



**UNIwersYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**

Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Bydgoszcz, 2023 r.



**UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**
Wydział Lekarski
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Joanna Marta Bogusiewicz

Analiza lipidomiczna w diagnostyce guzów mózgu

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu

Promotor:

Dr hab. Barbara Bojko, prof. UMK

Bydgoszcz, 2023 r.

Składam serdeczne podziękowania Pani dr hab. Barbarze Bojko, prof. UMK za wiarę we mnie i ukierunkowanie abym odważyła się sięgnąć po to co wydawało się nieosiągalne. Dziękuję za liczne poprawki, komentarze i ukazanie ogromnych możliwości, które przede mną się pojawiły. Dziękuję za cierpliwość przy moich potknięciach i wspólną radość przy nawet najmniejszych sukcesach.

Dziękuję Panu Profesorowi Januszowi Pawliszynowi za możliwość poszerzenia mojej wiedzy i zdobycia nowych umiejętności podczas stażu w Jego laboratorium, a także wsparcie w realizacji badań do niniejszej rozprawy doktorskiej.

Dziękuję Panu Profesorowi Markowi Haratowi wraz z zespołem z Kliniki Neurochirurgii 10 Wojskowego Szpitala Klinicznego z Polikliniką w Bydgoszczy za umożliwienie pozyskania materiału biologicznego do badań, a także współpracę przebiegającą w przyjaznej atmosferze.

Dziękuję koleżankom i kolegom z Katedry Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej za dobrą atmosferę, pomoc w realizacji kolejnych etapów niniejszej rozprawy doktorskiej, a także za chwile spędzone na wspólnym piciu niezmiernych ilości kawy.

Dziękuję Monice, Mariuszowi, Kasi, Gracjanowi oraz moim bezcennym przyjaciołom za wsparcie w dążeniu do obranego celu. Dawaliście mi energię, która podtrzymywała motywację do dalszej pracy, a jednocześnie mieliście udział w tym, abym zachowała odpowiednią równowagę pomiędzy pracą i odpoczynkiem.

Składam serdeczne podziękowania rodzicom, Ewie i Januszowi za wspieranie mnie w podejmowaniu moich decyzji nawet wtedy gdy nie wydawały się one rozsądne. Dziękuję, że byliście zawsze wtedy gdy Was potrzebowałam.

*Moim rodzicom,
Ewie i Januszowi*

Przedstawiona rozprawa doktorska została zrealizowana dzięki następującym źródłom finansowania:

1. Grant pozyskany ze środków Narodowego Centrum Nauki pt. *Nowe rozwiązania analityczne w onkologii: od badań podstawowych do szybkiej diagnostyki śródoperacyjnej; HARMONIA 7; nr 2015/18/M/ST4/00059.*
2. Grant pozyskany ze środków Ministerstwa obrony Narodowej pt. *Profilowanie metabolomiczne i lipidomiczne substancji białej i szarej kory mózgowej z wykorzystaniem nowoczesnej technologii opartej na biopsji chemicznej połączonej ze spektrometrem mas; KOŚCIUSZKO, II edycja (508/2017/DA).*

Spis treści

1. Wykaz publikacji stanowiących podstawę postępowania w sprawie o nadanie stopnia naukowego doktora	14
2. Wykaz skrótów	15
3. Streszczenie w języku polskim	18
4. Streszczenie w języku angielskim	20
5. Wstęp	22
5.1. Klasyfikacja guzów mózgu	22
5.1.1. Mutacja w genie kodujących dehydrogenazę izocytrynianową.....	22
5.1.2. Kodecja 1p/19q	23
5.2. Diagnostyka guzów mózgu	24
5.3. Leczenie guzów mózgu.....	24
5.4. Nowoczesne techniki szybkiej diagnostyki guzów mózgu.....	25
5.5. Mikroekstrakcja do fazy stałej – biopsja chemiczna.....	28
5.6. Lipidomika	33
5.6.1. Podział i rola lipidów	34
5.6.2. Lipidom w komórkach nowotworowych.....	37
5.6.3. Przygotowanie próbki do analizy lipidomicznej	38
5.6.4. Platformy analityczne wykorzystywane w analizie lipidomicznej	38
6. Cel rozprawy doktorskiej	40
7. Wyniki badań	41
7.1. Zastosowanie biopsji chemicznej do charakterystyki lipidomu guzów mózgu – P.1.	41
Kopia pracy P.1.	44

7.2. Profilowanie acylokarnityn w glejakiach – P.2.....	73
Kopia pracy P.2.....	75
7.3. Zastosowanie biopsji chemicznej do przestrzennego profilowania ludzkiej tkanki mózgowej <i>in vivo</i> – P.3.....	92
Kopia pracy P.3.....	95
8. Wnioski.....	128
9. Wkład wyników w rozwój nauki, możliwości aplikacyjne	129
10. Piśmiennictwo.....	130
11. Spis rycin	138
12. Wykaz osiągnięć doktorantki	139
12.1. Wykaz publikacji współautorskich	140
12.2. Wykaz doniesień konferencyjnych.....	142
12.2.1. Doniesienia konferencyjne przedstawiane przed doktorantką.....	142
12.2.2. Doniesienia konferencyjne których doktorantka jest współautorką	144
12.3. Wykonawstwo w grantach badawczych	147
12.4. Wykaz staży zagranicznych	147
12.5. Wykaz nagród.....	147
12.5.1. Stypendia wyjazdowe.....	147
12.5.2. Nagrody na konferencjach	148
12.5.3. Nagrody o zasięgu uczelnianym	148
12.5.4. Inne.....	148
12.6. Pozostałe formy działalności naukowej	149
12.6.1. Członkostwo w towarzystwach naukowych.....	149
12.6.2. Recenzowanie artykułów w czasopismach naukowych.....	149
12.6.3. Inne formy działalności naukowej	149

13.	Opinia Komisji Bioetycznej	150
13.1.	Projekt HARMONIA 7	151
13.2.	Projekt Kościuszko II	156
14.	Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej.....	162
15.	Oświadczenia współautorów	164

1. Wykaz publikacji stanowiących podstawę postępowania w sprawie o nadanie stopnia naukowego doktora

P.1. J. Bogusiewicz, B. Kupcewicz, P.Z. Goryńska, K. Jaroch, K. Goryński, M. Birski, J. Furtak, D. Paczkowski, M. Harat, B. Bojko: ***Investigating the Potential Use of Chemical Biopsy Devices to Characterize Brain Tumor Lipidomes***. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23, 3518
IF – 6,208 MNiE – 140pkt

P.2. J. Bogusiewicz, K. Burlikowska, K. Jaroch, P.Z. Gorynska, K. Gorynski, M. Birski, J. Furtak, D. Paczkowski, M. Harat, B. Bojko: ***Profiling of carnitine shuttle system intermediates in gliomas using solid-phase microextraction (SPME)***. Molecules, 2021, 26, 6112
IF – 4,927 MNiE – 140pkt

P.3. J. Bogusiewicz, K. Burlikowska, K. Łuczykowski, K. Jaroch, M. Birski, J. Furtak, M. Harat, J. Pawliszyn, B. Bojko: ***New Chemical Biopsy Tool for Spatially Resolved Profiling of Human Brain Tissue in vivo***. Scientific Reports, 2021, 11, 19522
IF – 4,997 MNiE – 140pkt

Łączna wartość wskaźnika impact factor (IF) dla prac wchodzących w cykl: 16,132.

Łączna wartość punktów Ministerstwa Edukacji i Nauki(MEiN) dla prac wchodzących w cykl: 420.

2. Wykaz skrótów

2-HG	ang. 2-hydroxyglutaric acid	2-hydroksyglutaran
2-OG	ang. 2-oxyglutaric acid	2-oksyglutaran
5-ALA	ang. 5-aminolevulinic acid	Kwas 5- aminolewulinikowy
BHT	ang. <i>Butylated hydroxytoluene</i>	Butylowany hydroksytoluen
CACT	ang. <i>Carnitine-acylcarnitine translocase</i>	Translokaza karnityno-acylokarnitynowa
CBS-MS	ang. <i>Coated blade spray mass spectrometry</i>	-
CPT-1	ang. <i>Carnitine palmitoyltransferase 1</i>	Palmitoilotransferaza karnitynowa 1
CPT-2	ang. <i>Carnitine palmitoyltransferase 2</i>	Palmitoilotransferaza karnitynowa 2
CT	ang. <i>Computed tomography</i>	Tomografia komputerowa
CUSA	ang. <i>Cavitation ultrasonic surgical aspiration</i>	Nóż ultradźwiękowy
DESI-MS	ang. <i>Desorption electrospray ionization mass spectrometry</i>	Desorpcyjna jonizacja przez elektrorozpylanie połączona ze spektrometrią mas
ESI	ang. <i>Electrospray Ionization</i>	Jonizacja przez elektrorozpylanie
FA	ang. <i>Fatty acids</i>	Kwasy tłuszczowe
FAO	ang. <i>Fatty acids oxidation</i>	Utlenianie kwasów tłuszczowych
FDA	ang. <i>Food and Drug Agency</i>	Agencja Żywności i Leków
GC	ang. <i>Gas chromatography</i>	Chromatografia gazowa
GL	ang. <i>Glycerolipids</i>	Glicerolipidy
GP	ang. <i>Glycerophospholipids</i>	Fosfolipidy
HGG	ang. <i>High grade glioma</i>	Wysoko-złośliwy glejak
HIF α	ang. <i>Hypoxia induced factor α</i>	Czynnik indukowany hipoksją α
HILIC	ang. <i>Hydrophilic interaction liquid chromatography</i>	Chromatografia oddziaływań hydroflowych

HLB	ang. <i>Hydrophilic-lipophilic balance</i>	Zrównoważone hydrofilowo-lipofilowe
HRMS	ang. <i>High resolution mass spectrometry</i>	Wysokorozdzielcza spektrometria mas
ICE	ang. <i>In-line cartridge extraction</i>	-
IDH	ang. <i>Isocitrate dehydrogenase</i>	Dehydrogenaza izocytrynianowa
IDHm	ang. IDH mutant	Mutacja w IDH
IDHw	ang. <i>IDH wildtype</i>	IDH typu dzikiego
iMRI	ang. <i>intra magnetic resonance imaging</i>	Śródoperacyjne obrazowanie rezonansem magnetycznym
LC	ang. <i>Liquid chromatography</i>	Chromatografia cieczowa
LCAC	ang. <i>Long chains acylcarnitines</i>	Acylokarnityny o długim łańcuchu acylowym
LCAD	ang. <i>Long-chain acylcarnitines</i>	Dehydrogenaza długołańcuchowych acylo-coa
LC-HRMS	ang. <i>Liquid chromatography high resolution mass spectrometry</i>	Chromatografia cieczowa połączona z wysokorozdzielczą spektrometrią mas
LGG	ang. <i>Low grade glioma</i>	Nisko-złośliwy glejak
LPC	ang. <i>Lysophospholipids</i>	Lisofosfolipidy
MALDI-MS	ang. <i>Matrix-assisted laser desorption/ ionization coupled with mass spectrometry</i>	Laserowa desorpcja/ionizacja wspomagana matrycą połączona ze spektrometrią mas
MEiN	-	Ministerstwo Edukacji i Nauki
MGMT	ang. <i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i>	metylotransferaza O6-metyloguaniny-DNA
MOI-MS	ang. <i>Microfluidic open interface mass spectrometry</i>	-
MRI	ang. <i>Magnetic resonance imaging</i>	Obrazowanie rezonansem magnetycznym
MS	ang. <i>Mass spectrometry</i>	Spektrometria mas
MTBE	ang. <i>Methyl tert-butyl ether</i>	Eter tert-butylovo-metylowy
MTIC	ang. <i>Methyl-triazenylimidazole-carboximide</i>	Metylo-triazenoimidazolo-karboksamid

NPLC	ang. <i>Normal phase liquid chromatography</i>	Chromatografia w normalnym układzie faz
OCT	ang. <i>Optical coherence tomography</i>	Optyczna koherencyjna tomografia komputerowa
PA	ang. <i>Phosphatidic acid</i>	Kwas fosfatydowy
PC	ang. <i>Glycerophosphocholine</i>	Fosfatydylocholina
PE	ang. <i>Glycerophosphoethanolamine</i>	Fosfatydyloetanolamina
PESI	ang. <i>Probe electrospray ionization</i>	-
PET	ang. <i>Positron emission tomography</i>	Pozytronowa tomografia emisyjna
PG	ang. <i>Glycerophosphoglycerol</i>	Fosfatydyloglicerol
PI	ang. <i>Glycerophosphoinositol</i>	Fosfatydyloinozytol
PK	ang. <i>Polyketides</i>	Poliketydy
PR	ang. <i>Prenol lipids</i>	Prenole
PS	ang. <i>Glycerophosphoserine</i>	Fosfatydyloseryna
REIMS	ang. <i>Rapid evaporative ionization mass spectrometry</i>	Szybka ewaporacyjno-jonizacyjna spektrometria mas
RPLC	ang. <i>Reversed phase liquid chromatography</i>	Chromatografia odwróconych faz
SCAC	ang. <i>Short acylcarnitine chains</i>	Acylokarnityny o krótkim łańcuchu acylowym
SL	ang. <i>Saccharolipids</i>	Sacharolipidy
SP	ang. <i>Sphingolipids</i>	Sfingolipidy
SPME	ang. <i>Solid phase microextraction</i>	Mikroekstrakcja do fazy stałej
ST	ang. <i>Sterol lipids</i>	Sterole
TMZ	ang. <i>Temozolomide</i>	Temozolomid
VEGF	ang. <i>Vascular endothelial growth factor</i>	Śródbłonkowy czynnik wzrostu naczyń
WHO	ang. <i>World Health Organization</i>	Światowa Organizacja Zdrowia

3. Streszczenie w języku polskim

Szybka i dokładna diagnostyka guzów mózgu może być jednym z kluczowych etapów terapii pacjentów. Ze względu jednak na trudno dostępną lokalizację zmiany w mózgowiu, a także późną manifestację objawów chorobowych diagnostyka jest często utrudniona. W związku z tym niezbędne są interdyscyplinarne badania z pogranicza chemii analitycznej, diagnostyki medycznej oraz inżynierii chemicznej mające na celu opracowanie nowych podejść diagnostycznych, które ułatwiłyby analizę zmian nowotworowych w mózgowiu. W ostatnich latach opracowano różnego rodzaju narzędzia umożliwiające różnicowanie tkanki nowotworowej i zdrowej a także charakterystykę metabolomiczną badanych tkanek. Jedną z takich technologii jest mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME, ang. *solid-phase microextraction*) nazywana również biopsją chemiczną. Wybór odpowiedniego narzędzia nie jest jednak rozwiązaniem problemu. Istotnym bowiem jest także wyselekcjonowanie związków, które mogłyby wskazywać i różnicować patofizjologiczne zmiany w badanej tkance oraz umożliwiać dobór odpowiedniej terapii. Związkami, które coraz częściej raportowane są za istotne w procesach nowotworowych są lipidy.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było przetestowanie możliwości zastosowania sond SPME w analizie guzów mózgu. Ponadto, dokonano oceny profilu lipidowego glejaków w zależności od stopnia złośliwości, jak i obecności zmian genetycznych: mutacji w genie IDH i kodelecji 1p/19q. Kolejnym celem niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena możliwości zastosowania SPME w badaniach mózgu *in vivo* u ludzi.

Zastosowanie biopsji chemicznej w analizie guzów mózgu pokazało, że profile lipidomiczne niezłośliwych oponiaków różniły się od tych pozyskanych ze złośliwych zmian jakimi są glejaki. Możliwe było także potwierdzenie klasyfikacji próbek pobranych z tej samej zmiany na podstawie wyekstrahowanego zestawu lipidów, co wskazuje na wiarygodność uzyskanych wyników. Badania glejaków wykazały, że lipidom guzów mózgu zmieniał się w zależności od stopnia złośliwości oraz statusu mutacji dla genu kodującego IDH.

Ze względu na istotny udział acylokarnityn w metabolizmie kwasów tłuszczowych, przeanalizowano ich profil w glejakach. Zaobserwowano, że zawartość estrów karnityny w tkance nowotworowej wzrasta w guzach o gorszym rokowaniu klinicznym, czyli zmianach o wyższym stopniu złośliwości oraz próbkach nieposiadających mutacji w genie dla IDH.

Wyłączna detekcja związków o potencjale diagnostycznym *ex vivo* nie jest wystarczająca aby opracować klinicznie użyteczną metodę poboru próbki z mózgowia, która umożliwi szybką analizę w trakcie zabiegu. W związku z tym, zgodnie z naszą wiedzą, po raz pierwszy opracowano i przetestowano sondę SPME w badaniach mózgu człowieka w warunkach operacyjnych. Ze względu jednak na różną lokalizację i heterogenność guzów mózgu, badania pilotażowe dotyczyły profilowania struktur mózgu, a nie różnicowania tkanki zdrowej i nowotworowej. Niniejsze badania miały na celu scharakteryzowanie istoty białej i szarej mózgu z wykorzystaniem sondy SPME, która umożliwiała pobranie próbki jednocześnie z obu struktur. W rezultacie możliwe było wyekstrahowanie zestawu metabolitów o szerokim zakresie właściwości fizykochemicznych. Na szczególną uwagę zasługują lipidy, gdyż ich liczba i poziom był najwyższy. Uzyskane wyniki metabolomiczne i lipidomiczne nie wykazały jednak różnicowania próbek należących do istoty szarej i białej, co prawdopodobnie wiązało się ze zbyt małą grubą badaną i zbyt dużą zmiennością międzypersonalną.

Podsumowując, badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wskazują na użyteczność sond mikroekstrakcyjnych w badaniach guzów mózgu, a także w lipidomicznym profilowaniu oponiaków i glejaków z uwzględnieniem stopnia złośliwości i genotypu. Zaobserwowano także, że biopsja chemiczna może być użyteczna w badaniach mózgu *in vivo* co pokazuje potencjał dla przyszłych badań guzów mózgu w trakcie zabiegów neurochirurgicznych.

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

4. Streszczenie w języku angielskim

Lipidomic analysis in the diagnosis of brain tumors

Fast and accurate diagnosis of brain tumors can be one of the key steps in patient therapy. However, due to the hard-to-reach location of the lesion in the brain, as well as the late manifestation of disease symptoms, diagnosis is often difficult. Therefore, interdisciplinary research on the borderline of analytical chemistry, medical diagnostics and chemical engineering is necessary to develop new diagnostic approaches that would facilitate the analysis of neoplastic changes in the brain. In recent years, various types of tools have been developed to enable the differentiation of neoplastic and healthy tissue as well as the metabolomic profile of the examined tissues. One such technology is solid-phase microextraction (SPME), also known as chemical biopsy. Although, the choice of the right tool is not a sufficient to solve entire problem. It is also important to select compounds that could indicate and differentiate pathophysiological changes in the examined tissue and enable the selection of appropriate therapy. Lipids are the compounds which are recently more often being reported as important in cancer processes.

The aim of this doctoral dissertation was to test the applicability of SPME probes in the analysis of brain tumors. In addition, the lipid profile of gliomas was assessed depending on the degree of malignancy and the presence of genetic changes: mutations in the IDH gene and 1p/19q codeletion. Another goal of this doctoral dissertation was to assess the possibility of using SPME in *in vivo* brain studies in humans.

The use of chemical biopsy in the analysis of brain tumors showed that the lipidomic profiles of benign meningiomas differed from those obtained from malignant lesions such as gliomas. It was also possible to classify samples taken from the same lesion on the basis of the extracted set of lipids, which indicates the reliability of the obtained results. Studies of gliomas showed that the lipidome of brain tumors varied depending on the grade of malignancy and IDH mutation status.

Due to the significant role of acylcarnitines in the fatty acid metabolism, their profile in gliomas was analyzed. It has been observed that the content of carnitine esters in neoplastic tissue

increases in tumors with a worse clinical prognosis, that is in lesions with a higher degree of malignancy, and in samples without mutations in the IDH gene.

Detection of compounds with diagnostic potential *ex vivo* is not sufficient to develop a clinically useful method of brain sample collection. The desired one should also enable rapid analysis during surgical procedures. Therefore, to the best of our knowledge, this is the first time when SPME probe was optimized and tested under surgical conditions in the study of the human brain. Although, due to the various localizations and heterogeneity of brain tumors, the pilot proof-of-concept studies were focused on profiling of brain structures rather than differentiating healthy and neoplastic tissue. This study was designed to characterize the white and gray matter of brain using the SPME probe, which allowed simultaneous sampling of both structures. As a result, it was possible to extract a set of metabolites with a wide range of physicochemical properties. Still, the obtained metabolomic and lipidomic results did not show differentiation between gray and white matter, which was probably due to too small study group and too high inter-individual variability.

To sum up, the research conducted within this doctoral dissertation indicates the usefulness of microextraction probes in the study of brain tumors as well as in lipidomic profiling of meningiomas and gliomas, taking into account the degree of malignancy and genotype. It has also been observed that chemical biopsy may be useful tool in *in vivo* brain research, what provides a future direction for studies of brain tumors during neurosurgical procedures.

Key words: solid-phase microextraction, brain tumor, diagnostics, lipidomics

5. Wstęp

Pierwotne guzy mózgu to zmiany nowotworowe mające swój początek w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). Wśród nich największy odsetek stanowią oponiaki wywodzące się z komórek nabłonka pokrywającego pajęczynówkę [1]. Guzy te w większości przypadków są łagodne, a wyższe stopnie złośliwości - 2 i 3 odnotowuje się odpowiednio w ok. 28% i ok. 3% przypadków [2]. Wśród złośliwych pierwotnych guzów mózgu dominują natomiast glejaki, których pochodzenia szuka się w nerwowych komórkach macierzystych lub komórkach glejowych [3]. Glejaki mogą być różnicowane na wiele typów i podtypów na podstawie cech histologicznych, jak i wyników badań genetycznych (np. mutacje w genie kodującym dehydrogenazę izocytrynianową (IDH, ang. *isocitrate dehydrogenase*) lub kodelecję w chromosomie 1p/19q) [4]. Około 45% tych zmian klasyfikowane jest jako glejaki wielopostaciowe, które są jednymi z najbardziej śmiertelnych nowotworów, z 5-letnim względnym wskaźnikiem przeżycia wynoszącym 5% [5].

5.1. Klasyfikacja guzów mózgu

Guzy ośrodkowego układu nerwowego charakteryzują się dużym zróżnicowaniem histologicznym i molekularnym, co ma odzwierciedlenie w ich klasyfikacji przygotowanej przez Światową Organizację Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) [4]. W różnicowaniu zmian bierze się pod uwagę nie tylko testy histologiczne i immunochemiczne ale także wyniki badań genetycznych [4,6]. W diagnostyce najczęściej występujących guzów – glejaków, najistotniejsze jest określenie statusu mutacji IDH oraz kodelecji 1p/19q [4]. W oponiakach z kolei nie wykonuje się rutynowo badań genetycznych [4].

5.1.1. Mutacja w genie kodujących dehydrogenazę izocytrynianową

Dehydrogenaza izocytrynianowa to enzym występujący w trzech izoformach i biorący udział w wielu ważnych procesach biochemicznych takich jak cykl Krebsa, metabolizm glutaminy, lipogeneza i regulacja statusu redoks [7]. Izoforma IDH1 zlokalizowana jest w cytoplazmie i peroksysomach, a IDH2 i IDH3 w macierzy mitochondrialnej [7]. IDH1 i IDH2 katalizują konwersję izocytrynianu do 2-oksylglutaranu (2-OG, ketoglutaranu) przy użyciu fosforanu

dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADP+) i dwuwartościowych jonów: magnezu, lub manganu [7]. IDH3 również katalizuje przekształcenie izocytrynianu do 2-OG, ale jako kofaktor wykorzystuje NAD+ zamiast NADP+ [7].

Mutacje obserwowane w enzymach IDH w glejakach dotyczą głównie cytozolowego IDH1 i mitochondrialnego IDH2, najczęściej odpowiednio w kodonach R132 i R172 [7,8]. Skutkuje to uzyskaniem nowej aktywności enzymatycznej, dzięki której enzymy przekształcają 2-OG w 2-hydroksyglutaran (2-HG), który uważa się za onkometabolit [8]. Synteza 2-HG powoduje zubożenie cyklu Krebsa w węglowodany co kompensowane jest wykorzystaniem przemian związanych z glutaminą i/lub glutaminianem, a także modyfikacjami w metabolizmie lipidów i glutationu [9]. Dodatkowo, obniżenie stężenia 2-OG, będącego substratem hydroksylaz propylowych może skutkować również zwiększeniem aktywności czynnika indukowanego hipoksją α (HIF α , ang. *hypoxia induced factor α*) pomimo braku hipoksji [9]. Obserwuje się także, że w odpowiedzi na 2-HG dochodzi do metylacji w genach odpowiedzialnych za glikolizę, co skutkuje zaburzeniem tego procesu w komórkach z mutacją w obrębie IDH, a zarazem zwolnionym rozrostem tych komórek. Unieczynnione mogą być również enzymy odpowiedzialne za naprawę DNA, np. metylotransferazy O6-metyloguaniny-DNA (MGMT, ang. *O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*). W 80% glejaków z mutacją w genie IDH1 obserwuje się podwyższony profil metylacji MGMT. Dla porównania dla glejaków bez mutacji IDH1 wartość ta wynosi około 60% [10].

Mutacje IDH są często obserwowane u pacjentów z nisko złośliwymi glejakami i występują z częstością około 80%. Zaobserwowano, że pacjenci posiadający mutację w genie dla IDH charakteryzują się korzystniejszymi prognozami niż pacjenci którzy nie posiadają tej zmiany genetycznej [11]. Może być to związane ze zwolnieniem procesów metabolicznych w komórkach w których produkowane są duże ilości 2-HG [7].

5.1.2. Kodecja 1p/19q

Kodecja 1p/19q jest dość rzadką aberracją chromosomalną w glejakach, która obejmuje całkowitą delecję krótkiego ramienia chromosomu 1 wraz z delecją długiego ramienia chromosomu 19 [12,13]. Praktycznie wszystkie skąpodrzewiaki z delecją 1p/19q mają mutację

w IDH1 lub w IDH2 co pokazuje, że analiza łącznie obecności kodelecji i statusu mutacji IDH1/2 może pomóc w identyfikacji tych guzów mózgu [4].

Wykazano, że pacjenci z tą zmianą chromosomalną mają znacznie lepsze rokowanie i całkowity czas przeżycia w porównaniu z pacjentami bez niej [14]. Zaobserwowano także, że pacjenci z skąpodrzewiakami anaplastycznymi posiadający kodelecję 1p/19q charakteryzują się lepszą odpowiedzią na chemioterapię [14].

5.2. Diagnostyka guzów mózgu

Wczesne wykrycie guza mózgu jest trudne ze względu na niespecyficzne objawy, takie jak bóle głowy, zaburzenia widzenia, zmiany nastroju, zawroty głowy, nudności a także tendencję do ujawniania się symptomów w późniejszym okresie rozwoju choroby [15]. Stąd też w diagnostyce konieczne są badania obrazowe, takie jak tomografia komputerowa (TK), rezonans magnetyczny (MRI, ang. *magnetic resonance imaging*) czy pozytronowa tomografia emisyjna (PET, ang. *positron emission tomography*), które potwierdzą obecność zmiany w mózgowiu [16].

Klasyfikacji guzów mózgu dokonuje się po ich wycięciu w trakcie zabiegu operacyjnego. Wówczas przeprowadza się badania histologiczne, testy biochemiczne i immunochemiczne, a także wybrane testy genetyczne [17]. W uzasadnionych przypadkach przeprowadza się biopsję guza mózgu mającą na celu postawienie wstępnego rozpoznania i wybór odpowiedniej formy leczenia [17].

5.3. Leczenie guzów mózgu

W większości przypadków leczenie guzów mózgu opiera się na chirurgicznym usunięciu zmiany, ale w zależności od rozległości resekcji chirurgicznej lub rodzaju guza może być również wskazana uzupełniająca chemo- i/lub radioterapia [18]. Najpopularniejszym chemioterapeutycznym stosowanym w tego typu przypadkach jest temozolomid (TMZ), który ze względu na lipofilne właściwości w ok. 20% przechodzi przez barierę krew-mózg [19]. Temozolomid to prolek, który po podaniu ulega przekształceniu do aktywnego metylo-triazenoimidazolo-karboksamid (MTIC, ang. *methyl-triazenylimidazole-carboximide*), który

z kolei powoduje alkilację w pozycji O6 oraz dodatkowo N7 guaniny skutkując błędną naprawą adduktów metylowych i finalnie wywołując efekt cytotoksyczny [20–22]. Terapia TMZ nie u wszystkich pacjentów jest skuteczna, a za przyczynę oporności na leczenie stawia się między innymi zmniejszoną aktywność enzymu odpowiedzialnego za naprawę DNA: metylotransferazę O6-metyloguaniny-DNA (MGMT) [21]. Stąd też pacjenci, u których doszło do deaktywacji MGMT w wyniku wysokiej ekspresji metylacji mają większe szanse na długoterminowe przeżycie po leczeniu TMZ [22,23]. Hipermetylacja promotora MGMT jest obecnie jedynym biomarkerem odpowiedzi na TMZ u pacjentów z glejakami [22].

Innym lekiem zatwierdzonym przez amerykańską Agencję Żywności i Leków (FDA, ang. *Food and Drug Agency*) do leczenia glejaków jest bewacizumab, który jest antyangiogennym ludzkim przeciwciałem monoklonalnym [24]. Mechanizm działania polega na wiązaniu się przeciwciała do śródbłonkowego czynnika wzrostu naczyń (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*), hamując w ten sposób jego zdolność do wiązania się z receptorami na powierzchni komórek śródbłonka [24]. Zahamowanie aktywności VEGF powoduje zmniejszenie waskularyzacji guza i finalnie zahamowanie jego wzrostu [24].

Rokowanie przeżycia pacjenta różni się w zależności od podtypu nowotworu, przy czym dla pacjentów z rozpoznaniem glejaka wielopostaciowego wynosi jedynie kilka miesięcy (8-15) [24]. Złe rokowania i wysoki współczynnik nawrotów są bezpośrednio związane z niską skutecznością dostępnych metod leczenia. Ponadto lokalizacja zmian w mózgu często utrudnia dostęp do nich, co stanowi kolejną kluczową przeszkodę w skutecznej diagnostyce i leczeniu.

5.4. Nowoczesne techniki szybkiej diagnostyki guzów mózgu

Usunięcie zmiany jest zwykle jednym z najistotniejszych etapów w schematach terapeutycznych leczenia guzów mózgu. Interwencja chirurgiczna ma na celu całkowite wycięcie nowotworowo zmienionej tkanki z bezpiecznym marginesem zdrowej. Niemniej jednak, gdy ryzyko upośledzenia funkcji życiowych pacjenta jest zbyt duże, zakres takich operacji jest często ograniczony. W związku z tym potrzebne są narzędzia, które umożliwią dokładne, specyficzne i czułe różnicowanie tkanek nowotworowych z nienowotworowymi, a także klasyfikację guza jeszcze podczas operacji [25].

Wśród dostępnych klinicznie możliwości na szczególną uwagę zasługują: neuronawigacja, mikroskopia fluorescencyjna i śródoperacyjny rezonans magnetyczny. Neuronawigacja opiera się na wykorzystaniu przedoperacyjnego skanu MRI w celu umożliwienia wizualizacji guza i ważnych struktur nerwowych podczas operacji [18]. Zastosowanie śródoperacyjnego MRI (iMRI, ang. *intra magnetic resonance imaging*) może być korzystne, jednak takiemu podejściu towarzyszy znaczne wydłużenie całkowitego czasu zabiegu i kosztu, a także aparatura zajmuje dużo miejsca na sali operacyjnej [26]. Ocenę marginesów guza może wspomóc wykorzystanie fluorescencyjnych właściwości znaczników takich jak kwas 5-aminolewulinowy (5-ALA), który umożliwia wizualizację tkanki o wysokiej aktywności metabolicznej (zmiany nowotworowej) [27].

Czasami intensywnie rozwijające się metody obrazowania/mikroskopii nie dają odpowiedzi na wszystkie pytania badacza odnośnie biochemii badanej tkanki. Stąd też opracowano narzędzia, które są wprowadzane w okolice guza lub bezpośrednio w badaną tkankę. W ostatnich latach przetestowano szeroki wachlarz nowych narzędzi umożliwiających szybkie różnicowanie tkanki nowotworowej i zdrowej a także profilowanie guzów mózgu. Detekcja oparta jest o różne zjawiska fizykochemiczne co ma też wpływ na klasyfikację tych metod, a także charakterystykę ich wad i zalet. Metody oparte na detekcji elektrochemicznej są często stosowane w neurobiologii, ale rzadko w neuroonkologii. W najnowszej literaturze znaleziono jedynie jedno doniesienie gdzie różnicowano tkankę zdrową i nowotworową w oparciu o różne wartości oporu elektrycznego [28]. Znacznie więcej wzmianek znaleźć można na temat zastosowania biopsji optycznej, czyli urządzeń wykorzystujących detekcję opartą na zjawiskach fizycznych towarzyszącym wiązce światła. W ostatnich latach raportowane były sondy do śródoperacyjnej diagnostyki guzów mózgu oparte o optyczną koherencyjną tomografię komputerową (OCT, ang. *optical coherence tomographu*), które testowane były w trakcie zabiegów operacyjnych do szczegółowej lokalizacji guza [16]. W literaturze raportowano także sondy wykorzystujące spektroskopię Ramana. Urządzenia te umożliwiają profilowanie badanej tkanki bazując na widmach z zakresami spektralnymi charakterystycznymi dla konkretnych związków lub grup związków, co daje wgląd w biochemię tkanki [29]. Znacznie dokładniejszą informację na temat składu chemicznego guza mogą wnieść techniki oparte o detekcję z wykorzystaniem spektrometrii mas (MS, ang.

mass spectrometry), która oferuje wysoką specyficzność i czułość. Niestety konwencjonalna aparatura jest droga i zajmuje dużo miejsca na sali operacyjnej. Innym kluczowym problemem jest konieczność przygotowania próbek zanim zostanie ona przeanalizowana. Stąd też poczyniono kroki w kierunku miniaturyzacji aparatury a także modyfikacji technik pobierania materiału biologicznego oraz jego preparatyki zanim zostanie poddany analizie instrumentalnej [30,31].

W wielu protokołach badaną tkankę należy pobrać, a następnie wyekstrahować związki. W badaniach próbek stałych najczęściej przeprowadza się homogenizację po której następuje ekstrakcja analitów. W celu uniknięcia procesu homogenizacji proponuje się pobranie wymazu z badanej tkanki [32,33]. Czasami wykorzystuje się skrawki tkankowe przygotowane podobnie jak do badań histopatologicznych. Osadzone na szkiełku próbki mogą następnie być analizowane z wykorzystaniem laserowej desorpcji/ionizacji wspomaganej matrycą połączonej ze spektrometrią mas (MALDI-MS, ang. *matrix-assisted laser desorption/ionization coupled with mass spectrometry*) lub desorpcyjnej jonizacji przez elektrorozpylanie połączonej ze spektrometrią mas (DESI-MS, ang. *desorption electrospray ionization mass spectrometry*) [34]. W pierwszej technologii na tkankę nakłada się matrycę, a następnie nakierowuje wiązkę lasera. Badane anality ulegają jonizacji w obecności matrycy i trafiają do spektrometru mas. W DESI-MS naładowane cząsteczki rozpuszczalnika są nakierowane na tkankę, gdzie powodują jonizację analitów, które następnie trafiają do spektrometru mas [34].

Część metod opartych o detekcję z wykorzystaniem spektrometru mas umożliwia tzw. analizę on-line, gdzie próbka bezpośrednio po pobraniu jest wprowadzona do spektrometru mas (analiza w czasie rzeczywistym), a inne off-line bazują na rozdzieleniu etapu pobrania tkanki czy też preparatyki próbki z późniejszą analizą instrumentalną [31]. Pamiętać należy jednak, że każda ze wspomnianych technologii ma wady i zalety. Metody takie jak rapid evaporative ionization mass spectrometry (REIMS), umożliwiają analizę on-line, co związane jest z tym, że podczas cięcia chirurgicznego opartego o elektrokausację dochodzi do wytworzenia „dymu” zawierającego związki uwolnione z ciętej tkanki [34,35]. Są one bezpośrednio skierowane do spektrometru mas i analizowane. Detekcja jest przeprowadzona szybko, ale skutkuje dezintegracją tkanki, dlatego nie jest przydatna we wstępnej diagnostyce wykonywanej podczas biopsji guza. Bardziej odpowiednie do takiej aplikacji jest zastosowanie

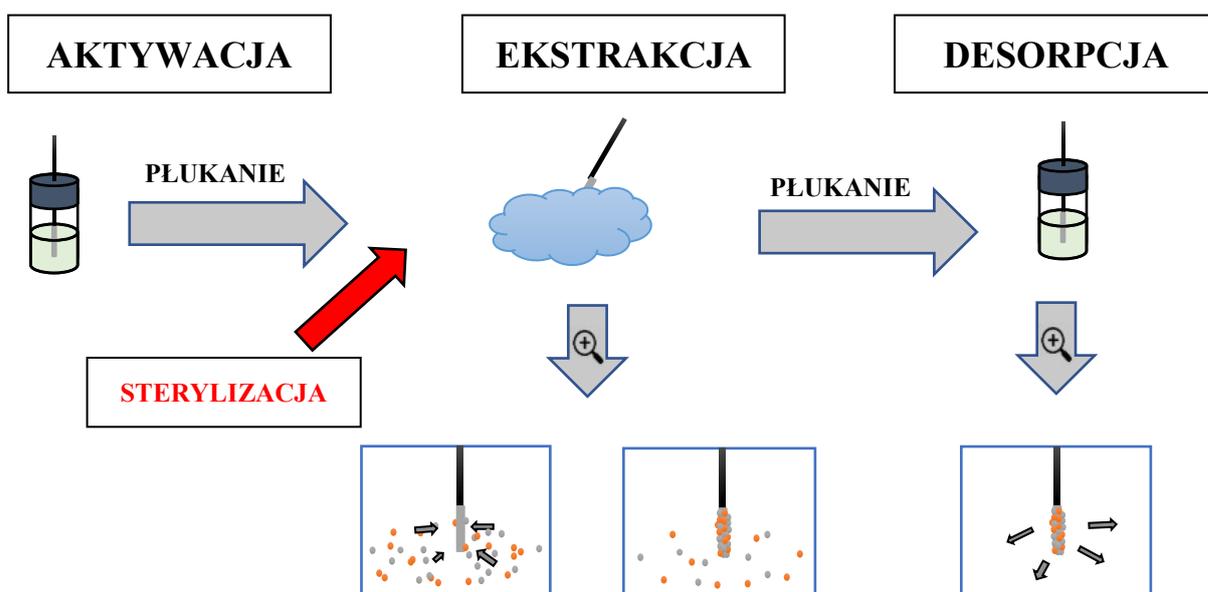
rozwiązań oferujących mniejszą inwazyjność tj. mikroekstrakcję do fazy stałej (SPME), gdzie do tkanki wprowadza się cienkie włókno, lub nanoESI (nESI), w którym z powierzchni tkanki pobiera się wymaz bibułą [36–38]. Należy jednak pamiętać, że takie analizy obarczone są opóźnionym odczytem. Przy wyborze platformy analitycznej, poza szybkością uzyskania wyniku i inwazyjnością, należy wziąć pod uwagę właściwości fizykochemiczne analizowanego analitu. Przykładowo, technika probe electrospray ionization (PESI) umożliwia wykrywanie polarnych analitów, podczas gdy REIMS, inline cartige extraction (ICE) czy DESI-MS najlepiej charakteryzują profile lipidowe. PESI to technika w której na powierzchni badanej tkanki podaje się roztwór (np. wody, etanolu), do którego ekstrahowane są związki z powierzchni tkanki [39,40]. Następnie do roztworu wprowadzana jest igła PESI zamontowana w specjalnym interfejsie umożliwiającym jej szybkie przemieszczanie się między tkanką a źródłem spektrometru mas. Igła PESI pobiera krople roztworu, a gdy jest blisko wejścia do spektrometru mas, przykładane jest do niej wysokie napięcie i pobrane anality ulegają jonizacji. Z kolei ICE polega na umieszczeniu fragmentu tkanki w odpowiednio zaprojektowanej kapilarze zamontowanej przy spektrometrze mas [41]. Badana tkanka przemywana jest następnie odpowiednio zoptymalizowanym roztworem rozpuszczalnika, który trafia bezpośrednio do spektrometru mas. Ponadto uwzględnić należy, że niektóre metody (np. PESI, rozmazy tkanki pobrane do analizy nESI) umożliwiają analizę powierzchni guza, natomiast SPME i metody polegające na dezintegracji tkanek (np. REIMS) umożliwiają analizę głębszych części guza [32,35,36,39].

5.5. Mikroekstrakcja do fazy stałej – biopsja chemiczna

Zasada metody mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME, ang. *solid-phase microextraction*) opiera się na interakcji między analitami w badanym materiale biologicznym a sorbentem, który ekstrahuje cząsteczki, aż do osiągnięcia stanu równowagi [36,42]. W zależności od właściwości fizykochemicznych badanego związku czas potrzebny na osiągnięcie tego stanu może być różny [36,42]. Ze względu jednak na ograniczenia czasowe, często pobranie próbki prowadzone jest przed osiągnięciem równowagi kosztem mniejszej wydajności ekstrakcji [43]. Do tej pory opracowano wiele narzędzi SPME o różnej geometrii, takich jak siatki, membrany i blaszki w kształcie miecza [36,42]. Nadal jednak niklowo-tytanowe włókna powleczone

sorbentem na jednym z końców pozostają najbardziej popularnym formatem SPME [36,42] Jako warstwę ekstrakcyjną najczęściej wykorzystuje się cząsteczki tzw. zrównoważone hydrofilowo-lipofilowo (HLB, ang. *hydrophilic-lipophilic balance*) lub oktadecylowe (C18) [36]. Średnica sondy SPME wynosi około 200 μm , co umożliwia pobranie analitów bez istotnego uszkodzenia badanej tkanki. Ekstrakcja bowiem zachodzi bez pobierania jej, stąd SPME jest czasami określane jako „biopsja chemiczna” [44]. Włókno bowiem wprowadzone jest do tkanki, anality oddziałują z sorbentem i finalnie sonda jest wyciągana z badanej struktury [36,44].

Protokół biopsji chemicznej jest prosty i szybki (**Rycina 1**) [36,44,45]. Podczas pobierania próbki sonda jest wprowadzana do tkanki na określony czas, a następnie spłukiwana wodą w celu usunięcia potencjalnych pozostałości tkanki lub płynów biologicznych. Sonda może być następnie przetransportowana do laboratorium i od razu desorbowana (transfer analitów z sondy do mieszaniny rozpuszczalników) lub przechowywana do czasu analizy instrumentalnej. Ostatnim etapem jest analiza instrumentalna próbek. W przypadku aplikacji SPME do badań *in vivo* istnieje możliwość sterylizacji sondy przed wprowadzeniem jej do próbki. Testowane było zarówno sterylizowanie z wykorzystaniem tlenu etyleny jak i pary wodnej [43,45].



Rycina 1. Protokół mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME)

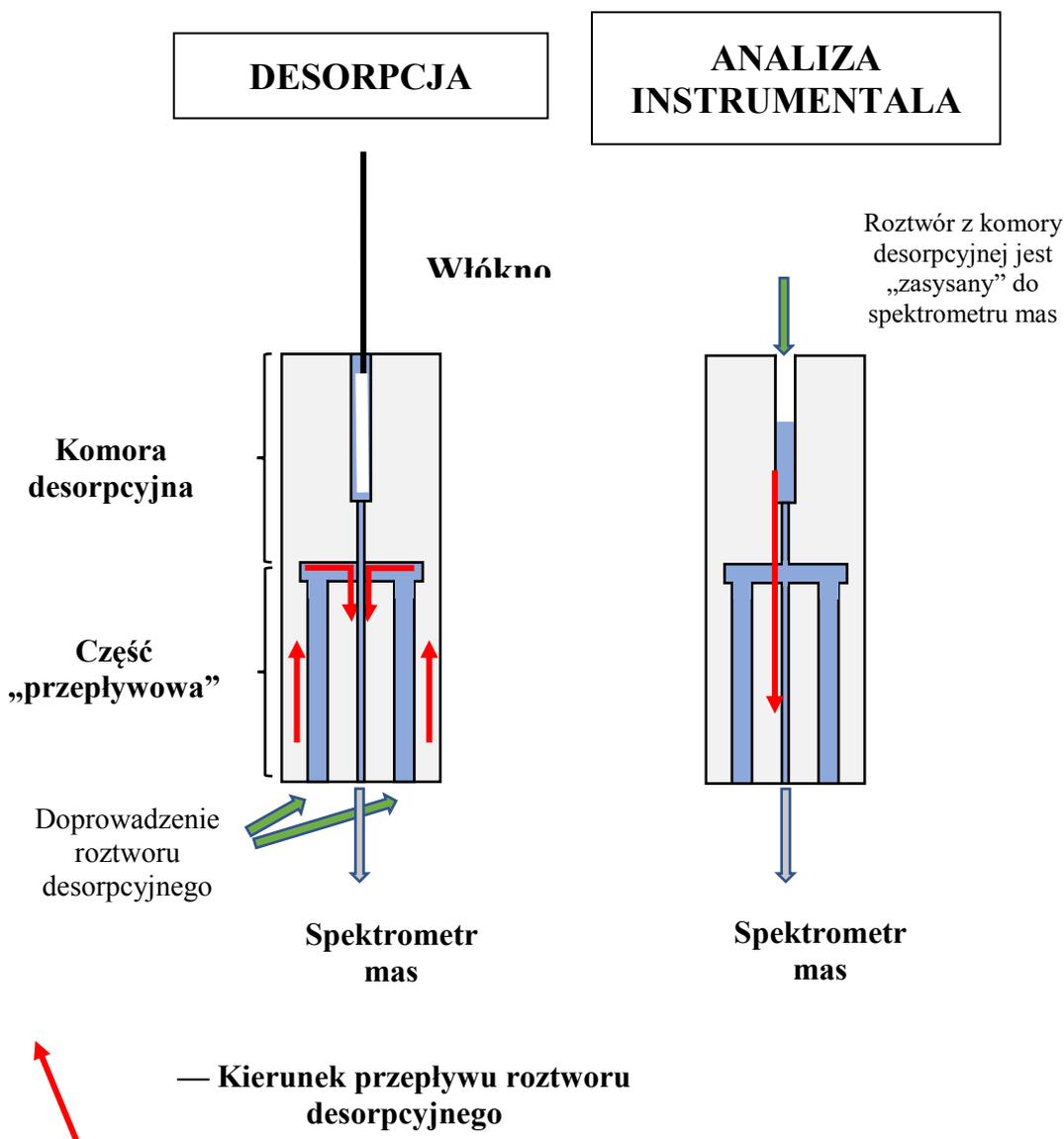
Oprócz minimalnej inwazyjności podczas pobierania próbek, włókna SPME oferują kilka innych kluczowych cech, które są przydatne w analizie tkanek. Po pierwsze, biopsja chemiczna jest metodą niezubożającą, co oznacza, że w danych warunkach pobierana jest tylko znikoma część wolnej frakcji analitów [36,45]. Dzięki temu nie dochodzi do zaburzenia procesów metabolicznych podczas ekstrakcji. Umożliwia to wielokrotne wprowadzenie sondy do materiału biologicznego w celu uzyskania danych w różnych punktach czasowych [46,47]. Jest to szczególnie ważne w badaniach *in vivo*, ponieważ system biologiczny jest w stanie natychmiast się zregenerować (przywrócić równowagę). Inną ważną cechą SPME jest możliwość wygaszenia reakcji metabolicznej na sondzie po pobraniu próbki co wynika z tego, że sorbent pozwala na ekstrakcję jedynie małych cząsteczek, a nie np. białkowych enzymów [42,45]. Dzięki tej cesze możliwe jest analizowanie substancji biologicznie niestabilnych, jak np. oksylipiny [48].

Bezsporną trudnością w badaniach tkanek z wykorzystaniem biopsji chemicznej *in vivo/in situ* jest analiza ilościowa co wynika z braku możliwości dodania standardu wewnętrznego do badanej próbki. Stąd też zaproponowano różne podejścia w analizie ilościowej. Jedynym z nich jest ekstrakcja standardu wewnętrznego przed pobraniem próbki a potem przeliczanie ilości analitu względem ilości standardu wewnętrznego pozostałego na włóknie [36,49]. Podejście to jednak może być ograniczone w badaniach u ludzi, ponieważ część standardu wewnętrznego dostaje się do badanego organizmu. Inną możliwością jest przygotowanie zastępczej matrycy, dodanie do niej standardów i przygotowanie krzywej wzorcowej, którą wykorzystuje się do oceny stężenia analitu w próbce [50,51].

SPME w badaniach biomedycznych najczęściej łączone jest z chromatografią sprzężoną ze spektrometrią mas [36,52]. Ze względu na labilność temperaturową wielu biologicznie dostępnych analitów to chromatografia cieczowa (LC, ang. *liquid chromatography*) jest częściej wybierana niż gazowa (GC, ang. *gas chromatography*), w której to wykorzystuje się wysokie temperatury. Chromatografia umożliwia separację badanych analitów, co ma duży wpływ na możliwość określenia struktury badanego związku, a także różnicowania izomerów czy izobarów [53]. Niemniej jednak, główną wadą chromatografii jest długi czas analizy. Stąd też interesującą wydaje się możliwość połączenia SPME z szybką analizą bezpośrednio z wykorzystaniem spektrometru mas. Sonda jest wówczas montowana w odpowiednio

zaprojektowanym interfejsie umieszczonym u wlotu spektrometr mas. Rozwiązanie takie skraca czas analizy do kilku sekund. Istnieje wiele metod które mogą umożliwić taką diagnostykę a w zależności od rodzaju prowadzonych badań powinna być wybrana odpowiednia platforma analityczna [54].

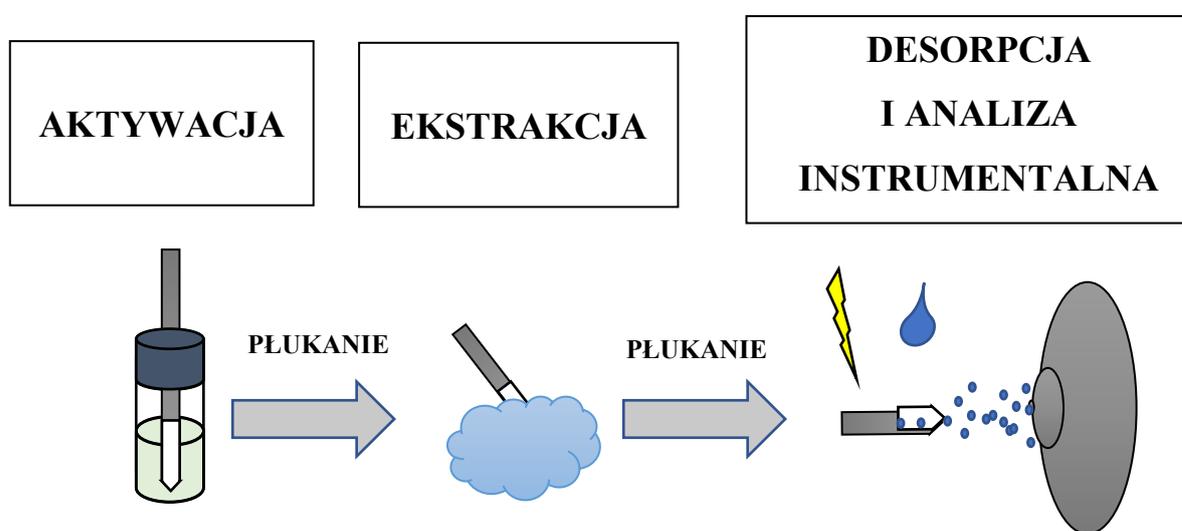
Przykładowo stosując najbardziej popularny format SPME- włókno, szybki odczyt wyników może być przeprowadzony z wykorzystaniem microfluidic open interface mass spectrometry (MOI-MS) [55,56]. Interfejs do tej technologii (**Rycina 2**) składa się z dwóch części: komory w której zachodzi desorpcja, a także części „przepływowej” składającej się z trzech kapilar. Roztwór desorpcyjny wypełnia komorę do której się wkłada włókno, a także przepływa przez dwie zewnętrzne kapilary w których po dotarciu do szczytu kierowany jest do środkowej, która prowadzi do spektrometru mas. Cały czas przepływający roztwór desorpcyjny gwarantuje stabilną jonizację. Do komory desorpcyjnej wypełnionej roztworem natomiast wprowadzone może być włókno na kilka sekund- ok. 5s[56]. Po tym czasie na chwile przerwany zostaje przepływ cieczy w części cieczowej co powoduje zaciągnięcie do spektrometru mas zawartości komory desorpcyjnej. Prawidłowo zoptymalizowana metoda umożliwia wznowienie przepływu rozpuszczalnika zaraz po opróżnieniu komory. W kilka sekund po opróżnieniu zawartości komory desorpcyjnej można odczytać wynik: chronogram w postaci piku. Metoda ta wykorzystywana była do oceny ilościowej leków w materiale biologicznym. Znaczną zaletą MOI-MS jest szybkość analizy oraz prostota technologii [54].



Rycina 2. Schemat przedstawiający technikę microfluidic open interface mass spectrometry (MOI-MS) [55,56]

Inną techniką stosowaną do analizy związków pobranych z wykorzystaniem SPME bezpośrednio z użyciem spektrometru mas jest DESI-MS [57]. Technologia ta pozwala na ocenę przestrzennej zawartości badanych analitów na całej długości włókna. Włókno montuje się bowiem w interfejsie do DESI-MS i odczytuje się wynik poprzez nakierowanie na sondę spreju elektrycznie naładowanego rozpuszczalnika. Testy z wykorzystaniem takiej technologii były testowane przez Lendor i współpracowników [57], którzy oznaczali zawartość wybranych leków na całej długości warstwy sorpcyjnej włókna.

W badaniach guzów mózgu przetestowana została technologia w której zamiast włókien wykorzystuje się blaszki w kształcie miecza, czyli tzw. coated blade spray mass spectrometry (CBS-MS) (**Rycina 3**) [58,59]. Najpierw pobiera się próbkę, a następnie montowana jest w interfejsie umieszczonym przy wlocie spektrometru mas. Następnie, na powierzchnię sorpcyjną dodaje się krople rozpuszczalnika co ma na celu desorpcję analitu, a po kilku sekundach przykłada się wysokie napięcie (3,5-5kV) - badane związki są jonizowane i trafiają do spektrometru mas, a po kilku sekundach można zaobserwować chronogram [58,59].



Rycina 3. Schemat przedstawiający technikę coated blade spray mass spectrometry (CBS-MS) [58,59]

5.6. Lipidomika

W ostatnich latach coraz częściej wspomina się nauki oomiczne jako szansę na poszukiwanie biomarkerów zmian zachodzących w organizmie żywym. Zastosowanie podejść biologii systemowej, takich jak metabolomika, lipidomika i genomika, może stanowić przydatne narzędzie do określania związków, które mogłyby pomóc w diagnostyce, a także wyborze i monitorowaniu leczenia [60].

Lipidomika jest dziedziną metabolomiki, która skupia się na analizie związków lipidowych, na ich identyfikacji oraz analizie ilościowej [9]. Pełen zestaw lipidów w danej komórce, tkance, narządzie czy organizmie nazywamy lipidomem [61].

5.6.1. Podział i rola lipidów

Zgodnie z definicją konsorcjum LipidMAPS, lipidy są cząsteczkami hydrofobowymi lub amfipatycznymi (posiadającymi w swojej strukturze część hydrofilową i hydrofobową), które mogą pochodzić całkowicie lub częściowo z kondensacji tioestrów na bazie karboanionów (takich jak: kwasy tłuszczowe, poliketydy) i/lub kondensacji jednostek izoprenowych na bazie karbokationów (takich jak: prenole, sterole) [9,62]. Ze względu na budowę chemiczną związki lipidowe zostały podzielone na osiem klas, a przykładowe lipidy z każdej z nich zamieszczono na rycinie (**Rycina 4**) [62,63]:

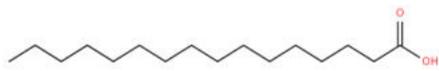
1. Kwasy tłuszczowe (FA, ang. *fatty acids*), czyli kwasy karboksylowe. Stanowią one grupę najprostszych strukturalnie lipidów. Mogą występować jako oddzielna grupa lub wiązać się z innymi cząsteczkami, np. glicerolem tworząc bardziej złożone związki lipidowe. Naturalne kwasy tłuszczowe zawierają parzystą liczbę węgli i mogą zawierać jedno lub kilka wiązań podwójnych. Łańcuch acylowy naturalnie występujących kwasów tłuszczowych składa się najczęściej z 12-20 atomów węgla [9,61].
2. Glicerololipidy (GL, ang. *glycerolipids*) są to związki lipidowe składające się z glicerolu i kwasów tłuszczowych. W zależności od ilości przyłączonych cząsteczek FA nazywamy je mono-, di-, trójglicerydami. Glicerolipidy biorą udział w magazynowaniu energii, metabolizmie energetycznym i transdukcji sygnału [9,61].
3. Glicerofosfolipidy (GP, ang. *glycerophospholipids*) są to związki lipidowe mające co najmniej jedną grupę hydroksylową glicerolu zestryfikowaną jedną grupą fosforanową lub fosfonianową. Ze względu na przyłączony podstawnik wyróżniamy kilka rodzajów fosfolipidów, m.in.: fosfatydylocholinę (PC, ang. *phosphatidylcholine*), fosfatydyloetanolaminę (PE, ang. *phosphatidylethanolamine*), fosfatydyloinozytol (PI, ang. *phosphatidylinositol*), fosfatydyloserynę (PS, ang. *phosphatidylserine*), fosfatydyloglicerol (PG, ang. *phosphatidylglycerol*), kwas fosfatydowy (PA, ang. *phosphatidic acid*), kardiolipinę. Glicerofosfolipidy są głównymi składnikami błon biologicznych [9,61]. Lipidy te przyczyniają się też do uwolnienia drugorzędowych przekaźników podczas sygnalizacji komórkowej a także biorą udział w licznych szlakach metabolicznych [9,61].

4. Sfingolipidy (SP, ang. *sphingolipids*) to związki lipidowe składające się z długołańcuchowego sfingoidu, do którego może być przyłączona grupa acylowa, cukrowa lub fosforanowa. Pełnią one przede wszystkim ważną funkcję w utrzymaniu struktury błon biologicznych, a także w transdukcji sygnału [9,61,64].
5. Sterole (ST, ang. *sterol lipids*) są to związki lipidowe posiadające szkielet węglowy w postaci czterech sprzężonych pierścieni. Wśród nich wyróżnić można cholesterol i jego pochodne, kwasy żółciowe, etc. Lipidy tej grupy mogą pełnić funkcję hormonalne a także sygnalizacyjne biorąc udział w wielu procesach metabolicznych [9,61].
6. Prenole (PR, ang. *prenol lipids*) są syntetyzowane głównie w szlaku mewalonianowym z pięciowęglowych prekursorów (difosforanu izopentenyłu i difosforanu dimetyloallilu). W tej grupie związków lipidowych sklasyfikowano takie witaminy jak: A, E, K czy ubichinon [9,61,65].
7. Sacharolipidy (SL, ang. *saccharolipids*), czyli związki posiadające szkielet cukrowy bezpośrednio połączony z kwasami tłuszczowymi. Mogą one występować w postaci glikanów lub fosforylowanych pochodnych [9,61].
8. Poliketydy (PK, ang. *polyketides*) – są to związki, które mają właściwości podobne do lipidów. Występują w drobnoustrojach i roślinach [9,61].

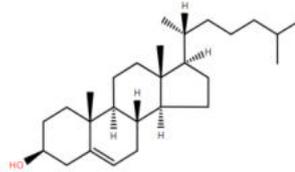
Lipidy są głównymi budulcami błon biologicznych, a także biorą udział w licznych procesach komórkowych takich jak: wzrost, proliferacja, różnicowanie i sygnalizacja komórkowa [9,61,66]. Istnieją co najmniej trzy sieci metaboliczne, które związane są bezpośrednio z gospodarką lipidową [9]:

- metabolizm sfingolipidów, gdzie w centrum przemian znajdują się ceramidy, które mogą być przekształcane na inne podklasy sfingolipidów. Szlak ten ma znaczenie m.in. w powstawaniu wysp lipidowych w błonach komórkowych, czy też sygnalizację apoptozy[9].
- metabolizm fosfolipidów – odpowiednie funkcjonowanie komórki jest uzależnione od przebudowy łańcuchów acylowych fosfolipidów co dzieje się dzięki aktywności transacylaz/acylotransferaz a także procesowi hydrolizy [9]. Wspomniane przemiany umożliwiają utrzymanie odpowiedniej struktury błon biologicznych, a także prawidłowej sygnalizacji komórkowej [9].

