

ANALIZA LIPIDOMICZNA W DIAGNOSTYCE GUZÓW MÓZGU

LIPIDOMIC ANALYSIS IN BRAIN TUMOR DIAGNOSIS

**Joanna Bogusiewicz¹, Katarzyna Burlikowska¹,
Bogumiła Kupcewicz², Kamil Łuczykowski¹, Karol
Jarocho¹, Paulina Zofia Goryńska¹, Krzysztof Goryński¹,
Marcin Birski⁴, Jacek Furtak^{3,4}, Dariusz Paczkowski^{4,5},
Marek Harat^{3,4}, Janusz Pawliszyn⁶, Barbara Bojko^{1*}**

¹*Katedra Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu*

²*Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu*

³*Wydział Medyczny, Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich*

⁴*Klinika Neurochirurgii, 10 Wojskowy Szpital Kliniczny z Polikliniką w Bydgoszczy*

⁵*Klinika Neurochirurgii i Neurologii, Szpital Uniwersytecki nr 2 im dr. Jana Biziela w Bydgoszczy*

⁶*Wydział Chemii, Uniwersytet w Waterloo, Ontario, Kanada*

**e-mail: bbojko@cm.umk.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

Przestrzenne profilowanie ludzkiej tkanki mózgowej in vivo

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

Dr Joanna Bogusiewicz – absolwentka analityki medycznej na Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Aktualnie pracownik Katedry Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej tejże uczelni. Tytuł doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne uzyskała w 2023r. Zainteresowania naukowe obejmują opracowywanie nowych protokołów analitycznych opartych o mikroekstrakcję do fazy stałej do analizy próbek biologicznych w celu poszukiwania metabolitów mogących pełnić rolę biomarkerów w neuroonkologii.



 <https://orcid.org/0000-0003-4429-6854>

Dr inż. Katarzyna Burlikowska – absolwentka Wydziału Zootechnicznego Akademii Techniczno-Rolniczej w Bydgoszczy (obecnie Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich). Stopień doktora nauk rolniczych uzyskała w 2005. Od 2017 roku kieruje Zwierzętnią należącą do Katedry Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum w Bydgoszczy UMK w Toruniu.



 <https://orcid.org/0000-0001-8030-6226>

Dr hab. Bogumiła Kupcewicz, prof. UMK – absolwentka chemii na UMK w Toruniu, uzyskała tytuł doktora i doktora habilitowanego nauk farmaceutycznych na Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Od 2002 r. pracuje na Wydziale Farmaceutycznym, a od 2019 pełni funkcję kierownika Katedry Chemii Nieorganicznej i Analitycznej. Jej zainteresowania naukowe to m. in. wykorzystanie metod statystycznych i chemometrycznych w analizie danych uzyskanych w badaniach metabolomicznych i lipidomicznych m.in. guzów mózgu czy endometriozy, oraz badania zależności jakościowych i ilościowych struktura-aktywność biologiczna (SAR i QSAR) oraz struktura-właściwości fizykochemiczne (QSPR) związków z różnych grup chemicznych.



 <https://orcid.org/0000-0002-4480-7338>

Mgr Kamil Łuczykowski - absolwent Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu na kierunku analityka medyczna. Aktualnie pracownik Katedry Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej CM UMK. Zainteresowania naukowe obejmują opracowywanie nowych protokołów analitycznych opartych na mikroekstrakcji do fazy stałej do analizy próbek biologicznych w celu poszukiwania metabolitów mogących pełnić rolę biomarkerów oceny jakości organów przeznaczonych transplantacji



 <https://orcid.org/0000-0001-7254-0864>

Dr hab. Karol Jaroń, prof. UMK - absolwent Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu na kierunkach Farmacja oraz Biotechnologia Medyczna. Aktualnie pracownik Katedry Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej CM UMK. Zainteresowania naukowe obejmują stosowanie technik mikroekstrakcyjnych, głównie mikroekstrakcji do fazy stałej, w analizie hodowli komórkowych *in vitro* oraz badania cytotoksyczności nowych związków o potencjale przeciwnowotworowym.



 <https://orcid.org/0000-0003-0189-2509>

Dr Marcin Birski – absolwent Wojskowej Akademii Medycznej w Łodzi. Obecnie ordynator w Klinice Neurochirurgii 10 Wojskowego Szpitala Klinicznego w Bydgoszczy. Zainteresowania naukowe obejmują głównie małoinwazyjne metody diagnostyki i leczenia chorób mózgu oraz choroby naczyń mózgu.



<https://orcid.org/0000-0001-6011-7559>

Dr hab. Jacek Furtak, prof. PBS – absolwent Wojskowej Akademii Medycznej w Łodzi. Aktualnie Kierownik Kliniki Neurochirurgii 10 Wojskowego Szpitala Klinicznego w Bydgoszczy. Zainteresowania naukowe obejmują głównie neuroonkologię i aspekty genetyczne chorób nowotworowych mózgu.



<https://orcid.org/0000-0001-9599-4156>

Dr Dariusz Paczkowski – Ordynator Oddziału Neurochirurgii Dziecięcej w Wojewódzkim Szpitalu Dziecięcym w Bydgoszczy. Wieloletni pracownik Kliniki Neurochirurgii 10 Wojskowego Szpitala Klinicznego z Polikliniką w Bydgoszczy.

Prof. dr hab. Marek Harat – neurochirurg, wieloletni kierownik Kliniki Neurochirurgii 10 Wojskowego Szpitala Klinicznego z Polikliniką w Bydgoszczy. Głównie zainteresowania badawcze Profesora Harata dotyczą neuroonkologii i neurochirurgii funkcjonalnej. W neuroonkologii ostatnie publikacje związane są z diagnostyką glejaka wielopostaciowego na podstawie skanowania PET.



<https://orcid.org/0000-0002-4043-2567>

Prof. Janusz Pawliszyn – absolwent Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej. Profesor Pawliszyn jest twórcą techniki mikroekstracji do fazy stałej oraz jest liderem grupy naukowej na Uniwersytecie Waterloo w Waterloo, Ontario w Kanadzie. Zainteresowania badawcze Profesora Pawliszyna związane są z ulepszeniem technologii opartych o mikroekstrakcję do fazy stałej, poszerzeniem portfolio jej zastosowań a także rozwojem ekologicznych rozwiązań analitycznych na etapie preparatyki oraz analizy próbki.

