



Laboratórna Diagnostika, XXVIII, 1, 2023: 53–60

LIPIDOMIKA: POTENCIÁLNY NÁSTROJ VČASNEJ DIAGNOSTIKY NÁDOROVÝCH OCHORENÍ MOZGU

LIPIDOMICS: THE POTENTIAL TOOL FOR EARLY DIAGNOSIS OF BRAIN CANCER

**Andrea Leškaničová¹, Patrik Šimko¹, Nicol Urbanská¹, Peter Petík²
Alžbeta Blichárová², Nela Žideková³, Martin Kertys³, Terézia Kisková¹**

¹Ústav biologických a ekologických vied PF UPJŠ, Košice

²Ústav patológie UPJŠ LF a UN LP, Košice

³Ústav farmakológie JLF UK v Martine

e-mail: terezia.kiskova@upjs.sk

SÚHRN

Malígne gliómy sú jedným z typov nádorov mozgu, ktoré najviac vzdorujú liečbe. Rozvoj rezistencie na rádioterapiu a chemoterapiu rovnako prispieva k agresívnym fenotypom týchto nádorov. Za posledných 50 rokov sa zistila zvýšená hladina lipidov a produktov ich metabolizmu v gliómoch. Molekulárne mechanizmy, vďaka ktorým neoplasticky transformované tkanivá získavajú a využívajú tieto lipidy, však doposiaľ nie sú dobre známe. V našej štúdii sme pozorovali 3 skupiny lipidov. V skupine fosfatidylcholínov sa počas skorého štádia rakoviny mozgu zistilo 48 % signifikantne zmenených metabolitov u samíc a 66,2 % metabolitov u samcov potkanov kmeňa Sprague Dawley. V skupine lyzofosfatidylcholínov bolo množstvo zmenených metabolitov 57,1 % u samíc a 64,3 % u samcov. Najzaujímavejšie výsledky sme pozorovali v skupine sfingomyelínov, kde vyše 85 % metabolitov bolo signifikantne zvýšených pri rakovine mozgu oproti kontrolnej skupine u oboch pohlaví.

Kľúčové slová: glioblastóm; nádory mozgu; metabolomika; lipidový metabolizmus

ABSTRACT

Malignant gliomas are one of the most treatment-resistant types of brain tumors. The development of resistance to radiotherapy and chemotherapy also contributes to the aggressive phenotypes of these tumors. Over the past 50 years, an increased level of lipids and products of their metabolism has been found in gliomas. However, the molecular mechanisms by which neoplastically transformed tissues acquire and use these lipids are still not well understood. In our study, we observed 3 groups of lipids. In the phosphatidylcholine group, 48 % of significantly altered metabolites in female and 66.2 % of metabolites in male Sprague Dawley rats were found during the early stage of brain cancer. In the group of lysophosphatidylcholines, the amount of changed metabolites was 57.1 % in females and 64.3% in males. We observed the most interesting results in the sphingomyelin group, where over 85 % of metabolites were significantly increased in brain cancer compared to the control group in both sexes.

Key words: glioblastoma; brain tumors; metabolomics; lipid metabolism

ÚVOD

Nádory mozgu a centrálného nervového systému patria k najfatálnejším typom rakoviny. Vyznačujú sa vysokou mierou morbidity a mortality (Miller et al., 2021). Hoci sú primárne malígne mozgové nádory zriedkavé, vykazujú vysokú mieru úmrtnosti. Len tretina pacientov preživa viac ako 5 rokov po diagnostikovaní ochorenia (Siegel et al., 2021). Najzhubnejšou formou mozgového nádoru je multiformný glioblastóm (glioblastoma multiforme, GBM), zvyčajne sa nachádza v hemisférach mozgu a vzniká buď de novo, alebo menej často malignitou nižších stupňov astrocytómov (Liu et al., 2016; Olari, Aldape, 2014). Pacienti s touto diagnózou zvyčajne prežívajú 6 až 18 mesiacov po jej diagnostikovaní. Hoci má GBM veľmi zlú prognózu, možnosti liečby sú extrémne obmedzené. Liečba je štandardne paliatívna, čiže zameraná na starostlivosť o pacientov, zmiernenie bolesti, podporu ich rodiny, rádioterapeutická alebo chemoterapeutická, zriedkavo chirurgická (Silantiev et al., 2019). Vzhľadom na absenciu účinnej liečby je pre výber personalizovanej liečby kľúčová včasná diagnostika spojená s presnou klasifikáciou nádoru (Olari, Aldape, 2014). Dôležitým aspektom, ktorý je potrebné brať do úvahy pri diagnostike mozgového nádoru, je jeho vysoká vnútorná heterogenita, ktorá je pre nové ale aj recidivujúce nádory charakteristická (Johnson et al., 2014). Morfologicky odlišné bunky mozgu totiž vykazujú rôznu *in vitro* inváziu a schopnosť migrácie v závislosti od okolitého mikroprostredia (Koh et al., 2018; Hawkins et al., 2020). Identifikácia zmien v koncentráciách malých molekúl alebo nízkomolekulových zlúčenín v rakovinových bunkách v porovnaní so zdravými bunkami môže byť použitá ako diagnostický, prognostický alebo klasifikačný marker typu nádoru (Longuespée et al., 2018; Mören et al., 2018). Malé molekuly zahŕňajú bunkové lipidy, metabolity a organické zlúčeniny schopné rýchlo difundovať cez bunkové membrány, čím sa dostanú do intracelulárnych a extracelulárnych priestorov (Spalding et al., 2016).