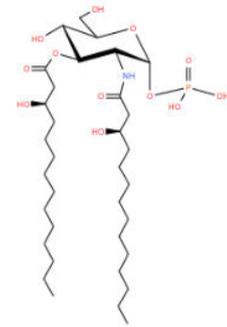
- metabolizm glicerolipidów – zachowanie odpowiedniej homeostazy między monoacylglicerolami, diacylglicerolami i triacylglicerolami jest istotne dla prawidłowego funkcjonowania komórki, a kluczowym związkiem w regulacji tej sieci metabolicznej jest acylo-CoA [9].



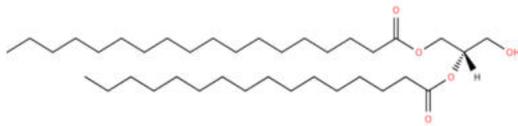
Kwasy tłuszczowe, np. FA 16:0



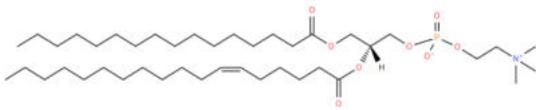
Steroidy, np. cholesterol



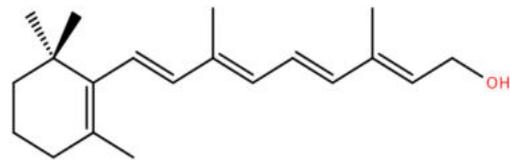
Sacharolipid, np. Lipid X



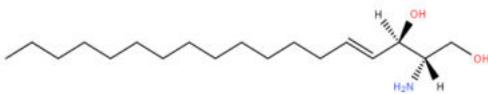
Glicerolipidy, np. DG 34:0



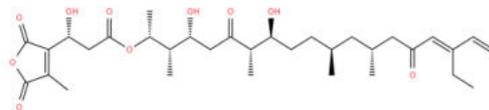
Fosfolipidy, np. PC 34:1



Prenol, np. Retinol



Sfingolipidy, np. SPB 18:1;O2 (sfingozyna)



Poliketydy, np. Tautomycetina

Rycina 4. Struktury przykładowych związków lipidowych

5.6.2. Lipidom w komórkach nowotworowych

Komórki nowotworowe charakteryzują się wysoką plastycznością metaboliczną, która umożliwia im szybką proliferację, wzrost i przetrwanie w niesprzyjających warunkach [66]. Nie jest jednak w pełni wyjaśnione w jaki sposób dochodzi do przeprogramowania metabolizmu, aby zaspokoić zapotrzebowanie na energię, a także zachować integralność [66].

Ze względu na lokalizację lipidów w błonie komórkowej, gdzie bezpośrednio graniczą ze środowiskiem zewnętrznym komórek czy organelli, są one bezpośrednio narażone na zmiany biochemiczne środowiska wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego [9]. Ponadto biorą udział w licznych procesach biochemicznych odpowiedzialnych za funkcjonowanie komórki, stąd też uważa się, że ich profil może być zaburzony w przebiegu procesu nowotworowego [9].

Szybki wzrost i proliferacja komórek nowotworowych wymaga dużej ilości lipidów m.in. do budowy błon biologicznych czy też wydatków energetycznych, stąd też dochodzi do nasilonej lipogenezy *de novo*, a także nasilonej produkcji cholesterolu w szlaku mewalonianu. Nasiloną aktywacją syntezy lipidów może powodować znaczą zmianę w składzie lipidowym błony komórkowej, np. zamieniając fosfolipidy nienasycone na nasycone i/lub jednonienasycone, co prowadzi do zmian w biofizycznych właściwościach błony komórkowej wpływając na jej płynność, a także możliwość transdukcji sygnału [9].

Ze względu na szybkie zmiany w mikrośrodowisku guza może także dojść do zmian w dostępności substratów niezbędnych do utrzymania optymalnego bilansu energetycznego. Zgodnie z efektem Warburga uważa się, że komórki nowotworowe jako główne źródło energii wykorzystują glikolizę. Zaobserwowano jednak, że procesy te są w niektórych typach nowotworów zastępowane przez inne przemiany, jak np. oksydacja lipidów w mitochondriach [9,66].

Bioaktywne lipidy, pełniąc funkcję wtórnych przekaźników i hormonów, odgrywają ważną rolę w regulacji sygnalizacji. Na przykład kwasy tłuszczowe, pochodne kwasów tłuszczowych i steroidów oraz eikozanoidy modulują ekspresję genów poprzez wiązanie i aktywację jądrowych receptorów hormonów, np. receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów. Może także dojść do zaburzenia działania hormonów i czynników wzrostu pochodzenia lipidowego, takich jak prostaglandyny, leukotrieny, kwas lizofosfatydowy, czy hormony steroidowe [9].

5.6.3. Przygotowanie próbki do analizy lipidomicznej

Materiał biologiczny do badań lipidomicznych może stanowić krew pełna, osocze, surowica, mocz, fragmenty tkanek i inne [67]. Idealnym rozwiązaniem byłaby analiza próbek zaraz po pobraniu, jednak ze względów organizacyjnych często jest to niemożliwe. W związku z tym powinny one być przechowywane w niskich temperaturach. Najlepiej aby zostały szybko zamrożone w ciekłym azocie, a później przechowywane w temperaturze -80°C do czasu dalszej analizy [60]. Stabilność próbki można przedłużyć, utrzymując ją w środowisku wolnym od tlenu, jonów metali i nadtlenków, a także dodając przeciwutleniacze, które hamują degradację lipidów (np. butylowany hydroksytoluen - BHT) [9,61,68]. Należy także unikać cykli zamrażania i rozmrażania ponieważ mogą one stymulować hydrolizę lipidów [61].

Przygotowując próbki do analizy lipidomicznej należy pamiętać, że próbki stałe, takie jak tkanki, muszą być odpowiednio spreparowane, aby możliwe było wyekstrahowanie analitów. Stąd też w pierwszym etapie przeprowadza się homogenizację [67]. W kolejnym kroku ekstrahuje się badane anality. W lipidomice wykorzystuje się metody bazujące na ekstrakcji ciecz-ciecz, takie jak metoda Folcha czy też Bligh i Dyer'a w których wykorzystuje się głównie chloroform jako czynnik ekstrakcyjny. Równie skuteczna jest metoda wykorzystująca eter tert-butylo-metylowy (MTBE, ang. *methyl tert-butyl ether*) [9,61]. Istnieją również doniesienia o zastosowaniu innych metod przygotowania próbki takich jak ekstrakcja ciecz:ciało stałe (SPE, ang. *solid-phase extraction*) czy też SPME [44,69,70].

5.6.4. Platformy analityczne wykorzystywane w analizie lipidomicznej

Zmiany w obrębie lipidomu można analizować za pomocą wielu różnych platform analitycznych, z których większość opiera się na detekcji i identyfikacji z wykorzystaniem spektrometrii mas [9,67,71].

W początkowych latach analizy lipidomiczne prowadzone były z zastosowaniem bezpośredniego nastrzyku/infuzji do spektrometru mas (tzw. *shotgun lipidomics*) [9,53]. Podejście to charakteryzuje się szybkością i prostotą procedury [72]. Tego typu analizy cechują się jednak wysokim efektem matrycy a także trudnościami z określeniem struktury badanego związku [72]. Zastosowanie chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas umożliwiło separacje lipidów skutkując zmniejszeniem efektu supresji/wzmocnienia sygnału

przez matrycę, bardziej wiarygodną separacją, a także możliwością rozróżnienia izomerów czy izobarów [53]. W lipidomice najczęściej wykorzystuje się chromatografię odwróconych faz (RPLC, ang. *reversed-phase chromatography*), w której lipidy są rozdzielane na kolumnie chromatograficznej na podstawie ich hydrofobowości. W związku z tym lipidy tej samej klasy są rozdzielane na podstawie długości łańcucha acylowego i liczby wiązań wielokrotnych, ponieważ czas retencji rośnie wraz ze wzrostem liczby węgli i maleje wraz ze wzrostem liczby podwójnych wiązań acylowych [9]. Chromatografia w normalnym układzie faz (NRPL, ang. *normal-phase chromatography*),) jest komplementarna do RPLC ponieważ umożliwia separację lipidów na podstawie ich grup funkcyjnych [9,61]. Niestety ten rodzaj chromatografii jest mało kompatybilny z jonizacją typu elektrorozpylenie (ESI, ang. *electrospray ionization*) ze względu na stosowanie niepolarnych rozpuszczalników organicznych [9]. Chromatografia ta została zastąpiona chromatografią oddziaływań hydrofilowych (HILIC, ang. *hydrophilic interaction chromatography*), która łączy cechy RPLC i NLPC [9,61]. Wykorzystuje ona bowiem kolumnę o normalnym układzie faz z eluentami podobnymi do tych stosowanych w RPLC. Stosując chromatografię HILIC separuje się lipidy na podstawie obecności hydrofilowej grupy funkcyjnej badanych lipidów [61].

W zależności od dobranej jonizacji można oznaczać nieco inne anality. Z wykorzystaniem jonizacji pozytywnej można analizować szeroki zakres lipidów, stąd też ten typ jonizacji jest najczęściej wykorzystywany w badaniach lipidomicznych. Jonizację ujemną wykorzystuje się przede wszystkim do analizy konkretnych klas lipidów, jak np. PI, PS, PA [9].

6. Cel rozprawy doktorskiej

Diagnostyka śródoperacyjna może być jednym z kluczowych kroków do szybkiej i skutecznej terapii pacjentów ze zmianami nowotworowymi. Często jednak dużym problemem jest pobranie próbki, które powinno być jak najmniej inwazyjne a jednocześnie charakteryzować się dostatecznie wysoką wartością diagnostyczną. Problem ten amplifikuje się szczególnie w badaniach zmian zlokalizowanych w trudno dostępnym miejscu lub też obejmujących heterogenną pod względem morfologicznym i funkcjonalnym tkankę, np. mózgowie. W związku z tym, celem niniejszej rozprawy doktorskiej było przetestowanie narzędzia, sondy mikroekstrakcyjnej, w badaniach guzów mózgu.

Istotne jest, aby przy biochemicznej ocenie tkanki nowotworowej zwrócić uwagę na związki lipidowe, które biorą udział w wielu fizjologicznych i patologicznych procesach biochemicznych. W tym celu przeprowadzono pilotażową niecelowaną analizę związków lipidowych oraz metabolitów: estrów karnityny, biorących udział w regulacji gospodarki kwasów tłuszczowych w guzach mózgu. Ze względu na wysoką złośliwość i występowanie trudności w prowadzeniu skutecznej terapii szczególnie istotna wydawała się analiza glicynów pod kątem profilu lipidomicznego w zależności od stopnia złośliwości oraz obecności zmian w obrębie IDH, a także występowania kodelecji 1p/19q.

Docelowym zastosowaniem tzw. biopsji chemicznej jest analiza *in vivo*. W związku z tym jednym z celów niniejszej rozprawy doktorskiej była także optymalizacja sond mikroekstrakcyjnych i badania pilotażowe oceniające możliwość zastosowania SPME u pacjentów w trakcie zabiegów neurochirurgicznych.

7. Wyniki badań

7.1. Zastosowanie biopsji chemicznej do charakterystyki lipidomu guzów mózgu – P.1.

Opis dotyczy pracy: J. Bogusiewicz, B. Kupcewicz, P.Z. Goryńska, K. Jaroch, K. Goryński, M. Birski, J. Furtak, D. Paczkowski, M. Harat, B. Bojko: *Investigating the Potential Use of Chemical Biopsy Devices to Characterize Brain Tumor Lipidomes*. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23, 3518

Opracowanie szybkiej i dokładnej metody śródoperacyjnej, umożliwiającej różnicowanie zmian nowotworowych, wciąż stanowi wyzwanie w medycynie laboratoryjnej. Ważne zatem jest, aby znaleźć i zoptymalizować prostą i skuteczną platformę analityczną umożliwiającą wybór związków charakterystycznych dla danego rodzaju guza, stopnia złośliwości czy też genotypu. Sondy SPME zostały już zaproponowane jako użyteczne narzędzie w profilowaniu metabolomicznym guzów mózgu [73]. Nie oceniono jednak ich użyteczności w diagnostyce lipidomicznej. Stąd też, celem niniejszej pracy jest ocena przydatności biopsji chemicznej w analizie lipidomicznej guzów mózgu. Analiza instrumentalna została przeprowadzona z wykorzystaniem chromatografii cieczowej połączonej z wysokorozdzielczą spektrometrią mas (LC-HRMS, ang. *liquid chromatography – high resolution mass spectrometry*).

W pierwszym etapie przeprowadzono eksperyment mający na celu ocenę wiarygodności poboru próbki z tak heterogennej tkanki jaką jest tkanka nowotworowa, a także oceniono użyteczność zaproponowanej platformy analitycznej w różnicowaniu histologicznie różnych guzów: oponiaków i glejaków. Przeprowadzono następnie szczegółową analizę glejaków, która polegała na ocenie profili lipidomicznych tych zmian pod kątem stopnia złośliwości, statusu mutacji w genie kodującym dehydrogenazę izocytrynianową 1/2 (IDH1/2) oraz obecności kodelecji 1p/19q.

Zmiany nowotworowe są strukturami heterogennymi na poziomie histologicznym, a także genomycznym, transkryptomycznym, epigenetycznym czy też metabolomicznym. Różnicowanie to wpływa na zmienność guzów mózgu między osobnikami, a także wewnątrz

guza. Heterogenność ta wydaje się być dużym problemem w badaniach, gdzie ocenia się tylko wycinek zmiany ponieważ może to wpływać na wiarygodność uzyskanych wyników. Uzasadnione zatem są wątpliwości dotyczące pobierania próbek z wykorzystaniem sondy SPME o średnicy ok 200 μ m, ponieważ umożliwiają one ekstrakcję analitów tylko z niewielkiego obszaru wokół włókna. Stąd też konieczne było przeprowadzenie badań umożliwiających ocenę wiarygodności biopsji chemicznej w neuroonkologii. W tym celu wprowadzono po 3 sondy do 8 guzów mózgu – 4 oponiaków i 4 glejaków. Zaobserwowano, że profile lipidów pobrane z danej zmiany są podobne i grupują się w zestawy odpowiadające danemu guzowi. Wyniki te sugerują, że pobrany profil lipidów uzyskany na włóknach wprowadzonych do danego guza jest charakterystyczny dla tej konkretnej zmiany, a profile analitów pobrane z badanego guza korelują ze sobą. Dobór sondy z wystarczająco długim sorbentem jest zatem dobrą opcją do ekstrakcji związków z całej zmiany umożliwiając uzyskanie uśrednionego profilu lipidomicznego.

Badanie guzów mózgu przeprowadzone zostało *ex vivo* co uniemożliwiało badanie tkanki zdrowej. Stąd też, aby ocenić dwie histologiczne różne struktury wybrano guzy niezłośliwe jako punkt porównania do złośliwych zmian. Profile lipidomiczne oponiaków różniły się od tych pozyskanych dla glejaków, co stanowiło podstawę do wnioskowania, że testowana platforma analityczna może być przydatna w ocenie guzów mózgu. Biorąc pod uwagę tę obserwację przeprowadzono szczegółowe badania glejaków.

Analiza statystyczna potencjalnych lipidów wykazała, że 17 z nich jest istotnie różnych w glejakach o wysokim stopniu złośliwości (HGG, ang. *high grade glioma*) w porównaniu z glejakami o niskim stopniu złośliwości (LGG, ang. *low grade glioma*). Lizofosfolipidy (LPC, ang. *lysophospholipids*) takie jak LPC P-16:0, LPC P-18:0 oraz LPC 18:2 były obecne w HGG w ponad dwukrotnie większym stężeniu niż w LGG. Zaobserwowano także, że ilość SM 42:1;O2 była mniejsza w bardziej złośliwych zmianach. Analizy chemometryczne, umożliwiły jednak wyselekcjonowanie jedynie czterech potencjalnych związków lipidowych, przy czym dla dwóch z nich udało się potwierdzić strukturę podczas fragmentacji. Wśród tych analitów był LPC P16:0, który w HGG był dwa razy wyższy niż w LGG oraz SM 42:1;O2, który był niższy w bardziej złośliwych zmianach.

Wyniki pokazały, że guzy typu dzikiego (IDHw, ang. *IDH wildtype*) miały znacznie zwiększoną ilość lizofosfolipidów (LPC O-16:0; LPC P-18:0; LPC 18:0) przy równoczesnym niższym poziomie fosfatydylocholin (PC 32:1, PC 32: 0 i PC 36:1). Istotnym może być również, że poziom fosfatydyloetanolamin był niższy w IDHw niż w próbkach z obecną mutacją (IDHm, ang. IDH mutant). Sfingolipidy natomiast nie ulegały większym zmianom w zależności od statusu mutacji IDH1/2. Zaobserwowano jedynie, że SM 43:4;O2 i LacCer 42:2;O2, były obecne na podwyższonych poziomach w próbkach bez mutacji IDH1/2. Ponadto w analizie chemometrycznej udało się wyselekcjonować zestaw 16 potencjalnych związków lipidów, które umożliwiają różnicowanie glejaków na podstawie statusu mutacji IDH 1/2.

Lipidomy guzów mózgu o różnych statusach kodelacji 1p/19q charakteryzowały się podobnym składem. Szczegółowa analiza wszystkich potencjalnych związków lipidowych umożliwiła selekcję 36 analitów statystycznie istotnie różnych w próbkach posiadających i nieposiadających wspomnianej aberracji chromosomalnej ($p < 0.05$). Ze względu jednak na słabe parametry modelu chemometrycznego nie było możliwe wybranie zestawu lipidów, który umożliwiłby dyskryminację guzów w zależności od statusu kodelacji 1p/19q.

Podsumowując, zaobserwowano, że lipidom badanych zmian nowotworowych różnił się w zależności od stopnia złośliwości i statusu mutacji w genie kodującym IDH1/2. Nie wykazano takiej zależności dla próbek o różnym statusie kodelacji 1p/19q. Pomimo małej grupy badanej zaobserwować można, że w zależności od stopnia złośliwości jak i genotypu może dochodzić do zmian w obrębie lipidomu guzów mózgu, a biopsja chemiczna może być użytecznym narzędziem w ocenie tych zmian.

Article

Investigating the Potential Use of Chemical Biopsy Devices to Characterize Brain Tumor Lipidomes

Joanna Bogusiewicz ¹, Bogumiła Kupcewicz ², Paulina Zofia Goryńska ¹, Karol Jaroch ¹,
Krzysztof Goryński ^{1,†}, Marcin Birski ³, Jacek Furtak ³, Dariusz Paczkowski ^{3,‡}, Marek Harat ^{3,4,*}
and Barbara Bojko ^{1,*}

¹ Department of Pharmacodynamics and Molecular Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Torun, 85-089 Bydgoszcz, Poland; j.bogusiewicz@cm.umk.pl (J.B.); gorynska@cm.umk.pl (P.Z.G.); karol.jaroch@cm.umk.pl (K.J.); gorynski@cm.umk.pl (K.G.)

² Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Torun, 85-089 Bydgoszcz, Poland; kupcewicz@cm.umk.pl

³ Department of Neurosurgery, 10th Military Research Hospital and Polyclinic, 85-681 Bydgoszcz, Poland; mbirski@poczta.fm (M.B.); jacek.furtak2019@gmail.com (J.F.); darek_paczkowski@vp.pl (D.P.)

⁴ Department of Neurosurgery and Neurology, Faculty of Health Sciences, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Torun, 85-168 Bydgoszcz, Poland

* Correspondence: harat@10wsk.mil.pl (M.H.); bbojko@cm.umk.pl (B.B.)

† Current address: Bioanalysis Scientific Group, Faculty of Pharmacy, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Torun, 85-089 Bydgoszcz, Poland.

‡ Current address: Department of Neurosurgery and Neurology, Jan Biziel University Hospital Collegium Medicum, Nicolaus Copernicus University, 85-168 Bydgoszcz, Poland.



Citation: Bogusiewicz, J.; Kupcewicz, B.; Goryńska, P.Z.; Jaroch, K.; Goryński, K.; Birski, M.; Furtak, J.; Paczkowski, D.; Harat, M.; Bojko, B. Investigating the Potential Use of Chemical Biopsy Devices to Characterize Brain Tumor Lipidomes. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 3518. <https://doi.org/10.3390/ijms23073518>

Academic Editor: Andreas Weigert

Received: 26 February 2022

Accepted: 21 March 2022

Published: 24 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The development of a fast and accurate intraoperative method that enables the differentiation and stratification of cancerous lesions is still a challenging problem in laboratory medicine. Therefore, it is important to find and optimize a simple and effective analytical method of enabling the selection of distinctive metabolites. This study aims to assess the usefulness of solid-phase microextraction (SPME) probes as a sampling method for the lipidomic analysis of brain tumors. To this end, SPME was applied to sample brain tumors immediately after excision, followed by lipidomic analysis via liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS). The results showed that long fibers were a good option for extracting analytes from an entire lesion to obtain an average lipidomic profile. Moreover, significant differences between tumors of different histological origin were observed. In-depth investigation of the glioma samples revealed that malignancy grade and isocitrate dehydrogenase (IDH) mutation status impact the lipidomic composition of the tumor, whereas 1p/19q co-deletion did not appear to alter the lipid profile. This first on-site lipidomic analysis of intact tumors proved that chemical biopsy with SPME is a promising tool for the simple and fast extraction of lipid markers in neurooncology.

Keywords: brain tumor; glioma; SPME; heterogeneity; lipids; chemical biopsy

1. Introduction

Malignant primary brain tumors are one of the most life-threatening neoplasms. The majority of these tumors are classified as gliomas, which are divided into many types and subtypes based on their histological features and the results of genetic testing (e.g., mutations in gene coding isocitrate dehydrogenase or co-deletion of the 1p/19q chromosome) [1]. The early detection of gliomas is challenging due to their non-specific symptoms and tendency to manifest later in their development. In most cases, the excision of these neoplastic lesions with appropriate margins is essential to improving the patient's outcome. This approach is generally followed by the application of chemo- and/or radiotherapy as a complementary treatment method. A patient's survival prognosis varies depending on

the tumor subtype, with prognoses as short as a few months for patients diagnosed with glioblastoma [2–4]. The poor prognoses and high recurrence rates for gliomas are directly related to the lack of effective treatment methods. Moreover, the locations of brain lesions often make them difficult to access, which is another key obstacle in the development of new sampling approaches. As such, it is important to explore new opportunities offered by translational research that link medicine and analytical chemistry [3]. Thus, the application of “omics sciences” such as metabolomics, lipidomics, and genomics could provide a useful tool for determining biomarkers that could help with the selection and monitoring of treatments.

Lipidomics is a branch of metabolomics that focuses on lipid species, and findings have shown that it can play an important role in the biomarker search workflow. Lipids perform various functions in organisms, which can change as a result of carcinogenesis [5,6]. These alterations can be analyzed using many different analytical platforms, with the majority being based on mass-spectrometry detection and identification [7,8]. It is important to note that solid samples such as tissues must be properly prepared prior to instrumental analysis, which generally entails homogenization and analyte extraction. Not only are these protocols time consuming and labor intensive, but they also preclude the use of the sample for additional tests, as it has been permanently modified [9]. To avoid tissue disintegration, researchers have worked to develop new approaches that do not require sample homogenization, such as ambient mass-spectrometry methods (e.g., desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS), matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS)) [10]. However, such analytical methods still require tissue to be excised and cut into thin slices. In contrast, solid-phase microextraction (SPME) enables tissue analysis without any pre-treatment, which has led to its use in a wide range of areas, including neuroscience, pharmacotherapy, and organ transplantation [11–21].

SPME is based on the interaction between analytes and a sorbent coating, which extracts the targeted molecules until equilibrium is reached. However, in the case of untargeted clinical studies, optimizing the extraction time is the best compromise between clinical practicality and extraction efficiency for the metabolites of interest. Furthermore, SPME extraction does not require tissue consumption, as only small molecules are withdrawn from the studied sample; hence, SPME is sometimes also referred to as “chemical biopsy” [21]. Although a number of SPME geometries have been developed to date, including meshes, membranes, and blades [11], coated fibers remain the most popular. SPME fibers consist of a core made from a nickel-titanium alloy rod, and one end coated with an adequate sorbent (e.g., hydrophilic-lipophilic balanced (HLB) or octadecyl (C18)). The diameter of the SPME probe is approximately 200 μm , which makes it thinner than a classical brain biopsy needle (ca. 1.8 mm) and enables the sampling of analytes without significantly disrupting the studied lesion or organ [11,12,20,22]. Apart from minimal invasiveness during sampling, SPME fibers offer a few other key features that are useful in tissue analysis. Firstly, chemical biopsy is a non-depletive method, which means that only a negligible portion of the free fraction of analytes is sampled under given conditions. As a result, metabolic pathways are not interrupted during sampling, which allows sampling to be repeated multiple times to obtain temporal data, particularly in the case of *in vivo* studies, as the biological system is able to immediately recover (re-balance) [21]. Secondly, sampling via SPME facilitates the quenching of the metabolic reaction, as the sorbent only permits the extraction of small molecules, which enables the analysis of even unstable substances [23]. Moreover, the chemical biopsy protocol is simple and fast. During sampling, the probe is simply inserted into the tissue for a predetermined amount of time and then rinsed with water to remove potential remnants of tissue or biological fluids that may be loosely attached. The probe can then be transported to a lab and desorbed immediately or stored until instrumental analysis [11,12].

SPME probes have been previously employed in metabolomic analyses of brain tumors, but their use in in-depth lipidomic profiling has yet to be investigated [13,24]. Therefore, the aim of the present study is to assess the utility of chemical biopsy in the lipidomic

analysis of brain tumors. To this end, a proof-of-concept experiment was first carried out to evaluate the utility of SPME probes in differentiating tumors with different histological origins (meningiomas and gliomas). This was followed by a detailed analysis of gliomas, which entailed using SPME to assess the intra- and inter-tumor distribution of lipids in neoplastic lesions. The lipidomic profile of these lesions was also assessed with respect to malignancy grade, isocitrate dehydrogenase mutation status, and the presence of 1p/19q codeletion.

2. Results

2.1. Assessing Tumor Heterogeneity Based on Lipidome Composition

The reliability of SPME probes for the analysis of heterogeneous tumors was assessed by using three 7 mm C18 probes (Figure 1) to perform extractions from four meningiomas and four high-grade gliomas, followed by lipidomic analysis.

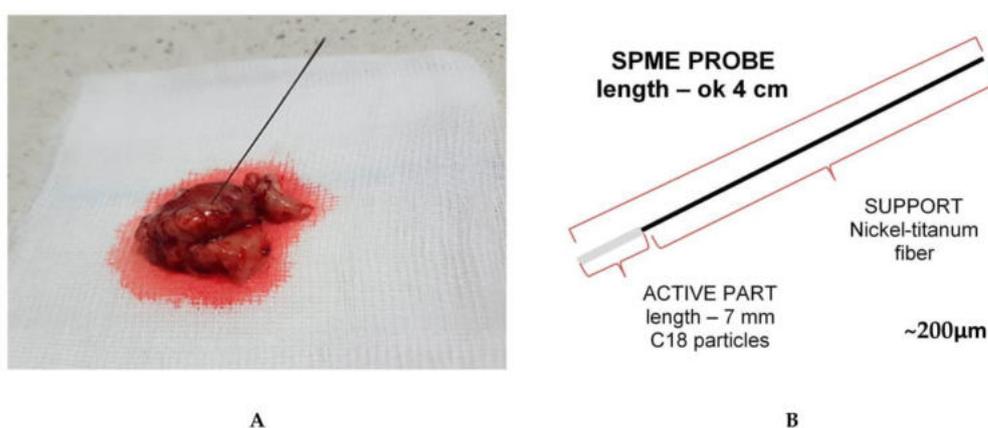


Figure 1. Chemical biopsy probes: (A) SPME probe during the sampling of a brain tumor; (B) the construction of the SPME probes.

It was observed that these histologically different tumors formed two distinct and separate groups on a three-dimensional PCA plot built on all tentatively detected lipids (Figure 2A). Nonetheless, diversity in each group was observed. A subsequent two-dimensional PCA plot showed that samples obtained from the same tumor type were situated close to each other (Figure 2B). Furthermore, a high degree of correlation was observed in lipidome data obtained from the same tumor with all three probes. The correlation plots for these data were presented in Supplementary Materials (Figures S1 and S2). In addition, cluster analysis showed that the samples formed two groups that further divided into subgroups corresponding to individual patients, indicating that intra-tumor variability was significantly smaller than inter-tumor differences (Figure 2C). A quick review of the variation in the results was then performed by examining the coefficients of variation for lipid species with structures confirmed by MS/MS analysis (Table S2). We observed that, in the majority of cases, the coefficient of variation (CV) for a particular tumor was below 30%. The presence of HexCer was characterized by higher CV values and lower normalized peak areas. Significantly higher variation was observed when calculating the average CV value of a given lipid in a given tumor type, which was driven by inter-patient variability (Table S1).

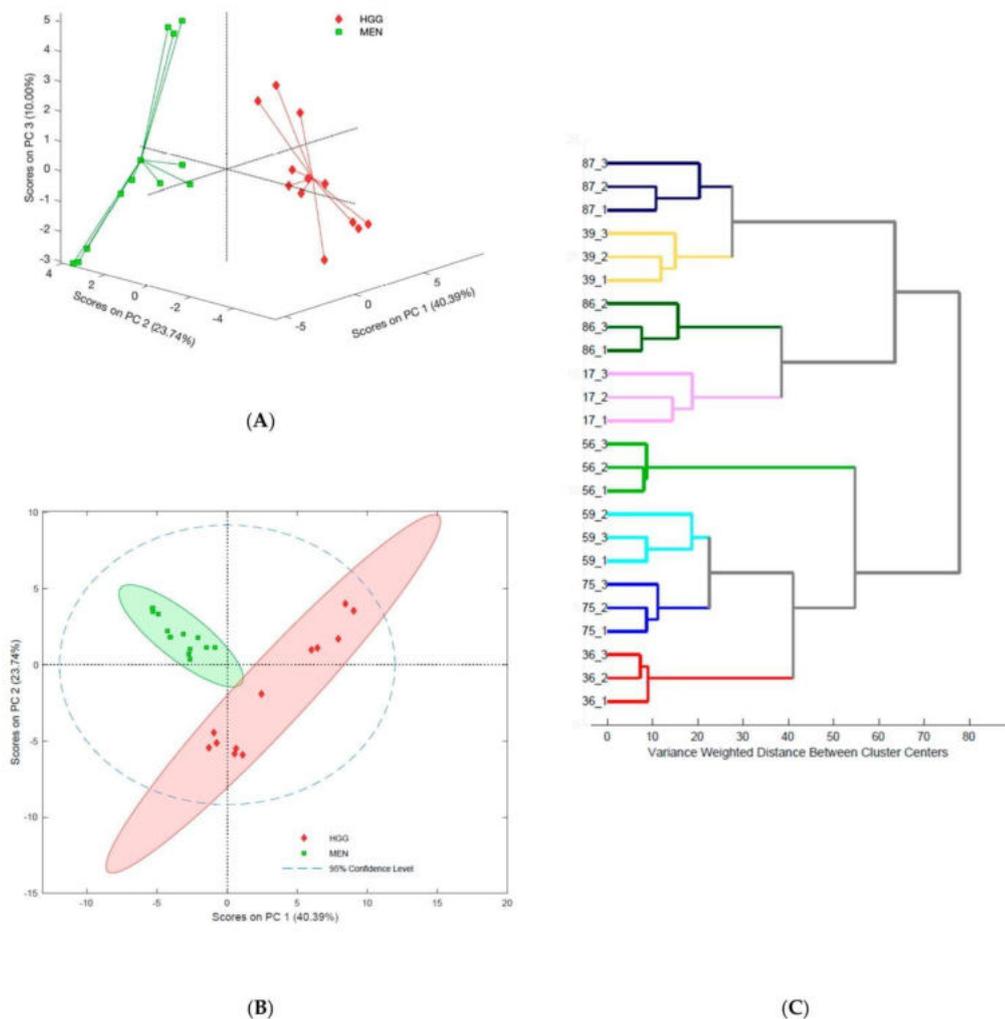


Figure 2. (A) Three-dimensional principal component analysis plot; preprocessing of variables: log10 and autoscale. (B) Two-dimensional principal component analysis plot showing samples from the same tumor; preprocessing of variables: log10 and autoscale. (C) Hierarchical clustering dendrogram based on tentative lipids with a VIP score above 1.0; preprocessing of variables: log10 and autoscale. Samples 36, 56, 59, and 75 were meningiomas, and samples 17, 39, 86, and 87 were gliomas. The number after the lower dash denotes the replicate inserted into the same lesion.

2.2. Differentiation of Brain Tumors

Following the heterogeneity experiment, the lipidomic profiling of meningiomas and gliomas was conducted using a bigger cohort. In addition, a more in-depth analysis of gliomas that assessed their grade, IDH mutation status, and 1p/19q co-deletion status was conducted. The proposed method enabled the extraction of a wide range of tentative lipids, as well as the structural confirmation of 15 phosphatidylcholines

(PC), 46 phosphatidylethanolamines (PE), 10 lysophosphatidylcholines (LPC), one phosphatidylethanolamine (LPE), 13 sphingomyelins (SM), 5 ceramides (Cer), 18 hexoylceramides (HexCer), 2 lactosylceramides (LacCer), and one sulfatide (ST d42:2) via MS/MS analysis. A list of identified lipid species is provided in Table S2. Lipid species with MS/MS-confirmed structures received greater attention in further analyses than those that were only identified tentatively.

2.2.1. Lipidomic Profiles of Brain Tumors with Different Histological Origins

The lipidomes of both types of tumors largely consisted of phospholipids, with PEs as one of the major groups at approximately 49% and 46% for meningiomas and gliomas, respectively (Figure S3A,B). PCs comprised the second largest group of lipids at 27% for meningiomas and 24% for gliomas. The remaining lipid groups were made up of lysoforms of PCs and PEs, as well as sphingolipids. More in-depth analysis revealed that gliomas had significantly higher levels of Cer and HexCer compared to meningiomas and that both tumors had coefficients of variation that were higher than 100%. Gliomas also contained increased levels of sphingolipids and phospholipids, but the CVs for these lipids was lower than 50%. Notably, LPE and ST should not be analyzed separately, as only one species of each group was identified in this experiment: LPE P-16:0 and ST 42:2;O2, respectively. A detailed account of the comparative statistical analysis results is provided in the Supplementary Materials (Table S3).

Chemometric analysis of tentatively identified lipids with a VIP-score above 1.0 confirmed the good separation of meningiomas and gliomas that had been observed previously (Figures 2 and 3). This analysis was confirmed through a positive permutation test and acceptable errors. All of the parameters used in the chemometric analysis (Table S4) and the PCA (Figure S4) are presented in the Supplementary Materials.

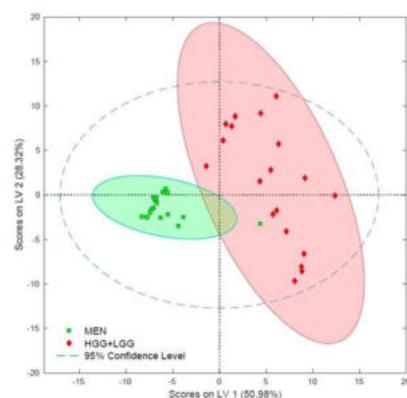


Figure 3. Chemometric analysis of meningiomas and gliomas—partial least squares data analysis (PLS-DA) performed on all detected features with a VIP above 1.0.

2.2.2. Lipidomic Differentiation of Gliomas with Different Grades

Tumor grade was not associated with significant variability in the lipidome. Detailed statistical analysis of tentatively identified lipids revealed significant changes in 17 species between high-grade gliomas (HGG) and low-grade gliomas (LGG) (Table S5). It should be noted that the set of lysophospholipids with the highest alterations (i.e., LPC P-16:0, LPC P-18:0, LPC 18:2) were present in HGG at over twice the level as in LGG. On the other hand, among lipids with confirmed structures, lower concentrations of one SM were observed in HGG. Nevertheless, based on the selection from all significantly altered tentative lipids, a pattern of only four analytes enabled the differentiation of low-grade gliomas and high-grade gliomas in the PLS-DA model with satisfactory parameters (Figure 4 and Table S4).

Among those lipids was LPC P-16:0, which was present in HGG at twice the concentration it was in LGG, and SM 42:1;O2, which was present at lower levels in higher-grade samples. The PCA can be found in the Supplementary Materials (Figure S5).

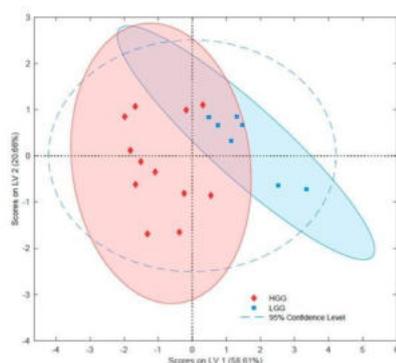


Figure 4. Principal least squares data analysis (PLS-DA) of gliomas with different grades. HGG—high grade glioma; LGG—low grade glioma.

2.2.3. Lipidomic Differentiation of Gliomas with Various IDH1/2 Mutation Statuses

IDH 1/2 mutation status is considered to be one of the most important factors in the clinical diagnosis of gliomas and a good prognosticator of survival [25]. Therefore, an attempt was made to profile the lipidomes of gliomas with and without IDH mutation. The results showed that wildtype tumors (IDHw) had significantly increased LPCs (i.e., LPC O-16:0; LPC P-18:0; LPC 18:0) and lower levels of PCs such as PC 32:1, PC 32:0, and PC 36:1 (Table S7). Notably, wildtype tumors also contained decreased levels of PEs with confirmed structures. While sphingolipids levels generally remained unaltered, two of them, SM 43:4;O2 and LacCer 42:2;O2, were present at increased levels in the wildtype samples. Moreover, it was possible to select the set of 16 tentative lipid species that enable differentiation of gliomas based on the IDH 1/2 mutation status (Figure 5 and Table S4). Among these analytes were the phosphatidylethanolamines PE O-36:4, PE 38:4, and PE O-40:6, which were present at higher levels in the mutant samples. In contrast, LPC O-16:0 and SM 43:4;O2 were downregulated in the mutant samples (IDHm). The complete set of differentiating tentative lipids (Table S6) and the PCA plot can be found in the Supplementary Materials (Figure S6).

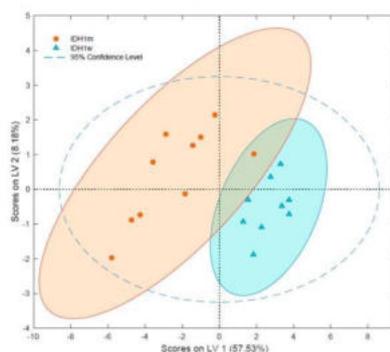


Figure 5. Partial least square data analysis (PLS-DA) of gliomas with different IDH mutation statuses. IDHm—*isocitrate dehydrogenase gene mutant*; IDHw—*isocitrate dehydrogenase gene wildtype*.

2.2.4. Lipidomic Differentiation of Gliomas with Various 1p/19q Co-deletion Statuses

The lipidomes of neoplasms with different 1p/19q codeletion statuses were characterized by similar lipid composition. Detailed analysis of all of the tentatively identified lipids revealed that 36 were significantly altered in these two types of tumors (Table S7). Specifically, the lysophospholipids LPC O-16:0, LPC P-16:0, LPC 18:0, and LPC P-18:0 were present at higher levels in the non-co-deleted samples, while fully acetylated phospholipids were mainly present at lower levels (Table S7). However, due to the weak parameters of the model, it was not possible to select a set of lipids that could be used to discriminate mutants from wildtype co-deleted and non-co-deleted samples with statistical significance (Figure 6).

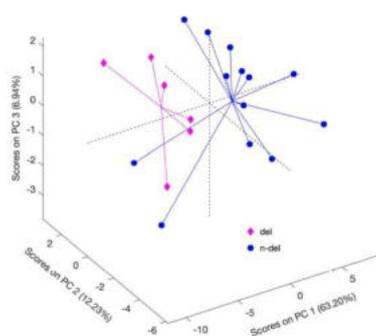


Figure 6. Three-dimensional principal component analysis of brain tumors with different 1p/19q co-deletion statuses. Autoscaling and logarithmic transformation were applied; del- 1p/19q co-deleted samples; n-del- 1p/19q non co-deleted samples.

3. Discussion

The biochemical analysis of cancerous tissue can be challenging; therefore, new approaches capable of simplifying this procedure and expanding the range of obtained information are required. One such potential method is chemical biopsy, which combines sampling and sample preparation into one step, making it easy to use in clinical applications. SPME probes have been previously applied to perform extractions from cell lines and animal and human samples in biomedical studies aimed at examining various medical procedures and diseases (e.g., therapeutic drug monitoring, organ transplantation, malignant hyperthermia) [11,14,16,19,26]. However, only a few reports exist relating to the use of SPME in cancer research. For instance, Goryńska et al. [13] were able to apply SPME to select a distinctive set of metabolites to describe tumors with different histological origins, grades, and genetic mutations. In addition, other findings have shown that the acylcarnitine profile of gliomas changes based on the molecular and histological features of a tumor, which could be related to changes in lipid composition [24]. Lipidome analysis via SPME probes has also been investigated from an analytical perspective, as well as for its usefulness in biomedical applications [18,27–29]. The results of the above studies provide a solid foundation for the assessment of brain tumor lipidomes using chemical biopsy. Cancerous cells are characterized by their high proliferation rate and metabolic plasticity [30,31]. These features enable them to adapt well to changing conditions, which contributes to the development of a wide range of changes in their structure and functions. These alterations result in diversity at the inter-tumoral (between patients) and intra-tumoral (heterogeneity within the same lesion) levels [32]. As such, the selection of a set of biomarkers that can enable the stratification of tumors with satisfactory specificity, in addition to providing accurate and fast assessment of patient outcomes, is highly challenging [33]. To address this challenge, we analyzed how tumor heterogeneity—specifically, heterogeneity within and between meningiomas and gliomas—impacts the reliability of lipidomic profiling via

chemical biopsy. As expected, unsupervised analysis revealed clear separation between the different histological types of brain tumor (Figure 2). Although inter-patient variability was observed in both groups, the group containing glioma samples demonstrated higher variability defined by PC2 (Figure 2A,B). In general, the inter-patient variability can be explained by diversity among the patients with respect to the location of the tumor, age, sex, lifestyle, and other environmental factors; nonetheless, the characteristics of the glioma samples featured a much higher degree of molecular alteration overall.

Intra-tumoral diversity is an additional challenge associated with the use of SPME probes, as these devices only extract analytes from a small area around the fiber. Various approaches can be used to characterize the spatial heterogeneity of tumors on a histological, genetic, transcriptomic, epigenetic, and metabolomic level [32,34,35]. Thus, there is significant risk of obtaining false results due to sampling only a small area. However, the inter-probe reproducibility results associated with the sampling of a given tumor showed high correlation factors between the lipid profiles obtained by individual probes (Figures S1 and S2). Ultimately, the data show that the set of extracted lipids for all fibers will be characteristic of that particular lesion, and that eventual variances will be relatively insignificant. As can be seen in the cluster analysis shown in Figure 2C, the samples from specific tumors are closer to each other than they are to samples obtained from different patients, despite being the same type of tumor (Figure 2C). Therefore, the diversity among the samples can be largely explained by the diversity of the patients. Variations in the level of analytes in the same tumor were acceptable in most cases, with the exception of ceramides and their derivatives; indeed, low levels of these lipids in the studied samples may explain the high CVs that were obtained (Table S1). Another possible explanation could be related to decreased levels of some lipids due to the partial degradation of samples during storage between excision and their use for extractions [36]. Nevertheless, based on the current findings, it can be concluded that long fibers are a good option for extracting analytes from an entire lesion to obtain an average lipidomic profile. Alternatively, chemical biopsy tools such as miniaturized SPME probes enable dot-sampling, which was developed by Vasiljevic et al. [37], and can be employed to sample small target areas, such as profiling of necrotic lesion or calcification region. Another tool that has been applied to obtain spatially resolved data is an SPME device consisting of four fibers, which was successfully deployed to extract analytes from grey and white matter during neurosurgical procedures [21]. In addition, the ability of a single fiber to capture the average lipidome composition of an entire lesion is valuable with respect to the future use of this technology in vivo studies. At present, there are numerous reports documenting the use of SPME probes on human subjects during surgical procedures or biopsies [14,21]. The ability to insert a chemical biopsy probe into a pathologically changed lesion followed by fast detection (e.g., with microfluid open interface mass spectrometry (MOI-MS) or coated-blade-spray mass spectrometry (CBS-MS)) indicates this approach's immense potential for use in intraoperative diagnostics [38].

Next, investigations were conducted on larger group of meningiomas and gliomas with more complex characteristics (different grades and mutations) (Table S8). Our results detected two separate groups of meningiomas and gliomas (from 2nd to 4th grade), which was consistent with the findings of other researchers who analyzed the metabolic profile of these types of lesions using different platforms, such as DESI-MS and magnetic resonance imaging (MRI) [13,39]. HILIC chromatography, which was employed to separate hydrophilic lipids based on their representative polar head-group classes, enabled the detection of a wide range of phospholipids and sphingolipids (Table S2) [7,40]. Interestingly, the results revealed that gliomas, which are higher malignancy neoplasms compared to meningiomas, contained higher amounts of ceramides and their derivatives (i.e., HexCer), while meningiomas contained higher levels of SMs, PCs, PEs, and LPCs (Figure S3 and Table S3). These alterations did not align with previous reports on biochemical alterations in gliomas compared to healthy tissue [6,41,42]; thus, further studies, possibly including spatially resolved in vivo sampling of healthy and cancerous tissue, are required to investigate this

discrepancy in greater depth. It must also be emphasized that the above-described comparison was performed as a proof-of-concept to verify the proposed method's applicability for the differentiation of brain tumors, and that further in-depth biological interpretation and discussion of these results was not undertaken, as currently available clinical tools already enable the easy identification of these lesions [25]. Given the relatively easy diagnosis of meningiomas compared to the high complexity resulting from the histological and molecular diversity in gliomas, further studies using chemical biopsy to examine the lipidomic profiles of gliomas were performed to assess this method's viability for future use in the diagnostic process.

The ability to accurately assess the grade of a malignant tumor is critical in the prognosis of a patient's survival. However, histological examination is often difficult due to the high diversity of glioma cells and the microenvironment of the tumor [32,35,43]. Examinations of a tumor via microscope are subjective and dependent on the pathologist's experience, which can result in misclassification [43]. The metabolomic or lipidomic phenotype of a tumor reflects not only its histopathological information, but also contains all of the information about the given sample. As such, it is possible to select the biochemical features corresponding to the given characteristics of the sample (e.g., malignancy grade) by comparing the metabolomic/lipidomic data with a reference. In the current study, the PLS-DA comparing the lipidomic profiles obtained for gliomas and the histology results for their malignancy grades shows two separate groups corresponding to LGG and HGG (Figure 4 and Table S4). However, some slight overlapping was observed among some samples, which could indicate that malignant neoplasms undergo dynamic processes, and that strict assignment to specific grades can be questionable in some cases. Therefore, it is difficult to determine whether instances of misclassification are due to the lipidomic data or the histological assignment. Significant alterations were only observed in a few lipidomic features between LGG and HGG. This can be explained either by the relatively small size of the studied cohort and high diversity among the samples on the one hand, or by the dynamics of the malignancy process on the other, which renders differences in the levels of individual lipid species irrelevant (Table S5). Interestingly, the upregulation of LPCs could indicate alterations in the pathway responsible for the production of LPCs from PCs via the action of phospholipases [44]. In the next step, the LPCs are further modified and are acetylated back to PCs via lysophospholipids acetyltransferase. This cycle of hydrolysis and acetylation of phospholipids is known as the Lands cycle [44]. Other alterations in the lipid profile are related to changes in cell membrane composition and signal transduction [5,6]. Cells membranes consist of a bilayer of lipids that are distributed unevenly [45]. The outer layer is mainly composed of PCs and SMs, while the inner layer is largely comprised of PEs and phosphatidylserines (PSs). During apoptosis, PSs are transferred to the outer layer and act as labels for the cells, which undergo phagocytosis [46]. Moreover, since the membrane's fluidity and ability to adapt to dynamic changes is associated with changes in lipid composition, changes in membrane composition may be an indicator of ongoing carcinogenesis [47]. It has previously been reported that, apart from changes in the phospholipid content, neoplasms also exhibit alterations in their sphingolipid content [42,48]. In our study, the HGG samples showed significantly decreased levels of SM 42:1;O2; however, the biochemical analysis of this observation may be vague due to the detection of only one sphingolipid showing statistically significant change (Table S5). SMs are responsible for the formation of lipid rafts in membranes and signal transduction between the cells. Furthermore, higher SM content, which leads to impaired cell-cell and cell-matrix interactions, is also often observed in cancerous tissues [49,50]. Hence, although these reports do not support the observations in this work, the lack of significant changes in other SMs and ceramides (being central molecules in SM synthesis) do not merit further discussion of this phenomena [49].

IDH 1/2 mutation is one of the most important factors in the classification of gliomas, as the detection of its presence is correlated with better patient prognoses [25]. Therefore, we analyzed the lipidome composition in tumors with and without this mutation, with

findings revealing a distinctive set of tentative lipids in the studied model (Figure 5, Tables S4 and S6). This result may indicate that IDH 1/2 mutation not only leads to changes in the tricarboxylic acid cycle (TCA) pathway and oncometabolite accumulation, but that it may also initiate molecular alterations in the lipid profile [13,24,42,51,52] (Table S6). Similar to higher-grade gliomas, our findings showed that patients with worse outcomes (IDHw) had significantly upregulated LPCs, which can be related to alterations in the Lands cycle [44]. Interestingly, this assumption is even stronger here than in the analysis of the relationship between grade and lipidome composition because, along with the increase of LPCs, the significant downregulation of PCs in IDHw samples can be observed (Table S6). This downregulation indicates that the level of both forms of LPC and PC is interdependent. The wildtype samples were also found to contain lower levels of all PEs, which could be also explained by disruptions in the Lands cycle. However, changes in membrane composition or signal transduction are also possible explanations for this observation. The literature contains reports of alterations to the sphingolipid pathways in IDHm, which is consistent with our observations [42]. Additionally, elevated levels of SM 43:4;O2 and LacCer 42:2;O2 were also observed in the IDH wildtype samples. As mentioned earlier, SMs are responsible for cell–cell and cell–matrix interactions. Cancerous tissue is usually characterized by the upregulation of this lipid class, which causes the cell to lose control of its metabolism. Increases in SM content are usually related to the downregulation of ceramides. Even though no significant decrease in Cer was observed, the upregulation of LacCer was detected. Cancerous tissue usually contains higher concentrations of LacCer due to the higher activity of ceramide metabolic enzymes such as glucosylceramide synthase in these tissues [53]. These enzymes change Cer into LacCer, which decreases the level of Cer and, as a result, lowers the proapoptotic activity of ceramides. The higher levels of LacCer and SM could be related to the aforementioned decrease in Cer levels. However, since the direct alteration of Cer levels was not observed in this study, this relationship should be further investigated via more comprehensive instrumental analysis (e.g., reversed-phase liquid chromatography). Moreover, it should be noted that almost all LGG were IDHm, while the majority of HGG were IDHw, which could be a limitation in drawing solid conclusions. Thus, bigger study group should be employed to study this phenomenon.

Chromosomal aberrations in the 1p/19q positions can be used to differentiate oligodendrogliomas from astrocytomas, although its value is mainly diagnostic [25]. The literature also contains reports of better radiotherapy outcomes for patients with this aberration; however, evidence supporting these outcomes is not solid at present [54]. In the current study, significant alterations in lipids were observed in samples with and without 1p/19q co-deletion (Table S7). Among these lipids, the changes in phospholipids were particularly notable, as they indicate transformations in membrane bilayer composition. However, the PCA model created using tentatively selected lipids did not meet the validation criteria and could not be used to differentiate tumors based on 1p/19q co-deletion status (Figure 6). These observations could indicate that lipid metabolism is not directly related to the presence of co-deletion; however, the small study group used in this study is a limiting factor that prevents any solid conclusions. Notably, the intermediates regulating fatty acid oxidation did not indicate a relationship between this group of lipids and the presence of chromosomal aberration in previous studies profiling acylcarnitines in gliomas [24,30]. However, the literature contains studies wherein glioma samples are initially characterized based on IDH mutation, followed by the division of subsets based on the presence/absence of 1p/19q co-deletion [25,54–56]. This approach enables inter-tumoral heterogeneity to be narrowed down and aids in the selection of important lipids. Unfortunately, such analysis was not possible in the current study due to the small sample and the fact that 1p/19q co-deleted gliomas were all IDHm and only three non-1p/19q-deleted gliomas were IDH-mutated. Furthermore, low differentiation power could indicate the need for more complex grouping of molecular factors.

4. Materials and Methods

4.1. Chemicals and Materials

All solvents (isopropanol, methanol, water, acetonitrile) and ammonium acetate used in this research were liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) grade, and were purchased from Merck (Poznan, Poland). External calibrant Pierce LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution was obtained from Thermo Scientific (San Jose, CA, USA), and fibers coated with octadecyl (C18) were kindly provided by Supelco (Bellefonte, PA, USA).

4.2. Biological Material

Brain tumors were obtained during neurosurgical procedures in 10th Military Research Hospital and Polyclinic in Bydgoszcz. This study was approved by Bioethical Committee in Bydgoszcz (KB 628/2015).

For the intra- and inter-tumor heterogeneity experiments, eight brain tumors (four meningiomas and four gliomas) were obtained and stored at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ until sampling and instrumental analysis.

The lipidome profiling experiment comprised the analysis of samples from 36 patients (22 females, 14 males) with a median age of 52 (minimum 24 and maximum 79). Of these patients, 18 had been diagnosed with meningiomas (MEN) and 18 had been diagnosed with gliomas. Sampling with the SPME probes was performed on-site directly after brain tumor excision.

A detailed characterization of the patients included in these experiments is provided in Table S8 in the Supplementary Materials.

4.3. Histological Data and Genetic Tests Results

The grades of the studied tumors were assessed by a histopathologist. Grade 1 and 2 tumors comprised the low-grade glioma (LGG) group, while Grade 3 and Grade 4 tumors formed the high-grade glioma (HGG) group.

The IDH1/2 status and presence of 1p/19q codeletion were assessed using a SALSA MLPA P088-D1 kit (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) in accordance with the manufacturer's protocol.

4.4. Chemical Biopsy (Solid-Phase Microextraction) Protocol

Solid-phase microextraction probes were used to conduct sampling on the excised brain tumors, as shown in Figure 1. Before sampling, the fibers were trimmed to 7 mm in length and preconditioned overnight in a methanol: water (1:1 *v/v*) solution to activate the sorbent; the probes were then rinsed in water immediately before sampling. Extractions were performed by inserting the probe into the sample for 30 min, followed by gentle rinsing in water and storage in a freezer ($-30\text{ }^{\circ}\text{C}$) until instrumental analysis. The fibers were desorbed into 150 μL of an isopropanol:methanol (1:1 *v/v*) solution with the use of silanized inserts. Desorption was conducted for 1 hour under agitation at 1200 rpm. A more detailed account of this protocol, with minor modifications, has been published elsewhere [57].

4.5. Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) Analysis

Liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (Q Exactive Focus, Thermo Scientific, Bremen, Germany) was used for instrumental analysis. The LC parameters were as follows: phase A—5 mM ammonium acetate in water; phase B—acetonitrile; gradient—0–2 min at 96% B, gradual decrease of B until 80% B at 15.0 min, and 15.1–21.0 min at 96% B; SeQuantZIC-CHILIC (Merck, Poznań, Poland) 3 μm 100 \times 2.1 mm column; mobile phase flow rate—0.4 mL/min; oven temperature—40 $^{\circ}\text{C}$; and injection volume—10 μL . The extracts obtained from the lesions sampled on-site were analyzed in full-scan mode, with lipids being tentatively identified in full MS/dd-MS2 confirmation mode. All of the samples obtained from the intra- and inter-tumor hetero-

generality experiments were analyzed using full MS/dd-MS2 confirmation mode based on the list of tentative lipids.

The MS parameters were as follows: positive ion mode scan range— m/z 100–1000; acquisition via AGC (1,000,000 ions); spray voltage—1.5 kV; S-lens RF level—55%; S-lens voltage—25 V; skimmer voltage—15 V; capillary temperature—325 °C; sheath gas—60 a.u.; aux gas—30 a.u.; spare gas—2 a.u.; and probe heater temperature—320 °C. The structure of the tentatively identified lipids was confirmed based on retention time and a mass accuracy of <3ppm. Finally, the fragmentation parameters were as follows: mass resolution—35,000 FWHM; AGC target— 2×10^4 ; minimum AGC— 8×10^3 ; intensity threshold—auto; maximum IT—auto; isolation window—3.0 m/z ; stepped collision energy—20 V, 30 V, 40 V; loop count—2; and dynamic exclusion—auto.

4.6. Data Processing

Data acquisition was performed using dedicated Thermo Scientific software, namely Xcalibur 4.2 and Free Style 1.4 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). The data for the lipidomic studies was processed using LipidSearch 4.1.30 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) with its accuracy set to 3 ppm and intensity threshold set to 10,000. The searched ion adducts included H^+ , NH_4^+ , and Na^+ , with an m -score of 10 and a retention time tolerance of 0.25 being used as the alignment settings. The obtained results were then filtered using the following parameters: for extraction quality control (QC), an area coefficient of variation (CV) below 30 and not equal to 0; the QC: extraction blank area ratio above 20; and a peak quality factor above 0.85 for at least one of the studied groups. Further information relating to these search parameters has been detailed in a previous work [21]. After filtering the results, the peak areas for all of the detected tentative lipids were normalized on the summary peak area of the probe, followed by the application of statistical analysis.

4.7. Statistical Analysis

Statistical significance was calculated based on the Mann–Whitney U Test using Statistica 13.3 PL (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) software. All chemometric calculations were performed using PLS Toolbox (Eigenvector Research Inc., Manson, WA, USA) and MatLab 2020b software (MathWorks, Natick, MA, USA). Principal component analysis (PCA) was first applied to screen for the variability/diversity of the samples, followed by the selection of discriminant analytes based on their p -value and variable importance in projection (VIP) score. Partial least squares data analysis (PLS-DA) was also applied to assess the discriminative power of selected variables. The validation parameters consisted of calculating metrics such as root-mean-squares errors of calibration (RMSEC), cross-validation (RMSECV), and R^2 . Permutation using the Wilcoxon test, significance test, and Rand t -test was also applied. The model was considered to have passed permutation when the p -value was lower than 0.05.

