



Laboratórna Diagnostika, XXVIII, 1, 2023: 67–76

ENERGETICKÝ METABOLIZMUS POČAS CHEMICKY INDUKOVANEJ RAKOVINY MOZGU LABORATÓRNYCH POTKANOV ENERGY METABOLISM DURING CHEMICALLY INDUCED BRAIN CANCER OF LABORATORY RATS

Zuzana Porvazová¹, Andrea Leškaničová¹, Peter Petík², Nela Žideková³
Alžbeta Blichárová², Ľudmila Verbóová², 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

Metabolomika sa v súčasnosti používa na identifikáciu biomarkerov a zmenených metabolických dráh pri rakovine. Hladiny metabolitov reprezentujú priame molekulárne údaje o stave buniek, ktoré odrážajú zmysluplný fyziologický fenotyp. Cieľom tohto výskumu bolo sledovať metabolomické zmeny v krvi laboratórnych potkanov a vytipovať najdôležitejšie metabolity so zameraním sa na aminokyseliny, biogénne amíny a acylkarnitíny po chemickom navodení nádorov mozgu. V experimente bolo použitých 10 dospelých laboratórnych potkanov kmeňa Sprague Dawley a bolo detegovaných 81 metabolitov. Štatistickými multivariálnymi metódami sa ukázali ako významné metabolity acylkarnitíny s krátkym (C3-C5) resp. stredne dlhým reťazcom (C6) a metionín-sulfoxid (Met-SO), a to s ohľadom aj bez ohľadu na pohlavie. Zistené metabolity by mohli predstavovať potenciálne biomarkery, ktoré významne ovplyvňujú diagnostiku a liečbu.

Kľúčové slová: metabolomika, nádor mozgu, acylkarnitíny, aminokyseliny, biogénne amíny

ABSTRACT

The metabolomics is used for identification of biomarkers and altered metabolic pathways in cancer. The direct molecular data of cell status that display a meaningful physiological phenotype are ultimately represented by the levels of metabolites. The aim of this research was to follow metabolomical changes in the blood of laboratory rats and identify the most important metabolites with focus on amino acids, biogenic amines and acylcarnitines after chemical induction of brain tumors. In the experiment were used 10 adult laboratory rats and were detected 81 metabolites. By using statistical multivariate methods, the acylcarnitines with short (C3-C5) or medium long chains (C6) and methionine sulfoxide were shown to be significant metabolites with the fact that gender was also was not considered. Detected metabolites could represent potential biomarkers that significantly influence diagnosis and treatment.

Key words: the metabolomics, the brain tumor, acylcarnitines, amino acids, biogenic amines

ÚVOD

Nádory centrálneho nervového systému (CNS) tvoria heterogénnu skupinu jednotlivých druhov nádorov, kde patria nádory benígne a malígne (F a d r u s et al., 2010). Gliómy predstavujú 75 % malígnych nádorov centrálneho nervového systému s celosvetovou incidenciou 7 na 100 000 obyvateľov (R e y n o s o - N o v e r ó n et al., 2021). Medzi najzhubnejšie a najagresívnejšie formy týchto nádorov patrí multiformný glioblastóm (GBM) (A b o u - A n t o u n et al., 2017). Klasifikácia nádorov CNS je založená najmä na štyroch morfológických kritériách: cytologická atypia, mitotická aktivita, mikrovaskulárna proliferácia (proliferácia endotelových buniek) a nekróza (G u p t a, D w i v e d i, 2017). Najnovšia klasifikácia mozgových nádorov CNS podľa svetovej zdravotníckej organizácie (WHO). Táto klasifikácia z roku 2021 zahŕňa 13 rôznych nádorov CNS (T o r p et al., 2022). Klasifikácia vychádza z WHO a gradingu delí gliómy na dve základné skupiny, ktoré sa medzi sebou značne odlišujú svojimi biologickými vlastnosťami, a tým aj celkovou prognózou pacienta: gliómy nízkeho stupňa malignity (low grade glioma – LGG) a gliómy vysokého stupňa malignity (high grade glioma – HGG) (F a d r u s et al., 2015). Metabolomika, podobne ako iné omické technológie, sa v súčasnosti používa na identifikáciu biomarkerov a metabolických dráh zmenených pri rakovine a používa sa na hodnotenie účinnosti lekárskeho zásahu pri rakovine (B e g e r, 2013). Je dobre známe, že metabolizmus rakoviny sa líši od metabolizmu normálneho tkaniva a dôležitá hypotéza publikovaná v 50.-tych rokoch Ottom Warburgom predpovedala, že nádorové bunky sa spoliehajú na anaeróbny metabolizmus ako na zdroj energie, dokonca aj pri fyziologických hladinách kyslíka (A r m i t a g e, B a r b a s, 2014). Rýchlosť metabolizmu glukózy prostredníctvom aeróbnej glykolýzy je však vyššia, takže dochádza k produkcii laktátu z glukózy 10 až 100-krát rýchlejšie ako úplná oxidácia glukózy v mitochondriách. V tomto procese sa zvýšená spotreba glukózy využíva ako zdroj uhlíka pre anabolické procesy potrebné na podporu nekontrolovateľnej bunkovej proliferácie (L i b e r t i, L o c a s a l e, 2016). Nádorové bunky sa prispôbujú, aby maximalizovali svoju schopnosť syntetizovať substráty pre membrány, nukleové kyseliny a proteíny pre zvýšenú rýchlosť proliferácie, čo je hlavná charakteristika týchto buniek. Je potrebné veľké množstvo energie (adenozíntrifosfátu – ATP), ktoré sa získa mnohonásob-

ným zvýšením spotreby glukózy a glutamínu (M a r i e, S h i n j o, 2011). Na rozdiel od normálneho mozgu, ktorý na energiu oxiduje glukózu aj ketolátky, zhubné mozgové nádory z ľudských alebo zvieracích modelov nemajú takú metabolickú flexibilitu a sú do značnej miery závislé od glukózy ako energie (S e y f r i e d, M u k h e r j e e, 2005).

METÓDA

Materiál a indukcia GBM

V experimente bolo použitých 10 dospelých laboratórnych potkanov kmeňa Sprague Dawley (5 samíc a 5 samcov; Velaz, Praha, Česká republika). Zvieratá boli kŕmené štandardnými granulovanými peletami Altromin 1328 (Velaz, Praha, Česká republika) podľa legislatívy EÚ o krmivách pre zvieratá a mali voľný nepretržitý prístup k vode. Rodičovské samice sa páрили so samcami, pričom ich potomstvo sa využilo na ďalšie experimenty. So zvieratami sa zaobchádzalo podľa usmernení 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).

