

**ZASTOSOWANIE TECHNIK LASEROWEJ  
DESORPCJI/JONIZACJI W IDENTYFIKACJI  
LIPIDÓW JAKO BIOMARKERÓW RAKA  
PROSTATY**

APPLICATION OF LASER DESORPTION/IONIZATION  
TECHNIQUES IN THE IDENTIFICATION OF LIPIDS  
AS PROSTATE CANCER BIOMARKERS

**Magdalena Buszewska-Forajta<sup>1\*</sup>,  
Paweł Piotr Pomastowski<sup>2</sup>, Ewelina Maślak<sup>2,3</sup>,  
Piotr Fijałkowski<sup>3</sup>, Bogusław Buszewski<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup>*Katedra Nauk Podstawowych i Przedklinicznych, Instytut Medycyny  
Weterynaryjnej, Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych,  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu*

<sup>2</sup>*Centrum Nowoczesnych Technologii,  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu*

<sup>3</sup>*Katedra Chemii Środowiska i Bioanalizy, Wydział Chemii,  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu*

\*e-mail: [m.buszewska@umk.pl](mailto:m.buszewska@umk.pl)

---

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Metody ekstrakcji lipidów

2. Lipidy jako biomarkery chorób nowotworowych

2.1. Choroby nowotworowe

2.2. Biomarkery chorób nowotworowych

2.3. Lipidy a rak prostaty

3. Analiza lipidów technikami LDI

3.1. Krótki przegląd technik LDI

3.2. Analiza lipidów

3.3. Analiza lipidów w kontekście raka prostaty z wykorzystaniem technik LDI

Uwagi końcowe

Podziękowania


Piśmiennictwo cytowane

---



**Dr inż. Magdalena Buszewska-Forajta** w roku 2011 ukończyła studia na kierunku biotechnologia na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej. W roku 2015 uzyskała stopień doktora nauk farmaceutycznych na Wydziale Farmaceutycznym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Obecnie jest zatrudniona na stanowisku adiunkta na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu. Jest współautorem 30 artykułów naukowych. Jest laureatką kilku nagród m.in. KChA PAN, stypendystą programu Innodoktorant. Główne zainteresowania obejmują techniki separacyjne i spektrometrię mas w szczególności: GC- MS, LC-MS, metabolomikę oraz lipidomikę w zakresie badań nad molekularnym mechanizmem rozwoju chorób nowotworowych.




 <https://orcid.org/0000-0003-1401-2558>



**Dr hab. Paweł Pomastowski** w roku 2012 ukończył studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. W roku 2016 uzyskał stopień doktora nauk chemicznych, a w 2019 tytuł doktora habilitowanego na Wydziale Chemii UMK w Toruniu. Obecnie jest zatrudniony na stanowisku adiunkta w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii UMK w Toruniu. Jest współautorem 95 artykułów naukowych, oraz 5 zgłoszeń patentowych oraz wdrożeń w przemyśle mleczarskim. Jest laureatem nagród m.in. KChA PAN, stypendystą FNP oraz MNiSW. Główne zainteresowania naukowe skupiają się wokół syntezy metalokompleksów, fizykochemii powierzchni, biokolooidach, identyfikacji mikroorganizmów, technikach elektromigracyjnych, proteomice, spektrometrii mas w szczególności: MALDI/NALDI MS.



 <https://orcid.org/0000-0002-1594-0623>




**Mgr Ewelina Maślak** jest doktorantką w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, gdzie w 2020 roku uzyskała stopień magistra chemii kryminalistycznej pod opieką prof. Bogusława Buszewskiego. Tematyka jej zainteresowań dotyczy zastosowania technik elektroforetycznych oraz laserowej desorpcji/ionizacji w identyfikacji mikroorganizmów.

**Piotr Fijałkowski** – student trzeciego roku chemii medycznej. Pracę licencjacką realizuje w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky, Wydział Chemii, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu z zakresu wykorzystania technik laserowej jonizacji/desorpcji wspomaganą matrycą i nanostrukturami w analizie związków biologicznie aktywnych pod kierunkiem dr hab. Pawła Pomastowskiego.



**Prof. Bogusław Buszewski** absolwent Chemii UMCS w Lublinie. W 1986 otrzymał tytuł doktora na Słowackim Uniwersytecie Technicznym w Bratysławie. W 1992 otrzymał tytuł doktora habilitowanego, a w 1999 tytuł profesora chemii. Stypendysta Fundacji AvH. Jest Autorem 15 książek, 62 patentów i ponad 660 artykułów naukowych. Prezes CEGSS, przewodniczący KChA PAN, członek PAN i EASA. Laureat licznych nagród i wyróżnień w kraju i zagranicą. Wypromował 46 doktorantów, z których 21 uzyskało stopień doktora habilitowanego. Od 2013 r. pełnomocnik Marszałka Woj. Kujawsko-Pomorskiego ds. rozwoju nauki, badań i wdrożeń oraz innowacyjności. Główne zainteresowania naukowe: bioanalitika, -omika (metabolomika, proteomika, lipidomika itp.), techniki separacyjne (chromatografia i techniki pokrewne, adsorpcja, przygotowanie próbek), spektroskopia i spektrometria, chemometria.



 <https://orcid.org/0000-0002-5482-7500>

---

**ABSTRACT**

Mass spectroscopy has grown enormously over the past century and its variations are used in many fields. One of the methods used to ionize particles is to irradiate the sample with laser radiation. This methods are called laser desorption/ionization techniques and they have great potential for diagnostic applications. Thanks to the so-called soft ionization, direct analysis of a wide variety of compound classes can be used for rapid profiling. Lipids are a diverse group of metabolites that share a common feature of having a hydrophobic fragment. They play an important role in various cellular processes. Changes in lipidome correlate with the symptoms of various diseases. The observation of abnormalities in lipid metabolism is especially important in cancers diagnosed in many patients - such as prostate cancer. Monitoring the level of key biomarkers in the development of a given disease will allow for an earlier correct diagnosis and the use of individual treatment.

This short review presents the issues of prostate cancer and the applicability of laser desorption/ionization techniques to identify lipid biomarkers that can be used for rapid identification.

