

НОВЫЕ НЕИНВАЗИВНЫЕ ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ МЕТАСТАТИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ ЛИМФОУЗЛОВ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

А. О. Токарева^{1,2}, В. В. Чаговец¹, В. В. Родионов¹, В. В. Кометова¹, М. В. Родионова¹, Н. Л. Стародубцева^{1,2}, В. Е. Франкевич¹ ✉

¹ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия

² Институт энергетических проблем химической физики имени В. Л. Тальрозе, Москва, Россия

Ранняя диагностика процесса метастазирования позволяет выбрать оптимальный протокол лечения и повысить выживаемость пациенток. Неинвазивные и малоинвазивные методы диагностики помогают ставить диагноз с минимальным ущербом для организма. Целью исследования было найти биомаркеры, характеризующие начало метастатического процесса и создать диагностическую модель по липидному профилю плазмы крови с использованием жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Исследовали плазму крови 55 пациенток, у 28 из которых было диагностировано метастазирование в региональные лимфоузлы, 27 пациенток составили контрольную группу. Липиды, относящиеся к окисленным липидам и сфингомиелинам имели при метастазировании статистически значимо более высокий и более низкий уровни соответственно. С использованием методов многомерного анализа были составлены панели липидов, и модели на их основе в ходе кросс-валидации по отдельному объекту имели чувствительность и специфичность 79 и 74% (режим положительных ионов) и 50 и 85% (режим отрицательных ионов).

Ключевые слова: липиды, регионарное метастазирование, рак молочной железы, плазма крови, молекулярные маркеры

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и ГФЕН в рамках научного проекта № 19-515-55021

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова (протокол № 9 от 22 ноября 2018 г.), проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации, Международной конференции по гармонизации (ICF), Стандартов надлежащей клинической практики (GCP), ФЗ № 323-ФЗ от 21 ноября 2011 г. «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации»; все пациентки подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Владимир Евгеньевич Франкевич
ул. Опарина, д. 4, г. Москва, 117997, Россия; vfrankevich@gmail.com

Статья получена: 26.10.2021 **Статья принята к печати:** 08.11.2021 **Опубликована онлайн:** 10.11.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.053

NEW NON-INVASIVE APPROACHES TO THE DIAGNOSIS OF LYMPH NODE METASTASES FROM BREAST CANCER BY MASS SPECTROMETRY

Tokareva AO^{1,2}, Chagovets VV¹, Rodionov VV¹, Kometova VV¹, Rodionova MV¹, Starodubtseva NL^{1,2}, Frankevich VE¹ ✉

¹ Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

² V. L. Talrose Institute for Energy Problems of Chemical Physics, Moscow, Russia

Early diagnosis of metastasis makes it possible to select the optimal treatment protocol and improve patient survival. Noninvasive and minimally invasive diagnostic techniques help to make a diagnosis with minimal damage to the body. The study was aimed to find biomarkers, being the hallmarks of the metastatic process initiation, and to develop a diagnostic model based on the plasma lipid profile using liquid chromatography-mass spectrometry. We studied blood plasma of 55 patients, 28 of them were diagnosed with the regional lymph node metastasis; the control group comprised 27 patients. The levels of lipids, belonging to the groups, such as oxidized lipids and sphingomyelins, in patients with metastases were significantly higher and significantly lower, respectively. The lipid panels were created by multivariate analysis, and the models based on these panels showed sensitivity and specificity of 79 and 74% (positive ion mode), and of 50 and 85% (negative ion mode) in leave-one-out cross-validation.

Keywords: lipids, regional metastasis, breast cancer, blood plasma, molecular markers

Funding: the study was funded by RFBR and National Natural Science Foundation of China within the framework of the scientific project № 19-515-55021

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology (protocol № 9 dated November 22, 2018); the study was carried out in accordance with the requirements of the Declaration of Helsinki, International Council for Harmonisation (ICF), Good Clinical Practice (GCP) guidelines, Federal Law 323-FZ dated November 21, 2011 "On the Basics of Protecting the Health of Citizens in the Russian Federation"; the informed consent was submitted by all patients.

