

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Lek. Aleksandra Hincz

Ocena potencjalnej wartości diagnostycznej i prognostycznej ekspresji produktu genu ALOX-15 i szpikopochodnych komórek LCA dodatnich w nowotworach ośrodkowego układu nerwowego oraz roli procesów frakcjonowania izotopowego w tkance nowotworowej i jej otoczeniu

Praca w ramach projektu „InterChemMed - Interdyscyplinarne studia doktoranckie łódzkich uczelni publicznych”

współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Działania 3.2
Studia doktoranckie Osi priorytetowej III Szkolnictwo wyższe dla gospodarki i rozwoju
Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020 ([1]POWR.03.02.00-00- [2]1029/16)

Promotorzy:

Prof. UM dr hab. n. med. Katarzyna Taran

Prof. dr hab. inż. Piotr Paneth



Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Katedra Onkologii

Zakład Patomorfologii

Pracownia Frakcjonowania Izotopowego w Procesach Patologicznych

Kierownik Katedry Prof. dr hab. n. med. Radziśław Kordek



**UNIWERSYTET
MEDYCZNY
W ŁODZI**

Łódź 2022

Serdeczne podziękowania dla:

**Pani Profesor UM dr hab. n. med. Katarzyny Taran
za inspirację, cierpliwość i niezwykle cenne rady**

**Pana Profesora dr. hab. inż. Piotra Panetha
za opiekę naukową i merytoryczne uwagi**

**Pana Prof. dr. hab. n. med. Radzisława Kordka
Kierownika Katedry Onkologii Zakładu Patomorfologii UM w Łodzi**

oraz

**Pana Prof. dr. hab. n.med. Dariusza Jaskólskiego
Kierownika Oddziału Klinicznego Neurochirurgii
i Onkologii Centralnego Układu Nerwowego
Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. N. Barlickiego w Łodzi
za umożliwienie i pomoc w realizacji badań**

**Zespołu Katedry Onkologii Zakładu Patomorfologii UM w Łodzi
Zespołu Oddziału Klinicznego Neurochirurgii
i Onkologii Centralnego Układu Nerwowego
Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. N. Barlickiego w Łodzi**

**Pani Dr n.med. Elżbiety Sałacińskiej-Łoś
z Kliniki Chirurgii i Onkologii Dziecięcej UM w Łodzi**

**Pana Dr. inż. Rafała Kamińskiego
z Międzyresortowego Instytutu Techniki Radiacyjnej
Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej**

**Pani Dr n.med. Magdaleny Orzechowskiej
z Zakładu Kancerogenezy Molekularnej UM w Łodzi
za pomoc w realizacji badań**

Rodzinie za pomoc, wyrozumiałość i wsparcie

Spis treści

1. Wprowadzenie	8
1.1. Glejaki - najczęstsze nowotwory wewnątrzczaszkowe.....	8
1.1.1. Epidemiologia glejaków.	9
1.1.2. Podział glejaków.	9
1.1.3. Histoklinika glejaków ze szczególnym uwzględnieniem glioblastoma.	16
1.1.4. Mikrośrodowisko nowotworu.....	17
1.1.5. Otoczenie nowotworu	18
1.1.6. Obraz makroskopowy i mikroskopowy glejaków.....	21
1.1.7. Diagnostyka i leczenie glejaków.	23
1.1.8. Czynniki prognostyczne i predykcyjne.	27
1.1.9. Profilowanie molekularne.....	28
1.1.9.1. Mutacje w genach IDH1 i IDH2.	28
1.1.9.2. Kodelecja 1p19q.....	29
1.1.9.3. Mutacja w genie ATRX.	30
1.1.9.4. Amplifikacja genu EGFR.	30
1.1.9.5. Aberracje w obrębie chromosomów 7 i 10.....	31
1.1.9.6. Mutacja w genie TERT.	31
1.1.9.7. Homozygotyczna delecja w genach CDKN2A i CDKN2B.....	31
1.1.9.8. Hipermetylacja promotora MGMT.	32
1.1.9.9. Podsumowanie profilowania molekularnego i jego wpływ na diagnostykę.....	33