Už v 20. rokoch 20. storočia Otto Warburg pozoroval jav, že nádorové bunky a tkanivá s dostatkom glukózy produkujú veľké množstvo laktátu bez ohľadu na to, či je alebo nie je prítomný v tkanive kyslík. Tento jav je v porovnaní s normálnymi tkanivami, v ktorých sa laktát výrazne produkuje len v neprítomnosti kyslíka odlišný. Označuje sa ako Warburgov efekt (Warburg, 1956).

Neskôr boli objavené ďalšie metabolické zmeny nádorových buniek a tkanív, ktoré charakterizujú rakovinu. Následná transformácia nádorových buniek získava niekoľko charakteristických znakov, ktoré uľahčujú proliferáciu a inváziu. V dôsledku toho sa významne mení metabolizmus glukózy, bielkovín a lipidov v nádorových bunkách (Lui, Chen, 2014). Metabolomické profilovanie neoplastických pacientov môže poskytnúť neoceniteľné informácie o mechanizmoch, ktoré sú základom onkogenézy, progresie nádorov a tiež reakcií na liečbu. Navyše, metabolické profilovanie rastúcich nádorov môže viesť k identifikácii nových diagnostických alebo prognostických biomarkerov, čo má veľký praktický klinický význam (Lui, Chen, 2014).

METÓDA

Zvieratá a podmienky

V experimente sa použila rodičovská generácia potkanov kmeňa *Sprague Dawley* (Velaz, Praha, Česká republika) (10 samíc, 5 samcov). Zvieratá boli adaptované na štandardné podmienky zvieratníka s teplotou 21–24 °C, relatívnou vlhkosťou 50–65 % a na svetelný režim 12:12 hodín (svetlo/tma). Zvieratá boli kŕmené štandardnými potkaními peletami Altromin 1328 (Velaz, Praha, Česká republika) podľa legislatívy EÚ pre krmivá a usmernenia a mali voľný prístup k vode z vodovodu. Rodičovské samice sa spáрили s rodičovskými samcami. Na ďalšie experimenty sa použilo potomstvo. So zvieratami sa zaobchádzalo podľa smerníc ustanovených zákonom č. 377 a 436/2012 Slovenskej republiky o starostlivosti a používaní laboratórnych zvierat a schválených Štátnou veterinárnou a potravinovou správou Slovenskej republiky (číslo schválenia: Ro-2219/19 -221/3).

Experimentálny dizajn

Gravidné samice boli rozdelené do dvoch skupín. Jedna skupina slúžila ako kontrolná a jedna ako GBM skupina (zvieratá nesúce nádor). Karcinogénna látka Etyl-nitroso-urea (ENU) bola podávaná ako jedna intraperitoneálna dávka (100 mg/kg b. w.) GBM samiciam na 15. deň gravidity, ako je opísané v uvedených štúdiách (Bulnes-Sesma, Ullibarri-Ortiz de Zárate, Lafuente-Sánchez, 2006; Koestner, Swenberger, Wechsler, 1971; Bulnes et al., 2012). Po na-

rodení bolo potomstvo ponechané s matkami po dobu 30 dní a následne bolo rozdelené podľa pohlavia. Vo veku 4 mesiacov boli potkany usmrtené, mozgy boli vybraté a tiež bola odobratá krv, aby sa zistili rozdiely v lipidomike.

Odber krvi a metabolomické meranie

Krv zo všetkých experimentálnych zvierat sa odobrala z *vena caudalis* v celkovom objeme 100 µl do mikroskúmaviek. Miesto odberu bolo ošetrené dezinfekčným prostriedkom. Po izolácii sa krvné sérum skladovalo pri –80 °C. Zmrazené sérum sa rozmrazilo a použilo sa na ďalšiu analýzu. Vzorky boli merané súpravou Absolutel DQ p180 (BIOCRATES Life Sciences AG, Innsbruck (Rakúsko)). Nasledovala prietoková injekčná analýza (FIA) a cielené metabolomické meranie vybranej skupiny lysoPC, PC na báze kvapalinovej chromatografie a tandemovej hmotnostnej spektrometrie (LCMS/MS). Plne automatizovaný test bol založený na derivatizácii PITC (fenylizotiokyanát) v prítomnosti vnútorných štandardov a následne FIA-MS/MS a LC-MS/MS s použitím SCIEX 4000 QTRAP® (SCIEX, Darmstadt, Nemecko) alebo prístroja Waters XEVO™ TQMS (Waters, Viedeň, Rakúsko) s elektrosprejovou ionizáciou. Test bol založený na princípe opísanom v štúdiu Pena a kol. (Pena et al., 2016). Určené hodnoty boli log₂-transformované, aby sa získali normálne údaje a stabilizoval rozptyl.

Štatistické analýzy

Kvantifikácia koncentrácií metabolitov sa uskutočnilo pomocou softvérového balíka MetIQ (BIOCRATES Life Sciences AG, Innsbruck, Rakúsko). Vnútorné štandardy slúžili ako referencia pre výpočty koncentrácie metabolitov.