Gravidné samice boli rozdelené do dvoch skupín. Jedna skupina slúžila ako kontrolná resp. intaktná skupina. Tejto skupine nebol podaný chemokarcinogén a potomstvu nevznikli nádory. Druhá skupina bola opísaná ako skupina GBM (zvieratá nesúce nádor). Na vyvolanie nádoru bola jednorazovo podaná intraperitoneálna dávka chemokarcinogénu etylnitrozourea (ENU) gravidným samicam na 15. deň gravidity v dávke 100mg/kg hmotnosti. Po narodení bolo potomstvo držané s matkami. Vo veku 30 dní po narodení bolo potomstvo rozdelené podľa pohlavia. Vytvorili sa 4 experimentálne skupiny – zdravé samice a samce (FEMALE a MALE) a samice a samce s nádorom na mozgu (FEMALE + GBM a MALE + GBM). Vo veku 4 mesiacov boli potkany usmrtené a tiež bola odobratá krv, aby sa zistili rozdiely v jednotlivých metabolitoch.

Odoberanie vzoriek a analýza metabolitov

Krv bola odoberaná z *vena caudalis* v celkovom objeme 100 µl do mikroskúmaviek. Miesto odberu bolo ošetrené dezinfekčným prostriedkom. Získané krvné sérum bolo následne uskladnené pri –80 °C. Následne bolo sérum rozmrazené na suchom ľade a bolo použité na ďalšiu analýzu.

Vzorky boli merané súpravou AbsoluteIDQ p180 (BIOCRATES Life Sciences AG, Innsbruck (Rakúsko) – prietokovou injekčnou analýzou (FIA) s cieľným metabolickým meraním na báze kvapalinovej chromatografie a tandemovej hmotnostnej spektrometrie (LCMS/MS) vybraných skupín metabolitov – aminokyselín, biogénnych amínov a acylkarnitínov (Tab. 2). Nasledoval plne automatizovaný test, počas ktorého boli vzorky najskôr podrobené derivatizácii PITC (fenyliizotiokyanát) v prítomnosti vnútorných štandardov, následne prebehla FIA-MS/MS a LC-MS/MS s použitím prístroja SCIEX 4000 QTRAP® (SCIEX, Darmstadt, Nemecko) alebo prístroja Waters XEVO™ TQMS (Waters, Viedeň, Rakúsko) s elektrosprejovou ionizáciou. Údaje boli transformované log₂, aby sme získali relevantné hodnoty a stabilizoval sa rozptyl.

Štatistická analýza

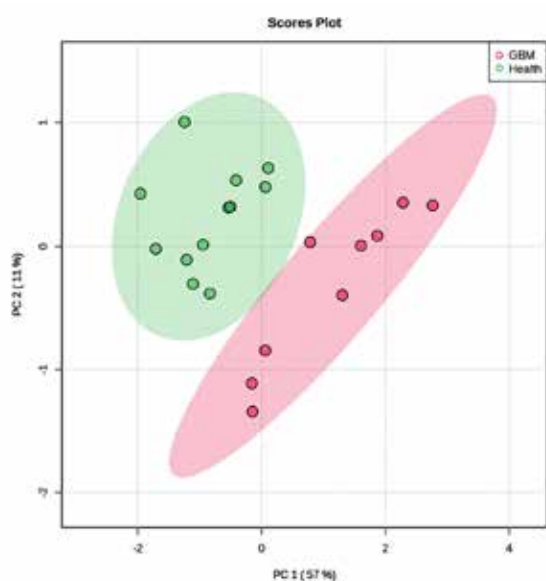
Výpočet koncentrácií metabolitov a hodnotenie kvality získaných údajov sme uskutočnili pomocou softvérového balíka MetIQ (BIOCRATES Life Sciences AG, Innsbruck, Rakúsko). Vnútorné štandardy slúžili ako referencia pre výpočty koncentrácie metabolitov. Údaje sme spracovali v programe GraphPad Prism 8.0, a to nepárovým t-testom na porovnanie vybraných skupín dát. Porovnávali sme zdravé jedince s nádorovými, a to s prihliadnutím na pohlavie alebo bez ohľadu na pohlavie. Okrem toho boli vykonané i jednorozmerná (t-test) a viacrozmerná štatis-

tika (diskriminačná analýza – partial least squares – PLS-DA), ako aj premenná dôležitosť v projekčnom (VIP) grafe pomocou voľne dostupného internetového štatistického softvéru MetaboAnalyst 5.0 (Xia Lab @ McGill, Ste. Anne de Bellevue, Quebec, US). Taktiež bola vykonaná PCA analýza (Principal Component Analysis), ktorá analyzuje údaje, v ktorých sú pozorovania opísané niekoľkými vzájomne korelovanými kvantitatívnymi závislými premennými.

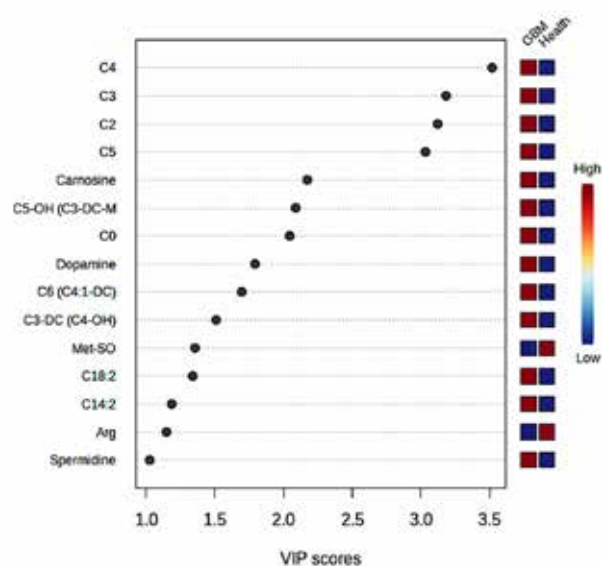
VÝSLEDKY

Celkovo sme v našej štúdií detegovali 81 metabolitov zo skupín aminokyselín (21), biogénnych amínov (20) a acylkarnitínov (41). Po nameraní hodnôt sme zistili, že spermín nameraný nebol (pravdepodobne chyba prístroja) a vylúčili sme ho z analýz. Získané dáta sme najprv vyhodnotili bez ohľadu na pohlavie, aby sme „simulovali“ situáciu, aká by mohla nastať v klinickej praxi, kde pri množstve dát nie je možné zameriavať sa na pohlavia a zároveň sme chceli vytipovať metabolity, všeobecne charakteristické pre nádorové ochorenia mozgu.