Prof. dr hab. Barbara Bojko - absolwentka analityki medycznej na Śląskim Uniwersytecie Medycznym i wieloletni pracownik tej uczelni. W latach 2009-2015 związana z University of Waterloo w Kanadzie, gdzie pracowała w grupie prof. Janusza Pawliszyna. Po powrocie do Polski została kierownikiem Katedry Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej CM UMK. Praca naukowa Profesor Bojko związana jest przede wszystkim z aplikacją metod mikroekstrakcyjnych w diagnostyce medycznej i badaniach biomedycznych.



<https://orcid.org/0000-0003-3971-9816>

ABSTRACT

Fast and accurate diagnosis of brain tumors is a critical step in effective patient therapy. However, challenges arise due to the complex anatomy of the brain and the late manifestation of symptoms, making diagnosis often difficult. Therefore, interdisciplinary research at the intersection of analytical chemistry, medical diagnostics, and chemical engineering is essential to develop new diagnostic approaches that facilitate the analysis of neoplastic changes in the brain. One of many promising technologies is solid-phase microextraction (SPME), also known as chemical biopsy. This method allows for the extraction of compounds from biological samples and solid ones such as tumors. However, selecting potential biomarkers is equally important to developing and optimizing appropriate analytical tools. Lipids have recently gained attention for their significant roles in cancer processes. Thus, the applicability of SPME probes in the analysis of brain tumor lipidome was assessed.

Chemical biopsy was used in the analysis of brain tumors, revealing that the lipidomic profiles of benign meningiomas significantly differed from those obtained from malignant lesions, such as gliomas. Furthermore, it was proven that sampling using the SPME probe was reliable. Studies focusing on gliomas demonstrated that the lipidome of these brain tumors varied depending on the grade of malignancy and the status of IDH1/2 mutations. Moreover, it was also proven that acylcarnitines, which take part in lipid oxidation, were altered. Their content in neoplastic tissue increased along with a worse clinical prognosis, specifically in lesions with a higher degree of malignancy and in samples without mutations in the IDH1/2 gene.

It was also reported that SPME probes could be a helpful method for probing brain during neurosurgical procedures from two brain structures in replicates simultaneously. As a result, extracting a set of metabolites with a wide range of physicochemical properties was possible. Most of them were lipids with interesting patterns in studied structures. However, due to the small cohort of patients and high diversity of samples, a detailed discussion on the biological role and implications to the spatial distribution was not conducted.

To sum up, solid-phase microextraction probes were useful in brain tumors lipidomic and acylcarnitine profiling of meningiomas and gliomas, considering malignancy degree and genotype. It has also been observed that chemical biopsy can serve as a valuable tool in *in vivo* brain research, indicating future directions for studies of brain tumors during neurosurgical procedures.

Keywords: solid-phase microextraction, brain tumor, diagnostics, lipidomics, mass spectrometry

Słowa kluczowe: mikroekstrakcja do fazy stałej, guz mózgu, diagnostyka, lipidomika, spektrometria mas

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

CACT	– <i>ang. Carnitine-acylcarnitine translocase</i> , Translokaza karnityno-acylokarnitynowa
CBS-MS	– <i>ang. Coated blade spray mass spectrometry</i>
CPT	– <i>ang. Carnitine palmitoyltransferase</i> , Palmitoilotransferaza karnitynowa
CT	– <i>ang. Computed tomography</i> Tomografia komputerowa
DESI-MS	– <i>ang. Desorption electrospray ionization mass spectrometry</i> , Desorpcyjna jonizacja przez elektrorozpylanie połączona ze spektrometrią mas
ESI	– <i>ang. Electrospray Ionization</i> , Jonizacja przez elektrorozpylenie
FA	– <i>ang. Fatty acids</i> , Kwasy tłuszczowe
FAO	– <i>ang. Fatty acids oxidation</i> , Utlenianie kwasów tłuszczowych
HGG	– <i>ang. High grade glioma</i> , Wysoko-złośliwy glejak
HILIC	– <i>ang. Hydrophilic interaction liquid chromatography</i> , Chromatografia oddziaływań hydrofiliowych
HLB	– <i>ang. Hydrophilic-lipophilic balance</i> , Równowaga hydrofilowo-lipofilowa
HRMS	– <i>ang. High resolution mass spectrometry</i> , Wysokorozdzielcza spektrometria mas
IDH	– <i>ang. Isocitrate dehydrogenase</i> , Dehydrogenaza izocytrynianowa
IDHm	– <i>ang. IDH mutant</i> , Mutacja w IDH
IDHw	– <i>ang. IDH wildtype</i> , IDH typu dzikiego
LC	– <i>ang. Liquid chromatography</i> Chromatografia cieczowa
LCAC	– <i>ang. Long chains acylcarnitines</i> , Acylokarnityny o długim łańcuchu acylowym
LCAD	– <i>ang. Long-chain acylcarnitines dehydrogenase</i> , Dehydrogenaza długołańcuchowych acylo-coA
LGG	– <i>ang. Low grade glioma</i> , Nisko-złośliwy glejak
LPC	– <i>ang. Lysophosphatidylcholine</i> , Lisofofosfatydylocholina
MOI-MS	– <i>ang. Microfluidic open interface mass spectrometry</i>
MRI	– <i>ang. Magnetic resonance imaging</i> , Obrazowanie rezonansem magnetycznym
MS	– <i>ang. Mass spectrometry</i> , Spektrometria mas
PC	– <i>ang. Glycerophosphocholine</i> , Fosfatydylocholina
PE	– <i>ang. Glycerophosphoethanolamine</i> , Fosfatydyloetanolamina
PET	– <i>ang. Positron emission tomography</i> , Pozytonowa tomografia emisyjna
PG	– <i>ang. Glycerophosphoglycerol</i> , Fosfatydyloglicerol
PS	– <i>ang. Glycerophosphoserine</i> , Fosfatydyloseryna
REIMS	– <i>ang. Rapid evaporative ionization mass spectrometry</i> , Szybka ewaporacyjno-jonizacyjna spektrometria mas
RPLC	– <i>ang. Reversed phase liquid chromatography</i> , Chromatografia odwróconych faz
SCAC	– <i>ang. Short acylcarnitine chains</i> Acylokarnityny o krótkim łańcuchu acylowym
SPME	– <i>ang. Solid phase microextraction</i> , Mikroekstrakcja do fazy stałej
WHO	– <i>ang. World Health Organization</i> , Światowa Organizacja Zdrowia