Jednorozmerná (t-test) a viacrozmerná štatistika (partial least square - discrimination analysis; čiastočná analýza najmenších štvorcov PLS-DA), ako aj faktor dôležitosti z analýzy PLS-DA (variable importance projection – VIP), boli vykonané pomocou MetaboAnalyst 3.0 (24). Taktiež sme použili analýzu Fold Change na charakterizovanie najvýznamnejších metabolitov.

VÝSLEDKY

Nádory mozgu indukované použitím m ENU boli prevažne solídne, lokalizované v bielej a sivej hmote. Tvorili skoré štádiá nádorov.

Nameraných bolo celkovo 102 lipidových metabolitov zo skupín fosfatidylcholínov (PC), lyzofosfatidylcholínov (lysoPC) a sfingomyelínov (SM). Porovnávali sa zdravé aj GBM zvieratá, a to v závislosti aj nezávisle od pohlavia.

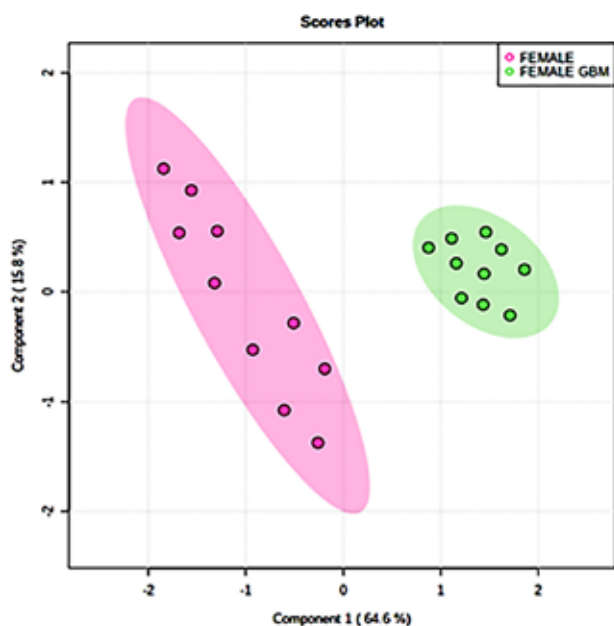
V skupine samíc bolo v ranom štádiu rakoviny mozgu signifikantne zmenených celkovo 36 zo 74 PC, čo predstavuje 48,6 %. Z nich 16 (44,4 %) malo vyššie hladiny u GBM samíc, zatiaľ čo zvyšných 20 (55,6 %) malo vyššie hladiny u intaktných samíc. V skupine lysoPC bolo 8 zo 14 (57,1 %) metabolitov významne zmenených, 2 (25 %) mali vyššie hladiny u GBM samíc a 6 (75 %) malo vyššie hladiny v skupine intaktných samíc. Najzaujímavejšie výsledky sme pozorovali v skupine sfingomyelínov, kde 12 zo 14 (85,8 %) metabolitov bolo signifikantne zvýšených počas rakoviny mozgu (skupina GBM).

V skupine samcov sa signifikantne zmenilo celkovo 49 zo 74 fosfatidylcholínov, čo predstavuje 66,2 %. Z nich

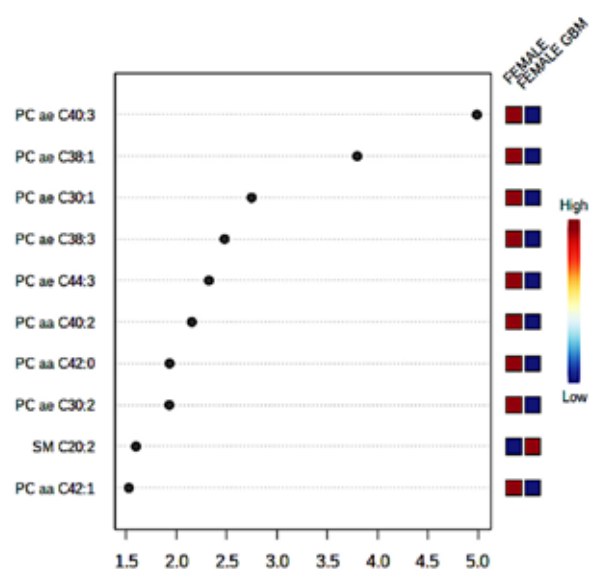


Obr. 1. Solídne nádory indukované ENU. Farbenie pomocou HE

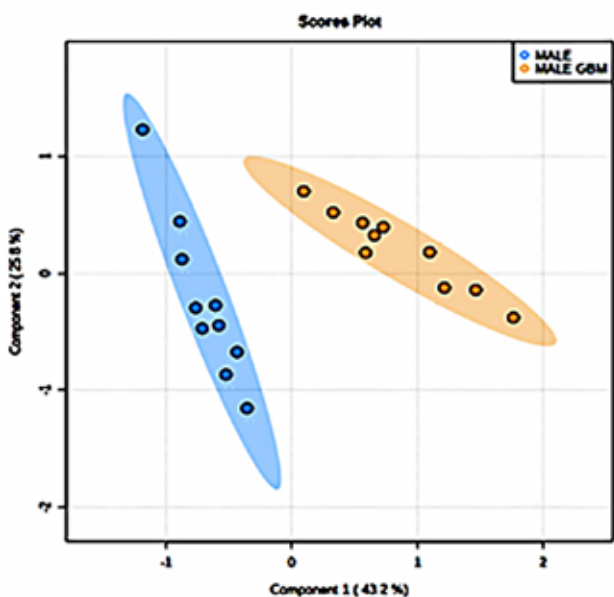
A – Mozgové tkanivo so solídnym nádorom v perihypokampálnej oblasti mozgu v hlbokjej bielej hmote mozgu; 40-násobné zväčšenie, solídny nádor označený červeným rámčekom. B – Mozgové tkanivo s dvoma solídnymi nádormi v oblasti corpus callosum v hlbokjej bielej hmote; 40-násobné zväčšenie, dva nádory označené červeným rámčekom