Keywords: laser desorption/ionization, lipids, biomarker, prostate cancer

Słowa kluczowe: laserowa desorpcja/jonizacja, lipidy, biomarker, rak prostaty

---

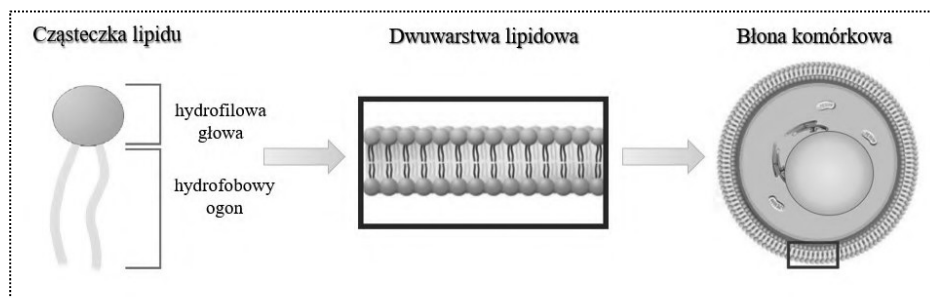
---

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

9-AA	– 9-aminoakrydyna
CE	– estry cholesterolu
DAG	– diacyloglicerole
DHB	– kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy
DIOS	– desorpcja/jonizacja na krzemie porowatym (ang. <i>desorption/ionization on silicon</i> )
FA	– kwasy tłuszczowe
HCCA	– kwas $\alpha$ -cyjano-4-hydroksycynamonowy
HR-MALDI	– wysokiej rozdzielczości laserowa desorpcja/jonizacja wspomagana matrycą
LDI	– laserowa desorpcja/jonizacja
MALDI	– laserowa desorpcja/jonizacja wspomagana matrycą (ang. <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i> )
MTBE	– eter metylo-tert-butyłowy
MTPFPF	– mezo-tetrakis(pentafluorofenylo)porfiryna
NALDI	– laserowa desorpcja/jonizacja wspomagana nanostrukturami (ang. <i>nanostructure-assisted laser desorption/ionization</i> )
PA	– kwas fosfatydowy
PC	– fosfatydylocholina
PE	– fosfatydyloetanolamina
PI	– fosfatydyloinozytol
PS	– fosfatydyloseryna
PL	– fosfolipidów
PSA	– antygen specyficzny dla prostaty
SA	– kwas sinapinowy
SALDI	– laserowa desorpcja/jonizacja wspomagana powierzchniowo (ang. <i>surface-assisted laser desorption/ionization</i> )
SELDI	– powierzchniowo wzmocniona laserowa desorpcja/jonizacja (ang. <i>surface-enhanced laser desorption/ionization</i> )
SFA	– nasycone kwasy tłuszczowe
TAG	– triacyloglicerole

## WPROWADZENIE

Lipidy, to zróżnicowana grupa metabolitów, której cechą wspólną jest posiadanie fragmentu hydrofobowego [1]. Na podstawie obecności grup ketoacylowych i izoprenowych lipidy można sklasyfikować na osiem grup: kwasy tłuszczowe (FA), glicerolipidy, glicerofosfolipidy, sfingolipidy, lipidy sterolowe, lipidy prenolowe, sacharolipidy i poliketidy. Pomimo tej niezwykłej różnorodności, głównym składnikiem strukturalnym każdej grupy lipidów są kwasy tłuszczowe [2]. Cząsteczka kwasów tłuszczowych zbudowana jest z alifatycznego łańcucha oraz polarnej grupy karboksylowej. Poszczególne cząsteczki kwasów tłuszczowych różnią się liczbą atomów węgla, a co za tym idzie, długością łańcucha acylowego oraz liczbą i położeniem wiązań wielokrotnych. W odniesieniu do ich struktury, kwasy tłuszczowe można sklasyfikować na nasycone (SFA), czyli takie, które nie posiadają podwójnych wiązań w węglowodorowych „ogonach” oraz nienasycone kwasy tłuszczowe, które zawierają co najmniej jedno wiązanie podwójne [3]. FA stanowią budulec dla bardziej złożonych lipidów, w tym fosfolipidów (PL), które razem z cholesterolem i sfingolipidami są głównymi składnikami błon komórkowych. Ponadto, ich występowanie w komórkach organizmów żywych odpowiada m. in. za magazynowanie energii (tłuszcze, oleje), przebieg szlaków metabolicznych (hormony, sterydy, część witamin) oraz przenoszenie tlenu/elektronów (hem) [1].



Rysunek 1. Schemat budowy błony komórkowej  
Figure 1. Diagram of the structure of the cell membrane

### 1. METODY EKSTRAKCJI LIPIDÓW

W badaniach lipidomicznych, etap przygotowania próbki warunkuje poprawność i wiarygodność uzyskanych wyników. Obejmuje ekstrakcję metabolitów z matryc biologicznych, dzięki zastosowaniu organicznych i nieorganicznych rozpuszczalników w odpowiednich proporcjach. Układ rozpuszczalników powinien ekstrahować lipidy w czystej postaci, bez wprowadzania zanieczyszczeń innych niż o charakterze lipidowym (m. in. cukry,

peptydy, aminokwasy), które mogą zostać uwiecznione w micelach lipidowych i tym samym przeniesione do warstwy organicznej. Ponadto, zastosowana mieszanina rozpuszczalników ma na celu oddzielić i dezaktywować wszelkie enzymy lipolityczne, które mogłyby doprowadzić do rozkładu lipidów, uzyskanych na drodze ekstrakcji. Rozpuszczalniki polarne stosowane są do dysocjacji amfipatycznych kompleksów lipidowych z błon komórkowych (takie rodzaje lipidów nie rozpuszczają się zwykle w niepolarnych rozpuszczalnikach). Warto jednak nadmienić, że zbyt polarny układ rozpuszczalników może zakłócić ekstrakcję lipidów niepolarnych lub spowodować reakcję chemiczną z innymi klasami lipidów (m.in. z triacyloglicerolami). Odzysk lipidom przy użyciu rozpuszczalników do ekstrakcji typu ciecz-ciecz zależy na ogół od rodzaju stosowanej matrycy (np. komórki, osocze, tkanki, materiał roślinny) i skutecznego rozdzielania klas lipidów w warstwie organicznej [3].