WPROWADZENIE

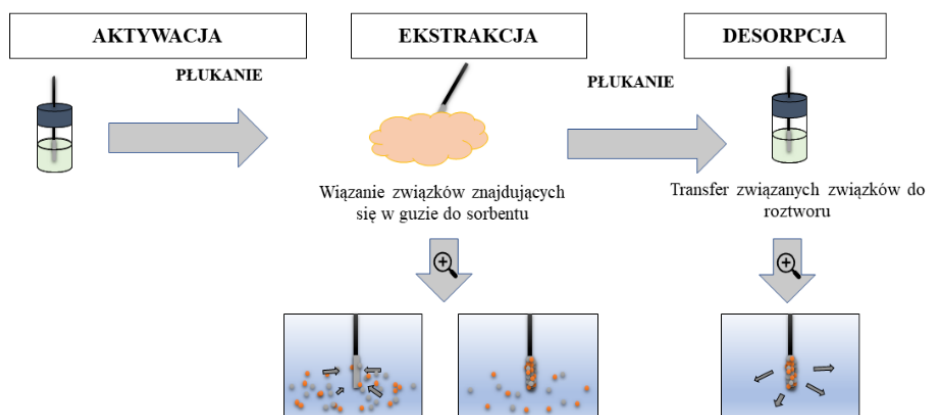
Złośliwe pierwotne guzy mózgu są zmianami nowotworowymi o jednym z najwyższych współczynników śmiertelności [1]. Większość z nich jest sklasyfikowana jako glejaki, wśród których wyróżnia się wiele podtypów różnicowanych na podstawie badań histopatologicznych oraz występowania zmian genetycznych, takich jak mutacja w genie kodującym dehydrogenazę izocytrynianową 1/2 (IDH1/2) lub kodelecja chromosomu 1p/19q [2]. Leczenie guzów mózgu w większości przypadków opiera się na usunięciu zmiany nowotworowej z odpowiednimi marginesami. Podejście to często jest uzupełniane chemio- i/lub radioterapią. Rokowanie kliniczne pacjenta różni się w zależności od typu guza i stopnia jego złośliwości, jeśli jednak u pacjenta występuje glejak wielopostaciowy to czas przeżycia pacjenta wynosi kilka-kilkanaście miesięcy [3,4]. Niski współczynnik przeżycia i wysoki odsetek nawrotów są bezpośrednio związane z brakiem skutecznych metod diagnostycznych [5]. Wczesne wykrycie guzów mózgu stanowi wyzwanie ze względu na niespecyficzne objawy choroby oraz ich późną manifestację. W związku z tym ważne jest zbadanie nowych możliwości oferowanych przez badania translacyjne, które łączą medycynę, chemię analityczną i inżynierię chemiczną.

Zastosowanie „nauk omicznych”, takich jak genomika, metabolomika i lipidomika, może zapewnić użyteczne narzędzie do określania biomarkerów, które potencjalnie pomoże w wyborze i monitorowaniu zastosowanego podejścia terapeutycznego [6]. Lipidomika zajmuje się badaniem profilu lipidów, ich interakcji oraz funkcji w komórkach i tkankach [7]. Związki lipidowe pełnią różne istotne funkcje w komórce, tkance, organizmie, które mogą zmieniać się w trakcie karcynogenezy [7,8]. Do analizy tych zmian wykorzystywane są różnorodne platformy analityczne, w tym techniki oparte o spektrometrię mas, która umożliwia ich identyfikację. Należy jednak zauważyć, że próbki stałe, takie jak tkanki, wymagają odpowiedniego przygotowania przed analizą, co zazwyczaj wiąże się z procesami homogenizacji i ekstrakcji analitów z próbki badanej [9]. Te procedury są nie tylko czasochłonne, ale również utrudniają dalsze badania ze względu na trwałą modyfikację pobranego materiału biologicznego. W odpowiedzi na te wyzwania naukowcy pracują nad nowymi metodami, które eliminują konieczność homogenizacji [9]. Jedną z proponowanych technologii jest mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME), która w rzeczywistości umożliwia analizę tkanek bez wcześniejszego przygotowania.

Sonda SPME składa się z sorbentu opłaszczonego na najczęściej tytanowo-niklowym włóknie. Średnica sondy wynosi około 200 µm, co czyni ją znacznie cieńszą od klasycznej igły do biopsji mózgu (ok. 1,8 mm) [10–12]. Zasada metody SPME opiera się na interakcji między analitami znajdującymi się w próbce a sorbentem aż do ustalenia się stanu równowagi, a czas ten jest różny w zależności od właściwości fizykochemicznych badanych analitów (Rys. 1). W przypadku badań biomedycznych optymalizacja czasu ekstrakcji powinna stanowić kompromis pomiędzy możliwym do zastosowania czasem a wydajnością ekstrakcji. W badaniach biomedycznych istotne jest także, że pobranie analitów z wykorzystaniem sond SPME nie powoduje zużycia próbki stąd też technika ta nazywana jest „biopsją chemiczną” [13]. Oprócz minimalnej inwazyjności podczas pobierania próbek, włókna SPME oferują kilka innych kluczowych

cech, które są przydatne w aplikacjach biomedycznych. Po pierwsze, biopsja chemiczna jest metodą niezubożającą, co oznacza, że w danych warunkach pobiera się tylko nieznaczną część wolnej frakcji analitów dzięki czemu nie dochodzi do zaburzenia szlaków metabolicznych w badanej tkance i możliwe jest wielokrotne pobieranie próbek w punktach czasowych [13]. Dodatkowo poprzez oddziaływanie analitu z sorbentem zahamowywany zostaje udział danego związku w przemianach biochemicznych regulowanych przez enzymy tkankowe, co umożliwia analizę nawet niestabilnych substancji [14]. Zwrócić uwagę także należy, że protokół biopsji chemicznej jest prosty i szybki. Podczas pobierania próbek sondę wprowadza się bezpośrednio do tkanki/narządu na określony czas, a następnie płucze wodą, aby usunąć potencjalne resztki tkanki lub płynów biologicznych, które mogą być niespecyficycznie związane z sorbentem. Sondę można następnie przetransportować do laboratorium i przechowywać lub bezpośrednio poddać analizie instrumentalnej [10,15].

Opierając się o role lipidów w kancerogenezie oraz o doniesienia dotyczące aplikacji sond SPME w diagnostyce guzów mózgu celem niniejszego przeglądu literatury jest ocena użyteczności sond mikroekstrakcyjnych w lipidomicznej diagnostyce guzów mózgu.



Rysunek 1. Protokół mikroekstrakcji do fazy stałej.

