

## КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

### АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ СОСТАВА ФОСФАТИДИЛХОЛИНОВ В ГЛИОБЛАСТОМАХ ЧЕЛОВЕКА *EX VIVO*

С.И. Пеков<sup>1,2</sup>, А.А. Сорокин<sup>2</sup>, А.А. Кузин<sup>2</sup>, К.В. Бочаров<sup>3</sup>, Д.С. Бормотов<sup>2</sup>,  
А.С. Шивалин<sup>2</sup>, В.А. Шурхай<sup>2,4</sup>, А.А. Потапов<sup>4</sup>, Е.Н. Николаев<sup>1</sup>, И.А. Попов<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Сколковский институт науки и технологий,

121205, Москва, Территория инновационного центра “Сколково”, Большой бульвар, 30, стр. 1

<sup>2</sup>Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет),  
141701, Московская область, Долгопрудный, Институтский пер., 9; \*эл. почта: popov.ia@phystech.edu

<sup>3</sup>Обособленное структурное подразделение

Института энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе  
Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук,  
19991, Москва, ул. Косыгина, 4

<sup>4</sup>Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко,  
125047, Москва, 4-я Тверская-Ямская, 16

Выполнен анализ данных, полученных при помощи прямого масс-спектрометрического профилирования клинических образцов первичных и вторичных глиобластом человека *ex vivo*, который позволил выделить изменения в липидном составе тканей, сопровождающие развитие глиальных опухолей IV степени злокачественности (согласно классификации ВОЗ). Показано, что как первичные, так и вторичные (развившиеся из астроцитомы) опухоли обогащены моно- и ди-ненасыщенными фосфатидилхолинами (РС 26:1, 30:2, 32:1, 32:2, 34:1, 34:2). При этом снижается содержание насыщенных и полиненасыщенных фосфатидилхолинов и фосфатидилэтаноламинов. Эти изменения связаны как с изменением доступности полиненасыщенных жирных кислот, так и с активацией процессов *de novo* синтеза и бета-окисления жирных кислот в условиях кислородного голодания в теле опухоли.

**Ключевые слова:** масс-спектрометрия; липидомика; метаболомика; глиобластома

**DOI:** 10.18097/PBMC20216701081

## ВВЕДЕНИЕ

Глиобластома представляет собой наиболее злокачественную (IV степень злокачественности по классификации ВОЗ) форму глиальной опухоли человека. Являясь наиболее распространённой и летальной опухолью головного мозга человека, глиобластомы разделяются не только на различные генетические подтипы, но и могут иметь определённые морфологические и молекулярные отличия [1, 2]. Это связано с тем, что хотя большинство глиобластом являются первичными опухолями, от 5% до 10% случаев глиобластом оказываются вторичными, развившимися из астроцитом — глиальных опухолей меньшей злокачественности [3]. Первичные глиобластомы часто характеризуются присутствием некротических участков, в то время как вторичные глиобластомы могут содержать области, гистологически близкие к опухолям меньшей злокачественности — олигодендроглиомам и астроцитомам [2]. Точно также первичные и вторичные глиобластомы различаются по частоте присутствия определенных мутаций. В частности, мутация фермента изоцитратдегидрогеназы (IDH) характерна более чем для 80% вторичных глиобластом, но не встречается в первичных глиобластомах [3-5].

Фермент IDH катализирует реакцию окислительного декарбоксилирования с образованием альфа-кетоглутарата ( $\alpha$ KG). Однако наблюдаемая

у большинства вторичных глиобластом (как и у большинства астроцитом) мутация R132H в IDH-1 и более редкие R140Q и R172K в изоформе IDH-2 приводят к тому, что мутантный фермент начинает превращать  $\alpha$ KG в 2-гидроксиглутарат (2HG), накапливающийся в опухолевых клетках в большом количестве [6, 7]. В нормальных физиологических условиях 2HG не имеет какой-либо известной функции в организме, но при повышении его концентрации в клетке происходит ингибирование  $\alpha$ KG-зависимых ферментов, в том числе деметилирующих молекулы ДНК и гистоны, что изменяет эпигенетический статус клетки [6]. В результате мутации IDH приводят к гиперметилированию ДНК, которое затрудняет дифференцировку клеток, что, несомненно, играет роль в росте и развитии опухолей [8]. Ещё одной важной с точки зрения карциногенеза функцией IDH является способность катализировать превращение глутамата в цитрат, который используется для *de novo* синтеза жирных кислот [9]. Значительные изменения в метаболизме злокачественных клеток (эффект Варбурга) также приводят к образованию значительного количества цитрата за счёт аэробного гликолиза [10]. Выделяющийся при этом избыток NADH не только расходуется на превращение  $\alpha$ KG в 2HG, но и облегчает синтез жирных кислот *de novo* [7]. Кроме того, в ходе анаэробного гликолиза образуются предшественники для синтеза аминокислот и

нуклеотидов, и таким образом злокачественные клетки получают возможность синтеза большого количества биомассы и энергии, необходимых для активного роста и пролиферации [7].

