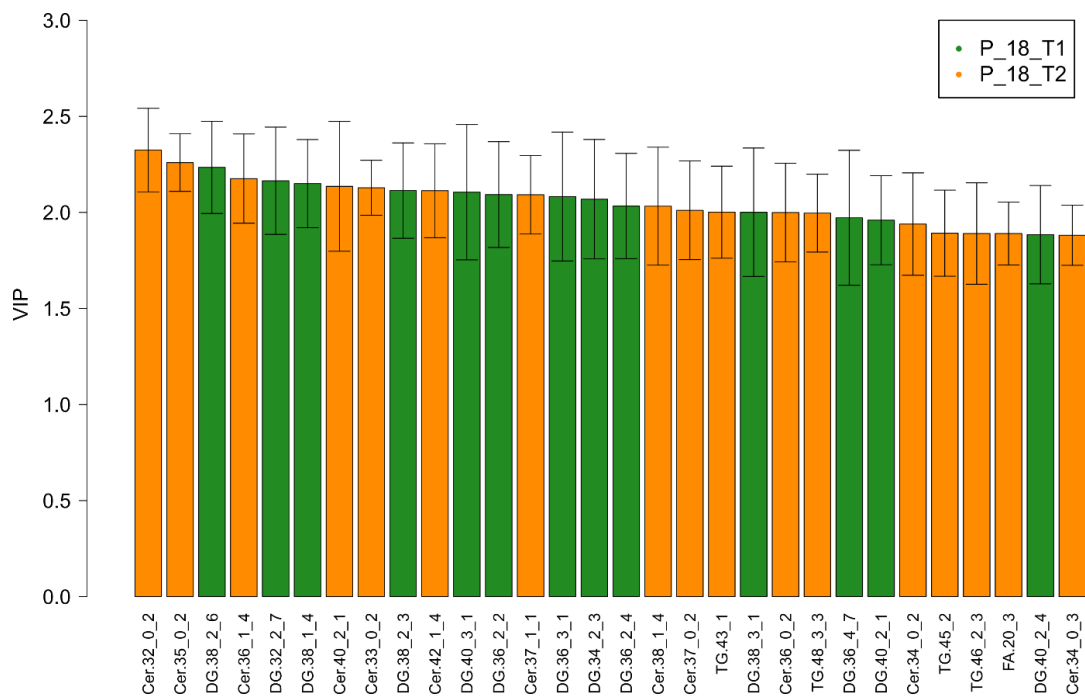


**Obr. č. 13:** Skórový graf analýzy OPLS-DA pre pacientov s T1 2018 a pacientov T4 2018.

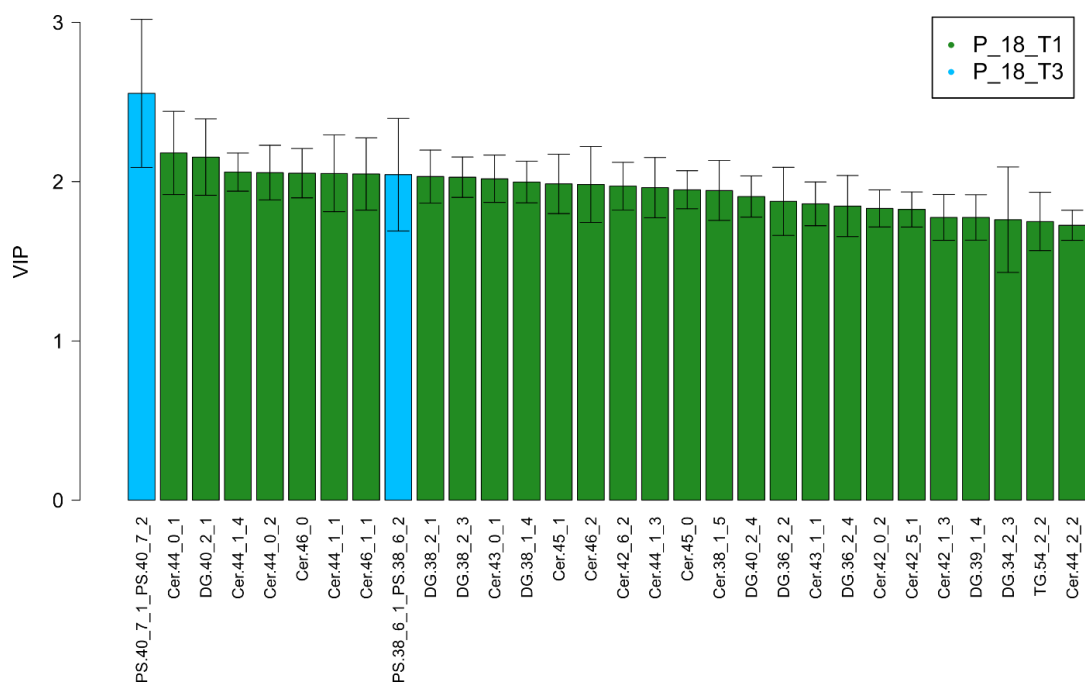
Ďalším výstupom OPLS-DA analýzy boli VIP grafy so znázornením 30-tich najvýznamnejších lipidov pri vzájomnom porovnávaní jednotlivých skupín. Na prvom grafe (Obr. č. 14) môžeme vidieť najvýznamnejšie lipidy pri porovnávaní kontrol z roku 2017 a pacientov s nádorom veľkosti T1 z roku 2017. Najčastejšie sa tu nachádzali skupiny diacylglycerolov a fosfatidylcholínov. V ďalších dvoch grafoch (Obr. č. 15, 16), pri porovnaní pacientov z roku 2018 s nádormi T1 a T2, a pacientov z roku 2018 s nádorom T1 a T3, boli v oboch prípadoch rozhodujúcimi lipidmi prevažne látky zo skupín ceramidov a diacylglycerolov. Na poslednom grafe (Obr. č. 17) môžeme pri porovnávaní pacientov z roku 2018 s nádormi T1 a T3 vidieť rozhodujúce lipidy hlavne zo skupín ceramidov a hexaglykozylceramidov.



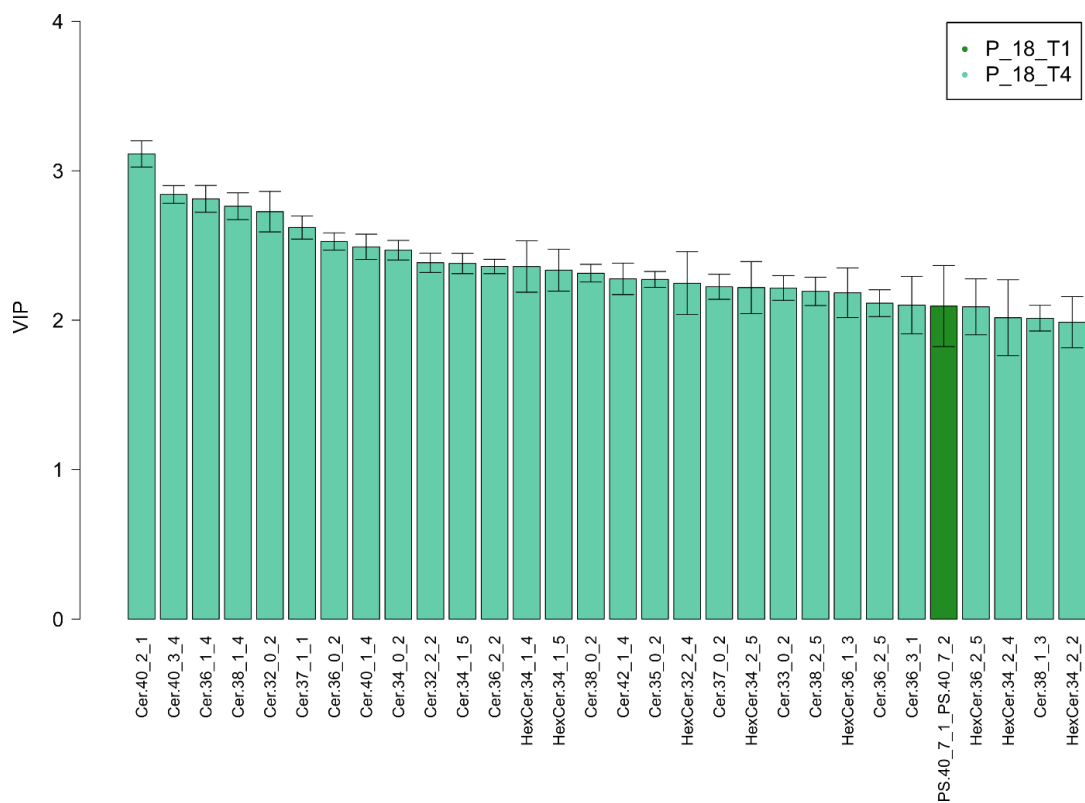
**Obr. č. 14:** VIP graf zobrazujúci VIP skóre OPLS-DA analýzy pre kontroly z roku 2017 a pacientov s T1 2017. Modrou sú označené zvýšené lipidy u kontrol z roku 2017, ružovou sú označené zvýšené lipidy u pacientov s T1 z roku 2017.



**Obr. č. 15:** VIP graf zobrazujúci VIP skóre OPLS-DA analýzy pre pacientov s T1 2018 a pacientov s T2 2018. Zelenou sú označené zvýšené lipidy u pacientov s T1 z roku 2018, oranžovou sú označené zvýšené lipidy u pacientov s T2 z roku 2018.



**Obr. č. 16:** VIP graf zobrazujúci VIP skóre OPLS-DA analýzy pre pacientov s T1 2018 a pacientov s T3 2018. Zelenou sú označené zvýšené lipidy u pacientov s T1 z roku 2018, modrou sú označené zvýšené lipidy u pacientov s T3 z roku 2018.

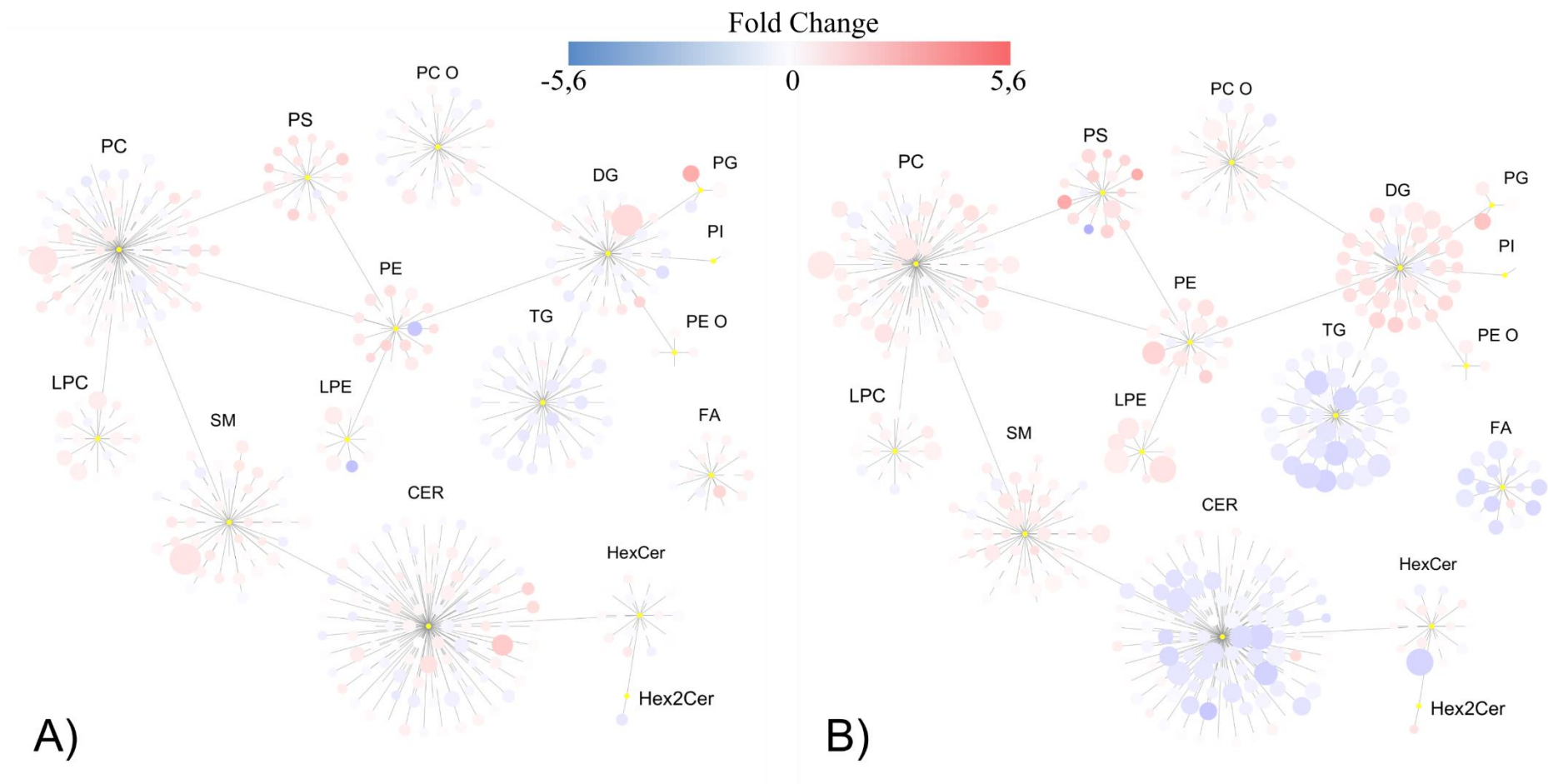


**Obr. č. 17:** VIP graf zobrazujúci VIP skóre OPLS-DA analýzy pre pacientov s T1 2018 a pacientov s T4 2018. Tmavo zelenou sú označené zvýšené lipidy u pacientov s T1 z roku 2018, svetlo zelenou sú označené zvýšené lipidy u pacientov s T4 z roku 2018.