5. Conclusions

SPME probes have been successfully applied on previous occasions for in vivo brain studies and the metabolomic profiling of brain tumors. The current study extends the application of this simple sampling tool, which can readily and easily be applied in clinical settings, to the analysis of brain tumor lipidomes. The resultant data shows high correlation among the different probes that were applied to sample the same tumor. This finding demonstrates the possibility of utilizing a longer coating to obtain information about the lipidome of a given lesion, which is very promising with regards to potential future in vivo applications. A wide range of phospholipids and sphingolipids were extracted from meningiomas and gliomas, which enabled the clear differentiation of tumors with various histological origins. Moreover, alterations detected in the lipidome were shown to reflect the malignancy grade of the studied glioma samples, with the most important alterations being observed at the genome level (i.e., IDH mutation). Considering the

recent documentation of the use of SPME devices to simultaneously sample different brain structures for metabolomic or lipidomic analysis, it can be assumed that this strategy can be used for the concomitant sampling of neoplastic lesions and normal tissue. Eventually, it will be possible to determine target biomarkers, both polar and lipid metabolites, on-site by directly coupling SPME with mass spectrometry or other analytical instrumentation, without the need for time- and solvent-consuming chromatographic separation.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23073518/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, J.B., B.B. and M.H.; methodology, J.B.; formal analysis, J.B.; investigation, J.B., B.B., J.F., P.Z.G., K.G., M.H., K.J. and D.P.; resources, B.B., J.F. and M.H.; data curation, J.B. and B.K.; writing—original draft preparation, J.B.; writing—review and editing, M.B., J.B., and B.B.; visualization, J.B.; supervision, B.B.; project administration, B.B.; funding acquisition, B.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the National Science Center Poland, within research grant No. 2015/18/M/ST4/00059, entitled “New analytical solutions in oncology: From basic research to rapid intraoperative diagnostics.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Bioethics Committee of Collegium Medicum in Bydgoszcz at Nicolaus Copernicus University in Toruń (KB 628/2015).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors would like to acknowledge Supelco/MilliporeSigma for kindly supplying the SPME probes, Thermo Fisher Scientific for granting us access to a Q-Exactive Focus mass spectrometer, and Anchem for its invaluable technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Louis, D.N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; von Deimling, A.; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W.K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Kleihues, P.; Ellison, D.W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Acta Neuropathol.* **2016**, *131*, 803–820. [CrossRef] [PubMed]
2. Matias, D.; Balça-Silva, J.; da Graça, G.C.; Wanjiru, C.M.; Macharia, L.W.; Nascimento, C.P.; Roque, N.R.; Coelho-Aguiar, J.M.; Pereira, C.M.; Dos Santos, M.F.; et al. Microglia/Astrocytes–Glioblastoma Crosstalk: Crucial Molecular Mechanisms and Microenvironmental Factors. *Front. Cell. Neurosci.* **2018**, *12*, 235. [CrossRef] [PubMed]
3. Aldape, K.; Brindle, K.M.; Chesler, L.; Chopra, R.; Gajjar, A.; Gilbert, M.R.; Gottardo, N.; Gutmann, D.H.; Hargrave, D.; Holland, E.C.; et al. Challenges to curing primary brain tumours. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2019**, *16*, 509–520. [CrossRef]
4. Lauko, A.; Lo, A.; Ahluwalia, M.S.; Lathia, J.D. Cancer cell heterogeneity & plasticity in glioblastoma and brain tumors. *Semin. Cancer Biol.* **2021**. [CrossRef]
5. Pan, M.; Qin, C.; Han, X. Lipid Metabolism and Lipidomics Applications in Cancer Research. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*; Springer: Singapore, 2021; Volume 1316, pp. 1–24, ISBN 978-981-33-6785-2.
6. Szlaska, W.; Zendran, I.; Zalesińska, A.; Tarek, M.; Kulbacka, J. Lipid composition of the cancer cell membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2020**, *52*, 321–342. [CrossRef]
7. Cajka, T.; Fiehn, O. Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2014**, *61*, 192–206. [CrossRef] [PubMed]
8. Nabi, M.M.; Mamun, M.A.; Islam, A.; Hasan, M.M.; Waliullah, A.S.M.; Tamanna, Z.; Sato, T.; Kahyo, T.; Setou, M. Mass spectrometry in the lipid study of cancer. *Expert Rev. Proteom.* **2021**, *18*, 201–219. [CrossRef]
9. Züllig, T.; Trötz Müller, M.; Köfeler, H.C. Lipidomics from sample preparation to data analysis: A primer. *Anal. Bioanal. Chem.* **2020**, *412*, 2191–2209. [CrossRef]
10. Deng, J.; Yang, Y.; Luo, L.; Xiao, Y.; Luan, T. Lipid analysis and lipidomics investigation by ambient mass spectrometry. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2020**, *128*, 115924. [CrossRef]
11. Reyes-Garcés, N.; Gionfriddo, E.; Gómez-Ríos, G.A.; Alam, M.N.; Boyacı, E.; Bojko, B.; Singh, V.; Grandy, J.; Pawliszyn, J. Advances in Solid Phase Microextraction and Perspective on Future Directions. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 302–360. [CrossRef]
12. Pawliszyn, J. *Handbook of Solid Phase Microextraction*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2012; ISBN 9780124160170.

13. Goryńska, P.Z.; Chmara, K.; Kupcewicz, B.; Goryński, K.; Jaroch, K.; Paczkowski, D.; Furtak, J.; Harat, M.; Bojko, B. Metabolomic Phenotyping of Gliomas: What Can We Get with Simplified Protocol for Intact Tissue Analysis? *Cancers* **2022**, *14*, 312. [CrossRef] [PubMed]
14. Bojko, B.; Looby, N.; Olkowicz, M.; Roszkowska, A.; Kupcewicz, B.; Reck dos Santos, P.; Ramadan, K.; Keshavjee, S.; Waddell, T.K.; Gómez-Ríos, G.; et al. Solid phase microextraction chemical biopsy tool for monitoring of doxorubicin residue during in vivo lung chemo-perfusion. *J. Pharm. Anal.* **2021**, *11*, 37–47. [CrossRef] [PubMed]
15. Stryjak, I.; Warmuzińska, N.; Luczykowski, K.; Hamar, M.; Urbanellis, P.; Wojtal, E.; Masztalerz, M.; Selzner, M.; Włodarczyk, Z.; Bojko, B. Using a chemical biopsy for graft quality assessment. *J. Vis. Exp.* **2020**, *160*, e60946. [CrossRef] [PubMed]
16. Lendor, S.; Hassani, S.A.; Boyaci, E.; Singh, V.; Womelsdorf, T.; Pawliszyn, J. Solid Phase Microextraction-Based Miniaturized Probe and Protocol for Extraction of Neurotransmitters from Brains in Vivo. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 4896–4905. [CrossRef] [PubMed]
17. Hassani, S.A.; Lendor, S.; Boyaci, E.; Pawliszyn, J.; Womelsdorf, T. Multineuromodulator measurements across fronto-striatal network areas of the behaving macaque using solid-phase microextraction. *J. Neurophysiol.* **2019**, *122*, 1649–1660. [CrossRef]
18. Boyaci, E.; Lendor, S.; Bojko, B.; Reyes-Garcés, N.; Gómez-Ríos, G.A.; Olkowicz, M.; Diwan, M.; Palmer, M.; Hamani, C.; Pawliszyn, J. Comprehensive Investigation of Metabolic Changes Occurring in the Rat Brain Hippocampus after Fluoxetine Administration Using Two Complementary In Vivo Techniques: Solid Phase Microextraction and Microdialysis. *ACS Chem. Neurosci.* **2020**, *11*, 3749–3760. [CrossRef]
19. Bojko, B.; Goryński, K.; Gomez-Rios, G.A.; Knaak, J.M.; Machuca, T.; Spetzler, V.N.; Cudjoe, E.; Hsin, M.; Cypel, M.; Selzner, M.; et al. Solid phase microextraction fills the gap in tissue sampling protocols. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *803*, 75–81. [CrossRef]
20. Cudjoe, E.; Bojko, B.; Delannoy, I.; Saldivia, V.; Pawliszyn, J. Solid-phase microextraction: A complementary In Vivo sampling method to microdialysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 12124–12126. [CrossRef]
21. Bogusiewicz, J.; Burlikowska, K.; Luczykowski, K.; Jaroch, K.; Birski, M.; Furtak, J.; Harat, M.; Pawliszyn, J.; Bojko, B. New chemical biopsy tool for spatially resolved profiling of human brain tissue in vivo. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 19522. [CrossRef]
22. Trojanowski, P.; Jarosz, B.; Szczepanek, D. The diagnostic quality of needle brain biopsy specimens obtained with different sampling methods—Experimental study. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 8077. [CrossRef]
23. Napylov, A.; Reyes-Garcés, N.; Gomez-Rios, G.; Olkowicz, M.; Lendor, S.; Monnin, C.; Bojko, B.; Hamani, C.; Pawliszyn, J.; Vuckovic, D. In Vivo Solid-Phase Microextraction for Sampling of Oxylipins in Brain of Awake, Moving Rats. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 2392–2398. [CrossRef] [PubMed]
24. Bogusiewicz, J.; Burlikowska, K.; Jaroch, K.; Goryńska, P.Z.; Goryński, K.; Birski, M.; Furtak, J.; Paczkowski, D.; Harat, M.; Bojko, B. Profiling of carnitine shuttle system intermediates in gliomas using solid-phase microextraction (SPME). *Molecules* **2021**, *26*, 6112. [CrossRef] [PubMed]
25. Louis, D.N.; Perry, A.; Wesseling, P.; Brat, D.J.; Cree, I.A.; Figarella-Branger, D.; Hawkins, C.; Ng, H.K.; Pfister, S.M.; Reifenberger, G.; et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Neuro. Oncol.* **2021**, *23*, 1231–1251. [CrossRef] [PubMed]
26. Filipiak, W.; Bojko, B. SPME in clinical, pharmaceutical, and biotechnological research—How far are we from daily practice? *TrAC Trends Anal. Chem.* **2019**, *115*, 203–213. [CrossRef]
27. Birjandi, A.P.; Bojko, B.; Ning, Z.; Figeys, D.; Pawliszyn, J. High throughput solid phase microextraction: A new alternative for analysis of cellular lipidome? *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2017**, *1043*, 12–19. [CrossRef]
28. Reyes-Garcés, N.; Diwan, M.; Boyaci, E.; Gómez-Ríos, G.A.; Bojko, B.; Nobrega, J.N.; Bambico, F.R.; Hamani, C.; Pawliszyn, J. In vivo brain sampling using a microextraction probe reveals metabolic changes in rodents after deep brain stimulation. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 9875–9884. [CrossRef]
29. Huq, M.; Rosales-Solano, H.; Pawliszyn, J. Investigation of binding of fatty acids to serum albumin to determine free concentrations: Experimental and in-silico approaches. *Anal. Chim. Acta* **2022**, *1192*, 339370. [CrossRef]
30. Melone, M.A.B.; Valentino, A.; Margarucci, S.; Galderisi, U.; Giordano, A.; Peluso, G. The carnitine system and cancer metabolic plasticity review-article. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 228. [CrossRef]
31. Meacham, C.E.; Morrison, S.J. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* **2013**, *501*, 328–337. [CrossRef]
32. Gularyan, S.K.; Gulin, A.A.; Anufrieva, K.S.; Shender, V.O.; Shakhparonov, M.I.; Bastola, S.; Antipova, N.V.; Kovalenko, T.F.; Rubtsov, Y.P.; Latyshev, Y.A.; et al. Investigation of inter- and intratumoral heterogeneity of glioblastoma using TOF-SIMS. *Mol. Cell. Proteom.* **2020**, *19*, 960–970. [CrossRef]
33. Henry, N.L.; Hayes, D.F. Cancer biomarkers. *Mol. Oncol.* **2012**, *6*, 140–146. [CrossRef] [PubMed]
34. Wenger, A.; Vega, S.F.; Kling, T.; Bontell, T.O.; Jakola, A.S.; Carén, H. Intratumor DNA methylation heterogeneity in glioblastoma: Implications for DNA methylation-based classification. *Neuro. Oncol.* **2019**, *21*, 616–627. [CrossRef] [PubMed]
35. Bergmann, N.; Delbridge, C.; Gempt, J.; Feuchtinger, A.; Walch, A.; Schirmer, L.; Bunk, W.; Aschenbrenner, T.; Liesche-Starnecker, F.; Schlegel, J. The Intratumoral Heterogeneity Reflects the Intertumoral Subtypes of Glioblastoma Multiforme: A Regional Immunohistochemistry analysis. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 494. [CrossRef] [PubMed]
36. Roszkowska, A.; Yu, M.; Bessonneau, V.; Bragg, L.; Servos, M.; Pawliszyn, J. Tissue storage affects lipidome profiling in comparison to in vivo microsampling approach. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 6980. [CrossRef] [PubMed]
37. Vasiljevic, T.; Singh, V.; Pawliszyn, J. Miniaturized SPME tips directly coupled to mass spectrometry for targeted determination and untargeted profiling of small samples. *Talanta* **2019**, *199*, 689–697. [CrossRef]

38. Gómez-Ríos, G.A.; Mirabelli, M.F. Solid Phase Microextraction-mass spectrometry: Metanoia. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2019**, *112*, 201–211. [[CrossRef](#)]
39. Jarmusch, A.K.; Pirro, V.; Baird, Z.; Hattab, E.M.; Cohen-Gadol, A.A.; Cooks, R.G. Lipid and metabolite profiles of human brain tumors by desorption electrospray ionization-MS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 1486–1491. [[CrossRef](#)]
40. Cajka, T.; Fiehn, O. Toward Merging Untargeted and Targeted Methods in Mass Spectrometry-Based Metabolomics and Lipidomics. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 524–545. [[CrossRef](#)]
41. Cheng, M.; Bhujwala, Z.M.; Glunde, K. Targeting Phospholipid Metabolism in Cancer. *Front. Oncol.* **2016**, *6*, 266. [[CrossRef](#)]
42. Dowdy, T.; Zhang, L.; Celiku, O.; Movva, S.; Lita, A.; Ruiz-Rodado, V.; Gilbert, M.R.; Larion, M. Sphingolipid Pathway as a Source of Vulnerability in IDH1mut Glioma. *Cancers* **2020**, *12*, 2910. [[CrossRef](#)]
43. Mikkelsen, V.E.; Solheim, O.; Salvesen, Ø.; Torp, S.H. The histological representativeness of glioblastoma tissue samples. *Acta Neurochir.* **2021**, *163*, 1911–1920. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Hishikawa, D.; Shindou, H.; Kobayashi, S.; Nakanishi, H.; Taguchi, R.; Shimizu, T. Discovery of a lysophospholipid acyltransferase family essential for membrane asymmetry and diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 2830–2835. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Bailey, R.W.; Nguyen, T.; Robertson, L.; Gibbons, E.; Nelson, J.; Christensen, R.E.; Bell, J.P.; Judd, A.M.; Bell, J.D. Sequence of physical changes to the cell membrane during glucocorticoid-induced apoptosis in S49 lymphoma cells. *Biophys. J.* **2009**, *96*, 2709–2718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Segawa, K.; Kurata, S.; Yanagihashi, Y.; Brummelkamp, T.R.; Matsuda, F.; Nagata, S. Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. *Science* **2014**, *344*, 1164–1168. [[CrossRef](#)]
47. Valentine, W.J.; Yanagida, K.; Kawana, H.; Kono, N.; Noda, N.N.; Aoki, J.; Shindou, H. Update and nomenclature proposal for mammalian lysophospholipid acyltransferases, which create membrane phospholipid diversity. *J. Biol. Chem.* **2022**, *298*, 101470. [[CrossRef](#)]
48. Companioni, O.; Mir, C.; Garcia-Mayea, Y.; LLeonart, M.E. Targeting Sphingolipids for Cancer Therapy. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 745092. [[CrossRef](#)]
49. Tallima, H.; Azzazy, H.M.E.; El Ridi, R. Cell surface sphingomyelin: Key role in cancer initiation, progression, and immune evasion. *Lipids Health Dis.* **2021**, *20*, 150. [[CrossRef](#)]
50. Barceló-Coblijn, G.; Martin, M.L.; De Almeida, R.F.M.; Noguera-Salvà, M.A.; Marcilla-Etxenike, A.; Guardiola-Serrano, F.; Lüth, A.; Kleuser, B.; Halver, J.E.; Escribá, P.V. Sphingomyelin and sphingomyelin synthase (SMS) in the malignant transformation of glioma cells and in 2-hydroxyoleic acid therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 19569–19574. [[CrossRef](#)]
51. Miyata, S.; Tominaga, K.; Sakashita, E.; Urabe, M.; Onuki, Y.; Gomi, A.; Yamaguchi, T.; Mieno, M.; Mizukami, H.; Kume, A.; et al. Comprehensive Metabolomic Analysis of IDH1 R132H Clinical Glioma Samples Reveals Suppression of β -oxidation Due to Carnitine Deficiency. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 9787. [[CrossRef](#)]
52. Esmaeili, M.; Hamans, B.C.; Navis, A.C.; Van Horsen, R.; Bathen, T.F.; Gribbestad, I.S.; Leenders, W.P.; Heerschap, A. IDH1 R132H mutation generates a distinct phospholipid metabolite profile in glioma. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 4898–4907. [[CrossRef](#)]
53. Morais, C.M.; Cunha, P.P.; Melo, T.; Cardoso, A.M.; Domingues, P.; Domingues, M.R.; Pedroso de Lima, M.C.; Jurado, A.S. Glucosylceramide synthase silencing combined with the receptor tyrosine kinase inhibitor axitinib as a new multimodal strategy for glioblastoma. *Hum. Mol. Genet.* **2019**, *28*, 3664–3679. [[CrossRef](#)]
54. Hu, X.; Martinez-Ledesma, E.; Zheng, S.; Kim, H.; Barthel, F.; Jiang, T.; Hess, K.R.; Verhaak, R.G.W. Multigene signature for predicting prognosis of patients with 1p19q co-deletion diffuse glioma. *Neuro. Oncol.* **2017**, *19*, 786–795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Fack, F.; Tardito, S.; Hochart, G.; Oudin, A.; Zheng, L.; Fritah, S.; Golebiewska, A.; Nazarov, P.V.; Bernard, A.; Hau, A.; et al. Altered metabolic landscape in IDH-mutant gliomas affects phospholipid, energy, and oxidative stress pathways. *EMBO Mol. Med.* **2017**, *9*, 1681–1695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Mur, P.; Mollejo, M.; Ruano, Y.; de Lope, Á.R.; Fiaño, C.; García, J.F.; Castresana, J.S.; Hernández-Lain, A.; Rey, J.A.; Meléndez, B. Codeletion of 1p and 19q determines distinct gene methylation and expression profiles in IDH-mutated oligodendroglial tumors. *Acta Neuropathol.* **2013**, *126*, 277–289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Bogusiewicz, J.; Goryńska, P.Z.; Gaca, M.; Chmara, K.; Goryński, K.; Jaroch, K.; Paczkowski, D.; Furtak, J.; Harat, M.; Bojko, B. On-Site Sampling and Extraction of Brain Tumors for Metabolomics and Lipidomics Analysis. *J. Vis. Exp.* **2020**, *159*, e61260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Investigating the potential use of chemical biopsy devices to characterize brain tumor lipidomes

Joanna Bogusiewicz¹, Bogumiła Kupcewicz², Paulina Zofia Goryńska¹, Karol Jaroch¹, Krzysztof Goryński¹, Marcin Birski³, Jacek Furtak³, Dariusz Paczkowski^{3†}, Marek Harat^{3,4*}, Barbara Bojko^{1*}

- ¹ Department of Pharmacodynamics and Molecular Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Torun, 85-089 Bydgoszcz, Poland; j.bogusiewicz@cm.umk.pl (J.B.); gorynska@cm.umk.pl (P.Z.G.); karol.jaroch@cm.umk.pl (K.J.); goryn-ski@cm.umk.pl (K.G.); bbojko@cm.umk.pl (B.B.)
- ² Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Torun, 85-089 Bydgoszcz, Poland; kupcewicz@cm.umk.pl (B.K.)
- ³ Department of Neurosurgery, 10th Military Research Hospital and Polyclinic, 85-681 Bydgoszcz, Poland; mbirski@poczta.fm (M.B.); jacek.furtak2019@gmail.com (J.F.); darek_paczkowski@vp.pl (D.P.); ha-rat@10wsk.mil.pl (M.H.)
- ⁴ Department of Neurosurgery and Neurology, Faculty of Health Sciences, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Torun, 85-168 Bydgoszcz, Poland
- * Correspondence: bbojko@cm.umk.pl (B.B.) and harat@10wsk.mil.pl (M.H.)
- † current affiliation: Department of Neurosurgery and Neurology, Jan Biziel University Hospital Collegium Medicum, Nicolaus Copernicus University, Bydgoszcz, Poland
- ‡ Current address: Bioanalysis Scientific Group, Faculty of Pharmacy, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Torun, 85-089 Bydgoszcz, Poland

SUPPLEMENTARY MATERIALS

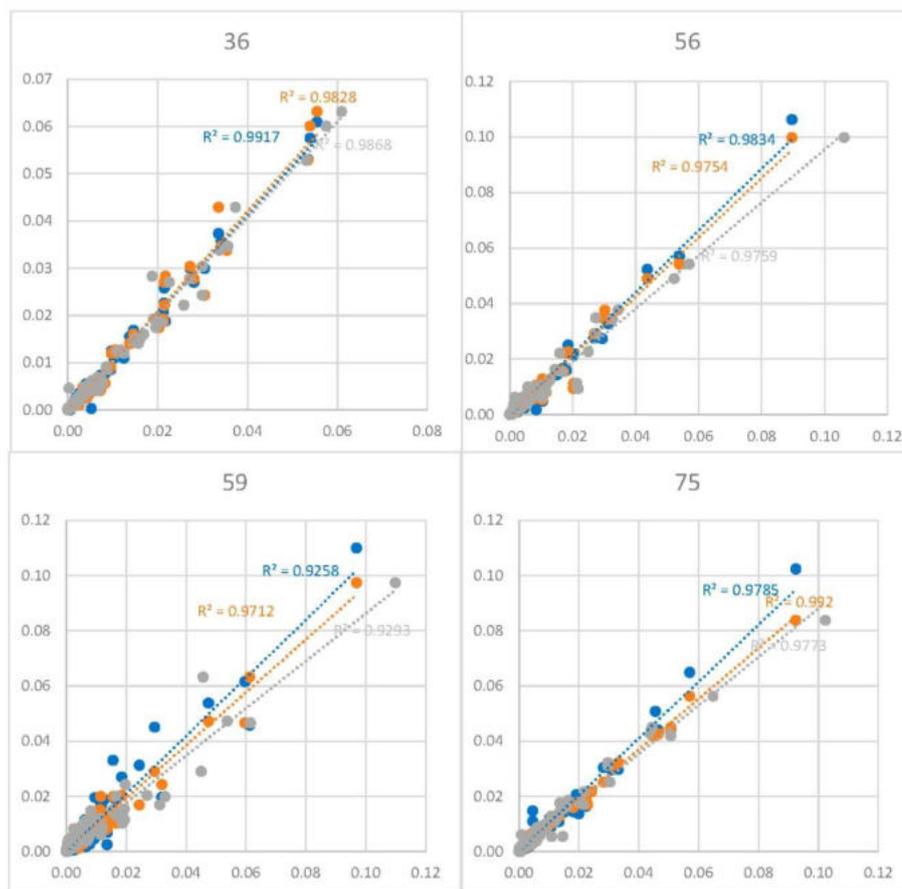


Figure S1. Plots presenting correlation factors of lipidome obtained using three different SPME probes in four different meningioma samples. Blue dots – correlation of fiber 1 and fiber 2; orange dots – correlation of fiber 1 and fiber 3; grey dots – correlation of fiber 2 and fiber 3. Axes represent normalized peak areas for subsequent lipids extracted by studied probes.

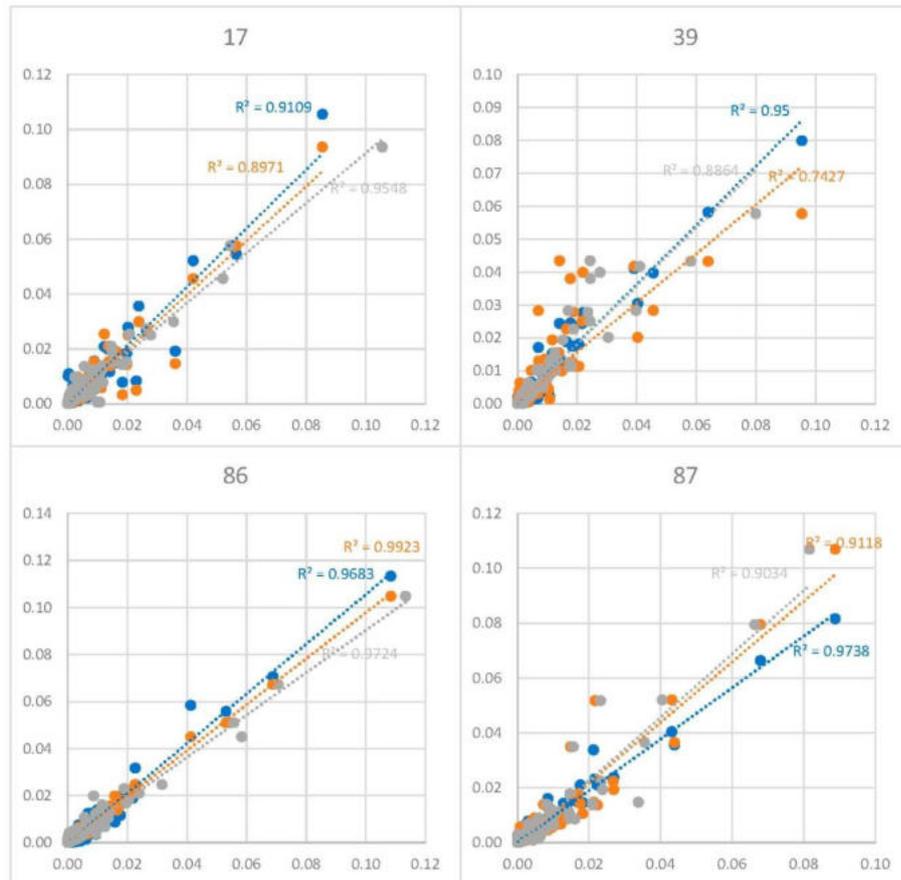


Figure S2. Plots presenting correlation factors of lipidome obtained using three different SPME probes in four glioma samples. Blue dots – correlation of fiber 1 and fiber 2; orange dots – correlation of fiber 1 and fiber 3; grey dots – correlation of fiber 2 and fiber 3. Axes represent normalized peak areas for subsequent lipids extracted by studied probes.

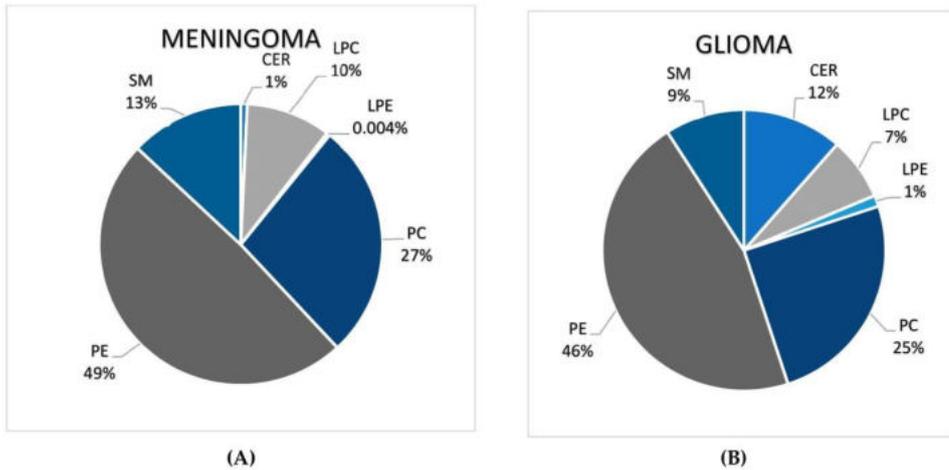


Figure S3. Pie charts presenting lipidome profile of (A) meningiomas; (B) gliomas. CER – ceramides and its derivatives; LPC – lysophosphatidylcholines; LPE – lysophosphatidylethanolamines; PC – phosphatidylcholines; PE – phosphatidylethanolamines; SM – sphingomyelins

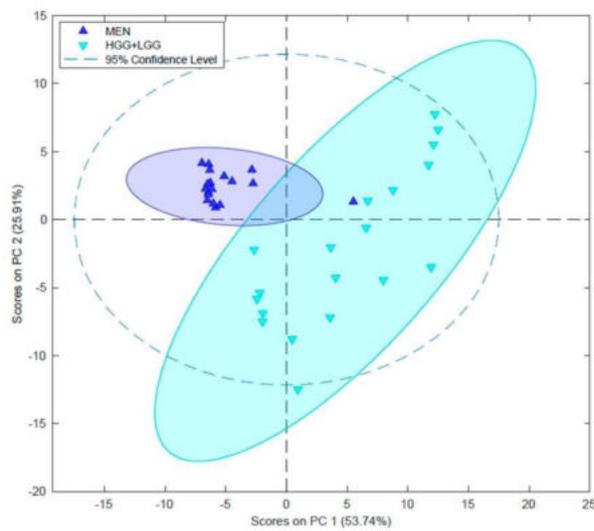


Figure S4. Principal component analysis (PCA) of brain tumors with different histological type. HGG – high grade glioma; LGG – low grade glioma; MEN – meningioma

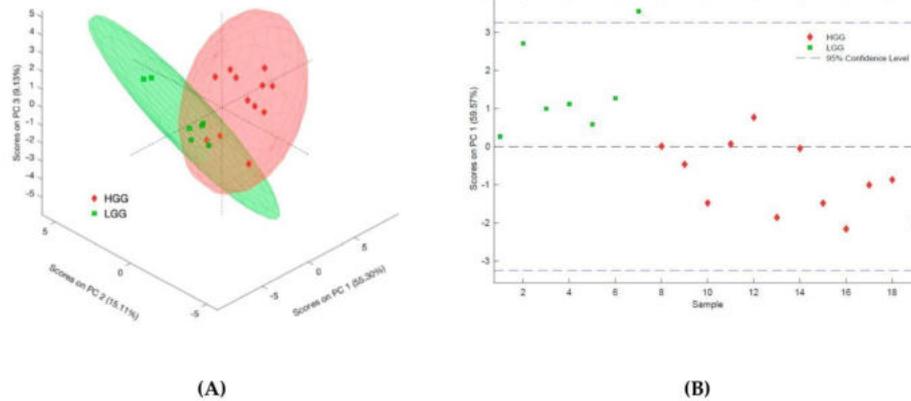


Figure S5. Principal component analysis (PCA) of gliomas with different grade. (A) Three-dimensional principal component analysis of gliomas with different grade performed on significantly altered features. (B) One-dimensional principal component analysis of gliomas with different grade performed on significantly altered features with VIP above 1.0. *HGG* – high grade glioma; *LGG* – low grade glioma

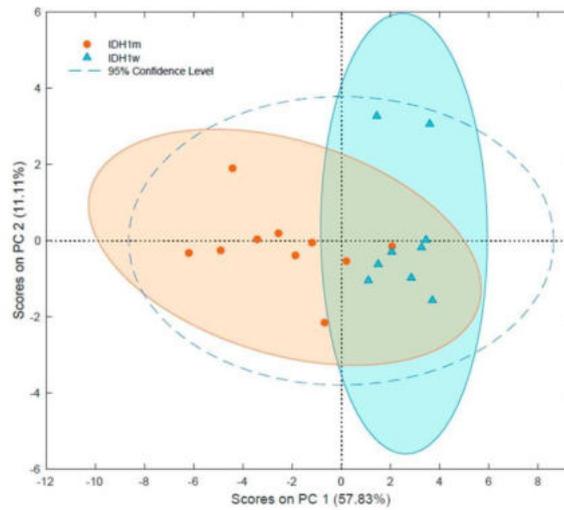


Figure S6. Principal component analysis (PCA) of gliomas with different IDH 1/2 mutation status. *IDHm* – isocitrate dehydrogenase gene mutant; *IDHw* – isocitrate dehydrogenase gene wildtype

Table S1. The list of lipids with confirmed structure which were detected in heterogeneity test

Lipid Species	Shorthand	Adduct	m/z	QC	MEN								HGG											
					36		56		59		75		MEN		17		39		86		87		HGG	
					Average*	CV	Average*	CV	Average*	CV	Average*	CV	Average*	CV	Average*	CV	Average*	CV	Average*	CV	Average*	CV	Average*	CV
LPE P-16:0	+Na	460.2798	5.21E-03	9%	7.74E-03	4%	5.92E-03	9%	5.03E-03	19%	6.23E-03	6%	6.23E-03	18%	7.58E-03	74%	4.24E-03	7%	5.42E-03	19%	6.13E-03	49%	5.84E-03	32%
Cer 42:3; O2	+H	646.6138	2.46E-04	16%	3.45E-04	11%	4.19E-04	16%	2.80E-04	14%	2.76E-04	15%	3.30E-04	22%	4.43E-04	23%	2.89E-04	33%	3.91E-04	26%	1.89E-04	11%	3.28E-04	38%
HesCer 36:1; O2	+H	726.5878	3.40E-04	13%	-	-	7.08E-07	173%	2.62E-06	87%	2.26E-06	173%	1.0E-06	164%	1.77E-03	33%	5.14E-04	40%	9.61E-04	68%	1.13E-05	31%	8.15E-04	95%
HesCer 38:1; O2	+H	756.6348	2.25E-04	12%	3.32E-06	98%	6.46E-06	33%	4.44E-06	14%	-	-	3.5E-06	84%	1.60E-03	31%	1.73E-04	73%	3.36E-04	79%	2.11E-05	173%	5.34E-04	131%
HesCer 41:1; O2	+H	798.6817	1.02E-03	6%	4.76E-05	16%	1.05E-05	119%	6.87E-05	77%	3.66E-05	56%	4.08E-05	81%	5.73E-03	26%	4.73E-06	88%	1.45E-03	76%	9.40E-06	106%	1.80E-03	143%
HesCer 42:2; O2	+H	810.6817	4.03E-04	10%	4.55E-04	164%	6.38E-04	170%	8.93E-05	88%	3.35E-04	163%	3.80E-04	170%	2.37E-03	24%	3.43E-04	164%	7.88E-04	78%	1.69E-04	145%	9.18E-04	110%
HesCer 43:2; O2	+H	824.6974	6.28E-03	45%	-	-	1.37E-06	173%	2.80E-07	173%	5.71E-06	173%	1.84E-06	270%	4.86E-04	49%	-	-	1.54E-04	89%	5.48E-06	173%	1.61E-04	147%
HesCer 44:2; O2	+H	838.7131	2.31E-03	13%	-	-	1.68E-06	93%	4.64E-04	68%	7.39E-05	171%	1.35E-04	184%	1.15E-02	27%	-	-	2.58E-03	76%	2.89E-06	173%	3.52E-03	147%
LPC P-16:0	+H	480.3448	2.73E-03	12%	2.24E-03	8%	6.01E-03	13%	2.23E-03	14%	2.73E-03	4%	3.30E-03	51%	5.50E-03	31%	1.34E-03	20%	1.84E-03	38%	1.31E-03	36%	2.50E-03	80%
LPC O-16:0	+H	482.3608	1.30E-03	15%	4.65E-04	13%	1.19E-03	13%	6.59E-04	37%	4.13E-04	5%	6.81E-04	50%	3.75E-03	40%	6.89E-04	27%	2.38E-03	9%	1.53E-03	40%	2.09E-03	66%
LPC 16:1	+H	494.3241	3.42E-03	8%	2.99E-04	19%	1.69E-03	37%	3.95E-04	12%	8.58E-04	88%	8.11E-04	88%	2.73E-03	134%	1.21E-02	66%	8.70E-03	29%	9.82E-03	14%	8.34E-03	64%
LPC 16:0	+H	496.3398	2.59E-02	11%	1.38E-02	8%	1.84E-02	4%	1.77E-02	13%	1.62E-02	8%	1.65E-02	13%	3.76E-02	34%	4.89E-02	21%	4.19E-02	15%	5.97E-02	17%	4.70E-02	26%
LPC P-18:0	+H	508.3762	1.52E-03	12%	5.52E-04	16%	9.09E-04	11%	6.83E-04	16%	6.85E-04	12%	7.07E-04	22%	2.45E-03	46%	7.26E-04	31%	3.42E-03	90%	1.72E-03	26%	2.08E-03	26%
LPC 18:3	+H	518.3241	1.51E-02	5%	8.07E-03	7%	1.10E-02	5%	9.79E-03	9%	9.64E-03	12%	9.61E-03	13%	2.20E-02	41%	1.35E-02	19%	2.52E-02	8%	3.71E-02	22%	2.90E-02	29%
LPC 18:2	+H	520.3398	2.84E-03	13%	4.43E-04	12%	3.16E-03	7%	1.74E-03	36%	9.26E-04	56%	1.41E-03	88%	1.04E-03	53%	1.97E-03	7%	9.51E-03	19%	6.03E-03	36%	4.64E-03	81%
LPC 18:1	+H	522.3554	1.46E-02	8%	6.05E-03	10%	1.45E-02	13%	6.21E-03	7%	2.92E-03	22%	9.00E-03	42%	2.00E-02	28%	2.14E-02	35%	3.36E-02	18%	1.12E-02	16%	2.40E-02	32%
LPC 18:0	+H	524.3711	8.85E-03	5%	6.53E-03	6%	1.12E-02	12%	8.38E-03	22%	6.98E-03	5%	8.27E-03	26%	1.98E-02	75%	7.47E-03	18%	8.64E-03	21%	1.28E-02	41%	1.22E-02	69%
PC 30:0	+Na	728.5201	1.13E-02	2%	9.23E-03	6%	1.36E-02	11%	9.68E-03	17%	1.00E-02	3%	1.06E-02	19%	1.19E-02	19%	1.83E-02	5%	1.37E-02	22%	6.87E-03	31%	1.27E-02	37%
PC P-34:1	+H	744.5902	1.94E-02	8%	2.06E-02	6%	3.21E-02	7%	1.76E-02	38%	2.60E-02	10%	2.41E-02	27%	3.70E-02	21%	3.22E-03	7%	1.38E-02	47%	1.59E-03	47%	1.39E-02	111%
PC 32:0	+Na	754.5357	2.55E-02	8%	5.51E-03	16%	1.74E-02	6%	1.16E-02	13%	1.38E-02	6%	1.21E-02	38%	3.29E-02	22%	5.51E-02	24%	3.21E-02	4%	3.39E-02	11%	3.85E-02	31%
PC 32:0	+Na	756.5514	7.25E-02	2%	9.70E-02	3%	5.15E-02	10%	8.90E-02	15%	5.44E-02	6%	7.30E-02	30%	5.18E-02	6%	7.95E-02	13%	8.91E-02	12%	7.57E-02	6%	7.40E-02	24%
PC 34:3	+H	766.5748	1.70E-02	5%	9.08E-02	6%	4.81E-02	5%	8.17E-02	26%	5.47E-02	6%	6.89E-02	30%	4.63E-02	11%	7.43E-02	9%	8.13E-02	22%	7.51E-02	7%	6.93E-02	21%
PC P-36:4	+H	766.5748	1.70E-02	5%	1.80E-02	4%	3.17E-02	14%	1.60E-02	28%	2.04E-02	9%	2.15E-02	32%	2.35E-02	9%	7.38E-03	19%	8.96E-03	42%	3.82E-03	25%	1.09E-02	74%
PC 34:2	+Na	804.5514	1.31E-02	6%	5.66E-03	15%	9.64E-03	8%	1.35E-02	22%	1.29E-02	19%	1.04E-02	35%	2.01E-02	30%	2.53E-02	18%	4.07E-02	4%	3.03E-02	3%	1.51E-02	28%
PC 34:1	+Na	782.5671	2.08E-01	2%	1.21E-01	5%	1.84E-01	2%	2.00E-01	2%	2.14E-01	8%	1.80E-01	21%	2.19E-01	2%	1.84E-01	14%	2.33E-01	3%	2.25E-01	13%	2.15E-01	12%
PC 36:4	+Na	804.5514	1.31E-02	6%	5.66E-03	15%	9.64E-03	8%	1.35E-02	22%	1.29E-02	19%	1.04E-02	35%	1.16E-02	15%	1.71E-02	18%	1.17E-02	20%	2.00E-02	3%	1.51E-02	28%
PC 36:3	+Na	806.5671	1.35E-02	3%	3.48E-03	13%	1.09E-02	15%	1.58E-02	9%	9.03E-03	13%	9.80E-03	48%	1.25E-02	14%	1.47E-02	7%	1.80E-02	10%	2.10E-02	7%	1.66E-02	22%
PC 36:2	+Na	808.5827	2.55E-02	3%	7.90E-03	18%	2.27E-02	4%	2.34E-02	19%	1.83E-02	16%	1.81E-02	38%	2.58E-02	10%	2.30E-02	16%	3.92E-02	6%	2.54E-02	16%	2.84E-02	25%
PC 36:1	+Na	810.5983	5.32E-02	8%	2.98E-02	4%	7.35E-02	13%	4.84E-02	25%	6.64E-02	10%	5.45E-02	35%	5.81E-02	9%	3.32E-02	21%	3.94E-02	21%	4.11E-02	11%	4.29E-02	69%
PC 38:5	+Na	830.5671	3.68E-03	3%	1.27E-03	9%	2.66E-03	18%	4.15E-03	20%	3.59E-03	20%	2.92E-03	43%	3.67E-03	13%	5.51E-03	22%	4.18E-03	17%	5.11E-03	17%	4.62E-03	23%
PC 38:4	+Na	832.5827	1.12E-02	7%	3.99E-03	13%	1.45E-02	14%	1.47E-02	36%	1.60E-02	28%	1.29E-02	39%	1.03E-02	8%	9.41E-03	4%	8.16E-03	13%	1.06E-02	16%	9.63E-03	14%
PE P-34:2	+H	700.5278	1.37E-03	8%	1.85E-03	7%	1.90E-03	10%	1.93E-03	23%	1.14E-03	8%	1.70E-03	24%	1.43E-03	26%	6.91E-04	62%	1.37E-03	17%	3.90E-04	59%	9.71E-04	56%
PE P-34:1	+H	702.5433	3.61E-02	8%	7.02E-02	7%	3.98E-02	7%	3.64E-02	17%	6.13E-02	6%	5.19E-02	30%	3.49E-02	17%	1.01E-02	7%	1.46E-02	33%	6.47E-03	23%	1.65E-02	73%
PE 34:2	+H	716.5225	1.50E-03	13%	1.41E-03	20%	2.24E-03	11%	2.68E-03	34%	7.37E-04	6%	1.57E-03	50%	4.84E-04	25%	9.33E-04	43%	1.64E-03	15%	1.59E-03	7%	1.16E-03	47%
PE 34:1	+H	718.5381	1.23E-02	7%	2.18E-02	6%	1.93E-02	6%	1.53E-02	18%	1.78E-02	6%	1.85E-02	16%	3.11E-03	30%	8.78E-03	4%	7.99E-03	14%	1.25E-02	48%	8.10E-03	54%
PE P-34:1	+Na	724.5252	4.36E-02	17%	7.92E-02	24%	4.24E-02	6%	3.69E-02	17%	6.92E-02	17%	5.69E-02	37%	4.06E-02	18%	4.39E-02	8%	1.47E-02	35%	2.16E-02	18%	3.02E-02	45%
PE 34:2	+Na	738.5044	1.59E-03	19%	1.54E-03	10%	2.17E-03	21%	2.77E-03	30%	8.02E-04	7%	1.82E-03	48%	6.59E-04	35%	1.42E-03	14%	1.74E-03	12%	1.80E-03	9%	1.41E-03	36%
PE 34:1	+Na	740.5201	1.62E-02	11%	2.66E-02	10%	2.37E-02	4%	1.76E-02	19%	1.89E-02	4%	2.17E-02	19%	4.19E-03	44%	1.32E-02	13%	1.01E-02	19%	1.73E-02	27%	1.12E-02	49%
PE 36:2	+H	744.5358	5.19E-03	17%	3.05E-03	11%	6.68E-03	9%	6.02E-03	14%	2.69E-03	4%	5.11E-03	51%	2.28E-03	38%	1.33E-03	19%	6.96E-03	17%	4.74E-03	37%	4.28E-03	49%
PE P-38:7	+H	746.5119	2.18E-02	11%	4.10E-02	5%	2.64E-02	20%	2.32E-02	23%	2.22E-02	23%	2.82E-02	32%	6.11E-03	48%	3.68E-02	23%	4.66E-03	39%	2.20E-02	15%	1.74E-02	82%
PE 36:1	+H	746.5694	7.71E-03	48%	1.22E-02	78%	3.09E-02	6%	8.81E-03	4														

Table S2. The list of lipid species identified with the use of MS/MS mode

m/z	RT	adduct	Lipid Species Shorthand
620.5976	4.98	+H	Cer 40:2;O2
666.6395	4.96	+H	Cer 42:1;O3
646.6133	4.64	+H	Cer 42:3;O2
662.6446	2.93	+H	Cer 43:2;O2
674.6446	4.83	+H	Cer 44:3;O2
728.6035	3.01	+H	HexCer 36:1;O2
726.5878	5.31	+H	HexCer 36:2;O2
756.6348	3.2	+H	HexCer 38:1;O2
800.6610	4.92	+H	HexCer 40:1;O3
782.6504	4.93	+H	HexCer 40:2;O2
798.6817	2.89	+H	HexCer 41:1;O2
814.6767	4.99	+H	HexCer 41:1;O3
796.6661	4.85	+H	HexCer 41:2;O2
794.6504	5.16	+H	HexCer 41:3;O2
812.6974	2.77	+H	HexCer 42:1;O2
828.6923	4.95	+H	HexCer 42:1;O3
810.6817	3.02	+H	HexCer 42:2;O2
810.6817	4.93	+H	HexCer 42:2;O2
826.6767	4.68	+H	HexCer 42:2;O3
808.6661	4.74	+H	HexCer 42:3;O2
842.7080	4.87	+H	HexCer 43:1;O3
824.6974	2.62	+H	HexCer 43:2;O2
838.7130	2.57	+H	HexCer 44:2;O2
836.6974	4.92	+H	HexCer 44:3;O2
862.6250	8.25	+H	LacCer 34:1;O2
972.7346	7.92	+H	LacCer 42:2;O2
496.3398	8.57	+H	LPC 16:0
482.3605	8.65	+H	LPC O-16:0
480.3449	8.13	+H	LPC P-16:0
494.3241	8.27	+H	LPC 16:1
524.3711	8.24	+H	LPC 18:0
508.3762	8.56	+H	LPC P-18:0
522.3554	8.38	+H	LPC 18:1
520.3398	8.16	+H	LPC 18:2
518.3217	8.65	+H	LPC 18:3
544.3374	8.41	+H	LPC 20:4
460.2798	9.7	+Na	LPE P-16:0
634.4806	8.16	+H	PC 26:1
728.5201	6.39	+Na	PC 30:0
756.5514	6.39	+Na	PC 32:0
754.5357	6.11	+Na	PC 32:1
782.5670	6.65	+Na	PC 34:1
744.5902	5.9	+H	PC P-34:1
780.5514	6.24	+Na	PC 34:2
756.5538	6.76	+H	PC 34:3
738.5432	6.96	+H	PC P-34:4
810.5983	6.46	+Na	PC 36:1
808.5827	6.59	+Na	PC 36:2
806.5670	6.27	+Na	PC 36:3

804.5514	5.88	+Na	PC 36:4
832.5827	6.27	+Na	PC 38:4
830.5670	5.94	+Na	PC 38:5
742.5357	7.25	+Na	PE 34:0
718.5381	7.10	+H	PE 34:1
740.5201		+Na	
702.5432	7.25	+H	PE P-34:1
724.5252		+Na	
716.5225	7.35	+H	PE 34:2
738.5044		+Na	
700.5276	7.14	+H	PE P-34:2
716.5589	7.12	+H	PE P-35:1
746.5694	7.20	+H	PE 36:1
768.5514		+Na	
744.5538	7.16	+H	PE 36:2
764.5201	7.08	+Na	PE 36:3
748.5252	6.79	+Na	PE O-36:4
724.5276	7.05	+H	PE P-36:4
746.5095	6.78	+Na	PE O-36:5
766.5721	6.99	+Na	PE P-37:1
796.5827	7.05	+Na	PE 38:1
756.5902	6.88	+H	PE P-38:2
778.5721	7.41	+Na	PE O-38:3
768.5538	6.90	+H	PE 38:4
790.5357		+Na	
752.5589	6.98	+H	PE P-38:4
752.5565	6.89	+H	PE P-38:4
766.5357	6.93	+H	PE 38:5
766.5381	7.01	+H	PE 38:5
788.5201		+Na	
774.5408	7.00	+Na	PE O-38:5
750.5432	7.01	+H	PE P-38:5
786.5044	7.12	+Na	PE 38:6
772.5252	7.02	+Na	PE O-38:6
772.5252	6.83	+Na	PE O-38:6
748.5276	6.87	+H	PE P-38:6
770.5097		+Na	
746.5119	6.80	+H	PE P-38:7
784.6215	6.87	+H	PE P-40:2
804.5878	6.84	+Na	PE O-40:4
780.5902	6.95	+H	PE P-40:4
802.5721		+Na	
816.5514	6.89	+Na	PE 40:5
778.5745	6.67	+H	PE P-40:5
792.5538	6.95	+H	PE 40:6
800.5565	6.74	+Na	PE O-40:6
798.5408	6.85	+Na	PE P-40:6
774.5432	6.69	+H	PE P-40:7
806.6058	6.87	+H	PE P-42:5
809.6531	7.42	+H	SM 32:4;O2
835.6688	7.27	+H	SM 34:5;O2

725.5592	7.59	+H	SM 36:4;O2
753.5905	7.41	+H	SM 38:4;O2
781.6218	7.52	+H	SM 40:4;O2
801.6844	7.21	+H	SM 41:1;O2
799.6688	7.43	+H	SM 41:2;O2
815.7001	7.11	+H	SM 42:1;O2
811.6688	7.18	+H	SM 42:3;O2
829.7157	7.11	+H	SM 43:1;O2
827.7001	7.91	+H	SM 43:2;O2
823.6663	7.4	+H	SM 43:4;O2
841.7157	7.16	+H	SM 44:2;O2
890.6386	2.37	+H	ST 42:2;O2

m/z – mass to charge ratio; *RT* – retention time

Table S3. The lipidome composition of meningiomas and gliomas based on MS/MS confirmed groups of lipids.

Lipid group	Meningioma		Glioma		ratio [glioma: meningioma]	U Mann Whitney test
	Average*	CV	Average*	CV		
Cer	2,30E-05	332%	1,16E-03	167%	50,42	0,02
HexCer	1,98E-03	274%	3,22E-02	150%	16,25	0,02
LacCer	4,06E-04	147%	3,47E-04	91%	0,85	0,77
LPC	3,16E-02	114%	2,13E-02	43%	0,67	0,23
LPE P-16:0	1,22E-03	37%	3,80E-03	76%	3,10	<0.01
PC	8,92E-02	10%	7,39E-02	30%	0,83	0,02
PE	1,60E-01	10%	1,36E-01	17%	0,85	<0.01
SM	4,24E-02	16%	2,68E-02	36%	0,63	<0.01
ST 42:2; O2	2,61E-04	31%	8,71E-05	98%	0,33	<0.01

*Average peak area after on-fiber normalization

CV – coefficient of variation; Cer – ceramides; HexCer – hexosyl ceramides; HGG – high grade glioma; LacCer – lactosyl ceramides; LGG – low grade glioma; LPC – lysophosphatidylcholines; LPE – lysophosphatidylethanolamines; MEN – meningioma; PC – phosphatidylcholines; PE – phosphatidylethanolamines; QC – quality control; SM – sphingomyelins; ST – sulfatides

Table S4. Parameters for Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA).

Paramter	MEN vs glioma		Glioma grade		IDH mutation status	
	MEN	LGG+HGG	LGG	HGG	IDHm	IDHw
Classes	MEN	LGG+HGG	LGG	HGG	IDHm	IDHw
Variable inclusion paramters	VIP-score>1		p-value<0.05 VIP-score>1		p-value<0.05 VIP-score>1	
Data preprocessing	Log10, Autoscale		Log10, Autoscale		Log10, Autoscale	
N	18	19	7	12	10	9
Number of LV	5		2		2	
RMSEC	0.084	0.084	0.260	0.260	0.184	0.184
RMSECV	0.225	0.225	0.322	0.322	0.263	0.263
R2(calibration)	0.972	0.972	0.710	0.710	0.864	0.864
R2(CV)	0.811	0.811	0.570	0.570	0.736	0.736
Permutation test	wilcoxon test – <0.05 significance test – <0.05 rand t-test – <0.05		wilcoxon test – <0.05 significance test – 0.056 rand t-test – <0.05		wilcoxon test – <0.05 significance test – <0.05 rand t-test – <0.05	

CV – coefficient of variation; HGG – high grade glioma; IDHm – isocitrate dehydrogenase gene mutant; IDHw – isocitrate dehydrogenase gene wiltype; LGG – low grade glioma; LV – latent variables; MEN – meningioma; N – number of samples; RMSEC– root mean square error of calibration; RMSECV – root mean square error of cross-validation; VIP - Variable Importance in Projection

Table S5. The list of significantly altered tentative lipids in differentiation of low and high grade gliomas ($p < 0.05$). In *italic* were given tentative lipid groups for detected m/z .

m/z	Lipid Species Shorthand	HGG/LGG ratio	VIP>1
480.34485	LPC P-16:0	2.66	+
502.32680	<i>CerP, LPC</i>	3.99	-
508.37615	LPC P-18:0	2.38	-
520.33977	LPC 18:2	2.64	-
718.57448	<i>Cer, CerP, LPC, LPE, PC, PE</i>	2.74	-
720.55378	<i>CerP, PC, PE</i>	1.55	+
745.55727	<i>HexCer</i>	0.66	-
748.58269	<i>PC</i>	1.68	-
773.53031	<i>PG</i>	0.75	-
781.61940	<i>SM, CerP</i>	0.37	+
794.60341	<i>CerP, PC, PE</i>	2.90	-
794.60582	<i>PC</i>	2.92	-
796.61906	<i>CerP</i>	4.53	-
796.62147	<i>CerP</i>	4.72	-
800.55646	<i>PE O-40:6</i>	0.66	-
815.70005	<i>SM 42:1; O2</i>	0.37	+
818.60341	<i>CerP</i>	10.38	-

Cer – ceramides; *CerP* – ceramide phosphate; *HexCer* – hexosyl ceramides; *HGG* – high grade glioma; *LGG* – low grade glioma; *LPC* – lysophosphatidylcholines; *LPE* – lysophosphatidylethanolamines; m/z – mass to charge ratio; *PC* – phosphatidylcholines; *PE* – phosphatidylethanolamines; *PG* – phosphatidylglycerols; *SM* – sphingomyelins; *VIP* – Variable Importance in Projection

Table S6. The list of significantly altered tentative lipids in differentiation of IDH mutant and wildtype gliomas ($p < 0.05$). In *italic* were given tentative lipid groups for detected m/z .

m/z	Lipid Species Shorthand	IDHw/ IDHm ratio	VIP>1
438.2979	<i>LPE</i>	1.98	-
460.2798	LPE P-16:0	0.56	-
482.36050	LPC O-16:0	6.15	+
502.32680	<i>CerP, LPC</i>	2.96	+
508.37615	LPC P-18:0	4.91	-
524.37107	LPC 18:0	1.89	-
628.60271	<i>Cholesterol ester</i>	1.79	+
700.5275	PE P-34:2	0.31	-
702.5432	PE P-34:1	0.54	-
706.5381	<i>CerP, PC, PE</i>	0.62	-
716.5588	PE P-35:1	0.27	-
717.59050	<i>CerP, SM</i>	1.80	+
718.5744	<i>Cer, CerP, LPC, LPE, PC, PE</i>	2.74	-
720.59017	<i>Cer, CerP, LPC, PE,</i>	2.46	+
723.5411	<i>SM</i>	1.93	-
724.5251	PE P-34:1	0.39	-
724.5275	PE P-36:4	0.43	-
725.53106	<i>HexCer</i>	1.96	+
728.52008	PC 30:0	0.47	-

728.5224	CerP, PC, PE	0.48	-
729.5252	PG	0.46	-
729.59050	CerP, SM	2.78	+
734.5670	PC, PE	0.62	-
740.5200	PE 34:1	2.21	-
742.5721	PC	3.11	-
742.5745	PC	3.05	-
744.5513	PC	0.33	-
745.55727	HexCer	0.39	+
746.5694	PE 36:1	0.25	-
746.6057	Cer, CerP, LPC, LPE	2.49	-
747.6093	HexCer	2.49	-
748.52516	PE O-36:4	0.36	+
750.5432	PE O-38:5	0.47	-
751.57245	CerP, SM	2.55	+
754.53573	PC 32:1	0.59	-
755.5408	PG	0.52	-
756.55138	PC 32:0	0.51	-
765.5252	PG	0.59	-
766.5745	CerP, PC	3.10	-
768.55378	PE 38:4	0.51	+
768.5877	CerP, PC, PE	4.08	-
768.59017	PC	4.01	+
774.5432	PE P-40:7	0.53	-
778.5721	PE O-38:3	3.38	-
785.65310	CerP, SM	2.03	+
786.5044	PE 38:6	0.35	-
787.6687	CerP, SM	1.81	-
790.5721	PC	7.39	-
792.5877	PC, PE	3.97	-
792.5901	PC	3.98	-
794.5670	PC, PE	0.48	-
794.5694	PC, PE	0.47	-
794.6034	CerP, PC, PE	3.17	-
794.6058	PC	3.17	-
796.58508	PC, PE	0.53	+
796.6190	CerP	5.74	-
796.6214	CerP	5.97	-
800.55646	PE O-40:6	0.78	+
810.59833	PC 36:1	0.60	-
812.6163	PC	1.53	-
813.6191	PG	1.58	-
814.5344	ST	0.35	-
814.5357	PC	0.38	-
814.5381	PE	0.37	-
818.6034	CerP	8,19	-
823.66635	SM 43:4; O2	1.92	+
972.73457	LacCer 42:2; O2	7.52	-

Cer – ceramides; CerP – ceramide phosphate; HexCer – hexosyl ceramides; LacCer – lactosyl ceramides; IDHm – isocitrate dehydrogenase gene mutant; IDHw – isocitrate dehydrogenase gene wildtype; LPC – lysophosphatidylcholines; LPE – lysophosphatidylethanolamines; m/z – mass to charge ratio; PC –

phosphatidylcholines; PE – phosphatidylethanolamines; PG – phosphatidylglycerols; SM – sphingomyelins; ST – sulfatides; VIP - Variable Importance in Projection

Table S7. The list of significantly altered tentative lipids in differentiation of tumors with 1p/19q co-deletion and without this aberration ($p < 0.05$). In *italic* were given tentative lipid groups for detected m/z .

m/z	Lipid Species Shorthand	n-del/del ratio
438.2979	<i>LPE</i>	2.30
480.3448	LPC P-16:0	4.62
482.3605	LPC O-16:0	5.15
508.3761	LPC P-18:0	4.79
524.3710	LPC 18:0	2.08
700.5275	PE P-34:2	0.56
701.5592	<i>CerP, SM</i>	2.11
706.5381	<i>CerP, PC, PE</i>	0.66
716.5588	PE P-35:1	0.49
717.5905	<i>CerP, SM</i>	1.51
720.5901	<i>Cer, CerP, LPC, PE,</i>	2.15
723.5411	<i>SM</i>	2.31
728.5224	<i>CerP, PC, PE</i>	0.58
729.5252	<i>PG</i>	0.56
729.5905	<i>CerP, SM</i>	2.40
740.5200	PE 34:1	2.09
742.5721	<i>PC</i>	2.43
742.5745	<i>PC</i>	2.38
744.5513	<i>PC</i>	0.52
746.5694	PE 36:1	0.41
746.6057	<i>Cer, CerP, LPC, LPE</i>	1.79
747.6093	<i>HexCer</i>	1.79
748.5251	PE O-36:4	0.59
751.5724	<i>CerP, SM</i>	2.06
768.5877	<i>CerP, PC, PE</i>	2.93
768.5901	<i>PC</i>	2.85
770.6034	<i>LPC</i>	2.33
787.6687	<i>CerP, SM</i>	1.71
792.5877	<i>PC, PE</i>	3.76
792.5901	<i>PC</i>	3.77
794.5670	<i>PC, PE</i>	0.59
794.6034	<i>CerP, PC, PE</i>	3.19
796.6190	<i>CerP</i>	4.77
796.6214	<i>CerP</i>	4.72
798.5408	<i>CerP, PE</i>	0.59
818.6034	<i>CerP</i>	11.25

Cer – ceramides; CerP – ceramide phosphate; del – 1p/19q co-deleted samples; HexCer – hexosyl ceramides; LPC – lysophosphatidylcholines; LPE – lysophosphatidylethanolamines; m/z – mass to charge ratio; n-del- 1p/19q non co-deleted samples; PC – phosphatidylcholines; PE – phosphatidylethanolamines; PG – phosphatidylglycerols; SM – sphingomyelins

Table S8. Patients characteristics.