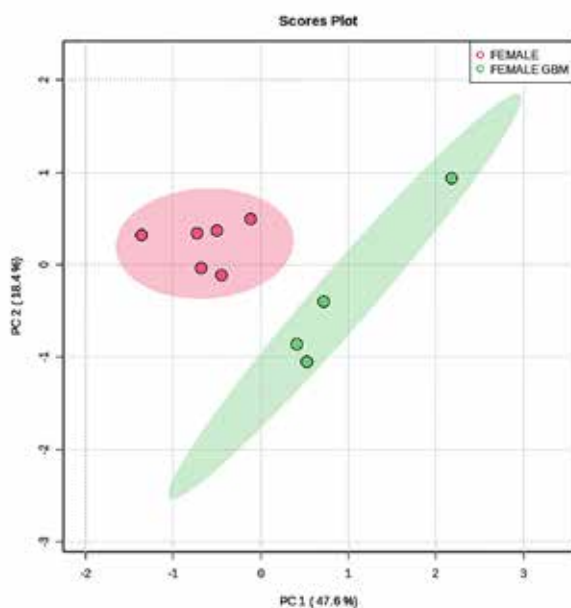
Zo skúmaných metabolitov sme zistili 18 štatisticky významných metabolitov pri porovnávaní intaktnej skupiny a skupiny s GBM bez ohľadu na pohlavie. Najväčšiu skupinu tvorili acylkarnitíny, ktorých bolo trinásť a všetky vykazovali zvýšené koncentrácie, konkrétne išlo o C2, C5,



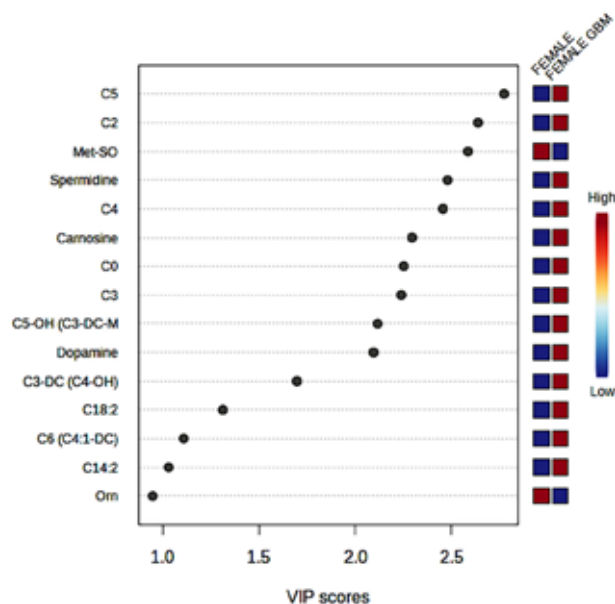
Obr. 1. Scores plot diagram PCA analýzy metabolitov intaktnej skupiny a GBM skupiny bez ohľadu na pohlavie



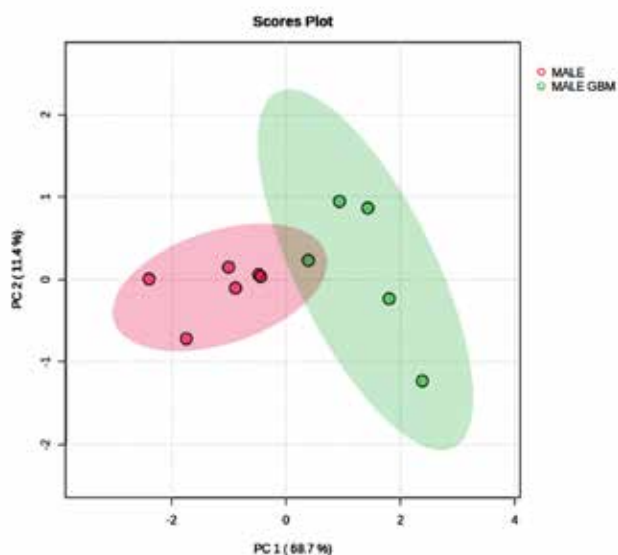
Obr. 2. VIP skóre (PLS-DA test) – porovnanie koncentrácie metabolitov skupiny zdravých jedincov so skupinou jedincov s GBM bez ohľadu na pohlavie



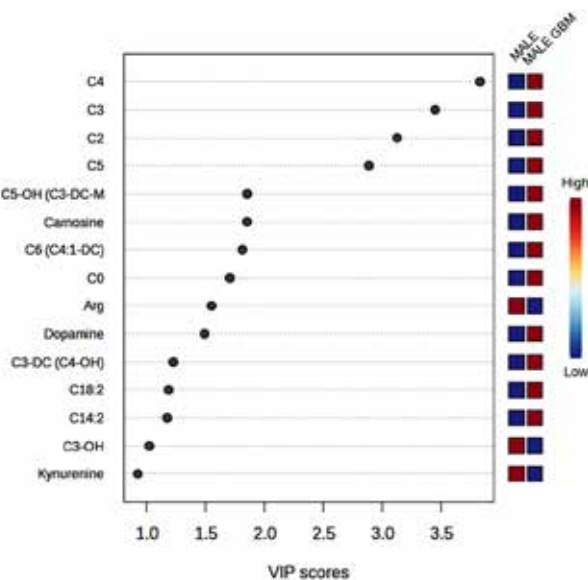
Obr. 3. Scores plot diagram PCA analýzy metabolitov experimentálnych skupín samíc



Obr. 4. VIP skóre (PLS-DA test) – porovnanie koncentrácie metabolitov experimentálnych skupín samíc



Obr. 6. VIP skóre (PLS-DA test) – porovnanie koncentrácie metabolitov experimentálnych skupín samcov



Obr. 5. Scores plot diagram PCA analýzy metabolitov experimentálnych skupín samcov

C3, C4, C0, C3-DC (C4-OH), C5-OH (C3-DC-M), C18:2, C5:1, C6 (C4:1-DC), C16:2, C14:2, C14:1. K zvýšenej koncentrácii došlo aj v prípade troch biogénnych amínov, a to kreatíninu, dopamínu a karnozínu. Znížená koncentrácia bola nameraná v prípade dvoch biogénnych amínov, konkrétne ADMA – asymetrický dimetylarginín a Met-SO – metionín sulfoxid. Zo skupiny aminokyselín sme nezistili ani jednu významnú aminokyselinu (dáta nie sú zobrazené).

Analýza hlavných komponentov (PCA) je matematická štatistická metóda, ktorá hľadá kombinácie pozorovaní so zachovaním čo najväčšieho množstva informácií o týchto pozorovaniach (premenných). Obr. 1. znázorňuje scores plot diagram, ktorý bol vyhodnotený PCA analýzou. Diagram porovnáva intaktnú skupinu so skupinou jedincov s GBM, pričom jasne znázorňuje viditeľnú separáciu skupín, čo signalizuje značnú zmenu koncentrácie detegovaných metabolitov.

PLS-DA analýza (partial least squares-discrimination analysis) využíva prvky PCA analýzy a na základe závislých a nezávislých premenných hľadá vo vzorke dát vzťahy a rovinu medzi nimi. Na základe týchto vzťahov je možné v dátach určiť tie najvýznamnejšie na základe VIP skóre (Variable Importance Point). Pri porovnaní skupiny zdravých jedincov so skupinou jedincov s chemicky navodeným nádorom mozgu bolo zistené zvýšenie koncentrácie trinástich významnejších metabolitov v skupine jedincov s GBM – Obr. 2. Najväčšiu časť z nich tvoria acylkarnitíny, konkrétne C4, C3, C2, C5, C5-OH (C3-DC-M), C0, C6(C4:1-DC), C3-DC (C4-OH), C18:2, C14:2. Zo skupiny biogénnych amínov ide o karnozín, dopamín a spermidín. Naopak k zníženej koncentrácii v skupine jedincov s GBM došlo len v prípade metionín-sulfoxidu (Met-SO) a aminokyseliny arginínu (Arg).