1.2. Spektrometria mas.....	35
1.2.1. Spektrometria mas jako metoda badawcza.	35
1.2.2. Historia pomiarów z wykorzystaniem spektrometrii mas.....	36
1.2.3. Wykorzystanie spektrometrii mas.	38
1.2.4. Stabilne izotopy pierwiastków.....	41
1.2.4.1 Frakcjonowanie izotopowe	42
1.2.4.2. Pomiar stosunku izotopowego izotopów stabilnych.....	44
1.2.5. Izotopowa spektrometria mas.....	45
1.3. Białka wykorzystane w badaniu glejaków.	47
1.3.1. Białko 15-LOX.	47
1.3.2. Białko LCA.....	52
1.4. Izotopy pierwiastków wykorzystane w badaniu glejaków.....	55
1.4.1. Węgiel i stabilne izotopy tego pierwiastka.	55
1.4.2. Azot i stabilne izotopy tego pierwiastka.	56
2. Założenia i cele pracy.	57
2.1. Założenia pracy.....	57
2.2. Cele pracy.....	58
3. Materiały i metody.....	59
3.1. Materiały	59
3.2. Metody	63

3.2.1. Metodyka badań immunohistochemicznych	63
3.2.2. Metodyka pomiarów składu izotopowego	66
4. Wyniki.....	70
4.1. Wyniki oceny immunoekspresji badanych białek.....	70
4.1.1. Immunoekspresja białka 15-LOX.....	70
4.1.2. Immunoekspresja białka LCA.	71
4.2. Wyniki pomiarów stosunku izotopowego stabilnych izotopów azotu i węgla w glejakach.....	73
4.2.1. Skład izotopowy centrum guza.	74
4.2.2. Skład izotopowy obrzeża guza.	75
4.2.3. Skład izotopowy makroskopowo niezmienionych tkanek otaczających guz.....	76
4.2.4. Analiza porównawcza składu izotopowego węgla w badanych lokalizacjach.	77
4.2.5. Analiza porównawcza składu izotopowego azotu w badanych lokalizacjach.	77
4.2.6. Analiza porównawcza stosunku masowego N/C w badanych lokalizacjach.	78
4.3. Wyniki analizy statystycznej.....	78
4.3.1. Wyniki analizy statystycznej immunoekspresji badanych białek.	78
4.3.1.1. Wyniki analizy statystycznej immunoekspresji białka 15-LOX.....	79
4.3.1.2. Wyniki analizy statystycznej immunoekspresji białka LCA.	88
4.3.1.3. Korelacje.	97

4.3.2. Wyniki analizy statystycznej pomiarów izotopowych.	100
4.3.2.1. Wyniki analizy statystycznej pomiarów stosunku izotopowego $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	100
4.3.2.2. Wyniki analizy statystycznej pomiarów stosunku izotopowego $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	103
4.3.2.3. Wyniki analizy statystycznej pomiarów stosunku masowego N/C.	103
4.3.2.4. Korelacje.	111
4.3.2.5. Analizy składowych głównych grupowania przestrzennego.	115
4.3.3. Podsumowanie wyników analizy statystycznej.	122
4.3.3.1. Podsumowanie wyników analizy statystycznej immunoekspresji badanych białek.	122
4.3.3.2. Podsumowanie wyników analizy statystycznej pomiarów izotopowych.	125
5. Dyskusja.	128
6. Wnioski.	148
7. Bibliografia i netografia.	149
8. Aneks.	172
8.1. Alfabetyczny wykaz skrótów i akronimów wykorzystanych w tekście.	172
8.2. Spis tabel.	175
8.3. Spis wykresów.	176
8.4. Spis diagramów.	178

8.5. Spis fotografii.....	178
8.6. Spis rycin.....	179
9. Streszczenie.	180
9.1. Streszczenie w języku polskim.	180
9.2. Streszczenie w języku angielskim – abstract.	186

1. Wprowadzenie

1.1. Glejaki - najczęstsze nowotwory wewnątrzczaszkowe

Glejaki (*ang.: gliomas*) są nowotworami złośliwymi ośrodkowego układu nerwowego (OUN), wywodzącymi się z komórek, pełniących funkcję podporową i odżywczą. Stanowią liczną i niejednorodną grupę nowotworów, których typy różnią się między sobą pochodzeniem, lokalizacją, stopniem złośliwości histologicznej (*ang.: grade*) oraz podłożem molekularnym. Glejaki stanowią najczęstszą grupę nowotworów OUN u osób dorosłych (Kapoor & Gupta, 2020), charakteryzującą się nie w pełni przewidywalnym przebiegiem i w większości dużą agresywnością.