No.	Type	Genetic Tests		Final Diagnosis*	Grade	2016 or 2021 WHO brain tumor classification	Age	Sex	Type of sampling
		codeletion 1p/19q	IDH1/2 mutation						
17	HGG	N	N	Glioblastoma, NOS	4	2016	73	M	Stored tissue
36	MEN	N	N	Meningioma	1	2021	53	F	Stored tissue
39	HGG	N	N	Glioblastoma, NOS	4	2016	72	F	Stored tissue
56	MEN	N	N	Meningioma	1	2021	80	M	Stored tissue
59	MEN	N	N	Meningioma	1	2021	62	F	Stored tissue
75	MEN	N	N	Meningioma	1	2021	55	F	Stored tissue
86	HGG	-	-	Glioblastoma, IDH-wildtype	4	2021	65	F	Stored tissue
87	HGG	-	-	Glioblastoma, IDH-wildtype	4	2021	67	F	Stored tissue
97	MEN	N	N	Meningioma	1	2021	44	F	On-site sampling
98	MEN	N	N	Meningioma	3	2021	72	F	On-site sampling
101	MEN	N	N	Meningioma	1	2021	59	F	On-site sampling
102	LGG	+	+	Oligodendroglioma, IDH-mutant, and 1p/19q codeleted	2	2021	33	F	On-site sampling
103	MEN	N	N	Meningioma	1	2021	55	F	On-site sampling
104	LGG	-	+	Astrocytoma, IDH-mutant	2	2021	32	M	On-site sampling
105	MEN	N	N	Meningioma	1	2021	41	F	On-site sampling
106	MEN	N	N	Meningioma	1	2021	70	F	On-site sampling
107	MEN	N	N	Meningioma	1	2021	58	M	On-site sampling
108	HGG	-	-	Glioblastoma, IDH-wildtype	4	2021	52	F	On-site sampling
109	MEN	N	N	Meningioma	1	2021	64	M	On-site sampling
110	HGG	-	-	Glioblastoma, IDH-wildtype	4	2021	64	M	On-site sampling
111	HGG	-	-	Glioblastoma, IDH-wildtype	4	2021	71	M	On-site sampling
112	LGG	-	+	Astrocytoma, IDH-mutant	2	2021	40	F	On-site sampling
114	MEN	N	N	Meningioma	1	2021	64	F	On-site sampling
115	MEN	N	N	Meningioma	1	2021	75	F	On-site sampling
117	HGG	+	+	Oligodendroglioma, IDH-mutant, and 1p/19q codeleted	3	2021	31	M	On-site sampling
118	MEN	N	N	Meningioma	1	2021	47	M	On-site sampling
119	MEN	N	N	Meningioma	1	2021	79	F	On-site sampling

15

120	HGG	-	-	Glioblastoma, IDH-wildtype	4	2021	50	M	On-site sampling
121	MEN	N	N	Meningioma	2	2021	42	M	On-site sampling
122	LGG	+	+	Oligodendroglioma, IDH-mutant, and 1p/19q codeleted	2	2021	52	F	On-site sampling
123	MEN	N	N	Meningioma	1	2021	42	F	On-site sampling
125	LGG	+	+	Oligodendroglioma, IDH-mutant, and 1p/19q codeleted	2	2021	59	M	On-site sampling
126	MEN	N	N	Meningioma	1	2021	51	F	On-site sampling
127	MEN	N	N	Meningioma	1	2021	66	F	On-site sampling
128	LGG	-	-	Pilocytic astrocytoma	1	2021	29	F	On-site sampling
129	HGG	-	+	Astrocytoma, IDH-mutan	4	2021	30	F	On-site sampling
130	HGG	-	-	Glioblastoma, IDH-wildtype	4	2021	69	M	On-site sampling
131	LGG	+	+	Oligodendroglioma, IDH-mutant, and 1p/19q codeleted	2	2021	71	F	On-site sampling
132	HGG	-	-	Posterior fossa ependymoma	3	2021	24	M	On-site sampling
133	HGG	+	+	Oligodendroglioma, IDH-mutant, and 1p/19q codeleted	3	2021	42	M	On-site sampling
134	MEN	N	N	Meningioma	1	2021	68	F	On-site sampling
135	HGG	-	-	Glioblastoma, IDH-wildtype	4	2021	78	F	On-site sampling
136	HGG	-	-	Glioblastoma, IDH-wildtype	4	2021	60	M	On-site sampling
137	MEN	N	N	Meningioma	1	2021	34	F	On-site sampling
138	HGG	+	+	Oligodendroglioma, IDH-mutant, and 1p/19q codeleted	3	2021	39	F	On-site sampling

*Tumor diagnoses were verified according to the 2021 WHO brain tumor classification. In some older cases before genetic testing was introduced into routine practice the 2016 WHO brain tumor classification was applied.

F – female; M – male; MEN – meningioma; N – not known; NOS – not otherwise specified; HGG – high grade glioma; LGG – low grade glioma; “+” – present; “-” – absent

16

7.2. Profilowanie acylokarnityn w glejakach – P.2.

Opis dotyczy pracy: J. Bogusiewicz, K. Burlikowska, K. Jaroch, P.Z. Gorynska, K. Gorynski, M. Birski, J. Furtak, D. Paczkowski, M. Harat, B. Bojko: ***Profiling of carnitine shuttle system intermediates in gliomas using solid-phase microextraction (SPME)***. *Molecules*, 2021, 26, 6112

Komórki nowotworowe charakteryzują się zwiększonym metabolizmem i zwiększoną zdolnością adaptacji do szybko zmieniającego się mikrośrodowiska. Od dłuższego czasu tak zwany efekt Warburga, w którym nasilona glikoliza prowadzona nawet przy obecności tlenu powoduje zwiększoną produkcję mleczanu, wymieniany był jako główne źródło energii w glejakach i innych nowotworach. Ostatnie odkrycia sugerują jednak, że istotną rolę w gospodarce energetycznej komórek nowotworowych mogą stanowić zmiany w procesie utleniania kwasów tłuszczowych (FAO, ang. *fatty acids oxidation*). Proces ten jest w głównej mierze regulowany przez enzymy odpowiedzialne za transport łańcuchów acylowych w mitochondriach, takich jak translokaza karnityno-acylokarnitynowa (CACT, ang. *carnitine-acylcarnitine translocase*), palmitoilotransferaza karnitynowa 1 (CPT-1, ang. *carnitine palmitoyltransferase 1*), palmitoilotransferaza karnitynowa 2 (CPT-2, ang. ang. *carnitine palmitoyltransferase 2*) i dehydrogenaza długołańcuchowych acylo-CoA (LCAD, ang. *long-chain acyl-CoA dehydrogenase*). Rola tych białek w procesie kancerogenezy była szeroko badana, ale nadal brakuje danych na temat związków powstających w trakcie procesu oksydacji lipidów – acylokarnityn.

Acylokarnityny, czyli estry karnityny, stanowią jedno z istotnych spoiw analizy metabolitów oraz profilowania lipidomicznego. Stąd też w celu dopełnienia obrazu uzyskanego podczas niecelowanej analizy lipidomicznej guzów mózgu przeprowadzone zostało ich profilowanie. Celem niniejszego eksperymentu było pogłębienie wiedzy na temat zmian w profilu acylokarnityn w glejakach o różnym stopniu złośliwości i genotypie z wykorzystaniem danych uzyskanych z niecelowanej analizy lipidomicznej glejaków za pomocą platformy SPME-LC-HRMS. W interpretacji wyników szczególną uwagę zwrócono na stopień złośliwości guza, a także obecność mutacji IDH i kodelacji 1p/19q.

Przedstawione badania wykazały, że z wykorzystaniem platformy SPME-LC-HRMS możliwym było wyekstrahowanie karnityny i jej 22 estrów. Ponadto zaobserwowano, że zmiany w profilu acylokarnityn mogą być ważnym czynnikiem w procesie szacowania złośliwości glejaka i oceny rokowania klinicznego pacjenta. Acylokarnityny o krótkim łańcuchu acylowym (SCAC, ang. *short chain acylcarnitines*) oraz acylokarnityny o długim łańcuchu acylowym (LCAC, ang. *long chain acylcarnitines*) utworzyły wyraźnie oddzielone klastry korelacji. Może to wskazywać na różne poziomy zależności od enzymów transportujących w mitochondrium, ponieważ LCAC są ściśle od nich zależne, a SCAC mogą w pewnym stopniu być transportowane bez ich udziału.

Analiza statystyczna wykazała istotnie różne ($p < 0,05$) poziomy AC C3:0, AC C9:0, AC C10:1, AC C14:2 i AC 20:3 między HGG i LGG, były to ponad dwukrotnie większe wartości pola powierzchni pod pikiem dla zmian o wyższym stopniu złośliwości. Ponadto wyniki wykazały wyższy poziom AC C12:0 w próbkach IDHw w porównaniu z próbkami zmutowanymi i niższy poziom AC C16:1. Zaobserwowano także, że powierzchnia pików dla AC C16:1 w próbkach bez kodecji 1p/19q była prawie dwukrotnie mniejsza ($p < 0,05$) niż w próbkach IDHw. Wyniki te świadczą, że ilości karnityny i acylokarnityn były zwykle wyższe w guzach o wyższym stopniu złośliwości lub u pacjentów z gorszym rokowaniem klinicznym (pacjenci bez mutacji w obrębie genu dla IDH1/2).

Biochemiczna interpretacja uzyskanych danych jest jednak obarczona niepewnością związaną z małą grupą badaną, dużą heterogennością uzyskanych wyników a także brakiem możliwości odniesienia do wyników uzyskanych metodami referencyjnymi (np. z wykorzystaniem immunochemii do oceny aktywności enzymatycznej). Niemniej jednak, pomimo wspomnianych ograniczeń, przedstawione badania są podstawą do wnioskowania, że dalsza, ukierunkowana analiza ilościowa acylokarnityn z wykorzystaniem proponowanego protokołu pobierania próbek SPME i metody LC-HRMS jest zasadna i może być cennym uzupełnieniem innych testów wykorzystywanych do oceny metabolizmu kwasów tłuszczowych.

Article

Profiling of Carnitine Shuttle System Intermediates in Gliomas Using Solid-Phase Microextraction (SPME)

Joanna Bogusiewicz ¹ , Katarzyna Burlikowska ¹, Karol Jaroch ¹ , Paulina Zofia Gorynska ¹, Krzysztof Gorynski ¹ , Marcin Birski ², Jacek Furtak ², Dariusz Paczkowski ², Marek Harat ^{2,3} and Barbara Bojko ^{1,*} 

¹ Department of Pharmacodynamics and Molecular Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Torun, 85-089 Bydgoszcz, Poland; j.bogusiewicz@cm.umk.pl (J.B.); k.burlikowska@cm.umk.pl (K.B.); karol.jaroch@cm.umk.pl (K.J.); gorynska@cm.umk.pl (P.Z.G.); gorynski@cm.umk.pl (K.G.)

² Department of Neurosurgery, 10th Military Research Hospital and Polyclinic, 85-681 Bydgoszcz, Poland; mbir-ski@poczta.fm (M.B.); jacek.furtak2019@gmail.com (J.F.); darek_paczkowski@vp.pl (D.P.); harat@10wsk.mil.pl (M.H.)

³ Department of Neurosurgery and Neurology, Faculty of Health Sciences, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Torun, 85-168 Bydgoszcz, Poland

* Correspondence: bbojko@cm.umk.pl; Tel.: +48-525-853-564

Abstract: Alterations in the carnitine shuttle system may be an indication of the presence of cancer. As such, in-depth analyses of this pathway in different malignant tumors could be important for the detection and treatment of this disease. The current study aims to assess the profiles of carnitine and acylcarnitines in gliomas with respect to their grade, the presence of isocitrate dehydrogenase (IDH) mutations, and 1p/19q co-deletion. Brain tumors obtained from 19 patients were sampled on-site using solid-phase microextraction (SPME) immediately following excision. Analytes were desorbed and then analyzed via liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry. The results showed that SPME enabled the extraction of carnitine and 22 acylcarnitines. An analysis of the correlation factor revealed the presence of two separate clusters: short-chain and long-chain carnitine esters. Slightly higher carnitine and acylcarnitine concentrations were observed in the higher-malignancy tumor samples (high vs. low grade) and in those samples with worse projected clinical outcomes (without vs. with IDH mutation; without vs. with 1p/19q co-deletion). Thus, the proposed chemical biopsy approach offers a simple solution for on-site sampling that enables sample preservation, thus supporting comprehensive multi-method analyses.

Keywords: glioma; cancer; carnitine; acylcarnitine; solid-phase microextraction SPME; liquid chromatography–mass spectrometry LC–MS



Citation: Bogusiewicz, J.; Burlikowska, K.; Jaroch, K.; Gorynska, P.Z.; Gorynski, K.; Birski, M.; Furtak, J.; Paczkowski, D.; Harat, M.; Bojko, B. Profiling of Carnitine Shuttle System Intermediates in Gliomas Using Solid-Phase Microextraction (SPME). *Molecules* **2021**, *26*, 6112. <https://doi.org/10.3390/molecules26206112>

Academic Editor: Hiroyuki Kataoka

Received: 21 July 2021

Accepted: 6 October 2021

Published: 10 October 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Gliomas are among the most dangerous and insidious brain tumors due to their high heterogeneity and the late manifestation of a wide range of non-specific symptoms, such as seizures, headaches, nausea, dizziness, fatigue, vision problems, and numbness [1–5]. Delayed diagnosis favors tumor progression and leads to worse prognoses and, consequently, a rapid decrease in the patient's quality of life. As a consequence, the introduction of accurate medical interventions, which often combine neurosurgery and chemo- or radiotherapy, is necessary. The selection of the best treatment is mainly based on the combined results of a histopathological examination and genetic and immunochemical testing. Genetic testing—for example, those that analyze the status of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) methylation, the presence of IDH mutation, or 1p/19q co-deletion—serves as a complement to the diagnosis process and enables accurate clinical prognoses [2,5]. Nonetheless, the survival rate of glioma patients is still low due to a lack of

effective treatment methods [1–5]. Thus, it is critical to further expand our basic knowledge about the metabolism of these tumors, as such information is indispensable in improving clinical prognoses and the effectiveness of treatments.

Cancer cells are characterized by increased metabolism, which generates ATP, NADPH, and other intermediates for tumor growth, as well as high adaptability to the dynamically changing microenvironment [3,6]. For a long time, the so-called Warburg effect—wherein increased aerobic glycolysis results in enhanced lactate production, rather than pyruvate production—has been cited as the main source of energy production in gliomas and other neoplasms [6]. However, recent findings suggest that altered fatty acid oxidation (FAO) is also an important marker of glioma initiation and development [3,6–8]. This metabolic pathway is mainly regulated by the carnitine shuttle system, which consists of enzymes and protein transporters that are responsible for transporting fatty acids through the mitochondrial membrane [6]. Although the expression and enzymatic activity of this pathway's protein components (e.g., carnitine: acylcarnitine translocase (CACT), carnitine palmitoyltransferase I (CPT-1) or carnitine palmitoyltransferase II (CPT-2), and long-chain acylcarnitines dehydrogenase (LCAD)) have been extensively studied [3,6], the role and fate of carnitine and the esters (also known as acylcarnitines) produced from transporting fatty acids through the mitochondrial membrane remain unclear.

There are many methods that can be used to analyze changes in the chemical composition of tissues, such as homogenization followed by liquid–liquid extraction, microdialysis, and solid-phase microextraction (SPME) [9–12]. SPME, which is based on the interaction between an active sorbent and targeted substances dispersed in a given matrix, offers a number of significant advantages. One of the most notable of these advantages is SPME's ultra-simple sampling procedure, which enables samples to be acquired directly from tissues without any major structural disruption. In addition, the SPME protocol can be implemented on-site (i.e., surgery room) by medical personnel who have no analytical background. The most common SPME device is a thin nickel–titanium fiber coated with an active sorbent to a final diameter of ca. 250 μm . Under the SPME protocol, the probe is first introduced into the tissue for a time period that has been predetermined to enable optimal metabolite binding, followed by desorption of the analytes from the device into an organic solvent. It should be emphasized that the extracted analytes do not require any additional treatment prior to instrumental analysis on an LC–MS platform. This methodology has been characterized in greater detail in the literature [9,13].

Our previous work on the untargeted metabolomic characterization of brain tumors found characteristic differences in metabolome composition with regards to histological type and genetic aberrations [13–15]. However, (semi)quantitative targeted analysis would provide more accurate information about the biochemical changes in a cancerous tissue. Therefore, this study aims to develop a more in-depth understanding of the intermediates in a carnitine shuttle system using data acquired from untargeted lipidomic analyses of brain tumors via SPME–LC–MS, with particular consideration given to tumor grade, the presence of IDH mutation, and 1p/19q codeletion.

2. Results

The use of SPME–LC–HRMS for acylcarnitine analysis enabled identification of carnitine (C) and 22 simple-chain saturated and unsaturated acylcarnitines (AC) (Table 1): five short-chain acylcarnitines (AC C2–AC C5, SCAC), seven medium-chain acylcarnitines (AC C6–AC C12, MCAC), and ten long-chain acylcarnitines (AC C14–AC C20, LCAC). SPME extraction from intact tissue did not cause any damage to the collected tumor, which precluded further performance of routine tests, i.e., histological or genotyping. Our findings showed that the level of carnitine (C) was significantly higher in high-grade gliomas (HGG) when compared to low-grade gliomas (LGG) with a ratio of 4.21, and in IDH wild-type (IDHw) compared to IDH mutant (IDHm) tumors, with fold change 3.91. Although no statistically significant difference was observed in the tumor carnitine levels of patients

with and without the presence of 1p/19q co-deletion, the area under the peak was higher for patients with tumors not featuring co-deletion (n-del:del ratio 3.37).

Table 1. Acylcarnitines identified in gliomas sampled via solid-phase microextraction (SPME). Table 1 represents identification details and ratios of normalized peak areas for detected analytes. AC—acylcarnitine; del—presence of 1p/19q co-deletion; HGG—high-grade glioma; IDHm—IDH mutation, IDHw—IDH wild-type; LCAC—long-chain-length acylcarnitine; LGG—low-grade glioma; MCAC—medium-chain-length acylcarnitines; n-del—absence of 1p/19q co-deletion; SCAC—short-chain-length acylcarnitines.

Group	AC	Chemical Formula [M + H ⁺]	M/Z [M + H ⁺]	RT [min]	HGG: LGG	IDHw: IDHm	n-del: del
SCAC	AC C2:0	C ₉ H ₁₈ O ₄ N ₁	204.1231	12.46	0.87	0.97	0.93
	AC C3:0	C ₁₀ H ₂₀ O ₄ N ₁	218.1387	11.00	2.89 ^a	1.68	1.68
	AC C4:0	C ₁₁ H ₂₂ O ₄ N ₁	232.1543	9.72	0.85	0.94	0.84
	AC C5:1	C ₁₂ H ₂₂ O ₄ N ₁	244.1543	9.28	0.95	0.78	0.83
	AC C5:0	C ₁₂ H ₂₄ O ₄ N ₁	246.1700	8.96	1.38	1.00	1.22
MCAC	AC C6:0	C ₁₃ H ₂₆ O ₄ N ₁	260.1856	8.37	0.66	0.91	1.11
	AC C8:0	C ₁₅ H ₃₀ O ₄ N ₁	288.2169	7.79	1.20	1.04	0.95
	AC C9:0	C ₁₆ H ₃₂ O ₄ N ₁	302.2325	7.62	29.98 ^a	2.12	1.37
	AC C10:1	C ₁₇ H ₃₂ O ₄ N ₁	314.2326	7.52	3.86 ^a	1.18	0.74
	AC C10:0	C ₁₇ H ₃₄ O ₄ N ₁	316.2484	7.48	1.53	1.09	0.93
	AC C12:1	C ₁₉ H ₃₆ O ₄ N ₁	342.2640	7.27	1.50	1.56	0.99
	AC C12:0	C ₁₉ H ₃₈ O ₄ N ₁	344.2796	7.23	1.34	1.66 ^b	1.22
	AC C14:2	C ₂₁ H ₃₈ O ₄ N ₁	368.2797	7.12	2.72 ^a	1.94	1.33
	AC C14:1	C ₂₁ H ₄₀ O ₄ N ₁	370.2953	7.07	1.06	1.19	1.02
	AC C14:0	C ₂₁ H ₄₂ O ₄ N ₁	372.3108	7.10	0.89	1.08	0.96
LCAC	AC C16:1	C ₂₃ H ₄₄ O ₄ N ₁	398.3266	6.96	0.82	0.60 ^b	0.59 ^c
	AC C16:0	C ₂₃ H ₄₆ O ₄ N ₁	400.3423	6.96	0.92	0.96	1.06
	AC C18:2	C ₂₅ H ₄₆ O ₄ N ₁	424.3422	6.89	1.05	0.79	0.86
	AC C18:1	C ₂₅ H ₄₈ O ₄ N ₁	426.3579	6.84	0.87	0.79	1.00
	AC C20:4	C ₂₇ H ₄₆ O ₄ N ₁	448.3424	6.80	2.43	1.77	1.73
	AC C20:3	C ₂₇ H ₄₈ O ₄ N ₁	450.3578	6.78	13.89 ^a	2.87	2.17
	AC C20:1	C ₂₇ H ₅₀ O ₄ N ₁	454.3891	6.71	0.71	1.25	11.19

^a the average normalized peak area for HGG is statistically significantly different from LGG, $p < 0.05$; ^b the average normalized peak area for IDHw is statistically significantly different from IDHm, $p < 0.05$; ^c the average normalized peak area for n-del is statistically significantly different from del, $p < 0.05$.

To explore the relationship between carnitine and its particular esters in all of the obtained glioma samples, correlation clustering analysis was performed. The results revealed a high correlation factor for specific patterns of acylcarnitines (Figure 1). The analytes classified as SCAC represented one correlation cluster, with a correlation coefficient above or equal to 0.63, while MCAC and LCAC were correlated with each other, with a minimum factor of 0.51. Moreover, no clear correlation was observed between the metabolites with short- and long-acyl-chain analytes (Figure 1).

The analysis of acylcarnitines with different acyl chain groups showed that the average peak areas for SCAC, MCAC, and LCAC were larger for HGG than for LGG, although statistical significance was observed only for SCAC (Figure 2A). Our findings revealed also higher levels of these analytes in the IDH wild-type samples (versus the mutants), although the difference was not statistically significant (Figure 2B). Similarly, the peak areas for all acylcarnitines were not significantly higher in the samples without the chromosomal aberration (Figure 2C).

In the next step, comparative analysis of the acylcarnitine profiles in the different subgroups of the glioma samples was conducted. The groups considered cancer grade, IDH mutation status, and the presence of 1p/19q co-deletion. A detailed list of calculated values in all studied samples is given in Table S1. The analysis revealed that a statistically significant difference between HGG and LGG was observed for AC C3:0, AC C9:0, AC C10:1, AC C14:2, and AC C20:3, with peak areas over two times higher in higher-grade lesions (Table 1). Moreover, the findings showed a higher level of AC C12:0 in the IDH wild-type samples (versus the mutated samples) and a lower level of AC C16:1 (Table 1).

With regards to 1p/19q codeletion status, it was observed that the peak area for AC C16:1 in the samples without codeletion was significantly lower than that in wild-type ones, and the ratio between the studied groups (n-del:del) was 0.59 (Table 1). A detailed description of the performed comparison is given in the Supplementary Materials (Table S2).

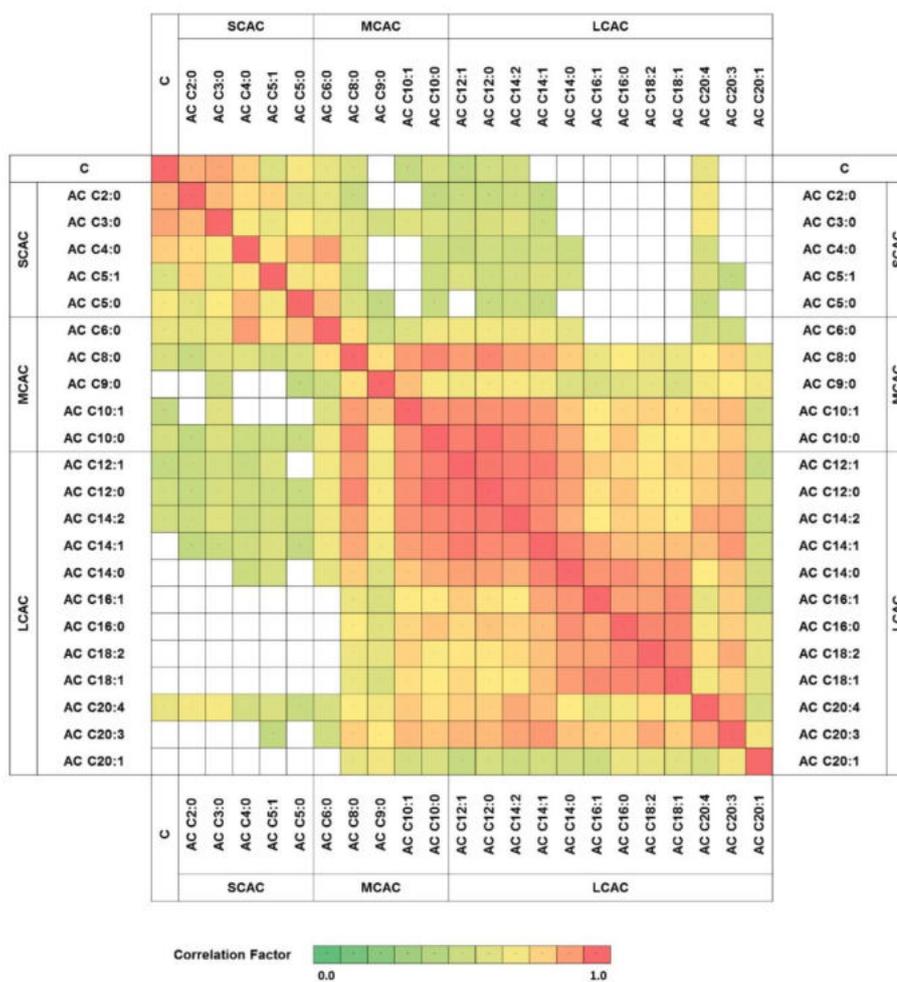


Figure 1. Carnitine and acylcarnitines correlation network. Only statistically significant correlation factors were presented ($p < 0.05$). AC—acylcarnitine; C—carnitine; SCAC—short-chain-length acylcarnitines; MCAC—medium-chain-length acylcarnitines; LCAC—long-chain-length acylcarnitines.

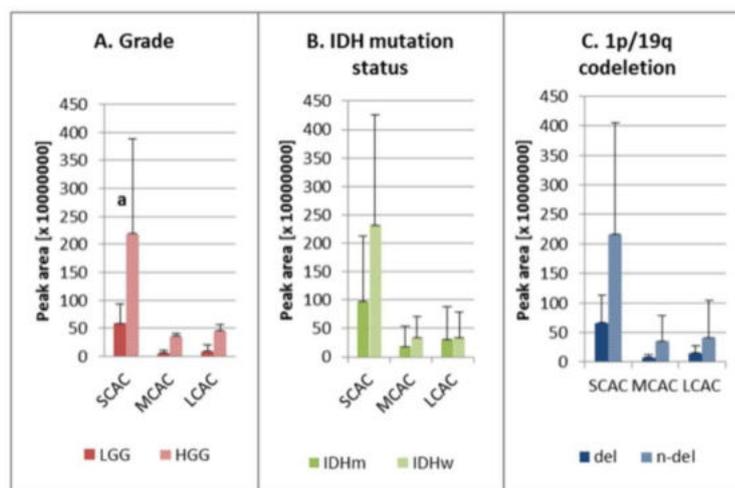


Figure 2. Ratios of SCAC, MCAC, and LCAC in the studied groups: (A) low-grade (LGG) and high-grade glioma (HGG); (B) IDH mutation status—IDH mutant (IDHm) and IDH wild-type (IDHw); (C) 1p/19q co-deletion—presence of deletion (del) and absence of deletion (n-del). AC—acylcarnitine; del—presence of 1p/19q co-deletion; HGG—high-grade glioma; IDHm—IDH mutation, IDHw—IDH wild-type; LCAC—long-chain-length acylcarnitine; LGG—low-grade glioma; MCAC—medium-chain-length acylcarnitines; n-del—absence of 1p/19q co-deletion; SCAC—short-chain-length acylcarnitines; ^a the average peak area for HGG is statistically significantly different from LGG, $p < 0.05$.

3. Discussion

The use of multiplatform studies combining various analytical methods—for example, extending routine tests to -omic studies—has become more common in basic cancer research [16], as such approaches are able to provide detailed analysis of the metabolic pathways and identify tumor vulnerability [17]. However, combining various techniques to analyze a single sample also faces limitations due to small amounts of the sample and analyte instability. Given these limitations, it is critical to continue to explore other approaches to sampling.

The methodology of profiling carnitine and its esters proposed herein is based on non-sample-consuming sampling, which is an approach that could enable additional testing of the obtained tissue (e.g., chemical biopsy followed by genetic testing or histopathology examination of the same specimen). Moreover, due to its simplicity, the sampling combined with the extraction of small molecules can be performed on-site (e.g., in the surgery room), which makes it radically different than other protocols used for tissue preparation prior to LC-MS analysis. Most of the currently used protocols include homogenization and multi-step (multi-solvent) solid-liquid extraction [18,19]. The goal of the current study was to verify if the extraction protocol dedicated to the untargeted screening of brain tumor lipidome enables the extraction of a representative range of carnitine derivatives and carnitine itself, thus observing dysregulation of small molecules in the carnitine shuttle system. Indeed, the results indicated that carnitine as well as its 22 short-, medium-, and long-chain acyl derivatives were extracted. The obtained data were then analyzed in the view of their biological significance and compared with up-to-date literature reports to verify findings. It needs to be emphasized here that the instrumental analysis was still performed in the university laboratory; however, the presented sampling approach can be combined directly with a mass spectrometer or other detector for fast quantitative analysis [20–23].

Carnitine is integral to the proper functioning of the enzymes (CPT-1, CPT-2, CACT) involved in transporting long-chain fatty acids across the inner mitochondrial membrane. Thus, this metabolite is considered a crucial regulator of the carnitine shuttle system [6,24]. Prior studies have examined levels of this metabolite in a variety of malignant neoplasms, including glioma, hepatocellular carcinoma, breast cancer, and prostate cancer, with findings showing higher concentrations in malignant tissues compared to histologically healthy samples [6,11,12,25,26]. In our study, we did not compare healthy and cancerous samples; rather, we compared cancerous samples with varying grades, with results indicating higher carnitine content in higher-grade tumors. Furthermore, our results agreed with a prior comprehensive metabolomic analysis of mutant and wild-type samples, which revealed higher carnitine concentrations in glioblastoma cells without the IDH mutation [24]. The higher levels of carnitine detected in HGG and IDHw could be related to the increased metabolism of these tumors compared to LGG and IDHm, which is consistent with Melone et al.'s [6] model of cancer metabolism. The carnitine shuttle system plays an important role in cancer plasticity, and it enables the metabolic demands of proliferating cancer cells to be fulfilled, even in adverse conditions.

The acylcarnitines identified in our study have also been observed by other researchers in their work on different types of malignant neoplasms (e.g., kidney, or liver); however, these prior works used sample preparation protocols that are more complex than SPME [11,27]. For instance, prior works have mainly used tissue homogenization, which is a sample-consuming approach, followed by liquid–liquid extraction prior to instrumental analysis. Thus, this method precludes the re-use of the sample with other diagnostic approaches. Moreover, the SPME approach used in the present work combines sampling and extraction into a single step, which greatly simplifies the sample preparation procedure. The utility of this non-sample-consuming technique for tissue analysis has been widely reported elsewhere [9,28–30].

The characteristic correlation clustering of SCAC and LCAC (in two separate clusters) was observed (Figure 1). The MCAC correlation clusters did not show clear patterns. Lu et al. [11] obtained similar results in their attempt to profile acylcarnitines in liver cancer, namely, that LCAC and SCAC formed separate correlation clusters. This phenomenon could be the result of the dependence of long-acyl-chain acylcarnitines on the enzymes in the carnitine shuttle system. Due to their small size, acylcarnitines with short acyl chains are able to pass through the mitochondrial membrane without the support of CPT-1, CPT-2, and LCAD, whereas the passage of LCAC is strictly controlled by the carnitine shuttle system [3]. The MCAC transport system is supposed to fall in between these two regulations.

The first of the studied factors was tumor malignancy grade. It was observed that the high malignancy status corresponded to a higher level of acylcarnitines (Table 1, Figure 2A). This could be explained by activated proliferation and the higher rates of metabolism in malignant lesions. The findings of Kant et al.'s [3] study of FAO in gliomas showed that glioblastomas contained higher levels of acylcarnitines compared to low-grade astrocytomas, which could be due to enhanced activity among carnitine shuttle enzymes [3].

One of the main prognostic factors with respect to gliomas is the presence of a mutation in the gene encoding isocitrate dehydrogenase (IDH) [2,5], which is the enzyme responsible for catalyzing the oxidative decarboxylation of isocitrate to 2-oxoglutarate in the tricarboxylic acid (TCA) cycle. During this process, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺) is reduced to nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) [31,32], which serves as a redox power for overcoming oxidative stress generated during cancerogenesis, as well as a co-enzyme in anabolic processes resulting in cellular proliferation. FAO by production of acetyl CoA, which is the TCA substrate, can be influenced by alterations related to IDH mutation [32]. This could explain our observations of higher levels of carnitine esters in wild-type samples (Figure 2B), but the changes in the levels of particular acylcarnitines are not consistent. Therefore, further investigation

is needed to fully elucidate the data (Table 1). It is likely that IDH mutation leads to changes in the activity of the carnitine shuttle system, which in turn results in the observed metabolic changes. This assumption could help to improve the prognosis of IDHm patients, as the down-regulation of fatty acid transport reduces the proliferation rate of cancer cells and, ultimately, tumor malignancy [2,5,33]. A similar observation has been reported by Miyata et al. [24], who also identified lower concentrations of carnitine and acetylcarnitine in IDH-mutant gliomas compared to the wild-type variants. However, these reports are not consistent because Kant et al. [3] did not observe any major differences in the amount of detected carnitine and its esters.

Testing aimed at detecting the co-deletion of chromosomes 1p and 19q and IDH mutation is one of the main genetic approaches to glioma diagnosis, as it enables the differentiation of oligodendrogliomas from astrocytomas [2,5]. In our study, we did not observe significant changes in the acylcarnitine level between samples without and with 1p/19q codeletion, with the exception of AC 16:1 in which the normalized level was significantly lower in n-del samples (Table 1, Figure 2C). It was not possible to explain the direct biochemical correlation between lipid metabolism and the presence of 1p/19q co-deletion based on the available literature. However, it is worth mentioning that the patients without this aberration had poorer responses to radiotherapy and worse survival rates compared to patients with the 1p/19q co-deletion [34]. Therefore, slightly higher levels of carnitine intermediates in wildtype might help to explain different responses to radiotherapy among patients with diverse status of this aberration in the future.

The investigations presented herein demonstrated that the use of SPME sampling of intact brain tumors on-site followed by untargeted LC–HRMS analysis in the lab enabled carnitine and 22 of its esters to be profiled in glioma samples. The results of this study confirmed that alterations in the carnitine shuttle system might be an important factor in estimating glioma malignancy and assessing clinical prognosis. Our findings also revealed that SCAC and LCAC formed clearly separated correlation clusters, which could indicate their different levels of dependence on the carnitine shuttle system. Moreover, we were able to profile carnitine and acylcarnitines in glioma samples. We observed that the content of carnitine and acylcarnitines was usually higher in higher-malignancy tumors (HGG vs. LGG) or in patients with worse clinical outcomes (IDHw vs. IDHm and with 1p/19q co-deletion vs. without 1p/19q co-deletion). However, it was not possible to form any firm conclusions due to the high heterogeneity among the studied samples, small cohort, and the lack of results obtained using reference methods (e.g., using immunochemistry to assess enzyme activity). At the same time, despite these obvious limitations of the presented studies, the results indicated validity of further in-depth targeted quantitative analysis with the use of the proposed SPME sampling protocol and LC–MS/MS method. In the future, it may be possible to obtain more detailed information about the biology of brain tumors by combining in situ SPME sampling coupled to LC–MS/MS with histological, immunochemical, or genetic platforms. Moreover, in the view of the recent work which demonstrated that SPME enables spatially resolved analysis of the living human brain [35], it can be expected that one of the future directions in carnitine analysis will be their simultaneous profiling in cancerous and normal tissue.

4. Materials and Methods

4.1. Biological Material

Primary brain tumors were obtained via neurosurgical procedures conducted at the 10th Military Research Hospital and Polyclinic in Bydgoszcz, Poland. Overall, 19 samples were analyzed. The characteristics of these samples were as follows: 7 were low-grade gliomas (LGG) and 12 were high-grade gliomas (HGG); 10 were IDH mutant (IDHm) tumors, and 9 were IDH wild-type (IDHw) tumors; 7 featured 1p/19q co-deletion (del), while 12 did not (n-del). A detailed summary of the patients' characteristics is presented in Table S3 in the Supplementary Materials.

The study was approved by the Bioethical Committee in Bydgoszcz, Poland (KB 628/2015).

The grades of studied tumors were assessed by a histopathologist. Grade 1 and 2 tumors were included in the low-grade glioma (LGG) group. Grade 3 and Grade 4 tumors were included in the high-grade glioma (HGG) group.

The IDH status and 1p/19q codeletion presence were assessed with the use of SALSA MLPA P088-D1 kit (MRC-Holland, Amsterdam, the Netherlands) according to the manufacturer's protocol.

4.2. Chemical Biopsy (Solid-Phase Microextraction) Protocol

Sampling was conducted using 7 mm C18 fibers kindly provided by Supelco, Merck, immediately following the removal of the brain tumor. To this end, the protocol developed by Bogusiewicz et al. [12] was employed, with minor modifications. The fibers were preconditioned overnight in a methanol:water (1:1 v/v) solution to activate the sorbent and were rinsed with water directly before sampling in order to remove any organic solvent residue. The fibers were then inserted into the tumor tissue for 30 min and then rinsed again in water to remove any residues from cell debris or blood. The brain tumor sampling was performed at room temperature. To verify the potential impact of temperature on the stability of investigated compounds, the data obtained at room temperature were compared with the results of the extraction carried on ice (Table S4). The experiment was performed using fresh mouse brain as a model tissue. Five fibers were inserted in the area of the hypothalamus. Two of the metabolites showed significant differences.

After extraction, the fibers were stored in a freezer at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ until desorption (1 h), which was conducted in silanized glass vials with 150 μL of an isopropanol:methanol (1:1 v/v) solution and agitation at 1200 rpm. Pooled quality control (QC) and extraction blanks (negative control) were also prepared.

4.3. Instrumental Analysis

The liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS), platform consisted of a Dionex UltiMate 3000 RS autosampler, a Dionex Ultimate 3000 RS pump (Thermo Fisher Scientific, Dionex, Bremen, Germany), and a QExactive Focus high-resolution mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany).

LC analysis was conducted using the following parameters: phase A—5 mM ammonium acetate in water; phase B—acetonitrile; gradient—0.0–2.0 min 96% B, 15.0 min 80% B, 15.1–21.0 min 96% B; SeQuantZIC-cHILIC—3 μm 100 \times 2.1 mm column; flow—0.4 mL/min; oven temperature—40 $^{\circ}\text{C}$; and injection volume—10 μL .

The present study used positive ion mode with the following parameters: a scan range of 100–1000 m/z ; acquisition via AGC (1,000,000 ions); a spray voltage of 1.5 kV; an S-lens RF level of 55%; an S-lens voltage of 25 V; a skimmer voltage of 15 V; a capillary temperature of 325 $^{\circ}\text{C}$; sheath gas at 60 a.u.; aux gas at 30 a.u.; spare gas at 2 a.u.; and a probe heater temperature of 320 $^{\circ}\text{C}$. Only acylcarnitines in the extraction QC samples with a coefficient of variation (CV) of less than 10% were accepted for analysis. These acylcarnitines were identified by matching their fragmentation patterns with spectra libraries at a mass accuracy of <3 ppm (the presence of characteristic fragment: 85.0290 peak in MS/MS spectra). Full MS/dd-MS2 discovery mode was used for this purpose. Matching was conducted using the following fragmentation parameters: mass resolution—35000 FWHM; AGC target—2E4; minimum AGC—8E3; intensity threshold—auto; maximum IT—auto; isolation window—3.0 m/z ; stepped collision energy—20 V, 30 V, 40 V; loop count—2; and dynamic exclusion—auto.

4.4. Data Processing and Statistical Analysis

Acylcarnitine identification was performed using LipidSearch 4.1.30 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) software, which is capable of identifying simple-chain carnitine esters with eight or more carbons in their structure (AC C8:0) (Table S5 in the Supplementary Materials). As such, carnitine and acylcarnitines with shorter chains were searched manually using mzCloud and the Human Metabolome Database (HMDB).

Statistical analysis was conducted using Statistica 13.3 PL (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) software. The average peak area for all analytes was calculated, and statistical tests were applied. In particular, Levene's test was used to assess variation, and the Shapiro–Wilk test was applied to assess normality. A T-test was subsequently applied when variation was homogenous and the variables were normal, while the Mann–Whitney U Test was used in all other cases.

For in-depth analysis of particular acylcarnitines, normalization on acylcarnitine groups was performed (SCAC, MCAC, LCAC).

Supplementary Materials: The following are available online. Figure S1. Correlation plot of short chain acylcarnitines and long chain acylcarnitines; Table S1. Detailed list of normalized peak areas in all samples; Table S2. Ratios of selected acylcarnitines and carnitine used to estimate the activity of enzymes related to the carnitine shuttle system; Table S3. Detailed description of samples included in the study; Table S4. Selection of sampling condition. Comparison of sampling on ice and in the room temperature. Table S5. Acylcarnitines which could be identified using LipidSearch.

Author Contributions: Conceptualization, J.B., B.B. and M.H.; methodology, J.B.; formal analysis, J.B.; investigation, J.B., B.B., J.F., P.Z.G., K.G., M.H., K.J. and D.P.; resources, B.B., J.F., M.H.; data curation, J.B.; writing—original draft preparation, J.B.; writing—review and editing, M.B., B.B. and K.B.; visualization, J.B.; supervision, B.B. project administration, B.B.; funding acquisition, B.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the National Science Center Poland, within research grant No. 2015/18/M/ST4/00059, entitled “New analytical solutions in oncology: From basic research to rapid intraoperative diagnostics.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Bioethics Committee of Collegium Medicum in Bydgoszcz at Nicolaus Copernicus University in Toruń (KB 628/2015).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors would like to acknowledge Supelco/MilliporeSigma for kindly supplying the SPME probes, Thermo Fisher Scientific for granting us access to a Q-Exactive Focus mass spectrometer, and Anchem for its invaluable technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.

References

1. Lin, H.; Patel, S.; Affeck, V.S.; Wilson, I.; Turnbull, D.M.; Joshi, A.R.; Maxwell, R.; Stoll, E.A. Fatty acid oxidation is required for the respiration and proliferation of malignant glioma cells. *Neuro-Oncology* **2017**, *19*, 43–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Louis, D.N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; von Deimling, A.; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W.K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Kleihues, P.; Ellison, D.W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Acta Neuropathol.* **2016**, *131*, 803–820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Kant, S.; Kesarwani, P.; Prabhu, A.; Graham, S.F.; Buelow, K.L.; Nakano, I.; Chinnaiyan, P. Enhanced fatty acid oxidation provides glioblastoma cells metabolic plasticity to accommodate to its dynamic nutrient microenvironment. *Cell Death Dis.* **2020**, *11*, 253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Duman, C.; Yaqubi, K.; Hoffmann, A.; Acikgöz, A.A.; Korshunov, A.; Bendszus, M.; Herold-Mende, C.; Liu, H.K.; Alfonso, J. Acyl-CoA-Binding Protein Drives Glioblastoma Tumorigenesis by Sustaining Fatty Acid Oxidation. *Cell Metab.* **2019**, *30*, 274–289.e5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Louis, D.N.; Perry, A.; Wesseling, P.; Brat, D.J.; Cree, I.A.; Figarella-Branger, D.; Hawkins, C.; Ng, H.K.; Pfister, S.M.; Reifenberger, G.; et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Neuro-Oncology* **2021**, *23*, 1231–1251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Melone, M.A.B.; Valentino, A.; Margarucci, S.; Galderisi, U.; Giordano, A.; Peluso, G. The carnitine system and cancer metabolic plasticity review-article. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 228. [[CrossRef](#)]
7. Juraszek, B.; Czarnecka-Herok, J.; Nałęcz, K.A. Glioma cells survival depends both on fatty acid oxidation and on functional carnitine transport by SLC22A5. *J. Neurochem.* **2021**, *156*, 642–657. [[CrossRef](#)]

8. Strickland, M.; Stoll, E.A. Metabolic reprogramming in glioma. *Front. Cell Dev. Biol.* **2017**, *5*, 43. [CrossRef]
9. Reyes-Garcés, N.; Gionfriddo, E.; Gómez-Ríos, G.A.; Alam, M.N.; Boyacı, E.; Bojko, B.; Singh, V.; Grandy, J.; Pawliszyn, J. Advances in Solid Phase Microextraction and Perspective on Future Directions. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 302–360. [CrossRef]
10. Ngernsutivorakul, T.; Steyer, D.J.; Valenta, A.C.; Kennedy, R.T. In Vivo Chemical Monitoring at High Spatiotemporal Resolution Using Microfabricated Sampling Probes and Droplet-Based Microfluidics Coupled to Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 10943–10950. [CrossRef]
11. Lu, X.; Zhang, X.; Zhang, Y.; Zhang, K.; Zhan, C.; Shi, X.; Li, Y.; Zhao, J.; Bai, Y.; Wang, Y.; et al. Metabolic profiling analysis upon acylcarnitines in tissues of hepatocellular carcinoma revealed the inhibited carnitine shuttle system caused by the downregulated carnitine palmitoyltransferase 2. *Mol. Carcinog.* **2019**, *58*, 749–759. [CrossRef]
12. Yu, D.; Xuan, Q.; Zhang, C.; Hu, C.; Li, Y.; Zhao, X.; Liu, S.; Ren, F.; Zhang, Y.; Zhou, L.; et al. Metabolic alterations related to glioma grading based on metabolomics and lipidomics analyses. *Metabolites* **2020**, *10*, 478. [CrossRef]
13. Bogusiewicz, J.; Goryńska, P.Z.; Gaca, M.; Chmara, K.; Goryński, K.; Jaroch, K.; Paczkowski, D.; Furtak, J.; Harat, M.; Bojko, B. On-Site Sampling and Extraction of Brain Tumors for Metabolomics and Lipidomics Analysis. *J. Vis. Exp.* **2020**, *2020*, 159. [CrossRef]
14. Bogusiewicz, J.; Goryńska, P.Z.; Jaroch, K.; Goryński, K.; Paczkowski, D.; Furtak, J.; Harat, M.; Bojko, B. P13.05 Chemical Biopsy as an Alternative Sampling Method in Neurooncology. *Neuro-Oncology* **2019**, *21*, iii63. [CrossRef]
15. Goryńska, P.Z.; Chmara, K.; Goryński, K.; Paczkowski, D.; Harat, M.; Bojko, B. A new strategy for brain tumour metabolomic analysis. *Med. Res. J.* **2018**, *3*, 15–22. [CrossRef]
16. Menyhart, O.; Györfy, B. Multi-omics approaches in cancer research with applications in tumor subtyping, prognosis, and diagnosis. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2021**, *19*, 949–960. [CrossRef] [PubMed]
17. Wang, H.; Diaz, A.K.; Shaw, T.L.; Li, Y.; Niu, M.; Cho, J.H.; Paugh, B.S.; Zhang, Y.; Sifford, J.; Bai, B.; et al. Deep multiomics profiling of brain tumors identifies signaling networks downstream of cancer driver genes. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3718. [CrossRef] [PubMed]
18. ter Veld, F.; Primassin, S.; Hoffmann, L.; Mayatepek, E.; Spiekerkoetter, U. Corresponding increase in long-chain acyl-CoA and acylcarnitine after exercise in muscle from VLCAD mice. *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, 1556–1562. [CrossRef]
19. Van Vlies, N.; Tian, L.; Overmars, H.; Bootsma, A.H.; Kulik, W.; Wanders, R.J.A.; Wood, P.A.; Vaz, F.M. Characterization of carnitine and fatty acid metabolism in the long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mouse. *Biochem. J.* **2005**, *387*, 185–193. [CrossRef]
20. Galievsky, V.; Pawliszyn, J. Fluorometer for Screening of Doxorubicin in Perfusate Solution and Tissue with Solid-Phase Microextraction Chemical Biopsy Sampling. *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 13025–13033. [CrossRef]
21. Gómez-Ríos, G.A.; Mirabelli, M.F. Solid Phase Microextraction-mass spectrometry: Metanoia. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2019**, *112*, 201–211. [CrossRef]
22. Acquaro Junior, V.R.; Gómez-Ríos, G.A.; Tascon, M.; Queiroz, M.E.C.; Pawliszyn, J. Analysis of endocannabinoids in plasma samples by biocompatible solid-phase microextraction devices coupled to mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2019**, *1091*, 135–145. [CrossRef] [PubMed]
23. Looby, N.T.; Tascon, M.; Acquaro, V.R.; Reyes-Garcés, N.; Vasiljevic, T.; Gomez-Rios, G.A.; Wasowicz, M.; Pawliszyn, J. Solid phase microextraction coupled to mass spectrometry: Via a microfluidic open interface for rapid therapeutic drug monitoring. *Analyst* **2019**, *144*, 3721–3728. [CrossRef] [PubMed]
24. Miyata, S.; Tominaga, K.; Sakashita, E.; Urabe, M.; Onuki, Y.; Gomi, A.; Yamaguchi, T.; Mieno, M.; Mizukami, H.; Kume, A.; et al. Comprehensive Metabolomic Analysis of IDH1 R132H Clinical Glioma Samples Reveals Suppression of β -oxidation due to Carnitine Deficiency. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 9787. [CrossRef] [PubMed]
25. Yaligar, J.; Teoh, W.W.; Othman, R.; Verma, S.K.; Phang, B.H.; Lee, S.S.; Wang, W.W.; Toh, H.C.; Gopalan, V.; Sabapathy, K.; et al. Longitudinal metabolic imaging of hepatocellular carcinoma in transgenic mouse models identifies acylcarnitine as a potential biomarker for early detection. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 20299. [CrossRef] [PubMed]
26. Zoni, E.; Minoli, M.; Bovet, C.; Wehrhan, A.; Piscuoglio, S.; Ng, C.K.Y.; Gray, P.C.; Spahn, M.; Thalmann, G.N.; Kruithof-De Julio, M. Preoperative plasma fatty acid metabolites inform risk of prostate cancer progression and may be used for personalized patient stratification. *BMC Cancer* **2019**, *19*, 1216. [CrossRef]
27. Li, S.; Gao, D.; Jiang, Y. Function, Detection and Alteration of Acylcarnitine Metabolism in Hepatocellular Carcinoma. *Metabolites* **2019**, *9*, 36. [CrossRef]
28. Reyes-Garcés, N.; Boyacı, E.; Gómez-Ríos, G.A.; Olkowicz, M.; Monnin, C.; Bojko, B.; Vuckovic, D.; Pawliszyn, J. Assessment of solid phase microextraction as a sample preparation tool for untargeted analysis of brain tissue using liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2021**, *1638*, 11–13. [CrossRef]
29. Stryjak, I.; Warmuzińska, N.; Bogusiewicz, J.; Luczykowski, K.; Bojko, B. Monitoring of the influence of long-term oxidative stress and ischemia on the condition of kidneys using solid-phase microextraction chemical biopsy coupled with liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* **2020**, *43*, 1867–1878. [CrossRef] [PubMed]
30. Lendor, S.; Hassani, S.A.; Boyacı, E.; Singh, V.; Womelsdorf, T.; Pawliszyn, J. Solid Phase Microextraction-Based Miniaturized Probe and Protocol for Extraction of Neurotransmitters from Brains in Vivo. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 4896–4905. [CrossRef]
31. Han, S.; Liu, Y.; Cai, S.J.; Qian, M.; Ding, J.; Larion, M.; Gilbert, M.R.; Yang, C. IDH mutation in glioma: Molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *Br. J. Cancer* **2020**, *122*, 1580–1589. [CrossRef] [PubMed]

32. Carracedo, A.; Cantley, L.C.; Pandolfi, P.P. Cancer metabolism: Fatty acid oxidation in the limelight. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 227–232. [[CrossRef](#)]
33. Fack, F.; Tardito, S.; Hochart, G.; Oudin, A.; Zheng, L.; Fritah, S.; Golebiewska, A.; Nazarov, P.V.; Bernard, A.; Hau, A.; et al. Altered metabolic landscape in IDH-mutant gliomas affects phospholipid, energy, and oxidative stress pathways. *EMBO Mol. Med.* **2017**, *9*, 1681–1695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Hu, X.; Martinez-Ledesma, E.; Zheng, S.; Kim, H.; Barthel, F.; Jiang, T.; Hess, K.R.; Verhaak, R.G.W. Multigene signature for predicting prognosis of patients with 1p19q co-deletion diffuse glioma. *Neuro-Oncology* **2017**, *19*, 786–795. [[CrossRef](#)]
35. Bogusiewicz, J.; Burlikowska, K.; Łuczykowski, K.; Jaroch, K.; Birski, M.; Furtak, J.; Harat, M.; Pawliszyn, J.; Bojko, B. New chemical biopsy tool for spatially resolved profiling of human brain tissue in vivo. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 19522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Profiling of carnitine shuttle system intermediates in gliomas using solid-phase microextraction (SPME)

Joanna Bogusiewicz¹, Katarzyna Burlikowska¹, Karol Jaroch¹, Paulina Zofia Gorynska¹, Krzysztof Gorynski¹,
Marcin Birski², Jacek Furtak², Dariusz Paczkowski^{2#}, Marek Harat^{2,3}, Barbara Bojko^{1*}

1. Department of Pharmacodynamics and Molecular Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Torun, Bydgoszcz, Poland
2. Department of Neurosurgery, 10th Military Research Hospital and Polyclinic, Bydgoszcz, Poland
3. Department of Neurosurgery and Neurology, Faculty of Health Sciences, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Torun, Bydgoszcz, Poland

*Corresponding author: Barbara Bojko, bbojko@cm.umk.pl

Department of Pharmacodynamics and Molecular Pharmacology

Jurasza 2 Street, 85089 Bydgoszcz, Poland

current affiliation: Department of Neurosurgery and Neurology, Jan Biziel University Hospital Collegium Medicum Nicolaus Copernicus University, Bydgoszcz, Poland

Figure S1. Correlation plot of short chain acylcarnitines and long chain acylcarnitines.

LCAC – long-chain-length acylcarnitine; SCAC – short-chain-length acylcarnitines

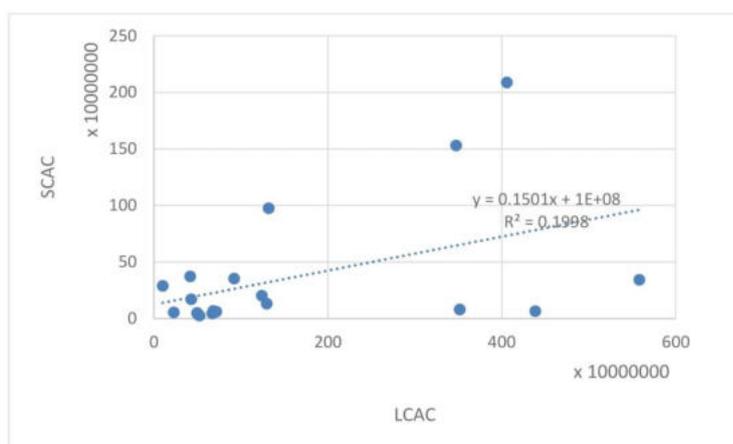


Table S1 Detailed list of normalized peak areas in all samples.

AC – acylcarnitine;

Number	102	104	108	110	111	112	117	120	122	125	128	129	130	131	132	133	135	136	138	
AcCa(2:0)	0.46	0.70	0.58	0.56	0.59	0.76	0.73	0.63	0.57	0.89	0.68	0.27	0.59	0.62	0.48	0.43	0.67	0.64	0.78	
AcCa(3:0)	0.01	0.04	0.06	0.08	0.06	0.03	0.14	0.06	0.01	0.02	0.03	0.07	0.05	0.03	0.08	0.02	0.08	0.09	0.03	
AcCa(4:0)	0.18	0.07	0.12	0.08	0.09	0.10	0.06	0.09	0.17	0.05	0.17	0.12	0.16	0.18	0.16	0.19	0.10	0.09	0.10	
AcCa(5:1)	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	
AcCa(5:0)	0.34	0.18	0.24	0.27	0.25	0.12	0.08	0.21	0.24	0.03	0.11	0.53	0.19	0.17	0.29	0.35	0.15	0.19	0.08	
AcCa(6:0)	0.74	0.78	0.73	0.61	0.15	0.73	0.32	0.14	0.56	0.21	0.60	0.23	0.47	0.38	0.39	0.29	0.52	0.21	0.44	
AcCa(8:0)	0.19	0.21	0.18	0.23	0.30	0.17	0.32	0.32	0.27	0.36	0.33	0.39	0.31	0.33	0.44	0.39	0.30	0.35	0.31	
AcCa(9:0)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.03	0.03	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	
AcCa(10:1)	0.01	0.00	0.02	0.05	0.09	0.00	0.19	0.19	0.01	0.08	0.01	0.05	0.02	0.03	0.03	0.08	0.03	0.11	0.06	
AcCa(10:0)	0.06	0.01	0.07	0.11	0.45	0.09	0.14	0.32	0.16	0.35	0.06	0.33	0.19	0.26	0.13	0.23	0.15	0.32	0.18	
AcCa(12:1)	0.04	0.00	0.07	0.06	0.13	0.01	0.04	0.08	0.05	0.10	0.02	0.03	0.01	0.02	0.02	0.01	0.07	0.03	0.05	
AcCa(12:0)	0.07	0.02	0.07	0.09	0.17	0.03	0.05	0.11	0.06	0.14	0.07	0.06	0.06	0.02	0.08	0.02	0.12	0.05	0.08	
AcCa(14:2)	0.01	0.00	0.03	0.07	0.05	0.00	0.02	0.06	0.03	0.05	0.00	0.03	0.01	0.00	0.03	0.01	0.06	0.02	0.04	
AcCa(14:1)	0.15	0.05	0.16	0.11	0.14	0.07	0.09	0.12	0.13	0.15	0.12	0.12	0.09	0.04	0.07	0.04	0.17	0.07	0.12	
AcCa(14:0)	0.13	0.08	0.10	0.15	0.07	0.08	0.07	0.08	0.09	0.12	0.10	0.06	0.11	0.09	0.10	0.05	0.09	0.07	0.10	
AcCa(16:1)	0.16	0.09	0.08	0.05	0.08	0.08	0.11	0.07	0.16	0.08	0.09	0.14	0.09	0.19	0.05	0.22	0.08	0.10	0.09	
AcCa(16:0)	0.20	0.33	0.22	0.26	0.15	0.34	0.29	0.23	0.24	0.18	0.29	0.23	0.30	0.35	0.40	0.26	0.15	0.30	0.24	
AcCa(18:2)	0.04	0.04	0.02	0.02	0.03	0.05	0.06	0.04	0.03	0.03	0.05	0.05	0.02	0.02	0.03	0.03	0.08	0.03	0.06	0.05
AcCa(18:1)	0.20	0.29	0.19	0.16	0.14	0.30	0.24	0.15	0.21	0.12	0.26	0.27	0.22	0.25	0.18	0.30	0.12	0.24	0.18	
AcCa(20:4)	0.00	0.02	0.05	0.02	0.01	0.02	0.03	0.01	0.00	0.03	0.00	0.01	0.03	0.00	0.02	0.01	0.07	0.02	0.03	
AcCa(20:3)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.00	0.00	0.01	0.02	0.02	0.01	
AcCa(20:1)	0.00	0.08	0.00	0.00	0.02	0.02	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.04	0.00	0.01	0.00	0.03	0.01	0.01	

Table S2. Ratios of selected acylcarnitines and carnitine used to estimate the activity of enzymes related to the carnitine shuttle system

AC – acylcarnitine; CV – coefficient of variation; del – presence of 1p/19q co-deletion; HGG – high-grade glioma; IDHm – IDH mutation, IDHw – IDH wildtype; LCAC – long-chain-length acylcarnitine; LGG – low-grade glioma; MCAC – medium-chain-length acylcarnitines; n-del – absence of 1p/19q co-deletion; SCAC – short-chain-length acylcarnitines

Group	Compound	malignancy grade				IDH mutation status				1p/19q codeletion status									
		LGG		HGG		IDHm		IDHw		del		n-del							
		average	CV	average	CV	average	CV	average	CV	average	CV	average	CV						
SCAC	AcCa(2:0)	0.668	21%	0.579	24%	0.87	0.191	0.620	30%	0.603	10%	0.97	0.803	0.639	26%	0.596	21%	0.93	0.532
	AcCa(3:0)	0.023	49%	0.067	44%	2.89	0.002 ^a	0.039	100%	0.065	25%	1.68	0.074	0.036	126%	0.060	32%	1.68	0.116
	AcCa(4:0)	0.131	42%	0.112	34%	0.85	0.385	0.122	44%	0.115	31%	0.94	0.750	0.132	46%	0.111	29%	0.84	0.335
	AcCa(5:1)	0.007	38%	0.007	66%	0.95	0.841	0.008	46%	0.006	68%	0.78	0.349	0.008	47%	0.007	62%	0.83	0.472
	AcCa(5:0)	0.171	58%	0.235	52%	1.38	0.255	0.212	73%	0.211	27%	1.00	0.985	0.185	70%	0.227	49%	1.22	0.468
	AcCa(6:0)	0.571	37%	0.377	49%	0.66	0.051	0.469	47%	0.426	51%	0.91	0.677	0.420	43%	0.465	51%	1.11	0.673
	AcCa(8:0)	0.267	28%	0.320	22%	1.20	0.135	0.295	27%	0.307	24%	1.04	0.737	0.310	21%	0.295	28%	0.95	0.684
	AcCa(9:0)	0.000	265%	0.009	117%	29.98	0.045 ^a	0.004	223%	0.008	126%	2.12	0.334	0.005	214%	0.007	143%	1.37	0.708
	AcCa(10:1)	0.020	147%	0.076	78%	3.86	0.032 ^a	0.051	113%	0.060	97%	1.18	0.739	0.066	94%	0.049	112%	0.74	0.538
	AcCa(10:0)	0.142	88%	0.218	52%	1.53	0.193	0.182	62%	0.199	67%	1.09	0.767	0.199	48%	0.185	74%	0.93	0.815
MCAC	AcCa(12:1)	0.034	100%	0.051	66%	1.50	0.310	0.035	81%	0.055	69%	1.56	0.218	0.045	62%	0.045	86%	0.99	0.985
	AcCa(12:0)	0.061	69%	0.082	50%	1.34	0.300	0.056	67%	0.093	40%	1.66	0.047 ^b	0.065	64%	0.079	53%	1.22	0.481
	AcCa(14:2)	0.013	160%	0.035	57%	2.72	0.034 ^a	0.018	97%	0.036	67%	1.94	0.091	0.022	82%	0.029	84%	1.33	0.507
	AcCa(14:1)	0.102	46%	0.108	35%	1.06	0.761	0.097	45%	0.116	31%	1.19	0.321	0.105	45%	0.107	35%	1.02	0.920
	AcCa(14:0)	0.099	18%	0.088	30%	0.89	0.344	0.089	27%	0.096	25%	1.08	0.510	0.094	27%	0.091	26%	0.96	0.772
	AcCa(16:1)	0.119	39%	0.098	46%	0.82	0.345	0.130	38%	0.078	22%	0.60	0.008 ^b	0.142	36%	0.084	26%	0.59	0.003 ^c
	AcCa(16:0)	0.276	26%	0.253	27%	0.92	0.496	0.266	23%	0.256	31%	0.96	0.758	0.252	23%	0.267	28%	1.06	0.649
	AcCa(18:2)	0.040	25%	0.042	40%	1.05	0.784	0.045	32%	0.036	35%	0.79	0.143	0.045	39%	0.038	31%	0.86	0.366
	AcCa(18:1)	0.231	27%	0.200	27%	0.87	0.272	0.234	25%	0.186	26%	0.79	0.071	0.212	27%	0.211	29%	1.00	0.984
	AcCa(20:4)	0.010	131%	0.025	66%	2.43	0.062	0.014	85%	0.025	78%	1.77	0.157	0.013	108%	0.023	75%	1.73	0.227
AcCa(20:3)	0.001	265%	0.009	89%	13.89	0.016 ^a	0.003	147%	0.009	103%	2.87	0.093	0.003	148%	0.007	117%	2.17	0.282	
AcCa(20:1)	0.015	193%	0.011	117%	0.71	0.653	0.011	225%	0.014	95%	1.25	0.770	0.002	215%	0.019	121%	1.19	0.068	

^a the average peak area for HGG is statistically significantly different from LGG. p<0.05

^b the average peak area for IDHw is statistically significantly different from IDHm. p<0.05

^c the average peak area for n-del is statistically significantly different from del. p<0.05

Table S3 Detailed description of samples included in the study

AC – acylcarnitine; del – presence of 1p/19q co-deletion; F – female; HGG – high-grade glioma; IDHm – IDH mutation, IDHw – IDH wildtype; LGG – low-grade glioma; n-del – absence of 1p/19q co-deletion; M – male

Number	Age	Gender	Grade*	1p/19q co-deletion status	IDH1 mutation status	Location	Diagnosis**
102	33	F	LGG	del	IDHm	right frontal	Oligodendroglioma, IDH-mutant, and 1p/19q codeleted, Grade 2
104	32	M	LGG	n-del	IDHm	left temporo-parietal	Astrocytoma, IDH-mutant, Grade 2
108	52	F	HGG	n-del	IDHw	bifrontal	Glioblastoma, IDH-wildtype, Grade 4
110	64	M	HGG	n-del	IDHw	right temporal	Glioblastoma, IDH-wildtype, Grade 4
111	71	M	HGG	n-del	IDHw	left temporal	Glioblastoma, IDH-wildtype, Grade 4
112	40	F	LGG	n-del	IDHm	right frontal	Astrocytoma, IDH-mutant, Grade 2
117	31	M	HGG	del	IDHm	left parietal	Oligodendroglioma, IDH-mutant, and 1p/19q codeleted, Grade 3
120	50	M	HGG	n-del	IDHw	left frontal	Glioblastoma, IDH-wildtype, Grade 4
122	52	F	LGG	del	IDHm	left frontal	Oligodendroglioma, IDH-mutant, and 1p/19q codeleted, Grade 2
125	59	M	LGG	del	IDHm	right parietal	Oligodendroglioma, IDH-mutant, and 1p/19q codeleted, Grade 2
128	29	F	LGG	n-del	IDHw	left thalamus	Pilocytic astrocytoma, Grade 1
129	30	F	HGG	n-del	IDHm	left frontal	Astrocytoma, IDH-mutant, Grade 4
130	69	M	HGG	n-del	IDHw	bifrontal	Glioblastoma, IDH-wildtype, Grade 4
131	71	F	LGG	del	IDHm	left frontal	Oligodendroglioma, IDH-mutant, and 1p/19q codeleted, Grade 2
132	24	M	HGG	n-del	IDHw	fourth ventricle	Posterior fossa ependymoma, Grade 3
133	42	M	HGG	del	IDHm	right frontal	Oligodendroglioma, IDH-mutant, and 1p/19q codeleted, Grade 3
135	78	F	HGG	n-del	IDHw	right frontal	Glioblastoma, IDH-wildtype, Grade 4
136	60	M	HGG	n-del	IDHw	left fronto-parietal	Glioblastoma, IDH-wildtype, Grade 4
138	39	F	HGG	del	IDHm	right frontal	Oligodendroglioma, IDH-mutant, and 1p/19q codeleted, Grade 3

* Grade 1 and 2 tumors were included in the low-grade glioma (LGG) group; Grade 3 and grade 4 tumors, respectively, were included in the group of high-grade gliomas (HGG)

**Tumor diagnoses were verified according to the 2021 WHO brain tumor classification

Table S4 Comparison of sampling on ice and in the room temperature

For this purpose 5 C18 fibers were inserted in the mouse brains (region of hypothalamus, n=2). The sampling from one mouse was conducted on ice and from another one at room temperature. Sampling and analysis conditions were the same as in the experiment presented in Materials and Methods section. The obtained peak areas for all acylcarnitines were normalized on peak areas for SCAC, MCAC and LCAC.