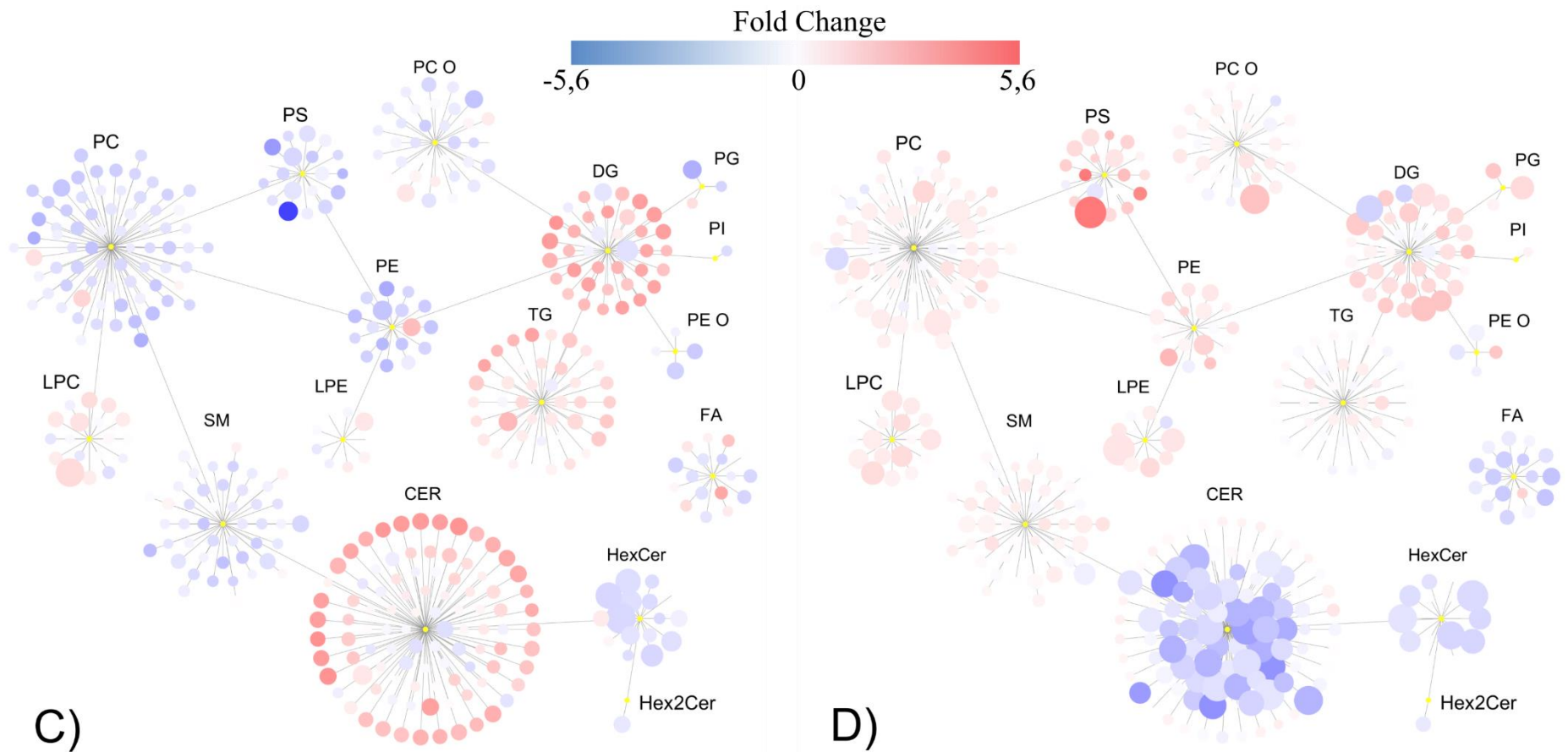
Pomocou programu Cytoscape (<https://cytoscape.org/>) bola vygenerovaná mapa jednotlivých lipidov a ich lipidových tried (Obr. č. 18, 19). Dáta v tejto sieti boli vizualizované na základe hodnoty fold change a p-value lipidov vypočítaných pre skupiny pacientov a kontrol. Veľkosť jednotlivých bodov bola určená hodnotou p-value. Čím je daný bod v mape väčší, tým je pozorovaná zmena významnejšia. Sfarbenie bodov znázorňuje zmeny fold change lipidu pre dané skupiny. Modré sfarbenie naznačuje rast hodnoty lipidu do záporných hodnôt, zatiaľ čo červená farba znázorňuje rast do kladných hodnôt. Prepojenia v tejto sieti medzi skupinami lipidov sú založené na možnej biochemickej premene. Pri samotných grafoch môžeme vidieť zmeny medzi rokmi 2017 a 2018, rovnako ako v roku 2018 môžeme pozorovať zmeny v prítomnosti lipidov v rôznych štádiách choroby.

Cytoscape mapa bola vytvorená k celkovej vizualizácii správania lipidových tried, zatiaľ čo k znázorneniu zmeny u konkrétnych lipidov bola vytvorená heatmapa.

K tvorbe heatmapy (Tab. č. 9-13) boli opäť využité hodnoty fold change a p-value lipidov, pričom v jednotlivých skupinách bolo možné pozorovať určité klesajúce (modrá farba), či stúpajúce tendencie (červená farba). V mnohých prípadoch, napr. u skupín PS, PC, PC O, PE alebo PE O nedochádzalo k výrazným zmenám.



**Obr. č. 18:** Mapa lipidov vygenerovaná pomocou programu Cytoscape. A – porovnanie vzoriek potu kontrol z roku 2017 a pacientov z roku 2017 s karcinómom veľkosti T1; B – porovnanie vzoriek potu pacientov z roku 2018 s karcinómom veľkosti T1 a pacientov z roku 2018 s karcinómom veľkosti T2. Veľkosť bodov je priamo úmerná významnosti jednotlivých lipidov. Modré sfarbenie označuje zníženie, červená farby znázorňuje zvýšenie.



**Obr. č. 19:** Mapa lipidov vygenerovaná pomocou programu Cytoscape. C – porovnanie vzoriek potu pacientov z roku 2018 s karcinómom veľkosti T1 a vzoriek potu pacientov z roku 2018 s karcinómom veľkosti T3; D – porovnanie vzoriek potu pacientov z roku 2018 s karcinómom veľkosti T1 a vzoriek potu pacientov z roku 2018 s karcinómom veľkosti T4. Veľkosť bodov je priamo úmerná významnosti jednotlivých lipidov. Modré sfarbenie označuje zníženie, červená farby znázorňuje zvýšenie.

**Tab. č. 9:** Heatmapa jednotlivých lipidov. K – kontrola; P – pacient; 17, 18 – rok odberu potu; T1, T2, T3, T4 – veľkosť nádoru.

	K_17/P_17_T1	P_18_T1/P_18_T2	P_18_T1/P_18_T2	P_18_T1/P_18_T4
Cer.32_0_2				
Cer.32_2_2				
Cer.32_2_3				
Cer.32_3_1				
Cer.33_0_2				
Cer.33_2_1				
Cer.33_2_2				
Cer.33_2_3				
Cer.34_0_2				
Cer.34_0_3				
Cer.34_1_5				
Cer.34_2_1				
Cer.34_2_5				
Cer.34_2_6				
Cer.34_3_3				
Cer.34_3_4				
Cer.34_4_3				
Cer.35_0_2				
Cer.35_2_1				
Cer.35_2_3				
Cer.36_0_2				
Cer.36_0_3				
Cer.36_1_4				
Cer.36_1_6				
Cer.36_2_2				
Cer.36_2_4				
Cer.36_2_5				
Cer.36_2_7				
Cer.36_3_1				
Cer.37_0_2				
Cer.37_0_3				
Cer.37_1_1				
Cer.37_1_2				
Cer.37_2_3				
Cer.38_0_2				
Cer.38_0_3				
Cer.38_1_1				
Cer.38_1_3				
Cer.38_1_4				
Cer.38_1_5				
Cer.38_1_6				
Cer.38_2_4				
Cer.38_2_5				
Cer.38_2_7				
Cer.38_3_6				
Cer.38_6_1				
Cer.39_0_3				
Cer.39_1_2				
Cer.39_1_3				
Cer.40_0_2				
Cer.40_1_1				
Cer.40_1_2				
Cer.40_1_3				
Cer.40_1_4				
Cer.40_1_5				
Cer.40_2_1				
Cer.40_2_3				
Cer.40_2_4				
Cer.40_2_5				
Cer.40_2_6				
Cer.40_3_1				
Cer.40_3_4				
Cer.40_4_3				
Cer.41_1_1				
Cer.41_1_2				
Cer.41_2				
Cer.42_0_2				
Cer.42_0_3				
Cer.42_1_1				
Cer.42_1_2				
Cer.42_1_3				
Cer.42_1_4				
Cer.42_1_5				
Cer.42_2_3				
Cer.42_2_4				
Cer.42_3_3				
Cer.42_5_1				
Cer.42_6_2				
Cer.43_0_1				
Cer.43_1_1				
Cer.43_1_2				
Cer.43_2				
Cer.44_0_1				
Cer.44_0_2				
Cer.44_1_1				
Cer.44_1_3				
Cer.44_1_4				
Cer.44_2_1				
Cer.44_2_2				
Cer.44_2_3				
Cer.44_3				
Cer.45_0				
Cer.45_1				
Cer.46_0				
Cer.46_1_1				
Cer.46_2				
DG.30_1_1				
DG.31_0_6				
DG.31_1_6				
DG.32_1_8				
DG.32_2_4				
DG.32_2_7				
DG.32_3_3				
DG.33_2_3				
DG.33_2_5				
DG.34_2_3				
DG.34_2_6				
DG.34_2_8				
DG.35_1_3				
DG.35_1_7				
DG.35_2_3				
DG.35_2_4				
DG.36_2_2				
DG.36_2_4				
DG.36_3_1				
DG.36_4_7				
DG.37_1_2				
DG.37_1_5				
DG.37_2_2				

	p-value
	-1,00E-05
	-1,00E-03
	0,00E+00
	1,00E-03
	1,00E-05



**Tab. č. 10:** Heatmapa jednotlivých lipidov (pokračovanie 2). K – kontrola; P – pacient; 17, 18 – rok odberu potu; T1, T2, T3, T4 – veľkosť nádoru.

	K_17/P_17_T1	P_18_T1/P_18_T2	P_18_T1/P_18_T2	P_18_T1/P_18_T4
DG.37_2_4				
DG.37_3_1				
DG.38_1_4				
DG.38_2_1				
DG.38_2_3				
DG.38_2_6				
DG.38_2_7				
DG.38_3_1				
DG.38_3_4				
DG.39_1_4				
DG.40_2_1				
DG.40_2_4				
DG.40_3_1				
DG.40_3_2				
FA.18_1				
FA.18_2				
FA.20_1				
FA.20_2				
FA.20_3				
FA.20_4				
FA.22_0				
FA.22_2				
FA.22_3				
FA.22_4				
FA.22_5				
FA.23_0				
FA.24_0				
FA.24_1				
FA.25_0				
FA.26_0				
FA.26_1				
Hex2Cer.34_2_5				
HexCer.32_2_2				
HexCer.32_2_4				
HexCer.34_1_4				
HexCer.34_1_5				
HexCer.34_2_2				
HexCer.34_2_4				
HexCer.34_2_5				
HexCer.36_1_3				
HexCer.36_2_2				
HexCer.36_2_4				
HexCer.36_2_5				
HexCer.38_1_3				
HexCer.38_2_5				
HexCer.40_1_3				
HexCer.40_2_4				
HexCer.42_4_2				
LPC.15_0_1_LPC.15_0_2_LPC.O_16_0				
LPC.16_0				
LPC.16_1				
LPC.17_0_LPC.O_18_0				
LPC.18_0				
LPC.18_1				
LPC.18_2				
LPC.19_0				
LPC.20_0				
LPC.20_1				
LPC.20_3				
LPC.20_4				
LPC.22_0				
LPC.22_1				
LPC.24_0				
LPC.24_1				
LPC.25_0				
LPC.26_0_PC.C.O_26_0				
LPE.14_1				
LPE.16_0				
LPE.17_2				
LPE.18_0				
LPE.18_1				
LPE.18_2				
LPE.20_1				
LPE.20_3				
LPE.22_1				
PC.24_0				
PC.26_0_PC.O_27_0				
PC.26_1				
PC.27_0				
PC.27_1				
PC.28_0				
PC.28_1				
PC.28_2				
PC.29_0				
PC.29_1				
PC.29_2				
PC.30_0				
PC.30_1				
PC.30_2				
PC.31_0				
PC.32_0_PC.O_33_0				
PC.32_1				
PC.32_2				
PC.32_3				
PC.32_6				
PC.33_0_1				
PC.33_0_2				
PC.33_1				
PC.33_2				
PC.34_0				
PC.34_1				
PC.34_2				

	p-value
	-1,00E-05
	-1,00E-03
	0,00E+00
	1,00E-03
	1,00E-05

**Tab. č. 11:** Heatmapa jednotlivých lipidov (pokračovanie 3). K – kontrola; P – pacient; 17, 18 – rok odberu potu; T1, T2, T3, T4 – veľkosť nádoru.

	K_17/P_17_T1	P_18_T1/P_18_T2	P_18_T1/P_18_T2	P_18_T1/P_18_T4
PC.34_3_1				
PC.34_3_2				
PC.34_5				
PC.35_0_1_P				
C.35_0_2				
PC.35_1				
PC.35_2				
PC.35_3				
PC.36_0				
PC.36_1_1_P				
C.36_1_2				
PC.36_2_1_P				
C.36_2_2				
PC.36_3_1_P				
C.36_3_2_P				
C.36_3_3				
PC.36_4_1				
PC.36_4_2				
PC.36_5				
PC.36_8				
PC.37_1_1				
PC.37_1_2				
PC.37_2_1_P				
C.37_2_2				
PC.37_3_1_P				
C.37_3_2				
PC.37_7				
PC.38_1_1_P				
C.38_1_2_P				
C.O_39_3				
PC.38_2_1_P				
C.38_2_2				
PC.38_3				
PC.38_4_1				
PC.38_4_2				
PC.38_5_1_P				
C.38_5_2_P				
C.38_5_3				
PC.38_6_1				
PC.38_6_2				
PC.38_7_1_P				
C.38_7_2				
PC.38_8				
PC.38_9				
PC.39_0				
PC.39_2				
PC.40_1_2				
PC.40_10				
PC.40_2_1_P				
C.40_2_2				
PC.40_3				
PC.40_4_1_P				
C.40_4_2				
PC.40_5_1_P				
C.40_5_2_P				
C.40_5_3				
PC.40_7				
PC.40_9				
PC.42_2_1_P				
C.42_2_2				
PC.42_3				
PC.42_4				
PC.O_28_3				
PC.O_29_2				
PC.O_29_3				
PC.O_30_3				
PC.O_32_0				
PC.O_32_1_1				
PC.O_32_1_2				
PC.O_32_2				
PC.O_32_3				
PC.O_33_1_1				
PC.O_33_2_1				
PC.O_34_0				
PC.O_34_1_1				
PC.O_34_2_1				
PC.O_34_2_2				
PC.O_34_3_1				
PC.O_36_1_1				
PC.O_36_2_1				
PC.O_36_2_2				
PC.O_36_3_1				
PC.O_36_3_2				
PC.O_36_4_1				
PC.O_36_5_2				
PC.O_36_5_1				
PC.O_36_7				
PC.O_38_1_1				
PC.O_38_1_2				
PC.O_38_4_2				
PC.O_38_5_1				
PC.O_38_7				
PC.O_40_2_1				
PC.O_40_3_1				
PC.O_42_2_1				
PC.O_42_3_1				
PC.O_42_4_1				
PC.O_42_7_2				
PE.25_1				
PE.34_2				
PE.34_3_1_P				
E.34_3_2				
PE.36_1_1_P				
E.36_1_2				
PE.36_3_1_P				
E.36_3_2				

	p-value
	-1,00E-05
	-1,00E-03
	0,00E+00
	1,00E-03
	1,00E-05

**Tab. č. 12:** Heatmapa jednotlivých lipidov (pokračovanie 4). K – kontrola; P – pacient; 17, 18 – rok odberu potu; T1, T2, T3, T4 – veľkosť nádoru.