Powszechnie stosowane są trzy metody ekstrakcji: metoda Folcha, Bligh-Dyer'a i Matyasha. **Metoda Folcha** została opracowana w 1951 roku w celu izolacji lipidów z tkanek mózgu. Technika ta wykorzystuje dwufazowy układ rozpuszczalników składający się z chloroformu/metanolu/wody w stosunku objętościowym 8:4:3 (v/v/v) [4]. Pierwszy etap obejmuje ekstrakcję typu ciało stałe-ciecz, zaś drugi ekstrakcję typu ciecz-ciecz. Próbkę biologiczną jest początkowo homogenizowana w jednofazowej mieszaninie chloroform/metanol/woda. W drugim etapie dodanie większej ilości wody, powoduje spontaniczne utworzenie układu dwufazowego. Wstępnie wyekstrahowana mieszanina biomolekuł zostaje podzielona na dwie fazy: pierwszą z nich stanowi faza organiczna bogata w substancje organiczne, drugą zaś faza wodna, zawierająca inne związki rozpuszczalne w wodzie na przykład: cukry, białka [5]. **Metoda Bligh & Dyer'a** (B&D) wykorzystuje układ rozpuszczalników składający się podobnie jak w przypadku metody Folcha z chloroformu, metanolu oraz wody, jednak w stosunku 2:2:1,8 (v/v/v), co redukuje ilość wykorzystywanego chloroformu. Metoda ta została opracowana w 1959 roku przez E. G. Bligha i W. J. Dyer'a jako szybka procedura izolacji lipidów z mięśni ryb [6]. Dzięki prostocie wykonania, obie metody są nadal szeroko stosowane do oznaczania lipidów w biopaliwach, laboratoriach szpitalnych, farmaceutycznych czy spożywczych. Jednakże, konieczność zastosowania chloroformu, będącego związkiem wysoce toksycznym i kancerogennym, czyni te metody nieodpowiednimi do stosowania na dużą skalę [5].

W 2008 roku opracowana została nowa, alternatywna metoda ekstrakcji lipidów- **metoda Matyasha**, która stanowi udoskonalenie wyżej wspomnianych metod [7]. Zastosowanie nietoksycznego eteru metylo-tert-butyłowego (MTBE) stanowi alternatywę dla chloroformu. Wykorzystanie MTBE jako rozpuszczalnika

jest bezpieczniejsze i umożliwia redukcję stosowania niebezpiecznych substancji chemicznych w laboratoriach [8]. Kolejną przewagą MTBE nad chloroformem jest jego niższy koszt i wyższa stabilność. Ponadto, jest bardziej polarny, przez co w większym stopniu miesza się z wodą bez separacji faz. W konsekwencji faza organiczna zawiera więcej wody i tym samym poprawia skuteczność ekstrakcji dla poszczególnych klas lipidów o charakterze kwasowym [6]. Stosunek objętościowy MTBE/MeOH/H<sub>2</sub>O dla metody Matyasha wynosi odpowiednio 10:3:2,5 (v/v/v) [9]. W metodzie Matyasha, faza organiczna stanowi górną warstwę, dzięki czemu ryzyko zanieczyszczenia próbki jest zredukowane [6]. Wykazano, że metodę tą cechuje wyższa specyficzność względem Bligh&Dyer czy Folcha. Ponadto, metoda Matyasha może zostać wykorzystana do automatycznego profilowania [7].

## 2. LIPIDY JAKO BIOMARKERY CHORÓB NOWOTWOROWYCH

### 2.1. CHOROBY NOWOTWOROWE

Choroby nowotworowe to grupa chorób obejmujących nieprawidłowy wzrost komórek, których podział zachodzi w niekontrolowany sposób, a nowo powstałe komórki nie różnicują się w swoiste komórki tkankowe. Choroby te stanowią, drugą co do częstości, przyczynę zgonów na całym świecie. W 2018 roku zdiagnozowano raka u 17 milionów ludzi, a 9,6 miliona zmarło w jego wyniku [10]. Na proces nowotworzenia wpływają zarówno czynniki genetyczne jak i środowiskowe, a jego rozwój wpływa na funkcjonowanie całego organizmu [11]. Początek nowotworu polega na niekontrolowanym wzroście komórek, ich podziale i przenoszeniu z jednego organu do drugiego, dając początek nowym ogniskom choroby. Do komórek nowotworowych docierają sygnały, które są przekazywane następnie do ich jąder komórkowych w celu aktywacji genów związanych ze wzrostem, agresywnością, angiogenezą, przeżywalnością komórek lub proliferacją. Pierwszym etapem prowadzącym do przerzutu jest ingerencja nowotworu w komórki śródbłonna. Wykorzystując system krwionośny, komórki nowotworowe migrują po organizmie w celu dotarcia do organu docelowego, gdzie są osadzone na błonie podstawnej. Tak osadzone komórki rakowe ulegają wzmożonej proliferacji prowadzącej do powstania guza [11]. Błony komórkowe biorą udział we wszystkich, wyżej opisanych, procesach. Ich głównym składnikiem są lipidy, dlatego też można przypuszczać, że ta grupa związków ma znaczący wpływ na rozwój chorób nowotworowych.

## 2.2. BIOMARKERY CHORÓB NOWOTWOROWYCH

Biomarker to zdefiniowana cecha, która jest mierzona jako wskaźnik normalnych procesów biologicznych, procesów patogennych lub odpowiedzi na narażenie lub interwencję [14]. Biomarker diagnostyczny umożliwia identyfikację lub potwierdzenie występowania danej choroby czy też stanu będącego przedmiotem zainteresowania. Jego oznaczenie wykorzystywane jest do różnicowania pacjentów ze względu na podtypy danej jednostki chorobowej, jak również, do badania reakcji organizmu na zastosowany sposób leczenia. Oznaczenie potencjalnego biomarkera, przy użyciu testu o wysokiej czułości analitycznej i swoistości, powinno być łatwe i powtarzalne. Test opracowany na bazie wyselekcjonowanego metabolitu bądź panelu związków powinien być niezawodny, rzetelny i efektywny [12].