Клетки человека не способны синтезировать полиненасыщенные жирные кислоты, они поступают в организм с пищей. Вследствие этого, активный *de novo* синтез жирных кислот, как и недостаточность их поступления за счёт гиповаскуляризации опухолевых тканей, значительно изменяет липидный состав клеток. Дополнительным источником энергии в клетках опухоли является бета-окисление. Этот процесс не реализуется в здоровой мозговой ткани человека, но в злокачественных клетках бета-окисление используется в качестве одного из источников энергии. Хотя бета-окисление, происходящее в митохондриях, в первую очередь, затрагивает триацилглицериды, накапливаемые в липидных каплях внутри клеток, оно также значительно влияет на общий жирнокислотный и, соответственно, липидный состав клетки [7, 11]. В результате, при изменении состава липидов значительно изменяются и физические свойства клеток за счёт изменения текучести клеточной мембраны. Однако, вне зависимости от того, является ли глиобластома первичной, или вторичной, а также присутствует ли в ней мутация IDH, морфологически ядро опухоли (не содержащее участков некроза и участков меньшей злокачественности) оказывается сформированным одинаковыми клетками, и для дальнейшей дифференциации и уточнения диагноза требуется подтверждение мутационного статуса и изучение анамнеза [2, 5]. Это свидетельствует о том, что основные структурные липиды, входящие в состав клеток глиобластом разных подтипов, сходны по составу жирных кислот и выявление отклонений в их составе позволит глубже понять механизмы карциногенеза и разработать более эффективные методы терапии глиобластом.

Основным методом лечения глиобластом является нейрохирургическое вмешательство, при этом высокая степень инфильтрации клеток опухоли в окружающие ткани затрудняет полную резекцию опухоли. Для увеличения эффективности хирургического вмешательства разрабатываются различные технологии интраоперационной диагностики, позволяющие контролировать состав удаляемой ткани, в том числе основанные на молекулярном профилировании иссекаемых тканей [12-14]. Получаемые таким образом молекулярные профили содержат и информацию об изменении соотношений различных липидов между собой в зависимости от количества опухолевых клеток в исследуемом образце, что позволяет построить автоматические классификаторы, определяющие присутствие злокачественных клеток в исследуемом образце [15, 16]. С другой стороны, появляется возможность выделить пики в масс-спектрах, отвечающие за отнесение спектров к группе патологических или неопухолевых, что позволяет выявить закономерности

в изменении липидного состава опухолей с учётом их естественной биологической variability. В данной работе полученные ранее данные прямого масс-спектрометрического профилирования глиобластом различных подтипов, дополненные липидным анализом их экстрактов, используются для выявления возникающих в процессе развития глиобластом, особенностей регулирования фосфатидилхолинов (PC) и фосфатидилэтаноламинов (PE), являющихся основными компонентами клеточной мембраны нервной ткани.

## МЕТОДИКА

В работе использованы результаты прямого масс-спектрометрического профилирования, полученные ранее [15].

### *Выбор ионов, характеризующих глиобластома*

Для построения классификаторов, разделяющих опухолевые и неопухолевые образцы на основании данных масс-спектрометрического профилирования, анализировали образцы тканей глиобластомы, полученные от 27 пациентов, 16 из которых были охарактеризованы как имеющие мутацию IDH-1, а также образцы от 9 пациентов с неопухолевой патологией (иссеченной в ходе плановой операции по терапии лекарственно-резистентной эпилепсии) в качестве контроля. Образцы подвергались профилированию при помощи технологии Inline Cartridge Extraction (ICE) [15], представляющей собой экстракцию аналитов из образца ткани в одноразовом картридже в токе растворителя непосредственно перед источником электрораспылительной ионизации. На основании полученных данных были построены классификаторы для определения принадлежности исследуемого образца к глиобластома, либо неопухолевой патологической ткани [15]. Для этого во всех сканах удаляли все масс-спектрометрические (МС) пики со значением отношения сигнал-шум меньше двух, оставшиеся МС пики выравнивались для устранения ошибки при определении позиции максимума, и на последнем этапе формировалась матрица характеристик, содержащая интенсивности МС пиков, присутствовавших не менее чем в 25% сканов каждого типа (глиобластома или неопухолевый образец). Сохранение пиков с такой частотой встречаемости необходимо для учёта внутригрупповой variability и особенностей экстракции в картриджах ICE. Для выделения наиболее значимых пиков использовали один из вариантов линейного дискриминантного анализа [17]. Для оценки значимости МС пика в разделении классов использовали критерий *lfd*r (local false discovery rate), показывающий вероятность того, что данный МС пик не будет оказывать влияния на классификацию образца при учёте всех остальных пиков [18]. Кроме того, были рассмотрены только МС пики, средняя интенсивность которых была выше медианной, для исключения низкоинтенсивных сигналов, идентификация молекул в которых

была бы невозможна. В результате такого анализа были выбраны наиболее значимые МС пики в диапазоне  $m/z$  от 500 до 1000, которые соответствуют липидной компоненте молекулярного профиля. Именно в этом диапазоне в режиме регистрации положительных ионов в масс-спектре наблюдаются ионы преимущественно фосфатидилхолинов и фосфатидилэтаноламинов. Значение  $l_{fdr}$  для всех выбранных пиков оказалось менее 10%.