Figure 1. Protocol of solid-phase microextraction.

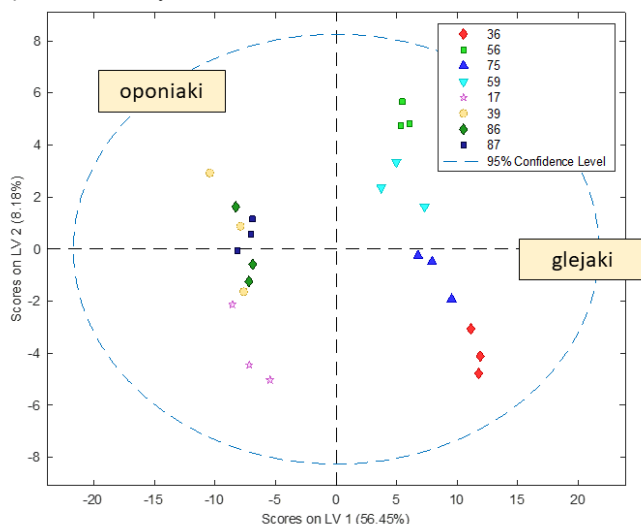
1. ANALIZA LIPIDOMU GUZÓW MÓZGU

Opracowanie szybkiej i precyzyjnej metody śródoperacyjnej do różnicowania zmian nowotworowych wciąż stanowi wyzwanie w medycynie laboratoryjnej. Kluczowe jest znalezienie i optymalizacja prostej oraz skutecznej platformy analitycznej, która umożliwi wybór związków charakterystycznych dla konkretnego rodzaju guza, jego stopnia złośliwości oraz genotypu [5]. Sondy SPME zostały zaproponowane jako przydatne narzędzie w profilowaniu metabolomicznym jak i lipidomicznym [16,17]. Ze względu na udział lipidów w wielu procesach biochemicznych dotyczących sygnalizacji komórkowej, funkcjonalności błony komórkowej, zapotrzebowania energetycznego szczególna uwaga została poświęcona tym związkom [7,17].

Analizę lipidomiczną guzów mózgu z wykorzystaniem sond SPME raportowała Bogusiewicz i wsp. [17] Analizę instrumentalną przeprowadzono przy użyciu chromato-

grafii cieczerwowej połączonej z wysokorozdzielczą spektrometrią mas (LC-HRMS). W pierwszym etapie wykonano eksperyment, który miał na celu ocenę wiarygodności poboru próbek z heterogennej tkanki nowotworowej oraz przydatności zaproponowanej platformy analitycznej do różnicowania histologicznie różnych guzów, takich jak oponiaki i glejaki. Następnie przeprowadzono szczegółową analizę glejaków, koncentrując się na profilach lipidomicznych tych zmian w kontekście stopnia złośliwości, statusu mutacji w genie IDH1/2 oraz obecności kodelecji 1p/19q.

Zmiany nowotworowe charakteryzują się dużym zróżnicowaniem zarówno międzyosobniczym jak i wewnątrz guza na wielu poziomach, np. histologicznym, metabolomicznym, epigenetycznym [4]. Heterogenność ta stanowi poważny problem w badaniach, w których analizowane są jedynie niewielkie fragmenty zmian, co może wpływać na wiarygodność uzyskanych wyników i małą reprezentatywność wyniku. W związku z tym Bogusiewicz i wsp. podjęli się weryfikacji analiz wykonanych z wykorzystaniem sond SPME, które mają średnicę zaledwie 200 μm i pozwalają na ekstrakcję analitów z wybranego, ograniczonego obszaru wokół włókna. Wprowadzono po 3 sondy do 8 guzów mózgu – 4 oponiaków i 4 glejaków [17]. Zaobserwowano, że profile lipidowe pobrane z danej zmiany są podobne i grupują się w zestawy odpowiadające określonej typowi guza (Rys.2). Wyniki te sugerują, że uzyskany profil lipidowy z włókien wprowadzonych do konkretnego guza jest charakterystyczny dla tej zmiany, a profile analitów pobrane z danego guza wykazują ze sobą korelację. Wybór sondy z odpowiednio długim sorbentem, np. 7 mm wydaje się zatem korzystny do ekstrakcji związków z całej zmiany, co pozwala na uzyskanie uśrednionego profilu lipidomicznego. Dodatkowo należy wspomnieć, że w razie konieczności długość sorbentu na sondzie można dopasować do celu badania – długie pokrycie w ocenie uśrednionego lipidomu całej zmiany, a krótsze, gdy celem jest ocena składu lipidowego w różnych częściach zmiany.



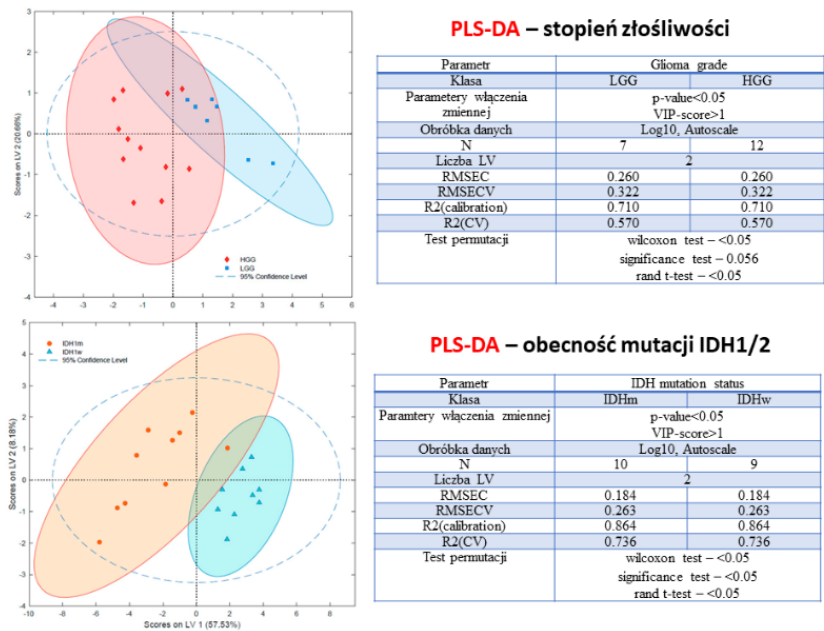
Rysunek 2. PCA dla oponiaków i glejaków z których pobierane były próbki w teście oceny wiarygodności wyników [17].