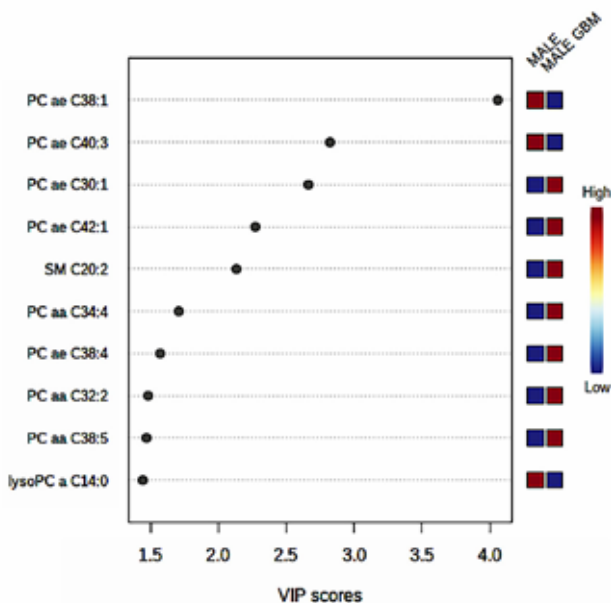
Obr. 2. Čiastočná diskriminačná analýza najmenších štvorcov (Partial least squares-discrimination analysis, PLS-DA) vybraných metabolitov u GBM a intaktných samičiach. V grafickom výstupe sú zahrnuté 95 % elipsy spoľahlivosti pre konkrétne skupiny



Obr. 3. Graf premennej dôležitosti v projekcii (VIP), vypočítaný metódou PLS-DA, zobrazuje 10 najdôležitejších vlastností metabolitov identifikovaných pomocou PLS-DA. Políčka vpravo označujú relatívnu koncentráciu zodpovedajúceho metabolitu v krvi v zostupnom poradí dôležitosti. VIP je vážený súčet druhých mocnín PLS-DA zaťaženia, berúc do úvahy množstvo vysvetlenej Y-premennej v každej dimenzii. Najdôležitejšie vlastnosti majú VIP hodnoty >1,5



Obr. 4. Čiastočná diskriminačná analýza najmenších štvorcov (Partial least squares-discrimination analysis, PLS-DA) vybraných metabolitov u GBM a intaktných samcov. V grafickom výstupe sú zahrnuté 95 % elipsy spoľahlivosti pre konkrétne skupiny



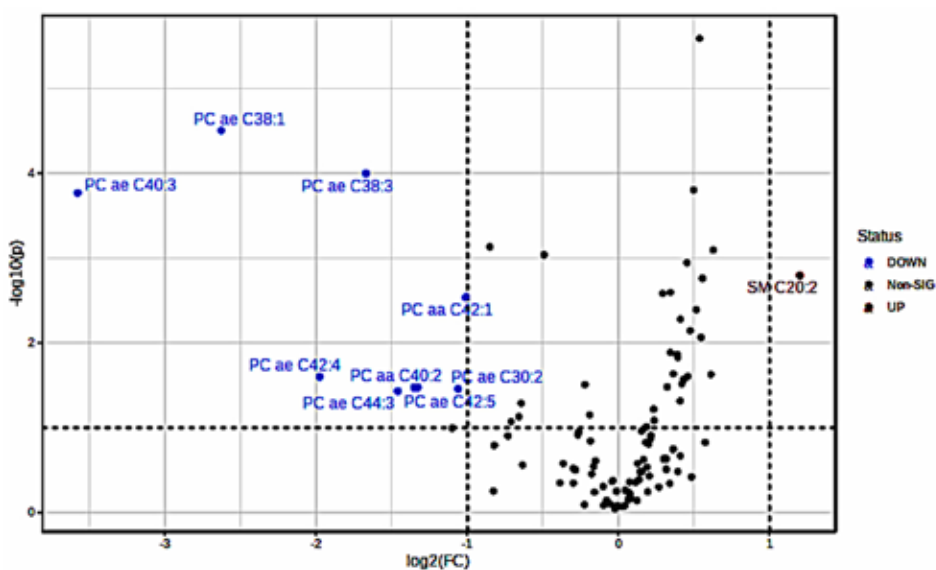
Obr. 5. Graf premennej dôležitosti v projekcii (VIP), vypočítaný metódou PLS-DA, zobrazuje 10 najdôležitejších vlastností metabolitov identifikovaných pomocou PLS-DA. Políčka vpravo označujú relatívnu koncentráciu zodpovedajúceho metabolitu v krvi v zostupnom poradí dôležitosti. VIP je vážený súčet druhých mocnín PLS-DA zaťaženia, berúc do úvahy množstvo vysvetlenej Y-premennej v každej dimenzii. Najdôležitejšie vlastnosti majú VIP hodnoty >1,5