✉ **Correspondence should be addressed:** Vladimir E. Frankevich
Oparina, 4, Moscow, 117997, Russia; vfrankevich@gmail.com

Received: 26.10.2021 **Accepted:** 08.11.2021 **Published online:** 10.11.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.053

Распространение раковых клеток по организму от материнской опухоли происходит через жидкие среды организма, такие как кровь или лимфа [1]. Определить начало метастазирования в региональные лимфатические узлы со 100%-й точностью можно при рассечении подмышечных узлов и биопсии сторожевого узла. При этом из-за высокой инвазивности высок риск осложнений, связанных со скоплением лимфатической жидкости в тканях [2, 3]. К неинвазивным методам диагностики регионального метастазирования относят ультразвуковое исследование (УЗИ), магнитно-резонансную и позитронно-эмиссионную томографию

(МРТ и ПЭТ). УЗИ является стандартным методом для поиска метастазирования в лимфатические узлы, но его чувствительность и специфичность зависят от качества аппаратуры и опыта оператора [4]. Применение МРТ ограничено противопоказаниями для людей с почечной недостаточностью, аллергией, кардиостимуляторами. ПЭТ отличается невысокой чувствительностью для диагностики подмышечных узлов [5].

Анализ плазмы крови является малоинвазивным методом. Его можно использовать для диагностики по молекулярному профилю плазмы болезни Альцгеймера [6], рака шейки матки [7], легкого [8], муковисцидоза печени и

Таблица 1. Значения относительной интенсивности липидов (условные единицы), имеющих статистически значимую разницу в уровнях в плазме при наличии метастазов и без них в режиме положительных ионов

Липиды	Метастазирование	Нет метастазирования	<i>p</i>
ОхТГ 16:0_16:0_18:3(ОО)	6,86×10 ⁵ (4,46×10 ⁵ ; 8,94×10 ⁵)	5,00×10 ⁵ (2,43×10 ⁵ ; 6,39×10 ⁵)	0,04
ОхТГ 16:0_18:0_18:3(ОН)	1,96×10 ⁶ (4,77×10 ⁵ ; 2,42×10 ⁶)	4,63×10 ⁵ (3,27×10 ⁵ ; 9,94×10 ⁵)	0,003
ОхТГ 18:1_18:1_18:2(ООН)	2,72×10 ⁶ (1,70×10 ⁶ ; 3,72×10 ⁶)	1,86×10 ⁶ (1,27×10 ⁶ ; 2,50×10 ⁶)	0,03
ТГ 14:0_16:0_18:1	2,43×10 ⁶ (2,05×10 ⁶ ; 2,84×10 ⁶)	1,85×10 ⁶ (1,45×10 ⁶ ; 2,57×10 ⁶)	0,04

легких [9]. Кроме того, в плазме крови были обнаружены белковые маркеры метастазирования опухолей прямой кишки [10] и ротовой полости [11], а также маркеры для определения регионального метастазирования, однако набор биомаркеров был специфичен для типа опухоли (лобулярной или протоковой) [12]. Липиды входят в состав молекулярного профиля и являются участниками важных метаболических процессов [13]. Липидный профиль плазмы, полученный с использованием высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии, позволил построить эффективную модель для классификации рака молочной железы или доброкачественной опухоли молочной железы на основе выбранных маркеров [14], что позволяет в совокупности с вышеприведенными примерами предположить наличие маркеров процессов метастазирования в плазме крови.

Целями данного исследования были поиск липидных маркеров регионального метастазирования в плазме крови у пациентов с зарегистрированным раком молочной железы методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии и оценка возможности создания диагностической панели.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование включили 55 женщин с диагностированным раком молочной железы, проходивших лечение в Национальном медицинском исследовательском центре акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова (Россия). Критериями включения были: наличие подписанного информированного добровольного согласия на проведение оперативного хирургического вмешательства и включение в дальнейшее исследование, возраст больных от 18 до 80 лет; наличие гистологически или цитологически подтвержденного диагноза рака молочной железы. Критерии исключения: неoadъювантная терапия и наличие злокачественных новообразований другой локализации до постановки диагноза РМЖ. У 28 женщин было выявлено метастазирование в региональные лимфоузлы, 27 женщин составили контрольную группу. Липиды экстрагировали из 40 мкл плазмы методом Фолча [15]: к 40 мкл плазмы и 5 мкл внутреннего стандарта добавляли 480 мкл СНСl₃ / MeOH (1 / 1) и выдерживали в ультразвуковой ванне 10 мин. После этого смесь перемешивали 10 с и центрифугировали 5 мин при 15 000 G. Органический слой, содержащий липиды, отбирали

в отдельную вials. К водному слою добавляли 250 мкл СНСl₃ / MeOH (1 / 1) и центрифугировали 5 мин при 15 000 G. Повторно отбирал нижний органический слой и соединял с отобраным ранее. Липидный раствор высушивали в потоке азота и перерастворили в 200 мкл IPA / ACN (1 / 1) для дальнейшего анализа.