	K_17/P_17_T1	P_18_T1/P_18_T2	P_18_T1/P_18_T2	P_18_T1/P_18_T4
PE.36_4				
PE.36_5_2_P E.36_5_1				
PE.38_2				
PE.38_3_2_P E.38_3_1_PE .38_3_3				
PE.38_4_2				
PE.38_4_3				
PE.38_5_1_P E.38_5_2				
PE.38_6				
PE.38_9				
PE.40_3				
PE.40_4_1_P E.40_4_2				
PE.40_5				
PE.O_34_2_1				
PE.O_36_2_2				
PE.O_36_5_1				
PE.O_38_7_1				
PG.35_1				
PG.37_1				
PG.37_2				
PI.36_1_1_PI .36_1_2				
PS.34_1_1_P S.34_1_2				
PS.34_2_2_P S.34_2_1				
PS.35_1_1_P S.35_1_2				
PS.35_2				
PS.36_0_2_P S.36_0_1				
PS.36_1_2_P S.36_1_1				
PS.36_2_2_P S.36_2_1				
PS.36_3_2_P S.36_3_1				
PS.36_4_3_P S.36_4_2_PS .36_4_1				
PS.37_1				
PS.37_2_1_P S.37_2_2				
PS.38_2_2_P S.38_2_1				
PS.38_3				
PS.38_4_1_P S.38_4_2				
PS.38_6_1_P S.38_6_2				
PS.40_3_2_P S.40_3_1				
PS.40_4				
PS.40_6_2_P S.40_6_1				
PS.40_7_1_P S.40_7_2				
SM.28_0				
SM.30_0				
SM.30_1				
SM.31_0				
SM.31_1				
SM.32_0				
SM.32_1				
SM.32_2				
SM.33_0				
SM.33_1				
SM.34_0				
SM.34_1_1_1 SM.34_1_2				
SM.34_2				
SM.34_3				
SM.35_0				
SM.35_1				
SM.35_2				
SM.36_0				
SM.36_1_1				
SM.36_1_2				
SM.36_2				
SM.36_3				
SM.36_6				
SM.37_0				
SM.37_1				
SM.37_2				
SM.38_0				
SM.38_1				
SM.38_2				
SM.38_3				
SM.39_0				
SM.39_1				
SM.40_0				
SM.40_1				
SM.40_2_1_1 SM.40_2_2				
SM.40_6				
SM.40_7				
SM.40_8				
SM.41_0				
SM.41_2				
SM.42_1				
SM.42_2				
SM.42_7				
SM.43_1				
SM.43_2				
TG.42_0_3				
TG.43_1				
TG.44_0_1				
TG.44_0_2				
TG.44_1_1				
TG.44_1_3				
TG.45_1_1				
TG.45_2				
TG.46_0				
TG.46_1				
TG.46_2_3				
TG.47_0				
TG.47_1_1				

	p-value
	-1,00E-05
	-1,00E-03
	0,00E+00
	1,00E-03
	1,00E-05

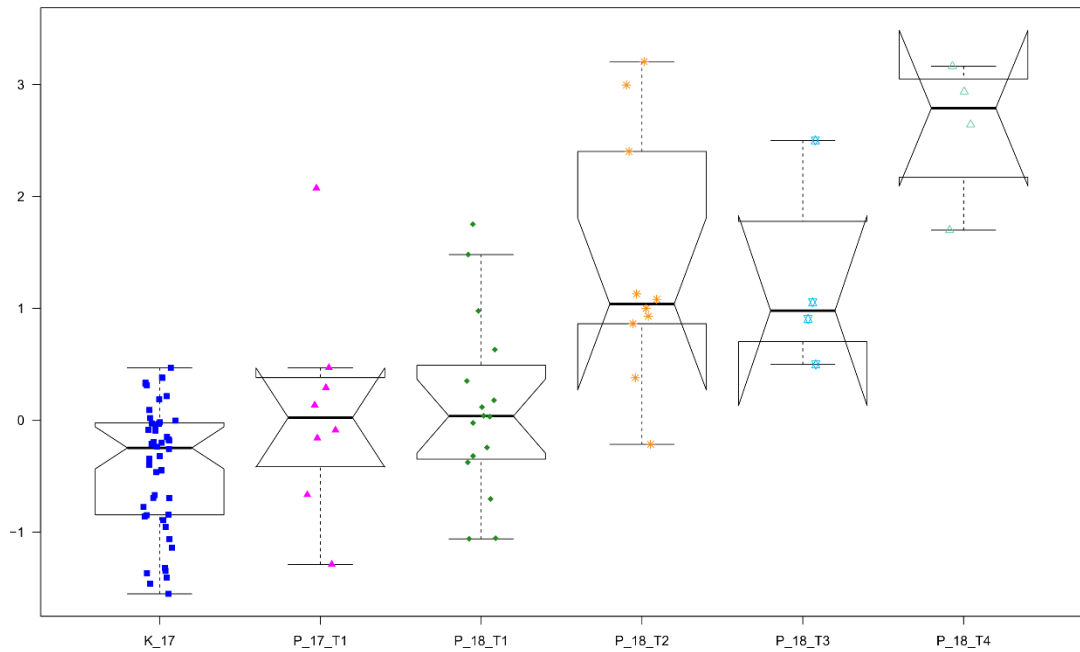
**Tab. č. 13:** Heatmapa jednotlivých lipidov (*pokračovanie 5*). K – kontrola; P – pacient; 17, 18 – rok odberu potu; T1, T2, T3, T4 – veľkosť nádoru.

TG.47_1_2					TG.50_1					TGe50_1				
TG.47_2_4					TG.50_2_1					TGe52_3				
TG.47_3_1					TG.50_2_2					TGP52_2				
TG.48_0_2					TG.50_4_3									
TG.48_1_2					TG.51_2_1									
TG.48_2_2					TG.52_2_1									
TG.48_3_3					TG.52_3_2									
TG.49_2_2					TG.54_2_2									
TG.49_2_3					TG.54_3_1									
TG.49_2_4					TG.54_4_2									
TG.49_3_3					TG.54_5_2									
TG.50_0_1					TGe50_0									

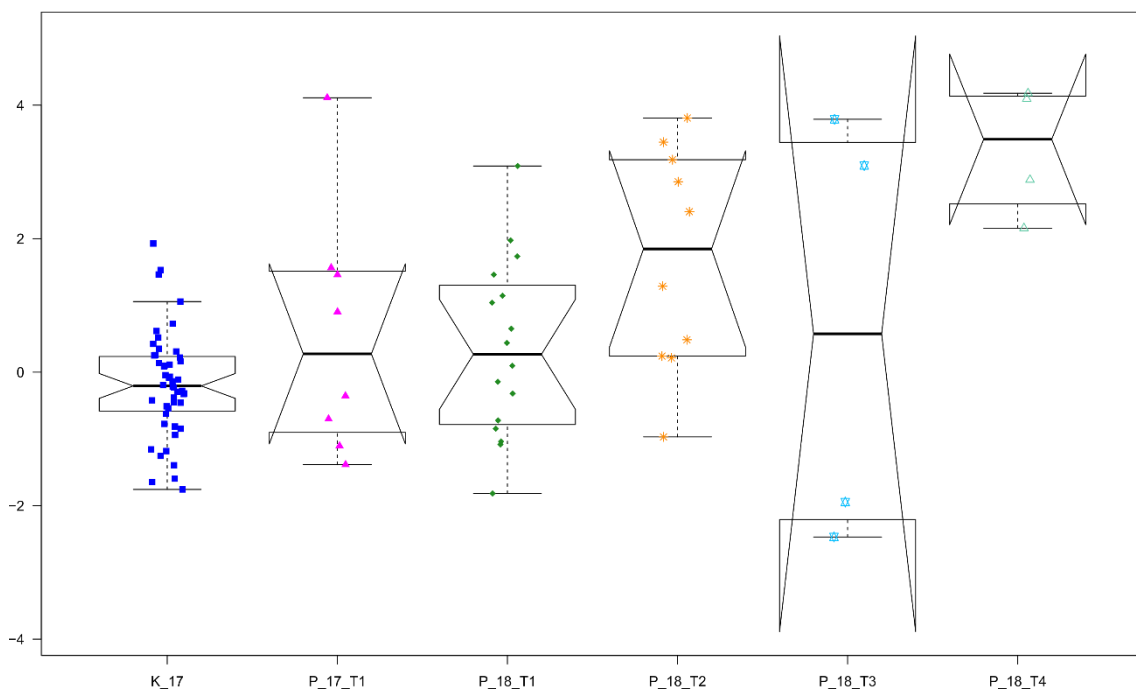
  

	p-value
	-1,00E-05
	-1,00E-03
	0,00E+00
	1,00E-03
	1,00E-05

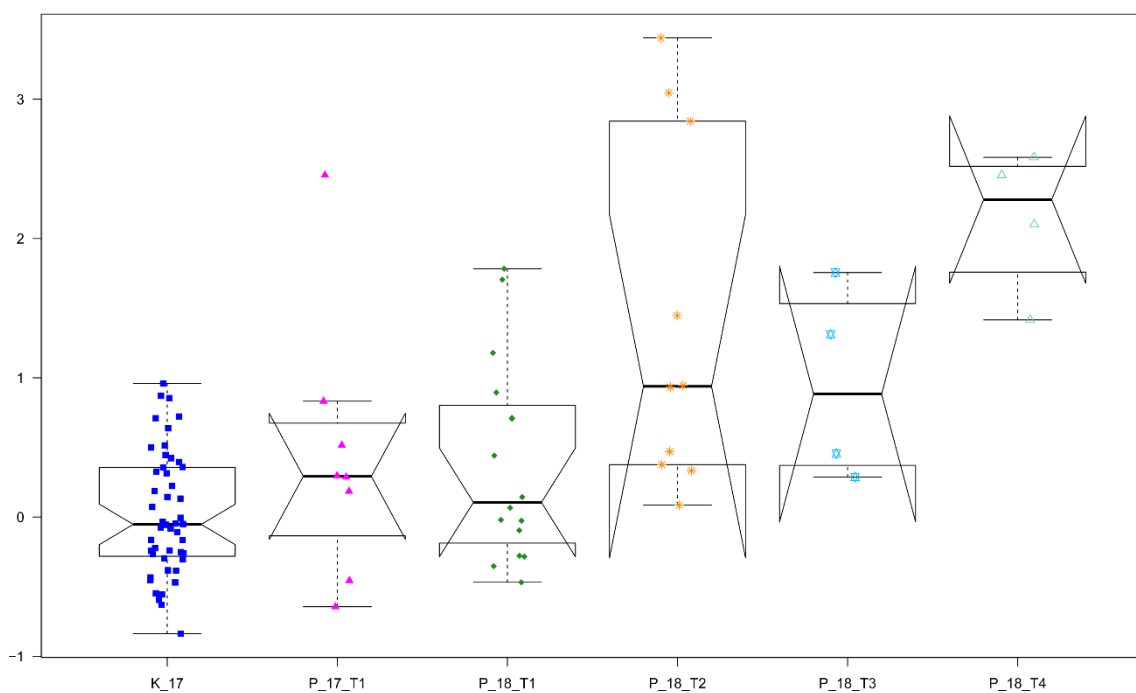
Ďalším výstupom boli krabicové grafy, zobrazené na obrázkoch číslo 18-29. Na týchto grafoch sú zobrazené príklady lipidov, u ktorých boli pozorované trendy naprieč jednotlivými štádiami rakoviny. Stúpajúcu tendenciu mali niektoré ceramidy (Obr. č. 20-22), hexaglykozylceramidy (Obr. č. 23-25) a mastné kyseliny (Obr. č. 26-28), zatiaľ čo klesajúcu tendenciu prejavili lyzofosfatidylcholíny (Obr. č. 29, 30) a lyzofosfatidyletanolamíny (Obr. č. 31).



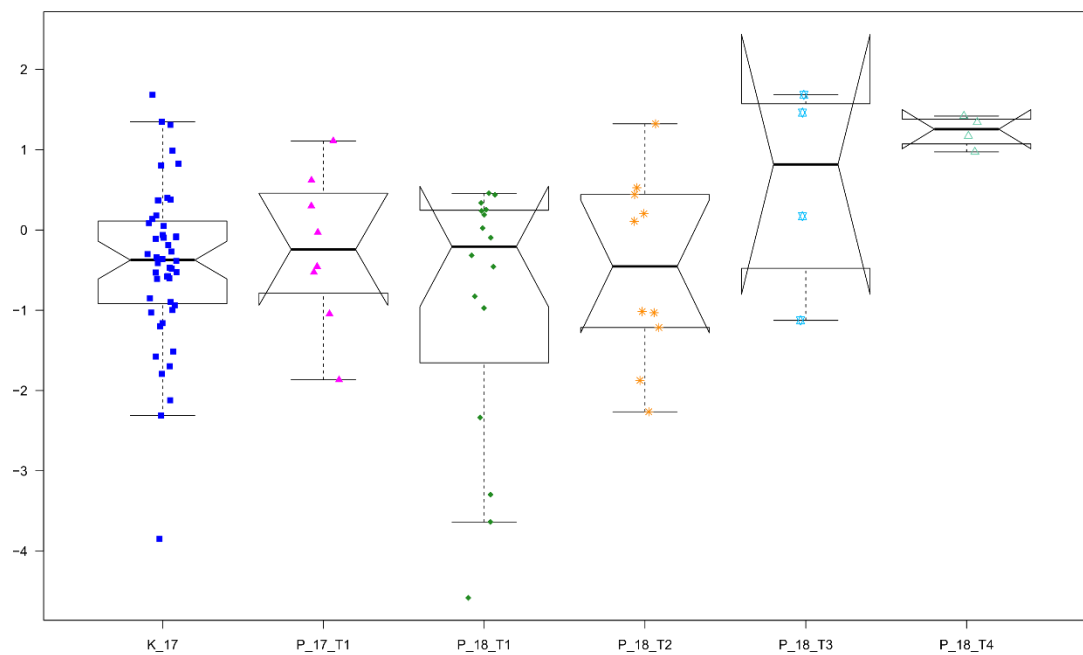
**Obr. č. 20:** Krabicový graf zobrazujúci hodnoty Cer.32\_0\_2 pri jednotlivých štádiách rakoviny.