Efekty leczenia chorych z glejakami nie są zadowalające a wyleczalność niska w stosunku do podejmowanych wysiłków terapeutycznych. Głównymi przyczynami takiego stanu rzeczy są pojawienie się objawów dopiero w zaawansowanych stadiach choroby, niekorzystna lokalizacja zmian oraz lekooporność. W glejakach o najwyższym stopniu złośliwości histologicznej nawet przy zastosowaniu najnowocześniejszych metod terapeutycznych w większości przypadków nie udaje się osiągnąć przeżycia powyżej 2 lat (Stupp i in., 2005). Wskaźnik 5-letniego przeżycia dla glioblastoma waha się w granicach 5% (Ostrom i in., 2014). Najczęściej jednak chorzy umierają w ciągu roku. Pomimo że w ostatnich latach notuje się spadek zachorowalności na glejaki u dorosłych, procentowy udział rozpoznań glejaka wielopostaciowego w tej grupie wciąż wzrasta (K. Li, Lu, i in., 2018), co w powiązaniu z niekorzystnym rokowaniem czyni glioblastoma modelowym obiektem licznych badań naukowych nad glejakami (Mehani i in., 2022; Mitre i in., 2022; Torrisi i in., 2022), a poszukiwanie nowych aspektów złożonej biologii tego nowotworu i innych, niż dotychczas ujawnione, czynników rokowniczych staje się narastającą potrzebą współczesnej onkologii. Odpowiedzią na to wyzwanie jest najnowsza V wersja klasyfikacji Światowej Organizacji Zdrowia (*ang.: World Health Organization, WHO*) nowotworów OUN, która w istotnym stopniu zmienia podejście do glejaków. Pomimo że ukazała się w ostatniej fazie tworzenia prezentowanej pracy doktorskiej, zdecydowano się poszerzyć pierwotne analizy o dostępne aspekty ewaluacji również w kontekście nowych wytycznych.

1.1.1. Epidemiologia glejaków

Częstość występowania glejaków rośnie wraz z wiekiem, osiągając szczyt między czwartą a szóstą dekadą życia (Kumar i in., 2019). Obecny wskaźnik to od 4,67 do 5,73 zachorowań na 100 000 osób (Ostrom i in., 2014). Prawdopodobnie dzięki coraz częstszemu wykrywaniu ich na wczesnym etapie rozwoju i coraz szybszemu wdrażaniu leczenia, stosunek śmiertelności do zachorowalności na nowotwory złośliwe ośrodkowego układu nerwowego spada, ale są one nadal przyczyną około 3% zgonów, a rocznie z ich powodu umiera około 2800 osób (Kordek & Jassem, 2019, s. 299).

Największą grupę nowotworów złośliwych ośrodkowego układu nerwowego stanowią glejaki. Przyczyny powstawania tych guzów nie zostały w pełni poznane i wciąż trwają próby ujawnienia informacji dotyczących biologii tych nowotworów, których znajomość mogłaby przyczynić się do obniżenia zachorowalności i śmiertelności.

Dotychczasowymi znaleziskami medycyny opartej na faktach (*ang.: evidence based medicine, EBM*) było powiązanie wzrostu ryzyka pojawienia się nowotworów złośliwych OUN pochodzenia glejowego z promieniowaniem jonizującym (Brüstle i in., 1992; Patel i in., 2019), zwłaszcza u pacjentów po radioterapii w dzieciństwie (Kitanaka i in., 1989) oraz z niektórymi zaburzeniami genetycznymi, w tym nerwiakowłókniakowatością (Rodriguez i in., 2013), zespołem Li-Fraumeni, stwardnieniem guzowatym, zespołem Lyncha, chorobą Olliera i zespołem Maffucci'ego (Davis, 2018). Mimo iż zbadano także wiele innych czynników, ich związek z rozwojem guzów OUN nie został potwierdzony w sposób bezpośredni (Ostrom i in., 2014, 2018).