Анализ липидов из экстракта проводили на жидкостном хроматографе Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific; Германия), соединенном с масс-анализатором Maxis Impact qTOF с источником ионов ЭРИ (Bruker Daltonics; Германия). Разделение образцов осуществляли методом обращенно-фазовой хроматографии на колонке Zorbax C18 (150 × 2,1 мм, 5 мкм; Agilent, США) с линейным градиентом от 30 до 90% элюента В (раствор ацетонитрил / изопропанол / вода, в объемном соотношении 90 / 8 / 2, с добавлением 0,1%-й муравьиной кислоты и 10 ммоль/л формиата аммония) за 20 мин. В качестве элюента А использовали раствор ацетонитрил / вода в объемном соотношении 60 / 40 с добавлением 0,1% муравьиной кислоты и 10 ммоль/л формиата аммония. Скорость потока элюирования была 40 мкл/мин, объем инжектируемого образца — 3 мкл. Масс-спектры получали в режиме положительных ионов и в режиме отрицательных ионов в диапазоне *m/z*, равном 100–1700, со следующими установками: напряжение на капилляре — 4,1 кВ и 3,0 кВ для режима положительных ионов и режима отрицательных ионов; давление распыляющего газа — 0,7 бар; скорость потока осушающего газа — 6 л/мин, температура осушающего газа — 200 °С.

Липиды идентифицировали с использованием R-скрипта Lipid Match [16] по точной массе и по характерным тандемным масс-спектрам (МС / МС).

Для статистической обработки результатов использовали скрипты, написанные на языке R [17] в среде RStudio [18].

Поиск соединений, имеющих статистически значимую разницу уровней плазмы у пациенток с метастазированием и без него, осуществляли с помощью теста Манна–Уитни для попарного сравнения групп. Для описания количественных данных использовали медиану (Me) и квартили Q₁ и Q₃. Величину порогового уровня значимости *p* принимали равной 0,05.

Создание диагностической модели на основе логистической регрессии осуществляли путем вычисления значения проекции переменной при ортогональной проекции на скрытые структуры [19] и выбора соединений,

Таблица 2. Значения относительной интенсивности липидов (условные единицы), имеющих статистически значимую разницу в уровнях в плазме при наличии метастазов и без них в режиме отрицательных ионов

Липиды	Метастазирование	Нет метастазирования	<i>p</i>
ОхРС 16:0_18:2(2О)	4,66×10 ⁵ (3,35×10 ⁵ ; 8,20×10 ⁵)	2,58×10 ⁵ (1,42×10 ⁵ ; 5,22×10 ⁵)	0,02
ОхРС 16:0_22:5(ОН)	1,15×10 ⁵ (8,32×10 ⁴ ; 1,39×10 ⁵)	7,93×10 ⁴ (5,10×10 ⁴ ; 1,10×10 ⁵)	0,04
ОхРС 18:0_18:2(ООН)	1,99×10 ⁵ (1,41×10 ⁵ ; 3,81×10 ⁵)	1,08×10 ⁵ (6,15×10 ⁴ ; 2,02×10 ⁵)	0,008
ОхРС 18:0_20:4(2О)	1,31×10 ⁵ (8,47×10 ⁴ ; 2,14×10 ⁵)	7,08×10 ⁴ (5,21×10 ⁴ ; 1,66×10 ⁵)	0,04
SM d22:0/20:3	5,71×10 ⁶ (5,17×10 ⁶ ; 6,49×10 ⁶)	6,94×10 ⁶ (5,28×10 ⁶ ; 7,38×10 ⁶)	0,01
SM d22:0/20:4	4,21×10 ⁵ (3,56×10 ⁵ ; 4,90×10 ⁵)	4,76×10 ⁵ (4,08×10 ⁵ ; 5,45×10 ⁵)	0,02