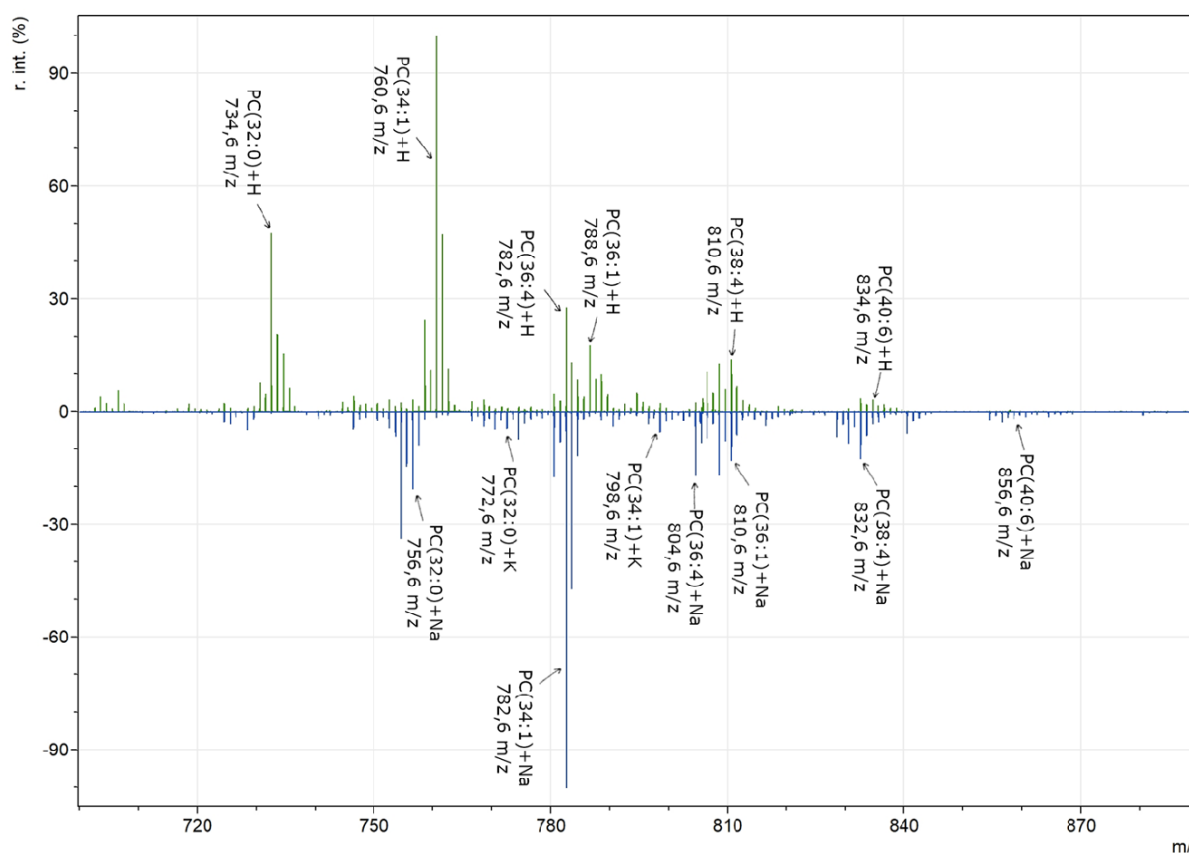
### Идентификация липидов

Идентификацию липидов по данным хромато-масс-спектрометрического исследования проводили с использованием ПО LipiDex [19] с последующей проверкой идентификаций вручную.