V skupinách experimentálnych samíc sme detegovali 5 štatisticky najvýznamnejších metabolitov vyhodnotených t-testom. U 4 z nich ide o zvýšenie koncentrácie v skupine samíc s GBM oproti skupine zdravých samíc. Ide o tri ACs, ktoré vykazujú zvýšenie koncentrácie, konkrétne C5, C2 a C0 a dva biogénne amíny, konkrétne spermidín (zvýšená koncentrácia) a Met-SO (znížená koncentrácia) (dáta nie sú zobrazené).

Scores plot diagram, ktorý bol vyhodnotený PCA analýzou, znázornený na Obr. 3. porovnáva experimentálnu skupinu zdravých samíc a skupinu samíc s vyvolaným GBM. Diagram zreteľne segreguje uvedené skupiny, keďže nedochádza k žiadnemu prekryvu, čo značí podstatnú zmenu koncentrácie skúmaných metabolitov.

PLS-DA testom bolo vykonané aj VIP skóre experimentálnych skupín s ohľadom na pohlavie jedincov, pričom bolo zistených tiež pätnásť štatisticky najvýznamnejších metabolitov. V prípade intaktnej skupiny zdravých samíc v porovnaní so skupinou samíc s indukovaným GBM tvoria najväčšiu skupinu signifikantných metabolitov ACs (Obr. 4.). V skupine samíc s GBM došlo k zvýšeniu koncentrácie desiatich ACs, konkrétne – C5, C2, C4, C0, C3, C5-OH (C3-DC-M), C3-DC (C4-OH), C18:2, C6 (C4:1-DC), C14:2. Vyššia koncentrácia v uvedenej skupine bola zistená aj v prípade spermidínu, karnozínu a dopamínu. Naopak znížená koncentrácia bola pozorovaná v prípade Met-SO a aminokyseliny ornitínu (Orn).

V rámci porovnania experimentálnych skupín samcov došlo k výrazným štatistickým zmenám u 13 metabolitov, pričom až u 12 z nich ide o zvýšenie koncentrácie v skupi-

ne samcov s GBM oproti zdravým samcom. Nemalú skupinu tvoria acylkarnitíny, ktorých je desať a všetky vykazujú zvýšenie koncentrácie, konkrétne ide o C3, C2, C4, C5, C3-DC (C4-OH), C18:2, C5:1, C5-OH (C3-DC-M), C0 a C5-DC (C6-OH). Zvýšenú koncentráciu vykazuje aj kreatinín a zníženie koncentrácie bolo zistené len v prípade kynurenínu, oba zo skupiny biogénnych amínov. Zo skupiny aminokyselín patrí medzi štatisticky významnejšie len jedna aminokyselina, konkrétne ornitín, kde bola zaznamenaná zvýšená koncentrácia v skupine samcov s GBM (dáta nie sú zobrazené).

Scores plot diagram, znázornený na Obr. 5. porovnáva experimentálnu skupinu zdravých samcov a skupinu samcov s GBM. Na diagrame pozorujeme z väčšej časti oddelenie uvedených skupín, čo signalizuje značnú zmenu koncentrácie sledovaných metabolitov.

PLS-DA testom vyhodnotených VIP skóre experimentálnych skupín samcov znázorňuje Obr. 6. Ide o porovnanie skupiny zdravých samcov so skupinou samcov s vyvolaným nádorom mozgu, kde najväčšiu skupinu signifikantných metabolitov tvoria ACs. V skupine samcov s GBM došlo k zvýšeniu koncentrácie desiatich ACs, konkrétne – C4, C3, C2, C5, C5-OH (C3-DC-M), C6 (C4:1-DC), C0, C3-DC (C4-OH), C18:2, C14:2. Zvýšenie koncentrácie v skupine samcov s GBM bolo zistené aj v prípade karnozínu a dopamínu. Oproti tomu stoja znížené koncentrácie Arg, C3-OH a kynurenínu.

DISKUSIA

Keďže abnormálny energetický metabolizmus a biologický chaos charakterizujú nádory mozgu, všeobecné princípy analýzy metabolickej kontroly môžu byť účinné pri liečbe rakoviny mozgu. Táto hypotéza je založená na rozdieloch v energetickom metabolizme medzi normálnymi mozgovými bunkami a neoplastickými nádorovými bunkami. Pokiaľ majú mozgové nádory fyziologické prostredie vhodné pre ich energetické potreby, prežijú. Keď je toto prostredie nevyhovujúce, obmedzené alebo náhle zmenené, rastú pomalšie, rast sa zastaví alebo zahynú (S e y f r i e d et al., 2011). Rozmanitosť gliómov je zakorenená v ich pôvode, ako aj v oblasti nádoru, z ktorej sa vzorky odoberajú. Gliómy sa vyznačujú pozoruhodnou biochemickou plasticitou, pokiaľ ide o prispôsobenie sa mikroprostrediu, čo môže viesť k rozvoju rezistencie na liečbu.

Metabolizmus nádorových buniek je definovaný mnohými faktormi, ako je zvýšená spotreba glukózy, hypoxia alebo infiltrácia imunitných buniek, ktoré by sa mali všetky zväžiť pri určovaní najvhodnejšej liečby. Súčasným „zlatým štandardom“ v terapii gliómu je odstránenie najväčšej časti nádoru, ktorá je bezpečne možná chirurgickou resekciou, po ktorej nasleduje temozolomid a radiačná terapia. Temozolomid je alkylačný liek, ktorý je schopný prejsť hematoencefalickou bariérou a pacient ho zvyčajne dobre znáša. Napriek tomu rezistencia rakoviny na tento liek stále predstavuje výzvu, vďaka čomu je štandardná liečba menej ako uspokojujúca. Okrem toho výskumníci predpokladali, že zvýšenú mieru prežitia pacientov možno dosiahnuť resekciou >98% nádoru, no žiaľ, v mnohých prípadoch je to veľmi ťažké dosiahnuť (G a c a - T a b a s z e w s k a et al., 2022).