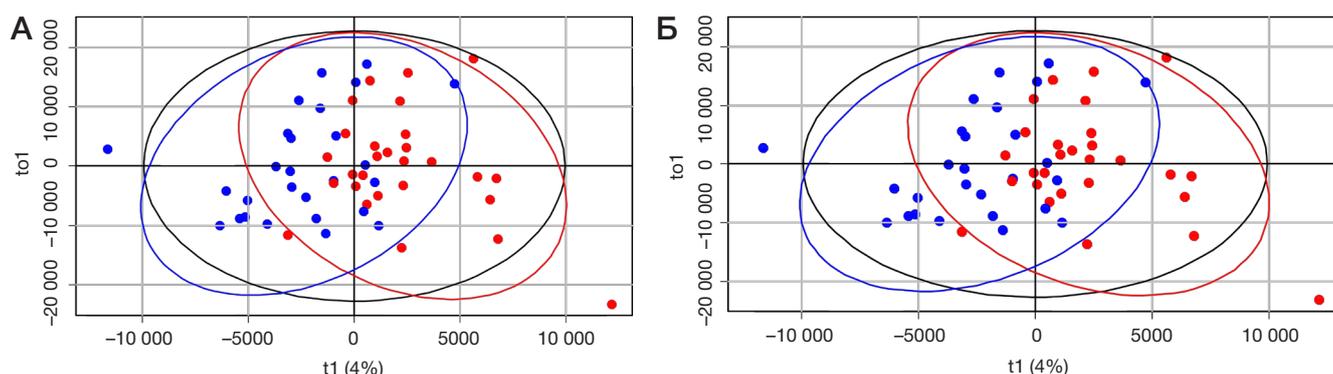


Рис. 1. Графики счетов, построенные для ортогональных проекций на скрытые структуры в режиме положительных ионов (А) и для режима отрицательных ионов (Б). Красными точками обозначены образцы от пациенток с региональным метастазированием, синими — от пациентов без регионального метастазирования

характеризующихся значением проекции переменной больше 1. Из выбранных переменных на основе информационного критерия Акаике (AIC) [20] осуществляли поэтапный выбор переменных, пока это приводило к уменьшению AIC. Для получения финальной модели из регрессии поэтапно удаляли переменные, коэффициенты которых не были статистически значимо отличны от 0 ($p > 0,05$). Качество полученной диагностической модели тестировали внутренней кросс-валидацией с контролем по отдельным объектам. Для оценки использовали значения площади под операционной кривой, чувствительность и специфичность.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе исследования было выявлено 183 липидных соединения в режиме положительных ионов и 161 соединение в режиме отрицательных ионов, из них четыре характеризовались наличием статистически значимой разницы в уровнях при режиме положительных ионов (табл. 1) и шесть — при режиме отрицательных ионов (табл. 2). Уровень окисленных липидов (оксотриглицеридов в режиме положительных ионов и фосфатидилхолинов в режиме отрицательных ионов) повышается при наличии метастазирования. Уровень сфингомиелинов, наоборот, падает при наличии метастазирования.

По результатам построений ортогональных проекций на скрытые структуры (рис. 1) было выбрано 36 липидов в режиме положительных ионов и 29 — в режиме отрицательных ионов со значением проекции переменной (ПП) больше 1.

Использовали семь соединений в режиме положительных ионов, которые позволили построить модель с площадью под операционной кривой, равной 0,84

(табл. 3; рис. 2А), и два соединения в режиме отрицательных ионов, которые позволили построить модель с площадью под операционной кривой, равной 0,71 (табл. 4; рис. 2Б). Чувствительность и специфичность составили для модели в режиме положительных ионов 79 и 74% соответственно, для модели в режиме отрицательных ионов — 50 и 85% соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Большая часть липидов, уровень которых статистически значимо повышается при наличии метастазирования, относится к окисленным. Окисленные липиды формируются преимущественно в подвергающихся апоптозу клетках, являясь при этом участниками воспалительных процессов [21]. Они были также выделены как предсказательные маркеры ишемической болезни сердца в плазме крови [22]. Созданные панели содержат в основном сфингомиелины и лизо- и фосфатидилхолины, содержащие длинные ацильные цепи. На сегодняшний день известна связь синтаз жирных кислот и омега-6 ненасыщенных жирных кислот с процессами метастазирования [23, 24], а также зарегистрировано повышение уровня сфингомиелинов и лизофосфатидилхолинов относительно фосфатидилхолинов в плазме крови при прогрессирующем метастатическом раке молочной железы у мышей [25]. Однако в данном исследовании было зарегистрировано статистически значимое понижение уровня сфингомиелинов в плазме крови при начале метастазирования. Разное изменение уровней сфингомиелинов в начале метастазирования было обнаружено при анализе злокачественных тканей (понижение уровня) и при анализе граничных здоровых тканей молочной железы (повышение уровня)