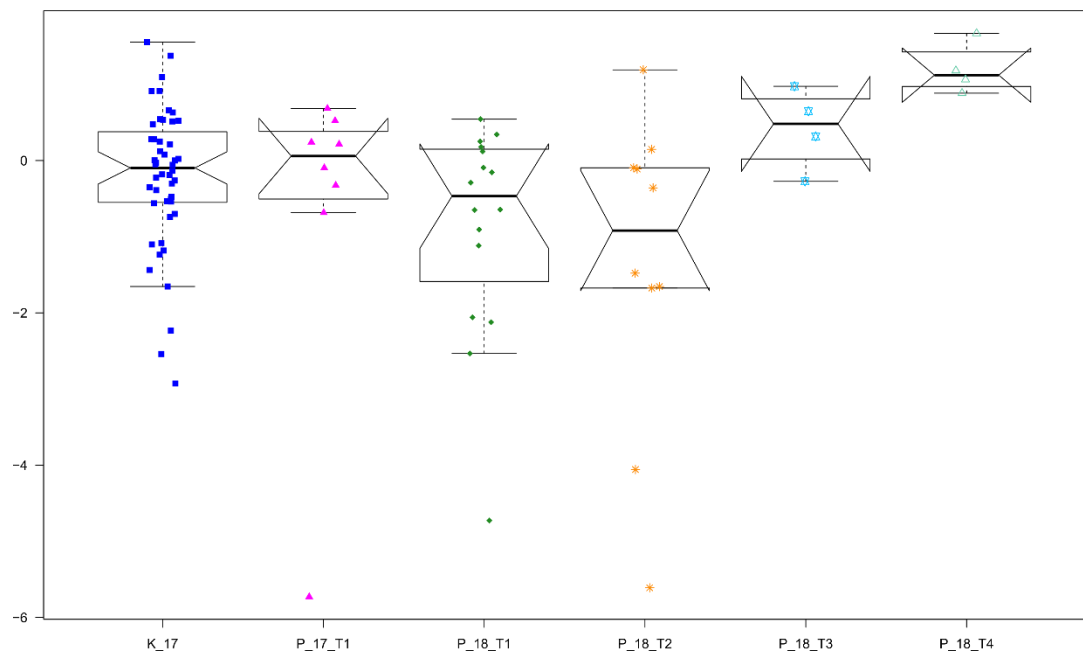
**Obr. č. 21:** Krabicový graf zobrazujúci hodnoty Cer.38\_1\_4 pri jednotlivých štádiách rakoviny.



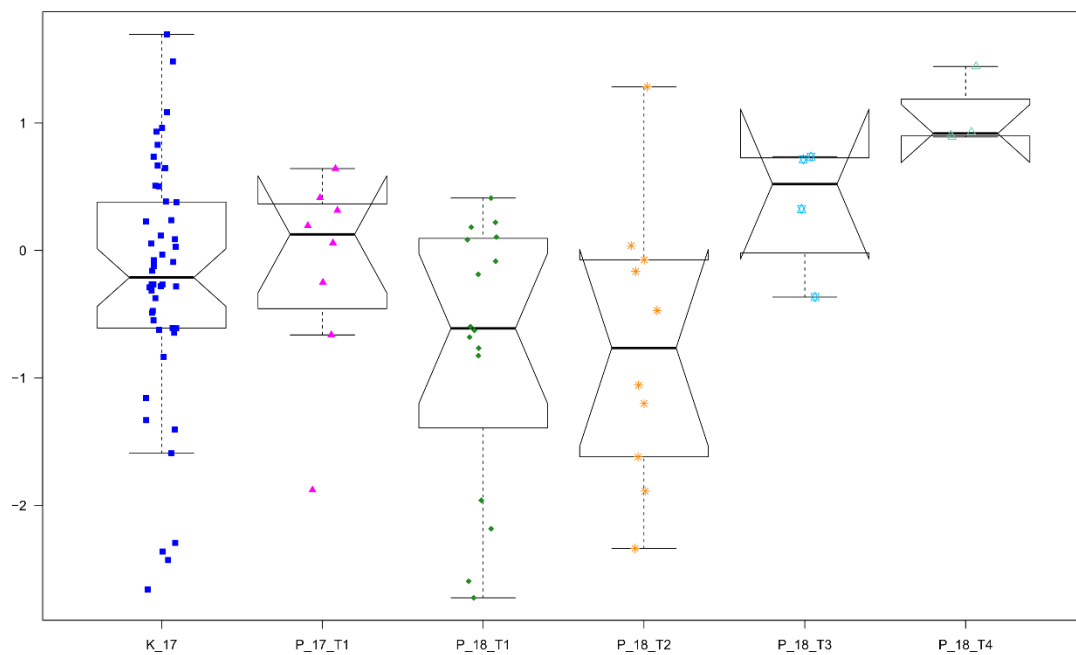
**Obr. č. 22:** Krabicový graf zobrazujúci hodnoty Cer.42\_1\_4 pri jednotlivých štádiách rakoviny.



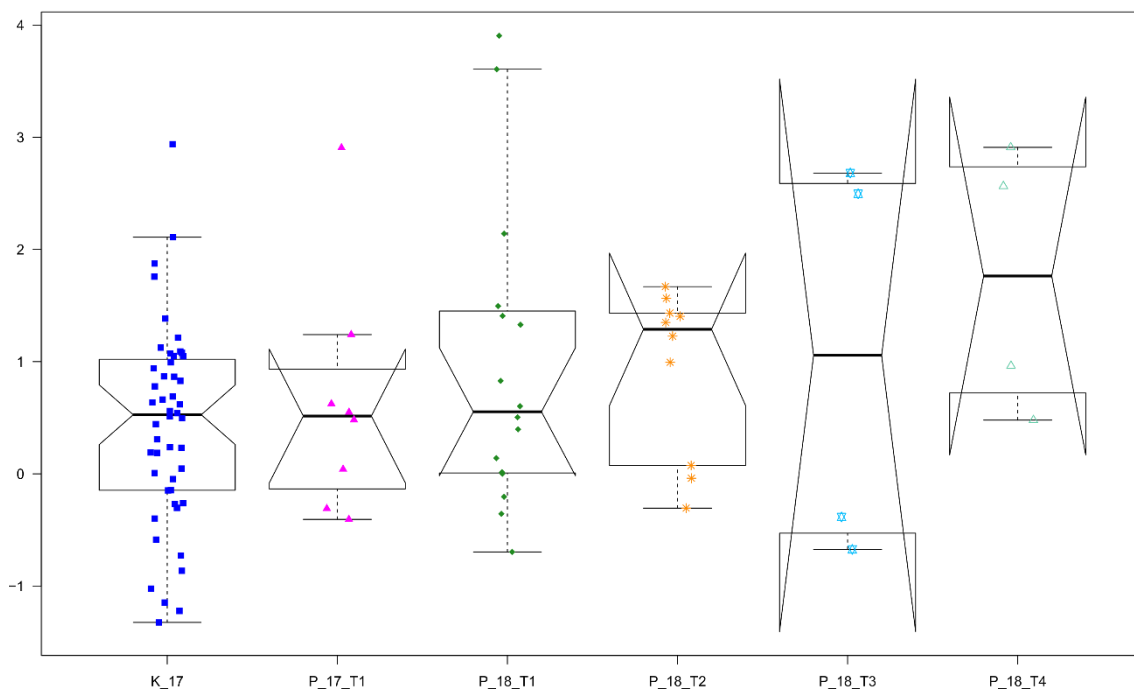
**Obr. č. 23:** Krabicový graf zobrazujúci hodnoty HexCer.32\_2\_4 pri jednotlivých štádiách rakoviny.