1.1.2. Podział glejaków

Podział glejaków wg lokalizacji pozwala na wyróżnienie guzów nadnamiotowych (70% przypadków u osób dorosłych) i podnamiotowych (75% guzów u dzieci). Oprócz wewnątrzczaszkowego wzrostu obserwuje się niekiedy glejaki w kanale kręgowym (Seki i in., 2015). Dodatkowym podziałem,

doprecyzowującym lokalizację zmiany jest odniesienie się do konkretnych struktur anatomicznych OUN.

Glej, z którego wywodzą się i od którego biorą swoją nazwę glejaki, składa się z wielu różnorodnych morfologicznie komórek, do których zaliczyć można między innymi astrocyty, oligodendrocyty i komórki ependymalne. Obraz mikroskopowy glejaków znacząco różni się w zależności od kierunku różnicowania. Tradycyjnie, glejaki, pod względem morfologii dzielą się na (Kordek i in., 2007, s.302-304):

- glejaki pochodzenia zarodkowego, czyli rdzeniaki (*ang.: medulloblastoma*),
- glejaki pochodzenia astrocytarnego, czyli gwiaździaki (*ang.: astrocytoma*) i glejak wielopostaciowy (*ang.: glioblastoma*),
- glejaki gleju skąpowypustkowego, czyli skąpodrzewiaki (*ang.: oligodendroglioma*)
- glejaki gleju wyściółkowego, czyli wyściółczaki (*ang.: ependymoma*)

Aktualnie, ze względu na rozwój badań nad molekularnym podłożem nowotworów, podział ten stracił na znaczeniu.

Klasyfikacja, która bierze pod uwagę zarówno stopień złośliwości histologicznej guza jak i odrębności molekularne poszczególnych nowotworów, została stworzona w 2016 roku przez Światową Organizację Zdrowia, stając się światowym standardem diagnostyki, wymiennie przekładającym się na decyzje kliniczne w indywidualnych przypadkach.

Obecna klasyfikacja jest efektem ewolucji poglądów na biologię nowotworów OUN i przez lata zmieniała swoją formę i zakres w zależności od aktualnych trendów i doniesień ze świata nauki (Scheithauer, 2009). Jej pierwsza edycja powstała w 1979 roku jako inicjatywa lekarzy oraz naukowców, mających na celu unifikację rozpoznań medycznych, bez względu na kraj pochodzenia pacjenta. W swojej pierwotnej formie skupiała się tylko i wyłącznie na wyznacznikach histopatologicznych, jednak wraz z upływem lat, w kolejnych edycjach kładziono coraz większy nacisk na najnowsze odkrycia biologii molekularnej.

W 2016 roku, wraz z wprowadzeniem IV edycji klasyfikacji WHO, w sposób diametralny zmieniono podejście do biologii nowotworów OUN i wyodrębniając

poszczególne jednostki, opisano ich podłoże molekularne. W ten sposób, do diagnostyki guzów ośrodkowego układu nerwowego obok cech histopatologicznych, po raz pierwszy w historii, wprowadzono profilowanie molekularne (Komori, 2022). W grupie glejaków, wzięto pod uwagę zaburzenia molekularne, o przedstawionym niżej charakterze (Hoshida & Jandial, 2016) :

- mutacje w genach kodujących dehydrogenazy izocytrynianowej 1 i 2 (*ang.: isocitrate dehydrogenase 1 and 2, IDH1 i IDH2*)
- kodelecje 1p/19q
- mutacje regulatora transkrypcji ATRX (*ang.: alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked gene*)
- mutacje lizyny w pozycji 27 histonu 3 (*ang.: histone H3 lysine 27 methylation, H3 K27M*)

Najnowsza V wersja klasyfikacji WHO nowotworów OUN z 2021 roku w istotnym stopniu zmienia podejście do glejaków. Poszerzono informację o podłożu molekularnym guzów oraz dokonano istotnych zmian w ich podziale i nazewnictwie. Niektóre, dotychczas rozpoznawane, zmiany przestały istnieć, a w ich miejsce pojawiły się nowe. Dodatkowo, podzielono glejaki na ograniczone i rozlane, dorosłych (*ang.: adult-type gliomas*) i dzieci (*ang.: pediatric-type gliomas*). Informacje dotyczące glejaków z obu powyższych klasyfikacji, zawarto w tabelach 1 i 2 (Louis i in., 2016, 2021).