Таблица 3. Соединения, использованные для построения логистической регрессии, их коэффициенты (условные единицы), доверительный интервал ДИ (условные единицы), критерий Вальда, вероятность отличия значения коэффициента p от нуля в режиме положительных ионов

Липиды	β	ДИ β	Критерий Вальда	p
Свободный член	-3,98	-15,96-6,27	-0,74	0,46
CE 20:4	$3,44 \times 10^{-7}$	$1,30 \times 10^{-7}$ - $6,54 \times 10^{-7}$	2,64	0,008
LPC 18:2	$2,37 \times 10^{-7}$	$7,21 \times 10^{-8}$ - $4,72 \times 10^{-7}$	2,44	0,01
ОхTG 16:0_18:0_18:3(OH)	$1,56 \times 10^{-6}$	$6,37 \times 10^{-7}$ - $2,89 \times 10^{-6}$	2,83	0,005
PC 16:0_22:5	$2,66 \times 10^{-7}$	$1,09 \times 10^{-7}$ - $5,17 \times 10^{-7}$	2,55	0,01
SM d18:2/24:1	$-4,72 \times 10^{-7}$	$-9,01 \times 10^{-7}$ - $-1,70 \times 10^{-7}$	-2,60	0,009
SM d18:1/24:0	$-3,92 \times 10^{-7}$	$-8,47 \times 10^{-7}$ - $-1,25 \times 10^{-7}$	-2,26	0,02
SM d18:1/22:0	$3,85 \times 10^{-7}$	$6,70 \times 10^{-8}$ - $8,51 \times 10^{-7}$	2,01	0,04

Таблица 4. Соединения, использованные для построения логистической регрессии, их коэффициенты β (условные единицы), доверительный интервал ДИ (условные единицы), критерий Вальда, вероятность отличия значения коэффициента ρ от нуля в режиме отрицательных ионов

Липиды	β	ДИ β	Критерий Вальда	ρ
Свободный член	3,71	-1,28–9,09	1,43	0,15
PC 16:0_22:5	$4,89 \times 10^{-7}$	$1,37 \times 10^{-7}$ – $9,45 \times 10^{-7}$	2,40	0,02
SM d22:0/20:3	$-1,05 \times 10^{-6}$	$-1,98 \times 10^{-6}$ – $2,52 \times 10^{-7}$	-2,42	0,02

[26]. Из липидов, определенных в диагностическую панель, только два соединения имеют статистически значимые различия в уровнях при метастазировании и при его отсутствии. Это связано с тем, что для создания диагностической панели использовали методы многомерного анализа, в которых учитывали связи липидов между собой. Использование данного метода для выбора маркеров оправдано с точки зрения применения модели к многокомпонентному пространству с неортогональными компонентами, которую представляет липидный профиль крови. Использование методов одномерного анализа позволяет оценить изменение липидного профиля с точки зрения дальнейшего исследования патофизиологии процесса метастазирования.

Выводы

В данном исследовании проведен анализ липидного профиля пациенток с раком молочной железы методом высокоэффективной хромато-масс-спектрометрии. Липиды, имеющие статистически значимые различия в уровнях, относились к окисленным липидам и сфингомиелинам. Липиды, вошедшие в состав диагностических панелей, преимущественно относились к классам сфингомиелинов и фосфатидилхолинов и характеризовались высоким уровнем ненасыщенности ацильных цепей и длиной (20–24 атома углерода). Полученную диагностическую модель можно использовать в дальнейших исследованиях, связанных с разработкой метода малоинвазивной диагностики метастазирования.