AC – acylcarnitine; CV – coefficient of variation; F – sampling on ice; LCAC – long-chain-length acylcarnitine; MCAC – medium-chain-length acylcarnitines; RT – sampling in the room temperature; SCAC – short-chain-length acylcarnitines

Group	name	F							RT								
		F1	F2	F3	F4	F5	average	CV	RT1	RT2	RT3	RT4	RT5	average	CV	ratio area [F/RT]	test t
SCAC	AcCa(2:0)	0.729	0.826	0.788	0.723	0.648	0.743	9%	0.747	0.806	0.841	0.705	0.724	0.764	7%	0.97	0.600
	AcCa(3:0)	0.048	0.051	0.052	0.056	0.057	0.053	8%	0.059	0.048	0.046	0.088	0.081	0.064	30%	0.82	0.221
	AcCa(4:0)	0.095	0.075	0.094	0.119	0.127	0.102	21%	0.122	0.091	0.073	0.107	0.115	0.101	19%	1.01	0.964
	AcCa(5:1)	0.001	0.001	0.000	0.001	0.001	0.001	54%	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.001	32%	0.78	0.380
	AcCa(5:0)	0.128	0.047	0.066	0.100	0.167	0.102	47%	0.072	0.055	0.039	0.098	0.078	0.068	33%	1.48	0.200
	AcCa(6:0)	0.667	0.681	0.662	0.633	0.676	0.664	3%	0.626	0.584	0.638	0.578	0.586	0.602	5%	1.10	0.003 ^a
MCAC	AcCa(8:0)	0.180	0.187	0.187	0.214	0.204	0.194	7%	0.213	0.229	0.186	0.221	0.230	0.216	8%	0.90	0.069
	AcCa(9:0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AcCa(10:1)	0.055	0.038	0.044	0.053	0.040	0.046	17%	0.050	0.045	0.037	0.047	0.049	0.046	11%	1.00	0.964
	AcCa(10:0)	0.098	0.094	0.107	0.100	0.079	0.096	11%	0.111	0.142	0.139	0.153	0.135	0.136	11%	0.70	0.001 ^a
	AcCa(12:1)	0.021	0.006	0.019	0.016	0.023	0.017	38%	0.017	0.016	0.006	0.009	0.003	0.010	59%	1.68	0.119
	AcCa(12:0)	0.058	0.056	0.061	0.041	0.068	0.057	17%	0.060	0.058	0.030	0.041	0.032	0.044	32%	1.29	0.137
LCAC	AcCa(14:2)	0.014	0.002	0.012	0.007	0.013	0.010	52%	0.008	0.009	0.005	0.008	0.002	0.006	47%	1.54	0.229
	AcCa(14:1)	0.075	0.064	0.064	0.454	0.069	0.145	119%	0.071	0.064	0.345	0.052	0.035	0.114	115%	1.28	0.752
	AcCa(14:0)	0.100	0.098	0.103	0.060	0.104	0.093	20%	0.112	0.112	0.079	0.106	0.105	0.103	13%	0.91	0.392
	AcCa(16:1)	0.098	0.078	0.089	0.058	0.089	0.082	18%	0.094	0.104	0.058	0.086	0.077	0.084	21%	0.98	0.897
	AcCa(16:0)	0.235	0.290	0.251	0.142	0.261	0.236	24%	0.242	0.257	0.224	0.343	0.380	0.289	24%	0.82	0.217
	AcCa(18:2)	0.045	0.040	0.043	0.020	0.029	0.035	30%	0.043	0.041	0.023	0.035	0.020	0.032	33%	1.09	0.659
	AcCa(18:1)	0.209	0.226	0.219	0.129	0.212	0.199	20%	0.210	0.215	0.156	0.231	0.238	0.210	15%	0.95	0.634
	AcCa(20:4)	0.136	0.133	0.130	0.068	0.126	0.119	24%	0.140	0.114	0.066	0.078	0.090	0.098	30%	1.21	0.292
	AcCa(20:3)	0.001	0.001	0.003	0.000	0.001	0.001	79%	0.001	0.003	0.003	0.001	0.000	0.002	74%	0.76	0.578
	AcCa(20:1)	0.009	0.005	0.007	0.004	0.005	0.006	31%	0.002	0.007	0.006	0.011	0.018	0.009	67%	0.68	0.333

^a the average normalized peak area for F is statistically significantly different from RT, p<0.05

Table S5 Aylcarnitines which could be identified using LipidSearch

AC – acylcarnitine; *m/z* – mass-to-charge ratio

AC	M/Z [M+H+]
AC C8:0	288.2169
AC C9:0	302.2326
AC C10:4	308.1856
AC C10:3	310.2013
AC C10:2	312.2169
AC C10:1	314.2326
AC C10:0	316.2482
AC C11:4	322.2013
AC C11:3	324.2169
AC C11:2	326.2326
AC C11:1	328.2482
AC C11:0	330.2639
AC C12:4	336.2169
AC C12:5	338.2326
AC C12:2	340.2482
AC C12:1	342.2639
AC C12:0	344.2795
AC C13:0	358.2952
AC C14:4	364.2482
AC C14:3	366.2639
AC C14:2	368.2795
AC C14:1	370.2952
AC C14:0	372.3108
AC C15:0	386.3265
AC C16:1	398.3265
AC C16:0	400.3421
AC C17:1	412.3421
AC C17:0	414.3578
AC C18:4	420.3108
AC C18:3	422.3265
AC C18:2	424.3421
AC C18:1	426.3578
AC C18:0	428.3734
AC C19:1	440.3734
AC C19:0	442.3891
AC C20:5	446.3265
AC C20:4	448.3421
AC C20:3	450.3578
AC C20:2	452.3734
AC C20:1	454.3891

AC C20:0	456.4047
AC C21:1	468.4047
AC C21:0	470.4204
AC C22:6	472.3421
AC C22:5	474.3578
AC C22:4	476.3734
AC C22:3	478.3891
AC C22:2	480.4047
AC C22:1	482.4204
AC C22:0	484.4360
AC C23:1	496.4360
AC C23:0	498.4517
AC C24:2	508.4360
AC C24:1	510.4517
AC C24:0	512.4673

7.3. Zastosowanie biopsji chemicznej do przestrzennego profilowania ludzkiej tkanki mózgowej *in vivo* – P.3.

Opis dotyczy pracy: J. Bogusiewicz, K. Burlikowska, K. Łuczykowski, K. Jaroch, M. Birski, J. Furtak, M. Harat, J. Pawliszyn, B. Bojko: ***New Chemical Biopsy Tool for Spatially Resolved Profiling of Human Brain Tissue in vivo***. Scientific Reports, 2021, 11, 19522

Wykonywanie analiz biochemicznych mózgu, szczególnie u ludzi, jest niezwykle trudne ze względu na ograniczony dostęp do tego narządu. W praktyce klinicznej podstawowym narzędziem w diagnostyce guzów mózgu są techniki obrazowania, ale dostarczają one jedynie ograniczonych informacji na temat składu chemicznego. Wprowadzenie nowych technik do diagnostyki neuroonkologicznej, a szczególnie platform diagnostycznych opartych na spektrometrii mas, stworzyło szeroki wachlarz wcześniej nieosiągalnych możliwości. W związku z tym w niniejszej pracy zaprezentowano możliwość zastosowania biopsji chemicznej w neuroonkologii. Wcześniejsze badania *ex vivo* i *in vivo* mózgow zwierząt wykazały, że biopsja chemiczna jest bezpieczna, umożliwia niskoinwazyjną analizę nietrwałych substancji endogennych, a także umożliwia zahamowanie metabolizmu ekstrahowanych związków.

Niniejsza praca przedstawia, zgodnie z naszą wiedzą, pierwsze zastosowanie SPME w badaniach mózgu człowieka. Docelowo proponowana strategia ma służyć do jednoczesnej ekstrakcji biomarkerów z tkanki nowotworowej i nienowotworowej, czy też z tkanki uszkodzonej i zdrowej. Ze względu jednak na różną wielkość i lokalizację zmian nowotworowych a także ich heterogenność guzów uproszczono badania wstępne i zamiast próbkowania tkanki zdrowej i chorobowo zmienionej przeprowadzono przestrzenną analizę istoty białej i szarej mózgu.

Niezbędne było zastosowanie modyfikacji sondy SPME ze względu na konieczność osiągnięcia kompromisu pomiędzy potrzebami analitycznymi, a użytecznością w trakcie zabiegu neurochirurgicznego. Przede wszystkim czas ekstrakcji analitów musiał być wystarczająco długi, aby zapewnić odpowiednią czułość i jakość pozyskanych danych, ale także dość krótki, aby był akceptowalny dla neurochirurga i pacjenta, który w trakcie zabiegu był świadomy.

Kolejnym aspektem była długość fazy ekstrakcyjnej na sondzie, bowiem im większa powierzchnia sorpcyjną (dłuższa faza sorpcyjna na włóknie), tym większy odzysk analitów. Ze względu jednak na to, że grubość istoty szarej to ok 2,5mm to sorbent musiał być na tyle krótki aby zmieścić się w badanej tkance. W związku z tym, aby zwiększyć powierzchnię sorpcyjną sondy wprowadzonej do danego rodzaju tkanki i aby jednocześnie czasu poboru próbki połączono 4 włókna razem. Dwa włókna były ulokowane na innej wysokości niż dwa pozostałe. Dzięki takiemu rozwiązaniu możliwe było wprowadzenie sondy jednocześnie do istoty białej i szarej. Czas pobierania próbki natomiast został ustalony na 4 minuty. Zaznaczyć należy także, że w celu zminimalizowania ryzyka wprowadzenia dodatkowych uszkodzeń mózgu pacjenta, sondy mikroekstrakcyjne wprowadzono wzdłuż zaplanowanej trajektorii igły biopsyjnej. Finalnie wielosondowe urządzenie zostało zastosowane do jednoczesnej ekstrakcji metabolitów z istoty białej i szarej pacjentów poddawanych biopsjom guza mózgu.

Analiza metabolomiczna i lipidomiczna wykazała, że badane struktury mózgu składały się głównie z lipidów, a stężenie i różnorodność wykrytych metabolitów była nieco wyższa w istocie białej niż w istocie szarej. Niewielka liczba uczestników tych badań uniemożliwia jednak wyciąganie wniosków na poziomie biochemicznym. Niemniej, zaobserwowano, że możliwym jest przeprowadzenie przestrzennej charakterystyki metabolomicznej ludzkiego mózgu *in vivo* z wykorzystaniem szybkiego i mało inwazyjnego sposobu. Nie dochodzi przy tym do zakłócenia rutynowych procedur medycznych (np. biopsji). Proponowana metoda może być komplementarna wobec innych technik stosowanych w neurobiologii, jak np. mikroodializa czy metod elektrochemicznych. SPME pozwala bowiem na ekstrakcję różnych rodzajów związków od hydrofobowych lipidów po bardziej polarne aminokwasy czy cukry. Podczas gdy mikroodializa (MD, ang. *microdialysis*) umożliwia pozyskanie do analizy głównie analitów polarnych, jak np. aminokwasy. Metody elektrochemiczne natomiast wykorzystywane są do celowanej analizy konkretnych substancji co może zmniejszyć zakres prowadzonych badań. Przy mikroodializie sonda zawierająca dwie równoległe kapilary zwieńczone u szczytu sondy półprzepuszczalną membraną jest umieszczona w mózgowiu pacjenta. Pompa persystaltyczna wpompowuje roztwór o odpowiednim składzie przez jedną z kapilar. Na odcinku gdzie występuje półprzepuszczalna membrana dochodzi do przechodzenia do płynu dializacyjnego analitów zgodnie z różnicą stężeń. Drugą kapilarą dializat jest kierowany do próbki lub

analizatora. Jeśli z powierzchnią membrany nieswoiście będą oddziaływać np. związki lipidowe to może dojść do zablokowania procesu dializy. Przy SPME ten problem nie jest obserwowany. Warto też nadmienić, że przy biopsji chemicznej nie jest konieczne wprowadzanie kaniuli przez którą pobiera się próbkę, jak to ma miejsce przy mikrodializie.

Przedstawione wyniki wskazują, że sondy SPME mogą potencjalnie znaleźć zastosowanie w badaniach śródoperacyjnych, a sposób detekcji wyników może zostać odpowiednio zoptymalizowany poprzez zastosowanie zminiaturyzowanych spektrometrów mas lub poprzez zastosowanie detekcji fluorescencyjnej albo spektroskopii Ramana.



OPEN New chemical biopsy tool for spatially resolved profiling of human brain tissue in vivo

Joanna Bogusiewicz¹, Katarzyna Burlikowska¹, Kamil Łuczykowski¹, Karol Jaroch¹, Marcin Birski², Jacek Furtak², Marek Harat^{2,3}✉, Janusz Pawliszyn⁴✉ & Barbara Bojko¹✉

It is extremely challenging to perform chemical analyses of the brain, particularly in humans, due to the restricted access to this organ. Imaging techniques are the primary approach used in clinical practice, but they only provide limited information about brain chemistry. Solid-phase microextraction (SPME) has been presented recently as a chemical biopsy tool for the study of animal brains. The current work demonstrates for the first time the use of SPME for the spatially resolved sampling of the human brain in vivo. Specially designed multi-probe sampling device was used to simultaneously extract metabolites from the white and grey matter of patients undergoing brain tumor biopsies. Samples were collected by inserting the probes along the planned trajectory of the biopsy needle prior to the procedure, which was followed by metabolomic and lipidomic analyses. The results revealed that studied brain structures were predominantly composed of lipids, while the concentration and diversity of detected metabolites was higher in white than in grey matter. Although the small number of participants in this research precluded conclusions of a biological nature, the results highlight the advantages of the proposed SPME approach, as well as disadvantages that should be addressed in future studies.

Neuroimaging methods enable the analysis of anatomical structures and functional changes in the brain. These techniques are based on wide range of physicochemical phenomena, such as electrical activity (e.g., encephalography), X-ray measurements (e.g., computed tomography), and magnetic field and computer-generated radio waves (e.g., magnetic resonance). Although the further development of these methods (e.g., the injection of radioccontrast or radiotracers) has enabled greater temporal and spatial resolution and analysis of functional changes in the brain, more invasive techniques are required for detailed explorations of the chemical composition of brain tissue^{1,2}. Histopathology is the gold standard for diagnosing and analyzing diseases in clinical analysis, especially in neuro-oncology, followed by genetic and biochemical testing³. However, the main disadvantage of “out of organism” examination is the fact that enzyme activity does not automatically stop when the sample is removed⁴. To overcome this problem, some in vivo approaches, such as microdialysis (MD) and methods based on electrochemical detection, have been applied in neuroscience applications⁵.

The development of mass spectrometry (MS) has yielded new sampling techniques that can be applied for in vivo brain analysis. One such technique is rapid evaporative ionisation mass spectrometry (REIMS), which measures analytes present in “smoke” generated during the electrosurgical cutting of tissue. Another MS-based technique is probe electrospray ionization (PESI), which entails depositing a drop of water mixed with ethanol on the tissue surface. Analytes are extracted via this solution, and subsequently transferred to the electrospray ionization source of the mass spectrometer with a metal needle, which enables the ionization of the analytes when connected to high voltage^{6,7}.

In recent years, solid-phase microextraction (SPME) has been successfully applied in in vivo studies⁸, including brain analyses of macaques⁹ and rats^{10–13}. SPME is based on the interaction between compounds in a sample and an extractive sorbent, with extraction taking place until equilibrium is reached between the respective analyte concentrations in the sample and sorbent. Under certain conditions (i.e., when the volume of the sample is much higher than the volume of the extraction phase) the amount of analyte extracted is independent of the

¹Department of Pharmacodynamics and Molecular Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Torun, Bydgoszcz, Poland. ²Department of Neurosurgery, 10th Military Research Hospital and Polyclinic, Bydgoszcz, Poland. ³Department of Neurosurgery and Neurology, Faculty of Health Sciences, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Torun, Bydgoszcz, Poland. ⁴Department of Chemistry, University of Waterloo, Waterloo, Canada. ✉email: harat@10wsk.mil.pl; janusz@uwaterloo.ca; bbojko@cm.umk.pl

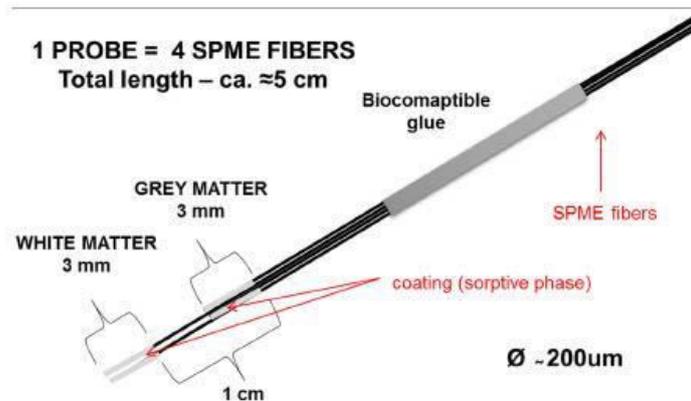


Figure 1. The construction of chemical biopsy probe.

sample volume¹⁴. Therefore, SPME can be used successfully in *in vivo* studies where the volume of the sampled tissue or body fluid is not known or difficult to measure. The sampling procedure involves inserting a thin fiber coated with a biocompatible sorbent into the tissue for a predetermined period of time. Following sampling, the fiber is removed and subjected to a desorption step; after this desorption step has been completed, the extracted substances can be analysed. *In vivo* SPME is commonly referred to as a “chemical biopsy,” as there is no need to remove tissue or draw blood in order to analyze small metabolites^{9,10,12,13,15}.

The present study aims to assess SPME’s suitability for the spatially resolved metabolic characterization of living human brain tissue using a single sampling device and a short extraction time. Ultimately, the proposed strategy is intended to be applied for the simultaneous extraction of biomarkers from neoplasma and non-neoplastic tissue, as well as from injured and non-injured tissue. To simplify the experiment and uniform sampling procedure in this proof of concept study, a profiling of white and grey matter was selected.

Materials and methods

Chemicals. External calibrant Pierce LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution and Pierce LTQ Velos ESI Negative Ion Calibration was purchased from Thermo Scientific, while all other chemicals were purchased from Sigma Aldrich (Poznan, Poland). This research used LC-MS-grade isopropanol, methanol, water, acetonitrile, and mobile phase additives (formic acid, acetic acid, and ammonium acetate), and HPLC-grade chloroform. The probes were prepared using *N,N*-dimethylformamide ACS reagent and polyacrylonitrile.

Materials. Three types of SPME fibers were used in the experiments: fibers coated with mix-mode ((MM) mixture of strong cation-exchange (SCX) and octyl (C8) particles) and octadecyl (C18) sorbents, both of which were kindly provided by Supelco, Merck; and hydrophilic-lipophilic balanced (HLB) fibers, which were manufactured in-house according to the protocol described in¹⁶. HLB particles were kindly provided by Waters (Wilmslow, U.K.).

Human biological material. Sampling was conducted at the 10th Military Research Hospital and Polyclinic in Bydgoszcz during brain biopsy procedures on patients with brain lesions localized at least 2 cm below the brain surface. Chemical biopsies (SPME samplings) were performed simultaneously on white and grey matter not affected by neoplastic changes using a specially designed device (Fig. 1). An acquisition time of 4 min was employed for sampling. Samples were obtained from eight patients whose detailed characterization is presented in Table S.A.1 of Supplementary Materials A. Written consent was obtained from each patient prior to undergoing the biopsy procedure.

In order to avoid additional brain damage, the SPME fibers were inserted along the planned trajectory of the biopsy needle. Sampling was performed by the neurosurgeon conducting the brain tumor biopsy procedure.

The study was approved by the Bioethical Committee of Nicolaus Copernicus University at Collegium Medicum in Bydgoszcz (KB 142/2017). The study protocol was performed in accordance with the relevant guidelines. The written informed consent and consent for publication was obtained from human participants.

Solid-phase microextraction. *General protocol for SPME.* Fibers with a coating length of 3 mm were used for the experiments. To increase the coverage, four fibers were immobilized together at a set position, with polyacrylonitrile (PAN) being used as a biocompatible glue. Two longer fibers were introduced into the white matter of the brain, while the other two (1 cm shorter) were inserted into the grey matter. The construction of the

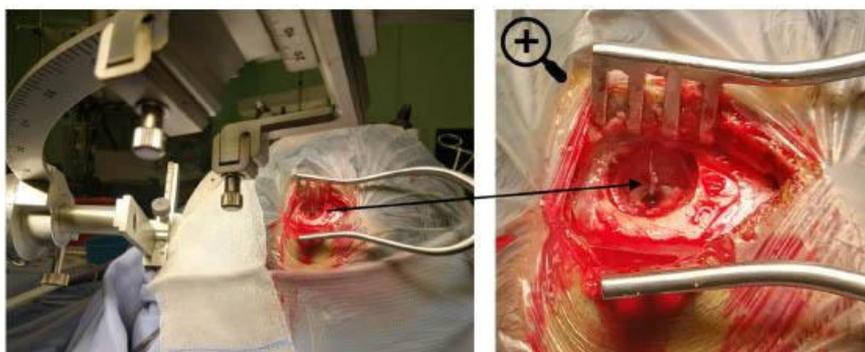


Figure 2. Chemical biopsy of brain tissue with the use of SPME probe.

device is illustrated in Fig. 1. Depending on the analysis, two types of sorbent were used: MM for metabolomics, and C18 for lipidomics.

Metabolomic analysis. Prior to sampling, the MM-fiber-based devices were preconditioned overnight in methanol:water (1:1 v/v) solution. After preconditioning, the fibers were transferred to individual glass vials, where they were sterilized in ethylene oxide in accordance with hospital protocols. The prepared devices were then used to conduct sampling during the biopsy procedure (Fig. 2). The sampling procedure (extraction of analytes) had a duration of 4 min. After extraction, the SPME device was removed and washed for 3 s. via static immersion in water. Following washing, the device was dismounted, and the fibers were separated, securely placed in labeled vials, and stored at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ until liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) analysis. Immediately prior to instrumental analysis, the metabolites were desorbed from the fiber using an acetonitrile:water (80:20 v/v) solution for 1 h with agitation at 1200 rpm. To increase recovery rates, two fibers used to sample the same structure were desorbed together in one vial with 150 μl of desorption solvent.

Lipidomic analysis. Before being used, the C18-fiber-based devices were immersed in a chloroform:methanol (2:1 v/v) solution for 45 min with agitation at 1200 rpm, and then preconditioned overnight in methanol:water (1:1 v/v) solution. Following preconditioning, the fibers were sterilized using the same protocol as was used for the MM devices. Similarly, the experiments using the C18-fiber-based devices also utilized the same sampling and storage procedures used in the experiments for the MM-based devices. Directly before instrumental analysis, the analytes were desorbed from the fibers via submersion in 150 μl of an isopropanol:methanol (1:1 v/v) solution for 1 h, with agitation at 1200 rpm. As in the metabolomics analyses, the two fibers used to sample each structure (i.e., two fibers for grey matter, and two for white matter) were desorbed together in one vial in order to increase recovery. Silanized glassware was used for the lipidomic analyses.

Selection of SPME coating for lipidomics. The effectiveness of the sorbents used in the lipidomic studies was assessed using brain tissue from a C57BL/6 mouse. According to European Union regulations, permission from the Local Ethical Commission is not required for the *post mortem* use of animal tissue or organs for scientific purposes. The mouse was euthanized via cervical dislocation, and its brain was immediately collected and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. Prior to sampling, the brain was thawed at room temperature, and then SPME probes were inserted into the hypothalamus for 15 min. The six fibers used for sampling were preconditioned overnight in a solution consisting of methanol:water (1:1 v/v) (three C18 and three HLB). After sampling, the fibers were desorbed under the same conditions used in the lipidomic analyses (described above).

Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS). Liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (Q Exactive Focus) was performed. Data acquisition was performed using dedicated Thermo Scientific software, namely, Xcalibur 4.2 and Free Style 1.4. The mass spectrometer was externally calibrated, resulting in mass accuracy of <2 ppm.

Samples were randomized within the sequence, and instrument performance was monitored by running pooled quality control (QC) samples composed of 10 μl of each sample every 4–5 injections. Instrumental blanks (desorption solvent) and extraction blanks (negative control) were also injected every 4–5 samples.

The metabolomic analyses utilized reversed-phase liquid chromatography (RPLC) and hydrophilic-interaction liquid chromatography (HILIC) in positive and negative ion mode. The protocol used in these analyses has been detailed in^{17,18}.

The structure of the detected compounds was confirmed by matching their fragmentation patterns to spectra libraries at a mass accuracy of <3 ppm. To this end, full MS/dd-MS2 discovery mode was used. The following fragmentation parameters were utilized for metabolomic analysis: mass resolution—35,000 FWHM; AGC

target—2E4; minimum AGC—8E3; intensity threshold—auto; maximum IT—auto; isolation window—3.0 m/z; stepped collision energy—10%, 20%, and 40%; loop count—2; and dynamic exclusion—auto.

Reversed-phase liquid chromatography (RPLC) and hydrophilic interaction chromatography (HILIC) in positive ion mode were conducted for the lipidomic analyses. The protocol used for these analyses is detailed in¹⁷ and ion source conditions were given in¹⁸.

As with the metabolomics analyses, the structure of the detected compounds was confirmed by matching their fragmentation patterns to spectra libraries at a mass accuracy of < 3 ppm. Full MS/dd-MS2 discovery mode was used for this purpose. The fragmentation parameters used for lipidomic analyses were as follows: mass resolution—35,000 FWHM; AGC target—2E4; minimum AGC—8E3; intensity threshold—auto; maximum IT—auto; isolation window—3.0 m/z; stepped collision energy—10%, 20%, and 40%; loop count—2; and dynamic exclusion—auto.

Data processing and statistical analysis. Compound Discoverer 2.1. (Thermo Fisher Scientific, San Jose, California, USA) software was used for metabolomics data processing and statistical analysis. The mass tolerance window was set to 3 ppm, the peak intensity was set to > 10 000, the signal to noise threshold was set to 3, and the max sample-to-blank ratio was set at > 5. Data was subjected to autoscaling, and the QC-based area was used for correction (min 50% coverage, max 30% RSD in QC, normalization by constant mean, fold change > 2 and $P < 0.05$). After aligning the peaks, gap filling was applied to fill in any missing values by a very small peak at the level of spectrum noise for the compound.

Following the annotation step, the compounds were searched for biological characteristics against HMDB, PubMed, ChempSpider and BioCyc databases. Next, a compound table, including all chromatography modes, was created and entered into Metaboanalyst online software, and a pathway search was performed using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database¹⁹. Fragmentation spectra were confirmed via online databases such as LIPID MAPS, HMDB, METLIN, and mzCloud.

The data for the lipidomic studies was processed using LipidSearch 4.1.30 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, California, USA) with the accuracy set to 3 ppm and the intensity threshold set to 10 000. With the exception of phosphatidic acids (PA), phosphatidylinositols (PI), and fatty acids (FA), which are more characteristic for negative ion mode not used in this study, all classes of lipids were included into the search range for RPLC-HRMS²⁰. In contrast, for HILIC-HRMS only glycerolipids were excluded. The searched ion adducts consisted of H^+ , NH_4^+ and Na^+ . An m -score of 10 and a retention time tolerance 0.25 min were utilized as the alignment settings. The following parameters were used to filter obtained results: for extraction control, an area coefficient of variation (CV) of < 30 and not equal to 0; a QC and extraction blank area ratio > 20; and a peak quality of > 0.85 for at least one of the studied groups.

To filter false positive lipid ID from LipidSearch results we applied identification grade filtering. Only lipids of which fatty acid chains and class were identified completely and lipids of which class and some fatty acid chains were identified (grade A and B, respectively).

Multivariate statistical analysis was performed using the online Metaboanalyst software package²¹. Missing values were estimated and replaced by small numbers (i.e., half of the minimum positive values in the study data). Logarithmic transformation and autoscaling were also applied. Finally, the following multivariate approaches were utilized: principal component analysis (PCA), partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), and volcano-plot.

Basic statistical analysis was performed using Statistica 13.3 PL (StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) software, while homogeneity was assessed via Levene's test and normality was checked using the Shapiro-Wilk test. The Student's t -test was used to evaluate the statistical significance of the differences between the studied groups, and the Mann-Whitney U test was employed when hypotheses about the normality and homogeneity of variance were not fulfilled. A p value of 0.05 was set as a threshold of statistical significance, and an F -test was used to compare the standard deviations.

Peaks area for lipidomic data were normalized on the total peak area for all lipids and these values were used for detailed statistical analysis.

Results

Chemical biopsy device. The four-fiber SPME device was successfully used to perform chemical biopsies in the examined patients (Figs. 1, 2). The SPME device, which is smaller than the biopsy needle, was inserted prior to the standard biopsy procedure along the trajectory planned for the biopsy needle in order to prevent any excessive tissue damage. The entire SPME procedure took less than 5 min. It is also worth noting that no mechanical damage (e.g., crumbling of the sorbent, fiber fractures, decomposition) to the device was observed.

Metabolomics. The first untargeted analysis was performed using the metabolomics protocol. A total of 75,449 features were detected after running all four LC-HRMS modes. After filtering out the background noise and the unstable features, a total of 2071 compounds were identified in the analyzed samples, which constituted 541 hits within the ChempSpider database (Figs. SA1-SA4 of Supplementary Materials A). According to Metabolomics Standards Initiative (MSI) scale, the mentioned compounds were classified on the 4th level. A comparison of the number of compounds detected in the grey and white matter samples revealed no significant differences, with an average grey-to-white compound ratio of 0.931. Greater variations in analyte coverage were usually detected inter-individually for the given matter rather than between the two types of brain matter in subsequent individuals (Fig. SA5 of Supplementary Materials A).

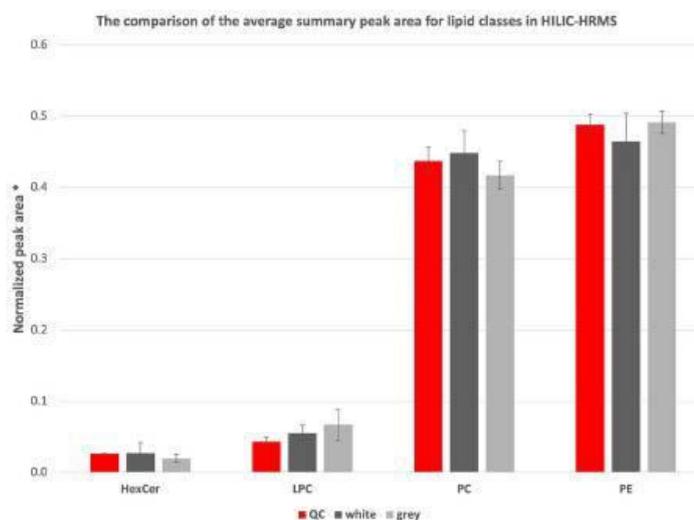


Figure 3. The comparison of the average summary peak area for lipid classes in HILIC-HRMS. Plots with mean normalized peak areas for lipid classes with whiskers representing standard deviation. *Ratio of the peak area and total peak area for lipids. *HexCer*—Hexosyl ceramide, *LPC*—Lysophosphatidylcholines, *PC*—Phosphatidylcholines, *PE*—Phosphatidylethanolamines, *QC*—Quality Control.

Further fragmentation of detected analytes which enabled to attain 2nd level of confidence according to MSI, revealed that the majority of confirmed compounds were lipids (Tables SA2 and SA3 of Supplementary Materials A).

Lipidomics. *Selection of SPME coating for lipidomics.* The first step in the lipidomic analysis process was to determine the optimal sorbent type, as this would ensure maximum effectiveness. To this end, fibers coated with C18 and HLB particles were used to obtain samples from the mouse brain specimens. The fibers were then subjected to HILIC-HRMS analysis, which detected 164 lipids, and RPLC-HRMS analysis, which detected 463 (Table SB1 and SB2 of Supplementary Materials B, respectively). Only 12.8% of the normalized peak areas for the compounds detected via HILIC-HRMS, and 6.5% of the compounds detected via RPLC-HRMS analysis were statistically different between the two types of sorbent (Table SB1 and SB2 of Supplementary Materials B). The average normalized area under the peak for almost all of the significantly differing compounds was larger when sampling was performed using the C18 fibers. Additionally, an F-test was conducted in order to compare the two coatings' coefficients of variation (CV) for the extracted compounds. The results revealed similar CVs for the majority of detected metabolites; however, sampling with the C18 fibers yielded statistically significantly higher CVs for 7.4% of the features in HILIC-HRMS and 16.4% of the features in RPLC-HRMS. When the HLB fibers were used, CVs were only higher for 2.8% of the detected putative analytes in reversed-phase chromatography (Table SB1 and SB2 of Supplementary Materials B). Ultimately, the C18-coated fibers were selected for use in the human subject experiments, as they provided larger average areas under the peaks.

Human brain analysis. A wide range of putative lipid species (phospholipids, glycerolipids, and sphingolipids) were detected in positive ion mode for HILIC-HRMS and RPLC-HRMS chromatography (189 and 245 compounds, respectively). RPLC-HRMS analysis mainly enabled the detection of triglycerides (TG) (Table SA4 of Supplementary Materials A), while HILIC-HRMS chromatography facilitated the analysis of more hydrophilic species, mainly phospholipids (Table SA5 of Supplementary Materials A). Multivariate analysis conducted with the online Metaboanalyst software package revealed weak separation between the white and grey matter (Figs. SA6 of Supplementary Materials A). As with the metabolomics results, PCA did not show any separation between the two types of matter. In addition, the PCA findings showed that the data points representing grey matter were closer to each other than the ones for white matter.

Next, statistical analysis was conducted on the compounds with confirmed structures. Data obtained with HILIC chromatography did not reveal significantly different levels of phospholipids and hexosyl ceramides (*HexCer*) in studied structures (Fig. 3). In more in-depth terms, three phosphatidylcholines (*PC*) and two phosphatidylethanolamines (*PE*) were more abundant in grey matter with $p < 0.05$ (Table SA5 of Supplementary Materials A). Interestingly, the amount of detected triglycerides in the grey matter was over two times higher than in the white matter (Fig. 4). More in-depth analysis of individual lipid species can be found in Table SA4 of Supplementary Materials A. As can be seen, majority of TGs were present in grey matter at slightly higher levels

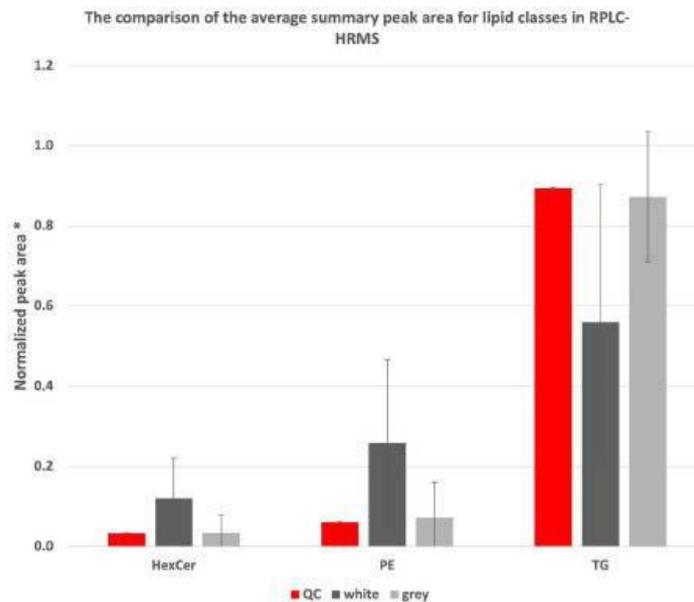


Figure 4. The comparison of the average summary peak area for lipid classes in RPLC-HRMS. Plots with mean normalized peak areas for lipid classes with whiskers representing standard deviation. *Ratio of the peak area and total peak area for lipids. *HexCer*—Hexosyl ceramide, *PE*—Phosphatidylethanolamines, *TG*—Triglycerides, *QC*—Quality Control.

as in white matter. Similarly, all the phospholipids analyzed with RPLC-HRMS were present in white matter at concentrations at least three times as high as in grey matter. HexCer was also more abundant, occurring about 2 times as often in white matter compared to grey matter.

Discussion

The introduction of new mass-spectrometry-based techniques to neuroscience has created a wide array of new opportunities within this discipline^{22,23}. Nonetheless, many challenges related to areas such as safety, biocompatibility, and practicability must still be overcome. The present article explores chemical biopsy as a new tool that can be used in neurochemistry applications. Previous *ex vivo* and *in vivo* investigations of animal brains have demonstrated that some of this technology's unique features may be able to fill the gaps present in existing methods^{10,11}. In addition, prior findings have shown that chemical biopsy is safe for use in laboratory animal studies, and enables the non-depletive analysis of labile endogenous substances, as well as metabolism quenching due to its ability to restrict the access of enzymes to absorbed substances^{10,13,15,24}.

This paper documents the first application of chemical biopsy for the analysis of human brain tissue *in vivo*, which was achieved by introducing a few adjustments to previously reported protocols. Firstly, it was necessary to sterilize the SPME fibers before inserting them into the human participants' brains. To this end, ethylene oxide was used in this study, but other research has shown that steam sterilization can be used as well²⁵.

Another modification to previous SPME protocols made in this research was the compromise that was struck between analytical needs and practicality in a clinical setting. Specifically, the selected sampling time must be long enough to ensure adequate sensitivity and data quality, but short enough to be acceptable for the neurosurgeon and the patient. The length of the extractive phase coating on the probe must also be sufficient to attain reasonable recovery of the metabolites, but not too long to fit within the selected location. A literature review revealed that a sampling time of 15–30 min is usually used in metabolomics studies²⁶. However, since the extractions were performed on conscious patients, prior to the actual biopsy procedure, the extraction time used in this research could not be longer than a few minutes in duration. Moreover, equilibrium time is established more quickly in complex matrices than in simple solutions (like phosphate buffered saline (PBS) or agarose gel) due to the fact that analytes are bound by tissue components (e.g., proteins), which in turn act as a local reservoir for the molecules to be extracted²⁷. Based on these findings, it is easy to conclude that even a short extraction time (e.g., 5 min) might be sufficient to achieve satisfactory recovery when extraction is performed from a complex matrix²⁷.

Unlike SPME, gold standard method in neuroscience—MD requires a relatively long sampling time, as it takes over 30 min to collect a sufficient amount of dialysate to enable the determination of target compounds.

Furthermore, a special cannula must be installed in the patient's skull 3–4 days prior to the experiment in order to allow the MD probe to be introduced to the brain. Attempts to modify this technology led to the development of push–pull probes (PPP), which enable faster analysis, but lower sensitivity and accuracy²⁸. Compared to MD and SPME, PPPs and electrochemical methods guarantee better temporal resolution, although push–pull probes are still prone to capillary clogging^{28,29}. Additionally, while electrochemical methods are able to return results in a few seconds, they only enable the analysis of selected substances, which may considerably reduce the scope of research^{28,30}.

As previously mentioned, extraction time and coating length must be customized in order to perform extractions from brain structures using SPME. The grey matter is a thin layer on the surface of the brain ranging between 1.0 and 4.5 mm in thickness (approximately 2.5 mm) depending on the region³¹. In the present study, probes with a coating length of 3 mm were selected in order to enable the extraction of metabolites from grey matter with maximum precision and acceptable sensitivity. However, to further increase sensitivity without compromising extraction time, a modification was introduced to the design of the sampling device. Since it is possible to increase analyte extraction by increasing the surface area of the extraction phase (coating)¹⁴, recovery was enhanced by sampling each brain structure with two fibers simultaneously (Figs. 1, 2) following by desorption of both fibers together in one vial. Another option is the change of the device's geometry to a thin-film format²⁴ but such devices are too invasive for use in brain studies. Nonetheless, it is important to note that the range of extracted metabolites was still limited, and, consistent with the previous research, for instance neurotransmitters were not observed in untargeted analyses^{10,11}. However, it is possible to extract neurotransmitters with SPME by optimizing the analytical protocol for that specific group of substances^{10,15}.

Some approaches using SPME fibers were employed so far to obtain spatial resolution results. One of them was the assessment of pollutants in fish tissue samples with segmented SPME fibers to simultaneously sample adipose and muscle tissues³². Recently, another approach to spatial resolution analysis was presented by Lendor et al., who analyzed the fluoxetine profile in rat brains using SPME fibers for extraction, and desorption electrospray ionization (DESI) coupled to mass spectrometry for target analyte detection along the probe³³.

The analytical methods most commonly used in *in vivo* neurochemical studies generally do not provide spatial resolution of brain structures that is as detailed as the SPME-DESI approach³³. With MD probes—even those with a diameter similar to SPME fibers (about 200 μm)—it is impossible to obtain comparable results due to the method's different governing principles. Thus, sampling must be carried out in a different way, which usually results in slower spatial resolution or time delay (i.e., sampling the grey and white matter sequentially rather than simultaneously)^{28,34}. Moreover, if sampling from two locations is planned, two cannulas outfitted with MD probes must be used, which will increase the invasiveness of the procedure and impact spatial resolution. Additionally, the MD probe needs to be connected to the device that pumps the perfusate during the sampling procedure. This means that a two single-channel-syringe pumps or one two-channel-syringe pump would be required in order to analyze two brain locations, which creates a need for additional space in the surgery room to accommodate the necessary extra equipment.

Distinct differences in the metabolomic or lipidomic profiles of the two studied brain matters were expected, but PCA did not show clear separation (Fig. SA5, Fig. SA6 of Supplementary Materials A). The patients from whom samples were collected in this study constituted a heterogeneous group in terms of age, sex, type, and location of brain lesion (Table SA1 of Supplementary Materials A). This could affect the repeatability of the obtained results and contribute to the relatively high variation observed in the average peak areas (Table SA2–SA5 of Supplementary Materials A). For these reasons, biochemical *in vivo* brain studies are almost exclusively performed on laboratory animals, wherein entire neurosurgical procedures are designed for the research at hand. The current study was conducted on a small cohort, which makes it difficult to draw solid conclusions. Indeed, our results only verify the concept and identify drawbacks that should be addressed in future studies seeking to analyze a larger number of patients.

Mainly lipids were identified in the metabolomic samples (Table SA2, and Table SA3 of Supplementary Materials A) which is in line with previous reports identifying lipids species as the predominant component in brain tissue composition^{6,15,31,35}. With regards to cerebral lipids, it is worth mentioning that MRI, a clinically approved method of differentiation of brain structures and detecting lesions, is mainly based on differences in lipid content (cholesterol and phospholipids)³⁶. Prior findings have also shown that white matter contains about 60% more lipids and 10–15% less proteins than grey matter³⁶. Similar observations regarding the prominent role of lipids in brain cells have been made using other mass-spectrometry-based methods, including REIMS and DESI^{22,37–39}. SPME on the other hand was reported as a complementary technology to MD, as it covers a broader hydrophobic range of metabolites (e.g., lipids), while MD is suitable for highly polar species (e.g., amino acids)^{10,11}. Both methods were compared by the performance of untargeted metabolomic profiling as well as targeted analysis of neurotransmitters obtained from brain of living rats.

Solid-phase microextraction makes it possible to tailor the protocol to the metabolites of interest, as it allows researchers to employ more selective coating and desorption parameters, and it can be coupled with appropriately optimized analytical instrumentation. In the present study, the results of the metabolomic analysis indicated a need for more in-depth lipidomic analysis. In order to better assess the lipid composition of the examined tissues, two types of sorbent were tested. First, fibers coated with C18 were analyzed, as they have been used in lipidomic studies previously, and they have a high affinity towards hydrophobic species^{12,40,41}. The second type of fiber that was selected for analysis was HLB-sorbent-coated fibers, as previous studies have demonstrated their high level of performance^{44,42}. The results of our comparison showed that the peak areas of detected features were larger in the samples collected with the C18 fibers, which indicated that this sorbent offered slightly better recoveries. The areas of only a few compounds showed a statistical significant difference (Table SB1 and Table SB2 of Supplementary Materials B). Based on this finding, the lipidomic analysis was carried out using the C18 fiber. This

is consistent with the previous work which presented the use of the C18 sorbent for lipidomic analysis, and a mixed-mode extractive phase for metabolomic analysis¹¹.

Despite the lack of statistically significant separation between the two types of brain matter determined by PCA (Fig. SA6 of Supplementary Materials A), the results nevertheless showed the characteristic patterns of lipids in those structures. For instance, the results showed that phospholipids were present in greater level in the white matter while TGs were elevated in grey matter (Figs. 3, 4 and Table SA4 and Table SA5 of Supplementary Materials A). Nevertheless, due to small cohort of patients and high diversity of samples, detailed discussion on biological role and implications to spatial distribution were not included in the current work.

The research described herein demonstrates that it is possible to achieve spatially resolved chemical characterization of a living human brain in a fast and low invasive manner, thus not disturbing other medical procedures (e.g., biopsy). The sampling device can be customized into a personalized diagnostic tool, and the proposed protocol can be applied in numerous clinical settings when supported by imaging data. In addition, this research proves that the proposed method complements those already used in neuroscience, for example, microdialysis, push-pull analysis, and electrochemical methods. Furthermore, the findings of this research also show that chemical biopsies performed with SPME probes enable more in-depth chemical analysis of brain tissue compared to other clinically available methods (e.g., MRI, biopsy). Not only is SPME capable of extracting lipids and more polar metabolites, but its lipid-characterization capabilities are also unique compared to other in vivo sampling devices. The results presented in this paper indicate that the proposed tool could be potentially used as a medical device, as it causes minimum damage and features operational parameters that are compatible with surgical procedures.

Finally, it should be emphasized that more portable reading devices—rather than mass spectrometers using optical spectroscopic techniques, such as fluorescence or Raman could be used in targeted determinations in order to create a technology that is more compatible with bedside or operational theatre applications⁴³.

Received: 29 June 2021; Accepted: 6 September 2021

Published online: 30 September 2021

References

- Berger, A. Magnetic resonance imaging. *BMJ* 324, 35 (2002).
- Pandarinathan, G., Mishra, S., Nedumaran, A. M., Padmanabhan, P. & Gulyasi, B. The potential of cognitive neuroimaging: A way forward to the mind-machine interface. *J. Imaging* 4, 70 (2018).
- Vaquero, J., Martínez, R. & Manrique, M. Stereotactic biopsy for brain tumors: Is it always necessary? *Surg. Neurol.* 53, 432–438 (2000).
- Haukaas, T. H. *et al.* Impact of freezing delay time on tissue samples for metabolomic studies. *Front. Oncol.* 6, 17 (2016).
- Ngernsutvorakul, T., Steyer, D. J., Valenta, A. C. & Kennedy, R. T. In vivo chemical monitoring at high spatiotemporal resolution using microfabricated sampling probes and droplet-based microfluidics coupled to mass spectrometry. *Anal. Chem.* 90, 10943–10950 (2018).
- Zaltsu, K. *et al.* In vivo real-time monitoring system using probe electrospray ionization/tandem mass spectrometry for metabolites in mouse brain. *Anal. Chem.* 90, 4695–4701 (2018).
- Hayashi, Y. *et al.* Intact metabolite profiling of mouse brain by probe electrospray ionization/triple quadrupole tandem mass spectrometry (PESI/MS/MS) and its potential use for local distribution analysis of the brain. *Anal. Chim. Acta* 983, 3556–3561 (2017).
- Bojko, B. *et al.* Solid phase microextraction chemical biopsy tool for monitoring of doxorubicin residue during in vivo lung chemoperfusion. *J. Pharm. Anal.* 11, 37–47 (2021).
- Hassani, S. A., Lendor, S., Boyaci, E., Pawliszyn, J. & Womelsdorf, T. Multineuromodulator measurements across fronto-striatal network areas of the behaving macaque using solid-phase microextraction. *J. Neurophysiol.* 122, 1649–1660 (2019).
- Cudjoe, E., Bojko, B., Delannoy, I., Saldivia, V. & Pawliszyn, J. Solid-phase microextraction: A complementary In Vivo sampling method to microdialysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 52, 12124–12126 (2013).
- Boyaci, E. *et al.* Comprehensive investigation of metabolic changes occurring in the rat brain hippocampus after fluoxetine administration using two complementary in vivo techniques: Solid phase microextraction and microdialysis. *ACS Chem. Neurosci.* 11, 3749–3760 (2020).
- Reyes-Garcés, N. *et al.* In vivo brain sampling using a microextraction probe reveals metabolic changes in rodents after deep brain stimulation. *Anal. Chem.* 91, 9875–9884 (2019).
- Napyllov, A. *et al.* In vivo solid-phase microextraction for sampling of oxylipins in brain of awake, moving rats. *Angew. Chem. Int. Ed.* 59, 2392–2398 (2020).
- Pawliszyn, J. *Handbook of Solid Phase Microextraction*. Elsevier: University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada, 2012. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-04297-7>.
- Lendor, S. *et al.* Solid phase microextraction-based miniaturized probe and protocol for extraction of neurotransmitters from brains in vivo. *Anal. Chem.* 91, 4896–4905 (2019).
- Gómez-Ríos, G. A. *et al.* Quantitative analysis of biofluid spots by coated blade spray mass spectrometry, a new approach to rapid screening. *Sci. Rep.* 7, 16104 (2017).
- Stryjak, I. *et al.* Using a chemical biopsy for graft quality assessment. *J. Vis. Exp.* <https://doi.org/10.3791/60946> (2020).
- Bogusiewicz, J. *et al.* On-site sampling and extraction of brain tumors for metabolomics and lipidomics analysis. *J. Vis. Exp.* 2020, 159 (2020).
- Xia, J., Broadhurst, D. L., Wilson, M. & Wishart, D. S. Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: An introductory tutorial. *Metabolomics* 9, 280–299 (2013).
- Lipidomics, H. X. *Comprehensive Mass Spectrometry of Lipids* (Wiley-Blackwell, 2016). <https://doi.org/10.1002/9781119085263>.
- Chong, J., Wishart, D. S. & Xia, J. Using MetaboAnalyst 4.0 for comprehensive and integrative metabolomics data analysis. *Curr. Protoc. Bioinform.* 68, e86 (2019).
- Ifa, D. R. & Eberlin, L. S. Ambient ionization mass spectrometry for cancer diagnosis and surgical margin evaluation. *Clin. Chem.* 62, 111–123 (2016).
- St John, E. R., Rossi, M., Pruski, P., Darzi, A. & Takats, Z. Intraoperative tissue identification by mass spectrometric technologies. *TRAC Trends Anal. Chem.* 85, 2–9 (2016).

24. Reyes-Garcés, N. *et al.* Advances in solid phase microextraction and perspective on future directions. *Anal. Chem.* **90**, 302–360 (2018).
25. Bojko, B. *et al.* Low invasive in vivo tissue sampling for monitoring biomarkers and drugs during surgery. *Lab Investig.* **94**, 586–594 (2014).
26. Filipiak, W. & Bojko, B. SPME in clinical, pharmaceutical, and biotechnological research—How far are we from daily practice? *TRAC Trends Anal. Chem.* **115**, 203–213 (2019).
27. Hug, M., Tascon, M., Nazdralic, E., Roszkowska, A. & Pawliszyn, J. Measurement of free drug concentration from biological tissue by solid-phase microextraction. In silico and experimental study. *Anal. Chem.* **91**, 7719–7728 (2019).
28. Van Den Brink, F. T. G. *et al.* A miniaturized push-pull-perfusion probe for few-second sampling of neurotransmitters in the mouse brain. *Lab Chip* **19**, 1332–1343 (2019).
29. Cepeda, D. E. *et al.* Experimental evaluation and computational modeling of tissue damage from low-flow push-pull perfusion sampling in vivo. *J. Neurosci. Methods.* **242**, 97–105 (2015).
30. Roberts, J. G., Lugo-Morales, L. Z., Loziuk, P. L. & Sombers, L. A. Real-time chemical measurements of dopamine release in the brain. *Methods Mol Biol* **964**, 275–294 (2013).
31. Fischl, B. & Dale, A. M. Measuring the thickness of the human cerebral cortex from magnetic resonance images. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 11050–11055 (2000).
32. Zhang, X. *et al.* Tissue-specific in vivo bioconcentration of pharmaceuticals in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using space-resolved solid-phase microextraction. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 3417–3422 (2010).
33. Lendor, S., Gómez-Ríos, G. A., Boyaci, E., Vander Heide, H. & Pawliszyn, J. Space-resolved tissue analysis by solid-phase microextraction coupled to high-resolution mass spectrometry via desorption electrospray ionization. *Anal. Chem.* **91**, 10141–10148 (2019).
34. Anderzhanova, E. & Wojtak, C. T. Brain microdialysis and its applications in experimental neurochemistry. *Cell Tissue Res.* **354**, 27–39 (2013).
35. Dawson, G. Measuring brain lipids. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids.* **1851**, 1026–1039 (2015).
36. Leuze, C. *et al.* The separate effects of lipids and proteins on brain MRI contrast revealed through tissue clearing. *NeuroImage* **156**, 412–422 (2017).
37. Jarmusch, A. K. *et al.* Differential Lipid profiles of normal human brain matter and gliomas by positive and negative mode desorption electrospray ionization—Mass spectrometry imaging. *PLoS ONE* **11**, 1–15 (2016).
38. Jarmusch, A. K. *et al.* Lipid and metabolite profiles of human brain tumors by desorption electrospray ionization-MS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, 1486–1491 (2016).
39. Balog, J. *et al.* Intraoperative tissue identification using rapid evaporative ionization mass spectrometry. *Sci. Transl. Med.* **5**, 194 (2013).
40. Birjandi, A. P., Bojko, B., Ning, Z., Flgeys, D. & Pawliszyn, J. High throughput solid phase microextraction: A new alternative for analysis of cellular lipidome? *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1043**, 12–19 (2017).
41. Reyes-Garcés, N. *et al.* Assessment of solid phase microextraction as a sample preparation tool for untargeted analysis of brain tissue using liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1638**, 11–13 (2021).
42. Gionfriddo, E., Boyaci, E. & Pawliszyn, J. New generation of solid-phase microextraction coatings for complementary separation approaches: A step toward comprehensive metabolomics and multiresidue analyses in complex matrices. *Anal. Chem.* **89**, 4046–4054 (2017).
43. Galievsky, V. & Pawliszyn, J. Fluorometer for screening of doxorubicin in perfusate solution and tissue with solid-phase microextraction chemical biopsy sampling. *Anal. Chem.* **92**, 13025–13033 (2020).

Acknowledgements

The work was supported by the grant, entitled, “Metabolomic and lipidomic profiling of white and gray matter of cerebral cortex using novel technology based on chemical biopsy coupled to mass spectrometry”, which was provided by the Ministry of National Defence of Poland under the second edition of the Kościuszko program (508/2017/DA). The authors would like to thank Supelco Inc. (Merck) for supplying the SPME probes for the MM and C18 fibers, and Waters for providing the HLB particles.