Argumentami, przemawiającymi za zmianami, były znaleziska naukowe, wskazujące na wyższość znaczenia prognostycznego oraz terapeutycznego wskaźników molekularnych nad histologicznymi (Louis i in., 2016). Mimo iż wykładniki morfologiczne i obraz mikroskopowy, według aktualnych wytycznych WHO nie są już głównym czynnikiem decydującym o rozpoznaniu, wciąż pozostają w użyciu, gdyż pozwalają na różnicowanie między sobą wielu jednostek chorobowych, zarówno nowotworowych jak i nienowotworowych oraz przyczyniają się do określenia stopnia złośliwości histologicznej (*ang.: grading*) według przyjętej przez Światową Organizację Zdrowia czterostopniowej skali (grade 1-4).

Tabela 1. Fragment klasyfikacji nowotworów OUN, dotyczący glejaków, według WHO, edycja IV, 2016. Wersja oryginalna.

KLASYFIKACJA WHO IV EDYCJA 2016
<p>Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours</p> <p>diffuse astrocytoma, IDH-mutant</p> <p>diffuse astrocytoma, IDH-wildtype,</p> <p>diffuse astrocytoma, NOS (ang. not otherwise specified)</p> <p>anaplastic astrocytoma, IDH-mutant</p> <p>anaplastic astrocytoma, IDH-wildtype</p> <p>anaplastic astrocytoma, NOS</p> <p>glioblastoma, IDH-wildtype</p> <p>glioblastoma, IDH-mutant</p> <p>glioblastoma, NOS</p> <p>diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant</p> <p>oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted</p> <p>oligodendroglioma, NOS</p> <p>anaplastic oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted</p> <p>anaplastic oligodendroglioma, NOS</p> <p>oligoastrocytoma, NOS</p> <p>anaplastic oligoastrocytoma, NOS</p>
<p>Other astrocytic tumours</p> <p>pilocytic astrocytoma</p> <p>subependymal cell astrocytoma</p> <p>pleomorphic xanthoastrocytoma</p> <p>anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma</p>