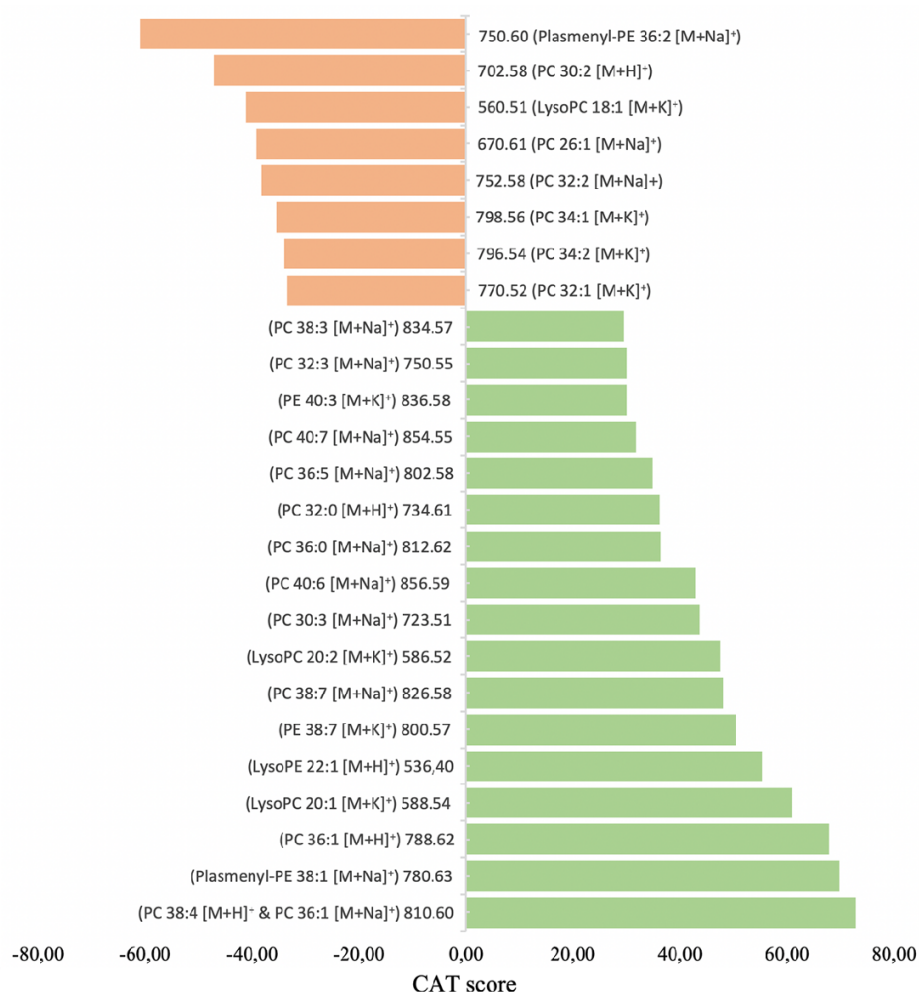
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Присутствие ионов щелочных металлов в физиологических концентрациях в мягких тканях приводит к образованию не только протонированных, но и катионизированных ими ионов-аддуктов при анализе образцов тканей методами прямой масс-спектрометрии. Для оценки вклада катионизированных ионов липидов в наблюдаемый спектр прямого масс-спектрометрического профилирования проводили сравнение масс-спектров экстрактов до и после обессоливания. На рисунке 1 показано, что при обессоливании [15] многие пики смещаются на 22 Да и 38 Да влево,

что соответствует уменьшению вклада ионов вида  $[M+Na]^+$  и  $[M+K]^+$  соответственно в пользу образования протонированных ионов. При этом спектр обессоленных экстрактов оказывается менее интенсивным в абсолютном значении отклика детектора, что объясняется худшей эффективностью ионизации липидов в отсутствие катионов щелочных металлов. Наблюдаемая картина позволяет предположить, что большинство пиков, наблюдаемых в спектре как не обессоленного экстракта, так и ICE-MS, соответствуют катионизированным ионам, в первую очередь содержащим натрий, но, в ряде случаев, и калий. Таким образом, из всех пиков, являющихся значимыми для разделения масс-спектров на спектры тканей глиобластомы и тканей неопухолевой патологии, были выбраны 32, обладающих достаточной интенсивностью для определения наличия в данном пике катионизированных ионов липидов. В свою очередь, для большинства липидов в условиях хромато-масс-спектрометрического эксперимента при наличии ионов аммония в элюенте не наблюдается образования катионизированных ионов, поэтому для каждого катионизированного иона был подобран соответствующий протонированный аналог. В дальнейшем 25 ионов были проанотированы как фосфатидилхолины (PC) и фосфатидилэтаноламины (PE) на основании данных хромато-масс-спектрометрического анализа (рис. 2) с учётом идентифицированных аддуктов в спектрах ICE-MS. Несмотря на то, что в ряде



**Рисунок 1.** Масс-спектр экстракта образца глиобластомы до (снизу) и после (сверху) обессоливания. Помечены основные липиды в протонированной и катионизированной формах.