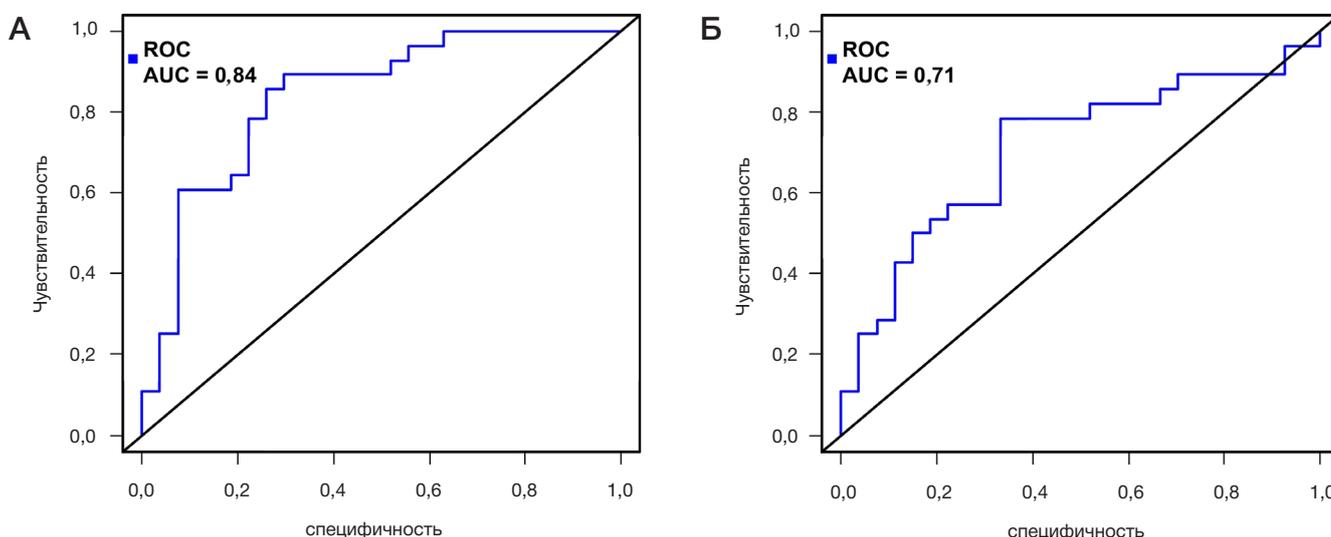


Рис. 2. Операционная кривая, построенная в ходе кросс-валидации диагностической модели в режиме положительных ионов (А) и в режиме отрицательных ионов (Б)

Литература

- Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3 (6): 453–8.
- Silberman AW, McVay C, Cohen JS, Altura JF, Brackert S, Sarna GP, et al. Comparative Morbidity of Axillary Lymph Node Dissection and the Sentinel Lymph Node Technique. *Ann Surg*. 2004; 240 (1): 1–6.
- Schrenk P, Rieger R, Shamiyeh A, Wayand W. Morbidity following sentinel lymph node biopsy versus axillary lymph node dissection for patients with breast carcinoma. *Cancer*. 2000; 88 (3): 608–14.
- Sukhikh GT, Sencha AN. Multiparametric ultrasound diagnosis of breast diseases. Cham: Springer, 2018.
- Zhou M, Lu B, Lv G, Tang Q, Zhu J, Li J, et al. Differential diagnosis between metastatic and non-metastatic lymph nodes using DW-MRI: a meta-analysis of diagnostic accuracy studies. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015; 141 (6): 1119–30.
- Wang T, Xiao S, Liu Y, Lin Z, Su N, Li X, et al. The efficacy of plasma biomarkers in early diagnosis of Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2014; 29 (7): 713–9.
- Lin YW, Lai HC, Lin CY, Chiou JY, Shui HA, Chang CC, et al. Plasma proteomic profiling for detecting and differentiating in situ and invasive carcinomas of the uterine cervix. *Int J Gynecol Cancer*. 2006; 16 (3): 1216–24.
- Zhong L, Coe SP, Stromberg AJ, Khattar NH, Jett JR, Hirschowitz EA. Profiling tumor-associated antibodies for early detection of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2006; 1 (6): 513–9.
- Schwarz KB, Rosensweig J, Sharma S, Jones L, Durant M, Potter C, et al. Plasma markers of platelet activation in cystic fibrosis liver and lung disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2003; 37 (2): 187–91.
- Langenskiöld M, Holmdahl L, Falk P, Ivarsson ML. Increased plasma MMP-2 protein expression in lymph node-positive patients with colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2005; 20 (3): 245–52.
- Chai YD, Zhang L, Yang Y, Su T. Discovery of potential serum protein biomarkers for lymph-node metastasis in oral cancer. *Head Neck*. 2015; 38 (1): 118–25.
- Yigitbasi T, Calibasi-Kocal G, Buyukuslu N, Kemal Atahan M,