Figure 2. PCA for meningiomas and gliomas sampled in the outcome assessment test [17].

W pierwszej kolejności w celu przetestowania badanej platformy analitycznej do różnicowania tkanek idealnym byłoby różnicowanie tkanki zdrowej i nowotworowo zmienionej. Niestety ze względu na brak możliwości wycięcia zdrowej tkanki z mózgu pacjenta wstępne badania przedstawione przez Bogusiewicz i wsp. [17] opierały się o różnicowanie histologicznie różnych zmian: łagodnych oponiaków i złośliwych glejaków. Zaobserwowano, że lipidomy tych zmian nowotworowych różnił się co sugeruje, że testowana platforma analityczna może być użyteczna w ocenie guzów mózgu.

Prowadząc szczegółowe badania glejaków Bogusiewicz i wsp. [17] zaobserwowali, że guzy o różnym stopniu złośliwości posiadały różne profile lipidomiczne (Ryc. 3). Lizofosfolipidy (LPC), takie jak LPC P-16:0, LPC P-18:0 oraz LPC 18:2, były obecne w glejakach wysokozłośliwych (HGG) w ponad dwukrotnie wyższej ilości niż w glejakach niskozłośliwych (LGG). Zauważono również, że ilość SM 42:1;O2 była mniejsza w bardziej złośliwych zmianach. Analizy chemometryczne pozwoliły na wyselekcjonowanie tylko czterech potencjalnych związków lipidowych, z czego dla dwóch z nich udało się potwierdzić strukturę podczas fragmentacji (analiza MS/MS). Wśród tych związków znalazł się LPC P-16:0, którego poziom w HGG był dwa razy wyższy niż w LGG, oraz SM 42:1;O2, który był niższy w bardziej złośliwych zmianach. We wspomnianym doniesieniu na temat analizy lipidomicznej guzów mózgu raportowano także zróżnicowanie lipidomów glejaków o różnym statusie mutacji IDH1/2 (Ryc.3). Guzy bez mutacji charakteryzowały się znacznie zwiększoną ilością lizofosfolipidów niższym poziomem fosfatydylocholin (np. PC 32:1, PC 32:0, PC 36:1). Istotne było również to, że poziom fosfatydyloetanolamin był niższy w próbkach bez mutacji w genie IDH1/2 (IDHw) w porównaniu do tych z obecnością mutacji (IDHm). Sfingolipidy nie wykazywały większych zmian w zależności od statusu mutacji IDH1/2, jedynie SM 43:4;O2 oraz LacCer 42:2;O2 były obecne w wyższych stężeniach w próbkach bez mutacji IDH1/2. Dodatkowo, w analizie chemometrycznej udało się wyselekcjonować zestaw 16 potencjalnych związków lipidowych, które mogą być użyte do różnicowania glejaków na podstawie statusu mutacji IDH 1/2. Nie wykazano natomiast, aby profile lipidowe guzów mózgu o różnych statusach kodekcji 1p/19q różniły się analizach chemometrycznych. Parametry walidacyjne dla takiego modelu były niesatysfakcjonujące. W związku z tym nie uzyskano zestawu lipidów, który umożliwiłby dyskryminację guzów w zależności od statusu kodekcji 1p/19q.

Podsumowując, mimo ograniczonej grupy badanej, zauważono, że zarówno stopień złośliwości, jak i status mutacji IDH1/2 mogą wpływać na zmiany lipidomu guzów mózgu. Biopsja chemiczna może zatem być użytecznym narzędziem w ocenie tych zmian.



Rysunek 3. PLS-DA oraz parametry jego walidacji dla lipidomów glejaków o różnym stopniu złośliwości oraz statusie mutacji IDH1/2 (na podstawie [17])

Figure 3. PLS-DA and its validation parameters for glioma lipidomes with different malignancy grades and IDH1/2 mutation status (adapted from [17])

2. ANALIZA PROFILU ACYLOKARNITYN GUZÓW MÓZGU

Rozwój procesu nowotworowego wiąże się ze zwiększonym zapotrzebowaniem energetycznym komórek. W związku z tym wraz z rozwojem nowotworu dojść musi do zmian adaptacyjnych w szlakach metabolicznych aby dopasować je do zmieniającego się mikrośrodowiska [18]. Szeroko raportowaną modyfikacją metabolizmu jest efekt Warburga, polegający na nasilonej glikolizie w wyniku której dochodzi do wzrostu produkcji mleczanu nawet w warunkach tlenowych [19]. Najnowsze badania sugerują jednak, że zmiany w procesie utleniania kwasów tłuszczowych (FAO) mogą również odgrywać istotną rolę w gospodarce energetycznej komórek nowotworowych [19,20]. Oksydacja kwasów tłuszczowych regulowana jest przez enzymy odpowiedzialne za transport łańcuchów acylowych w mitochondriach, do białek tych zalicza się translokazę karnityno-acylokarnitinową (CACT), palmitoilottransferazę karnitynową 1 (CPT-1), palmitoilottransferazę karnitynową 2 (CPT-2) oraz dehydrogenazę długołańcuchowych acylo-CoA (LCAD) [19]. Aktywność i funkcje tych białek w nowotworach były szeroko badane, brakuje jednak nadal danych na temat profilowania metabolitów powstających w trakcie oksydacji lipidów czyli acylokarnityn [19].

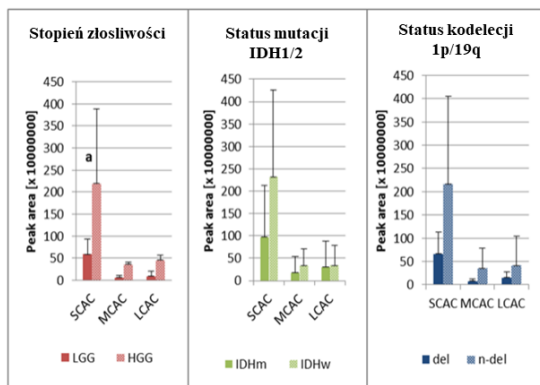
Badania przedstawione przez Bogusiewicz i wsp. [21] wykazały, że zastosowanie mikroekstrakcji do fazy stałej w połączeniu z platformą LC-HRMS umożliwiło wyekstrahowanie i analizę karnityny oraz jej 22 estrów. Acylokarnityny o

krótkim łańcuchu acylowym (SCAC) oraz acylokarnityny o długim łańcuchu acylowym (LCAC) utworzyły wyraźnie oddzielone klastry korelacji. Autorzy badań sugerują, że może to wskazywać na różne poziomy zależności od enzymów transportujących acylokarnityny w błonach mitochondrium. Związki o długim łańcuchu acylowym są ściśle uzależnione od aktywności m.in. CPT, CACT, LCAD, podczas gdy SCAC mogą być częściowo transportowane niezależnie od nich[20].