Author contributions

J.B. and K.B.—preparation of SPME probes; M.B., J.E.—surgical procedures and recruitment of the patients; J.B., B.B., K.B., K.L.—assistance in samplings and handling of samples after biopsies; J.B.—instrumental analysis; J.B., K.J., K.L.—statistical analysis and data interpretation; J.B.—writing original draft of the manuscript; M.B., J.B., B.B., K.B., M.H., K.J., K.L., J.P.—review and editing of the manuscript; M.H.—coordination and supervision of the medical side of the project; J.P.—funding, participation in the design of the analytical side of the project; B.B.—conceptualization, coordination and supervision of the project. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98973-y>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.H., J.P. or B.B.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

New Chemical Biopsy Tool for Spatially Resolved Profiling of Human Brain Tissue in vivo

Joanna Bogusiewicz¹, Katarzyna Burlikowska¹, Kamil Łuczykowski¹, Karol Jaroch¹, Marcin Birski², Jacek Furtak², Marek Harat^{2,3#}, Janusz Pawliszyn^{4#}, Barbara Bojko^{1#}

1. Department of Pharmacodynamics and Molecular Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Torun, Jurasza 2 Street, 85-089 Bydgoszcz, Poland
2. Department of Neurosurgery, 10th Military Research Hospital and Polyclinic, Powstancow Warszawy 5 Street, 85-681 Bydgoszcz, Poland
3. Department of Neurosurgery and Neurology, Faculty of Health Sciences, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Torun, Ujejskiego 75 Street, 85-168 Bydgoszcz, Poland
4. Department of Chemistry, University of Waterloo, 200 University Avenue West, Waterloo, Ontario N2L 3G1, Canada

#corresponding authors

Marek Harat – e-mail: harat@10wsk.mil.pl; phone: +48261417094; Janusz Pawliszyn – e-mail: janusz@uwaterloo.ca; Barbara Bojko – e-mail: bbojko@cm.umk.pl; phone: +48525853564

Figures

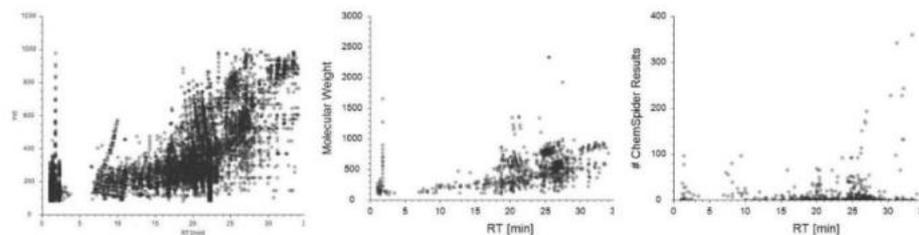


Fig. SA1. Scatter plots representing A. number of features, B. compounds and C. Chemspider database hits acquired in PFP (+) metabolomics analysis.

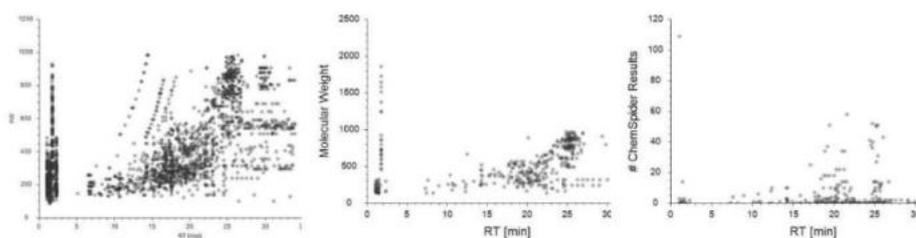


Fig. SA2. Scatter plots representing A. number of features, B. compounds and C. Chemspider database hits acquired in PFP (-) metabolomics analysis.

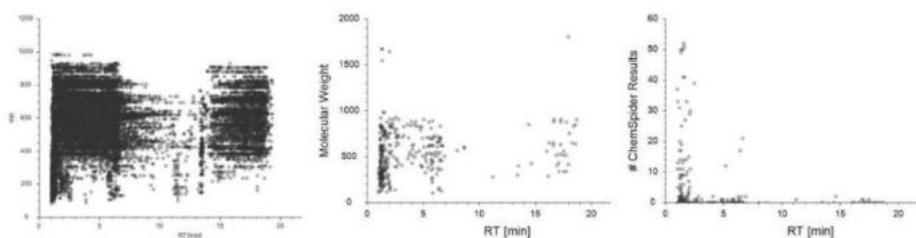


Fig. SA3. Scatter plots representing A. number of features, B. compounds and C. Chemspider database hits acquired in HILIC (+) metabolomics analysis.

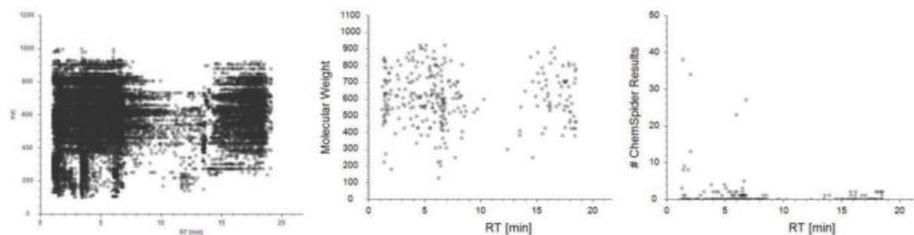


Fig. SA4. Scatter plots representing A. number of features, B. compounds and C. Chemspider database hits acquired in HILIC (-) metabolomics analysis.

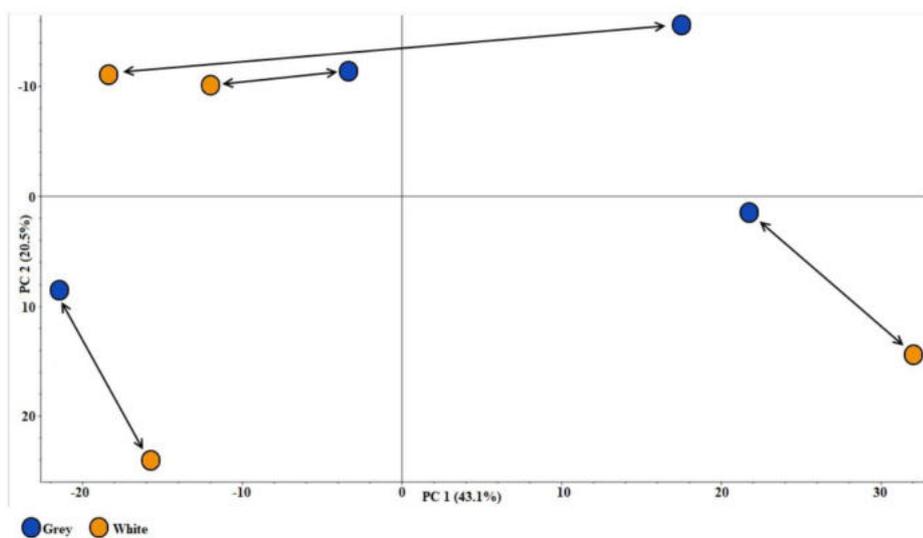


Fig. SA5 The Principal Component Analysis of white (blue) and grey (orange) matters for metabolomics data obtained with use **reversed-phase liquid chromatography (RPLC) high resolution mass spectrometry (HRMS)**. Arrows represents samples from the same individual.

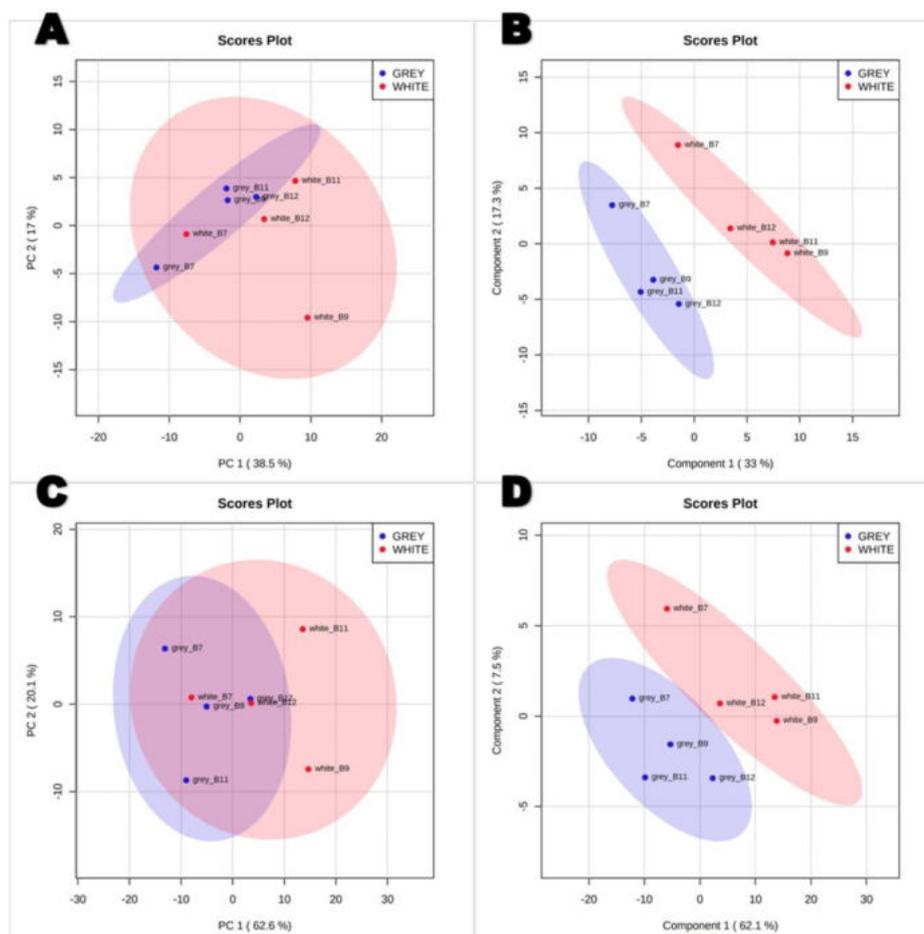


Fig. SA6. Chemometric analysis of data obtained with use of hydrophilic-interaction liquid chromatography high resolution mass spectrometry (HILIC-HRMS) for lipidomic data.

A. principal component analysis (PCA); B. partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), plot parameters: 1 component: R2: 0.659; Q2: -0.072; 2 component: R2: 0.957; Q2: -0.129; and reversed-phase liquid chromatography high resolution mass spectrometry (RPLC-HRMS) for lipidomic data C. PCA; D. PLS-DA, plot parameters: 1 component: R2: 0.447; Q2: 0.060; 2 component: R2: 0.881; Q2: 0.049.

The parameters of PLS-DA for HILIC-HRMS showed over-fitting of the model, while separation was slightly better for the RPLC-HRMS analysis. It was observed that the samples taken from patient B12 were located very close to each other (almost overlapping), which may lead to the assumption that, in this case, sampling was performed only from one type of matter.

Tables

Table SA1 Patient and tumor sampling characteristics.

Sample ID	Histopathologic diagnoses	Brain tumor location	Age	Sex	Sorbent	Type of Analysis
B2	Diffuse large B-cell lymphoma	Corpus callosum	55	female	MM	metabolomics
B3	High- grade glioma (WHO grade III)	Left parietal lobe	46	female	MM	metabolomics
B4	Metastatic breast adenocarcinoma	Left temporal lobe	57	female	MM	metabolomics
B5	Glioblastoma, IDH- wildtype	Deep structures of the right hemisphere	66	male	MM	metabolomics
B7	Glioblastoma, NOS	Right frontal lobe	58	male	C18	lipidomics
B9	Gemistocytic astrocytoma, IDH- wildtype	multifocal tumor of the left hemisphere	55	male	C18	lipidomics
B11	hemorrhagic stroke (non-neoplastic cells)	Left thalamus	63	Female	C18	lipidomics
B12	Diffuse large B- cell lymphoma	Right fronto-parietal region	64	Female	C18	lipidomics

C18 – octadodecyl fibers; MM – mix mode fibers; NOS – not otherwise specified; WHO – World Health Organization

Table SA2 Metabolites detected in HILIC-HRMS negative ion mode analysis and confirmed with fragmentation pattern.

Name + adduct	Observed m/z	Retention Time [min]	QC		White		Grey		WHITE/ GREY
			Mean	CV [%]	Mean	CV [%]	Mean	CV [%]	
N-Nonanoylglycine -H	214.14453	12.3	1.93E+05	11.43	5.55E+04	65.71	8.71E+04	38.11	0.6
Tridecanoylglycine -H	270.20792	15.9	2.32E+05	8.22	1.22E+05	112.89	1.57E+05	45.58	0.8
16-Hydroxyhexadecanoic acid -H	271.22812	19.5	4.36E+04	5.05	2.24E+04	29.99	6.61E+04	66.94	0.3
Acetoxycorenone -H	277.18127	18.4	1.42E+04	13.06	8.79E+03	72.27	1.00E+04	101.17	0.9
(Arabinosylamino) (glucosylamino)propanenitrile -H	378.15161	14.2	2.46E+04	3.36	1.38E+04	79.41	1.44E+04	40.03	1.0
LPE(18:1) -H	478.29468	18.2	1.80E+04	4.68	2.25E+04	79.79	2.20E+04	53.59	1.0
LPE(20:4) -H	500.27963	17.7	1.99E+04	8.69	1.95E+04	61.27	2.37E+04	47.96	0.8
PE(22:4) -H	528.31079	18.6	1.59E+04	3.62	2.02E+04	68.45	1.87E+04	51.18	1.1
PE(22:6) -H	542.27942	17.8	2.91E+04	3.08	1.96E+04	99.82	2.50E+04	27.37	0.8
PE(36:2) -H	742.54120	25.4	1.52E+05	3.05	2.06E+05	57.12	1.65E+05	59.86	1.3
PE(38:6p) -H	746.54514	24.7	2.26E+05	3.82	1.83E+05	95.83	1.91E+05	80.49	1.0
PE(38:5p) -H	748.53040	25.1	3.30E+05	3.82	3.67E+05	61.51	3.10E+05	39.96	1.2
PE(38:6) -H	762.51007	24.4	3.63E+05	4.28	2.31E+05	104.51	2.62E+05	76.24	1.0
PE(38:5) -H	764.52557	24.7	1.97E+05	4.39	2.27E+05	62.22	1.97E+05	33.29	1.2
PE(38:4) -H	766.54175	25.1	4.77E+04	4.79	3.30E+04	67.87	3.79E+04	62.20	0.9
PE(40:6p) -H	774.54633	25.6	7.94E+05	7.39	6.94E+05	92.42	7.11E+05	77.70	1.0
PE(40:6) -H	790.54132	25.2	1.52E+06	3.12	1.20E+06	91.45	1.13E+06	78.67	1.1

CV – coefficient of variation; LPE – lyso phosphatidylethanolamines; m/z – mass to charge ratio; PE – phosphatidylethanolamines; QC – quality control

Table SA3 Metabolites detected in RPLC-HRMS positive ion mode analysis and confirmed with fragmentation pattern.

Name + adduct	Observed m/z	Retention Time [min]	QC		White		Grey		WHITE/GREY
			Mean	CV [%]	Mean	CV [%]	Mean	CV [%]	
Creatinine +H	114.0664	3.5	1.37E+05	11.66	2.16E+05	94.98	1.96E+05	39.94	1.1
Isothiocyanatobutane +H	116.0531	12.8	8.59E+03	7.95	8.70E+03	85.76	9.40E+03	118.97	0.9
norleucine +H	132.1019	7.3	9.81E+03	3.91	1.04E+04	75.21	1.61E+04	93.04	0.6
Deoxyribose +H	137.0809	1.2	2.15E+04	9.37	6.48E+03	134.69	3.05E+03	47.03	2.1
Triethanolamine +H	150.1125	2.4	2.42E+05	4.63	6.40E+04	78.58	7.72E+04	130.01	0.8
Histidine +H	156.0768	2.0	1.79E+03	5.00	2.94E+03	87.33	8.36E+03	112.60	0.4
Phenylalanine +H	166.0865	1.4	2.24E+03	6.60	7.11E+02	36.32	8.84E+02	182.04	0.8
Artemisia alcohol acetate +H	197.1537	20.4	4.15E+05	1.80	1.18E+05	39.12	1.69E+05	39.78	0.7
Norlidocaine +H	207.1493	19.2	6.71E+05	1.37	1.17E+06	60.93	9.87E+05	44.43	1.2
tetradecenal +H	211.2058	18.7	1.69E+04	6.45	2.91E+04	56.05	2.53E+04	53.33	1.2
Furanofukinin+H	249.1848	23.4	3.70E+04	2.20	5.56E+04	68.36	6.18E+04	50.07	0.9
Hexadecenolide +H	253.2163	16.9	9.43E+05	16.32	1.06E+06	97.95	6.07E+05	42.10	1.7
Ginsenyne D +H	263.2004	20.7	2.17E+05	3.03	2.75E+05	83.64	1.93E+05	133.56	1.4
Nandrolone +H	275.2005	22.7	4.23E+03	0.37	3.83E+03	54.48	3.40E+03	115.03	1.1
androstenediol +H	275.2369	22.3	4.46E+05	7.33	2.20E+05	155.16	1.29E+06	101.06	0.2
Panaquinquecol 7 +H	277.1798	20.1	3.06E+05	12.81	2.13E+05	101.32	3.48E+05	147.85	0.6
Stearamide +H	284.2587	21.8	4.48E+03	0.37	2.44E+03	59.42	7.96E+03	105.35	0.3
Myristoylglycine +H	286.2373	20.4	6.09E+04	15.54	1.06E+05	78.84	9.94E+04	29.72	1.1
aminooctadecynediol +H	298.2739	20.7	1.87E+04	10.74	1.50E+04	55.50	1.68E+04	56.26	0.9
hydroxy stearic acid +H	301.2737	20.6	3.24E+04	8.68	3.54E+04	51.05	6.79E+04	41.75	0.5
Octadecatrienoic acid isobutylamide +H	334.3104	20.5	1.96E+04	16.53	7.77E+03	29.73	6.65E+03	15.61	1.2

Cholestadienone +H	383.3307	29.5	1.68E+04	4.20	9.82E+03	72.34	2.84E+04	44.75	0.3
dehydrocholesterol +H	385.3463	22.9	1.81E+04	14.21	5.38E+03	162.97	4.10E+04	87.79	0.1
Drotaverine +H	398.2327	22.3	2.44E+04	7.33	1.36E+04	49.38	3.94E+04	70.02	0.3
Hydroxymethyltetraacosanoic acid +H	399.3832	24.8	3.78E+03	14.41	1.67E+03	109.35	9.18E+03	54.91	0.2
Squalene +H	411.3981	26.8	2.00E+04	16.55	2.21E+03	182.21	1.31E+04	140.87	0.2
Tasosartan +H	412.1874	26.8	2.28E+05	0.45	1.23E+05	54.57	2.94E+05	93.65	0.4
Diepomuricanin A +H	547.4719	26.9	8.20E+03	5.29	9.67E+03	72.37	1.44E+04	87.10	0.7
PE(38:6p) +H	748.5280	24.7	1.61E+05	4.04	2.09E+05	117.02	1.49E+05	86.40	1.4
PE(38:4p) +H	752.5590	25.5	1.55E+05	5.23	3.22E+05	78.39	2.30E+05	47.29	1.4
PE(38:6) +H	764.5227	24.3	2.46E+05	7.89	2.89E+05	111.46	2.12E+05	89.43	1.4
PE(38:4) +H	768.5536	25.1	3.10E+04	2.58	3.73E+04	101.81	4.72E+04	49.95	0.8
PE(40:6p) +H	776.5591	25.6	5.98E+05	1.90	8.41E+05	109.21	6.09E+05	98.47	1.4
PE(40:4p) +H	780.5897	26.4	1.24E+05	6.09	7.21E+04	150.72	1.40E+04	161.46	5.2
PE(40:6) +H	792.5539	25.2	1.07E+06	2.42	1.34E+06	114.17	1.02E+06	92.36	1.3
PE(40:5) +H	794.5694	25.8	5.34E+04	7.67	8.26E+04	69.98	6.67E+04	63.83	1.2
PE(40:4) +H	796.5852	26.0	1.89E+05	4.16	2.66E+05	111.96	1.94E+05	83.08	1.4

CV – coefficient of variation; m/z – mass to charge ratio; PE – phosphatidylethanolamines; QC – quality control

Table SA4 Lipid species detected in RPLC-HRMS analysis and confirmed with fragmentation pattern.

Name + adduct	Lipid Class	Observed m/z	Retention Time	Normalized peak area*						WHITE/GREY	P-value
				QC		WHITE		GREY			
				Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV		
LPC(16:0)+H	LPC	496.3397	5.4	0,001	8%	0,005	104%	0,003	117%	1,89	0,471
ChE(18:2)+NH ₄	ChE	666.6183	15.3	0,006	1%	0,033	119%	0,014	144%	2,40	0,427
PE(34:1p)+H	PE	702.5432	11.7	0,007	4%	0,030	78%	0,008	130%	3,80	0,158
PE(36:2p)+H	PE	728.5565	11.8	0,014	2%	0,052	87%	0,015	141%	3,43	0,211
PE(36:1p)+H	PE	730.5745	12.3	0,005	6%	0,022	78%	0,006	137%	3,60	0,165
PE(38:4p)+H	PE	752.5589	11.8	0,004	27%	0,022	102%	0,005	113%	4,25	0,233
PE(38:4)+H	PE	768.5538	11.6	0,005	4%	0,022	128%	0,005	90%	4,35	0,318
PE(40:6p)+H	PE	776.5584	11.9	0,007	5%	0,028	99%	0,009	125%	3,21	0,266
PE(40:5p)+H	PE	778.5745	11.9	0,005	11%	0,020	72%	0,006	132%	3,36	0,154
PE(40:4p)+H	PE	780.5899	12.4	0,005	9%	0,022	74%	0,006	103%	3,80	0,140
PC(34:1)+Na	PC	782.5670	11.2	0,005	3%	0,023	102%	0,007	109%	3,48	0,262
PE(40:6)+H	PE	792.5536	11.6	0,009	5%	0,041	104%	0,012	114%	3,54	0,265
HexCer(d42:2)+H	HexCer	810.6814	12.5	0,010	1%	0,037	85%	0,011	142%	3,46	0,202
TG(48:2)+NH ₄	TG	820.7386	14.8	0,014	1%	0,009	50%	0,017	59%	0,56	0,250
TG(48:1)+NH ₄	TG	822.7541	15.0	0,010	1%	0,007	36%	0,008	45%	0,83	0,550
HexCer(d42:2+pO)+H	HexCer	826.6760	12.3	0,011	4%	0,041	76%	0,011	134%	3,53	0,162
TG(48:1)+Na	TG	827.7089	15.0	0,030	1%	0,020	69%	0,033	30%	0,62	0,203
HexCer(d42:1+O)+H	HexCer	828.6918	12.8	0,012	1%	0,043	94%	0,011	136%	3,99	0,212
TG(50:3)+NH ₄	TG	846.7536	14.9	0,018	0%	0,010	52%	0,020	77%	0,47	0,269
TG(50:2)+NH ₄	TG	848.7699	15.1	0,071	1%	0,037	58%	0,065	40%	0,56	0,144
TG(50:1)+NH ₄	TG	850.7854	15.2	0,070	1%	0,046	69%	0,069	25%	0,66	0,253
TG(50:2)+Na	TG	853.7246	15.1	0,019	1%	0,012	26%	0,013	42%	0,86	0,581
TG(50:1)+Na	TG	855.7404	15.2	0,016	1%	0,012	34%	0,014	56%	0,86	0,677
TG(51:2)+NH ₄	TG	862.7850	15.2	0,005	1%	0,004	61%	0,005	32%	0,81	0,555
TG(52:5)+NH ₄	TG	870.7536	14.8	0,004	3%	0,002	57%	0,005	81%	0,51	0,324

TG(52:4)+NH ₄	TG	872.7691	15.0	0,026	3%	0,015	64%	0,028	57%	0,52	0,209
TG(52:3)+NH ₄	TG	874.7852	15.1	0,112	2%	0,064	70%	0,106	33%	0,60	0,194
TG(52:2)+NH ₄	TG	876.8007	15.3	0,196	1%	0,124	73%	0,191	25%	0,65	0,259
TG(52:4)+Na	TG	877.7256	15.0	0,009	10%	0,006	44%	0,007	32%	0,76	0,338
TG(52:1)+NH ₄	TG	878.8157	15.5	0,029	3%	0,024	98%	0,035	40%	0,69	0,468
TG(52:3)+Na	TG	879.7404	15.1	0,026	4%	0,018	45%	0,022	49%	0,84	0,612
TG(52:2)+Na	TG	881.7556	15.3	0,038	2%	0,028	42%	0,034	55%	0,82	0,601
TG(53:3)+NH ₄	TG	888.8003	15.2	0,002	0%	0,002	79%	0,003	25%	0,67	0,321
TG(53:2)+NH ₄	TG	890.8171	15.4	0,003	1%	0,003	89%	0,004	44%	0,74	0,542
TG(54:4)+NH ₄	TG	900.8003	15.2	0,037	1%	0,020	63%	0,035	38%	0,57	0,152
TG(54:3)+NH ₄	TG	902.8161	15.3	0,069	1%	0,039	67%	0,067	24%	0,58	0,131
TG(54:2)+NH ₄	TG	904.8317	15.5	0,032	4%	0,023	85%	0,039	35%	0,59	0,225
TG(54:4)+Na	TG	905.7557	15.2	0,009	4%	0,006	42%	0,007	46%	0,86	0,641
TG(54:3)+Na	TG	907.7711	15.3	0,017	1%	0,011	42%	0,014	45%	0,76	0,420
TG(54:2)+Na	TG	909.7867	15.5	0,012	6%	0,008	54%	0,012	42%	0,67	0,290
TG(56:6)+NH ₄	TG	924.8004	15.1	0,005	2%	0,003	46%	0,005	34%	0,57	0,097
TG(56:5)+NH ₄	TG	926.8155	15.3	0,005	8%	0,003	57%	0,005	31%	0,62	0,159
TG(56:4)+NH ₄	TG	928.8312	15.4	0,004	11%	0,002	82%	0,004	27%	0,56	0,160
TG(56:3)+NH ₄	TG	930.8484	15.5	0,005	9%	0,003	84%	0,005	44%	0,53	0,181

*Ratio of the peak area and total peak area for lipids

ChE – cholesterol esters; CV – coefficient of variation; HexCer – hexosyl ceramides; LPC – lysophosphatidylcholines; m/z – mass to charge ratio; PC – phosphatidylcholines; PE – phosphatidylethanolamines; QC – quality control; TG – triglycerides

Table S.A.5. Lipid species detected in HILIC-HRMS analysis and confirmed with fragmentation pattern

Name + adduct	Lipid Class	Observed m/z	Retention Time [min]	Normalized peak area*						WHITE/GREY	P-value
				QC		WHITE		GREY			
				Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV		
LPC(16:1)+H	LPC	494.3241	8.9	0,001	17%	0,001	33%	0,001	56%	0,63	0,328
LPC(16:0)+H	LPC	496.3396	8.9	0,025	14%	0,031	18%	0,039	35%	0,80	0,484
LPC(18:2)+H	LPC	520.3398	8.5	0,001	25%	0,001	19%	0,002	48%	0,66	0,346
LPC(18:1)+H	LPC	522.3554	8.8	0,005	17%	0,007	19%	0,008	33%	0,87	0,741
LPC(18:0)+H	LPC	524.3711	8.7	0,007	14%	0,010	34%	0,010	25%	1,00	0,805
LPC(18:2)+Na	LPC	542.3217	8.8	0,001	5%	0,001	41%	0,001	55%	0,58	0,253
LPC(20:4)+H	LPC	544.3374	8.8	0,002	4%	0,002	28%	0,004	33%	0,70	0,226
LPC(20:3)+H	LPC	546.3530	8.7	0,002	3%	0,003	30%	0,003	30%	0,82	0,544
Cer(d36:1)+H	Cer	566.5507	1.3	0,001	3%	0,001	33%	0,001	11%	1,31	0,256
PE(34:2p)+H	PE	700.5271	7.6	0,002	10%	0,002	19%	0,003	22%	0,63	<0,05
PE(34:1p)+H	PE	702.5432	7.6	0,038	7%	0,033	32%	0,030	16%	1,08	0,867
PC(30:0)+H	PC	706.5381	6.8	0,014	14%	0,018	27%	0,013	12%	1,38	0,143
PC(32:1p)+H	PC	716.5589	7.5	0,003	11%	0,002	47%	0,002	36%	1,21	0,698
PC(31:1)+H	PC	718.5381	7.7	0,011	7%	0,012	24%	0,015	14%	0,81	0,335
PC(32:1e)+H	PC	718.5745	6.6	0,003	4%	0,004	28%	0,003	19%	1,15	0,439
PE(36:2p)+H	PE	728.5589	7.5	0,058	6%	0,056	64%	0,045	22%	1,25	0,668
PC(32:2)+H	PC	730.5381	6.6	0,001	6%	0,001	28%	0,001	16%	1,20	0,356
PC(32:1)+H	PC	732.5538	6.7	0,035	6%	0,038	19%	0,036	9%	1,06	0,616
PE(34:1)+Na	PE	740.5201	7.7	0,009	5%	0,007	39%	0,012	13%	0,60	<0,05
PC(33:2)+H	PC	744.5538	7.7	0,013	7%	0,013	5%	0,015	8%	0,86	0,058
PE(36:2p)+Na	PE	750.5408	7.4	0,044	12%	0,035	19%	0,041	11%	0,84	0,135
PE(38:5p)+H	PE	750.5415	7.4	0,047	11%	0,035	19%	0,041	14%	0,85	0,125
PE(36:1p)+Na	PE	752.5565	7.4	0,030	17%	0,033	46%	0,037	24%	0,89	0,751

PE(38:4p)+H	PE	752.5565	7.4	0,048	6%	0,047	20%	0,054	10%	0,88	0,355
PC(34:4)+H	PC	754.5357	6.6	0,005	21%	0,004	14%	0,005	7%	0,88	0,104
HexCer(d38:1)+H	HexCer	756.6348	3.1	0,001	11%	0,002	68%	0,001	41%	1,51	0,440
PE(36:2)+Na	PE	766.5376	7.5	0,043	7%	0,043	12%	0,047	5%	0,93	0,401
PE(36:1)+Na	PE	768.5514	7.5	0,002	8%	0,002	29%	0,002	21%	0,98	0,873
PC(36:4e)+H	PC	768.5878	6.6	0,005	6%	0,005	28%	0,005	23%	0,88	0,453
PE(38:4p)+Na	PE	774.5408	7.4	0,017	17%	0,016	29%	0,019	14%	0,88	0,476
PE(40:7p)+H	PE	774.5408	7.4	0,017	17%	0,016	29%	0,019	14%	0,88	0,489
PE(40:6p)+H	PE	776.5582	7.3	0,033	8%	0,038	27%	0,036	18%	1,05	0,673
PE(38:2p)+Na	PE	778.5745	7.4	0,033	9%	0,032	31%	0,030	18%	1,08	0,773
PC(34:2)+Na	PC	780.5514	6.6	0,011	8%	0,009	10%	0,015	19%	0,58	<0,05
PC(36:5)+H	PC	780.5538	6.6	0,011	8%	0,009	10%	0,015	19%	0,58	<0,05
PC(34:1)+Na	PC	782.5694	6.6	0,112	4%	0,101	19%	0,110	18%	0,91	0,460
PC(36:1)+H	PC	788.6157	6.6	0,099	16%	0,100	28%	0,073	10%	1,36	0,231
PE(38:4)+Na	PE	790.5357	7.5	0,011	8%	0,010	48%	0,013	37%	0,80	0,508
PE(38:3)+Na	PE	792.5531	7.5	0,044	13%	0,045	24%	0,046	28%	0,98	0,966
PC(36:2)+Na	PC	808.5827	6.5	0,022	13%	0,025	17%	0,024	8%	1,04	0,632
PC(36:1)+Na	PC	810.6007	6.5	0,043	10%	0,051	15%	0,040	9%	1,26	0,070
PC(38:4)+H	PC	810.6007	6.5	0,044	9%	0,055	29%	0,040	9%	1,36	0,176
HexCer(d43:2)+H	HexCer	824.6974	2.9	0,015	13%	0,015	55%	0,011	35%	1,32	0,549
PC(38:6)+Na	PC	828.5503	6.5	0,003	9%	0,003	26%	0,004	11%	0,69	<0,05
HexCer(d44:2)+H	HexCer	838.7123	2.8	0,010	13%	0,011	54%	0,007	28%	1,48	0,388
ST(d42:2)+H	ST	890.6376	1.7	0,005	2%	0,004	41%	0,004	27%	1,02	0,872

* Ratio of the peak area and total peak area for lipids

CV – coefficient of variation; HexCer – hexosyl ceramides; LPC – lysophosphatidylcholines; m/z – mass to charge ratio; PC – phosphatidylcholines; PE – phosphatidylethanolamines; QC – quality control; ST – sulfatides

New Chemical Biopsy Tool for Spatially Resolved Profiling of Human Brain Tissue in vivo

Joanna Bogusiewicz¹, Katarzyna Burlikowska¹, Kamil Łuczykowski¹, Karol Jaroń¹, Marcin Birski², Jacek Furtak², Marek Harat^{2,3#}, Janusz Pawliszyn^{4#}, Barbara Bojko^{1#}

1. Department of Pharmacodynamics and Molecular Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Torun, Jurasza 2 Street, 85-089 Bydgoszcz, Poland

2. Department of Neurosurgery, 1001 Military Research Hospital and Polyclinic, Gowstanów 5, Bydgoszcz, Poland

3. Department of Neurosurgery and Neurology, Faculty of Health Sciences, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Torun, Ujejskiego 75 Street, 85-168 Bydgoszcz, Poland

4. Department of Chemistry, University of Waterloo, 200 University Avenue West, Waterloo, Ontario N2L 2G1, Canada

#corresponding authors

Marek Harat – e-mail: harat@10wsk.mil.pl; phone: +48261417094; Janusz Pawliszyn – e-mail: janusz@uwaterloo.ca; Barbara Bojko – e-mail: bbojko@cm.umk.pl; phone: +48525853564

Table SB1. Features sampled with use of SPME fibers and analysed by HILIC-HRMS

Putative Lipid Ion	Observed m/z	Delta(pp m)	Retention time	average normalized area- C18	CV - C18	average normalized area - HLB	CV - HLB	ratio of average normalized area- C18:HLB	The F-test
Cer 20:0;O2 +H	344,3154	1,48	11,217	4,45E-04	59%	1,88E-04	9%	2,36 +	
Cer 23:1;O3 +H	400,3417	1,17	7,985	7,31E-04	34%	5,74E-04	9%	1,27 -	
Cer 34:1;O2 +H	538,5189	0,92	1,352	1,00E-04	78%	3,97E-05	16%	2,52 +	
Cer 36:1;O2 +H	566,5502	0,79	1,352	1,15E-03	29%	9,64E-04	10%	1,19 -	
Cer 36:2;O2 +H	564,5345	0,89	1,352	3,18E-04	26%	2,16E-04	29%	1,47 -	
Cer 40:0;O2 +Na	646,6109	0,01	5,277	5,44E-04	29%	7,12E-04	14%	0,76 -	
Cer 40:2;O2 +H	620,5974	0,43	5,362	1,08E-03	39%	1,29E-03	16%	0,84 -	
Cer 41:2;O2 +H	634,6129	0,51	5,286	4,04E-04	16%	5,07E-04	13%	0,80 -	
Cer 42:2;O2 +H	648,6283	0,92	5,227	8,49E-04	30%	1,06E-03	19%	0,80 -	
Cer 42:3;O2 +H	646,6129	0,58	5,277	5,29E-04	37%	7,24E-04	14%	0,73 -	
Cer 45:6;O3 +Na	720,5901	0,00	7,073	1,48E-03	9%	1,23E-03	5%	1,20 -	
Cer 45:7;O4 +Na	718,5745	0,00	6,996	9,21E-04	4%	8,67E-04	16%	1,06 -	
CerP 21:0;O3 +H	454,2922	1,36	10,628	4,09E-04	15%	2,58E-04	7%	1,58 -	
CerP 21:0;O3 +Na	476,2743	0,87	10,628	2,23E-04	18%	1,54E-04	8%	1,45 -	
CerP 23:0;O3 +H	482,3241	0,00	10,446	1,46E-03	10%	9,13E-04	9%	1,60 -	
CerP 23:0;O3 +Na	504,3061	0,01	10,476	7,93E-04	20%	5,59E-04	7%	1,42 -	
CerP 23:1;O3 +H	480,3081	0,68	10,477	4,52E-04	26%	2,59E-04	20%	1,75 -	
CerP 23:1;O3 +Na	502,2912	1,52	10,054	9,80E-04	14%	6,42E-04	11%	1,53 -	
CerP 23:1;O3 +Na	502,2904	0,01	10,454	4,84E-04	8%	2,78E-04	23%	1,74 -	
CerP 24:0;O3 +H	496,3393	0,94	9,214	1,32E-02	4%	8,45E-03	9%	1,57 -	
CerP 24:0;O3 +Na	518,3214	0,56	9,192	1,46E-03	12%	1,11E-03	14%	1,32 -	
CerP 24:1;O3 +H	494,3237	0,87	9,217	2,75E-04	16%	1,31E-04	7%	2,10 -	
CerP 26:0;O3 +H	524,3711	0,00	9,038	5,19E-03	10%	3,63E-03	10%	1,43 -	

CerP 26:0;O3 +Na	546,3530	0,01	9,05	6,98E-04	9%	5,43E-04	18%	1,29 -	
CerP 26:1;O3 +H	522,3554	0,00	8,769	3,07E-03	12%	1,80E-03	5%	1,70 -	
CerP 26:1;O3 +Na	544,3373	0,15	9,055	2,14E-03	16%	1,13E-03	9%	1,90 -	
CerP 26:1;O3 +Na	544,3374	0,01	8,715	8,74E-04	21%	5,04E-04	6%	1,73 -	
CerP 38:1;O4 +H	706,5377	0,58	7,157	3,79E-03	7%	3,28E-03	3%	1,16 -	
CerP 39:2;O2 +NH4	703,5745	0,51	8,406	4,56E-03	24%	2,65E-03	7%	1,72 -	
CerP 39:2;O3 +Na	724,5252	0,00	7,545	1,41E-03	49%	1,32E-03	60%	1,07 -	
CerP 39:3;O3 +H	700,5273	0,36	7,702	2,77E-04	23%	3,01E-04	14%	0,92 -	
CerP 40:2;O4 +H	732,5532	0,73	7,073	1,04E-02	3%	9,74E-03	7%	1,07 -	
CerP 41:3;O2 +Na	750,5421	1,72	7,505	5,66E-03	18%	5,88E-03	21%	0,96 -	
CerP 41:3;O2 +NH4	729,5905	0,00	8,339	6,18E-03	14%	3,99E-03	24%	1,55 -	
CerP 42:0;O4 +Na	786,5983	0,00	6,903	1,38E-02	10%	1,46E-02	21%	0,95 -	
CerP 43:2;O2 +NH4	759,6375	0,00	8,267	5,60E-03	22%	5,39E-03	18%	1,04 -	
CerP 43:4;O3 +Na	776,5577	1,53	7,434	1,52E-02	14%	1,54E-02	9%	0,99 -	
CerP 43:5;O3 +Na	774,5432	3,11	7,45	3,71E-03	5%	4,06E-03	9%	0,92 -	
CerP 43:5;O3 +H	752,5589	0,00	7,471	9,17E-03	7%	7,93E-03	3%	1,16 -	
CerP 43:6;O3 +H	750,5432	0,00	7,505	5,66E-03	18%	5,22E-03	17%	1,09 -	
CerP 43:7;O3 +H	748,5276	0,00	7,509	5,47E-03	10%	5,74E-03	13%	0,95 -	
CerP 45:2;O2 +NH4	787,6688	0,00	8,178	2,28E-03	33%	1,99E-03	12%	1,15 -	
CerP 45:3;O2 +NH4	785,6531	0,00	8,2	9,32E-04	48%	8,69E-04	35%	1,07 -	
CerP 45:7;O3 +H	776,5589	0,00	7,432	1,51E-02	15%	1,44E-02	9%	1,05 -	
CerP 45:7;O3 +Na	798,5408	0,00	7,432	1,10E-03	15%	1,66E-03	23%	0,66 -	
CerP 46:2;O2 +NH4	801,6844	0,00	8,16	7,82E-04	15%	6,69E-04	9%	1,17 -	
CerP 47:3;O2 +NH4	813,6844	0,00	8,151	9,02E-03	27%	8,84E-03	6%	1,02 -	
CerP 47:4;O2 +NH4	811,6688	0,00	8,142	6,28E-04	20%	4,81E-04	11%	1,31 -	
CerP 47:7;O3 +H	804,5886	1,94	7,357	3,32E-04	2%	3,08E-04	9%	1,08 -	
DG P-40:7 +H	651,5340	1,00	7,985	5,15E-04	18%	2,74E-04	11%	1,88 -	
HexCer 33:1;O4 +NH4	735,5729	0,01	7,084	5,96E-02	13%	5,74E-02	3%	1,04 -	
HexCer 33:2;O4 +NH4	733,5570	0,36	7,074	4,64E-03	1%	4,14E-03	13%	1,12 +	
HexCer 34:3;O4 +NH4	745,5566	0,88	7,728	2,68E-03	15%	2,84E-03	15%	0,94 -	
HexCer 35:0;O4 +H	748,5926	0,98	1,58	2,84E-04	32%	2,96E-04	13%	0,96 -	
HexCer 35:2;O4 +NH4	761,5886	0,01	6,993	8,91E-02	8%	9,53E-02	9%	0,94 -	

HexCer 36:1;O3 +H	728,6028	0,95	3,177	1,26E-03	48%	1,26E-03	12%	1,00 -
HexCer 36:1;O3 +H	744,5975	1,25	5,53	2,31E-03	36%	2,39E-03	14%	0,96 -
HexCer 36:1;O3 +Na	766,5791	1,58	5,588	7,43E-04	17%	9,21E-04	5%	0,81 -
HexCer 36:2;O2 +H	726,5870	1,19	5,53	1,65E-03	31%	1,56E-03	7%	1,06 -
HexCer 36:3;O3 +NH4	757,5925	1,53	7,554	9,99E-04	61%	1,24E-03	29%	0,81 -
HexCer 36:3;O4 +NH4	773,5872	1,74	7,666	2,45E-04	58%	2,74E-04	28%	0,89 -
HexCer 36:5;O3 +NH4	753,5614	1,33	7,5	4,60E-03	10%	4,40E-03	11%	1,05 -
HexCer 36:6;O3 +NH4	751,5454	1,68	7,504	2,65E-03	14%	2,83E-03	11%	0,93 -
HexCer 36:7;O3 +NH4	749,5303	1,02	7,511	2,36E-03	9%	2,47E-03	17%	0,96 -
HexCer 37:1;O4 +H	774,6079	1,45	1,561	4,30E-04	36%	4,39E-04	12%	0,98 -
HexCer 38:1;O3 +H	772,6290	0,86	5,448	1,77E-03	34%	1,97E-03	11%	0,90 -
HexCer 38:1;O3 +Na	794,6106	1,28	5,484	4,01E-04	15%	5,00E-04	12%	0,80 -
HexCer 38:2;O2 +H	754,6183	1,10	5,46	1,15E-03	35%	1,25E-03	19%	0,92 -
HexCer 38:5;O3 +NH4	781,5926	1,38	7,465	2,71E-03	11%	2,36E-03	2%	1,15 +
HexCer 39:0;O2 +Na	794,6494	1,65	5,304	3,19E-04	17%	4,11E-04	4%	0,77 -
HexCer 40:0;O2 +Na	808,6649	1,50	5,277	3,57E-03	30%	4,64E-03	26%	0,77 -
HexCer 40:1;O2 +H	784,6649	1,56	3,002	1,56E-03	39%	1,65E-03	7%	0,95 -
HexCer 40:1;O3 +H	800,6599	1,35	5,362	1,02E-02	35%	1,21E-02	18%	0,85 -
HexCer 40:1;O3 +Na	822,6420	1,14	5,416	1,52E-03	21%	2,04E-03	20%	0,75 -
HexCer 40:2;O2 +H	782,6497	0,91	5,361	7,09E-03	34%	8,09E-03	13%	0,88 -
HexCer 40:2;O3 +H	798,6445	1,05	5,385	1,04E-03	31%	1,29E-03	6%	0,81 -
HexCer 41:1;O2 +H	798,6804	1,64	2,958	8,47E-04	31%	9,60E-04	1%	0,88 +
HexCer 41:1;O3 +H	814,6756	1,25	5,286	3,95E-03	18%	4,79E-03	15%	0,82 -
HexCer 41:1;O3 +Na	836,6574	1,50	5,291	7,07E-04	28%	8,05E-04	23%	0,88 -
HexCer 41:2;O2 +H	796,6652	1,07	5,291	2,58E-03	18%	3,27E-03	18%	0,79 -
HexCer 42:1;O3 +H	828,6908	1,83	5,236	9,64E-03	34%	1,29E-02	17%	0,75 -
HexCer 42:1;O3 +Na	850,6725	2,04	5,236	1,33E-03	13%	1,91E-03	23%	0,70 -
HexCer 42:2;O2 +H	810,6802	1,92	5,236	6,44E-03	33%	7,77E-03	20%	0,83 -
HexCer 42:2;O3 +H	826,6755	1,45	5,286	5,59E-03	35%	7,77E-03	24%	0,72 -
HexCer 42:2;O3 +Na	848,6572	1,65	5,277	7,70E-04	13%	1,15E-03	22%	0,67 -
HexCer 43:1;O2 +H	842,7064	1,80	5,172	4,44E-04	16%	5,70E-04	17%	0,78 -
HexCer 43:2;O2 +H	824,6961	1,62	2,895	3,44E-04	31%	4,25E-04	14%	0,81 -
LPC 22:6 +H	568,3394	0,68	8,697	1,06E-03	13%	5,78E-04	10%	1,83 -

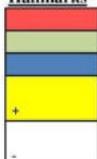
LPC 29:1 +H	676,5272	0,50	7,76	1,97E-04	19%	2,09E-04	33%	0,94 -
LPC 32:1 +H	718,5738	0,93	6,996	9,21E-04	4%	8,67E-04	16%	1,06 -
LPE 21:1 +H	522,3550	0,75	8,769	3,07E-03	12%	1,80E-03	5%	1,71 -
LPE 22:6 +H	526,2928	0,00	10,365	5,69E-04	21%	2,59E-04	4%	2,20 +
LPE 22:6 +Na	548,2746	0,35	10,385	3,11E-04	31%	1,43E-04	2%	2,18 +
LPE 35:1 +H	718,5745	0,00	6,996	9,22E-04	4%	8,67E-04	16%	1,06 -
MG P-18:2 +H	339,2889	1,52	1,554	2,64E-04	29%	2,83E-04	21%	0,93 -
PC 31:1 +Na	740,5216	2,01	7,666	2,02E-03	59%	1,03E-03	14%	1,97 +
PC 32:0 +Na	756,5510	0,47	7,095	3,00E-03	18%	4,31E-03	23%	0,70 -
PC 33:2 +Na	766,5357	0,00	7,639	3,75E-03	6%	4,31E-03	12%	0,87 -
PC 35:1 +Na	796,5837	1,29	7,58	3,08E-03	3%	2,71E-03	8%	1,14 -
PC 35:3 +Na	792,5514	0,00	7,58	1,91E-02	11%	1,96E-02	5%	0,97 -
PC 35:4 +H	768,5514	3,13	7,602	1,64E-02	7%	1,44E-02	15%	1,14 -
PC 36:1 +Na	810,5983	0,00	6,8	3,17E-02	7%	2,97E-02	18%	1,07 -
PC 36:3 +Na	806,5681	1,29	6,808	1,68E-02	13%	1,91E-02	8%	0,88 -
PC 38:4 +Na	832,5827	0,00	6,744	4,76E-03	15%	4,85E-03	9%	0,98 -
PC 40:7 +H	832,5851	0,00	6,744	4,76E-03	16%	4,87E-03	8%	0,98 -
PC O-31:0 +Na	728,5583	2,54	7,619	5,81E-03	40%	6,74E-03	23%	0,86 -
PC O-31:1+Na	768,5514	0,00	7,603	1,47E-02	5%	1,33E-02	9%	1,11 -
PC O-32:1+H	760,5851	0,00	6,992	1,85E-01	4%	2,08E-01	9%	0,89 -
PC O-32:1+Na	782,5670	0,00	6,865	2,74E-02	19%	2,63E-02	28%	1,04 -
PC O-34:1+H	788,6146	2,22	6,902	5,29E-02	17%	6,14E-02	3%	0,86 -
PC O-36:1+H	816,6477	0,00	6,865	2,59E-03	30%	2,91E-03	18%	0,89 -
PC O-36:1+Na	838,6296	0,00	6,789	2,49E-03	8%	2,20E-03	4%	1,14 -
PC P-31:1 +Na	724,5247	0,60	7,701	1,04E-03	93%	7,81E-04	28%	1,33 -
PC P-33:1 +H	730,5745	0,00	7,621	5,69E-03	44%	6,76E-03	24%	0,84 -
PC P-33:1 +Na	752,5578	1,84	7,502	9,58E-03	1%	8,29E-03	6%	1,16 -
PC P-33:2 +H	728,5589	0,00	7,616	5,78E-03	44%	7,08E-03	18%	0,82 -
PC P-35:1 +H	758,6040	2,37	7,581	1,69E-03	64%	2,08E-03	35%	0,81 -
PC P-35:1 +Na	780,5878	0,00	7,132	1,34E-03	19%	1,09E-03	3%	1,23 +
PC P-37:1 +Na	808,6187	0,41	7,437	2,37E-04	9%	2,13E-04	9%	1,11 -
PC P-37:3 +Na	804,5878	0,00	7,357	3,33E-04	2%	3,11E-04	8%	1,07 -
PE 36:3 +Na	764,5225	3,14	7,665	6,21E-03	14%	5,43E-03	5%	1,14 -

PE 38:4 +Na	790,5357	0,00	7,58	2,39E-03	7%	2,78E-03	10%	0,86 -
PE 38:5 +H	766,5367	1,90	7,639	3,70E-03	8%	4,26E-03	11%	0,87 -
PE 38:6 +Na	786,5032	1,54	7,665	4,39E-04	29%	6,84E-04	19%	0,64 -
PE 40:6 +Na	814,5357	0,00	7,576	1,12E-03	17%	1,91E-03	24%	0,59 -
PE 41:2 +H	814,6320	0,00	6,901	1,94E-03	19%	2,32E-03	23%	0,84 -
PE 41:3 +Na	834,5986	0,33	6,742	1,10E-02	31%	1,19E-02	16%	0,92 -
PE 44:10 +H	840,5538	0,00	7,447	3,86E-04	24%	4,93E-04	14%	0,78 -
PE O-35:0 +H	720,5893	1,16	7,086	1,57E-03	9%	1,23E-03	5%	1,28 -
PE O-36:4 +Na	748,5271	2,56	7,509	5,24E-03	10%	5,43E-03	14%	0,97 -
PE P-40:7 +H	774,5421	1,43	7,456	3,49E-03	9%	4,07E-03	8%	0,86 -
PG 34:3 +NH4	762,5269	1,38	8,213	9,27E-04	5%	4,63E-04	13%	2,00 -
PG 36:3 +NH4	790,5593	0,00	8,182	7,54E-03	43%	5,46E-03	14%	1,38 -
PG 36:4 +NH4	788,5428	1,09	8,137	3,80E-03	16%	2,06E-03	12%	1,84 -
PG 38:3 +NH4	818,5895	1,31	8,088	6,77E-04	66%	4,32E-04	23%	1,57 -
PG 40:7 +NH4	838,5593	0,00	6,996	3,11E-03	20%	2,52E-03	19%	1,23 -
PG 40:8 +NH4	836,5436	0,00	7,985	1,99E-02	17%	1,32E-02	21%	1,51 -
PG 42:7 +NH4	866,5915	1,03	6,914	9,59E-04	14%	8,03E-04	15%	1,19 -
PS 34:1 +H	762,5280	0,00	8,213	9,36E-04	6%	5,19E-04	11%	1,80 -
PS 34:1 +Na	784,5090	1,10	8,222	3,86E-04	22%	1,89E-04	12%	2,04 -
PS 36:1 +Na	812,5412	0,00	8,137	3,83E-03	29%	2,94E-03	7%	1,31 -
PS 36:2 +Na	810,5251	0,55	8,137	9,21E-04	11%	7,62E-04	36%	1,21 -
PS 38:3 +Na	836,5429	2,01	7,983	1,71E-02	13%	1,17E-02	24%	1,46 -
PS 40:6 +Na	858,5243	1,51	7,984	4,27E-03	15%	3,67E-03	6%	1,16 -
PS 42:5 +H	866,5906	0,00	6,915	9,46E-04	14%	8,04E-04	15%	1,18 -
PS 42:5 +Na	888,5725	0,00	6,789	4,64E-04	32%	3,06E-04	27%	1,51 -
PS 44:10 +H	884,5422	1,57	7,886	6,09E-04	14%	3,72E-04	13%	1,64 -
SHexCer 34:0;O3 +H	798,5391	0,63	7,433	1,14E-03	14%	1,62E-03	25%	0,70 -
SHexCer 34:0;O4 +H	814,5344	0,14	7,576	1,12E-03	17%	1,92E-03	23%	0,59 -
SHexCer 36:1;O4 +H	840,5515	1,59	7,447	3,83E-04	23%	4,87E-04	15%	0,79 -
SHexCer 42:2;O2 +H	890,6368	1,95	1,57	2,23E-04	41%	2,70E-04	21%	0,83 -
SM 34:1;O2 +Na	725,5562	0,81	8,423	3,97E-04	16%	2,92E-04	25%	1,36 -
SM 36:1;O2 +H	731,6054	1,00	8,327	8,81E-02	21%	6,36E-02	20%	1,39 -
SM 36:1;O2 +Na	753,5870	1,49	8,343	7,08E-03	23%	7,15E-03	21%	0,99 -

SM 36:2;O2 +Na	751,5713	1,48	8,365	4,50E-04	12%	4,37E-04	25%	1,03 -
SM 37:1;O2 +H	745,6204	1,94	8,298	3,01E-04	28%	2,25E-04	21%	1,34 -
SM 38:1;O2 +Na	781,6180	1,80	8,296	3,53E-04	18%	5,19E-04	25%	0,68 -
SM 40:0; O2+Na	811,6664	0,00	8,142	6,29E-04	20%	4,80E-04	11%	1,31 -
SM 42:2;O2 +Na	835,6647	1,97	8,186	4,15E-04	44%	7,74E-04	15%	0,54 -
SPB 18:0;O2 +H	302,3050	1,20	10,476	9,93E-04	50%	5,00E-04	4%	1,99 +
SPB 18:1;O2 +H	300,2893	1,22	9,015	1,86E-03	35%	1,27E-03	2%	1,47 +
SPB 20:0;O2 +H	330,3361	1,66	10,203	1,13E-03	57%	5,99E-04	2%	1,88 +
SPB 20:1;O2 +H	328,3205	1,44	8,758	4,22E-04	23%	2,96E-04	10%	1,43 -
SPB 22:0;O2 +H	358,3680	0,01	10,01	1,20E-03	62%	6,68E-04	3%	1,80 +

Legend to the Table SA2:

Hallmarks



ratio two times higher for feature sampled with use of C18 than HLB fibers
 ratio two times lower for feature sampled with use of C18 than HLB fibers
 peak area between C18 and HLB fibers statistically significantly different ($p < 0.05$)
 standard deviation of peak area between C18 and HLB fibers statistically significantly different
 ($p < 0.05$) - The F test significant
 standard deviation of peak area between C18 and HLB fibers is not statistically significantly
 different ($p < 0.05$) - The F test insignificant

Abbreviations

C18 Octadecyl
 CV Coefficient of variation
 HLB Hydrophilic-lipophylic balanced

Lipids

Cer Ceramides
 CerP Ceramide phosphates
 DG Diglycerides
 HexCer Hexoyl ceramides
 LPC LySPBphosphatidylcholines
 LPE LySPBphosphatidyletanolamines
 MG Monoglycerides

PC Phosphatidylcholines
 PE Phosphatidyletanolamines
 PG Phosphatidylglycerols
 PS Phosphatidylserines
 SHexCer Sulfatides
 SM Sphingomyelins
 SPB Sphingosines

Table SB2. Feaures sampled with use of SPME fibers and analysed by RPLC-HRMS

Putative LipidIon	Observed m/z	Delta(pp m)	Retention time	average normalized area - C18	CV - C18	average normalized area - HLB	CV - HLB	ratio of average normalized area - C18:HLB	The F-te5HexCe r
CE 11:0 +NH4	572,5396	0,86	13,166	2,04E-03	22%	1,11E-03	5%	1,84	+
CE 13:0 +NH4	600,5709	0,79	13,634	6,54E-04	3%	3,93E-04	6%	1,66	-
CE 15:0 +NH4	628,6027	0,01	14,057	4,39E-04	4%	2,86E-04	5%	1,54	-
CE 16:1 +NH4	640,6024	0,48	14,721	2,82E-03	33%	1,53E-03	2%	1,83	+
CE 17:0 +NH4	656,6344	0,59	15,147	3,01E-04	69%	9,87E-05	10%	3,04	+
CE 18:0 +NH4	670,6507	1,63	15,309	2,17E-04	65%	9,34E-05	4%	2,32	+
CE 18:1 +NH4	668,6336	0,60	15,037	2,50E-03	55%	1,14E-03	6%	2,19	+
CE 18:2 +NH4	666,6179	0,68	14,808	1,75E-03	55%	8,43E-04	6%	2,08	+
CE 20:1 +NH4	696,6654	0,11	15,348	2,84E-04	29%	1,56E-04	8%	1,82	+
CE 20:2 +NH4	694,6490	0,95	15,104	3,10E-04	33%	1,58E-04	3%	1,96	+
Cer 25:0;O3 +NH4	447,4169	2,72	12,562	9,85E-04	37%	1,56E-03	18%	0,63	-
Cer 25:1;O3 +NH4	445,4000	0,01	12,089	4,08E-04	11%	3,00E-04	9%	1,36	-
Cer 27:0;O3 +NH4	475,4469	0,01	13,105	6,48E-04	16%	1,01E-03	22%	0,64	-
Cer 27:1;O3 +NH4	473,4325	2,64	12,688	2,73E-03	13%	2,18E-03	3%	1,25	-
Cer 28:0;O5 +H	504,4255	0,67	8,796	3,60E-03	34%	2,79E-03	11%	1,29	-
Cer 28:1;O3 +NH4	487,4482	2,51	12,966	1,78E-03	41%	1,76E-03	2%	1,01	+
Cer 29:0;O3 +NH4	503,4794	2,39	13,57	1,13E-03	27%	1,41E-03	18%	0,80	-
Cer 29:0;O5 +H	518,4414	0,26	9,225	1,10E-02	17%	8,27E-03	21%	1,33	-
Cer 29:1;O3 +NH4	501,4639	2,61	13,219	6,13E-03	9%	4,41E-03	3%	1,39	-
Cer 30:2;O3 +NH4	513,4639	2,53	13,061	9,66E-04	12%	7,06E-04	2%	1,37	+
Cer 30:4;O2 +H	476,4096	0,45	8,112	3,93E-04	157%	2,62E-05	21%	15,02	+
Cer 31:0;O3 +NH4	531,5108	2,36	14,007	9,37E-04	131%	1,29E-03	9%	0,73	+
Cer 31:1;O3 +NH4	529,4952	2,44	13,664	7,69E-03	12%	5,59E-03	4%	1,38	-

Cer 31:1;O4 +H	528,4623	0,00	9,552	2,98E-04	44%	1,43E-04	5%	2,09	+
Cer 31:2;O3 +NH4	527,4794	2,22	13,302	6,14E-03	6%	4,35E-03	1%	1,41	+
Cer 31:4;O3 +NH4	523,4481	2,23	12,527	5,18E-04	7%	3,67E-04	3%	1,41	-
Cer 32:1;O3 +NH4	543,5107	2,19	13,822	4,43E-03	15%	3,34E-03	12%	1,33	-
Cer 32:2;O3 +NH4	541,4952	2,34	13,51	3,86E-03	10%	2,49E-03	11%	1,55	-
Cer 32:3;O3 +NH4	539,4796	2,45	13,172	6,13E-04	15%	4,10E-04	4%	1,50	-
Cer 32:5;O3 +NH4	535,4484	2,82	12,398	8,81E-04	16%	5,92E-04	15%	1,49	-
Cer 33:1;O3 +NH4	557,5262	1,85	14,095	6,39E-03	26%	3,71E-03	12%	1,72	-
Cer 33:1;O4 +H	556,4936	0,00	10,416	1,29E-03	39%	6,88E-04	6%	1,87	+
Cer 33:2;O3 +NH4	555,5107	2,01	13,746	1,63E-02	13%	1,05E-02	4%	1,55	-
Cer 33:2;O4 +H	554,4789	1,73	9,857	2,53E-04	43%	1,46E-04	7%	1,73	+
Cer 34:0;O3 +NH4	573,5574	1,62	14,526	3,11E-04	63%	5,55E-04	46%	0,56	-
Cer 34:0;O4 +H	572,5245	0,57	11,257	1,92E-03	38%	3,42E-03	18%	0,56	-
Cer 34:1;O3 +Na	576,4958	0,68	9,705	3,67E-04	140%	8,85E-05	9%	4,14	+
Cer 34:1;O3 +NH4	571,5420	2,12	14,22	2,94E-03	27%	1,98E-03	11%	1,49	-
Cer 34:1;O4 +Na	592,4905	1,02	8,295	1,70E-04	122%	6,70E-05	16%	2,54	+
Cer 34:2;O3 +NH4	569,5263	1,92	13,913	2,94E-04	52%	1,55E-04	3%	1,89	+
Cer 34:3;O3 +NH4	567,5107	2,06	13,606	1,11E-03	14%	7,13E-04	4%	1,55	-
Cer 34:6;O2 +NH4	545,4693	2,99	13,667	3,57E-04	37%	2,18E-04	28%	1,64	-
Cer 35:0;O4 +H	586,5405	0,00	11,625	3,97E-03	27%	4,98E-03	17%	0,80	-
Cer 35:1;O3 +NH4	585,5575	1,77	14,463	2,67E-03	30%	1,82E-03	3%	1,47	+
Cer 35:1;O4 +H	584,5245	0,52	11,176	3,98E-03	35%	2,38E-03	9%	1,67	+
Cer 35:2;O3 +NH4	583,5418	1,71	14,124	7,11E-03	26%	4,81E-03	1%	1,48	+
Cer 35:3;O5 +NH4	613,5138	2,03	6,301	2,18E-04	17%	6,90E-04	14%	0,32	-
Cer 35:4;O3 +NH4	579,5108	2,17	13,544	1,62E-03	27%	6,77E-04	7%	2,39	+
Cer 35:5;O3 +NH4	577,4952	2,31	13,163	1,97E-03	26%	1,08E-03	1%	1,82	+
Cer 36:0;O3 +NH4	601,5890	2,02	14,861	3,32E-04	40%	5,22E-04	44%	0,64	-
Cer 36:1;O3 +NH4	599,5730	1,41	14,58	1,77E-03	11%	1,15E-03	2%	1,54	+
Cer 36:1;O4 +H	598,5401	0,74	11,476	1,90E-03	36%	1,16E-03	4%	1,65	+
Cer 36:2;O2 +H	564,5347	0,66	10,385	1,49E-03	60%	7,58E-04	46%	1,96	-
Cer 36:2;O2 +Na	586,5165	0,85	10,414	2,54E-03	55%	1,54E-03	28%	1,65	-
Cer 36:2;O3 +NH4	597,5577	2,04	14,287	1,77E-03	26%	1,18E-03	7%	1,51	-