GBM dospelých je jedným z najsmrteľnejších a najodolnejších zo všetkých malígnych solídnych nádorov. Incidencia sa dramaticky zvyšuje po dosiahnutí veku 54 rokov a dosahuje maximálnu incidencia vo veku 75 až 84 rokov (A l e x a n d e r, C l o u g h e s y, 2017). V Spojených štátoch má GBM priemernú ročnú mieru incidence upravenú podľa veku s konštantným rastom o 3 % ročne u mužov aj žien. Zatiaľ čo incidencia gliómov nižšieho stupňa je takmer podobná u mužov a žien, zhubné nádory mozgu, vrátane GBM, sa vyskytujú 1,6-krát častejšie u mužov (C a r r a n o et al., 2021). Doba perzistencie je u pacientov s diagnózou GBM mimoriadne nízka. Pri diagnostikovanom GBM je priemerná miera prežitia 8 až 15 mesiacov (A n j u m et al., 2017). Napriek niekoľkým medzinárodným snahám je liečba GBM stále najnáročnejšou úlohou v klinickej onkológii. Počas posledného desaťročia sa skúmalo množstvo rôznych spôsobov liečby s veľmi obmedzeným úspechom. Hlavné výzvy v terapii GBM súvisia s lokalizáciou ochorenia a jeho komplexnou a heterogénnou biológiou. Prognóza pacientov s GBM je stále deprimujúca aj napriek postupným pokrokom v chirurgických prístupoch, rádioterapii a adjuvantnej chemoterapii. Na zlepšenie prežitia a kvality života pacientov je však potrebné výraznejšie tempo na dosiahnutie analogických výsledkov s tými, ktoré sa vyskytujú pri niektorých iných druhoch rakoviny (H a n i f et al., 2017).

Metabolomika ako „omická“ veda poskytuje funkčné údaje o bunkovej aktivite, ktoré výrazne prispievajú k pochopeniu biológie rakoviny vrátane biológie mozgových nádorov. Metabolity sú vysoko informatívne ako priamy

znak biochemickej aktivity, preto sa profilovanie metabolitov stalo sľubným prístupom pre klinickú diagnostiku a prognostiku (P a n d e y et al., 2017). Objav onkometabolitov (prostredníctvom metabolomiky) bol tiež doplnený objavom mnohých ďalších metabolitov spojených s rakovinou, ktoré by mohli potenciálne slúžiť ako biomarkery rakoviny. Patria sem početné biomarkery metabolitov nachádzajúce sa v sére, plazme, moči, slinách a vzorkách tkanív (W i s h a r t et al., 2016).

V oblasti mozgových nádorov sú biomarkery získavané neinvazívnymi alebo minimálne invazívnymi technikami veľmi žiadané vzhľadom na ich potenciálne využitie ako doplnok preventívnej medicíny alebo na skrátenie obdobia medzi prvými nešpecifickými príznakmi a konečnou diagnózou (P i e n k o w s k i et al., 2022).

V našej štúdii sa ukázala ako najviac významná skupina metabolitov – acylkarnitíny (ACs), ktoré dominujú pri porovnávaní jedincov bez ohľadu na pohlavie, ale aj pri porovnaní experimentálnych skupín s ohľadom na pohlavie. V oboch pohlaviach, ale aj v skupine jedincov bez ohľadu na pohlavie, ide o zvýšenie koncentrácie v skupinách s GBM oproti zdravým intaktným jedincom. Medzi najvýznamnejšie ACs môžeme zaradiť C5 (izovalerylkarnitín/valerylkarnitín), C3 (propionylkarnitín), C0 (karnitín), C4 (butyryl/ izobutylykarnitín), C2 (acetylkarnitín), C5-OH (C3-DC-M) (hydroxyizovalerylkarnitín), C6 (C4:1-DC) (hexanoylkarnitín), či C3-DC (C4-OH) (hydroxybutyrylkarnitín). Uvedené ACs patria medzi ACs s krátkym reťazcom (C3-C5) a stredne dlhým reťazcom (C6).

B j ö r k b l o m, B. a kol. vykonali komplexnú analýzu metabolomického profilovania metabolitov odvodených z nádorového tkaniva, kde detegovali 224 gliových nádorov resekovaných dospelým pacientom vo veku 25 až 84 rokov. Zo všetkých gliových nádorov predstavoval GBM až 72,3 %. Táto štúdia ukázala, že najzreteľnejšie boli nízke hladiny širokého spektra ACs nájdené v mutovanom astrocytóme v porovnaní s mutovaným oligodendrogliómom a GBM, kde boli hladiny ACs vysoké (B j ö r k b l o m et al., 2022). ACs sú považované za kľúčovú skupinu metabolitov, v ktorej dochádza k narušeniu metabolických dráh v GBM (G i l a r d et al., 2021). Primárnou funkciou karnitínu v bunkách je metabolizmus mastných kyselín. Estery AC sú transportované do mitochondrií na následnú oxidáciu mastných kyselín a produkciu energie. Pri rýchlym raste nádoru a zlyhaní správneho zásobovania krvou chýba nádorovým bunkám dostatok kyslíka pre metabolizmus

energetických zdrojov. V glykolytickej dráhe sa cytosolická glukóza normálne premieňa na pyruvát v aeróbných podmienkach a laktát, keď je nedostatok kyslíka. Hoci sa glukóza považuje za primárny zdroj energie pre normálny mozog dospelých, modelové štúdie ukázali, že hypoxické prostredie podnecuje nádorové bunky k syntéze mastných kyselín a k využívaniu oxidácie mastných kyselín ako primárneho zdroja energie (Björklom et al., 2022).

Štúdia Randa et al., E. C. a kol. ukázala zvýšené hladiny ACs na okraji nádoru v porovnaní s jadrom nádoru, ako aj na rozhraní medzi nádorom a normálnym tkanivom a nie na okraji nádoru susediaceho s vonkajším okrajom mozgu. Toto zistenie naznačuje, že GBM bunky v jadre a na proliferujúcom okraji nádoru podliehajú rôznym úrovňam metabolizmu mastných kyselín, čo vedie k intratumorovej metabolickej heterogenite (Randa et al., 2020).

Yu, D. a kol. vykonali štúdiu, v ktorej odoberali počas operácie tkanivá mozgového nádoru u 76 pacientov. Uskutočnený výskum bol zameraný na metabolické zmeny súvisiace s rôznymi stupňami gliómov na pochopenie molekulárneho mechanizmu progresie gliómu. Detegovali štyri ACs s krátkym reťazcom, ktoré boli významne zvýšené v gliómovom tkanive stupňa III/IV v porovnaní s tkanivami gliómu stupňa II, konkrétne išlo o acetyl-(C2-), propionyl-(C3-), butyryl-(C4-) a hexanoylkarnitín (C6-). Je dobre známe, že ACs úzko súvisia s metabolizmom BCAA a oxidáciou mastných kyselín, pričom pri β -oxidácii mastných kyselín s krátkym reťazcom zohráva kľúčovú úlohu aj séria acylkoenzým A (CoA) dehydrogenáz. Ide o dehydrogenázy, ktoré sa špecificky zameriavajú na butanoyl-CoA (C4-CoA) a hexanoyl-CoA (C6-CoA). V tkanivách gliómu vysokého stupňa boli zistené zvýšené C4- a C6-, avšak hladiny ich dehydrogenáz boli znížené. Táto štúdia naznačuje, že viac ACs s krátkym reťazcom sú silne spojené s progresiou gliómu a ďalej ovplyvňujú prežitie pacientov s gliómom, čo môže byť kľúčový cieľ liečby gliómu a hodnotenia prognózy (Yu et al., 2020).