**Obr. č. 24:** Krabicový graf zobrazujúci hodnoty HexCer.34\_1\_4 pri jednotlivých štádiách rakoviny.

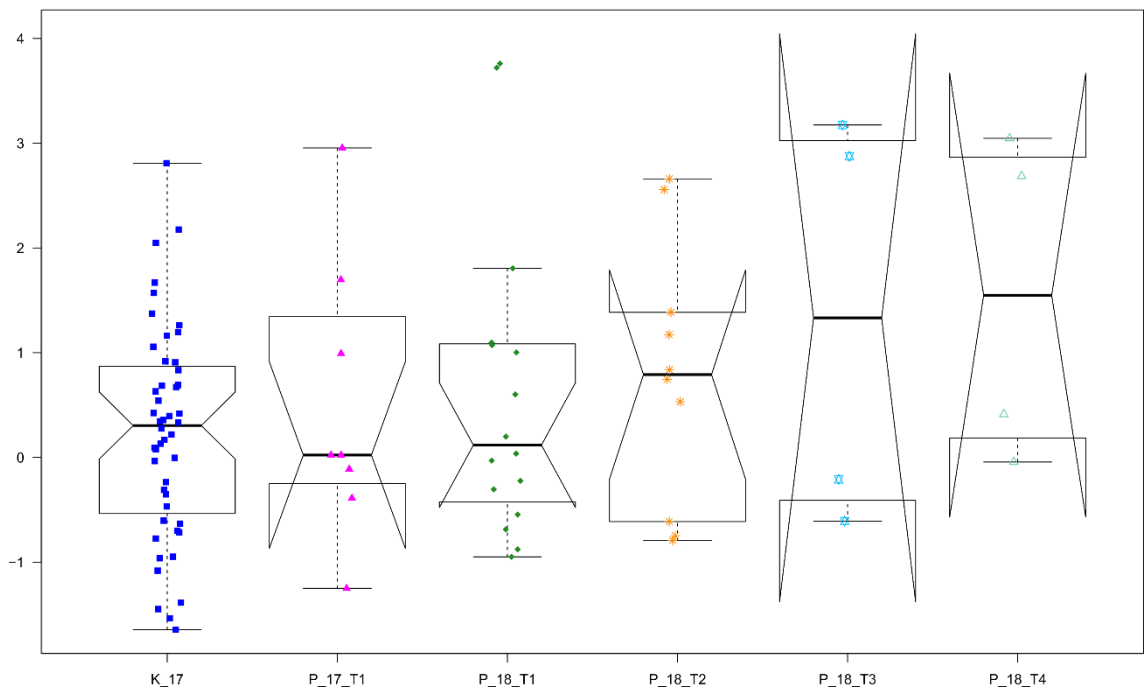


**Obr. č. 25:** Krabicový graf zobrazujúci hodnoty HexCer.34\_2\_5 pri jednotlivých štádiách rakoviny.

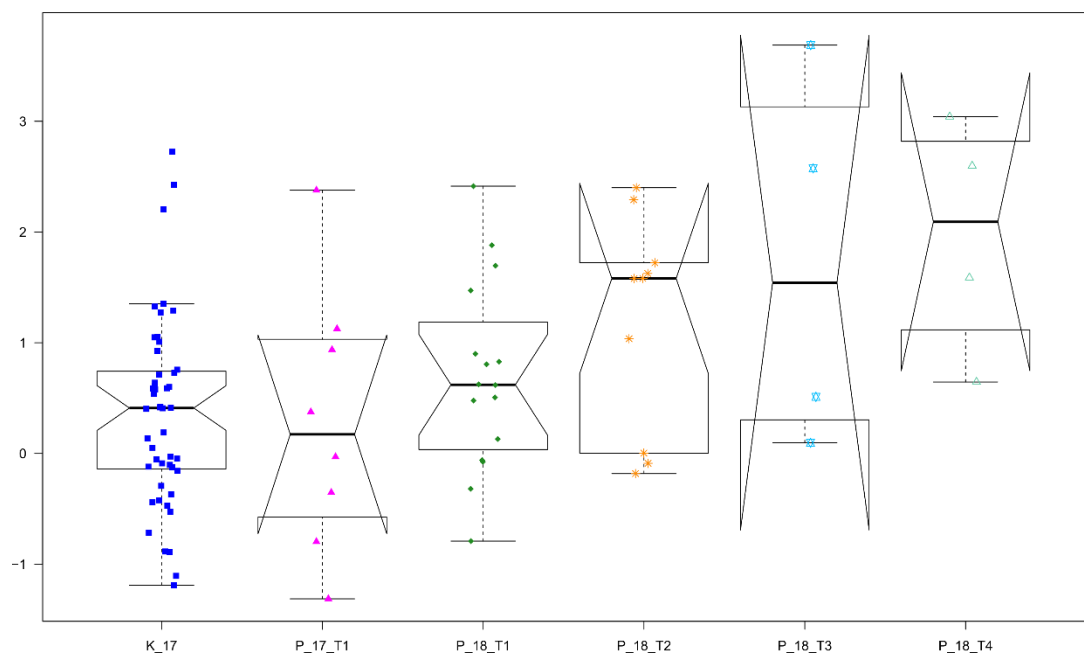


**Obr. č. 26:** Krabicový graf zobrazujúci hodnoty FA.18\_1 pri jednotlivých štádiách rakoviny.

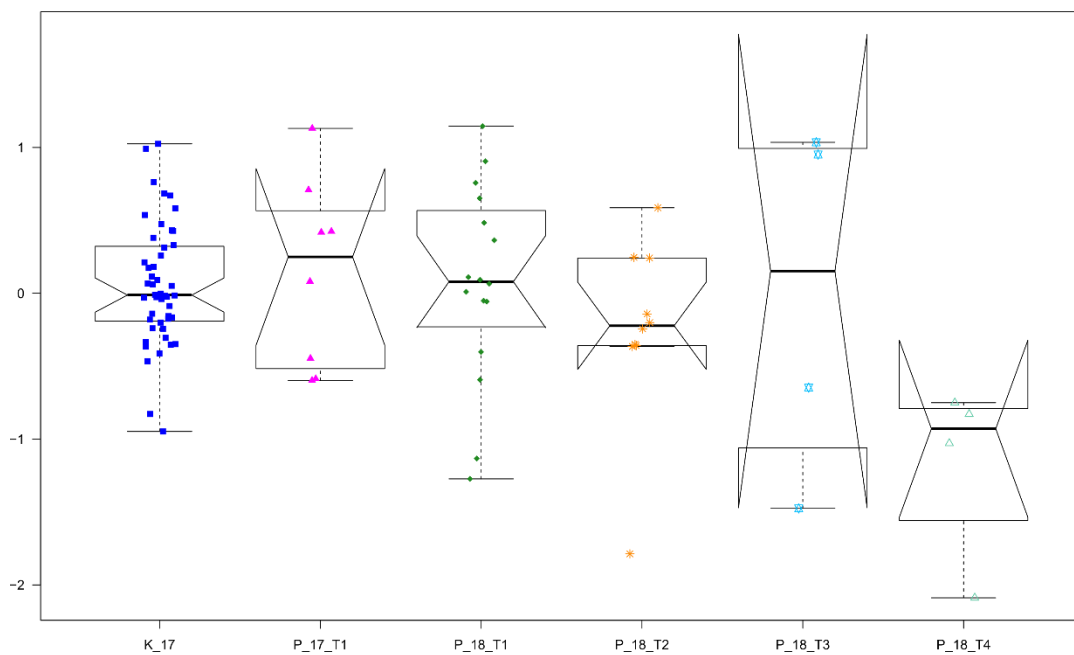




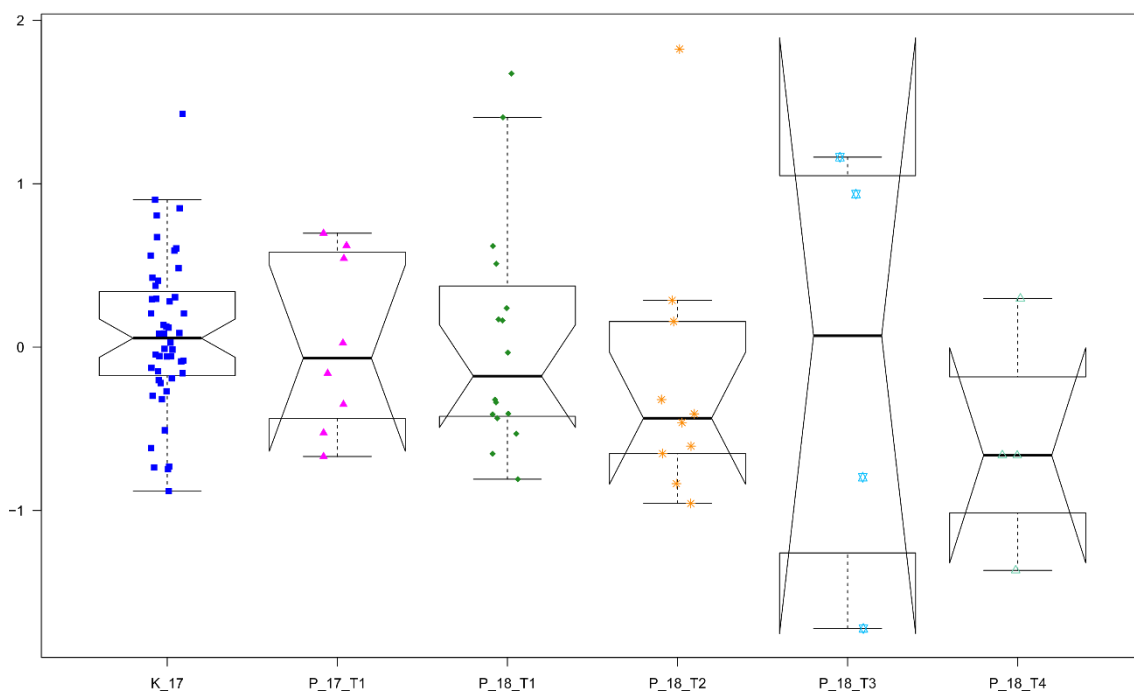
**Obr. č. 27:** Krabicový graf zobrazujúci hodnoty FA.18\_2 pri jednotlivých štádiách rakoviny.



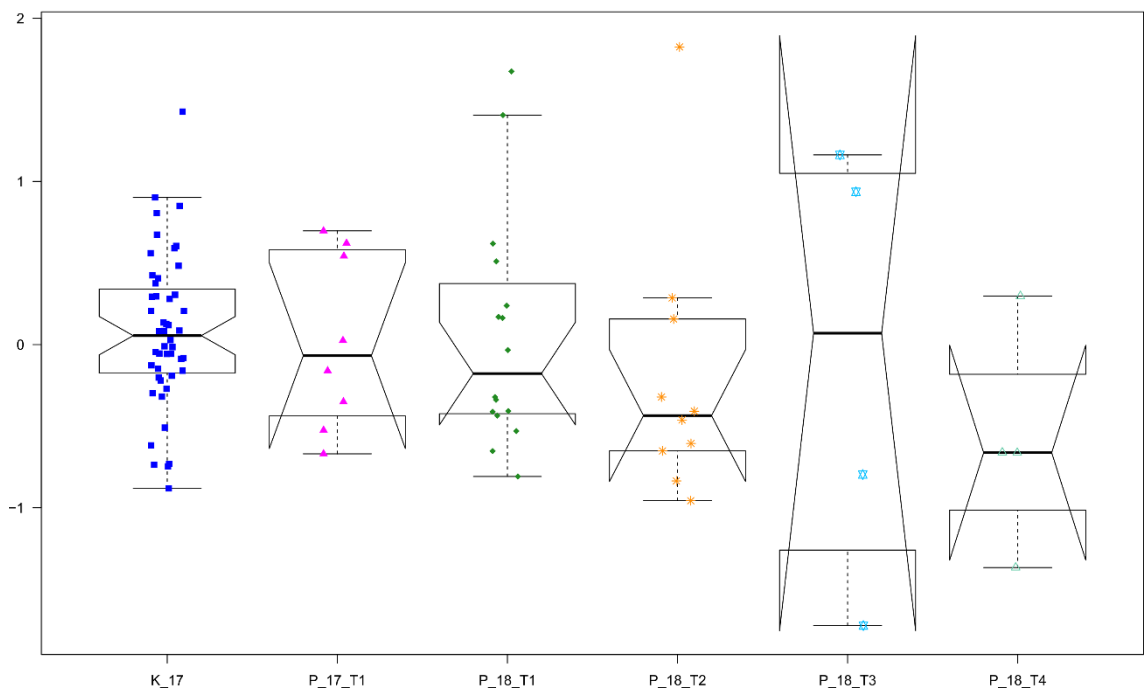
**Obr. č. 28:** Krabicový graf zobrazujúci hodnoty FA.20\_2 pri jednotlivých štádiách rakoviny.



**Obr. č. 29:** Krabicový graf zobrazujúci hodnoty LPC.18\_1 pri jednotlivých štádiách rakoviny.



**Obr. č. 30:** Krabicový graf zobrazujúci hodnoty LPC.20\_1 pri jednotlivých štádiách rakoviny.



**Obr. č. 31:** Krabicový graf zobrazujúci hodnoty LPE.18\_0 pri jednotlivých štádiách rakoviny.

## **4.4 Finálna optimalizácia metódy odberu potu**

Po optimalizovaní lipidomickej analýzy bola vytvorená finálna metóda odberu potu, ktorá bude využitá v nadväzujúcej štúdií.

### **4.4.1 Pomôcky**

Fritová doska, S1, 10 mm; plastová pinzeta; nadstavec z 3D tlačiarne; uzatvárateľné skúmavky s plochou základňou, 7 ml, 82x13 mm (Sarstedt).

### **4.4.2 Chemikálie**

Izopropylalkohol (IPA), voda. Oboje v LC-MS kvalite z Honeywell Research Chemicals.

### **4.4.3 Príprava frity pred odberom**

Bude pripravený 80 % roztok IPA; tzn. zmes IPA a vody v pomere 4:1 (v/v). Frity budú vopred sonifikované v ultrazvukovom kúpeli v 80% IPA približne 30 min. Následne budú vysušené. Frity budú uchovávané v skúmavkách, ktoré sa budú využívať aj pri samotnom odbere potu.

### **4.4.4 Odber potu**

Odber potu bude vykonávaný v rukaviciach pomocou špeciálne vyrobeného nadstavca. Frita bude nasadená na nadstavec a ponorí sa do 80 % IPA. Následne bude axilárny apokrinny pot odobraný prechádzaním fritou po povrchu kože odchlpenej axily, kde ústia apokrinne potné žľazy. Predpokladaná doba odberu bude 30 sek. Odber bude vykonaný iba z axily na strane postihnutia (nie z oboch strán). Po odbere bude frita s odobraným potom prenesená pomocou pinzety do označenej skúmavky. Táto skúmavka s fritou bude okamžite zmrazená na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Od tej istej pacientky bude do samostatnej skúmavky s protizrážanlivou úpravou ( $\text{K}_3\text{EDTA}$ ) odobraná aj krv, ktorá bude stočená a plazma bude zmrazená na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 5 DISKUSIA

Táto diplomová práca je zameraná na pilotný výskum v oblasti lipidomickej analýzy potu u žien s karcinómom prsníkov. Vzhľadom k malému využitiu potu ako vzorky, či už v medicíne alebo v samotnom výskume, bolo potrebné niekoľko krokov najskôr optimalizovať. Jednalo sa o odber potu a extrakciu lipidov z potu. Po kompletnej analýze bol vytvorený finálny postup odberu, ktorý bude využitý v nadväzujúcej štúdií a je bližšie popísaný v kapitole 4.4.

Prvou optimalizáciou bol odber potu od pacientok. Využívali sa pri tom tri rôzne prístupy, a to odber pomocou frity, kovovej špachtle a čistiacej tyčinky k MS. Počet zistených lipidov vo všetkých metódach tvoril maximálne jednu tretinu zo všetkých hľadaných lipidov, pričom najhoršie dopadla kovová špachtľa, kedy bol počet lipidov iba 561. Podobne to bolo aj pri zistenej ploche lipidov. U špachtle tvorili lipidy z blanku najvyšší podiel v porovnaní s ostatnými metódami. Najlepšie naopak dopadla čistiaca tyčinka k MS, kedy bol počet lipidov najvyšší, a to 774. Rovnako sa aj v blanku nachádzalo najmenej lipidov. Metóda odberu s fritou sa svojim výsledkom blížila čistiacej tyčinke, avšak hodnoty boli o čosi nižšie. Najlepším výberom by bola tyčinka, avšak pri extrakcii lipidov sa z nej drobil materiál, z ktorého bola vyrobená. Rovnako bol pozorovaný problém pri samotnom odobraní potu, keďže tyčinka bola kompletne nasiaknutá roztokom IPA, a tým sa jej schopnosť vpiť ďalšiu tekutinu znižovala. Na odber potu tak bola zvolená frita, ktorá dopadla po čistiacej tyčinke najlepšie a jej príprava na odber potu bola jednoduchá.

Jedným z bežne využívaných odberov potu je pilokarpínová elektroforéza u cystickej fibrózy. Na predlaktie sa v tomto prípade aplikuje stimulačný roztok pilokarpínu a oblasť je následne stimulovaná elektrickým prúdom. Po krátkej dobe sa oblasť od pilokarpínu očistí. Nasledujúcich 30 minút sa pot zbiera pomocou filtračného papiera prikrytého igelitom. V našom prípade však nebolo možné použiť danú metódu, keďže pomocou elektrického prúdu dochádza k vylučovaniu prevažne chloridových a sodíkových iónov z ekrinných žliaz a nie k vylučovaniu lipidového sekrétu z apokrinných žliaz.

Pri nasledujúcej optimalizácii sa využívala extrakcia lipidov z potu pomocou MTBE/MeOH/H<sub>2</sub>O a IPA. Dané dve metódy boli vybrané na základe predchádzajúcich

výskumov v lipidomickej analýze rôznych materiálov, ako napr. rozboru krvného séra či cerebrospinálnej tekutiny. Kombinácia MTBE a MeOH bola spracovaná podľa extrakcie kvapalina-kvapalina (Matyash *et al.*, 2008). IPA sa ukázala ako účinné extrakčné činidlo u Sarafian *et al.* (2014). V našom prípade bolo o niečo úspešnejšie spojenie MTBE, MeOH a vody, kedy došlo k vyššiemu zisku lipidov, a aj celková suma plochy lipidov bola väčšia ako u extrakcie s IPA, ktorá vykázala nižšiu extrakčnú schopnosť. Vďaka týmto výsledkom bola pri tejto štúdií využitá extrakcia pomocou MTBE.

Využitie metabolomiky, či lipidomiky, pri štúdovaní karcinómu prsníkov sa u predchádzajúcich výskumoch ukázal byť efektívny. Väčšina štúdií sa zaoberala zmenou lipidomického zloženia krvnej plazmy alebo nádorových buniek nachádzajúcich sa v prsníku. V štúdií z roku 2011 založenej na pozorovaní lipidov v plazme pacientov a kontrol bolo zistené, že v skupinách ceramidov (Cer), fosfatidylcholínov (PC) a fosfatidyletanolamínov (PE) dochádzalo k výraznému zvýšeniu hodnôt oproti kontrolám (Hilvo *et al.*, 2011).

Skupina ceramidov patrí medzi lipidy vyskytujúce sa v signalizačných kaskádach, či v množstve metabolických dráh. Vytvárané sú tromi rozdielnymi dráhami, a to pomocou *de novo* syntézy, záchranej a sfingomyelínovej dráhy (Kitatani *et al.*, 2008). Vďaka tomuto faktoru dochádza k priamemu metabolickému prepojeniu Cer s inými lipidmi, ako napríklad so sfingomyelínmi (SM) alebo hexaglykozylceramidmi (HexCer). Ceramidy boli preukázané ako jedny z hlavných lipidov, ktoré priamo indukujú bunkovú apoptózu v nádorových bunkách. Aj napriek tomuto faktoru je ich hodnota u väčšiny štúdií viditeľne zvýšená, čo bolo potvrdené vo viacerých výskumoch v oblasti rôznych druhov karcinómov. Jednalo sa o nárast hodnôt v krvnej plazme alebo priamo v nádorových bunkách (Schiffmann *et al.*, 2009; Moro *et al.*, 2018). Kanto *et al.* (2001) navrhol, že táto skutočnosť indikuje využitie vysokého množstva Cer rakovinovými bunkami. Tieto bunky využívajú ceramidy k apoptóze dendritických buniek v ich okolí, vďaka čomu nie sú nádorové bunky rozpoznávané imunitným systémom. Táto skupina lipidov tak vykazuje voči tumoru protektívne účinky. Pri porovnaní ceramidov v pote pacientok s karcinómom prsníkov dochádzalo k postupnému zvyšovaniu hodnôt v rôznych štádiách ochorenia (pozri tabuľka č. 9-13). Cer.38\_1 preukazuje postupný nárast u väčšiny svojich izomérov, čo korešponduje s výskumom Yang *et al.* (2015), kedy práve tento lipid v plazme vykazoval podstatné zmeny u vzoriek pacientov voči kontrolám. Iba jeden

z týchto izomérov (Cer.38\_1\_4) sa nachádzal v 30-tich najviac diskriminujúcich lipidoch VIP analýzy OPLS-DA, a to pri porovnávaní vzoriek pacientov z roku 2018 s nádormi T1 so vzorkami pacientov skupiny T2 a T4. Medzi ďalšie významné ceramidy patriace medzi najviac diskriminujúce lipidy z VIP OPLS-DA patrili Cer.32\_0\_2, Cer.34\_0\_2, Cer.36\_1\_4 a Cer.42\_1\_4, ktoré boli taktiež pozorované u vzoriek pacientov 2018 T1/T2 a T1/T4. Tieto lipidy boli rovnako detegované vo zvýšenej hladine aj v nádorových bunkách prsníka (Moro *et al.*, 2018). Všeobecné zvyšovanie ceramidov bolo sledované u Cer do C40, s jedinou výnimkou, a to už spomínaným Cer.42\_1\_4.