Markery mogą być produkowane przez samego guza lub przez inne tkanki, jako odpowiedź na obecność nowotworu lub innych, związanych z nim, stanów m.in. stan zapalny. Biomarkerami nowotworów mogą być takie indywidualne jak: DNA, mRNA, białka, lipidy, metabolity, jak również procesy takie jak: apoptoza, angiogeneza czy proliferacja [13]. Jedną z cech charakterystycznych dla komórek nowotworowych jest wzmożone zapotrzebowanie na lipidy. Mechanizm pozyskiwania lipidów z dodatkowych źródeł może być dwojaki. Pierwszy z nich bazuje na nadmiernej ekspresji enzymów przez komórki nowotworowe w celu syntezy lipidów *de novo*, co w ujęciu klinicznym wiąże się z gorszym rokowaniem chorych na raka prostaty czy piersi. Drugi zaś, polega na pobieraniu egzogennych lipidów przez komórki nowotworowe, co aktywnie stymuluje uwalnianie zmagazynowanych lipidów (proces ten nazywany jest lipolizą) [14].

Oba mechanizmy prowadzą do zmian profilu jakościowego, jak i ilościowego lipidów w organizmie. Pełny profil lipidów w układach biologicznych (komórka, tkanka, organizm) nazywany jest lipidomem. Jest on dynamiczny i zależy od wielu czynników (wiek, płeć, styl życia, dieta, stan ogólny organizmu, przyjmowane farmaceutyki). Analiza lipidomu jest bardzo trudna ze względu na różnorodność klas lipidów i ich odmienne właściwości fizykochemiczne [15]. Z drugiej strony, lipidy odgrywają ważną rolę w różnych procesach komórkowych, dlatego też, mogą stanowić cenne źródło informacji w zakresie patomechanizmu. Nowe podejście obejmuje badania korelacji pomiędzy zmianami w lipidomie a klinicznymi objawami choroby, co wskazuje na znaczenie lipidów jako potencjalnych biomarkerów raka. Zrozumienie związku pomiędzy chorobą a lipidomem nie tylko zapewnia lepszy wgląd w jej patogenezę, ale ma również kluczowe znaczenie dla opracowania nowych biomarkerów i strategii terapeutycznych [2]. Lipidomika rozwija się wraz z poprawą czułości i precyzji metod analitycznych, wykorzystywanych do jakościowego i ilościowego profilowania lipidów. Tym



samym oczekuje się, że coraz więcej ligandów lipidowych może być wykorzystywanych w badaniach klinicznych. Analiza lipidomiczna opiera się głównie na zastosowaniu chromatografii cieczowej, spektrometrii mas w tym laserowej desorpcji/ionizacji wspomaganej matrycą (MALDI), które pozwalają na analizę lipidów o różnorodnych właściwościach fizykochemicznych, takich jak polaryzacja, rozpuszczalność czy masa cząsteczkowa [16].

Liczne badania dowiodły, że lipidy mogą służyć jako obiecujący biomarker we wczesnym diagnozowaniu i zindywidualizowanym leczeniu nowotworów. Dane literaturowe wskazują na wzrost poziomu lipidów wraz z rozwojem nowotworu. Na przykład, wykazano podwyższony poziom lizofosfolipidów w raku jajnika [17], glicerofosfolipidów w raku wątroby [18], acylokarnityn i glicerofosfolipidów w raku prostaty [19], fosforanu sfingolipidu w raku jajnika, glejaka czy raku piersi [20]. Istnieją także dowody, że metabolizm lipidów jest związany z rakiem jelita grubego [21]. Dowiedziono, że rozwój gruczolaka jelita grubego indukuje zmiany wysokocząsteczkowych triglicerydów w surowicy. Wyniki badań wskazujące, iż lipidy mogą być traktowane jako biomarkery raka, są stopniowo przekładane na zastosowania kliniczne. Przykładem mogą być związana z eterem fosfatydyloetanoloamina czy fosfatydylocholina. Oba metabolity uznane są za swoiste biomarkery raka gruczołu krokowego [22]. Według ostatnich doniesień, lipidy mogą być wykorzystane do diagnostyki raka piersi. W tym celu kilka klas lipidów jest ekstrahowanych z 1 ml moczu pacjenta [23].

### 2.3. LIPIDY A RAK PROSTATY

Według statystyk Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) rak gruczołu krokowego jest drugim, najczęściej występującym rakiem u mężczyzn, oraz czwartym najczęściej występującym rakiem w ogóle [24]. W 2020 roku u ponad 1,4 miliona mężczyzn zdiagnozowano raka prostaty, a ponad 375 tysięcy pacjentów zmarło z jego powodu. W przypadku Europy zachorowalność na ten rodzaj raka jest najwyższa. Na całym świecie, aż 33,5% nowych przypadków zdiagnozowano wśród Europejczyków. Od 2015 roku liczba zgonów w Europie spadła o 7%, co niezaprzeczalnie jest zasługą lepszej diagnostyki (wczesne wykrycie nowotworu gruczołu krokowego daje nawet 90% szans na wyleczenie). Niestety, wyżej wymienione statystyki nie odnoszą się do Polski, gdzie w 2020 roku, zarejestrowano ponad 18 tysięcy nowych przypadków i ponad 7 tysięcy zgonów. Jest to konsekwencja diagnostyki choroby w jej zaawansowanym stadium.

Najczęściej stosowanym biomarkerem do identyfikacji raka prostaty jest białko PSA (z ang. *prostate specific antygen*), wytwarzane zarówno przez zdrowe jak i rakowe komórki gruczołu krokowego [25]. PSA jest markerem specyficznym

tkankowo, jednakże nie nowotworowo. Jest ono kontrowersyjne pod względem swojej specyficzności i czułości w różnych populacjach. Diagnostyka bazująca na oznaczaniu PSA prowadzi do „nadrozpoznienia” raka prostaty u chorych, z ograniczonym potencjałem do progresji choroby. Dlatego też, nadal poszukuje się swoistych wskaźników, które umożliwią postawienie trafnej diagnozy. Dotychczasowe badania wskazują, że jedną z grup związków, które mogą być skutecznymi markerami o znaczeniu klinicznym, są lipidy. Zaburzenia w metabolizmie lipidów zaobserwowano nie tylko podczas etapu nowotworzenia ale również podczas progresji choroby. Dysfunkcja obejmuje zmiany w lipidomie i jest spowodowana zwiększoną lipogenezą, wychwytywaniem lipidów i przebudową fosfolipidów [16]. W porównaniu do innych rodzajów nowotworów, kwasy tłuszczowe stanowią podstawowy substrat energetyczny dla komórek raka prostaty. Jest to odmienne do innych chorób nowotworowych, gdzie podstawowym źródłem energii jest glukoza.