	Compounds	Fold Change	log ₂ (FC)
1	PC ae C40:3	0.083717	-3.5783
2	PC ae C38:1	0.16185	-2.6272
3	PC ae C42:4	0.25423	-1.9758
4	PC ae C38:3	0.31453	-1.6687
5	PC ae C44:3	0.36375	-1.459
6	PC aa C40:2	0.39181	-1.3518
7	PC ae C42:5	0.39875	-1.3265
8	SM C20:2	2.3005	1.202
9	PC aa C42:0	0.46668	-1.0995
10	PC ae C30:2	0.47993	-1.0591
11	PC aa C42:1	0.49718	-1.0082

Obr. 6. Dôležité metabolity identifikované fold change analýzou
Tabuľka bola vytvorená v softvéri Metaboanalyst

41 (83,6 %) malo vyššie hladiny u GBM samcov, zatiaľ čo 8 (16,4 %) malo vyššie hladiny u intaktných samcov. V skupine lysoPC bolo 9 zo 14 (64,3 %) metabolitov významne zmenených, 5 (55,6 %) malo vyššie hladiny u GBM samcov a 4 (44,4 %) mali vyššie hladiny v skupine intaktných samcov. Najzaujímavejšie výsledky sme opäť pozorovali v skupine sfingomyelínov, kde bolo signifikantne zmenených 11 zo 14 (78,6 %) metabolitov. Všetky vykazovali zvýšené hladiny u GBM samcov.

Pri porovnávaní údajov nezávisle od pohlavia s cieľom nájsť metabolit, ktorý charakterizuje ochorenie v počiatkových štádiách bez ohľadu na pohlavie, sme odhalili, že



Obr. 7. Dôležité vlastnosti vybrané pomocou volcano plot analýzy násobnej zmeny (x) 2 a prahom t-testov (y) 0,1. Červené kruhy predstavujú prvky nad prahom. Násobné zmeny aj hodnoty p sú logaritmicke transformované. Čím ďalej je jeho poloha od (0,0), tým významnejší je prvok

mnohé znaky sú rovnaké u samcov aj samíc. Najdôležitejším metabolitom sa ukázal byť SM C20:2.

Ostatné signifikantne znížené metabolity boli prevažne zo skupiny PC (PC ae C38:1; PC ae C38:3, PC ae C40:3; PC aa C42:1; PC aa C40:2; PC ae C42:4; PC ae C42:5 PC ae C30:2; PC ae C44:3).

Podľa VIP skóre, vypočítaného metódou PLS-DA, bolo určených 5 najdôležitejších metabolitov. Počas skorých štádií rakoviny mozgu sa zistilo, že PC ae C40:3, PC ae C38:1, PC ae C38:3 a PC ae C42:4 sú exkluzívne markery. Ďalším dôležitým metabolitom je SM C20:2, ktorý je počas rakoviny mozgu výrazne zvýšený.

DISKUSIA

Od roku 2007 Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) klasifikuje gliómy na základe ich bunkového typu a agresivity, pričom trieda I pozostáva z benígnych nádorov a trieda IV zahŕňa najagresívnejšie typy nádorov. GBM je mozgový nádor triedy IV (Chhabda et al., 2016). Včasná diagnostika rakoviny mozgu zostáva výzvou, pretože novo navrhované lieky musia spĺňať špecifické požiadavky, ako je schopnosť prekonať hematoencefalickú bariéru (BBB) a účinná infiltrácia nádoru (Cava z o s, B r e n n e r, 2016). V roku 2016 WHO zaviedla nové usmernenia pre diagnostiku mozgových gliómov na základe nových genómových markerov. Pridanie týchto nových markerov

k už existujúcim diagnostickým metódam poskytlo novú úroveň presnosti diagnostiky gliómu a predikcie účinnosti liečby. Napriek tomuto novému klasifikačnému nástroju má GBM naďalej jednu z najvyšších mier úmrtnosti medzi nádormi CNS. Metabolomika je obzvlášť sľubným nástrojom na analýzu mozgových nádorov a potenciálnych metód ich liečby, keďže je to jediný „omický“ prístup, ktorý môže poskytnúť metabolický „podpis“ fenotypu nádoru (J a r o c h, M o d r a k o w s k a, B o j k o, 2021).

Pri štúdiu rakoviny mozgu u ľudí existuje veľa nekontrolovateľných faktorov, ako je anamnéza liekov, vek pacienta alebo životné podmienky. V tomto ohľade predstavujú zvieracie modely základný krok na skúmanie nervových obvodov alebo molekulárnych a bunkových dráh v kontrolovanom prostredí (L e s k a n i c o v a et al., 2021). Cieľom našej štúdie bolo odhaliť zmeny v lipidomike počas skorých štádií chemicky indukovanej rakoviny mozgu laboratórnych potkanov, a to aj v závislosti od pohlavia.