Skupinou, ktorá je priamo spojená s Cer pomocou rôznych metabolických dráh sú hexaglykozylceramidy. Premena ceramidu na HexCer je regulovaná vďaka enzýmu ceramidglukozyltransferázy (EC 2.4.1.80), zatiaľ čo opačná reakcia prebieha pomocou glukocerebrozidázy (EC 3.2.1.45). HexCer je základnou látkou využívanou k syntéze mnohých komplikovanejších glykozylsfolipidov. Pri skúmaníach rakovinových buniek prsníka (Moro *et al.*, 2018) bolo zistené všeobecné zvýšenie tejto skupiny voči kontrolám. Tento fakt koreluje aj s našou štúdiou, kedy u väčšiny z týchto lipidov dochádzalo aspoň k mierne stúpajúcej tendencii. Medzi najvýznamnejšie lipidy tu podľa VIP analýzy patrili HexCer.32\_2\_4, HexCer.34\_1\_4 a HexCer.34\_2\_5. Tieto lipidy boli významnými pri porovnávaní v roku 2018 u vzoriek pacientok T1 a T4. Avšak pri porovnávaní najviac diskriminujúcich HexCer nájdenými v pote s významnými hexaglykozylceramidmi v nádorových bunkách prsníka (Moro *et al.*, 2018), sa jednalo o iné HexCer ako v našej štúdií. Boli to napríklad HexCer.32\_0, HexCer.34\_0, či HexCer.42\_1.

Ceramidy môžu byť ďalej premenené na sfingomyelíny (SM) pomocou sfingomyelínovej dráhy. Enzýmom zabezpečujúcim premenu Cer na SM je fosfatidylcholín:ceramidcholínfosfotransferáza (EC 2.7.8.27), zatiaľ čo aj SM môže fungovať ako prekursor tvorby ceramidov, a to pomocou sfingomyelínfosfodiesterázy (EC 3.1.4.12). Podľa výskumov zaoberajúcimi sa lipidomickou analýzou plazmy a rakovinových buniek prsníka, by v tejto skupine malo dochádzať k rastu koncentrácií lipidov (Chen *et al.*, 2016; Moro *et al.*, 2018), avšak v našej štúdií sme pozorovali opačný trend. Zo všetkých detegovaných lipidov neboli medzi 30-timi najvýznamnejšími lipidmi podľa VIP analýzy detegované žiadne významné SM.

Ďalšou veľkou skupinou lipidov, ktoré sú ovplyvnené karcinómom prsníkov, sú fosfolipidy, kam sa zaraďujú fosfatidylcholíny (PC), lyzofosfatidylcholíny (LPC), fosfatidyletanolamíny (PE), lyzofosfatidyletanolamíny (LPE), fosfatidylinozitoly (PI), fosfatidylglyceroly (PG) a fosfatidylseríny (PS). Vo výskume zameranom na pozorovanie fosfolipidov v nádorových bunkách nedochádzalo v skupinách LPE, PS ani PG k významným zmenám (Dória *et al.*, 2012), zatiaľ čo u plazmy neboli rozhodujúcimi jedine PS (Yang *et al.*, 2015). V našej štúdií boli sledované všetky fosfolipidové skupiny, avšak v prípade PG a PI sa jednalo iba o veľmi malý počet lipidov. Významnosť týchto lipidov v našej štúdií nebola potvrdená.

Fosfatidylcholíny tvorili v ostatných telových tekutinách a tkanivách jednu z najvýznamnejších skupín, ktorej zvýšenie signalizovalo prítomnosť nádoru v organizme. Tieto lipidy sú v prítomnosti nádoru akumulované v bunkách, čo je spôsobené zvýšeným transportom lipidu do vnútra bunky pomocou jeho transferového proteínu (PCTP). Zároveň je pozorovaná zvýšená prítomnosť enzýmu cholínkinázy (EC 2.7.1.32), ktorá iniciuje prvý krok biosyntézy fosfatidylcholínov (Eliyahu *et al.*, 2007). V našom prípade dochádzalo k významnému rozdielu podľa VIP OPLS-DA iba u PC.39\_0 v roku 2017 pri porovnávaní kontrol a pacientov T1, avšak pri porovnaní tohto lipidu na heatmape či krabicovom grafe táto zmena nebola pozorovaná. Tento lipid nebol spomínaný v žiadnom výskume zameranom na iné tkanivá ani telové tekutiny. V týchto výskumoch bola PC ako skupina lipidov mimoriadne významnou v porovnaní medzi pacientami a kontrolami (Chen *et al.*, 2016; Cala *et al.*, 2018).

PC sa po hydrolýze pomocou enzýmu fosfolipázy 2 (PLA2, EC 3.1.1.4) mení na LPC. Jedná sa o lipid, ktorý je prevažne viazaný na albumín v krvi, vďaka čomu je u zdravých jedincov jeho hodnota v plazme konštantná (Taylor *et al.*, 2007). Na rozdiel od PC sú však hodnoty LPC v plazme aj nádorových bunkách prsníka výrazne znížené (Chen *et al.*, 2016; Cala *et al.*, 2018). Pravdepodobnou príčinou je masívna degradácia LPC nádorovými bunkami. Výsledkom sú LPC viazané na masťné kyseliny, ktoré sú následne pripojené k membránovým proteínom (Raynor *et al.*, 2015). Dva významné lipidy z tejto skupiny podľa VIP analýzy boli LPC.22\_0 a LPC.25\_0, avšak v heatmape a krabicových grafoch neboli tieto zmeny významné. V našej štúdií pri daných lipidoch nedochádzalo k prominentným zmenám. Možná významnosť týchto lipidov bola pravdepodobne spôsobená veľkým rozptylom medzi jednotlivými vzorkami. Aj napriek



tomu, že podľa VIP analýzy LPC nepatrili medzi 30. najvýznamnejších lipidov, klesavú tendenciu tu prejavovali dva LPC, ktoré už boli bližšie popísané v štúdiách zameraných na lipidomickú analýzu plazmy. Jedná sa o LPC.18\_1 (Cala *et al.*, 2018) a LPC.20\_1 (Chen *et al.*, 2016).

Fosfatidyletanolamíny sú kľúčovými lipidmi zabezpečujúcimi fluiditu membrán. Jedná o lipidy s množstvom funkcií. PE sú kľúčovými lipidmi pri autofágií, sú nevyhnutné pre činnosť dýchacích komplexov a taktiež napomáhajú skladaniu proteínov (Patel a Witt, 2017). V plazme dochádzalo k zníženiu hodnôt iba jedného PE, a to PE.34\_1 (Jiang *et al.*, 2017). U potu však nedochádzalo k významným zmenám a hodnoty všetkých PE zostávali na grafoch a analýzach konštantné v porovnaní pacientok s vyšším stupňom nádoru voči kontrolám a skupine T1. Rovnako na tom boli aj LPE, ktoré vznikajú obdobným spôsobom ako LPC, a to hydrolýzou PE pomocou PLA2. Ich úloha v nádorových bunkách je špecifická, pričom ich prítomnosť zvyšuje množstvo intracelulárneho vápnika (Park *et al.*, 2014). Aj napriek tomuto faktu nedochádzalo v pote ani nádorových bunkách prsníka k významným zmenám. V plazme boli popísané zmeny u LPE.24\_0 (Yang *et al.*, 2015), LPE.18\_0 a LPE.18\_1 (Cala *et al.*, 2018). Prvý lipid v našej štúdií nebol detegovaný a posledný nevykazoval žiadnu zmenu v priebehu rôznych štádií choroby. Lipid LPE.18\_0 vykazoval na heatmape a krabicové grafy mierny pokles.

Poslednou podskupinou fosfolipidov sú PG, PI a PS. Fosfatidylseríny nevykazovali v rakovinových bunkách prsníka žiadne stúpanie ani klesanie, a ich hladina zostávala celú dobu konštantná (Dória *et al.*, 2012). V našom prípade boli pozorované dva významné lipidy, a to PS.38\_6\_1\_PS.38\_6\_2 a PS.40\_7\_1\_PS.40\_7\_2, ale v oboch prípadoch to bolo spôsobené veľkým rozptylom hodnôt vzoriek v jednotlivých skupinách. Fosfatidylglyceroly v plazme vykazovali klesajúce tendencie u lipidov PG.32\_0, PG.36\_1 a PG.36\_3 (Yang *et al.*, 2015), ale ani jeden z týchto lipidov nebol detegovaný v našej štúdií. Všetky PG, ktoré bolo možné detegovať, boli pri všetkých štádiách choroby na podobnej úrovni. Fosfatidylinozitoly boli v nádorových bunkách prsníka zvýšené iba mierne (Dória *et al.*, 2012). V plazme však bolo v tejto skupine nájdených hneď viacero potencionálnych biomarkerov rakoviny prsníkov. Jednalo sa o PI.32\_1, PI.32\_1, PI.38\_4 a PI.38\_4 (Yang *et al.*, 2015), avšak ani jeden z týchto lipidov nebol v našom výskume detegovaný.

Mastné kyseliny (FA) patria medzi jedny z najvýznamnejších lipidov nachádzajúcich sa v organizme. Slúžia ako signálne molekuly, základná zložka zložitejších lipidov, či energetické zásoby. Ich zmnoženie tak môže mať za následok informácie o prítomnosti rakovinových buniek, ktoré môžu využívať energiu z týchto lipidov ako svoj zdroj energie pri proliferácii, či celkovom prežití buniek. V prípade výsledkov z nádorových buniek dochádzalo ku zvýšeniu hneď niekoľkých mastných kyselín, a to FA.16\_0, FA.18\_1, FA.18\_2 a FA.20\_2 (Cala *et al.*, 2018). U plazmy sa jednalo o zvýšenie u FA.16\_0, FA.18\_0 a FA.18\_2 (Lv a Yang, 2012). V našom výskume boli okrem lipidov FA.16\_0 a FA.18\_0 nájdené všetky ostatné mastné kyseliny, pričom žiadna z nich nebola významná podľa VIP analýzy OPLS-DA. Aj napriek tomu sme boli schopný pozorovať ich stúpajúce hodnoty naprieč jednotlivými štádiami choroby aj v heatmapa, aj v krabicových grafoch.

Poslednými detegovanými skupinami sú diacylglyceroly (DG) a triacylglyceroly (TG). DG sú dôležitými medziproduktami lipidového metabolizmu a bunkovej signalizácie. Predchádzajúce štúdie dokázali, že DG hrajú dôležitú úlohu pri aktivácii proteínkinázy C (EC 2.7.11.13), čo priamo ovplyvňuje zvýšenú proliferáciu rakovinových buniek (Nishizuka, 1995). V množstve štúdií boli pozorované zvýšené hodnoty DG v nádorových bunkách prsníka i v plazme (Yang *et al.*, 2015). V našej štúdií však žiadne detegované DG nevykazovali dostatočnú významnosť. Niekoľko z nich sa nachádzalo vo VIP analýze, avšak podľa heatmapy a krabicových grafov neboli zaznamenané väčšie zmeny. Väčšina lipidov, ktoré boli v iných štúdiách zameraných na sledovanie DG v plazme a rakovinových bunkách, označované ako významné (Jiang *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2015), boli diacylglyceroly bez prítomnosti dvojných väzieb. V našom výskume však boli detegované jedine diacylglyceroly s minimálne jednou dvojnou väzbou, čo mohlo viesť k tomuto negatívnemu výsledku.

Triacylglyceroly sú základným zdrojom energie v bunkách a zvýšené hodnoty týchto lipidov boli preukázané u rôznych typov nádorov, v našom prípade s rakovinou prsníkov. Zvýšená produkcia TG v plazme, či v karcinómnych bunkách prsníka, je asociovaná so znižovaním cytotoxicity založenej na vysokom obsahu voľných mastných kyselín v cytoplazme (Listenberger *et al.*, 2003). Žiadna z pozorovaných FA v pote nebola dostatočne významná pri porovnaní skupín naprieč boxplotmi, aj napriek tomu, že sa vo VIP analýze pri porovnaní vzoriek pacientov z roku 2018 s nádormi T1 so

vzorkami pacientov skupiny T2 nachádzalo hneď niekoľko týchto lipidov. Tieto výsledky môžu byť spôsobené veľkým rozptylom získaných hodnôt v jednotlivých skupinách.

Pri tejto štúdií sa naskytli aj určité limitácie. Prvou z nich je malý počet pacientok v skupinách s veľkosťou nádoru T3 a T4. Údaje tak nemusia byť dostatočne relevantné a je potreba získať viacero dát na upresnenie získaných výsledkov. Ďalším obmedzením je absencia kontrol v roku 2018, vďaka čomu nebolo možné porovnávať zdravé ženy s pacientkami v rôznych štádiách. V tomto prípade bolo potrebné porovnávať vyššie štádia choroby s tým najnižším. Poslednou limitáciou bol rozdielny rok odberu, kedy bolo možné pri vzorkách toho istého štádia rakoviny (T1) z roku 2017 a 2018 pozorovať rozdiely. Mohlo to byť spôsobené rozkladom určitých lipidov, poprípade ich zoskupovaním. Takéto zmeny môžu byť v budúcnosti ošetrené väčším počtom vzoriek v skupinách.

Vzhľadom k tomu, že sa jedná o pilotnú prácu v tomto obore, bude na tento výskum nadväzovať rozsiahlejšia štúdia, kde budú výsledky zistené v tejto práci eventuálne potvrdzované.

## 6 ZÁVER

Cieľom tejto diplomovej práce bolo zistiť, či je možné pomocou lipidomickej analýzy potu pozorovať rozdielnu hladinu lipidov u pacientok s karcinómom prsníkov a zdravých žien.

V teoretickej časti bola vypracovaná literárna rešerš na niekoľko tém. Prvá kapitola sa zaoberala rakovinou prsníkov, jej vznikom, rozdelením, a v neposlednej rade, jej diagnostike a liečbe. V druhej kapitole boli popísané jednotlivé typy potných žliaz, druhov potov a ich možné využitie v modernej diagnostike. Posledná kapitola bola venovaná lipidomike ako samostatnému vednému oboru.

Experimentálna časť bola zameraná na štúdium lipidomickej analýzy potu pacientok s karcinómom prsníkov a ich porovnanie s kontrolami. V tejto oblasti sa jednalo o prvotný výskum, a tak bolo potrebné optimalizovať niekoľko krokov postupu. Jednalo sa o optimalizáciu odberu potu a extrakcie. V prvej optimalizácii boli posudzované tri rôzne techniky odberov, pričom na základe výsledkov bola nakoniec zvolená frita. Pri optimalizácii extrakcie lipidov z potu bola vybraná metóda využívajúca extrakciu na báze spojenia MTBE, MeOH a vody.

Pomocou UHLPC-MS/MS bolo vo vzorkách analyzovaných 16 lipidových skupín, ktoré boli následne upravené a štatisticky vyhodnotené. Hlavnými lipidmi, ktoré v našej štúdií vykazovali významné zmeny medzi pacientkami a kontrolami, bolo 5 lipidov zo skupiny ceramidov, 3 lipidy zo skupiny hexaglykozylceramidov, 3 lipidy zo skupiny mastných kyselín, 2 lipidy zo skupiny lyzofosfatidylcholínov a jeden lipid zo skupiny lyzofosfatidyletanolamínov.