- Kupeli H, Yigit S, et al. SELDI-TOF-MS Profiling of Metastatic Phenotype in Histopathological Subtypes of Breast Cancer. *Curr Proteomics*. 2018; 15 (3): 214–20.
13. Bandu R, Mok HJ, Kim KP. Phospholipids as cancer biomarkers: mass spectrometry-based analysis. *Mass Spectrom Rev*. 2016; 47 (3): 1–32.
 14. Chen X, Chen H, Dai M, Ai J, Li Y, Mahon B, et al. Plasma lipidomics profiling identified lipid biomarkers in distinguishing early-stage breast cancer from benign lesions. *Oncotarget*. 2016; 7 (24): 36622–31.
 15. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957; 226 (1): 497–509.
 16. Koelmel JP, Kroeger NM, Ulmer CZ, Bowden JA, Patterson RE, Cochran JA, et al. LipidMatch: An automated workflow for rule-based lipid identification using untargeted high-resolution tandem mass spectrometry data. *BMC Bioinformatics*. 2017; 18 (1): 1–11.
 17. R Development Core Team. A Language and Environment for Statistical Computing. R Found Stat Comput. 2019.
 18. R team. R Studio: Integrated Development for R. 2016.
 19. Galindo-Prieto B, Eriksson L, Trygg J. Variable influence on projection (VIP) for OPLS models and its applicability in multivariate time series analysis. *Chemom Intell Lab Syst*. 2015; 146: 297–304.
 20. Akaike H. A New Look at the Statistical Model Identification. *IEEE Trans Automat Contr*. 1974; 19 (6): 716–23.
 21. Miller YI, Shyy JYJ. Context-Dependent Role of Oxidized Lipids and Lipoproteins in Inflammation. *Trends Endocrinol Metab*. 2017; 28 (2): 143–52.
 22. Paynter NP, Balasubramanian R, Giulianini F, Wang DD, Tinker LF, Gopal S etc. Metabolic predictors of incident coronary heart disease in women. *Circulation*. 2018; 137 (8): 841–53.
 23. Ferreri C, Sansone A, Ferreri R, Amézaga J, Tueros I. Fatty acids and membrane lipidomics in oncology: A cross-road of nutritional, signaling and metabolic pathways. *Metabolites*. 2020; 10 (9): 1–26.
 24. Maan M, Peters JM, Dutta M, Patterson AD. Lipid metabolism and lipophagy in cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018; 504 (3): 582–9.
 25. Kus K, Kij A, Zakrzewska A, Jaształ A, Stojak M, Walczak M, et al. Alterations in arginine and energy metabolism, structural and signalling lipids in metastatic breast cancer in mice detected in plasma by targeted metabolomics and lipidomics. *Breast Cancer Res*. 2018; 20 (1): 1–13.
 26. Токарева А. О., Чаговец В. В., Родионов В. В., Кометова В. В., Родионова М. В., Стародубцева Н. Л. и др. Липидные маркеры метастатического поражения регионарных лимфоузлов у больных раком молочной железы. *Акушерство и гинекология*. 2020; 8: 133–40.