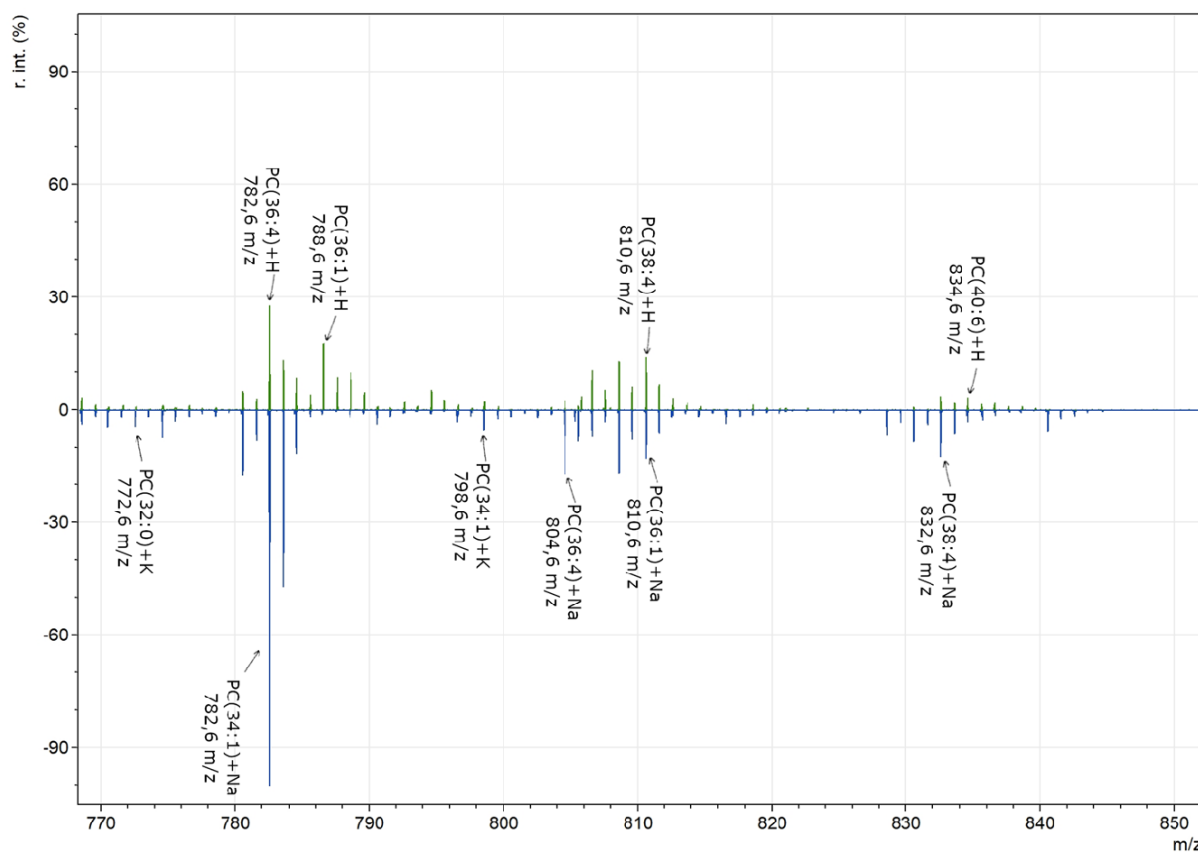
**Рисунок 2.** Значимость отдельных липидов при отнесении спектра к группе глиобластомы и неопухолевой патологии. По оси абсцисс отложен CAT score, который представляет из себя t-критерий Стьюдента с поправкой на корреляцию между ионами. Знак CAT score определяется относительно состава неопухолевой патологической ткани.

случаев одному значению  $m/z$  в спектре ICE-MS может соответствовать несколько липидов разных классов, для аннотирования выбирался кандидат, отличающийся наибольшей интенсивностью хроматографического пика, кроме иона  $m/z$  810,6, который соответствует как протонированному PC 38:4, так и катионизированному натрием PC 36:1 (рис. 3). В результате было идентифицировано 6 фосфатидилхолинов и по одному плазмалогену и лизолецитину, повышение относительного содержания которых оказывается связанным с малигнизацией мозговой ткани в глиобластоме.

Использованный в работе метод выделения пиков, значимых для классификации глиобластомы, основанный на линейном дискриминантном анализе, не позволяет напрямую делать количественных выводов об изменении концентрации определенных липидов в анализируемых тканях во многом ввиду небольшого размера исследованной выборки. Рассчитываемый в этой работе LDA CAT-score является аналогом t-критерия Стьюдента, которая используется для проверки гипотезы о равенстве средних двух групп измерений. Напрямую t-критерий Стьюдента в нашем случае неприменим, как ввиду того, что распределение интенсивности

пиков отклоняется от нормального, так и вследствие корреляции между интенсивностями пиков, малого объема выборки и высокой размерности сигнала. Тем не менее, величина CAT-score представляет ту же информацию что и t-критерий Стьюдента: большая положительная величина свидетельствует о статистически значимом различии в средних, при этом среднее в группе спектров неопухолевой патологии выше среднего в спектрах глиобластом; отрицательная величина CAT-score свидетельствует о значимом превышении среднего в спектрах глиобластом по отношению к неопухолевым образцам (рис. 2). Кроме того, интенсивности пиков в масс-спектрах не всегда прямо пропорциональны концентрации молекул в образце. Однако в целом CAT-score отражает общие закономерности между повышением уровня одних молекул на фоне других.

Таким образом, исследование опухолей человека *ex vivo* является единственным на данный момент эффективным средством для оценки изменений в метаболизме липидов в клетках глиобластом, особенно в случае исследования молекул, имеющих структурную функцию в клеточных мембранах, таких как фосфатидилхолины. Высокая биологическая вариабельность характерная



**Рисунок 3.** Фрагмент масс-спектра экстракта образца глиобластомы до (снизу) и после (сверху) обессоливания. Для иона  $m/z$  810,6 обнаруживается одновременный вклад катионизированного иона PC 36:1 и протонированного иона PC 38:4.