Na definovanie špecifických metabolických programov, ktoré prispievajú ku gliomagenéze vykonali metabolické profilovanie nádorov a bunkových línií vo svojej štúdii aj Kant, S. a kol. (2020). Skúmali profil astrocytómu nízkeho stupňa (LGA) a GBM, kde všetky identifikované ACs boli zvýšené v GBM v porovnaní s LGA, pričom niektoré vykazovali viac ako 20-násobné zvýšenie. Pri podrobnejšom skúmaní GBM pozorovali značnú heterogenitu a zároveň preukázali dva fenotypy, ktoré definovali ako

AC „vysoký“ a „nízky“. Tieto fenotypy vykazovali rozdiely aj pri vykonaní analýz s použitím RNA (profilovania génovej expresie v mezenchymálnych bunkách) a DNA (mutáciou izocitrátdehydrogenázy – IDH1 a metyláciou promótoru O-6-metylguanín-DNA metyltransferázy) (Kant et al., 2020).

Okrem zvýšenej koncentrácie ACs s krátkym resp. stredne dlhým reťazcom pozorujeme v našej štúdii aj zvýšené množstvo karnitínu. Bogusiewicz, J. a kol. porovnávali vzorky rakoviny s rôznym stupňom. Ich štúdia ukázala, že hladina karnitínu bola významne vyššia v gliómech vysokého stupňa (HGG) v porovnaní s gliómami nízkeho stupňa (LGG). Karnitín je neoddeliteľnou súčasťou správneho fungovania enzýmov (CPT-1, CPT-2, CACT), ktoré sa podieľajú na transporte mastných kyselín s dlhým reťazcom cez vnútornú mitochondriálnu membránu. Tento metabolit sa teda považuje za rozhodujúci regulátor karnitínového kyvadlového systému. Hrá dôležitú úlohu pri plasticite rakoviny a umožňuje splnenie metabolických požiadaviek proliferujúcich nádorových buniek aj v nepriaznivých podmienkach (Bogusiewicz et al., 2021).

Pohlavné dimorfne mechanizmy majú veľký vplyv na biológiu rakoviny a génovú expresiu v mozgových nádoroch, ako je GBM. Hoci sú v GBM dobre opísané účinky špecifické pre pohlavie v incidencii, fenotype choroby a výsledku, je k dispozícii len málo poznatkov na rozlíšenie mužských a ženských pacientov s GBM na molekulárnej úrovni (Carrano et al., 2021). V našom experimente pri porovnávaní experimentálnych skupín samíc a samcov tvoria najväčšiu skupinu signifikantných metabolitov ACs, u ktorých došlo k zvýšeniu koncentrácie. Medzi významné metabolity, u ktorých koncentrácia naopak klesla patrí Met-SO, ktorý patrí do skupiny biogénnych amínov. Pokles pozorujeme v skupine samíc s GBM, ale aj v skupine s GBM pri porovnaní jedincov bez ohľadu na pohlavie, a teda Met-SO môže vystupovať ako potenciálny biomarker.

Met-SO je hlavným produktom oxidácie metionínu (Met), ktorý je vysoko citlivý na oxidáciu prostredníctvom reaktívnych foriem kyslíka. Oxidácia proteínov sa považuje za jeden z hlavných mechanizmov, ktorým je oxidačný stres integrovaný do dráh bunkovej signálnej transdukcie. Vo veľkej miere sa uvádza, že oxidačný stres sa podieľa na progresii rôznych ľudských chorôb vrátane rakoviny, neurodegeneratívnych porúch a cukrovky (Garciaga et al., 2012). Met je esenciálna aminokyselina, ktorá sa

podieľa na niekoľkých kritických metabolických procesoch (Lee, Gladyshev, 2011). Normálne bunky sa množia *in vitro* v prítomnosti homocysteínu, metabolického prekursora metionínu, zatiaľ čo mnohé rakovinové bunkové línie to nedokázali. Pozorovanie tejto závislosti na metioníne predstavuje biochemický rozdiel medzi normálnymi a malígnymi bunkami (Sowers, Sowers, 2022). Nawashiro, H. a kol. preukázali vysokú expresiu aminokyselinového transportéra, a tým zvýšený transport metionínu do gliómových buniek, čo naznačuje mechanizmus reakcie na defekty v intracelulárnej syntéze metionínu (Nawashiro et al., 2005). Wang, Z. a kol. vo svojej štúdií zistili vysokú aktivitu metionínového cyklu čo spôsobuje, že spotreba metionínu ďaleko prevyšuje jeho regeneráciu, čo vedie k návyku na exogénny metionín (Wang et al., 2019). Je pravdepodobné, že viaceré faktory v nádorových bunkách sa kombinujú a vytvárajú závislosť od exogénneho metionínu a relatívny príspevok týchto faktorov by sa mohol líšiť od jednej bunky k druhej a silne závisieť od podmienok v mikroprostredí nádoru (Sowers, Sowers, 2022). Bol zistený priamy vzťah medzi oxidačným stresom a rakovinou (Martinez et al., 2017). Nádorové bunky sú vo všeobecnosti závislé od metionínu v dôsledku povahy ich nepretržitej proliferácie. Wang, L. a kol. vo svojej štúdií vytvorili bunky tolerantné voči metionínu, aby študovali odpoveď gliómu na prostredie s obmedzeným metionínom, pričom zistili, že došlo k zníženiu proliferácie nádorových buniek pri nedostatku metionínu (Wang et al., 2021).

Fukagawa, N. K. a kol. študovali rozdiely súvisiace s pohlavím v kinetike metionínového cyklu. Ide o prvú štúdiu, ktorá uvádza a kvantifikuje rozdiely v rýchlosti remetylácie homocysteínu medzi mužmi a ženami. Štúdie sa zúčastnilo 11 mužov a 11 žien, pričom zistili podobné koncentrácie homocysteínu nalačno. Po perorálnom podaní metionínu boli miery remetylácie a transmetrylácie vyššie u žien ako u mužov. Uvedené zistenia pripisujú rozdielom, ktoré súvisia s pohlavím v metionín syntáze (5-metyltetrahydrofolát-homocysteín metyltransferáza) alebo betaín homocysteín metyltransferázovej dráhe alebo v oboch uvedených metabolických krokoch (Fukagawa et al., 2000). Posúdenie úlohy akumulácie a metabolizmu Met pri zvýšenej citlivosti mužských hepatocytov na toxicitu Met v porovnaní so ženskými hepatocytmi vykonali aj Dever a Elfarrá. Ich štúdia preukázala vyššie celkové hladiny Met v mužských hepatocytoch ako v žen-

ských, čo môže naznačovať zvýšenú citlivosť mužských hepatocytov na toxicitu Met (Dever, Elfarrá, 2009). V našej štúdií sme detegovali Met-SO ako významný metabolit, avšak v znížených koncentráciách v skupinách s GBM oproti zdravým jedincom. Mnohé štúdie popisujú závislosť nádorových buniek od metionínu. Met-SO môže byť redukovaný späť na Met (Lee, Gladyshev, 2011), a teda významne znížená koncentrácia Met-SO môže signalizovať zvýšenú spotrebu Met nádorovými bunkami, aj napriek tomu, že samotný Met nepatrí medzi významné metabolity nášho experimentu.