References

1. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3 (6): 453–8.
2. Silberman AW, McVay C, Cohen JS, Altura JF, Brackert S, Sarna GP, et al. Comparative Morbidity of Axillary Lymph Node Dissection and the Sentinel Lymph Node Technique. *Ann Surg*. 2004; 240 (1): 1–6.
3. Schrenk P, Rieger R, Shamiyeh A, Wayand W. Morbidity following sentinel lymph node biopsy versus axillary lymph node dissection for patients with breast carcinoma. *Cancer*. 2000; 88 (3): 608–14.
4. Sukhikh GT, Sencha AN. Multiparametric ultrasound diagnosis of breast diseases. *Cham: Springer*, 2018.
5. Zhou M, Lu B, Lv G, Tang Q, Zhu J, Li J, et al. Differential diagnosis between metastatic and non-metastatic lymph nodes using DW-MRI: a meta-analysis of diagnostic accuracy studies. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015; 141 (6): 1119–30.
6. Wang T, Xiao S, Liu Y, Lin Z, Su N, Li X, et al. The efficacy of plasma biomarkers in early diagnosis of Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2014; 29 (7): 713–9.
7. Lin YW, Lai HC, Lin CY, Chiou JY, Shui HA, Chang CC, et al. Plasma proteomic profiling for detecting and differentiating in situ and invasive carcinomas of the uterine cervix. *Int J Gynecol Cancer*. 2006; 16 (3): 1216–24.
8. Zhong L, Coe SP, Stromberg AJ, Khattar NH, Jett JR, Hirschowitz EA. Profiling tumor-associated antibodies for early detection of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2006; 1 (6): 513–9.
9. Schwarz KB, Rosensweig J, Sharma S, Jones L, Durant M, Potter C, et al. Plasma markers of platelet activation in cystic fibrosis liver and lung disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2003; 37 (2): 187–91.
10. Langenskiöld M, Holmdahl L, Falk P, Ivarsson ML. Increased plasma MMP-2 protein expression in lymph node-positive patients with colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2005; 20 (3): 245–52.
11. Chai YD, Zhang L, Yang Y, Su T. Discovery of potential serum protein biomarkers for lymph-node metastasis in oral cancer. *Head Neck*. 2015; 38 (1): 118–25.
12. Yigitbasi T, Calibas-Kocal G, Buyukuslu N, Kemal Atahan M, Kupeli H, Yigit S, et al. SELDI-TOF-MS Profiling of Metastatic Phenotype in Histopathological Subtypes of Breast Cancer. *Curr Proteomics*. 2018; 15 (3): 214–20.
13. Bandu R, Mok HJ, Kim KP. Phospholipids as cancer biomarkers: mass spectrometry-based analysis. *Mass Spectrom Rev*. 2016; 47 (3): 1–32.
14. Chen X, Chen H, Dai M, Ai J, Li Y, Mahon B, et al. Plasma lipidomics profiling identified lipid biomarkers in distinguishing early-stage breast cancer from benign lesions. *Oncotarget*. 2016; 7 (24): 36622–31.
15. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957; 226 (1): 497–509.
16. Koelmel JP, Kroeger NM, Ulmer CZ, Bowden JA, Patterson RE, Cochran JA, et al. LipidMatch: An automated workflow for rule-based lipid identification using untargeted high-resolution tandem mass spectrometry data. *BMC Bioinformatics*. 2017; 18 (1): 1–11.
17. R Development Core Team. A Language and Environment for Statistical Computing. R Found Stat Comput. 2019.
18. R team. R Studio: Integrated Development for R. 2016.
19. Galindo-Prieto B, Eriksson L, Trygg J. Variable influence on projection (VIP) for OPLS models and its applicability in multivariate time series analysis. *Chemom Intell Lab Syst*. 2015; 146: 297–304.
20. Akaike H. A New Look at the Statistical Model Identification. *IEEE Trans Automat Contr*. 1974; 19 (6): 716–23.
21. Miller YI, Shyy JYJ. Context-Dependent Role of Oxidized Lipids and Lipoproteins in Inflammation. *Trends Endocrinol Metab*. 2017; 28 (2): 143–52.
22. Paynter NP, Balasubramanian R, Giulianini F, Wang DD, Tinker LF, Gopal S etc. Metabolic predictors of incident coronary heart disease in women. *Circulation*. 2018; 137 (8): 841–53.
23. Ferreri C, Sansone A, Ferreri R, Amézaga J, Tueros I. Fatty acids and membrane lipidomics in oncology: A cross-road of nutritional, signaling and metabolic pathways. *Metabolites*. 2020; 10 (9): 1–26.
24. Maan M, Peters JM, Dutta M, Patterson AD. Lipid metabolism and lipophagy in cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018; 504 (3): 582–9.
25. Kus K, Kij A, Zakrzewska A, Jaształ A, Stojak M, Walczak M, et al. Alterations in arginine and energy metabolism, structural and signalling lipids in metastatic breast cancer in mice detected in plasma by targeted metabolomics and lipidomics. *Breast Cancer Res*. 2018; 20 (1): 1–13.
26. Tokareva AO, Chagovets VV, Rodionov VV, Kometova VV, Rodionova MV, Starodubtseva NL, i dr. Lipidnye markery metastaticheskogo porazheniya regionalnykh limfouzlov u bol'nykh rakom molochnoj zhelezy. *Akusherstvo i ginekologija*. 2020; 8: 133–40. Russia.