Naše výsledky budú využité v nadväzujúcej rozsiahlejšej štúdií, v ktorej sa odstránia všetky limitácie a bude tak možné overiť výsledky získané touto prácou. Detegované lipidy by mohli byť v budúcich výskumoch pozorované ako potenciálne biomarkery rakoviny prsníkov v pote.

## 7 LITERATÚRA

- Abrahámová J. (2019): *Co byste měli vědet o rakovině prsu*. 2nd ed. Grada Publishing, Praha, Česká republika, 172 strán.
- Ackermann A.B. (1997): Embryologic, histologic, and anatomic aspects. In: *Histologic Diagnosis of Inflammatory Skin Diseases* (Stamathis, G., ed.), Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 3-56.
- Akram M., Iqbal M., Daniyal M., Khan A.U. (2017): Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological research* 50, 33.
- Al-Naggar R.A., Al-Naggar D.H., Bobryshev Y.V., Chen R., Assabri A. (2011): Practice and barriers toward breast self-examination among young Malaysian women. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 12, 1173-1178.
- Arpino G., Bardou V.J., Clark G.M., Elledge R.M. (2004): Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. *Breast cancer research* 6, R149.
- Astarita G., Yu K. (2012): New frontiers for mass spectrometry in lipidomics, part II. *LC GC North America* 30, 482-491.
- Aumüller G., Wilhelm B., Seitz J. (1999): Apocrine secretion – fact or artifact?. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger* 181, 437-446.
- Baker L.B. (2019): Physiology of sweat gland function: The roles of sweating and sweat composition in human health. *Temperature* 6, 211-259.
- Bang Y.H., Kim J.H., Paik S.W., Park S.H., Jackson I.T., Lebeda R. (1996): Histopathology of apocrine bromhidrosis. *Plastic and reconstructive surgery* 98, 288-292.
- Benson A.B., Schrag D., Somerfield M.R., Cohen A.M., Figueredo A.T., Flynn P.J., Kryzanowska M.K., Maroun J., McAllister P., van Cutsem E., Brouwers M., Charette M., Haller D.G. (2004): American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *Journal of clinical oncology* 22, 3408-3419.
- Blaichman J., Marcus J.C., Alsaasi T., El-Khoury M., Meterissian S., Mesurolle B. (2012): Sonographic appearance of invasive ductal carcinoma of the breast according to histologic grade. *American Journal of Roentgenology* 199, W402-W408.
- Bland K., Copeland E. (2009): *The Breast – Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases*. 4th ed. Saunders, Philadelphia, USA, 1712 strán.
- Blanksby S.J., Mitchell T.W. (2010): Advances in mass spectrometry for lipidomics. *Annual Review of Analytical Chemistry* 3, 433-465.
- Blight E.G., Dyer W.J. (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology* 37, 911-917.
- Bolognia J.L., Schaffer J.V., Cerroni L. (2012): *Dermatology*. 3rd ed. Mosby Elsevier, Londýn, UK, 2776 strán.
- Bombieri C., Claustres M., De Boeck K., Derichs N., Dodge N., Dodge J., Girodon E., Sermet I., Schwarz M., Tzetis M., Wilschanski M., Bareil C., Bilton D., Castellani C., Cuppens H., Cuttin G.R., Dřevínek P., Farrell P., Elborn J.S., Jarvi K., Kerem B., Kerem E., Knowles M., Macek Jr M., Munck A., Radojkovic D., Seia M., Sheppard D.N., Southern K.W., Stuhmann M., Tullis E., Zielenski J., Pignatti P.F., Feres C. (2011): Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *Journal of Cystic Fibrosis* 10, S86-S102.
- Brierley J.D., Gospodarowicz M.K., Wittekind C. (2017): *TNM classification of malignant tumours*. 1st ed. John Wiley & Sons, Chichester, UK, 241 strán.

- Cala M.P., Aldana J., Medina J., Sanchez J., Guio J., Wist J., Meesters R.J. (2018): Multiplatform plasma metabolic and lipid fingerprinting of breast cancer: A pilot control-case study in Colombian Hispanic women. *PloS one* 13, e0190958.
- Carrasco-Pancorbo A., Navas-Iglesias N., Cuadros-Rodriguez L. (2009): From lipid analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part I: Modern lipid analysis. *Trends in Analytical Chemistry* 28, 263-278.
- Castillo S., Gopalacharyulu P., Yetukuri L., Orešič M. (2011): Algorithms and tools for the preprocessing of LC–MS metabolomics data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 108, 23-32.
- Chalmers T.M., Keele C.A. (1952): The nervous and chemical control of sweating. *British Journal of Dermatology* 64, 43-54.
- Charles A. (1960): An electron microscope study of the eccrine sweat gland. *Journal of Investigative Dermatology* 34, 81-88.
- Chen X., Chen H., Dai M., Ai J., Li Y., Mahon B., Dai S., Deng Y. (2016): Plasma lipidomics profiling identified lipid biomarkers in distinguishing early-stage breast cancer from benign lesions. *Oncotarget* 7, 36622.
- Chlebowski R.T., Chen Z., Anderson G.L., Rohan T., Aragaki A., Lane D., Dolan N.C., Paskett E.D., McTiernan A., Hubbell F.A., Adams-Campbell L.L., Prentice R. (2005): Ethnicity and breast cancer: factors influencing differences in incidence and outcome. *Journal of the National Cancer Institute* 97, 439-448.
- Chuang H.Y., Lee E., Liu Y.T., Lee D., Ideker T. (2007): Network-based classification of breast cancer metastasis. *Molecular systems biology* 3, 140.
- Čihák R. (2016): *Anatomie* 3, 3rd ed., Grada Publishing, Praha, Česká republika, 552 strán.
- Coleman M. P., Quaresma M., Berrino F., Lutz J. M., De Angelis R., Capocaccia R., Baili P., Rachet B., Gatta G., Hakulinen T., Micheli A., Sant M., Weir H. K., Elwood M., Tsukuma H., Koifman S., Azevedo e Silva G., Francisci S., Satanquilani M., Verdecchia A., Storm H. H., Young J. L., CONCORD Working Group (2008): Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *The lancet oncology* 9, 730-756.
- Damera A., Evans A.J., Conford E.J., Klimberg V. (2004): Diagnosis of axillary nodal metastases by ultrasound-guided core biopsy in primary operable breast cancer. *Breast Diseases* 15, 180-181.
- DiCostanzo D., Rosen P.P., Gareen I., Franklin S., Lesser M. (1990): Prognosis in infiltrating lobular carcinoma. An analysis of "classical" and variant tumors. *The American journal of surgical pathology* 14, 12-23.
- DiSaverio S., Gutierrez J., Avisar E. (2008): A retrospective review with long term follow up of 11,400 cases of pure mucinous breast carcinoma. *Breast cancer research and treatment* 111, 541-547.
- Dória M.L., Cotrim Z., Macedo B., Simões C., Dominigues P., Helguero L., Dominigues M.R. (2012): Lipidomic approach to identify patterns in phospholipid profiles and define class differences in mammary epithelial and breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment* 133, 635-648.
- Dorval M., Maunsell E., Deschênes L., Brisson J. (1998): Type of mastectomy and quality of life for long term breast carcinoma survivors. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society* 83, 2130-2138.
- Drew P., Cawthorn S., Michell M (2007): *Interventional Ultrasound of the Breast*. 1st ed. Informa Healthcare, Londýn, UK, 219 strán.
- Dunbar E.M., Singer T.W., Singer K., Knight H., Lanska D., Okun M.S. (2002): Understanding gustatory sweating. *Clinical Autonomic Research* 12, 179-184.

- Eliyahu G., Kreizman T., Degani H. (2007): Phosphocholine as a biomarker of breast cancer: molecular and biochemical studies. *International journal of cancer* 120, 1721-1730.
- Fahy E., Subramaniam S., Brown H.A., Glass C.K., Merrill Jr A.H., Murphy R.C., Raetz C.R.H., Russell D.W., Seyama Y., Shaw W., Shimizu T., Spener F., van Meer G., VanNieuwenhze M.S., White S.H., Witztum J.L., Dennis E.A. (2005): A comprehensive classification system for lipids. *European journal of lipid science and technology* 107, 337-364.
- Fawcett D.W., Bloom W., Raviola E., Angevine J.B., Maximov A. (1994): *Textbook of Histology*. 12th ed. Chapman & Hall, Londýn, UK, 964 strán.
- Fisher B., Anderson S., Redmond C.K., Wolmark N., Wickerham D.L., Cronin W.M. (1995): Reanalysis and results after 12 years of follow-up in a randomized clinical trial comparing total mastectomy with lumpectomy with or without irradiation in the treatment of breast cancer. *New England Journal of Medicine* 333, 1456-1461.
- Fisher E.R., Palekar A.S., Redmond S., Barton B., Fisher B. (1980): Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (protocol no. 4): VI. Invasive papillary cancer. *American journal of clinical pathology* 73, 313-322.
- Folch J., Lees M., Stanley G.S. (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of biological chemistry* 226, 497-509.
- Forman D., Bray F., Brewster D.H., Mblawa C.G., Kohler B., Piñeros M., Steliarova-Foucher E., Swaminathan R., Ferlay J. (2014): *Cancer incidence in five continents*. Vol. X. IARC, Lyon, Francúzsko, 1436 strán.
- Fu L., TsucMya S.L., Matsuyama I., Ishii K. (1998): Clinicopathologic features and incidence of invasive lobular carcinoma in Japanese women. *Pathology international* 48, 348-354.
- Gardlo A., Friedecký D., Najdekr L., Karlíková R., Adam T. (2019): Metabol: The statistical analysis of metabolomic data.
- Goldstein N.S., Kestin L.L., Vicini F.A. (2004): Refined morphologic criteria for tubular carcinoma to retain its favorable outcome status in contemporary breast carcinoma patients. *American journal of clinical pathology* 122, 728-739.
- Gross R.W., Han X. (2011): Lipidomics at the interface of structure and function in systems biology. *Chemistry & biology* 18, 284-291.
- Hall E.J., Brenner D.J. (2008): Cancer risks from diagnostic radiology. *The British journal of radiology* 81, 362-378.
- Han X., Gross R.W. (2003): Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry a bridge to lipidomics. *Journal of lipid research* 44, 1071-1079.
- Han X., Rozen S., Boyle S.H., Hellegers C., Cheng H., Burke J.R., Welsh-Bohmer K.A., Doraiswamy P.M., Kaddurah-Daouk R. (2011): Metabolomics in early Alzheimer's disease: identification of altered plasma sphingolipidome using shotgun lipidomics. *PLoS one* 6, e21643.
- Hashimoto K. (1971): Demonstration of the intercellular spaces of the human eccrine sweat gland by lanthanum: I. The secretory coil. *Journal of ultrastructure research* 36, 249-262.
- Hashimoto K., Gross B.G., Lever W.F. (1966): The ultrastructure of human embryo skin. II. The formation of intradermal portion of the eccrine sweat duct and of the secretory segment during the first half of embryonic life. *Journal of investigative dermatology* 46, 513-529.
- Hibbs R.G. (1958): The fine structure of human eccrine sweat glands. *American Journal of Anatomy* 103, 201-217.

- Hibbs R.G. (1962): Electron microscopy of human apocrine sweat glands. *The Journal of investigative dermatology* 38, 77-84.
- Hilvo M., Denkert C., Lehtinen L., Müller B., Brockmöller S., Seppänen-Laakso T., Budczies J., Bucher E., Yetukuri L., Castillo S., Berg E., Nygren H., Sysi-Aho M., Griffin J.L., Fiehn O., Loibi S., Richter-Ehrenstein C., Radke C., Hyötyläinen T., Kallioniemi O., Iljin K., Orešič M. (2011): Novel theranostic opportunities offered by characterization of altered membrane lipid metabolism in breast cancer progression. *Cancer research* 71, 3236-3245.
- Holzle E. (2002): Pathophysiology of sweating. *Current Problems in Dermatology* 30, 10-22.
- Houghton J. (2003): Radiotherapy and tamoxifen in women with completely excised ductal carcinoma in situ of the breast in the UK, Australia, and New Zealand: randomized controlled trial. *The Lancet* 362, 95-102.
- Hu Y., Converse C., Lyons M.C., Hsu W.H. (2018): Neural control of sweat secretion: a review. *British Journal of Dermatology* 178, 1246-1256.
- Huckelmann M., Oster O. (2002): Mercurimetric determination of chloride in sweat. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 319, 75-76.
- Hurley Jr H.J., Shelley W.B. (1954): The role of the myoepithelium of the human apocrine sweat gland. *Journal of Investigative Dermatology* 22, 143-156.
- Hurley M.N., McKeever T.M., Prayle A.P., Fogarty A.W., Smyth A.R. (2014): Rate of improvement of CF life expectancy exceeds that of general population – observational death registration study. *Journal of Cystic Fibrosis* 13, 410-415.
- Hussain J.N., Mantri N., Cohen M.M., (2017): Working up a good sweat—the challenges of standardising sweat collection for metabolomics analysis. *The Clinical Biochemist Reviews* 38, 13.
- Inoue M., Nakagomi H., Nakada H., Furuya K., Ikegama K., Watanabe H., Omata M., Oyama T. (2017): Specific sites of metastases in invasive lobular carcinoma: a retrospective cohort study of metastatic breast cancer. *Breast Cancer* 24, 667-672.
- Jadoon S., Karim S., Akram M.R., Kalsoom Khan A., Zia M.A., Siddiqi A.R., Murtaza G. (2015): Recent developments in sweat analysis and its applications. *International journal of analytical chemistry* 2015, <https://www.hindawi.com/journals/ijac/2015/164974/>.
- Jandorf L., Bursac Z., Pulley L., Trevino M., Castillo A., Erwin D.O. (2008): Breast and cervical cancer screening among Latinas attending culturally specific educational programs. *Progress in community health partnerships: research, education, and action* 2, 195-204.
- Jiang N., Zhang G., Pan L., Yan C., Zhang L., Weng Y., Wang W., Chen X., Yang G. (2017): Potential plasma lipid biomarkers in early-stage breast cancer. *Biotechnology letters* 39, 1657-1666.
- Kanto T., Kalinski P., Hunter O.C., Lotze M.T., Amoscato A.A. (2001): Ceramide mediates tumor-induced dendritic cell apoptosis. *The Journal of Immunology* 167, 3773-3784.
- Kashiwagi S., Onoda N., Asano Y., Noda S., Kawajiri H., Takashima T., Ohsawa M., Kitagawa S, Hirakawa K. (2013): Clinical significance of the sub-classification of 71 cases mucinous breast carcinoma. *Springerplus* 2, 481.
- Katajamaa M., Orešič M. (2007): Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *Journal of chromatography A* 1158, 318-328.
- Keskin G., Gumus A.B. (2011): Turkish hysterectomy and mastectomy patients—depression, body image, sexual problems and spouse relationships. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 12, 425-432.