Cer 36:2;04 +H	596,5245	0,63	11,069	6,18E-04	44%	3,96E-04	7%	1,56	+
Cer 36:3;03 +NH4	595,5418	1,62	14,006	8,21E-04	22%	5,09E-04	4%	1,61	+
Cer 36:4;03 +NH4	593,5263	1,87	13,747	3,37E-04	15%	2,12E-04	9%	1,59	-
Cer 36:7;02 +NH4	571,4842	1,49	13,744	6,33E-04	22%	4,74E-04	7%	1,34	-
Cer 37:0;04 +H	614,5712	1,00	12,2	4,47E-03	20%	4,65E-03	6%	0,96	-
Cer 37:1;03 +NH4	613,5887	1,52	14,789	1,71E-03	13%	1,38E-03	4%	1,24	-
Cer 37:1;04 +H	612,5557	0,70	11,764	4,72E-03	15%	3,14E-03	4%	1,51	-
Cer 37:2;03 +NH4	611,5729	1,24	14,502	2,96E-03	24%	2,02E-03	6%	1,47	+
Cer 37:2;04 +H	610,5400	0,83	11,36	2,02E-03	37%	1,00E-03	16%	2,02	-
Cer 37:3;03 +NH4	609,5574	1,46	14,219	1,62E-03	29%	1,01E-03	5%	1,60	+
Cer 37:4;03 +NH4	607,5419	1,77	13,963	1,01E-03	16%	6,62E-04	4%	1,53	+
Cer 37:5;03 +NH4	605,5263	1,77	13,629	4,81E-04	13%	2,98E-04	5%	1,61	-
Cer 37:6;03 +NH4	603,5107	1,87	13,327	2,32E-04	6%	1,44E-04	7%	1,61	-
Cer 38:1;02 +H	594,5813	1,15	11,62	5,53E-04	63%	3,35E-04	36%	1,65	-
Cer 38:1;03 +NH4	627,6042	1,15	14,919	9,10E-04	21%	7,05E-04	2%	1,29	+
Cer 38:1;04 +H	626,5721	0,43	12,089	8,32E-04	31%	5,81E-04	5%	1,43	+
Cer 38:2;03 +NH4	625,5886	1,33	14,641	9,08E-04	20%	5,94E-04	6%	1,53	-
Cer 38:6;03 +NH4	617,5262	1,64	14,368	5,25E-04	40%	3,35E-04	1%	1,57	+
Cer 39:1;03 +NH4	641,6204	2,07	15,078	5,62E-04	29%	4,19E-04	8%	1,34	-
Cer 39:1;04 +H	640,5869	0,92	12,309	2,18E-03	26%	1,89E-03	15%	1,15	-
Cer 39:1;04 +Na	662,5714	2,95	11,95	1,59E-03	38%	1,17E-03	30%	1,36	-
Cer 39:2;03 +NH4	639,6045	1,72	14,802	8,50E-04	13%	7,00E-04	7%	1,21	-
Cer 39:4;03 +NH4	635,5728	1,10	14,305	3,71E-04	24%	2,50E-04	11%	1,48	-
Cer 39:6;03 +NH4	631,5418	1,57	14,541	4,20E-04	33%	2,67E-04	5%	1,57	+
Cer 40:0;03 +H	624,6285	0,62	12,381	1,84E-04	78%	1,28E-04	17%	1,44	+
Cer 40:5;03 +NH4	647,5731	1,53	14,99	2,37E-03	136%	3,98E-04	7%	5,95	+
Cer 41:0;04 +H	670,6344	0,00	13,163	3,47E-04	27%	4,80E-04	16%	0,72	-
Cer 41:0;04 +Na	692,6161	0,32	11,875	8,80E-05	58%	5,65E-05	18%	1,56	-
Cer 41:1;02 +Na	658,6109	0,01	13,881	5,57E-05	27%	9,52E-04	50%	0,06	+
Cer 41:1;04 +Na	690,5999	1,09	11,212	8,34E-05	70%	4,69E-05	16%	1,78	+
Cer 41:1;04 +Na	690,6007	0,01	6,546	2,63E-04	11%	1,47E-04	19%	1,79	-
Cer 41:2;03 +NH4	667,6360	1,84	15,096	3,46E-04	26%	1,90E-04	6%	1,82	+
Cer 41:6+hD +NH4	659,5732	1,65	14,875	6,17E-04	44%	3,20E-04	1%	1,93	+

Cer 42:0;02 +H	652,6597	0,80	12,845	2,58E-04	104%	1,21E-04	14%	2,14	+
Cer 42:0;02 +Na	674,6413	1,33	12,845	2,46E-04	102%	1,23E-04	8%	2,00	+
Cer 42:0;03 +H	668,6551	0,01	12,403	2,99E-04	79%	1,84E-04	21%	1,62	-
Cer 42:0;03 +Na	690,6360	1,55	12,403	2,15E-04	86%	1,26E-04	23%	1,71	+
Cer 42:1;02 +H	650,6440	0,82	12,707	6,27E-04	116%	1,52E-04	17%	4,11	+
Cer 42:1;03 +Na	688,6208	0,93	12,44	6,68E-04	146%	1,02E-04	13%	6,56	+
Cer 42:1;04 +H	698,6293	0,01	13,204	2,49E-04	47%	5,45E-04	32%	0,46	-
Cer 42:1;04 +Na	704,6156	1,02	11,531	3,00E-04	98%	1,43E-04	33%	2,10	-
Cer 42:2;02 +H	648,6283	0,94	12,241	6,63E-04	59%	5,30E-04	15%	1,25	-
Cer 42:5;03 +NH4	675,6042	1,17	15,304	3,55E-04	79%	1,28E-04	21%	2,77	+
Cer 42:7;03 +NH4	671,5730	1,29	14,807	7,66E-04	64%	4,24E-04	6%	1,81	+
Cer 43:0;04 +H	698,6657	0,00	13,575	4,85E-04	31%	7,13E-04	12%	0,68	-
Cer 43:0;05 +Na	736,6426	0,00	13,293	5,80E-04	28%	5,97E-04	3%	0,97	+
Cer 43:1;04 +Na	718,6314	0,77	11,835	2,08E-04	74%	9,03E-05	18%	2,30	+
Cer 43:1;05 +H	712,6450	0,01	13,45	8,04E-04	52%	1,66E-03	28%	0,49	-
Cer 43:2;03 +NH4	695,6667	0,92	15,374	1,66E-04	32%	1,02E-04	3%	1,63	+
Cer 43:2;05 +H	710,6293	0,01	13,164	5,74E-04	33%	6,73E-04	5%	0,85	-
Cer 43:4;03 +H	658,6133	0,00	13,913	6,18E-05	28%	8,61E-04	46%	0,07	+
Cer 43:6;03 +NH4	687,6041	0,98	15,191	1,38E-04	34%	7,10E-05	12%	1,94	-
Cer 44:0;03 +Na	718,6675	1,25	12,849	2,37E-04	78%	1,54E-04	30%	1,54	-
Cer 44:0;04 +H	712,6814	0,00	13,737	3,29E-04	30%	4,07E-04	6%	0,81	-
Cer 44:0;04 +Na	734,6623	1,34	12,644	2,23E-04	93%	1,21E-04	25%	1,84	+
Cer 44:1;02 +H	678,6754	0,72	13,141	3,90E-04	138%	8,92E-05	20%	4,37	+
Cer 44:1;02 +Na	700,6574	0,59	13,163	5,14E-04	140%	8,95E-05	17%	5,75	+
Cer 44:1;03 +Na	716,6519	1,22	12,895	5,38E-04	148%	8,23E-05	21%	6,54	+
Cer 44:2;02 +H	676,6598	0,59	12,398	2,08E-04	73%	9,83E-05	47%	2,12	-
Cer 45:0;04 +H	726,6970	0,00	13,936	2,10E-04	35%	2,55E-04	8%	0,82	-
Cer 46:0;02 +H	708,7221	1,06	13,642	1,55E-04	42%	1,12E-04	25%	1,38	-
Cer 46:0;02 +Na	730,7034	1,83	13,652	1,46E-04	61%	9,87E-05	18%	1,48	-
Cer 48:0;03 +Na	774,7299	1,35	13,629	1,47E-04	41%	1,15E-04	30%	1,28	-
Cer 48:1;04 +H	766,7283	0,00	14,49	2,55E-04	14%	1,91E-04	8%	1,34	-
Cer 49:1;04 +H	780,7440	0,00	14,661	3,10E-04	16%	2,16E-04	15%	1,43	-

HexCer 16:0;03 +NH4	483,3289	2,66	6,353	1,34E-03	36%	1,34E-03	24%	1,00	-
HexCer 19:0;02 +NH4	509,3811	2,78	8,766	4,33E-03	24%	3,21E-03	11%	1,35	-
HexCer 29:0;03 +NH4	665,5311	0,00	10,782	1,47E-04	53%	1,64E-04	5%	0,90	+
HexCer 30:3;03 +NH4	673,4984	1,96	11,615	1,18E-04	53%	1,69E-04	23%	0,70	-
HexCer 32:0;05 +NH4	739,5685	0,93	10,425	1,20E-03	51%	1,06E-03	15%	1,14	-
HexCer 32:2;02 +NH4	687,5534	2,35	12,8	2,26E-04	59%	4,99E-04	22%	0,45	-
HexCer 32:2;04 +NH4	719,5416	0,01	10,358	1,82E-03	57%	1,75E-03	56%	1,04	-
HexCer 32:3;03 +H	684,5039	0,89	11,941	1,14E-04	40%	1,04E-04	21%	1,09	-
HexCer 32:3;03 +NH4	701,5291	2,73	12,223	1,91E-04	12%	2,01E-04	6%	0,95	-
HexCer 33:0;03 +NH4	721,5938	0,21	12,178	5,01E-04	9%	5,44E-04	21%	0,92	-
HexCer 34:0;05 +NH4	767,5999	0,96	11,109	2,74E-03	37%	2,48E-03	14%	1,11	-
HexCer 34:1;04 +NH4	749,5889	0,40	12,416	6,23E-04	29%	7,35E-04	43%	0,85	-
HexCer 34:3;04 +NH4	745,5594	2,87	10,028	1,10E-03	72%	5,20E-04	51%	2,12	-
HexCer 35:1;02 +NH4	731,6160	2,21	13,593	6,21E-04	25%	1,01E-03	23%	0,61	-
HexCer 36:0;05 +NH4	795,6311	0,79	11,714	1,67E-03	34%	1,58E-03	15%	1,06	-
HexCer 36:1;03 +Na	766,5804	0,01	9,929	9,10E-04	36%	1,19E-03	9%	0,76	-
HexCer 36:2;02 +NH4	743,6144	0,01	13,557	1,22E-03	20%	1,63E-03	6%	0,75	-
HexCer 36:2;04 +NH4	775,6042	0,01	11,669	2,95E-04	45%	4,55E-04	21%	0,65	-
HexCer 37:0;02 +H	744,6337	1,49	12,407	8,76E-04	28%	7,10E-04	17%	1,23	-
HexCer 37:0;03 +H	760,6288	1,15	11,261	2,91E-04	48%	2,53E-04	18%	1,15	-
HexCer 37:2;02 +NH4	757,6300	0,01	13,727	2,49E-03	21%	2,56E-03	4%	0,97	-
HexCer 38:1;02 +NH4	773,6618	0,64	14,148	2,51E-03	13%	4,76E-03	20%	0,53	-
HexCer 38:1;03 +H	772,6286	1,49	10,733	7,94E-04	49%	7,26E-04	16%	1,09	-
HexCer 38:1;03 +Na	794,6117	0,01	10,719	1,63E-03	46%	1,70E-03	11%	0,96	-
HexCer 38:3;02 +NH4	769,6317	2,10	13,656	1,91E-03	29%	2,17E-03	5%	0,88	-
HexCer 39:1;02 +NH4	787,6775	0,61	14,287	2,83E-03	15%	5,05E-03	23%	0,56	-
HexCer 39:1;03 +H	786,6445	1,12	11,069	2,22E-04	43%	2,04E-04	28%	1,09	-
HexCer 39:4;02 +NH4	781,6317	2,07	13,606	4,52E-04	23%	4,58E-04	3%	0,99	+
HexCer 40:0;02 +H	786,6805	1,61	11,776	1,34E-04	44%	2,01E-04	19%	0,67	-
HexCer 40:0;03 +Na	824,6566	2,45	11,624	1,04E-03	40%	1,32E-03	15%	0,79	-
HexCer 40:1;02 +H	784,6650	1,39	11,575	9,34E-04	45%	7,77E-04	17%	1,20	-
HexCer 40:1;02 +NH4	801,6927	0,08	14,462	3,08E-03	13%	5,00E-03	40%	0,62	-
HexCer 40:1;03 +H	800,6600	1,21	11,408	8,83E-03	43%	9,08E-03	11%	0,97	-

HexCer 40:1;04 +H	816,6542	2,17	14,236	2,11E-04	17%	2,19E-04	18%	0,96	-
HexCer 40:2;02 +NH4	799,6775	0,61	14,238	8,46E-03	8%	8,22E-03	6%	1,03	-
HexCer 40:2;04 +H	814,6403	0,01	14,034	1,74E-04	19%	1,94E-04	12%	0,90	-
HexCer 41:0;03 +H	816,6912	1,37	11,915	3,69E-04	41%	3,67E-04	13%	1,01	-
HexCer 41:0;03 +Na	838,6724	2,16	11,906	2,48E-04	42%	3,09E-04	12%	0,80	-
HexCer 41:1;02 +NH4	815,7087	0,45	14,594	2,99E-03	12%	4,95E-03	36%	0,61	-
HexCer 41:1;03 +H	814,6757	1,24	11,714	4,78E-03	44%	4,56E-03	14%	1,05	-
HexCer 41:2;02 +NH4	813,6928	0,18	14,399	6,47E-03	15%	6,68E-03	4%	0,97	-
HexCer 41:3;02 +NH4	811,6772	0,25	14,188	5,52E-03	8%	5,06E-03	9%	1,09	-
HexCer 42:0;03 +H	830,7064	1,94	12,183	5,17E-04	50%	6,41E-04	16%	0,81	-
HexCer 42:1;02 +H	812,6964	1,19	12,134	2,39E-03	44%	2,12E-03	31%	1,13	-
HexCer 42:1;02 +Na	834,6778	1,84	12,149	2,20E-03	47%	2,39E-03	15%	0,92	-
HexCer 42:1;03 +H	828,6923	0,00	10,599	2,20E-04	48%	2,32E-04	14%	0,94	-
HexCer 42:1;03 +Na	850,6730	1,48	11,984	7,65E-03	45%	8,36E-03	9%	0,91	-
HexCer 42:1;04 +H	844,6851	2,47	14,546	1,77E-04	13%	1,68E-04	1%	1,05	+
HexCer 42:2;02 +H	810,6818	0,01	10,126	2,75E-04	49%	2,80E-04	9%	0,98	-
HexCer 42:2;02 +NH4	827,7083	0,05	14,538	9,09E-03	8%	8,84E-03	6%	1,03	-
HexCer 42:2;03 +H	826,6753	1,62	11,469	5,26E-03	49%	5,82E-03	8%	0,90	-
HexCer 42:2;03 +Na	848,6572	1,64	11,471	6,73E-03	46%	7,57E-03	3%	0,89	+
HexCer 42:2;04 +H	842,6697	2,22	14,352	1,63E-04	12%	1,88E-04	17%	0,87	-
HexCer 42:3;02 +NH4	825,6931	0,50	14,355	7,25E-03	3%	7,22E-03	6%	1,00	-
HexCer 42:3;03 +H	824,6587	2,84	11,624	1,03E-03	42%	1,25E-03	14%	0,82	-
HexCer 42:3;03 +Na	846,6430	0,01	11,069	2,43E-04	55%	3,27E-04	13%	0,74	-
HexCer 42:4;02 +NH4	823,6775	0,62	14,122	3,20E-03	8%	3,01E-03	3%	1,06	-
HexCer 43:1;02 +NH4	843,7399	0,34	14,875	1,87E-03	20%	3,11E-03	29%	0,60	-
HexCer 43:2;02 +H	824,6969	0,66	11,917	2,13E-04	44%	2,62E-04	13%	0,81	-
HexCer 43:2;02 +Na	846,6782	1,38	11,918	3,70E-04	43%	4,14E-04	12%	0,89	-
HexCer 43:2;02 +NH4	841,7241	0,19	14,668	4,80E-03	11%	4,54E-03	7%	1,06	-
HexCer 43:2;03 +Na	862,6728	1,70	11,765	2,68E-04	48%	3,09E-04	10%	0,87	-
HexCer 43:2;04 +H	856,6872	0,01	14,488	1,05E-04	23%	1,37E-04	24%	0,77	-
HexCer 43:3;02 +NH4	839,7085	0,21	14,489	4,51E-03	11%	4,06E-03	10%	1,11	-
HexCer 43:4;02 +NH4	837,6931	0,50	14,284	1,82E-03	4%	1,75E-03	7%	1,04	-
HexCer 44:1;02 +NH4	857,7554	0,21	15,014	1,66E-03	32%	2,07E-03	20%	0,80	-

HexCer 44:1;O3 +H	856,7222	1,68	12,505	1,40E-04	61%	1,28E-04	14%	1,09	-
HexCer 44:1;O3 +Na	878,7039	1,93	12,508	1,74E-04	59%	1,87E-04	19%	0,93	-
HexCer 44:2;O2 +NH4	855,7398	0,27	14,807	5,01E-03	10%	5,37E-03	17%	0,93	-
HexCer 44:3;O2 +NH4	853,7239	0,10	14,598	4,54E-03	9%	4,79E-03	14%	0,95	-
HexCer 44:4;O3 +H	850,6767	0,00	11,992	7,50E-03	44%	8,24E-03	8%	0,91	-
HexCer 44:6;O3 +H	846,6436	2,11	11,069	2,43E-04	54%	3,28E-04	14%	0,74	-
HexCer 45:1;O2 +NH4	871,7709	0,01	15,109	7,34E-04	30%	1,24E-03	29%	0,59	-
HexCer 45:2;O2 +NH4	869,7555	0,32	14,937	2,19E-03	27%	2,35E-03	11%	0,93	-
HexCer 45:3;O2 +NH4	867,7396	0,03	14,749	2,33E-03	7%	2,43E-03	6%	0,96	-
HexCer 45:4;O2 +NH4	865,7242	0,28	14,56	1,23E-03	0%	1,17E-03	7%	1,05	+
HexCer 46:1;O3 +H	884,7549	0,00	14,134	1,92E-04	15%	8,15E-04	65%	0,24	+
HexCer 47:1;O2 +NH4	899,8019	0,37	15,353	2,94E-04	2%	1,44E-03	74%	0,20	+
HexCer 47:2;O2 +NH4	897,7867	0,22	15,197	1,18E-03	20%	1,18E-03	2%	1,00	+
HexCer 47:3;O2 +NH4	895,7711	0,25	15,009	9,42E-04	20%	9,73E-04	8%	0,97	-
HexCer 49:2;O2 +NH4	925,8177	0,18	15,434	1,35E-03	18%	1,39E-03	4%	0,97	-
HexCer 49:3;O2 +NH4	923,8024	0,22	15,239	6,38E-04	12%	6,46E-04	4%	0,99	-
HexCer 50:0;O2 +H	926,8383	0,00	14,368	2,35E-04	63%	2,69E-04	18%	0,88	-
HexCer 50:4;O2 +NH4	935,8022	0,00	15,192	3,46E-04	14%	3,39E-04	9%	1,02	-
HexCer 52:0;O2 +H	954,8696	0,00	14,663	3,33E-04	26%	2,04E-04	41%	1,63	-
PC 33:4 +Na	762,5032	1,59	9,885	3,63E-04	56%	2,43E-04	24%	1,50	-
PC 35:5 +Na	788,5189	1,49	10,054	5,09E-04	54%	3,89E-04	14%	1,31	-
PC 36:4 +Na	804,5502	1,41	9,76	7,62E-03	63%	4,85E-03	34%	1,57	-
PC 37:6 +Na	814,5357	0,00	10,626	4,01E-03	62%	3,12E-03	21%	1,28	-
PC 38:6 +Na	828,5503	1,34	9,695	5,80E-03	68%	4,62E-03	28%	1,26	-
PC 40:1 +H	844,6790	0,00	12,143	5,37E-04	49%	5,12E-04	16%	1,05	-
PC 40:2 +H	842,6620	1,61	11,683	3,89E-04	46%	3,71E-04	13%	1,05	-
PC 40:4 +Na	860,6140	0,00	11,078	8,02E-04	65%	4,33E-04	37%	1,85	-
PC 40:6 +H	834,6007	0,00	10,501	7,21E-03	64%	5,52E-03	23%	1,31	-
PC 40:6 +Na	856,5809	2,11	10,5	3,40E-03	63%	2,79E-03	26%	1,22	-
PC 42:2 +H	870,6938	0,96	12,215	2,54E-04	49%	2,60E-04	5%	0,98	+
PC 44:12 +Na	900,5500	1,49	9,257	3,24E-04	79%	2,04E-04	32%	1,59	-
PC O-29:0 +Na	742,5349	1,15	9,606	1,99E-04	63%	1,29E-04	23%	1,54	-
PC O-34:2 +Na	766,5721	0,00	10,617	1,23E-04	34%	1,31E-04	11%	0,94	-

PC O-36:1 +H	816,6465	1,51	11,562	2,14E-03	46%	1,85E-03	9%	1,16	-
PC O-36:1 +Na	838,6296	0,00	11,069	2,00E-03	58%	1,22E-03	31%	1,64	-
PC O-38:1 +H	844,6779	1,27	12,143	5,35E-04	47%	5,01E-04	14%	1,07	-
PC P-31:1 +Na	724,5252	0,00	10,783	7,34E-04	36%	6,61E-04	13%	1,11	-
PE 37:1 +Na	782,5670	0,00	9,761	1,55E-02	61%	9,45E-03	35%	1,64	-
PE 38:6 +Na	786,5033	1,39	9,857	1,04E-03	62%	7,14E-04	33%	1,46	-
PE O-23:4 +Na	566,3211	1,07	4,509	1,50E-04	53%	2,94E-05	46%	5,08	-
PE O-36:4 +H	726,5432	0,00	10,412	6,83E-04	54%	4,32E-04	25%	1,58	-
PE P-38:6 +Na	770,5081	1,81	10,252	1,10E-03	58%	8,09E-04	18%	1,36	-
PE P-40:7 +Na	796,5252	0,00	10,416	6,41E-04	59%	4,34E-04	33%	1,48	-
PS 41:6 +Na	872,5412	0,00	9,781	1,63E-04	63%	1,27E-04	28%	1,29	-
SHexCer 32:0;O3 +H	770,5083	0,00	10,26	1,16E-03	59%	7,92E-04	21%	1,47	-
SHexCer 32:0;O3 +Na	792,4901	0,19	10,302	2,79E-04	52%	2,54E-04	4%	1,10	+
SHexCer 32:0;O4 +H	786,5032	0,00	9,857	1,04E-03	61%	7,14E-04	33%	1,46	-
SHexCer 34:0;O3 +H	798,5393	0,30	10,983	3,70E-03	59%	2,62E-03	26%	1,41	-
SHexCer 34:0;O3 +Na	820,5210	0,58	10,992	7,77E-04	50%	6,80E-04	9%	1,14	-
SHexCer 34:0;O4 +H	814,5342	0,41	10,617	4,11E-03	62%	3,10E-03	21%	1,32	-
SHexCer 34:1;O3 +H	796,5235	0,50	10,416	6,42E-04	59%	4,36E-04	32%	1,47	-
SHexCer 34:1;O3 +Na	818,5059	0,00	10,415	2,16E-04	56%	1,64E-04	18%	1,31	-
SHexCer 34:1;O4 +H	812,5169	2,38	10,023	2,69E-04	65%	2,00E-04	26%	1,34	-
SHexCer 34:2;O3 +H	794,5083	0,00	10,466	2,79E-04	42%	2,33E-04	13%	1,20	-
SHexCer 37:0;O4 +H	856,5814	0,00	10,497	3,15E-03	60%	2,79E-03	26%	1,13	-
SHexCer 37:3;O2 +Na	840,5266	0,00	10,273	3,36E-04	38%	3,44E-04	6%	0,98	+
SHexCer 38:5;O3 +H	844,5237	0,23	9,669	2,77E-04	72%	2,19E-04	16%	1,26	-
SHexCer 40:1;O3 +H	880,6166	1,37	9,894	2,38E-04	48%	2,33E-04	15%	1,02	-
SHexCer 42:1;O2 +H	892,6526	1,81	10,702	3,56E-04	54%	3,51E-04	14%	1,02	-
SM 36:1;O2 +Na	753,5870	1,52	9,93	9,94E-03	53%	6,53E-03	29%	1,52	-
SM 36:2;O2 +Na	751,5718	0,85	9,317	1,17E-03	65%	5,89E-04	50%	1,98	-
SM 38:1;O2 +Na	781,6185	1,19	10,702	8,49E-04	61%	6,95E-04	38%	1,22	-
SM 42:1;O2 +H	815,6999	0,23	11,99	6,31E-04	39%	4,88E-04	22%	1,29	-
SPB 16:1;O2 +H	272,2580	1,66	12,706	2,44E-04	3%	1,60E-04	5%	1,52	-
SPB 17:0;O3 +H	304,2841	1,56	7,501	5,77E-04	47%	7,75E-04	14%	0,74	-
SPB 18:1;O2 +Na	322,2713	0,96	4,878	5,38E-04	58%	2,51E-04	22%	2,14	-

SPB 22:0;O2 +Na	380,3494	1,25	6,671	3,61E-04	21%	2,06E-04	13%	1,76	-
SPB 24:0;O2 +H	386,3988	1,17	7,677	7,46E-04	27%	3,57E-04	19%	2,09	-
SPB 24:0;O2 +Na	408,3807	1,21	7,675	1,23E-03	18%	6,64E-04	15%	1,86	-
SPB 25:0;O2 +Na	422,3965	0,92	8,183	6,54E-04	17%	3,11E-04	25%	2,11	-
TG 36:1 +Na	659,5209	1,91	12,264	1,51E-04	57%	3,97E-04	56%	0,38	-
TG 36:1 +NH4	654,5668	0,20	12,288	3,15E-04	54%	4,82E-04	11%	0,65	-
TG 38:1 +Na	687,5522	1,80	12,8	2,80E-04	47%	4,71E-04	32%	0,60	-
TG 38:1 +NH4	682,5976	0,60	12,782	4,12E-04	60%	5,98E-04	1%	0,69	+
TG 39:0 +Na	703,5847	0,00	13,21	1,09E-04	64%	3,62E-04	34%	0,30	-
TG 39:1 +Na	701,5691	0,00	12,943	1,34E-04	27%	4,13E-04	56%	0,33	+
TG 39:1 +NH4	696,6137	0,01	12,966	1,80E-04	41%	2,54E-04	11%	0,71	-
TG 40:0 +Na	717,5996	1,03	13,45	2,92E-04	48%	1,08E-03	30%	0,27	-
TG 40:0 +NH4	712,6443	0,96	13,45	6,95E-04	53%	1,65E-03	28%	0,42	-
TG 40:1 +Na	715,5838	1,29	13,199	4,22E-04	35%	8,32E-04	36%	0,51	-
TG 40:2 +Na	713,5680	1,44	12,892	1,25E-04	40%	1,70E-04	7%	0,73	-
TG 40:2 +NH4	708,6137	0,01	12,891	1,92E-04	39%	2,11E-04	6%	0,91	-
TG 41:0 +Na	731,6155	0,65	13,604	5,84E-04	26%	1,02E-03	22%	0,57	-
TG 41:0 +NH4	726,6598	1,13	13,585	1,05E-03	34%	1,57E-03	18%	0,67	-
TG 41:1 +Na	729,5993	1,47	13,316	4,84E-04	30%	6,11E-04	17%	0,79	-
TG 41:1 +NH4	724,6443	0,86	13,357	7,32E-04	37%	7,30E-04	1%	1,00	+
TG 42:0 +Na	745,6306	1,46	13,811	1,23E-03	39%	1,90E-03	8%	0,65	-
TG 42:0 +NH4	740,6754	1,15	13,812	2,62E-03	46%	3,56E-03	31%	0,74	-
TG 42:1 +Na	743,6151	1,22	13,565	1,20E-03	15%	1,51E-03	9%	0,79	-
TG 42:1 +NH4	738,6596	1,33	13,554	2,06E-03	33%	2,02E-03	11%	1,02	-
TG 42:2 +Na	741,5985	2,51	13,302	4,42E-04	31%	4,69E-04	5%	0,94	-
TG 42:2 +NH4	736,6432	2,40	13,308	5,80E-04	28%	5,41E-04	11%	1,07	-
TG 43:0 +Na	759,6461	1,57	13,968	2,04E-03	21%	2,91E-03	16%	0,70	-
TG 43:0 +NH4	754,6908	1,45	13,978	4,35E-03	37%	5,97E-03	17%	0,73	-
TG 43:1 +Na	757,6307	1,28	13,748	2,29E-03	25%	2,55E-03	3%	0,90	+
TG 43:1 +NH4	752,6752	1,46	13,715	4,18E-03	33%	4,04E-03	5%	1,03	+
TG 43:2 +Na	755,6149	1,45	13,494	7,43E-04	25%	7,29E-04	2%	1,02	+
TG 43:2 +NH4	750,6596	1,29	13,483	1,07E-03	32%	9,73E-04	3%	1,10	+

TG 44:0 +Na	773,6630	0,00	14,138	2,50E-03	19%	4,57E-03	34%	0,55	-
TG 44:0 +NH4	768,7066	1,29	14,134	7,81E-03	9%	1,22E-02	18%	0,64	-
TG 44:1 +Na	771,6460	1,75	13,911	3,60E-03	31%	3,18E-03	14%	1,13	-
TG 44:1 +NH4	766,6909	1,36	13,911	7,80E-03	44%	6,33E-03	14%	1,23	-
TG 44:2 +Na	769,6307	1,31	13,652	2,19E-03	20%	1,96E-03	6%	1,12	-
TG 44:2 +NH4	764,6752	1,40	13,683	3,43E-03	35%	3,18E-03	14%	1,08	-
TG 44:3 +Na	767,6160	0,00	13,403	3,28E-04	28%	3,39E-04	5%	0,97	-
TG 44:3 +NH4	762,6599	0,88	13,417	4,74E-04	33%	4,31E-04	2%	1,10	+
TG 45:0 +Na	787,6786	0,00	14,287	2,73E-03	21%	4,96E-03	24%	0,55	-
TG 45:0 +NH4	782,7224	1,08	14,287	9,17E-03	23%	1,48E-02	15%	0,62	-
TG 45:1 +Na	785,6617	1,59	14,094	5,37E-03	12%	5,62E-03	6%	0,96	-
TG 45:1 +NH4	780,7065	1,32	14,095	1,34E-02	31%	1,31E-02	5%	1,02	-
TG 45:2 +Na	783,6455	2,25	13,862	2,78E-03	23%	2,91E-03	4%	0,95	-
TG 45:2 +NH4	778,6901	2,33	13,86	4,63E-03	34%	4,34E-03	6%	1,07	-
TG 45:3 +Na	781,6306	1,40	13,606	4,51E-04	24%	4,56E-04	3%	0,99	+
TG 45:3 +NH4	776,6753	1,29	13,602	6,78E-04	22%	6,36E-04	2%	1,07	+
TG 46:0 +Na	801,6943	0,00	14,463	2,40E-03	20%	5,19E-03	45%	0,46	-
TG 46:0 +NH4	796,7375	1,72	14,462	9,37E-03	35%	1,90E-02	31%	0,49	-
TG 46:1 +Na	799,6786	0,00	14,246	7,29E-03	23%	7,87E-03	2%	0,93	+
TG 46:1 +NH4	794,7220	1,50	14,238	2,17E-02	25%	2,18E-02	5%	1,00	-
TG 46:2 +Na	797,6614	1,96	14,029	5,09E-03	18%	5,62E-03	1%	0,91	+
TG 46:2 +NH4	792,7062	1,72	14,029	1,15E-02	34%	1,11E-02	10%	1,04	-
TG 46:3 +Na	795,6459	1,77	13,796	1,38E-03	22%	1,46E-03	5%	0,95	-
TG 46:3 +NH4	790,6909	1,31	13,796	2,28E-03	39%	2,22E-03	5%	1,02	+
TG 47:0 +Na	815,7099	0,00	14,594	2,35E-03	20%	5,05E-03	37%	0,46	-
TG 47:0 +NH4	810,7533	1,53	14,592	9,92E-03	35%	1,73E-02	27%	0,57	-
TG 47:1 +Na	813,6943	0,00	14,395	5,71E-03	16%	6,76E-03	13%	0,84	-
TG 47:1 +NH4	808,7377	1,48	14,409	2,15E-02	26%	2,08E-02	5%	1,03	-
TG 47:2 +Na	811,6786	0,00	14,185	4,84E-03	7%	5,32E-03	6%	0,91	-
TG 47:2 +NH4	806,7219	1,62	14,185	1,24E-02	24%	1,20E-02	4%	1,03	+
TG 47:3 +Na	809,6615	1,81	13,972	1,41E-03	18%	1,46E-03	4%	0,97	-
TG 47:3 +NH4	804,7064	1,46	13,978	2,61E-03	36%	2,50E-03	7%	1,04	-
TG 48:0 +Na	829,7256	0,00	14,756	1,87E-03	33%	3,20E-03	26%	0,59	-

TG 48:0 +NH4	824,7688	1,68	14,753	9,32E-03	32%	2,02E-02	13%	0,46	-
TG 48:1 +Na	827,7099	0,00	14,54	7,27E-03	19%	8,59E-03	7%	0,85	-
TG 48:1 +NH4	822,7533	1,43	14,539	2,43E-02	14%	2,71E-02	6%	0,89	-
TG 48:1e +NH4	808,7741	1,47	14,964	3,87E-04	14%	2,96E-04	5%	1,31	-
TG 48:2 +Na	825,6943	0,00	14,355	6,40E-03	6%	6,82E-03	10%	0,94	-
TG 48:2 +NH4	820,7378	1,35	14,355	1,90E-02	24%	1,82E-02	8%	1,04	-
TG 48:3 +Na	823,6786	0,00	14,122	2,82E-03	12%	3,00E-03	3%	0,94	-
TG 48:3 +NH4	818,7221	1,33	14,123	6,30E-03	28%	6,05E-03	3%	1,04	+
TG 48:4 +Na	821,6630	0,00	13,915	4,11E-04	15%	4,08E-04	6%	1,01	-
TG 48:4 +NH4	816,7064	1,40	13,912	6,82E-04	31%	6,19E-04	5%	1,10	+
TG 49:0 +Na	843,7412	0,00	14,874	1,59E-03	27%	2,78E-03	23%	0,57	-
TG 49:0 +NH4	838,7846	1,41	14,861	5,19E-03	35%	9,76E-03	31%	0,53	-
TG 49:1 +Na	841,7256	0,00	14,667	4,10E-03	9%	4,74E-03	18%	0,86	-
TG 49:1 +NH4	836,7688	1,68	14,677	1,39E-02	28%	1,46E-02	12%	0,95	-
TG 49:2 +Na	839,7099	0,00	14,481	3,79E-03	17%	4,60E-03	7%	0,82	-
TG 49:2 +NH4	834,7528	2,08	14,464	1,29E-02	26%	1,25E-02	6%	1,03	-
TG 49:3 +Na	837,6943	0,00	14,285	1,55E-03	2%	1,75E-03	8%	0,89	-
TG 49:3 +NH4	832,7375	1,69	14,286	4,17E-03	30%	4,15E-03	3%	1,01	+
TG 49:7 +H	807,6498	0,04	11,562	7,19E-04	53%	7,11E-04	12%	1,01	-
TG 50:0 +Na	857,7569	0,00	15,014	1,29E-03	31%	2,19E-03	19%	0,59	-
TG 50:0 +NH4	852,8003	1,32	15,009	3,64E-03	19%	4,63E-03	17%	0,79	-
TG 50:1 +Na	855,7412	0,00	14,811	3,75E-03	37%	6,02E-03	5%	0,62	-
TG 50:1 +NH4	850,7847	1,34	14,807	1,26E-02	24%	1,13E-02	6%	1,12	-
TG 50:2 +Na	853,7256	0,00	14,639	3,87E-03	12%	4,89E-03	12%	0,79	-
TG 50:2 +NH4	848,7687	1,68	14,638	1,58E-02	26%	1,57E-02	14%	1,01	-
TG 50:3 +Na	851,7099	0,00	14,418	2,51E-03	3%	2,89E-03	5%	0,87	-
TG 50:3 +NH4	846,7527	2,19	14,427	7,43E-03	32%	7,16E-03	5%	1,04	+
TG 50:4 +Na	849,6926	1,91	14,242	7,43E-04	25%	7,14E-04	5%	1,04	-
TG 50:4 +NH4	844,7375	1,67	14,238	1,82E-03	23%	1,63E-03	4%	1,12	-
TG 51:0 +Na	871,7725	0,00	15,109	7,18E-04	20%	1,19E-03	26%	0,60	-
TG 51:0 +NH4	866,8156	1,70	15,11	1,72E-03	21%	2,43E-03	25%	0,71	-
TG 51:1 +Na	869,7569	0,00	14,919	1,93E-03	10%	2,31E-03	9%	0,84	-
TG 51:1 +NH4	864,8004	1,25	14,919	4,86E-03	21%	4,65E-03	7%	1,05	-

TG 51:2 +Na	867,7412	0,00	14,748	1,95E-03	18%	2,42E-03	3%	0,81	-
TG 51:2 +NH4	862,7843	1,76	14,754	6,82E-03	31%	6,80E-03	14%	1,00	-
TG 51:3 +Na	865,7256	0,00	14,541	1,05E-03	5%	1,15E-03	6%	0,91	-
TG 51:3 +NH4	860,7685	1,92	14,538	3,42E-03	29%	3,08E-03	10%	1,11	-
TG 52:1 +Na	883,7725	0,00	15,086	5,12E-04	125%	1,93E-03	8%	0,27	-
TG 52:1 +NH4	878,8155	1,83	15,072	2,64E-03	56%	3,95E-03	4%	0,67	+
TG 52:11 +H	841,6362	2,51	10,719	7,94E-04	31%	7,01E-04	29%	1,13	-
TG 52:2 +Na	881,7569	0,00	14,87	9,28E-04	94%	1,75E-03	19%	0,53	-
TG 52:2 +NH4	876,8001	1,58	14,861	4,70E-03	45%	5,93E-03	21%	0,79	-
TG 52:3 +Na	879,7412	0,00	14,68	1,27E-03	3%	1,75E-03	9%	0,73	-
TG 52:3 +NH4	874,7841	1,94	14,701	4,79E-03	21%	4,97E-03	8%	0,96	-
TG 53:0 +Na	899,8022	1,80	15,357	7,48E-04	21%	1,06E-03	7%	0,70	-
TG 53:0 +NH4	894,8466	2,06	15,358	1,41E-03	27%	2,23E-03	12%	0,63	-
TG 53:1 +Na	897,7882	0,00	15,199	1,13E-03	28%	1,22E-03	9%	0,93	-
TG 53:1 +NH4	892,8311	1,89	15,19	1,96E-03	28%	2,10E-03	12%	0,93	-
TG 53:2 +Na	895,7725	0,00	14,996	8,91E-04	21%	1,01E-03	3%	0,88	+
TG 53:2 +NH4	890,8157	1,62	15	2,07E-03	25%	1,83E-03	10%	1,13	-
TG 53:3 +Na	893,7569	0,00	14,811	5,70E-04	2%	5,67E-04	6%	1,01	-
TG 53:3 +NH4	888,7999	1,80	14,807	1,45E-03	12%	1,33E-03	16%	1,09	-
TG 53:4 +Na	891,7412	0,00	14,652	2,34E-04	12%	2,44E-04	16%	0,96	-
TG 53:4 +NH4	886,7842	1,82	14,679	6,66E-04	18%	6,53E-04	11%	1,02	-
TG 55:1 +Na	925,8195	0,00	15,44	1,35E-03	18%	1,37E-03	3%	0,99	-
TG 55:1 +NH4	920,8624	1,85	15,442	2,21E-03	30%	2,34E-03	4%	0,94	+
TG 55:2 +Na	923,8022	1,76	15,238	6,37E-04	13%	6,21E-04	4%	1,02	-
TG 55:2 +NH4	918,8468	1,79	15,251	1,18E-03	26%	1,11E-03	8%	1,06	-
TG 55:3 +Na	921,7882	0,00	15,101	2,56E-04	9%	2,58E-04	8%	0,99	-
TG 55:3 +NH4	916,8310	1,93	15,037	5,27E-04	20%	4,57E-04	4%	1,15	-
TG 56:2 +Na	937,8195	0,00	15,386	9,16E-04	11%	9,45E-04	3%	0,97	-
TG 56:2 +NH4	932,8622	1,95	15,397	1,57E-03	17%	1,41E-03	6%	1,11	-
TG 56:3 +Na	935,8038	0,00	15,189	3,28E-04	17%	3,06E-04	30%	1,07	-
TG 56:3 +NH4	930,8468	1,78	15,191	5,44E-04	48%	5,31E-04	5%	1,03	+
TG 56:4 +NH4	928,8312	1,73	15,014	4,44E-04	23%	3,43E-04	7%	1,30	-
TG O-31:0 +Na	577,4797	0,87	11,289	2,25E-03	45%	4,60E-03	26%	0,49	-

TG O-31:0 +NH4	572,5249	0,00	11,257	2,13E-03	34%	3,47E-03	19%	0,61	-
TG O-36:1 +NH4	640,5875	0,00	12,309	2,32E-03	26%	1,89E-03	15%	1,22	-
TG O-39:0 +Na	689,6045	1,35	13,379	3,53E-04	30%	5,45E-04	17%	0,65	-
TG O-39:0 +NH4	684,6501	0,00	13,392	3,24E-04	96%	1,31E-04	46%	2,46	-
TG O-43:0 +NH4	740,7118	1,14	13,073	1,75E-04	49%	1,23E-04	32%	1,42	-
TG O-48:2 +NH4	806,7584	1,43	14,749	2,44E-04	8%	2,11E-04	7%	1,16	-
TG O-49:1 +NH4	822,7892	2,04	15,054	3,45E-04	15%	2,68E-04	9%	1,29	-
TG O-50:1 +Na	841,7620	0,00	15,195	3,30E-04	14%	2,58E-04	5%	1,28	-
TG O-50:1 +NH4	836,8050	1,85	15,194	5,20E-04	8%	3,79E-04	12%	1,37	-
TG O-50:2 +NH4	834,7894	1,80	15,011	5,08E-04	4%	3,78E-04	5%	1,34	-
TG O-52:1 +NH4	864,8361	1,97	15,432	3,17E-04	20%	2,47E-04	13%	1,28	-
TG O-52:2 +NH4	862,8208	1,63	15,24	4,13E-04	5%	3,22E-04	11%	1,28	-
TG P-38:3 +NH4	662,5718	0,00	11,95	1,57E-03	40%	1,18E-03	30%	1,34	-

Legend to the Table SB2:

Hallmarks

+
-

ratio two times higher for feature sampled with use of C18 than HLB fibers

ratio two times lower for feature sampled with use of C18 than HLB fibers

peak area between C18 and HLB fibers SHexCeratiSHexCerically significantly different ($p < 0.05$)

standard deviation of peak area between C18 and HLB fibers statistically significantly different ($p < 0.05$) - The F test significant

standard deviation of peak area between C18 and HLB fibers is not statistically significantly different ($p < 0.05$) - The F test unsignificant

Abbreviations

C18	Octadecyl
CV	Coefficient of variation
HLB	Hydrophilic-lipophytic balanced
Lipids	
CE	Cholesterol ester
Cer	Ceramides
CerP	Ceramide phosphates
Co	Coenzyme
DG	Diglycerides
GluSph	Glucosyl Sphingosine
Hex2Cer	Dihexoyl ceramides

HexCer	Hexoyl ceramides
PC	Phosphatidylcholines
PE	Phosphatidylethanolamines
PS	Phosphatidylserines
SHexCer	Sulfatides
SM	Sphingomyelins
SPB	Sphingosines
TG	Triglycerides

8. Wnioski

- Histologicznie różne guzy mózgu można różnicować bazując na profilach lipidomicznych pobranych z wykorzystaniem biopsji chemicznej. Stąd też możliwe było rozróżnienie niezłośliwych oponiaków ze złośliwymi glejakami. Zaobserwowano także, że heterogenna struktura nowotworów nie wpływa na jakość uzyskanych wyników, a wprowadzenie odpowiednio długiej sondy pozwala na pozyskanie zestawu analitów charakterystycznego dla całej zmiany nowotworowej.
- Wykorzystana platforma analityczna umożliwiła ekstrakcję fosfolipidów i sfingolipidów, które to odpowiadają za różnicowanie glejaków w zależności od stopnia złośliwości i obecności mutacji IDH. W przypadku zmian statusu kodelecji 1p/19q nie udało się wyselekcjonować reprezentacyjnego zestawu lipidów pozwalającego na identyfikację zmiany genetycznej.
- Z wykorzystaniem sond SPME wyekstrahowano karnitynę oraz zestaw jej pochodnych -acylokarnityn. Zaobserwowano, że ilość tych związków zmienia się w zależności od stopnia złośliwości oraz statusu mutacji IDH.
- Możliwym było zastosowanie biopsji chemicznej do profilowania metabolomicznego i lipidomicznego mózgow pacjentów poddanych zabiegom neurochirurgicznym. Większość zidentyfikowanych związków była lipidami. Nie zaobserwowano jednak wyraźnego zróżnicowania profilu lipidomicznego badanych struktur mózgowia. Niemniej, na uwagę zasługuje możliwość pobrania zestawu analitów w krótkim czasie – 4min, bez wywołania dodatkowych uszkodzeń tkanki mózgowej.

9. Wkład wyników w rozwój nauki, możliwości aplikacyjne

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej pozwoliły na wstępne zdefiniowanie procesów zachodzących podczas rozwoju guzów mózgu ze szczególnym uwzględnieniem profilowania związków lipidowych w zmianach o różnym stopniu złośliwości oraz genotypie. Przyczynić się to może do opracowania nowych rozwiązań terapeutycznych opierających się na profilowaniu związków lipidowych w materiale biologicznym. Konieczne jest jednak rozszerzenie grupy badanej aby potwierdzić zaobserwowane tendencje zmian. W projekcie grantowym finansowanym z programu Harmonia 7, którego efektem jest m.in. niniejsza praca doktorska, zebrano już grupę ok 200 pacjentów. Wyniki są obecnie analizowane i opracowywane.

Docelowo biopsja chemiczna będzie mogła mieć zastosowanie w śródoperacyjnej diagnostyce guzów mózgu. Pozwoli to na rozszerzenie obecnej diagnostyki o szybkie, czułe i selektywne narzędzie do oznaczania biomarkerów oraz oceny przestrzennej dystrybucji metabolitów w badanej tkance. Opierając się bowiem na właściwościach sond mikroekstrakcyjnych, takich jak możliwość ekstrakcji związków bez zaburzenia przestrzennej struktury tkanki oraz znikomej ingerencji w szlaki biochemiczne możliwe jest wykorzystanie tej samej tkanki do innych badań, np. genetycznych, proteomicznych, histologii itd. Profilowanie lipidomiczne mogłoby zatem uzupełnić inne protokoły badań bez konieczności zwiększenia objętości pobranej tkanki.

Czas analizy próbki pobranej przy pomocy sond SPME mógłby zostać skrócony dzięki analizie instrumentalnej z wykorzystaniem bezpośrednio spektrometru mas. Do tej pory w badaniach guzów mózgu *ex vivo* wykorzystana została technologia CBS-MS [59]. Istnieje jednak wiele innych możliwości jak odczyt przestrzennego rozłożenia metabolitów na włóknie SPME z wykorzystaniem DESI-MS [57].

Odpowiednia optymalizacja budowy sond mikroekstrakcyjnych i przetestowanie ich w warunkach klinicznych może być pierwszym etapem dla szerszej aplikacji biopsji chemicznej w neuroonkologii umożliwiając dogłębne poznanie mechanizmów biochemicznych w tkance zdrowej i chorobowo zmienionej, a także wykorzystaniem zidentyfikowanych biomarkerów w diagnostyce laboratoryjnej.

10. Piśmiennictwo

- [1] Solomon DA, Pekmezci M. Pathology of meningiomas. *Handb. Clin. Neurol.*, vol. 169, 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804280-9.00005-6>.
- [2] Esteban Garcia-Robledo J, Ordóñez-Reyes C, Ruiz-Patiño A, Muñoz Á, Arrieta O, Jiménez E, et al. High Grade Meningiomas: Current Therapy Based on Tumor Biology. *Brain Tumors*, 2022. <https://doi.org/10.5772/intechopen.100432>.
- [3] Llaguno SRA, Parada LF. Cell of origin of glioma: Biological and clinical implications. *Br J Cancer* 2016;115. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.354>.
- [4] Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol* 2021;23:1231–51. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>.
- [5] Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, et al. The epidemiology of glioma in adults: A state of the science review. *Neuro Oncol* 2014;16. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou087>.
- [6] Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 2016;131:803–20. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>.
- [7] Han S, Liu Y, Cai SJ, Qian M, Ding J, Larion M, et al. IDH mutation in glioma: molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *Br J Cancer* 2020;122:1580–9. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0814-x>.
- [8] Kayabolen A, Yilmaz E, Bagci-Onder T. IDH mutations in glioma: Double-edged sword in clinical applications? *Biomedicines* 2021;9. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9070799>.
- [9] Pan M, Qin C, Han X. Lipid Metabolism and Lipidomics Applications in Cancer Research. *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 1316, 2021, p. 1–24. https://doi.org/10.1007/978-981-33-6785-2_1.
- [10] Christensen BC, Smith AA, Zheng S, Koestler DC, Houseman EA, Marsit CJ, et al. DNA methylation, isocitrate dehydrogenase mutation, and survival in glioma. *J Natl Cancer*

- Inst 2011;103. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq497>.
- [11] Jiang S, Zanazzi GJ, Hassanpour S. Predicting prognosis and IDH mutation status for patients with lower-grade gliomas using whole slide images. *Sci Rep* 2021;11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95948-x>.
- [12] Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, Walsh KM, Decker PA, Sicotte H, et al. Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. *N Engl J Med* 2015;372. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1407279>.
- [13] Ren X, Cui X, Lin S, Wang J, Jiang Z, Sui D, et al. Co-Deletion of Chromosome 1p/19q and IDH1/2 Mutation in Glioma Subsets of Brain Tumors in Chinese Patients. *PLoS One* 2012;7:e32764. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032764>.
- [14] Hu X, Martinez-Ledesma E, Zheng S, Kim H, Barthel F, Jiang T, et al. Multigene signature for predicting prognosis of patients with 1p19q co-deletion diffuse glioma. *Neuro Oncol* 2017;19:786–95. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now285>.
- [15] Comelli I, Lippi G, Campana V, Servadei F, Cervellin G. Clinical presentation and epidemiology of brain tumors firstly diagnosed in adults in the Emergency Department: A 10-year, single center retrospective study. *Ann Transl Med* 2017;5. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.06.12>.
- [16] Yashin K, Bonsanto MM, Achkasova K, Zolotova A, Wael AM, Kiseleva E, et al. OCT-Guided Surgery for Gliomas: Current Concept and Future Perspectives. *Diagnostics* 2022;12. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12020335>.
- [17] Di Bonaventura R, Montano N, Giordano M, Gessi M, Gaudino S, Izzo A, et al. Reassessing the role of brain tumor biopsy in the era of advanced surgical, molecular, and imaging techniques—a single-center experience with long-term follow-up. *J Pers Med* 2021;11. <https://doi.org/10.3390/jpm11090909>.
- [18] Rivera M, Norman S, Sehgal R, Juthani R. Updates on Surgical Management and Advances for Brain Tumors. *Curr Oncol Rep* 2021;23. <https://doi.org/10.1007/s11912-020-01005-7>.
- [19] Tan AC, Ashley DM, López GY, Malinzak M, Friedman HS, Khasraw M. Management of glioblastoma: State of the art and future directions. *CA Cancer J Clin* 2020;70. <https://doi.org/10.3322/caac.21613>.

- [20] Strobel H, Baisch T, Fitzel R, Schilberg K, Siegelin MD, Karpel-Massler G, et al. Temozolomide and Other Alkylating Agents in Glioblastoma Therapy. *Biomedicines* 2019;7. <https://doi.org/10.3390/biomedicines7030069>.
- [21] Yi GZ, Huang G, Guo M, Zhang X, Wang H, Deng S, et al. Acquired temozolomide resistance in MGMT-deficient glioblastoma cells is associated with regulation of DNA repair by DHC2. *Brain* 2019;142. <https://doi.org/10.1093/brain/awz202>.
- [22] Oldrini B, Vaquero-Siguero N, Mu Q, Kroon P, Zhang Y, Galán-Ganga M, et al. MGMT genomic rearrangements contribute to chemotherapy resistance in gliomas. *Nat Commun* 2020;11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17717-0>.
- [23] Mansouri A, Hachem LD, Mansouri S, Nassiri F, Laperriere NJ, Xia D, et al. MGMT promoter methylation status testing to guide therapy for glioblastoma: Refining the approach based on emerging evidence and current challenges. *Neuro Oncol* 2019;21. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy132>.
- [24] Cohen MH, Shen YL, Keegan P, Pazdur R. FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) as treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *Oncologist* 2009;14:1131–8. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2009-0121>.
- [25] Aldape K, Brindle KM, Chesler L, Chopra R, Gajjar A, Gilbert MR, et al. Challenges to curing primary brain tumours. *Nat Rev Clin Oncol* 2019;16:509–20. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0177-5>.
- [26] Hu S, Kang H, Baek Y, El Fakhri G, Kuang A, Choi HS. Real-Time Imaging of Brain Tumor for Image-Guided Surgery. *Adv Healthc Mater* 2018;7. <https://doi.org/10.1002/adhm.201800066>.
- [27] Schupper AJ, Rao M, Mohammadi N, Baron R, Lee JYK, Acerbi F, et al. Fluorescence-Guided Surgery: A Review on Timing and Use in Brain Tumor Surgery. *Front Neurol* 2021;12:1–14. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.682151>.
- [28] Latikka J, Eskola H. The Resistivity of Human Brain Tumours In Vivo. *Ann Biomed Eng* 2019;47:706–13. <https://doi.org/10.1007/s10439-018-02189-7>.
- [29] Desroches J, Jermyn M, Mok K, Lemieux-Leduc C, Mercier J, St-Arnaud K, et al. Characterization of a Raman spectroscopy probe system for intraoperative brain tissue classification. *Biomed Opt Express* 2015;6. <https://doi.org/10.1364/boe.6.002380>.

- [30] Mielczarek P, Silberring J, Smoluch M. Miniaturization in mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2020;39:453–70. <https://doi.org/10.1002/mas.21614>.
- [31] Ogrinc N, Saudemont P, Takats Z, Salzet M, Fournier I. Cancer Surgery 2.0: Guidance by Real-Time Molecular Technologies. *Trends Mol Med* 2021;27. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2021.04.001>.
- [32] Brown HM, Alfaro CM, Pirro V, Dey M, Hattab EM, Cohen-Gadol AA, et al. Intraoperative Mass Spectrometry Platform for IDH Mutation Status Prediction, Glioma Diagnosis, and Estimation of Tumor Cell Infiltration. *J Appl Lab Med* 2021;6. <https://doi.org/10.1093/jalm/jfaa233>.
- [33] Alfaro CM, Pirro V, Keating MF, Hattab EM, Graham Cooks R, Cohen-Gadol AA. Intraoperative assessment of isocitrate dehydrogenase mutation status in human gliomas using desorption electrospray ionization-mass spectrometry. *J Neurosurg* 2020;132. <https://doi.org/10.3171/2018.8.JNS181207>.
- [34] Ifa DR, Eberlin LS. Ambient ionization mass spectrometry for cancer diagnosis and surgical margin evaluation. *Clin Chem* 2016;62:111–23. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.237172>.
- [35] Van Hese L, De Vleeschouwer S, Theys T, Larivière E, Solie L, Sciot R, et al. Towards real-time intraoperative tissue interrogation for REIMS-guided glioma surgery. *J Mass Spectrom Adv Clin Lab* 2022;24:80–9. <https://doi.org/10.1016/j.jmsacl.2022.04.004>.
- [36] Reyes-Garcés N, Gionfriddo E, Gómez-Ríos GA, Alam MN, Boyacı E, Bojko B, et al. Advances in Solid Phase Microextraction and Perspective on Future Directions. *Anal Chem* 2018;90:302–60. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04502>.
- [37] Brown HM, Pu F, Dey M, Miller J, Shah M V., Shapiro SA, et al. Intraoperative detection of isocitrate dehydrogenase mutations in human gliomas using a miniature mass spectrometer. *Anal Bioanal Chem* 2019;411. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02198-y>.
- [38] Pu F, Alfaro CM, Pirro V, Xie Z, Ouyang Z, Cooks RG. Rapid determination of isocitrate dehydrogenase mutation status of human gliomas by extraction nanoelectrospray using a miniature mass spectrometer. *Anal Bioanal Chem* 2019;411. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01632-5>.

- [39] Kawakami D, Tsuchiya M, Murata T, Iguchi A, Zaitso K. Rapid quantification of extracellular neurotransmitters in mouse brain by PESI/MS/MS and longitudinal data analysis using the R and Stan-based Bayesian state-space model. *Talanta* 2021;234. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122620>.
- [40] Hayashi Y, Zaitso K, Murata T, Ohara T, Moreau S, Kusano M, et al. Intact metabolite profiling of mouse brain by probe electrospray ionization/triple quadrupole tandem mass spectrometry (PESI/MS/MS) and its potential use for local distribution analysis of the brain. *Anal Chim Acta* 2017;983:3556–61. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.06.047>.
- [41] Pekov SI, Eliferov VA, Sorokin AA, Shurkhay VA, Zhvansky ES, Vorobyev AS, et al. Inline cartridge extraction for rapid brain tumor tissue identification by molecular profiling. *Sci Rep* 2019;9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55597-7>.
- [42] Pawliszyn J. *Handbook of Solid Phase Microextraction*. University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada: Elsevier; 2012. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-04297-7>.
- [43] Bojko B, Gorynski K, Gomez-Rios GA, Knaak JM, MacHuca T, Cudjoe E, et al. Low invasive in vivo tissue sampling for monitoring biomarkers and drugs during surgery. *Lab Investig* 2014;94:586–94. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2014.44>.
- [44] Bogusiewicz J, Goryńska PZ, Gaca M, Chmara K, Goryński K, Jaroch K, et al. On-Site Sampling and Extraction of Brain Tumors for Metabolomics and Lipidomics Analysis. *J Vis Exp* 2020;2020:159. <https://doi.org/10.3791/61260>.
- [45] Bogusiewicz J, Burlikowska K, Łuczykowski K, Jaroch K, Birski M, Furtak J, et al. New chemical biopsy tool for spatially resolved profiling of human brain tissue in vivo. *Sci Rep* 2021;11:19522. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98973-y>.
- [46] Jaroch K, Taczyńska P, Czechowska M, Bogusiewicz J, Łuczykowski K, Burlikowska K, et al. One extraction tool for in vitro-in vivo extrapolation? SPME-based metabolomics of in vitro 2D, 3D, and in vivo mouse melanoma models. *J Pharm Anal* 2021;11. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2021.03.005>.
- [47] Cudjoe E, Bojko B, Delannoy I, Saldivia V, Pawliszyn J. Solid-phase microextraction: A complementary InVivo sampling method to microdialysis. *Angew Chemie - Int Ed* 2013;52:12124–6. <https://doi.org/10.1002/anie.201304538>.