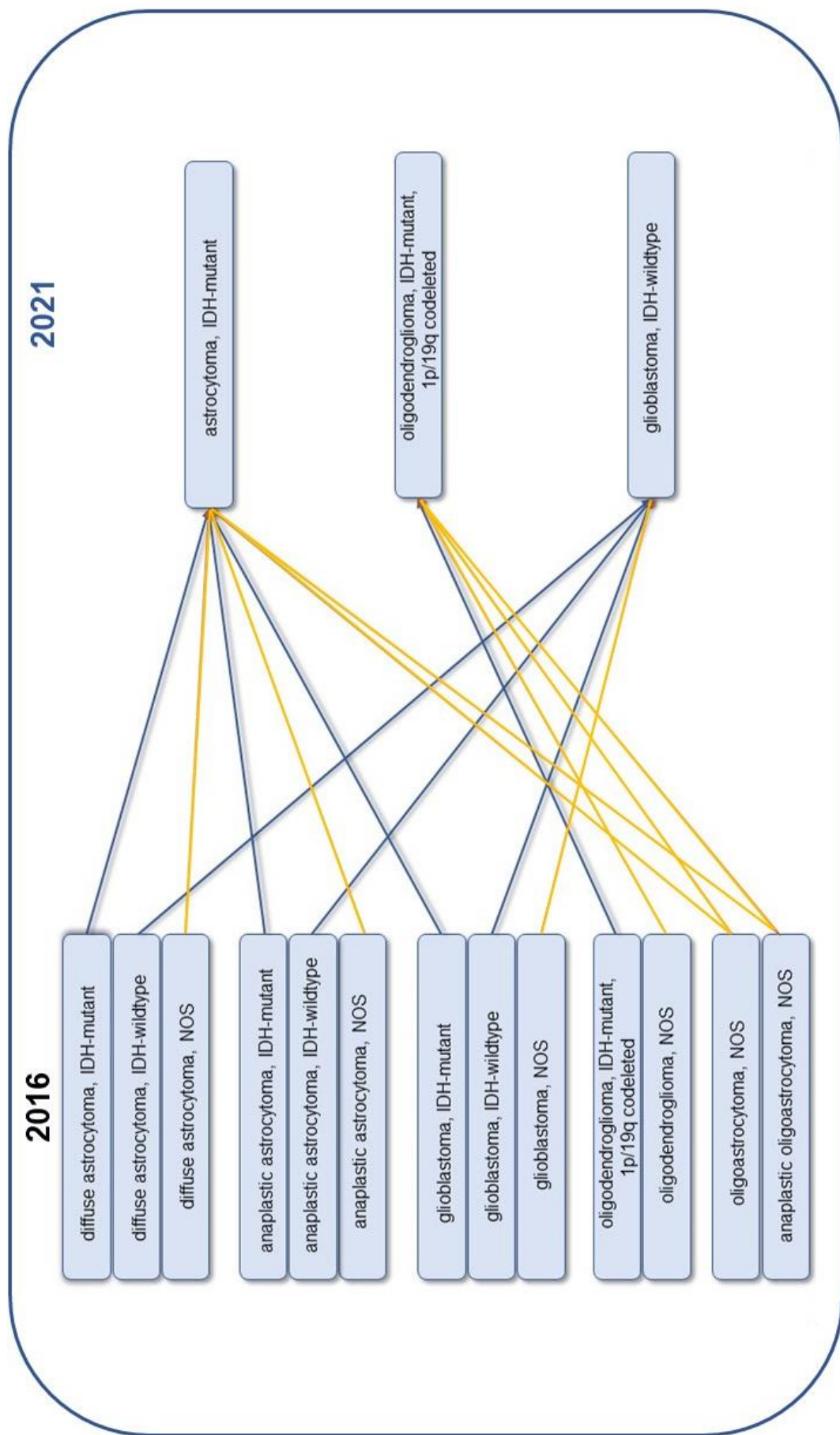
Tabela 2. Fragment klasyfikacji nowotworów OUN, dotyczący glejaków, według WHO, edycja V, 2021. Wersja oryginalna.

KLASYFIKACJA WHO V EDYCJA 2021
<p>Adult-type diffuse gliomas:</p> <p>astrocytoma, IDH-mutant</p> <p>oligodendroglioma, IDH-mutant, and 1p/19q-codeleted</p> <p>glioblastoma, IDH-wildtype</p>
<p>Pediatric-type diffuse low-grade gliomas:</p> <p>diffuse astrocytoma, MYB- or MYBL1-altered</p> <p>angiocentric glioma</p> <p>polymorphous low-grade neuroepithelial tumor of the young</p> <p>diffuse low-grade glioma, MAPK pathway-altered</p>
<p>Pediatric-type diffuse high-grade gliomas:</p> <p>diffuse midline glioma, H3 K27-altered</p> <p>diffuse hemispheric glioma, H3 G34-mutant</p> <p>diffuse pediatric-type high-grade glioma, H3-wildtype and IDH-wildtype</p> <p>infant-type hemispheric glioma</p>
<p>Circumscribed astrocytic gliomas:</p> <p>pilocytic astrocytoma</p> <p>high-grade astrocytoma with piloid features</p> <p>pleomorphic xanthoastrocytoma</p> <p>subependymal giant cell astrocytoma</p> <p>chordoid glioma</p> <p>astroblastoma, MN1-altered</p>