W obrazie klinicznym, konsekwencją tych zaburzeń jest podwyższony poziom, zwłaszcza osoczowych kwasów tłuszczowych, m.in. kwasu mirystynowego, kwasu  $\alpha$ -linolowego i kwasu eikozapentaenowego, co potęguje wzrost ryzyka rozwoju złośliwego raka prostaty [22]. Kolejnym metabolitem, którego obniżony poziom wiąże się z rakiem prostaty jest lizofosfatydylocholina. W przypadku nawrotu raka zaobserwowano zmniejszenie całkowitej zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, omega-3, kwasu sterynowego czy arachidonowego oraz zwiększenie całkowitej zawartości mononienasyconych kwasów tłuszczowych i kwasu oleinowego [26]. Ponadto, wiele badań sugeruje, iż podwyższony poziom kinazy choliny, której zadaniem jest uwalnianie choliny, a także fosfocholina - produkt fosforylacji choliny i prekursor fosfatydylocholiny, mogą stanowić marker wielu nowotworów złośliwych, w tym również raka prostaty [27].

Na szczególną uwagę zasługuje cholesterol i jego pochodne. Komórki gruczołu krokowego są zależne od androgennych hormonów, które biorą udział w syntezie, metabolizmie czy w transporcie lipidów. W procesie produkcji tych hormonów istotną rolę odgrywa cholesterol, metabolit, który jest punktem wyjściowym dla przemian steroidowych. Badania Li i wsp. (2016 roku) dowiodły, że zarówno cholesterol jak i jego estry są potencjalnymi biomarkerami raka prostaty. Oznaczenie zestawu wyżej wymienionych analitów umożliwiło rozróżnienie raka prostaty od formy indolentnej czy też łagodnego przerostu gruczołu krokowego [28].

### 3. ANALIZA LIPIDÓW TECHNIKAMI LDI

#### 3.1. KRÓTKI PRZEGLĄD TECHNIK LDI

W ciągu ostatniej dekady zaobserwowano rozwój technik analitycznych, w szczególności spektroskopii mas (MS). Wszystko rozpoczęło się w 1911 roku, kiedy to Joseph John Thompson skonstruował pierwszy na świecie spektrometr mas. Od tamtego czasu dzięki ciągłemu doskonaleniu, technika ta jest niezwykle ceniona ze względu na możliwość identyfikacji związków chemicznych oraz precyzyjne określanie ich struktur. Niewątpliwie do rozwoju w tym kierunku, przyczyniło się opracowanie łagodnych metod jonizacji, do których możemy zaliczyć między innymi techniki laserowej desorpcji/ionizacji (LDI z ang. *laser desorption/ionization*). Metody LDI znalazły zastosowanie w proteomice, metabolomice, lipidomice oraz w chemii materiałów i polimerów.

Mechanizm LDI polega na desorpcji, a następnie jonizacji analizowanej próbki przy pomocy impulsu lasera trwającego kilka nanosekund. Znanych jest kilka metod jonizacji neutralnej cząsteczki. Wśród nich wyróżnić można:

- termiczną dysocjację, której towarzyszy powstanie pary kation – anion,
- oderwanie bądź przyłączenie elektronu,
- oderwanie lub przyłączenie protonu,
- przyłączenie kationu [29].

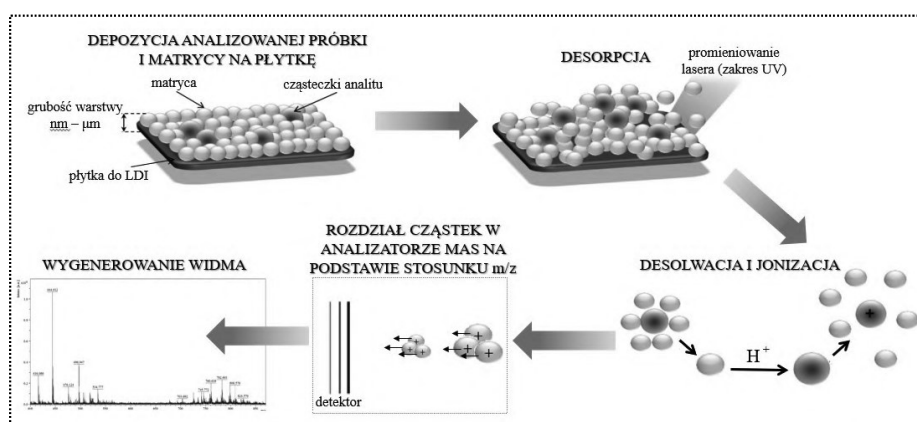
Istnieje wiele wariacji technik laserowej desorpcji/ionizacji. Najważniejsze z nich opisano poniżej.

Najczęściej stosowaną techniką jest laserowa desorpcja/ionizacja wspomagana matrycą (**MALDI** z ang. *matrix-assisted laser desorption/ionization*). Metoda ta po raz pierwszy została wprowadzona w 1988 roku przez Hillenkamp i Karasa i stała się powszechnym narzędziem analitycznym do badania peptydów, białek i innych biomolekuł. W procesie przygotowania próbki anality rozpuszcza się w lotnym rozpuszczalniku, na przykład mieszaninie wody, acetonitrylu i metanolu. Następnie, taki roztwór miesza się z matrycą (związek organiczny absorbujący promieniowanie z zakresu UV), w taki sposób aby stosunek zawartości próbki do matrycy wynosił 1:10000. Sporządzoną mieszaninę umieszcza się później na stoliku desorpcyjnym i suszy w celu odparowania rozpuszczalnika i uzyskania jednorodnego kryształu badanej substancji z matrycą (Rys. 2). MALDI zalicza się do miękkich metod jonizacji, ponieważ w większości przypadków, w wyniku jonizacji, nie dochodzi do degradacji badanej substancji oraz niekontrolowanej fragmentacji w źródle jonów.