Zhao, H. a kol. vykonali metabolické profilovanie vzoriek plazmy od pacientov s gliómom a získali päť metabolitov, arginín, uracil, laktát, cysteamín a ornitín, ktorých hladiny sa medzi pacientmi s LGG a HGG významne líšili. Hladiny arginínu boli vyššie v LGG ako v HGG. Viaceré štúdie naznačujú, že zvýšená závislosť od exogénneho arginínu je typická pre mnohé malígne nádorové bunky *in vitro* aj *in vivo*. Tieto zistenia naznačujú významné zmeny v dráhach súvisiacich s metabolizmom aminokyselín (Zhao et al., 2016). V našej štúdií sa ukázal arginín ako významný metabolit, ktorého koncentrácia v skupinách jedincov s GBM bez ohľadu na pohlavie, ako aj v skupine samčích jedincov s GBM klesla.

Cieľom mnohých štúdií v súčasnosti je detegovať významné metabolity, ktoré by obsiahli funkciu biomarkrov, a tým poskytli priaznivejšiu predpoveď pre pacientov nielen s rakovinou mozgu, ale aj inými typmi rakoviny. Je dobre známe, že nádorové bunky sú charakterizované metabolickým preprogramovaním a agresívnym postupom, preto je nevyhnutné určiť správne medicínske postupy na zlepšenie života pacientov.

ZÁVER

V tejto štúdií boli analyzované krvné séra experimentálnych zvierat po chemicky indukovanom nádore mozgu. Vytvorili sa experimentálne skupiny, ktoré sa následne vyhodnocovali pomocou štatistických multivariačných metód ako je PCA analýza, PLS-DA analýza alebo t-test. Hlavným cieľom tejto práce bolo vytipovať najdôležitejšie metabolity zmenené v študovaných mozgových ochoreniach so zameraním sa na aminokyseliny, biogénne amíny a acylkarnitíny. Štatistickou analýzou 81 metabolitov boli porovnávané skupiny zdravých intaktných jedincov

so skupinami jedincov s indukovaným glioblastómom, či už s ohľadom alebo bez ohľadu na pohlavie. Pri nediferencovanom rode bolo detegovaných 15 významných metabolitov, kde najväčšiu skupinu tvorili acylkarnitínny s krátkym resp. stredne dlhým reťazcom, ktorých koncentrácie boli zvýšené v skupinách s vyvolaným nádorom mozgu. Tie patrili medzi štatisticky významné aj pri porovnávaní samčích a samičích experimentálnych skupín, čo naznačuje, že nádorové bunky v hypoxickom prostredí sú podnecované k využitiu ako primárneho zdroja energie oxidáciu mastných kyselín.

Ako ďalší významný metabolit sa ukázal metionín-sulfoxid (Met-SO), ktorého koncentrácia oproti acylkarnitínom klesla v skupinách jedincov s vyvolaným nádorom mozgu. Viaceré štúdie dokázali závislosť nádorových buniek na metioníne. Ten sa v oxidačnom strese oxiduje na Met-SO, ktorý môže byť spätne redukovaný na metionín. Keďže došlo k zníženiu koncentrácie Met-SO predpokladáme spätnú reakciu v prospech metionínu pre potreby proliferácie nádorových buniek.

Našou štúdiou sme vytypovali štatisticky najvýznamnejšie metabolity, no napriek veľkej pozornosti rôznych výskumov je dôležité realizovať ďalšie experimenty, ktoré by uvedené metabolity, ako potenciálne biomarkery, potvrdili resp. vyvrátili. Využitie biomarkerov v praxi, či už pričasnej diagnostike alebo pri samotných liečebných postupoch, predstavuje základný pilier metabolomiky na určenie účinnosti lekárskeho zásahov pri rakovine.

PodĎakovanie

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. ABOU-ANTOUN, T. J., HALE, J. S., LATHIA, J. D., DOMBROWSKI, S. M. (2017): Brain Cancer Stem Cells in Adults and Children: Cell Biology and Therapeutic Implications. *Neurotherapeutics*, 14, 372–384.
2. ALEXANDER, B. M., CLOUGHESY, T. F. (2017): Adult Glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 35, 2402–2409.
3. ANJUM, K., SHAGUFTA, B. I., ABBAS, S. Q., PATEL, S., KHAN, I., SHAH, S. A. A., AKHTER, N., HASSAN, S. S. U. (2017): Current status and future therapeutic perspectives of glioblastoma multiforme (GBM) therapy: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 92, 681–689.
4. ARMITAGE, E. G., BARBAS, C. (2014): Metabolomics in cancer biomarker discovery: Current trends and future perspectives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, 1–11.
5. BEGER, R. D. (2013): A review of applications of metabolomics in cancer. *Metabolites*, 3, 552–574.
6. BJÖRKBLOM, B., WIBOM, C., ERIKSSON, M., BERGENHEIM, A. T., SJÖBERG, R. L., JONSSON, P., BRÄNNSTRÖM, T., ANTTI, H., SANDSTRÖM, M., MELIN, B. (2022): Distinct metabolic hallmarks of WHO classified adult glioma subtypes. *Neuro-Oncology*, 24, 1454–1468.
7. BOGUSIEWICZ, J., BURLIKOWSKA, K., JAROCH, K., GORYNSKA, P. Z., GORYNSKI, K., BIRSKI, M., FURTAK, J., PACZKOWSKI, D., HARAT, M., BOJKO, B. (2021): Profiling of Carnitine Shuttle System Intermediates in Gliomas Using Solid-Phase Microextraction (SPME). *Molecules*, 26, 6112.
8. CARRANO, A., JUAREZ, J. J., INCONTRI, D., IBARRA, A., GUERRERO CAZARES, H. (2021): Sex-Specific Differences in Glioblastoma. *Cells*, 10, 1783.
9. DEVER, J. T., ELFARRA, A. A. (2009): Gender differences in methionine accumulation and metabolism in freshly isolated mouse hepatocytes: potential roles in toxicity. *Toxicol Appl. Pharmacol.*, 236, 358–65.
10. FADRUS, P., LAKOMÝ, R., HÜBNEROVÁ, P., SLABÝ, O., KEŘKOVSKÝ, M., SVOBODA, T., VYBÍHAL, V., NEUMAN, E., KRYŠTOFOVÁ, S., SOVA, M., SMRČKA, M. (2010): *Intrakraniální nádory – diagnostika a terapie*.
11. FADRUS, P., ŠLAMPÁ, P., LAKOMÝ, R., SMRČKA, M. (2015): Komplexní terapie gliomů mozku. *Onkologie*, 9, 214–217.
12. FUKAGAWA, N. K., MARTIN, J. M., WURTHMANN, A., PRUE, A. H., EBENSTEIN, D., O'ROURKE, B. (2000): Sex-related differences in methionine metabolism and plasma homocysteine concentrations. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 22–29.
13. GACA-TABASZEWSKA, M., BOGUSIEWICZ, J., BOJKO, B. (2022): Metabolomic and Lipidomic Profiling of Gliomas-A New Direction in Personalized Therapies. *Cancers (Basel)*, 14.
14. GARCIA-GARCIA, A., RODRIGUEZ-ROCHA, H., MADAYIPUTHIYA, N., PAPPAS, A., PANAYIOTIDIS, M., FRANCO, R. (2012): Biomarkers of protein oxidation in human disease. *Current Molecular Medicine*, 12, 681–697.
15. GILARD, V., FERREY, J., MARGUET, F., FONTANILLES, M., DUCATEZ, F., PILON, C., LESUEUR, C., PEREIRA, T., BASSET,