Rýchly rast a delenie patria medzi hlavné charakteristiky malígnych nádorov. Vzhľadom na dôležitú úlohu lipidov pri tvorbe bunkovej membrány a prenose signálov je identifikácia rozdielov v zložení lipidov medzi nádorovými a normálnymi tkanivami, s cieľom nájsť možné diagnostické a prognostické biomarkery pre pacientov s rakovinou, dlhodobým úsilím vedcov (G u o, B e l l, C h a k r a v a r t i, 2013).

Zdravie a funkcia nervového systému je úzko spätá s homeostázou lipidov. Mozog je druhou najväčšou zásobárňou lipidov v tele, hneď za tukovým tkanivom (R a l h a n et al., 2021; P e t r e l l i, K n o b l o c h, A m a t i, 2022). Normálne bunky využívajú hlavne glukózu a mastné kyseliny na výrobu energie a splnenie požiadaviek na rast buniek. Rakovinové bunky však využívajú zmenený metabolizmus, kde rakovinové bunky využívajú vyššie hladiny glukózy na výrobu energie anaeróbnou glykolýzou namiesto aeróbnej glykolýzy prostredníctvom cyklu trikarboxylových kyselín (TCA), sa nazýva Warburgov efekt (W a r b u r g, 1956). Znížené hladiny lipidov pozorované v tkanive mozgového nádoru môžu naznačovať, že okrem glukózy z anaeróbnej glykolýzy závisí od mastných kyselín ako zdroja paliva. Potenciálne zvýšená hladina lipolýzy v mozgových rakovinových bunkách generuje energiu na proliferáciu rakovinových buniek a vedie k celkovému zníženiu hladiny detekovaných lipidov (H e et al., 2007, C a m p a n e l l a, 1992). CNS má špecializované dráhy na syntézu a degradá-

ciu lipidov súvisiace s jeho špecializovanou fyziológiou a funkciou (H e et al., 2007). K zníženiu obsahu lipidov teda môžu viesť dva scenáre: mozgové tkanivo bohaté na lipidy nahradzujúce nádorové bunky bohaté na lipidy by celkovo znížilo množstvo lipidov, zatiaľ čo nádorové bunky by pravdepodobne využívali aj normálne fyziologické dráhy súvisiace s metabolizmom lipidov v centrálnom nervovom tkanive. V literatúre je množstvo správ, že syntetáza mastných kyselín je vysoko regulovaná pri rôznych druhoch rakoviny vrátane GBM a môže byť dobrým terapeutickým cieľom (F l a v i n et al., 2010).

Štúdie o úlohe metabolizmu sfingolipidov sa v posledných rokoch stali neoddeliteľnou súčasťou výskumu rakoviny. Sfingomyelíny (SM), prevládajúce sfingofosfolipidy v bunkovej membráne, a ich hydrolýza sfingomyelinázami sú nevyhnutné pre účinnosť chemo- a rádioterapie. Sfingomyelín je tiež kľúčovou zložkou bunkovej membrány, ktorá interaguje s cholesterolom a glycerofosfolipidmi, čím sa podieľa na tvorbe a udržiavaní lipidových mikrodomén. Lipidové rafty sú dôležité signálne platformy, ktorých štruktúra je citlivá na zloženie membránových lipidov (S i m o n s, T o o m r e, 2000), rovnako ako proteíny, ktoré interagujú s týmito a inými membránovými mikrodoménami (d e A l m e i d a, F e d o r o v, P r i e t o, 2003; d e A l m e i d a et al., 2005). Preto modifikácie obsahu SM ovplyvňujú signálne dráhy spojené s lipidovým raftom (H u i t e m a et al., 2004).

V našej štúdii sme pozorovali najzaujímavejšie výsledky v skupine sfingolipidov, kde 12 zo 14 metabolitov, čo predstavuje 85,8 %, metabolitov bolo významne zmenených počas rakoviny mozgu u žien a 11 zo 14, čo predstavuje 78,6 % u mužov. Zhaw a kol. vo svojej štúdii tiež identifikovali sfingomyelíny ako biomarkery gliómových nádorov (Z h a i et al., 2019).

Sfingolipidová dráha hrá kľúčovú úlohu pri určovaní bunkového osudu, vďaka čomu je atraktívnym liekovým cieľom v procesoch, ako sú zápaly, kardiovaskulárne ochorenia, cukrovka a rakovina (M a c e y k a, Spiegel, 2014; H a d i et al., 2015). Predovšetkým súčasná terapia GBM indukuje viaceré účinky na sfingolipidovú dráhu. Ionizujúce žiarenie spôsobuje jedno a dvojlátkové zlomy v DNA, ale tiež aktivuje kyslú sfingomyelinázu, aby vyvolala konverziu sfingomyelinu nachádzajúceho sa v bunkových membránach na ceramid (M i r z a y a n s et al., 2013). Toto obohatenie ceramidu v plazmatickej membráne vedie k zhlukovaniu receptorov bunkovej smrti,