Zaprezentowane przez Bogusiewicz i wsp. [21] wyniki analizy statystycznej wykazały istotnie różne ($p<0,05$) poziomy AC C3:0, AC C9:0, AC C10:1, AC C14:2 oraz AC C20:3 między glejakami o wysokim stopniu złośliwości (HGG) a glejakami o niskim stopniu złośliwości (LGG), przy czym wartości pola powierzchni pod pikiem były ponad dwukrotnie wyższe dla guzów o wyższej złośliwości (Rys 4.). Dodatkowo, wyniki wykazały wyższy poziom AC C12:0 w próbkach IDHw w porównaniu do próbek z mutacją w IDH1/2, a także niższy poziom AC C16:1 (Rys 4.). Zaobserwowano, że powierzchnia piku dla AC C16:1 w próbkach bez kodekcji 1p/19q (n-del) była prawie dwukrotnie mniejsza ($p<0,05$) niż w próbkach z tą aberracją chromosomalną (del) (Rys 4.).

Wyniki te sugerują, że ilości karnityny i acylokarnityn były zazwyczaj wyższe w guzach o wyższym stopniu złośliwości lub u pacjentów z gorszym rokowaniem klinicznym (np. pacjenci bez mutacji w genie IDH1/2).

Wykres poziomów grup acylokarnityn



AC	HGG: LGG	IDHw: IDHm	N-del: del
Wolna karnityna	4,21 ^a	3,91 ^b	3,37
AC C2:0	0,87	0,97	0,93
AC C3:0	2,89 ^a	1,68	1,68
AC C4:0	0,85	0,94	0,84
AC C5:1	0,95	0,78	0,83
AC C5:0	1,38	1,00	1,22
AC C6:0	0,66	0,91	1,11
AC C8:0	1,20	1,04	0,95
AC C9:0	29,98 ^a	2,12	1,37
AC C10:1	3,86 ^a	1,18	0,74
AC C10:0	1,53	1,09	0,93
AC C12:1	1,50	1,56	0,99
AC C12:0	1,34	1,66 ^b	1,22
AC C14:2	2,72 ^a	1,94	1,33
AC C14:1	1,06	1,19	1,02
AC C14:0	0,89	1,08	0,96
AC C16:1	0,82	0,60 ^b	0,59 ^c
AC C16:0	0,92	0,96	1,06
AC C18:2	1,05	0,79	0,86
AC C18:1	0,87	0,79	1,00
AC C20:4	2,43	1,77	1,73
AC C20:3	13,89 ^a	2,87	2,17
AC C20:1	0,71	1,25	11,19

Rysunek 4. Wykresy poziomów grup acylokarnityn oraz tabela współczynników dla poszczególnych acylokarnityn w guzach o różnym stopniu złośliwości, statusie mutacji IDH1/2 oraz kodekcji 1p/19q. średnia znormalizowana powierzchnia piku jest statystycznie istotna ($p<0,05$) dla porównia ^a LGG i HGG, ^b IDHw i IDHm, ^c n-del i del. (na podstawie [21])

Figure 4. Graphs of acylcarnitine group levels and a table of coefficients for individual acylcarnitines in tumors with different degrees of malignancy, IDH1/2 mutation status, and 1p/19q codeletion. The average normalized peak area is statistically significant ($p<0,05$) for comparing ^a LGG and HGG, ^b IDHw and IDHm, ^c n-del and del. (adapted from [21]).

Biochemiczna interpretacja uzyskanych danych jest jednak obarczona niepewnością, wynikającą z małej grupy badanej, dużej heterogenności wyników oraz braku możliwości odniesienia do danych uzyskanych metodami referencyjnymi (np.

immunochemia do oceny aktywności enzymatycznej). Mimo tych ograniczeń, przedstawione badania stanowią podstawę do wnioskowania, że dalsza, ukierunkowana analiza ilościowa acylokarnityn, wykorzystująca proponowany protokół pobierania próbek SPME oraz metodę LC-HRMS, jest uzasadniona i może stanowić cenne uzupełnienie innych testów stosowanych do oceny metabolizmu kwasów tłuszczowych.

3. PRZESTRZENNE PROFILOWANIE LUDZKIEJ TKANKI MÓZGOWEJ *IN VIVO*

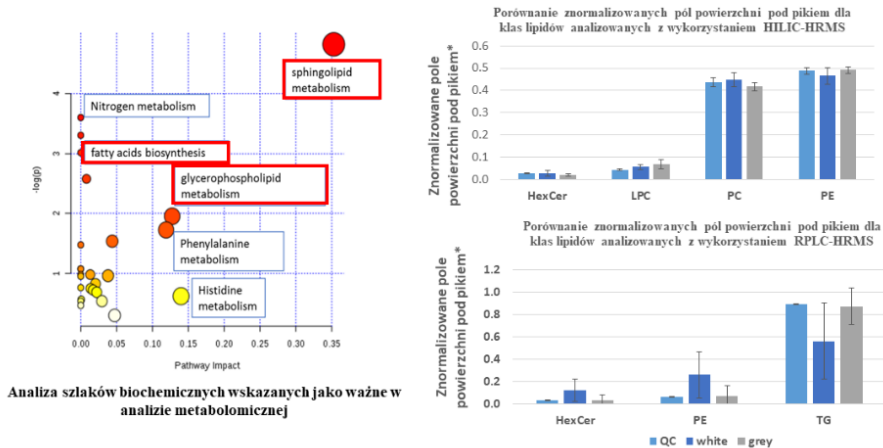
W praktyce klinicznej podstawowym narzędziem wykorzystywanym w diagnostyce guzów mózgu są techniki obrazowania, które jednak dostarczają ograniczonych informacji o składzie chemicznym. Wykonywanie analiz biochemicznych mózgu przyżyciowo, zwłaszcza u ludzi, jest niezwykle trudne z uwagi na ograniczony dostęp do tego narządu a także fakt, że nawet najmniejsze uszkodzenie może powodować zaburzenie złożonych funkcji istotnych dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Rozwój nowych technologii, szczególnie platform opartych o spektrometrię mas poszerzył możliwości diagnostyczne w neuroonkologii [9]. Jedną z takich technik jest mikroekstrakcja do fazy stałej. Opierając się na wcześniej przeprowadzonych badaniach *ex vivo* i *in vivo* na mózgach zwierząt, które wykazały bezpieczeństwo i wysoką użyteczność biopsji chemicznej postanowiono przetestować tę technologię w warunkach szpitalnych, u ludzi, w trakcie zabiegu neurochirurgicznego [13,14,22,23].