- [48] Napylov A, Reyes-Garces N, Gomez-Rios G, Olkowicz M, Lendor S, Monnin C, et al. In Vivo Solid-Phase Microextraction for Sampling of Oxylipins in Brain of Awake, Moving Rats. *Angew Chemie - Int Ed* 2020;59:2392–8. <https://doi.org/10.1002/anie.201909430>.
- [49] Zhou SN, Oakes KD, Servos MR, Pawliszyn J. Application of solid-phase microextraction for in vivo laboratory and field sampling of pharmaceuticals in fish. *Environ Sci Technol* 2008;42. <https://doi.org/10.1021/es8001162>.
- [50] Hassani SA, Lendor S, Boyaci E, Pawliszyn J, Womelsdorf T. Multineuromodulator measurements across fronto-striatal network areas of the behaving macaque using solid-phase microextraction. *J Neurophysiol* 2019;122:1649–60. <https://doi.org/10.1152/jn.00321.2019>.
- [51] Huq M, Tascon M, Nazdrajic E, Roszkowska A, Pawliszyn J. Measurement of Free Drug Concentration from Biological Tissue by Solid-Phase Microextraction: In Silico and Experimental Study. *Anal Chem* 2019;91:7719–28. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00983>.
- [52] Filipiak W, Bojko B. SPME in clinical, pharmaceutical, and biotechnological research – How far are we from daily practice? *TrAC Trends Anal Chem* 2019;115:203–13. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.02.029>.
- [53] Cajka T, Fiehn O. Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry. *TrAC Trends Anal Chem* 2014;61:192–206. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.04.017>.
- [54] Gómez-Ríos GA, Mirabelli MF. Solid Phase Microextraction-mass spectrometry: Metanoia. *TrAC Trends Anal Chem* 2019;112:201–11. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.030>.
- [55] Tascon M, Alam MN, Gómez-Ríos GA, Pawliszyn J. Development of a Microfluidic Open Interface with Flow Isolated Desorption Volume for the Direct Coupling of SPME Devices to Mass Spectrometry. *Anal Chem* 2018;90. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04295>.
- [56] Looby NT, Tascon M, Acquaro VR, Reyes-Garcés N, Vasiljevic T, Gomez-Rios GA, et al. Solid phase microextraction coupled to mass spectrometry: Via a microfluidic open

- interface for rapid therapeutic drug monitoring. *Analyst* 2019;144. <https://doi.org/10.1039/c9an00041k>.
- [57] Lendor S, Gómez-Ríos GA, Boyaci E, Vander Heide H, Pawliszyn J. Space-resolved tissue analysis by solid-phase microextraction coupled to high-resolution mass spectrometry via desorption electrospray ionization. *Anal Chem* 2019;91:10141–8. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02157>.
- [58] Gómez-Ríos GA, Pawliszyn J. Development of coated blade spray ionization mass spectrometry for the quantitation of target analytes present in complex matrices. *Angew Chemie - Int Ed* 2014;53. <https://doi.org/10.1002/anie.201407057>.
- [59] Bogusiewicz J, Gaca-Tabaszewska M, Olszówka D, Jaroch K, Furtak J, Harat M, et al. Coated Blade Spray-Mass Spectrometry as a New Approach for the Rapid Characterization of Brain Tumors. *Molecules* 2022;27:1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules27072251>.
- [60] Gaca-Tabaszewska M, Bogusiewicz J, Bojko B. Metabolomic and Lipidomic Profiling of Gliomas—A New Direction in Personalized Therapies. *Cancers (Basel)* 2022;14:5041. <https://doi.org/10.3390/cancers14205041>.
- [61] Züllig T, Trötz Müller M, Köfeler HC. Lipidomics from sample preparation to data analysis: a primer. *Anal Bioanal Chem* 2020;412:2191–209. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02241-y>.
- [62] Fahy E, Subramaniam S, Murphy RC, Nishijima M, Raetz CRH, Shimizu T, et al. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* 2009;50. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800095-JLR200>.
- [63] Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH, Murphy RC, et al. A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* 2005;46. <https://doi.org/10.1194/jlr.E400004-JLR200>.
- [64] Dowdy T, Zhang L, Celiku O, Movva S, Lita A, Ruiz-Rodado V, et al. Sphingolipid Pathway as a Source of Vulnerability in IDH1mut Glioma. *Cancers (Basel)* 2020;12:2910. <https://doi.org/10.3390/cancers12102910>.
- [65] Chang H, Cheng T, Wang AHJ. Structure, catalysis, and inhibition mechanism of prenyltransferase. *IUBMB Life* 2021;73:40–63. <https://doi.org/10.1002/iub.2418>.

- [66] Melone MAB, Valentino A, Margarucci S, Galderisi U, Giordano A, Peluso G. The carnitine system and cancer metabolic plasticity review-article. *Cell Death Dis* 2018;9:228. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0313-7>.
- [67] Cajka T, Fiehn O. Toward Merging Untargeted and Targeted Methods in Mass Spectrometry-Based Metabolomics and Lipidomics. *Anal Chem* 2016;88:524–45. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04491>.
- [68] Roszkowska A, Yu M, Bessonneau V, Bragg L, Servos M, Pawliszyn J. Tissue storage affects lipidome profiling in comparison to in vivo microsampling approach. *Sci Rep* 2018;8:6980. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25428-2>.
- [69] Birjandi AP, Bojko B, Ning Z, Figeys D, Pawliszyn J. High throughput solid phase microextraction: A new alternative for analysis of cellular lipidome? *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2017;1043:12–9. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.09.034>.
- [70] Köfeler HC, Ahrends R, Baker ES, Ekroos K, Han X, Hoffmann N, et al. Recommendations for good practice in ms-based lipidomics. *J Lipid Res* 2021;62. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2021.100138>.
- [71] Yang K, Han X. Lipidomics: Techniques, Applications, and Outcomes Related to Biomedical Sciences. *Trends Biochem Sci* 2016;41. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.08.010>.
- [72] Han X. *Lipidomics: Comprehensive Mass Spectrometry of Lipids*. Wiley-Blackwell; 2016. <https://doi.org/10.1002/9781119085263>.
- [73] Goryńska PZ, Chmara K, Kupcewicz B, Goryński K, Jaroch K, Paczkowski D, et al. Metabolomic Phenotyping of Gliomas: What Can We Get with Simplified Protocol for Intact Tissue Analysis? *Cancers (Basel)* 2022;14:312. <https://doi.org/10.3390/cancers14020312>.

11. Spis rycin

Rycina 1. Protokół mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME)	29
Rycina 2. Schemat przedstawiający technikę microfluidic open interface mass spectrometry (MOI-MS) [55,56].....	32
Rycina 3. Schemat przedstawiający technikę coated blade spray mass spectrometry (CBS-MS) [58,59]	33
Rycina 4. Struktury przykładowych związków lipidowych	36

12. Wykaz osiągnięć doktorantki

Publikacje

Prace w języku angielskim	12
Prace w języku polskim	2
Publikacje jako pierwszy autor	6
Sumaryczny IF	60,856
Sumaryczna punktacja MEiN	1 290

Cytacje		Hirsh index	
Web of Science*	176	Web of Science*	5
Scopus *	190	Scopus*	6
Google Scholar*	269	Google Scholar*	7

**dane na dzień 4.03.2023r.*

Streszczenia zjazdowe

Doniesienia konferencyjne przedstawiane przed doktorantką	14
Krajowe	8
Zagraniczne	6
Doniesienia konferencyjne których doktorantka jest współautorką	22
Krajowe	13
Zagraniczne	9

12.1. Wykaz publikacji współautorskich

- M. Gaca-Tabaszewska, J. Bogusiewicz, B. Bojko: ***Metabolomic and Lipidomic Profiling of Gliomas—A New Direction in Personalized Therapies***. *Cancers* 2022, 14, 5041.
IF 6.575 MEiN 140
- J. Bogusiewicz, M. Gaca-Tabaszewska, D. Olszówka, K. Jaroch, J. Furtak, M. Harat, J. Pawliszyn, B. Bojko: ***Coated Blade Spray-Mass Spectrometry as a New Approach for the Rapid Characterization of Brain Tumors***. *Molecules*, 2022, 27, 2251
IF 4.412 MEiN 140
- J. Bogusiewicz, B. Kupcewicz, P.Z. Goryńska, K. Jaroch, K. Goryński, M. Birski, J. Furtak, D. Paczkowski, M. Harat, B. Bojko: ***Investigating the Potential Use of Chemical Biopsy Devices to Characterize Brain Tumor Lipidomes***. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23, 3518
IF 6,208 MEiN 140
- J. Bogusiewicz, K. Burlikowska, K. Jaroch, P.Z. Gorynska, K. Gorynski, M. Birski, J. Furtak, D. Paczkowski, M. Harat, B. Bojko: ***Profiling of carnitine shuttle system intermediates in gliomas using solid-phase microextraction (SPME)***. *Molecules*, 2021, 26, 6112
IF 4,927 MEiN 140
- J. Bogusiewicz, K. Burlikowska, K. Łuczykowski, K. Jaroch, M. Birski, J. Furtak, M. Harat, J. Pawliszyn, B. Bojko: ***New Chemical Biopsy Tool for Spatially Resolved Profiling of Human Brain Tissue in vivo***. *Scientific Reports*, 2021, 11, 19522
IF 4,997 MEiN 140
- K. Jaroch, P. Taczyńska, M. Czechowska, J. Bogusiewicz, K. Łuczykowski, K. Burlikowska, B. Bojko: ***One extraction tool for in vitro-in vivo extrapolation? SPME-based metabolomics of in 2 vitro 2D, 3D, in vivo mouse melanoma models***. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2021, 11, 667–674
IF 14,026 MEiN 140
- K. Łuczykowski, N. Warmuzińska, S. Operacz, I. Stryjak, J. Bogusiewicz, J. Jacyna, R. Wawrzyniak, W. Struck-Lewicka, M. J. Markuszewski, B. Bojko: ***Metabolic evaluation of urine from patients diagnosed with high grade (HG) bladder cancer by SPME-LC-MS method***. *Molecules*, 2021: 26,8, 1-12

IF 4,927 MEiN 140

- K. Burlikowska, I. Stryjak, **J. Bogusiewicz**, B. Kupcewicz, K. Jaroch, B. Bojko: **Comparison of metabolomic profiles of organs in mice of different strains based on solid phase microextraction (SPME) method**, *Metabolites*, 2020, 159

IF 4.932 MEiN 70

- **J. Bogusiewicz** P. Z. Goryńska, M. Gaca, K. Chmara, K. Goryński, K. Jaroch, D. Paczkowski, J. Furtak, M. Harat, B. Bojko: **On-Site Sampling and Extraction of Brain Tumors for Metabolomics and Lipidomics Analysis**, *Journal of Visualized Experiments*, 2020, e61260

IF 1.163 MEiN 70

- I. Stryjak, N. Warmuzińska, **J. Bogusiewicz**, K. Łuczykowski, B. Bojko: **Monitoring of the influence of long-term oxidative stress and ischemia on the condition of kidneys using solid-phase microextraction chemical biopsy coupled with liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry**, *Journal of Separation Science*, 2020, 43(9-10):1867-1878

IF 3,645 MEiN 70

- A. Chrustek, I. Hołyńska-Iwan, I. Dziembowska, **J. Bogusiewicz**, M. Wróblewski, A. Cwynar, D. Olszewska-Słonina: **Current research on the safety of pyrethroids used as insecticides**, *Medicina-Lithuania*, 2018, 54, 4:61

IF 1,467 MEiN 20

- I. Holynska-Iwan, **J. Bogusiewicz**, D. Chajdas, K. Szewczyk-Golec, M. Lampka, D. Olszewska-Słonina: **The immediate influence of deltamethrin on ion transport through the rabbit skin. An in vitro study**, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2018, 148:144-150;

IF 2,870 MEiN 30

- M. Napierała, **J. Bogusiewicz**, J. Enko, E. Florek: **Nikotyna i kofeina: wpływ na przekąźnictwo dopaminergiczne**, *Przegląd Lekarski*, 2016, 73(10): 783-786

IF - MEiN 10

- M. Napierała, A. Teżyk, M. Piznal, **J. Bogusiewicz**, E. Florek: **Wykorzystanie śliny do oceny narażenia młodzieży na dopalacze**, *Przegląd Lekarski*, 2015, 72(10): 531-535;

IF - MEiN 10

12.2. Wykaz doniesień konferencyjnych

12.2.1. Doniesienia konferencyjne przedstawiane przed doktorantkę

- **J. Bogusiewicz**, M. Gaca-Tabaszewska, J. Furtak, M. Harat, B. Bojko: ***Coated blade spray mass spectrometry as a useful tool for rapid analysis in biomedical application.*** 9th Metabolomics Circle 2023. Wrocław, Polska; 27-28.01.2023r. **e-poster-krótka prezentacja ustna**
- **J. Bogusiewicz**, K. Burlikowska, K. Jaroch, J. Furtak, M. Birski, M. Harat, J. Pawliszyn, B. Bojko: ***Chemical biopsy as a new tool in profiling of the human brain in vivo.*** The 18th International Conference "Monitoring Molecules in Neuroscience". Lyon, Francja; 29.06-2.07.2022r. **poster**
- **J. Bogusiewicz**, M. Gaca-Tabaszewska, K. Jaroch, P. Goryńska, K. Goryński, A. Roszkowska, M. Birski, J. Furtak, M. Harat, J. Pawliszyn, B. Bojko: ***New diagnostic opportunities in oncology based on microextraction methods.*** XXVI Gliwice Scientific Meetings. Gliwice, Polska; 18-19.11.2022r. **referat**
- **J. Bogusiewicz**, P. Z. Goryńska, K. Burlikowska, K. Jaroch, K. Goryński, K. Łuczykowski, M. Gaca-Tabaszewska, J. Furtak, M. Birski, D. Paczkowski, J. Pawliszyn, M. Harat, B. Bojko: ***Mikroekstrakcja - nowy potencjał w diagnostyce neuroonkologicznej.*** Konferencja oddziału pomorskiego i białostockiego Polskiego Towarzystwa Neurochirurgów. 15.10.2022r. **wykład**
- **J. Bogusiewicz**, K. Burlikowska, K. Jaroch, P.Z. Goryńska, K. Goryński, M. Birski, J. Furtak, D. Paczkowski, M. Harat, B. Bojko: ***Profiling of carnitine and acylcarnitines in gliomas using solid phase microextraction (SPME) : the pilot study.*** 23rd International Symposium on Advances in Extraction Technologies; Alicante, Spain; 30.06-02.07.2002r. **referat**
- **J. Bogusiewicz**, M. Gaca-Tabaszewska, P. Modrakowska, K. Soszyńska, A. Majdańska, A. Ryfa, K. Jaroch, P.Z. Goryńska, K. Goryński, M. Birski, J. Furtak, M. Harat, D. Paczkowski, Bojko B: ***Genetic landscape of meningiomas and its implication to lipidome composition.*** 4th Central European Biomedical Congress; Cracow, Poland; 7-9.06.2021r. **poster**
- **J. Bogusiewicz**, D. Olszówka, K. Jaroch, P.Z. Goryńska, K. Goryński, M. Birski, J. Furtak, D. Paczkowski, M. Harat, B. Bojko: ***Application of coated blade spray mass spectrometry in***

lipidomic analysis. 9th International Singapore Lipid Symposium "Lipidomic technologies and applications"; Singapore, Singapore; 1-5.03.2021r. **poster**

- **J. Bogusiewicz**, K. Burlikowska, K. Łuczykowski, K. Jaroch, J. Furtak, M. Birski, M. Harat M, J. Pawliszyn, B. Bojko: ***Spatially resolved profiling of human brain in vivo : chemical biopsy as a new tool in neuroscience research.*** 7th Metabolomics Circle 2020. Białystok, Polska; 4-6.11.2020r. **wykład**

- **J. Bogusiewicz**, P. Goryńska, K. Jaroch, K. Goryński, D. Paczkowski, J. Furtak, M. Harat, B. Bojko: ***Lipidomics in Histological and Genetic Differentiation of Brain Tumors.*** Metabolomics Circle 2019; Olsztyn, 15-16.10.2019r. **referat**

- **J. Bogusiewicz**, P. Goryńska, K. Jaroch, K. Goryński, D. Paczkowski, J. Furtak, M. Harat, B. Bojko: ***Chemical biopsy in brain studies*** 14th EANO annual meeting, Lyon, France, 19 - 22.09.2019r, **poster**

- **J. Bogusiewicz**, M. Gaca, P. Goryńska, K. Jaroch, K. Goryński, D. Paczkowski, J. Furtak, M. Harat, B. Bojko: ***Solid Phase Microextraction - Low Invasive Sampling Method for Brain Tumor Differentiation;*** MSACL US 2019; Palm Springs, California, USA, 31.03-5.04.2019r, **e-poster-krótka prezentacja ustna**

- **J. Bogusiewicz**, M. Gaca, P. Goryńska, K. Jaroch, K. Goryński, B. Bojko: ***The Use Of Microextraction To The Solid Phase In Lipidomics Of Brain Tumors;*** Metabolomics Circle 2018; Przysiek koło Torunia, 26-28.10.2018r. **e-poster-krótka prezentacja ustna**

- **J. Bogusiewicz**, M. Napierała, E. Florek: ***Przewlekła ekspozycja na dym tytoniowy a parametry biochemiczne - model eksperymentalny.***; XVII Ogólnopolska Konferencja Naukowo – Szkoleniowa TYTOŃ A ZDROWIE: „W dobie uzależnień od tytoniu, alkoholu, narkotyków i leków”; Poznań, 23-24.11.2016 r; **referat**

- **J. Bogusiewicz**, D. Chajdas, M. Markiewicz, M. Szabłowska, I. Hołyńska-Iwan; ***Wpływ pestycydu : deltametryny na procesy regulacyjne transportu jonów fragmentów skóry króliczej badanych in vitro;*** III Ogólnopolska Konferencja Doktorantów i Młodych Naukowców "Per scientiam ad salutem aegroti". Bydgoszcz, Polska; 9-10. 05.2014r. **poster**

12.2.2. Doniesienia konferencyjne których doktorantka jest współautorką

- M. Gaca-Tabaszewska, J. Bogusiewicz, D. Olszówka, K. Jaroch, J. Furtak, M. Harat, J. Pawliszyn, B. Bojko: ***Coated blade spray-mass spectrometry as a new approach for quantitative analysis of gliomas.*** The 18th International Conference "Monitoring Molecules in Neuroscience". Lyon, Francja; 29.06-02.07.2022r. **poster**
- M. Gaca-Tabaszewska, J. Bogusiewicz, D. Olszówka, K. Jaroch, J. Furtak, M. Harat, J. Pawliszyn, B. Bojko: ***Coated Blade Spray jako nowe podejście do celowanej analizy ilościowej guzów tkanki glejowej.*** XV Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie Organizowane przez Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu. Toruń, Polska; 20-22.06.2022r. **referat**
- A. Roszkowska, I. Klejbor, J. Bogusiewicz, B. Bojko, J. Moryś, T. Bączek: ***Application of novel microsampling approach based on SPME probes for monitoring age- and gender-related alterations in the level of endocannabinoids in brain samples.*** 37th International Symposium on Microscale Separations and Bioanalysis. Boston, Stany Zjednoczone; 12-15.07.2021r. **referat**
- A. Roszkowska, J. Bogusiewicz, P.Z. Goryńska, K. Łuczykowski, K. Burlikowska, K. Jaroch, K. Goryński, M. Birski, D. Paczkowski, J. Furtak, M. Harat, T. Bączek, J. Pawliszyn, B. Bojko: ***SPME-based sample preparation strategies in clinical and biomedical analysis.*** 23rd International Symposium on Advances in Extraction Technologies; Alicante, Hiszpania; 30.06-2.07.2021r. **wykład**
- M. Gaca-Tabaszewska, J. Bogusiewicz, B. Kupcewicz, P.Z. Goryńska, K. Jaroch, K. Goryński, J. Furtak, D. Paczkowski, M. Birski, M. Harat, B. Bojko: ***Assessment of the lipidome of brain tumors extracted using Solid Phase Microextraction (SPME) directly after tumor resection and after freezing.*** Singapore, Singapur; 1-5.03.2021r. **poster**
- M. Gaca-Tabaszewska Magdalena, J. Bogusiewicz, P.Z. Goryńska, K. Jaroch, K. Goryński, J. Furtak, D. Paczkowski, M. Birski, M. Harat, B. Bojko: ***Ocena lipidomu guzów mózgu ekstrahowanego z wykorzystaniem biopsji chemicznej bezpośrednio po wycięciu guza i po mrożeniu.*** Nowe trendy w badaniach naukowych; Kraków, Polska; 26-28.02.2021r. **referat**

- S. Bobińska, A. Roszkowska, J. Bogusiewicz, B. Bojko, T. Bączek: ***Optymalizacja metodyki oznaczania wybranych endokannabinoidów przy użyciu techniki SPME-LC-MS/MS.*** XXVI Konferencja Naukowa Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego; Gdańsk, Polska; 28-29.01.2021r. referat
- A. Roszkowska, I. Klejbor, B. Bojko, J. Bogusiewicz, S. Dzielińska, J. Moryś, T. Bączek: ***Optimization of analytical approach based on SPME-LC-MS/MS for the analysis of selected endocannabinoids in brain regions.*** 7th Metabolomics Circle 2020. Białystok, Polska; 4-6.11.2020r. poster
- B. Bojko, D. Paczkowski, J. Furtak, J. Pawliszyn, J. Bogusiewicz, K. Łuczykowski, K. Jaroch, K. Burlikowska, K. Goryński, M. Birski, M. Harat, P. Goryńska: ***Chemical biopsy based on solid phase microextraction : why should it be of scientists and clinicals interest?*** PITTCON 2020 Conference & Expo. The Clear Advantage; Chicago, Stany Zjednoczone; 1-5.03.2020r. referat
- J Bogusiewicz, P. Z. Goryńska, K. Goryński, K. Jaroch, D. Paczkowski, M. Birski, J Furtak, M. Harat, B. Bojko: ***Lipidomic analysis of brain tumor by solid phase microextraction.*** ExTech 2019, Guangzhou, Chiny; 9-13.11.2019r. referat
- N. Warmuzińska, I. Stryjak, K. Łuczykowski, J. Bogusiewicz, M. Hamar, M. Selzner, B. Bojko: ***Graft Quality Assessment in Kidney Transplantation by Monitoring Lipidomic Changes in the Organ During Transplantation Using Solid Phase Microextraction (SPME);*** MSALC EU 2019, Salzburg, Austria, 22-26.09.2019r. poster
- J. Bogusiewicz, P. Z. Goryńska, K. Łuczykowski, K. Burlikowska, K. Jaroch, K. Chmara, K. Goryński, D. Paczkowski, J. Furtak, M. Harat, J. Pawliszyn, B. Bojko: ***Application of solid phase microextraction to in vivo brain and brain tumor analysis;*** XX Euroanalysis 2019, Istanbuł, Turcja, 1-5.09.2019r. referat
- K. Jaroch, J. Bogusiewicz, P.Z. Goryńska, K. Goryński, K. Burlikowska, K. Łuczykowski, D. Paczkowski, J. Furtak, M. Harat, E. Boyaci, J. Pawliszyn, B. Bojko: ***From in vitro Cell Line To in vivo Brain and Brain Cancer Studies. SPME: One Technique That Fits It All;*** HPLC 2019; Mediolan, Włochy, 16-20.06.2019r. referat
- N. Warmuzińska, K. Łuczykowski, J. Bogusiewicz, B. Bojko: ***Lipidomika w badaniach in vivo: jak przygotować włókna SPME.*** TYGIEL 2019; Lublin, Polska; 23-24.03.2019r. poster

- M.Gaca, **J. Bogusiewicz**, P. Goryńska, K. Jaroch, K. Goryński, D. Paczkowski, J. Furtak, M. Harat, B. Bojko: [Pilot studies for the rapid diagnosis of selected brain tumors using modern technology based on a chemical biopsy (SPME).] Polish Student Scientific Conference NEUROTRIP 5: Neuro-oncology, Warszawa, Polska; 23-24.03.2019r. **referat**
- I. Stryjak, N. Warmuzińska, K. Łuczykowski, **J. Bogusiewicz**, B. Bojko: **Mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME) in situ w badaniach nerek – krok w stronę lepszej diagnostyki w transplantologii**; Nowe wyzwania dla polskiej nauki, III edycja; Gdańsk, Polska; 08.09.2018r. **poster**
- M. Napierała, **J. Bogusiewicz**, J. Enko, E. Florek: **Nikotyna i kofeina: wpływ na przekąźnictwo dopaminergiczne**; XVII Ogólnopolska Konferencja Naukowo – Szkoleniowa TYTOŃ A ZDROWIE: „W dobie uzależnień od tytoniu, alkoholu, narkotyków i leków”; Poznań, Polska; 23-24.11.2016r. **poster**
- E. Florek, M. Napierała, **J. Bogusiewicz**: **Nowa dyrektywa unijna regulująca rynek papierosów**; IV Ogólnopolska Konferencja Naukowo-Szkoleniowa "Farmakoekonomika szansą na zbilansowanie wydatków systemu opieki zdrowotnej w Polsce"; Poznań, Polska; 18.11.2016r. **referat**
- M. Napierała, A. Teżyk, M. Piznal, **J. Bogusiewicz**, E. Florek; **Wykorzystanie śliny do oceny narażenia młodzieży na dopalacze**; XVI Ogólnopolska Konferencja Naukowo-Szkoleniowa „TYTOŃ A ZDROWIE. Razem dla zdrowia. Interdyscyplinarne ujęcie tytoniu, alkoholu, narkotyków i leków". Poznań, Polska; 25-26.11.2015r. **referat**
- E. Florek, M. Napierała, **J. Bogusiewicz**; **Podatki a tytoń**; III Ogólnopolska Konferencja Naukowo-Szkoleniowa "Farmakoekonomika szansą na zbilansowanie wydatków systemu opieki zdrowotnej w Polsce". Poznań, Polska; 20.11.2015r. **referat**
- M. Szabłowska, **J. Bogusiewicz**, D. Chajdas, M. Markiewicz, I. Hołyńska-Iwan; **Wpływ pestycydu: deltametryny na parametry elektrofizjologiczne fragmentów skóry króliczej badanych metodą Ussinga**. I Ogólnopolska Konferencja Naukowa Studenckiego Towarzystwa Diagnostów Laboratoryjnych w Bydgoszczy. Bydgoszcz, Polska; 7.06.2014r. **referat**
- M. Markiewicz, M. Szabłowska, D. Chajdas, **J. Bogusiewicz**, I. Hołyńska-Iwan; **Wpływ pestycydu deltametryny na parametry elektrofizjologiczne fragmentów skóry króliczej**

badanych metodą Ussinga; III Ogólnopolska Konferencja Doktorantów i Młodych Naukowców "Per scientiam ad salutem aegroti". Bydgoszcz, Polska; 9-10.05.2014r. **poster**

12.3. Wykonawstwo w grantach badawczych

- Zastosowanie Coated Blade Spray sprzężonego ze spektrometrią mas do analizy związków endogennych w oponiakach; PRELUDIUM 17; nr 2019/33/N/ST4/00286; **kierownik projektu**
- Sampler do ekstrakcji mózgu in vivo, Badania przedwdrożeniowe w ramach Projektu pn. „KUBUS 2.0- Komercjalizacja Uniwersyteckich Badań i Usług, **wykonawca**
- Profilowanie metabolomiczne i lipidomiczne substancji białej i szarej kory mózgowej z wykorzystaniem nowoczesnej technologii opartej na biopsji chemicznej połączonej ze spektrometrem mas; KOŚCIUSZKO, II edycja; **wykonawca**
- Nowe rozwiązania analityczne w onkologii: od badań podstawowych do szybkiej diagnostyki śródoperacyjnej; HARMONIA 7; nr 2015/18/M/ST4/00059; **wykonawca**
- Wpływ przewlekłej ekspozycji na dym tytoniowy na wybrane parametry stresu oksydacyjnego w surowicy krwi i narządach – model eksperymentalny; projekt uczelniany Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, 2016-2017; nr 502-14-03315431-10799; **kierownik projektu**

12.4. Wykaz staży zagranicznych

- 22.03-29.03.2019 Professor Janusz Pawliszyn Research Group, Faculty of Chemistry, University in Waterloo, Ontario, Canada
- 5.04-25.05.2018 Professor Janusz Pawliszyn Research Group, Faculty of Chemistry, University in Waterloo, Ontario, Canada

12.5. Wykaz nagród

12.5.1. Stypendia wyjazdowe

- ExTech 2021 Travel Grant od EuChemS-DAC Sample Prep

- Young Investigator Travel Scholarship for Outstanding Science for EANO allied health professionals / nurse members for the EANO 2019 Meeting in Lyon, France
- Travel Grant MSACL US 2019 for Young Investigators

12.5.2. Nagrody na konferencjach

- I miejsce za prezentację e-posteru: J. Bogusiewicz, M. Gaca-Tabaszewska, J. Furtak, M. Harat, B. Bojko: Coated blade spray mass spectrometry as a useful tool for rapid analysis in biomedical application; Metabolomics Circle 2023; Wrocław, 27-28.01.2023r.
- Nagroda za e-poster: J. Bogusiewicz, M. Gaca, P. Goryńska, K. Jaroch, K. Goryński, B. Bojko: The Use Of Microextraction To The Solid Phase In Lipidomics Of Brain Tumors; Metabolomics Circle 2018; Przysiek koło Torunia, 26-28.10.2018r

12.5.3. Nagrody o zasięgu uczelnianym

- Nagroda zespołowa I stopnia za osiągnięcia w dziedzinie naukowo-badawczej od Rektora UMK za 2021 rok
- Nagroda zespołowa II stopnia za osiągnięcia w dziedzinie naukowo-badawczej od Rektora UMK za 2018 rok
- Tytuł Najlepszego Absolwenta Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum UMK uzyskany w roku 2015
- Stypendium Rektora UMK dla Najlepszych Doktorantów w roku akademickim: 2020-2021, 2021-2022
- Stypendium doktoranckie i projakościowe na studiach doktoranckich w latach 2017-2018, 2018-2019, 2019-2020, 2020-2021, 2021-2022
- Stypendium Rektora UMK dla Najlepszych Studentów w roku akademickim: 2014-2015, 2013-2014, 2012-2013 oraz 2011-2012.

12.5.4. Inne

- Nominacja do nagrody Naukowiec Przyszłości 2023 w kategorii: Kobieta nauki, która zmienia świat za realizacją projektu badawczego pn. „Zastosowanie Coated Blade Spray

sprzężonego ze spektrometrią mas do analizy związków endogennych w oponiakach”, Tychy, 16.08.2022

- Medicina 2020 Best Paper Award za pracę: Current Research on the Safety of Pyrethroids Used as Insecticides
- Nagroda dla Najlepszego Absolwenta kierunku: Analityka medyczna na Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy ufundowana przez Krajową Izbę Diagnostów Laboratoryjnych w roku 2015.

12.6. Pozostałe formy działalności naukowej

12.6.1. Członkostwo w towarzystwach naukowych

2022- obecnie	EuChemS-DAC Sample Preparation Study Group and Network
2019- obecnie	European Association of Cancer Research
2019- 2022	European Association of Neurooncology

12.6.2. Recenzowanie artykułów w czasopismach naukowych

- Open Medicine (4 recenzje)
- Human and Experimental Toxicology (2 recenzje)
- Bioanalysis (1 recenzja)
- OncoTargets and Therapy (1 recenzja)

12.6.3. Inne formy działalności naukowej

- Instruktor w trakcie Sample Preparation Course, Bydgoszcz, Polska; 28.09-04.10.2021
- Instruktor w trakcie Sample Preparation Course, Bydgoszcz, Polska; 25-27.09.2019

13. Opinia Komisji Bioetycznej

13.1. Projekt HARMONIA 7

2/2016

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy
KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 628/2015

Bydgoszcz, 29.09.2015r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz.U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U.Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(skład podano w załączeniu), na posiedzeniu w dniu 29.09.2015 r. przeanalizowała wniosek, który złożyła kierownik badania:

dr hab. n. farm. Barbara Bojko
Katedra i Zakład Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej
Collegium Medicum w Bydgoszczy

z zespołem w składzie:

- **prof. dr hab. n. med. M. Harat, dr n. farm. K. Goryński,**
dr n. med. D. Paczkowski,

w sprawie badania:

„Zintegrowana platforma oparta na mikroekstrakcji do fazy stałej: nowy potencjał w badaniach i diagnostyce guzów mózgu.”

Po zapoznaniu się ze złożonym wnioskiem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania Komisja podjęła

Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu wniosku

w sprawie przeprowadzenia badań, w zakresie określonym we wniosku pod warunkiem:

- poinformowania uczestników badania o celu oraz zakresie badań i uzyskania od każdego z nich osobnej, pisemnej, świadomej zgody na udział w badaniu, zgodnie z obowiązującymi przepisami, datowanej najpóźniej na moment rozpoczęcia badania a nie wcześniej niż data uzyskania z Komisji Bioetycznej zgody na takie badanie;
- zachowania tajemnicy wszystkich danych, w tym danych osobowych pacjentów, umożliwiających ich identyfikację w ewentualnych publikacjach;
- zapewnienia, że osoby uczestniczące w eksperymencie badawczym nie są ubezwłasnowolnione, nie są żołnierzami służby zasadniczej, nie są osobami pozbawionymi wolności, nie pozostają w zależności służbowej, dydaktycznej lub innej z prowadzącym badanie;
- sugerujemy uzyskanie podpisu uczestnika badania pod informacją o badaniu, lub sporządzenie formularza informacji i świadomej zgody na udział w badaniu na jednej kartce.

Jednocześnie informujemy, iż „Zgoda na udział w badaniu” winna zawierać m.in.: imię i nazwisko badanej osoby; Nr historii choroby pacjenta (L.ks.gł. Oddziału/Poradni) oraz datę i podpis badanej osoby, a także klauzule, że uczestnik badania wyraża zgodę na przetwarzanie danych osobowych dotyczących realizacji tematu badawczego, z wyjątkiem publikacji danych osobowych.

Kierownik badania zobowiązany jest do przechowywania wszystkich dokumentów dotyczących badania przez okres dwudziestu lat.

Zgoda obowiązuje od daty posiedzenia (29.09.2015 r.) do końca 2019 r.

Wydana opinia dotyczy tylko rozpatrywanego wniosku z uwzględnieniem przedstawionego projektu; każda zmiana i modyfikacja wymaga uzyskania odrębnej opinii. Wnioskodawca zobowiązany jest do informowania o wszelkich poprawkach, które mogłyby mieć wpływ na opinię Komisji oraz poinformowania o zakończeniu badania.

Od niniejszej uchwały podmiot zamierzający przeprowadzić eksperyment medyczny, kierownik zakładu opieki zdrowotnej, w której eksperyment medyczny ma być przeprowadzony, mogą wnieść odwołanie do Odwoławczej Komisji Bioetycznej przy Ministrze Zdrowia, za pośrednictwem Komisji Bioetycznej przy Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, w terminie 14 dni od daty otrzymania niniejszej Uchwały.

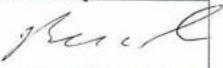
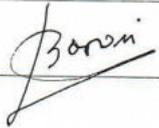
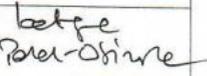
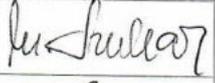
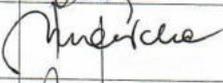
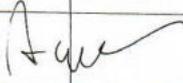
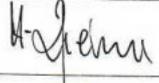
Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:

dr hab. n. farm. Barbara Bojko
Katedra i Zakład Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Lista obecności
na posiedzeniu Komisji Bioetycznej
w dniu 29.09.2015 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	przewodniczący	
2.	Prof. dr hab. Adam Buciński	z-ca przewodniczącego	
3.	Prof. dr hab. med. Anna Balcar-Boroń		
4.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska		
5.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec		
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk		
7.	Dr hab. n. med. Katarzyna Pawlak-Osińska, prof. UMK		
8.	Ks. dr hab. Wojciech Szukalski, prof. UAM		
9.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska		
10.	Dr hab. n. med. Maria Kłopotka		
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka		
12.	Mgr prawa Joanna Poetek-Żygas		
13.	Mgr piel. Hanna Ziemińska		

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy
KOMISJA BIOETYCZNA

Stwierdzam zgodność z oryginałem

Data 22/11/2018

Pieczęta imienna

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 628/2015

Bydgoszcz, 17.01.2017 r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz.U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U.Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH - GCP

Komisja Bioetyczna przy Collegium Medicum w Bydgoszczy

(której skład podano w załączeniu) na posiedzeniu w dniu 17.01.2017 r. przeanalizowała prośbę o wyrażenie zgody na uzupełnienie zespołu badawczego nast. osoby:

- mgr farm. Paulinę Goryńską, mgr farm. Karola Jarocho, mgr Joannę Bogusiewicz,
lic. Annę Trojanowską, Panią Igę Stryjak i Panią Kamilę Chmara,

którą złożyła:

dr hab. n. farm. Barbara Bojko
Katedra i Zakład Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej
Collegium Medicum w Bydgoszczy

w sprawie badania: „Zintegrowana platforma oparta na mikroekstrakcji do fazy stałej: nowy potencjał w badaniach i diagnostyce guzów mózgu.”

Po zapoznaniu się ze złożonym dokumentem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania jawnego Komisja przyjęła do wiadomości podane informacje i wyraża zgodę na powyższe pod warunkami określonymi w uchwale Komisji podjętej w dniu 29.09.2015 r. Zgoda na kontynuowanie przedmiotowego badania obowiązuje do końca 2019 r.

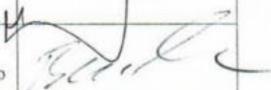
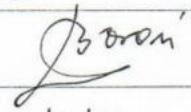
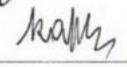
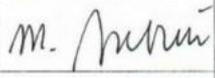
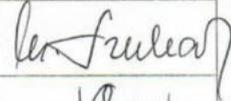
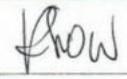
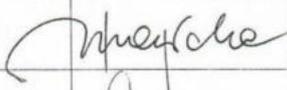
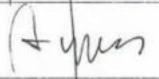
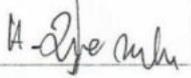
Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:

dr hab. n. farm. Barbara Bojko
Katedra i Zakład Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Lista obecności
na posiedzeniu Komisji Bioetycznej
w dniu 17.01.2017 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	przewodniczący	
2.	Prof. dr hab. Adam Buciński	z-ca przewodniczącego	
3.	Prof. dr hab. med. Anna Balcar-Boroń		
4.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska		
5.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec		
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk		
7.	Dr hab. n. med. Katarzyna Pawlak-Osińska, prof. UMK		
8.	Ks. dr hab. Wojciech Szukalski, prof. UAM		
9.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska		
10.	Dr hab. n. med. Maria Kłopocka		
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka		
12.	Mgr prawa Joanna Połetek-Żygas		
13.	Mgr piel. Hanna Ziemniarska		

13.2. Projekt Kościuszko II

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy
KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 142/2017

Bydgoszcz, 19.06.2018 r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz. U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(której skład podano w załączeniu) na posiedzeniu w dniu **19.06.2018 r.** przeanalizowała prośbę o wyrażenie zgody na:

1. Zmianę składu osobowego realizującego projekt – obecny skład zespołu:
-prof. dr n. med. Marek Harat, prof. Janusz Pawliszyn, dr hab. n. farm. Barbara Bojko, dr n.med. Dariusz Paczkowski, dr n. med. Marcin Birski, dr n. med. Jacek Furtak, dr inż. Katarzyna Burlikowska, mgr Paulina Goryńska, mgr Joanna Bogusiewicz,
2. Korektę założeń i metodyki badań
3. Korektę „Informacji dla uczestnika badania”
4. Nowy formularz „zgody na udział w badaniu”
5. Nowy formularz obserwacji klinicznej..

którą złożył:

prof. dr hab. n. med. Marek Harat
Klinika Neurochirurgii
10 Wojskowy Szpital Kliniczny z Polikliniką SP ZOZ
w Bydgoszczy

w sprawie badania:

„Profilowanie metabolomiczne i lipidomiczne istoty szarej i białej mózgu z materiałów pochodzących z resekcji podczas operacji guzów mózgu.”

Po zapoznaniu się ze złożonym dokumentem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania jawnego Komisja przyjęła do wiadomości podane informacje i wyraża zgodę na powyższe pod warunkami określonymi w uchwale Komisji podjętej w dniu 21.02.2017 r.

Zgoda na kontynuowanie przedmiotowego badania obowiązuje do końca 2020 r.



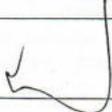
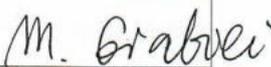
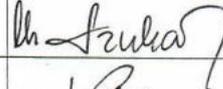
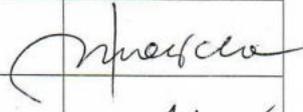
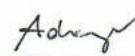
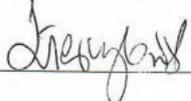
Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:

prof. dr hab. n. med. Marek Harat
Klinika Neurochirurgii
10 Wojskowy Szpital Kliniczny z Polikliniką SP ZOZ
w Bydgoszczy

Lista obecności
na posiedzeniu Komisji Bioetycznej
w dniu 19.06.2018 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	Przewodniczący	
2.	Mgr prawa Joanna Połetek-Żygas	Z-ca przewodniczącego	
3.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska		
4.	Prof. dr hab. med. Anna Balcar-Boroń		
5.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec		
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk		
7.	Dr hab. n. med. Katarzyna Pawlak-Osińska, prof. UMK		
8.	Dr hab. n. med. Maria Kłopotcka		
9.	Ks. dr hab. Wojciech Szukalski, prof. UAM		
10.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska		
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka		
12.	Mgr farm. Aleksandra Adamczyk		
13.	Mgr Lidia Iwińska-Tarczykowska		

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy
KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 142/2017

Bydgoszcz, 19.06.2018 r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz. U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(której skład podano w załączeniu) na posiedzeniu w dniu **19.06.2018 r.** przeanalizowała prośbę o wyrażenie zgody na:

1. Zmianę składu osobowego realizującego projekt – obecny skład zespołu:
-prof. dr n. med. Marek Harat, prof. Janusz Pawliszyn, dr hab. n. farm. Barbara Bojko, dr n.med. Dariusz Paczkowski, dr n. med. Marcin Birski, dr n. med. Jacek Furtak, dr inż. Katarzyna Burlikowska, mgr Paulina Goryńska, mgr Joanna Bogusiewicz.
2. Korektę założeń i metodyki badań
3. Korektę „Informacji dla uczestnika badania”
4. Nowy formularz „zgody na udział w badaniu”
5. Nowy formularz obserwacji klinicznej..

która złożył:

prof. dr hab. n. med. Marek Harat
Klinika Neurochirurgii
10 Wojskowy Szpital Kliniczny z Polikliniką SP ZOZ
w Bydgoszczy

w sprawie badania:

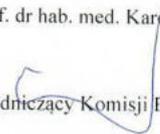
„Profilowanie metabolomiczne i lipidomiczne istoty szarej i białej mózgu z materiałów pochodzących z resekcji podczas operacji guzów mózgu.”

Po zapoznaniu się ze złożonym dokumentem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania jawnego Komisja przyjęła do wiadomości podane informacje i wyraża zgodę na powyższe pod warunkami określonymi w uchwale Komisji podjętej w dniu 21.02.2017 r.

Zgoda na kontynuowanie przedmiotowego badania obowiązuje do końca 2020 r.



Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

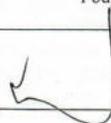
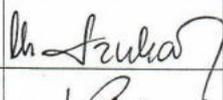
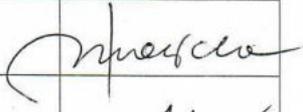
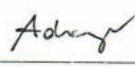
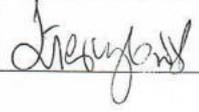


Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:

prof. dr hab. n. med. Marek Harat
Klinika Neurochirurgii
10 Wojskowy Szpital Kliniczny z Polikliniką SP ZOZ
w Bydgoszczy

Lista obecności
na posiedzeniu Komisji Bioetycznej
w dniu 19.06.2018 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	Przewodniczący	
2.	Mgr prawa Joanna Poletek-Żygas	Z-ca przewodniczącego	
3.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska		
4.	Prof. dr hab. med. Anna Balcar-Boroń		
5.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec		
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk		
7.	Dr hab. n. med. Katarzyna Pawlak-Osińska, prof. UMK		
8.	Dr hab. n. med. Maria Kłopocka		
9.	Ks. dr hab. Wojciech Szukalski, prof. UAM		
10.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska		
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka		
12.	Mgr farm. Aleksandra Adameczyk		
13.	Mgr Lidia Iwińska-Tarczykowska		

14. Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Bydgoszcz, 23.02.2023r.

Mgr Joanna Bogusiewicz
Katedra Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej
Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu,
Bydgoszcz, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstawanie pracy pt. „Profiling of Carnitine Shuttle System Intermediates in Gliomas Using Solid-Phase Microextraction (SPME)” (<https://doi.org/10.3390/molecules26206112>) był następujący:

- Koncepcja oraz zaplanowanie eksperymentu,
- Przeprowadzenie analizy laboratoryjnej, analiza uzyskanych wyników oraz ich interpretacja,
- Przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu, wprowadzanie poprawek oraz odpowiedzi na recenzje,
- Zapoznanie się z końcową wersją manuskryptu,

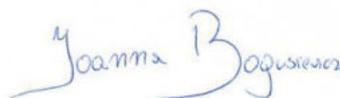
oraz w pracy pt. „Investigating the Potential Use of Chemical Biopsy Devices to Characterize Brain Tumor Lipidomes” (<https://doi.org/10.3390/ijms23073518>) to:

- Przeprowadzenie samplingsów oraz analizy laboratoryjnej,
- Analiza uzyskanych wyników oraz ich interpretacja,
- Przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu, wprowadzanie poprawek oraz odpowiedzi na recenzje,
- Zapoznanie się z końcową wersją manuskryptu,

oraz w pracy pt. „New chemical biopsy tool for spatially resolved profiling of human brain tissue in vivo” (<https://doi.org/10.1038/s41598-021-98973-y>) to:

- Optymalizacja wielosondowego urządzenia, przygotowanie sond mikroekstrakcyjnych, udział w samplingsach z wykorzystaniem przygotowanych urządzeń SPME,
- Przeprowadzanie analizy lipidomicznej oraz metabolomicznej, a także analiza uzyskanych wyników oraz ich interpretacja,
- Przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu, wprowadzanie poprawek, odpowiedzi na recenzje,
- Zapoznanie się z końcową wersją manuskryptu.

Jednocześnie oświadczam, że udostępnienie utworów w mojej rozprawie doktorskiej nie będzie naruszało praw autorskich osób trzecich.



15. Oświadczenia współautorów

dr Marcin Birski

Bydgoszcz, 15.02.2023r.

Dr Marcin Birski
Klinika Neurochirurgii
10 Wojskowy Szpital Kliniczny z Polikliniką w Bydgoszczy
Bydgoszcz, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstawanie pracy pt. „Profiling of Carnitine Shuttle System Intermediates in Gliomas Using Solid-Phase Microextraction (SPME)” (<https://doi.org/10.3390/molecules26206112>) był następujący:

- pomoc przy redagowaniu pracy,
- zapoznanie się z końcową wersją manuskryptu,

oraz w pracy pt. „Investigating the Potential Use of Chemical Biopsy Devices to Characterize Brain Tumor Lipidomes” (<https://doi.org/10.3390/ijms23073518>):

- pomoc przy redagowaniu pracy,
- zapoznanie się z końcową wersją manuskryptu,

oraz w pracy pt. „New chemical biopsy tool for spatially resolved profiling of human brain tissue in vivo” (<https://doi.org/10.1038/s41598-021-98973-y>):

- przeprowadzenie zabiegów neurochirurgicznych i rekrutacja pacjentów,
- zapoznanie się z końcową wersją manuskryptu.

Jednocześnie oświadczam, że udostępnienie utworów w rozprawie doktorskiej mgr Joanny Bogusiewicz nie będzie naruszało praw autorskich osób trzecich.



dr hab. Barbara Bojko, prof. UMK

Bydgoszcz, 23.02.2023r.

Dr hab. Barbara Bojko, prof. UMK
Katedra Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej
Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu,
Bydgoszcz, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstawanie pracy pt. „Profiling of Carnitine Shuttle System Intermediates in Gliomas Using Solid-Phase Microextraction (SPME)” (<https://doi.org/10.3390/molecules26206112>) był następujący:

- koncepcja projektu, planowanie eksperymentu, koordynacja i nadzór nad projektem,
- pomoc w redagowaniu pracy,
- odpowiedzi na recenzje,
- zapoznanie się z końcową wersją manuskryptu,

oraz w pracy pt. „Investigating the Potential Use of Chemical Biopsy Devices to Characterize Brain Tumor Lipidomes” (<https://doi.org/10.3390/ijms23073518>) to:

- koncepcja projektu, planowanie eksperymentu, koordynacja i nadzór nad projektem,
- pomoc w redagowaniu pracy,
- odpowiedzi na recenzje,
- zapoznanie się z końcową wersją manuskryptu,

oraz w pracy pt. „New chemical biopsy tool for spatially resolved profiling of human brain tissue in vivo” (<https://doi.org/10.1038/s41598-021-98973-y>) to:

- koncepcja projektu, udział w samplingach z wykorzystaniem sond SPME,
- planowanie eksperymentu, koordynacja i nadzór nad projektem,
- pomoc w redagowaniu pracy,
- odpowiedzi na recenzje,
- zapoznanie się z końcową wersją manuskryptu.

Jednocześnie oświadczam, że udostępnienie utworów w rozprawie doktorskiej mgr Joanny Bogusiewicz nie będzie naruszało praw autorskich osób trzecich.

Kierownik
Katedry Farmakodynamiki
i Farmakologii Molekularnej

Barbara Bojko, prof. UMK

dr Katarzyna Burlikowska

Bydgoszcz, 23.02.2023r.

Dr Katarzyna Burlikowska
Katedra Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej
Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu,
Bydgoszcz, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstawanie pracy pt. „Profiling of Carnitine Shuttle System Intermediates in Gliomas Using Solid-Phase Microextraction (SPME)” (<https://doi.org/10.3390/molecules26206112>) był następujący:

- pomoc w redagowaniu pracy,
- zapoznanie się z końcową wersją manuskryptu,

oraz w pracy pt. „New chemical biopsy tool for spatially resolved profiling of human brain tissue in vivo” (<https://doi.org/10.1038/s41598-021-98973-y>):

- przygotowanie sond mikroekstrakcyjnych,
- udział w samplingach z wykorzystaniem sond SPME,
- pomoc w redagowaniu pracy,
- zapoznanie się z końcową wersją manuskryptu.

Jednocześnie oświadczam, że udostępnienie utworów w rozprawie doktorskiej mgr Joanny Bogusiewicz nie będzie naruszało praw autorskich osób trzecich.

Katarzyna Burlikowska

dr Jacek Furtak

Bydgoszcz, 15.02.2023r.

Dr Jacek Furtak
Klinika Neurochirurgii
10 Wojskowy Szpital Kliniczny z Polikliniką w Bydgoszczy
Bydgoszcz, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstawanie pracy pt. „Profiling of Carnitine Shuttle System Intermediates in Gliomas Using Solid-Phase Microextraction (SPME)” (<https://doi.org/10.3390/molecules26206112>) był następujący:

- przeprowadzenie zabiegów neurochirurgicznych i rekrutacja pacjentów,
- zapoznanie się z końcową wersją manuskryptu,

oraz w pracy pt. „Investigating the Potential Use of Chemical Biopsy Devices to Characterize Brain Tumor Lipidomes” (<https://doi.org/10.3390/ijms23073518>):

- przeprowadzenie zabiegów neurochirurgicznych i rekrutacja pacjentów,
- zapoznanie się z końcową wersją manuskryptu,

oraz w pracy pt. „New chemical biopsy tool for spatially resolved profiling of human brain tissue in vivo” (<https://doi.org/10.1038/s41598-021-98973-y>):

- przeprowadzenie zabiegów neurochirurgicznych i rekrutacja pacjentów,
- zapoznanie się z końcową wersją manuskryptu.

Jednocześnie oświadczam, że udostępnienie utworów w rozprawie doktorskiej mgr Joanny Bogusiewicz nie będzie naruszało praw autorskich osób trzecich.

Dr. n. med. Jacek Furtak
SPECJALISTA NEUROCHIRURG
9173263
tel. kom. 604 104 065



dr Krzysztof Goryński

Bydgoszcz, 23.02.2023r.

Dr Krzysztof Goryński
Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu,
Bydgoszcz, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstawanie pracy pt. „Profiling of Carnitine Shuttle System Intermediates in Gliomas Using Solid-Phase Microextraction (SPME)” (<https://doi.org/10.3390/molecules26206112>) był następujący:

- przeprowadzenie sampligów guzów mózgu z wykorzystaniem sond SPME,
- zapoznanie się z końcową wersją manuskryptu:

oraz w pracy pt. „Investigating the Potential Use of Chemical Biopsy Devices to Characterize Brain Tumor Lipidomes” (<https://doi.org/10.3390/ijms23073518>):

- przeprowadzenie sampligów guzów mózgu z wykorzystaniem sond SPME,
- zapoznanie się z końcową wersją manuskryptu.

Jednocześnie oświadczam, że udostępnienie utworów w rozprawie doktorskiej mgr Joanny Bogusiewicz nie będzie naruszało praw autorskich osób trzecich.

Kierownik
Zespołu Naukowego Bioanaliz
Krzysztof Goryński
dr Krzysztof Goryński

dr Paulina Zofia Goryńska

Bydgoszcz, 23.02.2023r.

Dr Paulina Zofia Goryńska
Katedra Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej
Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu,
Bydgoszcz, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstawanie pracy pt. „Profiling of Carnitine Shuttle System Intermediates in Gliomas Using Solid-Phase Microextraction (SPME)” (<https://doi.org/10.3390/molecules26206112>) był następujący:

- przeprowadzenie samplingu guzów mózgu z wykorzystaniem sond SPME,
- zapoznanie się z końcową wersją manuskryptu,

oraz w pracy pt. „Investigating the Potential Use of Chemical Biopsy Devices to Characterize Brain Tumor Lipidomes” (<https://doi.org/10.3390/ijms23073518>):

- Przeprowadzenie samplingu guzów mózgu z wykorzystaniem sond SPME,
- zapoznanie się z końcową wersją manuskryptu.

Jednocześnie oświadczam, że udostępnienie utworów w rozprawie doktorskiej mgr Joanny Bogusiewicz nie będzie naruszało praw autorskich osób trzecich.

*Paulina
Goryńska*

prof. dr hab. Marek Harat

Bydgoszcz, 15.02.2023r.

Prof. dr hab. Marek Harat
Klinika Neurochirurgii
10 Wojskowy Szpital Kliniczny z Polikliniką w Bydgoszczy
Bydgoszcz, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstawanie pracy pt. „Profiling of Carnitine Shuttle System Intermediates in Gliomas Using Solid-Phase Microextraction (SPME)” (<https://doi.org/10.3390/molecules26206112>) był następujący:

- udział w planowaniu eksperymentu,
- przeprowadzenie zabiegów neurochirurgicznych i rekrutacja pacjentów,
- zapoznanie się z końcową wersją manuskryptu,


oraz w pracy pt. „Investigating the Potential Use of Chemical Biopsy Devices to Characterize Brain Tumor Lipidomes” (<https://doi.org/10.3390/ijms23073518>):

- udział w planowaniu eksperymentu,
- przeprowadzenie zabiegów neurochirurgicznych i rekrutacja pacjentów,
- zapoznanie się z końcową wersją manuskryptu.

oraz w pracy pt. „New chemical biopsy tool for spatially resolved profiling of human brain tissue in vivo” (<https://doi.org/10.1038/s41598-021-98973-y>):

- nadzorowanie medycznej części projektu,
- zapoznanie się z końcową wersją manuskryptu.

Jednocześnie oświadczam, że udostępnienie utworów w rozprawie doktorskiej mgr Joanny Bogusiewicz nie będzie naruszało praw autorskich osób trzecich.


72-00000 | prof. dr hab. med. Marek Harat
Klinika Neurochirurgii
Bydgoszcz, ul. Władysława
tel. 26 141 70 96 · 9623723

dr Karol Jaroch

Bydgoszcz, 23.02.2023r.

Dr Karol Jaroch
Katedra Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej
Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu,
Bydgoszcz, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstawanie pracy pt. „Profiling of Carnitine Shuttle System Intermediates in Gliomas Using Solid-Phase Microextraction (SPME)” (<https://doi.org/10.3390/molecules26206112>) był następujący:

- przeprowadzenie sampligów guzów mózgu z wykorzystaniem sond SPME,
- zapoznanie się z końcową wersją manuskryptu,


oraz w pracy pt. „Investigating the Potential Use of Chemical Biopsy Devices to Characterize Brain Tumor Lipidomes” (<https://doi.org/10.3390/ijms23073518>):

- przeprowadzenie sampligów guzów mózgu z wykorzystaniem sond SPME,
- zapoznanie się z końcową wersją manuskryptu,

oraz w pracy pt. „New chemical biopsy tool for spatially resolved profiling of human brain tissue in vivo” (<https://doi.org/10.1038/s41598-021-98973-y>):

- udział w opracowaniu wyników z części metabolomicznej,
- zapoznanie się z końcową wersją manuskryptu.

Jednocześnie oświadczam, że udostępnienie utworów w rozprawie doktorskiej mgr Joanny Bogusiewicz nie będzie naruszało praw autorskich osób trzecich.



dr hab. Bogumiła Kupcewicz, prof. UMK

Bydgoszcz, 15.02.2023r.

Dr hab. Bogumiła Kupcewicz, prof.UMK
Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu,
Bydgoszcz, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstawanie pracy pt. „Investigating the Potential Use of Chemical Biopsy Devices to Characterize Brain Tumor Lipidomes” (<https://doi.org/10.3390/ijms23073518>) to:

- analiza statystyczna wyników,
- zapoznanie się z końcową wersją manuskryptu.

Jednocześnie oświadczam, że udostępnienie utworów w rozprawie doktorskiej mgr Joanny Bogusiewicz nie będzie naruszało praw autorskich osób trzecich.



mgr Kamil Łuczykowski

Bydgoszcz, 23.02.2023r.

Mgr Kamil Łuczykowski
Katedra Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej
Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu,
Bydgoszcz, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstawanie pracy pt. „New chemical biopsy tool for spatially resolved profiling of human brain tissue in vivo” (<https://doi.org/10.1038/s41598-021-98973-y>) to:

- udział w samplingu z wykorzystaniem sond SPME,
- udział w opracowaniu wyników z części metabolomicznej,
- zapoznanie się z końcową wersją manuskryptu.

Jednocześnie oświadczam, że udostępnienie utworów w rozprawie doktorskiej mgr Joanny Bogusiewicz nie będzie naruszało praw autorskich osób trzecich.

Łuczykowski
Kamil

dr Dariusz Paczkowski

Bydgoszcz, 15.02.2023r.

Dr Dariusz Paczkowski
Klinika Neurochirurgii i Neurologii
Szpital Uniwersytecki nr 2 im. Jana Bizuela w Bydgoszczy
Bydgoszcz, Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstawanie pracy pt. „Profiling of Carnitine Shuttle System Intermediates in Gliomas Using Solid-Phase Microextraction (SPME)” (<https://doi.org/10.3390/molecules26206112>) był następujący:

- przeprowadzenie zabiegów neurochirurgicznych i rekrutacja pacjentów,
- zapoznanie się z końcową wersją manuskryptu,

oraz w pracy pt. „Investigating the Potential Use of Chemical Biopsy Devices to Characterize Brain Tumor Lipidomes” (<https://doi.org/10.3390/ijms23073518>):

- przeprowadzenie zabiegów neurochirurgicznych i rekrutacja pacjentów,
- zapoznanie się z końcową wersją manuskryptu.

Jednocześnie oświadczam, że udostępnienie utworów w rozprawie doktorskiej mgr Joanny Bogusiewicz nie będzie naruszało praw autorskich osób trzecich.



prof. Janusz Pawliszyn

Bydgoszcz, 28.02.2023r.

Profesor Janusz Pawliszyn
Waterloo University
Waterloo, Ontario, Canada

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstawanie pracy pt. „New chemical biopsy tool for spatially resolved profiling of human brain tissue in vivo” (<https://doi.org/10.1038/s41598-021-98973-y>):

- zapewnienie finansowania badań,
- udział w projektowaniu części analitycznej projektu,
- pomoc w redagowaniu pracy,
- zapoznanie się z końcową wersją manuskryptu.

Jednocześnie oświadczam, że udostępnienie utworów w rozprawie doktorskiej mgr Joanny Bogusiewicz nie będzie naruszało praw autorskich osób trzecich.