Zmiany w nazewnictwie i kryteriach diagnostycznych spowodowały pojawienie się wielu postawionych przed lekarzami, wyzwań, obejmujących przede wszystkim potrzebę odejścia od znanego schematu postępowania. Część rozpoznań nowotworów złośliwych, ujętych w najnowszej klasyfikacji, opiera się w dużej mierze na diagnostyce molekularnej, co w przypadku mniejszych ośrodków diagnostycznych, bez możliwości wykonania owych oznaczeń, nastęrcza problemów lub wprost uniemożliwia postawienie ostatecznego rozpoznania. Korelacja pomiędzy dotychczasowymi rozpoznaniami, zgodnie z klasyfikacją WHO z 2016 roku, a oceną wg najnowszej V klasyfikacji, jest trudna z uwagi na obecne położenie tak wielkiego nacisku na badania molekularne. W przypadku braku informacji na temat pełnego profilu molekularnego guza reklasyfikacja jest prawie niemożliwa. Biorąc to pod uwagę, podtrzymano istnienie pojęcia NOS (*ang.: not otherwise specified*) dla rozpoznań, w których nie ma możliwości określenia profilu molekularnego oraz wprowadzono NEC (*ang.: not elsewhere specified*) dla przypadków, niewpisujących się w żadną z zaproponowanych diagnoz. Wykorzystanie tych rozpoznań zaleca się jednak tylko w wyjątkowych przypadkach.

V klasyfikacja WHO z 2021 roku dzieli glejaki na ograniczone (*ang.: circumscribed astrocytic gliomas*), do których zaliczamy między innymi gwiazdziaki włosowatokomórkowe oraz glejaki rozlane typu dzieci (*ang.: pediatric-type diffuse gliomas*) i typu dorosłych (*ang.: adult-type diffuse gliomas*), które podzielono dodatkowo na trzy kategorie: gwiazdziaki (*astrocytoma, IDH-mutant*), skąpodrzewiaki (*oligodendroglioma, IDH-mutant, and 1p/19q-codeleted*) oraz glejaki wielopostaciowe (*glioblastoma, IDH-wildtype*).

Podstawowymi kryteriami, pozwalającymi na postawienie rozpoznania w świetle najnowszej klasyfikacji WHO, są obecność mutacji IDH1/2 i kodelecji 1p/19q (Louis i in., 2021). W przypadku guzów o statusie wildtype, czyli tych w których nie stwierdza się mutacji w genach IDH1/2, rozpoznaniem, w większości przypadków, będzie glioblastoma, IDH-wildtype. Guzy o statusie mutant, czyli takie, w których stwierdza się mutacje w genach IDH1/2, w zależności od obecności kodelecji 1p/19q mogą zostać przyporządkowane albo do grupy *astrocytoma, IDH-mutant* albo do grupy *oligodendroglioma, IDH-mutant, 1p/19q codeleted*. W literaturze pojawiły się już pierwsze prezentacje powiązań pomiędzy dwiema klasyfikacjami (Whitfield & Huse, 2022), a jedna z nich została przedstawiona na rycinie 1.



Rycina 1. Fragmenty klasyfikacji glejaków rozlanych wg WHO z 2016 i 2021 roku. Schemat na podstawie Whitfield & Huse, 2022. **Legenda:** granatowe strzałki - korelacje silne, żółte strzałki - korelacje potencjalne.

1.1.3. Histoklinika glejaków ze szczególnym uwzględnieniem glioblastoma

Najczęściej występującą wśród glejaków grupą są gwiaździaki (*ang: astrocytomas*), z najważniejszym z nich, z uwagi na najczęstsze występowanie i najpoważniejsze rokowanie - glejakiem wielopostaciowym.

Gwiaździaki u dorosłych lokalizują się zazwyczaj w półkulach mózgu, w większości w płacie czołowym (Larjavaara i in., 2007). Największa ich część zalicza się do glejaków rozlanych.

Gwiaździaki o pierwszym stopniu złośliwości histologicznej należą do odrębnej grupy - glejaków ograniczonych - ze względu na ich odmienne, korzystne, w stosunku do glejaków rozlanych rokowanie.

Glejaki ograniczone charakteryzują się powolnym tempem rozwoju i nie obserwuje się w ich przypadku tendencji do naciekającego wzrostu, w związku z czym leczenie chirurgiczne przynosi w tej grupie bardzo dobre wyniki, a wskaźnik 10-letniego przeżycia sięga 95%. Do tego podtypu zaliczamy nowotwory o 1 i 2 stopniu złośliwości histologicznej. Zdecydowanie częściej pojawiają się one u dzieci niż u osób dorosłych, a najpowszechniejszym zaburzeniem molekularnym w tej grupie jest mutacja w genie BRAF (J. Chen & Dahiya, 2020).