Doniesienia opublikowane przez Bogusiewicz i wsp. [13], według najlepszej wiedzy autorów, przedstawiają pierwszą aplikację SPME w badaniach przyżyciowych ludzkiego mózgu. W celu osiągnięcia kompromisu między potrzebami analitycznymi a użytecznością w trakcie zabiegu neurochirurgicznego zastosowane zostały modyfikacje sond mikroekstrakcyjnych. Newralgicznym aspektem był czas ekstrakcji związków, który musiał być wystarczająco długi, aby zapewnić odpowiednią czułość i jakość danych, a jednocześnie na tyle krótki, by był bezpieczny i komfortowy dla pacjenta. Długość fazy ekstrakcyjnej na sondzie również miała znaczenie; większa powierzchnia sorpcyjna (dłuższa faza sorpcyjna) prowadziła do lepszego odzysku metabolitów. W związku z tym, w celu zwiększenia powierzchni sorpcyjnej, połączono cztery włókna, z których dwa były umiejscowione na innej wysokości niż pozostałe. Taka budowa sondy ma umożliwić w przyszłości jednoczesną analizę tkanki zdrowej i chorobowo zmienionej. Ze względu jednak na duże zróżnicowanie tkanki guzowej, testy Bogusiewicz i wsp. [13] zostały przeprowadzone na tkance zdrowej. Podjęto się bowiem różnicowania istoty białej i szarej mózgu. W tym celu zastosowano cztery 3 mm włókna, które wprowadzono wzdłuż zaplanowanej trajektorii igły biopsyjnej aby nie wprowadzać dodatkowych uszkodzeń i pozostawiono je w tkance na 4 min.

Nicelowana analiza metabolomiczna i lipidomiczna wykazała, że badane struktury mózgowia składały się głównie ze związków lipidowych (Rys. 5). Zaobserwowano także większe ilości lipidów w istocie białej. Ze względu jednak na małą grupę badaną analiza zmian biochemicznych i różnic między istotami nie została przeprowadzona. Interesującym jednak jest fakt, że biopsja chemiczna z powodzeniem została zastosowana do przestrzennej charakterystyki metabolomicznej ludzkiego mózgu *in vivo* przy użyciu szybkiej i mało inwazyjnej metody. Proponowana metoda nie zakłóca

rutynowych procedur medycznych, takich jak biopsja, i może być komplementarna wobec innych technik stosowanych w neurobiologii, jak mikrodializa czy metody elektrochemiczne [9]. W przypadku mikrodializy sonda z półprzepuszczalną membraną umieszczana jest w mózgu pacjenta, a roztwór o odpowiednim składzie jest wpompowywany przez jedną z kapilar. Związki przechodzą do płynu dializacyjnego na zasadzie różnicy stężeń, co może być ograniczone przez interakcje z lipidami, prowadząc do zablokowania procesu dializy. Przy SPME tego problemu nie obserwuje się, a dodatkowo nie ma potrzeby wprowadzania kaniuli, jak ma to miejsce w przypadku mikrodializy. SPME umożliwia ekstrakcję różnych rodzajów związków, od hydrofobowych lipidów po bardziej polarne metabolity, takie jak aminokwasy czy cukry. Mikrodializa z kolei umożliwia głównie analizę analitów polarnych [24].

Podsumowując zaprezentowane badania wskazują na użyteczność sond mikroekstrakcyjnych w badaniach śródoperacyjnych. Konieczne jednak byłoby skrócenie czasu analizy instrumentalnej – analiza chromatograficzna jednej próbki trwa zwykle około 20 min. Stąd też istotne wydaje się rozważenie zastosowania zminiaturyzowanych „mobilnych” spektrometrów mas, co umożliwiłoby szybszą i bardziej kompaktową analizę na miejscu [9]. Alternatywnie, detekcja fluorescencyjna lub spektroskopia Ramana mogłyby być skutecznymi metodami, pozwalającymi na uzyskanie dokładnych informacji o składzie chemicznym próbek [25]. Dodatkowo kombinacja mikroekstrakcji do fazy stałej bezpośrednio ze spektrometrem mas mogłaby znacząco skrócić czas analizy. Przykładowymi technikami mogłyby być MOI-MS lub CBS-MS [9].



Rysunek 5. Analiza szlaków biochemicznych wskazanych jako ważne w analizie metabolomicznej. Porównanie znormalizowanych pól powierzchni pod pikiem dla badanych klas lipidów (na podstawie [13]).

Figure 5. Analysis of biochemical pathways identified as important in metabolomic analysis. Comparison of normalized peak areas for lipid classes studied (adapted from [13]).

UWAGI KOŃCOWE

Podsumowując, lipidomika może być przydatna w różnicowaniu guzów mózgu: niezłośliwych oponiaków od złośliwych glejaków, a także zmian pochodzenia glejowego

o różnym stopniu złośliwości oraz statusie mutacji IDH1/2. Na podstawie prezentowanych badań nie wykazano jednak aby możliwe było różnicowanie zmian o różnym statusie kodelecji 1p/19q. Grupa potencjalnych biomarkerów jakimi są acylokarnityny charakteryzowała się wyższymi wartościami w guzach o gorszym rokowaniu klinicznym- wyższy stopień złośliwości, brak mutacji IDH1/2. Przydatnym narzędziem do pobrania analitów z tkanki okazały się sondy mikroekstrakcyjne. Zastosowanie włókna z odpowiednio długim sorbentem umożliwia bowiem pobranie związków charakterystycznych dla całej zmiany nowotworowej, pomimo jej heterogennej struktury. Nadmienić także należy, że biopsja chemiczna umożliwia pobieranie próbek bezpośrednio w trakcie zabiegu neurochirurgicznego, w krótkim czasie (4 minuty), z dwóch struktur jednocześnie i bez dodatkowego uszkodzenia tkanki. Większość ekstrahowanych związków stanowiły lipidy, jednakże mała grupa badana pacjentów nie pozwoliła na dogłębną analizę statystyczną ze wskazaniem znaczących różnic w profilu lipidów w istocie białej i szarej.