для клинического материала, осложняет его исследование классическими методами липидомики с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС) за счёт малой доступности биоматериала. Малый объём иссекаемого материала зачастую не позволяет провести экстракцию липидов из ткани в количествах, достаточных для дальнейшего липидного анализа. В то же время применение прямой масс-спектрометрии позволяет относительно быстро проанализировать большое количество образцов, в том числе малого объёма, поскольку количество биоматериала, необходимого для анализа не превышает 1 мм<sup>3</sup>.

Большинство пиков в масс-спектре прямой ионизации тканей опухолей глиобластомы в режиме регистрации положительных ионов соответствует фосфатидилхолинам и фосфатидилэтаноламинам (рис. 1), хотя обнаруживаются и липиды других классов, в том числе фосфатидилсерины, сфингомиелины и триглицериды. Но наибольшее различие в спектрах глиобластом и неопухоловой ткани наблюдаются в интенсивности пиков фосфатидилхолинов, что объясняется не только их высоким содержанием в клеточной мембране, но и высокой эффективностью при проведении масс-спектрометрического анализа. Наиболее интенсивные пики в спектре, однако, они не играют существенной роли в дифференцировании глиобластом от неопухоловой ткани, поскольку внутригрупповая вариативность их интенсивности в спектрах

образцов с одинаковым диагнозом сравнима с межгрупповой вариативностью, что объясняется естественной биологической вариативностью содержания липидов в образцах.

Полученные результаты (рис. 2) демонстрируют, что в глиобластомах понижается уровень фосфатидилхолинов с длинными остатками жирных кислот и высоким числом двойных связей, выполняющих в первую очередь структурную функцию в клеточных мембранах. В то же время содержание фосфатидилэтаноламинов, большое количество которых характерно для нервной ткани, уменьшается в процессе малигнизации. Все фосфолипиды, характеризующие клеточную мембрану глиобластом, содержат относительно небольшие моно- и диненасыщенные жирнокислотные остатки, что, в целом, хорошо согласуется с литературными данными по различным видам рака [22]. Увеличение содержания коротких жирных кислот, состоящих из 12-16 атомов углерода, свидетельствует об общем снижении доступности длинных жирных кислот, которые, по всей видимости, подвергаются бета-окислению для поддержания метаболизма в раковой клетке и замещаются синтезированными *de novo*. Снижение содержания полиненасыщенных липидов в пользу моно- и диненасыщенных также связано с активизацией процессов *de novo* синтеза жирных кислот, преимущественно приводящих к образованию относительно насыщенных жирных

кислот, характерно для многих видов рака, в том числе и для глиальных опухолей [22, 23]. Снижение уровня насыщенных фосфолипидов объясняется тем, что большинство насыщенных жирных кислот в опухолевых клетках расходуется на синтез триглицеридов, накапливаемых в качестве источника энергии в липидных каплях [7, 21], что является значимым отличием глиом от опухолей других органов. Худшая, по сравнению с фосфолипидами, ионизационная способность триглицеридов затрудняет их детектирование с применением методов прямой масс-спектрометрии, поэтому ни один из триглицеридов в нашем эксперименте не обладает достаточно заметным вкладом в классификацию образцов глиобластомы. Это хорошо согласуется с общей теорией об интенсификации процессов, приводящих к быстрому синтезу биомассы для обеспечения ускоренной пролиферации клеток без необходимости сохранения их функциональности [7].

Ранее было продемонстрировано [24], что РС 34:2, преимущественно характеризует не опухоль, а участки некроза и кровоизлияний, что хорошо соотносится с клинической картиной первичной глиобластомы. При этом его высокая значимость в классификации глиобластом, в том числе вторичных, IDH-мутантных, показывает, что с молекулярной точки зрения липиды первичных и вторичных глиобластом оказываются заметно более схожи, нежели липиды вторичных глиобластом и предшествующих им IDH-мутантных астроцитом [16]. Это свидетельствует о конвергентном изменении метаболизма под действием условий кислородного и метаболического голодания внутри ядра опухоли. Кроме того, это также может указывать на процессы метаболического репрограмминга в высокозлокачественных глиальных опухолях в условиях развития гипоксии внутри ядра опухоли для поддержания жизнедеятельности клеток.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В процессе развития глиобластом заметно изменяется липидный состав клеток в сравнении с немодифицированной мозговой тканью, приводя к уменьшению содержания полиненасыщенных фосфатидилхолинов. Обнаруживается снижение содержания полностью насыщенных фосфатидилхолинов и одновременное снижение доли фосфатидилэтаноламинов. Фосфолипиды, содержание которых значимо увеличивается в процессе малигнизации, представлены моно- и диненасыщенными липидами с относительно короткими жирнокислотными остатками.