čo podporuje apoptózu (Grassmé, Riethmüller, Gulbins, 2007). TMZ tiež spôsobuje zlomy dvojvláknovej DNA a ukázalo sa, že podporuje akumuláciu ceramidu v bunkách GBM (Grassmé, Riethmüller, Gulbins, 2007). To je v súlade so známymi účinkami mnohých chemoterapií, ktoré často aktivujú tvorbu ceramidov prostredníctvom viacerých mechanizmov, vrátane aktivácie ceramidsyntáz, pričom táto akumulácia ceramidu hrá hlavnú úlohu v mechanizme účinku mnohých z týchto látok (Ekiz, Baran, 2011; Truman et al., 2014; Oskoui a Saba, 2010). Súčasná terapia GBM teda čiastočne fungujú tak, že menia metabolizmus sfingolipidov na zvýšenie proapoptotických hladín ceramidu. Zvýšený metabolizmus ceramidov napríklad prostredníctvom zvýšených hladín sfingozínkináz, kyslej ceramidázy alebo glukozylceramidsyntázy, ktoré sa bežne pozorujú pri mnohých rakovinách, môže odstrániť tento zvýšený ceramid a prekonať rádio/chemoterapiu (Ekiz, Baran, 2011; Truman et al., 2014).

V našej štúdii bolo 48,6 % PC významne zmenených počas skorého štádia rakoviny mozgu u samíc a 66,2 % u samcov. Čo sa týka lysoPC, 57,1 % metabolitov sa významne zmenilo u samíc a 64,3 % u samcov. Podľa VIP projekcie boli najdôležitejšie metabolity: PC ae C38:1, PC ae C40:3, PC ae C30:1, PC ae C42:1, SM C20:2, PC aa C34:4, PC ae C38:4, PC aa C32:2, PC aa C38:5, lysoPC a C14:0. Najdôležitejšie vlastnosti identifikované analýzou násobnej zmeny boli PC ae C40:3, PC ae C38:1, PC ae C42:4, PC ae C38:3, PC ae C44:3, PC aa C40:2, PC ae C42:5, SM C20:2, PC aa C42:0, PC ae C30:2, PC aa C42:1.

Naše výsledky sú v súlade s niektorými predchádzajúcimi štúdiami. Buentzel a kol. vo svojej štúdii zistili významné zmeny v hladinách metabolitov PC aa C38:5, PC ae C38:3, PC aa C40:2, kde metabolit PC aa C38:5 a lysoPC C26:0 boli spojené s výrazne kratším celkovým prežitím, čo zdôrazňuje prognostický význam tohto zistenia (Buentzel et al., 2021). V súlade s tým Guo a kol. už skôr opísali, že odchýlky lysoPC boli spojené s progresiou rakoviny (Guo et al., 2012). Schmid a kol. po kontrole pre viacnásobné testovanie uviedli, že lysoPC a C18:0, PC aa C36:2, PC aa C36:3, PC aa C38:3, PC aa C38:5, PC aa C40:2, PC aa C40:3, PC aa C40:4, PC aa C40:5, PC aa C42:4, PC aa C42:5 a PC ae C40:1 boli nepriamo spojené s rizikom rakoviny prostaty (Schmid et al., 2017). V našom modeli rakoviny mozgu nastali identické zmeny v PC aa C40:2, PC ae C30:2, PC aa C42:1 a PC aa C38:5.

Podakovanie

Táto práca bola podporená grantovou agentúrou VEGA (VEGA-1/0658/20; VEGA-1/0081/20) a internými grantovými systémami UPJŠ (VVGS-PF-2022-2136; VVGS-2023-2561).

LITERATÚRA

1. Buentzel, J. et al. (2021): Metabolomic Profiling of Blood-Derived Microvesicles in Breast Cancer Patients. *Int. J. Mol. Sci.*, 22.
2. Bulnes-Sesma, S., Ullibarri-Ortiz De Zárate, N., Lafuente-Sánchez, J. V. (2006): Tumour induction by ethylnitrosourea in the central nervous system. *Rev. Neurol.*, 43, 733–8.
3. Bulnes, S. et al. (2012): Angiogenic Signalling Pathways Altered in Gliomas: Selection Mechanisms for More Aggressive Neoplastic Subpopulations with Invasive Phenotype. *Journal of Signal Transduction*, 2012, 597915.
4. Campanella, R. (1992): Membrane lipids modifications in human gliomas of different degree of malignancy. *J. Neurosurg. Sci.*, 36, 11–25.
5. Cavazos, D. A. & Brenner, A. J. (2016): Hypoxia in astrocytic tumors and implications for therapy. *Neurobiol. Dis.*, 85, 227–233.
6. De Almeida, R. F. et al. (2005): Lipid rafts have different sizes depending on membrane composition: a time-resolved fluorescence resonance energy transfer study. *J. Mol. Biol.*, 346, 1109–20.
7. De Almeida, R. F. M., Fedorov, A., Prieto, M. (2003): Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts. *Biophysical Journal*, 85, 2406–2416.
8. Ekiz, H. A., Baran, Y. (2011): Bioactive sphingolipids in response to chemotherapy: a scope on leukemias. *Anticancer Agents Med. Chem.*, 11, 385–97.
9. Flavin, R. et al. (2010): Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Future Oncol.*, 6, 551–62.
10. Grassmé, H., Riethmüller, J., Gulbins, E. (2007): Biological aspects of ceramide-enriched membrane domains. *Prog. Lipid. Res.*, 46, 161–70.
11. Guo, D., Bell, E. H., Chakravarti, A. (2013): Lipid metabolism emerges as a promising target for malignant glioma therapy. *CNS Oncol.*, 2, 289–99.
12. Guo, Y. et al. (2012): Probing gender-specific lipid metabolites and diagnostic biomarkers for lung cancer using Fourier