Jest to możliwe dzięki zastosowaniu matrycy, która przekształca główną część energii cieplnej w energię wibracji wiązań chemicznych, a następnie pochłania ją, przez co chroni analit przed degradacją [29, 30]. MALDI ma jednak pewne

ograniczania. Ze względu na obecność matrycy, technika ta może być wykorzystywana do oznaczania związków o masie cząsteczkowej większej niż 2000 Da. W przypadku jonów o masie cząsteczkowej mniejszej niż 2000 Da, dochodzi do zjawiska tłumienia (supresji) jonów, przez jony matrycy jak i ich klastry sodowo - potasowe, będące w nadmiarze w stosunku do analitu.

Brak możliwości analizy związków niskocząsteczkowych spowodował opracowanie wielu alternatywnych odmian tej techniki nie wymagających użycia matrycy.



Rysunek 2. Schemat przeprowadzania analizy za pomocą techniki MALDI

Figure 2. Diagram of the analysis performing with the use of MALDI technique

Laserowa desorpcja/jonizacja wspomagana nanostrukturami (**NALDI** z ang. *nanostructure-assisted laser desorption/ionization*) umożliwia analizę związków niskocząsteczkowych poprzez zastosowanie nanostruktur metali (np. złoto, srebro, cynk lub ich tlenki). Mechanizm w NALDI opiera się na zastosowaniu układów nanocząsteczkowych, które są dawcami ładunku podczas jonizacji próbki. Proces jonizacji nie jest jednoznacznie opisany, jednakże najczęściej przyjmuje się, że jest on powiązany z występowaniem powierzchniowego rezonansu plazmowego [30].

Kolejną techniką jest laserowa desorpcja/jonizacja wspomagana powierzchniowo (**SALDI** z ang. *surface-assisted laser desorption/ionization*), w której pochłaniającą energię lasera przyjęto stosować ciekłą warstwę cząstek węgla aktywnego unieruchomioną na podłożu z aluminium. Warstwa powierzchniowa nie zakłóca jednak sygnałów pochodzących od analitu. Materiałami skutecznie wykorzystywanymi przez SALDI są między innymi materiały nieorganiczne, takie jak grafit, nanorurki węglowe czy proszki metaloksydów [31].

Powierzchniowo wzmocniona laserowa desorpcja/ionizacja (**SELDI** a ang. *surface-enhanced laser desorption/ionization*) polega na wykorzystywaniu specjalnie zaprojektowanych macierzy nazywanych ProteinChip, które zawierają chemicznie lub biochemicznie modyfikowane powierzchnie. Płytki SELDI występują w różnych odmianach, między innymi jako podłoża wykorzystujące oddziaływania hydrofobowe, hydrofilowe, jonowe, atomowe czy także oddziaływania antygen-przeciwciała, które wchodzi w interakcje z białkami, kwasami nukleinowymi lub innymi cząsteczkami o określonych właściwościach fizykochemicznych [30].

Istnieje również technika wykorzystująca do jonizacji porowaty krzem – desorpcja/ionizacja na krzemie porowatym (**DIOS** z ang. *desorption/ionization on silicon*). W procesie wytrawiania galwanostaticznego powstaje mikrometrowa warstwa porowata o architekturze nanokrystalicznej, która po wystawieniu na działania promieniowania ultrafioletowego nie dopuszcza do fotoluminescencji. DIOS pozwala na bezpośrednią analizę związków o małej masie cząsteczkowej, takich jak: cukry, peptydy, glikolipidy, leki [32].

### 3.2. ANALIZA LIPIDÓW

Przy użyciu technik LDI można oznaczyć różne klasy lipidów, do których możemy zaliczyć między innymi: wolne kwasy tłuszczowe, cholesterol i jego estry, sfingolipidy, glicerolipidy, di- i triacyloglicerole czy też glikoglicerolipidy.

Analiza wolnych kwasów tłuszczowych przy użyciu standardowych matryc, takich jak DHB (kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy) czy HCCA (kwas  $\alpha$ -cyjano-4-hydroksycynamonowy), może być stosunkowo trudna, ponieważ dochodzi do nakładania się sygnałów pochodzących od analitów i zastosowanej matrycy. Problem ten jest w szczególności obserwowany, gdy stężenie kwasów tłuszczowych występujących w próbce jest niskie [33]. Dlatego też, do analizy lipidów stosuje się matryce o wysokiej masie cząsteczkowej jak np. mezo-tetrakis(pentafluorofenylo)porfiryne (MTPFPP). Matryca ta, dedykowana jest oznaczeniom lipidów o masach cząsteczkowych w zakresie 200 – 350 Da. W przypadku MTPFPP, nie obserwujemy sygnałów pochodzących od matrycy, gdy analizy przeprowadzane są w trybie jonizacji dodatniej, w zakresie  $m/z$  do 500 Da. Kolejną matrycą skuteczną do oznaczania kwasów tłuszczowych jest 9-aminoakrydyna (9-AA), jednakże jej zastosowanie warunkuje przeprowadzenie analiz w trybie jonizacji ujemnej. Kwasy tłuszczowe można również oznaczyć, przy użyciu matryc nieorganicznych, takich jak grafit czy porowaty krzem (DIOS) [34]. W przypadku tych matryc, system wykazuje jednak dość niską czułość.