- Kitatani K., Idkowiak-Bladys J., Hannun Y.A. (2008): The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cellular signaling* 26, 1010-1018.
- Krag D.N., Weaver D.L., Alex J.C., Fairbank J.E.A. (1993): Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe. *Surgical oncology* 2, 335-340.
- Labors J.N., Preti G., Hoelzle E., Leyden J., Kligman A. (1979): Steroid analysis of human apocrine secretion. *Steroids* 34, 249-258.
- Lakhani S.R., Ellis I.O., Schnitt S.J., Tan P.H., van de Vijver M.J. (2012): *World Health Organization Classification of Tumours*. Vol. 4. IARC, Lyon, Francúzsko, 240 strán.
- Listenberger L.L., Han X., Lewis S.E., Cases S., Farese R.V., Ory D.S., Schaffer J.E. (2003): Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 3077-3082.
- Lv W., Yang T. (2012): Identification of possible biomarkers for breast cancer from free fatty acid profiles determined by GC-MS and multivariate statistical analysis. *Clinical biochemistry* 45, 127-133.
- Ly D., Forman D., Ferlay J., Brinton L.A., Cook M.B. (2013): An international comparison of male and female breast cancer incidence rates. *International journal of cancer* 132, 1918-1926.
- Masi C.M., Blackman D.J., Peek M.E. (2007): Interventions to enhance breast cancer screening, diagnosis, and treatment among racial and ethnic minority women. *Medical Care Research and Review* 64, 195S-242S.
- Matyash V., Liebisch G., Kurzchalia T.V., Shevchenko A., Schwudke D. (2008): Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *Journal of lipid research* 49, 1137-1146.
- Menet E., Becetter V., Brifford M. (2008): Cytologic diagnosis of lobular carcinoma of the breast: experience with 555 patients in the Rene Huguenin Cancer Center. *Cancer Cytopathology: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society* 114, 111-117.
- Mitsubayashi K.M., Suzuki M., Tamiya E., Karube I. (1994): Analysis of metabolites in sweat as a measure of physical condition. *Analytica chimica acta* 289, 27-34.
- Moinfar F. (2007): *Essentials of diagnostic breast pathology: a practical approach*. 1st ed. Springer, Berlin, Nemecko, 496 strán.
- Montes L.F., Baker B.L., Curtis A.C. (1960): The cytology of the large axillary sweat glands in man. *Journal of Investigative Dermatology* 35, 273-291.
- Morita M., Kuba K., Ichikawa A., Nakayama M., Katahira J., Iwamoto R., Watanebe T., Sakabe S., Daidoji T., Nakamura S., Kadowaki A., Ohto T., Nakanishi H., Taguchi R., Nakaya T., Murakami M., Yoneda Y., Hiroyuki A., Kawaoka Y., Penninger J.M., Arita M., Imai Y. (2013): The lipid mediator protectin D1 inhibits influenza virus replication and improves severe influenza. *Cell* 153, 112-125.
- Moro K., Kawaguchi T., Tsuchida J., Gabriel E., Qi Q., Yan L., Wakai T., Takabe K., Nagahashi M. (2018): Ceramide species are elevated in human breast cancer and are associated with less aggressiveness. *Oncotarget* 9, 19874.
- Mullholland M.W., Lillemoe K.D., Doherty G.M., Maier R.V., Simeone D.M., Upchurch Jr G.R. (2010): *Greenfield's Surgery: Scientific Principles & Practice*. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2112 strán.
- Nishizuka Y. (1995): Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *The FASEB journal* 9, 484-496.
- Orešič M. (2011): Informatics and computational strategies for the study of lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1811, 991-999.

- Ozkan A., Malak A.T., Gürkan A., Turgay A.D. (2010): Do Turkish nursing and midwifery students teach breast self-examination to their relatives. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 11, 1569-1573.
- Papadatos G., Rangan A.M., Psarianos T., Ung O., Taylor R., Boyages J. (2001): Probability of axillary node involvement in patients with tubular carcinoma of the breast. *British journal of surgery* 88, 860-864.
- Park S.J., Lee K.P., Im D.S. (2014): Action and signaling of lysophosphatidylethanolamine in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biomolecules & therapeutics* 22, 129.
- Patel D., Witt S.N. (2017): Ethanolamine and phosphatidylethanolamine: partners in health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017, <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2017/4829180/>.
- Pearson R., Milligan R., Cain H. (2017): Radioactive iodine-125 seed localisation of breast carcinoma in advance of the day of surgery reduces pre-operative anxiety levels. *European Journal of Surgical Oncology* 43, 7-10.
- Rafeeq M.M., Murad H.A.S. (2017): Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches. *Journal of translational medicine* 15, 84.
- Raterink R.J., Lindenburg P.W., Vreeken R.J., Ramautar R., Hankemeier T. (2014): Recent developments in sample-pretreatment techniques for mass spectrometry-based metabolomics. *Trends in Analytical Chemistry* 61, 157-167.
- Raynor A., Jantscheff P., Ross T., Schleisinger M., Wilde M., Haasis S., Dreckmann T., Bendas G., Massing U. (2015): Saturated and mono-unsaturated lysophosphatidylcholine metabolism in tumour cells: a potential therapeutic target for preventing metastases. *Lipids in health and disease* 14, 69.
- Rebbeck T.R., Friebel T., Lynch H.T., Neuhausen S.L., van't Veer L., Garber J.E., Evans G.R., Narod S.A., Isaacs C., Matloff E., Daly M.B., Olopade O.I., Weber B.L. (2004): Bilateral prophylactic mastectomy reduces breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: the PROSE Study Group. *American Society of Clinical Oncology* 22, 1055-1062.
- Reid-Nicholson M.D., Tong G., Cangiarella J.F., Moreira A.L. (2006): Cytomorphologic features of papillary lesions of the male breast: a study of 11 cases. *Cancer Cytopathology: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society* 108, 222-230.
- Reis A., Rudnitskaya A., Blackburn G.J., Fauzi N.M., Pitt A.R., Spickett C.M. (2013): A comparison of five lipid extraction solvent systems for lipidomic studies of human LDL. *Journal of lipid research* 54, 1812-1824.
- Ring A., Dowsett M. (2004): Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocrine-related cancer* 11, 643-658.
- Robertson J.F.R., Blamey R.W. (2003): The use of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) agonists in early and advanced breast cancer in pre-and perimenopausal women. *European Journal of Cancer* 39, 861-869.
- Robinson S., Robinson A.H. (1954): Chemical composition of sweat. *Physiological reviews* 34, 202-220.
- Rommens J.M., Iannuzzi M.C., Kerem B., Drumm M.L., Melmer G., Dean M., Rozmahel R., Cole J.L., Kennedy D., Hidaka N., Zsiga M., Buchwald M., Riordan J.R., Tsui L., Collins F.S. (1989): Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245, 1059-1065.
- Rowland J.H., Desmond K.A., Meyerowitz B.E., Belin T.R., Wyatt G.E., Ganz P.A. (2000): Role of breast reconstructive surgery in physical and emotional outcomes

- among breast cancer survivors. *Journal of the National Cancer Institute* 92, 1422-1429.
- Saliba A.E., Vonkova I., Gavin A.C. (2015): The systematic analysis of protein-lipid interactions comes of age. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16, 753-761.
- Sarafian M.H., Gaudin M., Lewis M.R., Martin F.P., Holmes E., Nicholson J.K., Dumas M.E. (2014): Objective set of criteria for optimization of sample preparation procedures for ultra-high throughput untargeted blood plasma lipid profiling by ultra performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Analytical chemistry* 86, 5766-5774.
- Sardanelli F., Giuseppetti G.M., Panizza P., Bazzocchi M., Fausto A., Simonetti G., Lattanzio V., Del Maschio A. (2004): Sensitivity of MRI versus mammography for detecting foci of multifocal, multicentric breast cancer in fatty and dense breasts using the whole-breast pathologic examination as a gold standard. *American Journal of Roentgenology* 183, 1149-1157.
- Sato K. (1993): Biology of the eccrine sweat gland. In: *Dermatology in General Medicine* vol. 1, 4th ed., (Fitzpatrick T., Eisen A.Z., Wolff K., Freedberg I.M., Austen K.F., eds), McGraw-Hill, New York, USA, 221-241.
- Sato K., Kang W.H., Saga K., Sato K.T. (1989): Biology of sweat glands and their disorders. I. Normal sweat gland function. *Journal of the American Academy of Dermatology* 20, 537-563.
- Sato K., Leidal R., Sato F. (1987): Morphology and development of an apoeccrine sweat gland in human axillae. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 252, R166-R180.
- Sato K., Nysijama A., Kobayashi M. (1979): Mechanical properties and functions of the myoepithelium in the eccrine sweat gland. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 237, C177-C184.
- Sato K., Sato F. (1987): Sweat secretion by human axillary apoeccrine sweat gland in vitro. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 252, R181-187.
- Schiffmann S., Sander J., Birod K., Wobst I., Angioni C., Ruckhäberle E., Kaufmann M., Ackermann H., Lötsch J., Schmidt H., Geisslinger G., Grösch S. (2009): Ceramide synthases and ceramide levels are increased in breast cancer tissue. *Carcinogenesis* 30, 745-752.
- Sheppard D.G., Whitman G.J., Fornage B.D., Stelling C.B., Huynh P.T., Sahin A.A. (2000): Tubular carcinoma of the breast: mammographic and sonographic features. *American Journal of Roentgenology* 174, 253-257.
- Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. (2019): Cancer statistics, 2019. *CA: a cancer journal for clinicians* 69, 7-34.
- Sotiriou C., Powles T.J., Dowsett M., Jazaeri A.A., Feldman A.L., Assersohn L., Gadisetti C., Libutti S.K., Liu E.T. (2002): Gene expression profiles derived from fine needle aspiration correlate with response to systemic chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Research* 4, 3-7.
- Spener F., Lagarde M., Gélouën A., Record M. (2003): What is lipidomics?. *European journal of lipid science and technology* 105, 481-482.
- Stenn K.S. (1988): The skin. In: *Cell and Tissue Biology* 6th ed. (Weiss L., ed.), Urban & Schwarzenberg, Mníchov, Nemecko, 539-572.
- Szabo G. (1967): The regional anatomy of the human integument with special reference to the distribution of the hair follicles, sweat glands and melanocytes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 252, 447-485.

- Tautenhahn R., Patti G.J., Kalisiak E., Miyamoto T., Schmidt M., Lo F.Y., McBee J., Baliga N.S., Siuzdak G. (2011): metaXCMS: second-order analysis of untargeted metabolomics data. *Analytical chemistry* 83, 696-700.
- Tavassoli F.A., Deville P. (2003): *Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs*. 1st ed. IARC, Lyon, Francúzsko, 432 strán.
- Taylor L.A., Arends J., Hodina A.K., Unger C., Massing U. (2007): Plasma lysophosphatidylcholine concentration is decreased in cancer patients with weight loss and activated inflammatory status. *Lipids in health and disease* 6, 17.
- Toikkanen S., Eerola E., Ekfors T.O. (1988): Pure and mixed mucinous breast carcinomas: DNA stemline and prognosis. *Journal of clinical pathology* 41, 300-303.
- Tsugawa H., Cajka T., Kind T., Ma Y., Higgins B., Ikeda K., Kanazawa M., VanderGheynst J., Fiehn O., Arita M. (2015): MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nature methods* 12, 523.
- Van Deventer P.V. (2004): The blood supply to the nipple-areola complex of the human mammary gland. *Aesthetic plastic surgery* 28, 393-398.
- Van Meer G. (2005): Cellular lipidomics. *The EMBO journal* 24, 3159-3165.
- Wainwright C.E., Elborn J.S., Ramsey B.W., Marigowda G., Huang X., Cipolli M., Colombo C., Davies J.C., De Boeck K., Flume P.A., Konstan M.W., McColley S.A., McCoy K., McKone E.F., Munck A., Ratjen F., Rowe S.M., Waltz D., Boyle M.P.; TRAFFIC Study Group; TRANSPORT Study Group (2015): Lumacaftor–ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del CFTR. *New England Journal of Medicine* 373, 220-231.
- Xuan Q., Hu C., Yu D., Wang L., Zhou Y., Zhao X., Li Q., Hou X., Xu G. (2018): Development of a High Coverage Pseudotargeted Lipidomics Method Based on Ultra-High Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Analytical chemistry* 90, 7608-7616.
- Yang L., Ciu X., Zhang N., Bai Y., Han X., Shi Y., Liu H. (2015): Comprehensive lipid profiling of plasma in patients with benign breast tumor and breast cancer reveals novel biomarkers. *Analytical and bioanalytical chemistry* 407, 5065-5077.
- Yokozeki H., Hibino T., Sato K. (1987): Partial purification and characterization of cysteine proteinases in eccrine sweat. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 252, R1119-R1129.
- Zaha D.C. (2014): Significance of immunohistochemistry in breast cancer. *World journal of clinical oncology* 5, 382.
- Zhang L., Jia N., Han L., Yang L., Xu W., Chen W. (2015): Comparative analysis of imaging and pathology features of mucinous carcinoma of the breast. *Clinical breast cancer* 15, 147-154.

## 8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ACN	acetonitril
AmAC	acetát amónny
BRCA	„Breast cancer“ gén
Cer	ceramidy
CF	cystická fibróza
CFTR	gén pre „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“
Clr	„centered log ratio“ – druh transformácie dát
DCIS	duktálny karcinóm <i>in situ</i>
DG	diacylglyceroly
DIN	duktálna intraepiteliárna neoplázia
FA	mastná kyselina
HER2	génpre „human epithelial growth receptor 2“
Hex2Cer	dihexaglykozylceramidy
HexCer	hexaglykozylceramidy
IDC	invazívny ductálny karcinóm
ILC	invazívny lobulárny karcinóm
IPA	izopropylalkohol
LCIS	lobulárny karcinóm <i>in situ</i>
LC-MS	kvapalinová chromatografia v kombinácii s hmotnostnou spektrometriou
LIN	lobulárna intraepiteliárna neoplázia
LPC	lyzofosfatidylcholíny
LPE	lyzofosfatidyletanolamíny
MeOH	metanol
MRM	„multiple reaction monitoring“ – mód sledovania viacerých reakcií
MTBE	metyltercbutyléter
OMIM	„Online Mendelian Inheritance in Man“ – online databáza dedičných genetických porúch
OPLS-DA	„Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis“ – ortogonálna diskriminačná analýza najmenších štvorcov
PC	fosfatidylcholíny
PC O	alkylové a alkenylové deriváty fosfatidylcholínov
PCA	„Principal Component Analysis“ - analýza hlavných komponentov
PE	fosfatidyletanolamíny
PE O	alkylové a alkenylové deriváty fosfatidyletanolamínov
PI	fosfatidylinozitoly
PS	fosfatidylseríny
QC vzorka	„quality control“ vzorka
SM	sfigomyelíny
TG	triacylglyceroly
TNM	klasifikácia tumoru, nádorov a metastáz
UHPLC	„Ultra-High Performance Liquid Chromatography“ – ultravysokoúčinná kvapalinová chromatografia
VIP graf	„Variable Importance for the Projection“ – graf významnosti premenných v analýze