- p>transform ion cyclotron resonance mass spectrometry.
- Clin. Chim. Acta*
- , 414, 135–41.
13. Hadi, L. A. et al.: The Role and Function of *Sphingolipids* in *Glioblastoma Multiforme*. 2015.
 14. Hawkins, C. C. et al. (2020): Sphingolipid Metabolism in Glioblastoma and Metastatic Brain Tumors: A Review of Sphingomyelinases and Sphingosine-1-Phosphate. *Biomolecules*, 10.
 15. He, H. et al. (2007): Method for lipidomic analysis: p53 expression modulation of sulfatide, ganglioside, and phospholipid composition of U87 MG glioblastoma cells. *Analytical chemistry*, 79, 8423–8430.
 16. Huitema, K. et al. (2004): Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *EMBO J.*, 23, 33–44.
 17. Chhabda, S. et al. (2016): The 2016 World Health Organization Classification of tumours of the Central Nervous System: what the paediatric neuroradiologist needs to know. *Quantitative imaging in medicine and surgery*, 6, 486–489.
 18. Jaroch, K., Modrakowska, P., Bojko, B. (2021): Glioblastoma Metabolomics-In Vitro Studies. *Metabolites*, 11.
 19. Johnson, B. E. et al. (2014): Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma. *Science*, 343, 189–193.
 20. Koestner, A., Swenberg, J. A., Wechsler, W. (1971): Transplacental production with ethylnitrosourea of neoplasms of the nervous system in Sprague-Dawley rats. *Am. J. Pathol.*, 63, 37–56.
 21. Koh, I. et al. (2018): The mode and dynamics of glioblastoma cell invasion into a decellularized tissue-derived extracellular matrix-based three-dimensional tumor model. *Sci. Rep.*, 8, 4608.
 22. Leskancova, A. et al. (2021): Sex-dependent differences in stress-induced depression in Wistar rats are accompanied predominantly by changes in phosphatidylcholines and sphingomyelins. *J. Physiol. Pharmacol.*, 72.
 23. Liu, B. et al. (2016): RND3 promotes Snail 1 protein degradation and inhibits glioblastoma cell migration and invasion. *Oncotarget*, 7, 82411-82423.
 24. Longuespée, R. et al. (2018): Rapid detection of 2-hydroxyglutarate in frozen sections of IDH mutant tumors by MALDI-TOF mass spectrometry. *Acta neuropathologica communications*, 6, 21–21.
 25. Lu, X., Ji, L. J., Chen, J. L. (2014): Metabolomic profiling of neoplastic lesions in mice. *Methods Enzymol.*, 543, 261–73.
 26. Maceyka, M., Spiegel, S. (2014): Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature*, 510, 58–67.
 27. Miller, K. D. et al. (2021): Brain and other central nervous system tumor statistics, 2021. *CA Cancer J. Clin.*, 71, 381–406.
 28. Mirzayans, R. et al. (2013): Ionizing radiation-induced responses in human cells with differing TP53 status. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 22409–35.
 29. Mören, L. et al. (2018): Metabolomic profiling identifies distinct phenotypes for ASS1 positive and negative GBM. *BMC Cancer*, 18, 167.
 30. Olar, A., Aldape, K. D. (2014): Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. *J. Pathol.*, 232, 165–77.
 31. Oskouian, B., Saba, J. D. (2010): Cancer treatment strategies targeting sphingolipid metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 688, 185–205.
 32. Pena, M. et al. (2016): Serum metabolites predict response to angiotensin II receptor blockers in patients with diabetes mellitus. *Journal of translational medicine*, 14, 203.
 33. Petrelli, F., Knobloch, M., Amati, F. (2022): Brain lipid metabolism: the emerging role of lipid droplets in glial cells. *Curr. Opin. Lipidol.*, 33, 86–87.
 34. Ralhan, I. et al. (2021): Lipid droplets in the nervous system. *J. Cell. Biol.*, 220.
 35. Schmidt, J. A. et al. (2017): Pre-diagnostic metabolite concentrations and prostate cancer risk in 1077 cases and 1077 matched controls in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *BMC Med.*, 15, 122.
 36. Siegel, R. L. et al. (2021): Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J. Clin.*, 71, 7–33.
 37. Silantyev, A. S. et al. (2019): Current and Future Trends on Diagnosis and Prognosis of Glioblastoma: From Molecular Biology to Proteomics. *Cells*, 8.
 38. Simons, K., Toomre, D. (2000): Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 1, 31–9.
 39. Spalding, K. et al. (2016): A review of novel analytical diagnostics for liquid biopsies: spectroscopic and spectrometric serum profiling of primary and secondary brain tumors. *Brain and behavior*, 6, e00502-e00502.
 40. Truman, J. P. et al. (2014): Evolving concepts in cancer therapy through targeting sphingolipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*, 1841, 1174–88.
 41. Warburg, O. (1956): On the origin of cancer cells. *Science*, 123, 309-14.
 42. Zhai, X. H. et al. (2019): Novel sphingomyelin biomarkers for brain glioma and associated regulation research on the PI3K/Akt signaling pathway. *Oncol. Lett.*, 18, 6207–6213.