W przypadku glikolipidów (glikoglicerolipidy i glikosfingolipidy), diacylogliceroli (DAG) i triacylogliceroli (TAG) powszechnie stosowaną matrycą

jest DHB. Cechą charakterystyczną dla tych związków jest tworzenie specyficznych adduktów z sodem. W przypadku fosfolipidów nie znaleziono do tej pory uniwersalnej matrycy. Jej wybór zależy od klasy fosfolipidów będących przedmiotem badań. Przy czym, najlepsze wyniki pod względem czułości, rozdzielczości i zakresu fragmentacji uzyskano dla kwasu sinapinowego (SA), HCCA i DHB. Niemniej jednak, bez względu na zastosowaną matrycę, poszczególne klasy fosfolipidów są oznaczane z różną czułością. Przykładowo, fosfatydylocholina (PC) jest oznaczana z wysoką czułością przy stężeniu 0,5 pmol lub 0,4 ng, zaś do analizy fosfatydyloetanolaminy (PE) należy zastosować wzorzec o znacznie wyższym stężeniu. Z kolei ze względu na ujemny ładunek fosfatydyloinozytol (PI), fosfatydyloseryna (PS) i kwas fosfatydowy (PA) są wykrywane z jeszcze niższą czułością. Dowodzi to jak trudna jest analiza mieszaniny fosfolipidów, ze względu na tłumienie sygnałów pozostałych PL przez PC. W takim przypadku niezbędne jest stosowanie co najmniej jednego standardu wewnętrznego dla każdej klasy lipidów [35]. Wang i wsp. wskazali na możliwość zastosowania tlenku grafenu jako matrycy do badania fosfolipidów [36]. Analiza fosfolipidów jest również możliwa dzięki zastosowaniu matryc na bazie cieczy jonowych. Wykorzystane przez Li i wsp. pochodnych anilinowych umożliwiło analizę fosfolipidów na poziomie pmol/spot. Zastosowanie soli aminowych HCCA oraz SA umożliwiło również na identyfikację i oznaczenie szeregu związków niskocząsteczkowych w tym kwasów tłuszczowych oraz fosfolipidów w układzie MADLI [37].

Kolejnym analitem, trudnym do oznaczenia za pomocą MALDI, jest cholesterol. Jest to konsekwencją nakładania się sygnału pochodzącego od analitu z tłem matrycy. Ponadto, technika MALDI dość rzadko jest stosowana do analizy cholesterolu, ze względu na niską powtarzalność i relatywnie wysokie koszty analizy. Obecnie, na rynku dostępne są zestawy testów enzymatycznych, służących do szybkiego oznaczania stężenia cholesterolu i jego estrów (CE). Jednakże, preferencyjną metodą dla tych metabolitów jest metoda chromatografii cieczowej sprzężonej z spektrometrią mas (HPLC-MS) [35].

### 3.3. ANALIZA LIPIDÓW W KONTEKŚCIE RAKA PROSTATY Z WYKORZYSTANIEM TECHNIK LDI

W diagnostyce nowotworów istotną rolę odgrywa analiza parametrów nowotworowych w tkankach prostaty i płynach ustrojowych, takich jak krew czy moczu. Goto i wsp. przeprowadzili analizę tkanek prostaty przy wykorzystaniu techniki MALDI o wysokiej rozdzielczości (HR-MALDI) [38]. Jako matrycę wykorzystano półwodną 9-aminoakrydynę. Kluczowym wynikiem badań było zidentyfikowanie dwudziestu wysoce ekspresyjnych fosfolipidów, z czego 14

z nich to lizofosfatydyloinozytyle i fosfatydyloinozytyle, 3 to fosfatydyloetanoaminy oraz 3 kwasy fosfatydowe na poziomie granicy wykrywalności (LOD) nmol-fmol/spot. Autorzy wskazali na kilka z fosfatydyloinozytoli, jako potencjalnych markerów komórek raka gruczoły krokowego. W kolejnym doświadczeniu ci sami badacze zaproponowali kolejny związek należący do lizofosfatydyloinozytoli, którego poziom jest znacznie niższy w tkance raka prostaty niż w prawidłowym nabłonku [39].

Buszewska-Foraja i wsp. dzięki zastosowaniu klasycznych matryc DHB oraz HCCA zidentyfikowała, w trybie jonizacji dodatniej MALDI, fosfatydylocholinę, lizofosfatydylocholinę, sfingomielinę i fosfatydyloetanoaminy izolowane z tkanek raka prostaty na poziomie LOD = nmol/spot. Wykazano, związek pomiędzy wzmożoną syntezą kwasów tłuszczowych, utlenianiem lipidów oraz dysfunkcją szlaków metabolicznych a procesem nowotworzenia [40].

Wykorzystanie matryc HCCA, DHB oraz SA w obrazowaniu tkanek w układzie MALDI umożliwiło na wskazanie potencjalnych markerów raka prostaty m.in. z grupy fosfatydyloinozytoli, pochodnych siarczanowych cholesterolu na poziomie wykrywalności mmon-pmol/skrawek tkanki [41].

W przypadku raka prostaty mocz rozważany jest jako matryca preferencyjna, ponieważ jego skład w bezpośredni sposób odzwierciedla zmiany w funkcjonowaniu układu moczowo-płciowego. W 2019 roku Ossoliński i wsp. dokonali profilowania metabolitów nowotworu prostaty znajdujących się w płynach ustrojowych (krew, mocz oraz płyn śródmiąższowy z rdzenia biopsyjnego) wykorzystując spektrometryczną technikę laserowej desorpcji/jonizacji wspomaganą matrycą [42]. Analizę przeprowadzono przy użyciu wysokorozdzielczej LDI, wykorzystując płytki pokryte nanocząsteczkami złota (NALDI). Dzięki temu możliwe było uzyskanie LOD rzędu nmol/spot. Wykryto łącznie cztery metabolity dla moczu, dwadzieścia dwa metabolity dla surowicy oraz dziesięć metabolitów dla rdzenia biopsyjnego, które wykazały zróżnicowanie między grupą nowotworową a kontrolną. W przypadku pacjentów cierpiących na raka prostaty zaobserwowano obniżenie stężenia skwalenu i kwasu alfa-linolenowego w surowicy oraz zmniejszenie intensywności siarczanu cholesterolu i podwyższenie poziom triglicerydów w moczu. Ponadto, w porównaniu z grupą kontrolną, u chorych zaobserwowano niedobór witaminy D i podwyższoną ilość metabolitów witaminy C w surowicy.