PODZIĘKOWANIE

Praca powstała dzięki finansowaniu uzyskanemu ze środków Narodowego Centrum Nauki; HARMONIA 7; nr 2015/18/M/ST4/00059 a także w ramach grantu ze środków Ministerstwa Obrony Narodowej; KOŚCIUSZKO, II edycja (506/2017/DA).

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Q.T. Ostrom, L. Bauchet, F.G. Davis, I. Deltour, J.L. Fisher, C.E. Langer, M. Pekmezci, J.A. Schwartzbaum, M.C. Turner, K.M. Walsh, M.R. Wrensch, J.S. Barnholtz-Sloan, *Neuro Oncol*, 2014, **16**, 896.
- [2] D.N. Louis, A. Perry, P. Wesseling, D.J. Brat, I.A. Cree, D. Figarella-Branger, C. Hawkins, H.K. Ng, S.M. Pfister, G. Reifenberger, R. Soffietti, A. von Deimling, D.W. Ellison, *Neuro Oncol*, 2021, **23**, 1231.
- [3] D. Matias, J. Balça-Silva, G.C. da Graça, C.M. Wanjiru, L.W. Macharia, C.P. Nascimento, N.R. Roque, J.M. Coelho-Aguiar, C.M. Pereira, M.F. Dos Santos, L.S. Pessoa, F.R.S. Lima, A. Schanaider, V.P. Ferrer, V. Moura-Neto, *Front Cell Neurosci*, 2018, **12**, 235.
- [4] A. Lauko, A. Lo, M.S. Ahluwalia, J.D. Lathia, *Semin Cancer Biol*, 2021, **82**, 162.
- [5] K. Aldape, K.M. Brindle, L. Chesler, R. Chopra, A. Gajjar, M.R. Gilbert, N. Gottardo, D.H. Gutmann, D. Hargrave, E.C. Holland, D.T.W. Jones, J.A. Joyce, P. Kearns, M.W. Kieran, I.K. Mellinghoff, M. Merchant, S.M. Pfister, S.M. Pollard, V. Ramaswamy, J.N. Rich, G.W. Robinson, D.H. Rowitch, J.H. Sampson, M.D. Taylor, P. Workman, R.J. Gilbertson, *Nat Rev Clin Oncol*, 2019, **16**, 509.
- [6] M. Gaca-Tabaszewska, J. Bogusiewicz, B. Bojko, *Cancers (Basel)*, 2022, **14**, 5041.
- [7] M. Pan, C. Qin, X. Han, *Adv Exp Med Biol*, 2021, **1316**, 1.
- [8] W. Szlasa, I. Zendran, A. Zalesińska, M. Tarek, J. Kulbacka, *J Bioenerg Biomembr*, 2020, **52**, 321.
- [9] J. Bogusiewicz, B. Bojko, *TrAC Trends Anal Chem*, 2023, **162**, 117043.
- [10] N. Reyes-Garcés, E. Gionfriddo, G.A. Gómez-Ríos, M.N. Alam, E. Boyacı, B. Bojko, V. Singh, J. Grandy, J. Pawliszyn, *Anal Chem*, 2018, **90**, 302.
- [11] J. Pawliszyn, *Handbook of Solid Phase Microextraction*, Elsevier, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada, 2012.
- [12] E. Cudjoe, B. Bojko, I. Delannoy, V. Saldivia, J. Pawliszyn, *Angew Chemie - Int Ed*, 2013, **52**, 12124.

- [13] J. Bogusiewicz, K. Burlikowska, K. Łuczykowski, K. Jaroch, M. Birski, J. Furtak, M. Harat, J. Pawliszyn, B. Bojko, *Sci. Rep.*, 2021, **11**, 19522.
- [14] A. Napylov, N. Reyes-Garcés, G. Gomez-Rios, M. Olkowicz, S. Lendor, C. Monnin, B. Bojko, C. Hamani, J. Pawliszyn, D. Vuckovic, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2020, **59**, 2392.
- [15] J. Bogusiewicz, P.Z. Goryńska, M. Gaca, K. Chmara, K. Goryński, K. Jaroch, D. Paczkowski, J. Furtak, M. Harat, B. Bojko, *J Vis Exp*, 2020, **2020**, 159.
- [16] P.Z. Goryńska, K. Chmara, B. Kupcewicz, K. Goryński, K. Jaroch, D. Paczkowski, J. Furtak, M. Harat, B. Bojko, *Cancers (Basel)*, 2022, **14**, 312.
- [17] J. Bogusiewicz, B. Kupcewicz, P.Z. Goryńska, K. Jaroch, K. Goryński, M. Birski, J. Furtak, D. Paczkowski, M. Harat, B. Bojko, *Int J Mol Sci*, 2022, **23**, 3518.
- [18] M. Strickland, E.A. Stoll, *Front Cell Dev Biol*, 2017, **5**, 43.
- [19] M.A.B. Melone, A. Valentino, S. Margarucci, U. Galderisi, A. Giordano, G. Peluso, *Cell Death Dis*, 2018, **9**, 228.
- [20] S. Kant, P. Kesarwani, A. Prabhu, S.F. Graham, K.L. Buelow, I. Nakano, P. Chinnaiyan, *Cell Death Dis*, 2020, **11**, 253.
- [21] J. Bogusiewicz, K. Burlikowska, K. Jaroch, P.Z. Goryńska, K. Goryński, M. Birski, J. Furtak, D. Paczkowski, M. Harat, B. Bojko, *Molecules*, 2021, **26**, 6112.
- [22] S.A. Hassani, S. Lendor, E. Boyaci, J. Pawliszyn, T. Womelsdorf, *J Neurophysiol*, 2019, **122**, 1649.
- [23] N. Reyes-Garcés, M. Diwan, E. Boyaci, G.A. Gómez-Ríos, B. Bojko, J.N. Nobrega, F.R. Bambico, C. Hamani, J. Pawliszyn, *Anal Chem*, 2019, **91**, 9875.
- [24] E. Boyaci, S. Lendor, B. Bojko, N. Reyes-Garcés, G.A. Gómez-Ríos, M. Olkowicz, M. Diwan, M. Palmer, C. Hamani, J. Pawliszyn, *ACS Chem Neurosci*, 2020, **11**, 3749.
- [25] B. Onat, H. Rosales-Solano, J. Pawliszyn, *Anal Chem*, 2020, **92**, 9379.

Praca wpłynęła do Redakcji 15 listopada 2024 r.