Исследование масс-спектрометрических профилей опухолевых тканей мозга человека *ex vivo* подтвердило предположения об изменении липидного метаболизма в процессе роста и развития глиальных опухолей. При этом липидный состав вторичных глиобластом более сходен с первичными глиобластомами, нежели с астроцитомами, являющимися предшественниками вторичных глиобластом.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования (соглашение № 075-00337-20-02, проект № 0714-2020-0006), с использованием оборудования ЦКП Федерального исследовательского центра химической физики им. Н.Н. Семенова РАН.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование было проведено в соответствии с рекомендациями этического комитета Национального медицинского исследовательского центра нейрохирургии (НМИЦ) им. акад. Н.Н. Бурденко (Приказ 40 от 12.04.2016 в редакции приказа 131 от 17.07.2018). У всех пациентов до операции было получено согласие на использование удалённых тканей в научных исследованиях в соответствии с законодательством и требованиями этического комитета. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией, пересмотренной в 2013 году. Все протоколы и процедуры были выполнены в соответствии с соответствующими и руководящими принципами и правилами, утвержденными контролирующим советом НМИЦ им. акад. Н.Н. Бурденко.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

- Huang L.E. (2019) Carcinogenesis, **40**, 1299-1307.
- Armento A., Ehlers J., Schotterl S., Naumann U. (2017) Glioblastoma (de Vleeschouwer S., ed.), Codon Publications, Australia. DOI:10.15586/codon.glioblastoma.2017.
- Ohgaki H., Kleihues P. (2007) Am. J. Pathol., **170**, 1445-1453.
- Демьяшкин Г.А., Никитин П.В. (2018) Журнал неврологии и психиатрии, **118**, 134-139. [Demyashkin G.A., Nikitin P.V. (2018) Zhurnal Nevrol. i Psihiatr. Im. S.S. Korsakova, **118**, 134-139.]
- Parsons D.W., Jones S., Zhang X., Lin J.C., Leary R.J., Angenendt P., Mankoo P., Carter H., Gallia G.L., Olivi A., McLendon R., Rasheed B.A., Nikolskaya T., Nikolsky Y., Busam D.A., Tekleab H., Diaz L.A., Hartigan J., Smith D.R., Strausberg R.L., Nagahashi S.K., Mieko S., Shinjo O., Yan H., Riggins G.J., Bigner D.D., Papadopoulos N., Parmigiani G., Vogelstein B., Victor E., Kinzler K.W. (2008) Science, **321**(5897), 1807-1812.
- Dang L., Yen K., Attar E.C. (2016) Ann. Oncol., **27**, 599-608.
- Sorokin A., Shurkhay V., Pekov S., Zhvansky E., Ivanov D., Kulikov E.E., Popov I., Potapov A., Nikolaev E. (2019) Curr. Top. Med. Chem., **19**, 1521-1534.
- Lu C., Ward P.S., Kapoor G.S., Rohle D., Turcan S., Abdel-Wahab O., Edwards C.R., Khanin R., Figueroa M.E., Melnick A., Wellen K.E., Oğrourke D.M., Berger S.L., Chan T.A., Levine R.L., Mellinghoff I.K., Thompson C.B. (2012) Nature, **483**, 474-478.
- Reitman Z.J., Duncan C.G., Poteet E., Winters A., Yan L.J., Gooden D.M., Spasojevic I., Boros L.G., Yang S.H., Yan H. (2014) J. Biol. Chem., **289**, 23318-23328.