## UWAGI KOŃCOWE

W publikacji tej przedstawiono możliwość zastosowania technik laserowej desorpcji/jonizacji do identyfikacji biomarkerów lipidowych dla raka prostaty. Techniki laserowej desorpcji/jonizacji wykazują ciągle rosnący potencjał aplikacyjny w zakresie

jakościowej i ilościowej analizy różnych rodzajów związków chemicznych. Dzięki tak zwanej „miękkiej” jonizacji, umożliwiają one bezpośrednią analizę związków niskocząsteczkowych i ich metabolitów. Jedną z grup związków o potencjalnych właściwościach diagnostycznych stanowią lipidy. Jest to zróżnicowana grupa metabolitów, która odgrywa ważną rolę w różnych procesach komórkowych. Zmiany w lipidomie korelują się z objawami różnych chorób. Obserwacja nieprawidłowości w metabolizmie lipidów jest szczególnie ważna w przypadku nowotworów rozpoznawanych u wielu pacjentów - takich jak rak prostaty. Monitorowanie poziomu kluczowych biomarkerów w rozwoju danej choroby pozwoli na wcześniejszą prawidłową diagnozę i zastosowanie dopasowanego do pacjenta leczenia.

### PODZIĘKOWANIA

Praca została zrealizowana w ramach projektu Sonata (UMO-2016/21/D/ST4/03730) finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] T. Ahern, Rajagopal, *Toxicol. Sci.*, 2014, **137**.
- [2] A. Pakiet, J. Kobiela, P. Stepnowski, T. Sledzinski, A. Mika, *Lipids Health Dis.*, 2019, **18**, 1.
- [3] C. Z. Ulmer, C. M. Jones, R. A. Yost, T. J. Garrett, J. A. Bowden, *Anal. Chim. Acta*, 2018, **1037**, 35.
- [4] L.F. Eggers, D. Schwudke, “Encyclopedia of Lipidomics,” *Encycl. Lipidomics*, vol. 3, 2019.
- [5] C. Breil, M. Abert Vian, T. Zemb, W. Kunz, F. Chemat, *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, **18**, 1.
- [6] L.F. Eggers, “Encyclopedia of Lipidomics,” *Encycl. Lipidomics*, 2019.
- [7] V. Matyash, G. Liebisch, T.V. Kurzchalia, A. Shevchenko, D. Schwudke, *J. Lipid Res.*, 2008, **49**, 113.
- [8] R.E. Patterson, A.J. Ducrocq, D.J. McDougall, T.J. Garrett, R.A. Yost, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2015, **1002**, 260.
- [9] J. Sostare *et al.*, *Anal. Chim. Acta*, 2018, **1037**, 301.
- [10] “Cancer Research UK,” <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer#heading-Zero> [dostęp: 2021-05-10].
- [11] A.Z. Fernandis, M.R. Wenk, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2009, **877**, 2830.
- [12] R.M. Califf, *Exp. Biol. Med.*, 2018, **243**, 213.
- [13] N.L. Henry, D. F. Hayes, *Mol. Oncol.*, 2012, **6**, 140.
- [14] L.M. Butler, M. M. Centenera, J. V Swinnen, *Endocr. Relat. Cancer*, 2016, **23**, R219.
- [15] G. Larrouy-Maumus, *Curr. Med. Chem.*, 2018, **26**, 1924.
- [16] F. Yan, H. Zhao, Y. Zeng, *Clin. Transl. Med.*, 2018, **7**, 21.
- [17] R. Sutphen *et al.*, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2004, **13**, 1185.
- [18] L. Lin *et al.*, *Hepatology*, 2017, **66**, 432.
- [19] G.F. Giskeødegård *et al.*, *Br. J. Cancer*, 2015, **113**, 1712.
- [20] J. Van Brocklyn, *Mini-Reviews Med. Chem.*, 2007, **7**, 984.
- [21] M.H. Yang *et al.*, *Am. J. Gastroenterol.*, 2013, **108**, 833.
- [22] X. Zhou *et al.*, *PLoS One*, 2012, **7**.



- [23] H. Kim, H. K. Min, G. Kong, M. H. Moon, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, **393**, 1649.
- [24] WHO, "Poland, Source: Globocan 2020," 2020.  
<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/616-poland-fact-sheets.pdf> [dostęp: 2021-05-10].
- [25] K.A.O. Tikkinen *et al.*, *BMJ*, 2018, **362**.
- [26] X. Zhou, *J. Glycomics Lipidomics*, 2014, **04**.
- [27] K. Jelonek, M. Ros, M. Pietrowska, P. Widlak, *Clin. Lipidol.*, 2013, **8**, 137.
- [28] J. Li *et al.*, *Sci. Rep.*, 2016, **6**, 1.
- [29] A. Bajuk, L. Michalak, K. Głuch, *Elektron. Konstr. Technol. Zastos.*, 2001, **42**, 51.
- [30] P. Pomastowski, B. Buszewski, *Nanomaterials*, 2019, **9**, 1.
- [31] K.P. Law, J.R. Larkin, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **399**, 2597.
- [32] J. Wei, J.M. Buriak, G. Siuzdak, *Nature*, 1999, **399**, 243.
- [33] B. Drożdż, "Spektroskopia masowa Materiały do ćwiczeń," Uniwersytet Jagielloński 2016.
- [34] B. Fuchs, R. Süß, J. Schiller, *Prog. Lipid Res.*, 2010, **49**, 450.
- [35] J. Leopold, Y. Popkova, K. M. Engel, J. Schiller, *Biomolecules*, 2018, **8**.
- [36] Z. Wang, Y. Cai, Y. Wang, X. Zhou, Y. Zhang, H. Lu, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 1.
- [37] L. Ying *et al.*, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2004, **15**, 1833.
- [38] T. Goto *et al.*, *PLoS One*, 2014, **9**, 1.
- [39] T. Goto *et al.*, *Prostate*, 2015, **75**, 1821.
- [40] M. Buszewska-Forajta *et al.*, *Cancers*, 2021, **21**, 2000
- [41] A. Kurreck *et al.*, *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2018, **21**, 297.
- [42] K. Ossoliński *et al.*, *J. Cancer Metastasis Treat.*, 2019, **2019**.

Praca wpłynęła do Redakcji 14 maja 2021 r.