- C., SCHMITZ-AFONSO, I., DI FIORÉ, F., LAQUERRIÈRE, A., AFONSO, C., DERREY, S., MARRET, S., BEKRI, S., TEBANI, A. (2021): Integrative Metabolomics Reveals Deep Tissue and Systemic Metabolic Remodeling in Glioblastoma. *Cancers*, 13, 5157.
16. GUPTA, A., DWIVEDI, T. (2017): A Simplified Overview of World Health Organization Classification Update of Central Nervous System Tumors 2016. *J. Neurosci. Rural Pract.*, 8, 629–641.
17. HANIF, F., MUZAFFAR, K., PERVEEN, K., MALHI, S. M., SIM-JEE SH, U. (2017): Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pac. J. Cancer. Prev.*, 18, 3–9.
18. KANT, S., KESARWANI, P., PRABHU, A., GRAHAM, S. F., BUELOW, K. L., NAKANO, I., CHINNAIYAN, P. (2020): Enhanced fatty acid oxidation provides glioblastoma cells metabolic plasticity to accommodate to its dynamic nutrient microenvironment. *Cell Death & Disease*, 11, 253.
19. LEE, B. C., GLADYSHEV, V. N. (2011): The biological significance of methionine sulfoxide stereochemistry. *Free Radical Biology and Medicine*, 50, 221–227.
20. LIBERTI, M. V., LOCASALE, J. W. (2016): The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*, 41, 211–218.
21. MARIE, S. K. N., SHINJO, S. M. O. (2011): Metabolism and Brain Cancer. *Clinics*, 66, 33–43.
22. MARTÍNEZ, Y., LI, X., LIU, G., BIN, P., YAN, W., MÁZ, D., VALDIVIÉ, M., HU, C.-A. A., REN, W., YIN, Y. (2017): The role of methionine on metabolism, oxidative stress, and diseases. *Amino Acids*, 49, 2091–2098.
23. NAWASHIRO, H., OTANI, N., UOZUMI, Y., OOIGAWA, H., TOYOOKA, T., SUZUKI, T., KATOH, H., TSUZUKI, N., OHNURI, A., SHIMA, K., SHINOMIYA, N., MATSUO, H., KANAI, Y. (2005): High expression of L-type amino acid transporter 1 in infiltrating glioma cells. *Brain Tumor Pathology*, 22, 89–91.
24. PANDEY, R., CAFLISCH, L., LODI, A., BRENNER, A. J., TIZIANI, S. (2017): Metabolomic signature of brain cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 56, 2355–2371.
25. PIENKOWSKI, T., KOWALCZYK, T., GARCIA-ROMERO, N., AYUSO-SACIDO, A., CIBOROWSKI, M. (2022): Proteomics and metabolomics approach in adult and pediatric glioma diagnostics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Cancer*, 1877, 188721.
26. RANDALL, E. C., LOPEZ, B. G. C., PENG, S., REGAN, M. S., ABDELMOULA, W. M., BASU, S. S., SANTAGATA, S., YOON, H., HAIGIS, M. C., AGAR, J. N., TRAN, N. L., ELMQUIST, W. F., WHITE, F. M., SARKARIA, J. N., AGAR, N. Y. R. (2020): Localized Metabolomic Gradients in Patient-Derived Xenograft Models of Glioblastoma. *Cancer Research*, 80, 1258–1267.
27. REYNOSO-NOVERÓN, N., MOHAR-BETANCOURT, A., ORTIZ-RAFAEL, J. (2021): Epidemiology of Brain Tumors. In MONROY-SOSA, A., CHAKRAVARTHI, S. S., DE LA GARZA-SALAZAR, J. G., MENESES GARCIA, A., KASSAM, A. B. (eds.): *Principles of Neuro-Oncology: Brain & Skull Base*. Springer International Publishing.
28. SEYFRIED, T. N., KIEBISH, M. A., MARSH, J., SHELTON, L. M., HUYSENTRUYT, L. C., MUKHERJEE, P. (2011): Metabolic management of brain cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 1807, 577–94.
29. SEYFRIED, T. N., MUKHERJEE, P. (2005): Targeting energy metabolism in brain cancer: review and hypothesis. *Nutrition & Metabolism*, 2, 30.
30. SOWERS, M. L., SOWERS, L. C. (2022): Glioblastoma and Methionine Addiction. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 7156.
31. TORP, S. H., SOLHEIM, O., SKJULSVIK, A. J. (2022): The WHO (2021) Classification of Central Nervous System tumours: a practical update on what neurosurgeons need to know—a minireview. *Acta Neurochir (Wien)*, 164, 2453–2464.
32. WANG, L., HU, B., PAN, K., CHANG, J., ZHAO, X., CHEN, L., LIN, H., WANG, J., ZHOU, G., XU, W. (2021): SYVN1-MTR4-MAT2A signaling Axis regulates methionine metabolism in glioma cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 633259.
33. WANG, Z., YIP, L. Y., LEE, J. H. J., WU, Z., CHEW, H. Y., CHONG, P. K. W., TEO, C. C., ANG, H. Y.-K., PEH, K. L. E., YUAN, J., MA, S., CHOO, L. S. K., BASRI, N., JIANG, X., YU, Q., HILLMER, A. M., LIM, W. T., LIM, T. K. H., TAKANO, A., TAN, E. H., TAN, D. S. W., HO, Y. S., LIM, B., TAM, W. L. (2019): Methionine is a metabolic dependency of tumor-initiating cells. *Nature Medicine*, 25, 825–837.
34. WISHART, D. S., MANDAL, R., STANISLAUS, A., RAMIREZ-GAONA, M. (2016): Cancer Metabolomics and the Human Metabolome Database. *Metabolites*, 6, 10.
35. YU, D., XUAN, Q., ZHANG, C., HU, C., LI, Y., ZHAO, X., LIU, S., REN, F., ZHANG, Y., ZHOU, L., XU, G. (2020): Metabolic Alterations Related to Glioma Grading Based on Metabolomics and Lipidomics Analyses. *Metabolites*, 10.
36. ZHAO, H., HEIMBERGER, A. B., LU, Z., WU, X., HODGES, T. R., SONG, R., SHEN, J. (2016): Metabolomics profiling in plasma samples from glioma patients correlates with tumor phenotypes. *Oncotarget*, 7, 20486–95.