10. Lunt S.Y., Vander Heiden M.G. (2011) Annu. Rev. Cell Dev. Biol., **27**, 441-464.
11. Koizume S., Miyagi Y. (2016) Int. J. Mol. Sci., **17**, 1-23.
12. Hänel L., Kwiatkowski M., Heikau L., Schlüter H. (2019) Futur. Sci. OA., **5**, 3. DOI: 10.4155/fsoa-2018-0087.
13. Keating M.F., Zhang J., Feider C.L., Retailleau S., Reid R., Antaris A., Hart B., Tan G., Milner T.E., Miller K., Eberlin L.S. (2020) Anal. Chem., **92**, 11535-11542.
14. Ivanov D.G., Pekov S.I., Bocharov K.V., Bormotov D.S., Spasskiy A.I., Zhvansky E.S., Sorokin A.A., Eliforov V.A., Zavorotnyuk D.S., Tkachenko S.I., Khaliullin I.G., Kuksin A.Y., Shurkhay V.A., Kononikhin A.S., Nikolaev E.N., Popov I.A. (2020) Russ. J. Phys. Chem. B., **14**, 483-487.
15. Pekov S.I., Eliforov V.A., Sorokin A.A., Shurkhay V.A., Zhvansky E.S., Vorobyev A.S., Potapov A.A., Nikolaev E.N., Popov I.A. (2019) Sci. Rep., **9**, 1-7.
16. Елиферов В.А., Жванский Е.С., Сорокин А.А., Шурхай В.А., Бормотов Д.С., Пеков С.И., Никитин П.В., Рыжова М.В., Куликов Е.Е., Потанов А.А., Николаев Е.Н., Попов И.А. (2020) Биомедицинская химия, **66**(4), 317-325. [Eliforov V.A., Zhvansky E.S., Sorokin A.A., Shurkhay V.A., Bormotov D.S., Pekov S.I., Nikitin P.V., Ryzhova M.V., Kulikov E.E., Potapov A.A., Nikolaev E.N., Popov I.A. (2020) Biomeditsinskaya Khimiya, **66**(4), 317-325.]
17. Ahdesmäki M., Strimmer K. (2010) Ann. Appl. Stat., **4**, 503-509.
18. Chong E.Y., Huang Y., Wu H., Ghasemzadeh N., Uppal K., Quyyumi A.A., Jones D.P., Yu T. (2015) Sci. Rep., **5**, 17221. DOI: 10.1038/srep17221.
19. Hutchins P.D., Russell J.D., Coon J.J. (2018) Cell Syst., **6**, 621-625.
20. Taib B., Aboussalah A.M., Moniruzzaman M., Chen S., Haughey N.J., Kim S.F., Ahima R.S. (2019) Sci. Rep., **9**, 19593. DOI: 10.1038/s41598-019-55985-z.
21. Miyai M., Tomita H., Soeda A., Yano H., Iwama T., Hara A. (2017) J. Neurooncol., **135**, 423-432.
22. Wolrab D., Jirásko R., Chocholoušková M., Peterka O., Holčapek M. (2019) Trends Anal. Chem., **120**, 115480. DOI: 10.1016/j.trac.2019.04.012.
23. Guo D., Bell E.H., Chakravarti A. (2013) CNS Oncol., **2**, 289-299.
24. Clark A.R., Calligaris D., Regan M.S., Pomeranz Krummel D., Agar J.N., Kallay L., MacDonald T., Schniederjan M., Santagata S., Pomeroy S.L., Agar N.Y.R., Sengupta S. (2018) J. Neurooncol., **140**(2), 269-279.

Поступила в редакцию: 30. 11. 2020.  
После доработки: 11. 12. 2020.  
Принята к печати: 19. 01. 2021.

## ANALYSIS OF PHOSPHATIDYLCHOLINES ALTERATIONS IN HUMAN GLIOBLASTOMA MULTIFORM TISSUES *EX VIVO*

**S.I. Pekov<sup>1,2</sup>, A.A. Sorokin<sup>2</sup>, A.A. Kuzin<sup>2</sup>, K.V. Bocharov<sup>3</sup>, D.S. Bormotov<sup>2</sup>,  
A.S. Shivalin<sup>2</sup>, V.A. Shurkhay<sup>2,4</sup>, A.A. Potapov<sup>4</sup>, E.N. Nikolaev<sup>1</sup>, I.A. Popov<sup>2\*</sup>**

<sup>1</sup>Skolkovo Institute of Science and Technology,  
Territory of "Skolkovo" Innovation Center, 30 bldg. 1, Bolshoy blvd., Moscow, 121205 Russia  
<sup>2</sup>Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University),  
9 Institutsky per., Dolgoprudny, Moscow Region, 141701 Russia; \*e-mail: popov.ia@phystech.edu  
<sup>3</sup>Semenov Federal Center of Chemical Physic of RAS,  
4 bldg. 1, Kosygina str, Moscow, 119991 Russia  
<sup>4</sup>N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery,  
16, 4th Tverskaya-Yamskaya str., Moscow, 125047 Russia

Significant metabolism alteration is accompanying the cell malignization process. Energy metabolism disturbance leads to the activation of *de novo* synthesis and beta-oxidation processes of lipids and fatty acids in a cancer cell, which becomes an indicator of pathological processes inside the cell. The majority of studies dealing with lipid metabolism alterations in glial tumors are performed using the cell lines *in vitro* or animal models. However, such conditions do not entirely represent the physiological conditions of cell growth or possible cells natural variability. This work presents the results of the data obtained by applying ambient mass spectrometry to human glioblastoma multiform tissues. By analyzing a relatively large cohort of primary and secondary glioblastoma samples, we identify the alterations in cells lipid composition, which accompanied the development of grade IV brain tumors. We demonstrate that primary glioblastomas, as well as ones developed from astrocytomas, are enriched with mono- and diunsaturated phosphatidylcholines (PC 26:1, 30:2, 32:1, 32:2, 34:1, 34:2). Simultaneously, the saturated and polyunsaturated phosphatidylcholines and phosphatidylethanolamines decrease. These alterations are obviously linked to the availability of the polyunsaturated fatty acids and activation of the *de novo* lipid synthesis and beta-oxidation pathways under the anaerobic conditions in the tumor core.

**Key words:** mass spectrometry; lipidomics; metabolomics; glioblastoma multiform

**Funding:** The research supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement no. 075-00337-20-02, project no. 0714-2020-0006). The research used the equipment of Shared Research Facilities of N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics RAS.

Received: 30.11.2020, revised: 11.12.2020, accepted: 19.01.2021.