Glejaki rozlane obejmują bardzo heterogenną grupę nowotworów, w których skład wchodzi gwiaździaki, skąpodrzewiaki i glejak wielopostaciowy. Guzy te charakteryzują się nieregularnym, naciekającym wzrostem. W zależności od swoich cech morfologicznych, tempa proliferacji oraz charakterystycznego profilu molekularnego mogą cechować się drugim, trzecim oraz czwartym stopniem złośliwości histologicznej (grade). Najważniejszym czynnikiem diagnostycznym oraz rokowniczym, decydującym o dalszym postępowaniu terapeutycznym jest obecność mutacji w genach IDH-1 i IDH-2.

Glejaki rozlane to przykład nowotworów złośliwych, które cechują się głównie wzrostem i naciekaniem lokalnym i w których przypadku przerzuty stwierdzone są niezwykle rzadko (Torrise i in., 2022). Niezależnie od tego są one niezwykle agresywne, a mikrośrodowisko w którym się rozwijają i bezpośrednie otoczenie, które modulują, promuje ich wzrost i hamuje odpowiedź obronną

organizmu w sposób pozwalający na wzmożoną proliferację i ograniczający dostępne możliwości terapeutyczne.

1.1.4. Mikrośrodowisko nowotworu

Mikrośrodowisko jest obszarem zlokalizowanym bezpośrednio w sąsiedztwie komórek nowotworowych, który cechuje duża heterogeniczność oraz zróżnicowanie pod względem wchodzących w jego skład komórek i oddziałujących w nim czynników chemicznych. Definiuje się je jako środowisko, w którym znajdują się komórki nowotworowe i w obrębie którego istnieją liczne reakcje pomiędzy komórkami nowotworowymi a podścieliskiem, komponentą immunologiczną oraz innymi nienowotworowymi komórkami, znajdującymi się w jego obrębie (Arneth, 2019; Torrisi i in., 2022).

Najnowsze badania wskazują, że mikrośrodowisko jest niezwykle ważne w procesie nowotworzenia (Buonfiglioli & Hambardzumyan, 2021). Analizy tego obszaru, zarówno jako całości jak i pojedynczych komórek oraz cytokin w nim występujących stały się w ostatnich latach tematem wielu dyskusji, a badania nad ich wpływem na przebieg i progresję choroby rozwijają się niezwykle dynamicznie (Aubry i in., 2015; Cui i in., 2020; Rahimi Koshkaki i in., 2020; Rodini i in., 2018).

Pojawiają się także doniesienia, że to właśnie mikrośrodowisko w sposób znaczący wspiera rozwój nowotworu (Arneth, 2019) oraz przyczynia się do powstawania największej liczby wznów (Clavreul i in., 2015; Petrecca i in., 2013).

Wpływ mikrośrodowiska tłumaczony jest przez wiele hipotez, a pod uwagę brane są przede wszystkim:

- występowanie w mikrośrodowisku komórek macierzystych nowotworu (*ang.: glioblastoma stem-like cells, GSCs*), cechujących się dużą opornością na zastosowane leczenie (Angelucci i in., 2018)
- działanie immunosupresyjne mikrośrodowiska (Dallavalasa i in., 2021; Hernández i in., 2021)
- promowanie tempa wzrostu komórek nowotworowych (Buonfiglioli & Hambardzumyan, 2021; Torrisi i in., 2022)

Pod względem histologicznym mikrośrodowisko składa się z macierzy pozakomórkowej, cytokin, naczyń oraz komórek - zarówno nowotworowych jak i nienowotworowych, spośród których najliczniej reprezentowane są komórki układu immunologicznego (Buonfiglioli & Hambardzumyan, 2021; Hernández i in., 2021) do których zaliczamy przede wszystkim:

- makrofagi związane z guzem (*ang.: tumor-associated macrophages, TAMs*), w których skład wchodzi szpikopochodne makrofagi LCA(+), 15-LOX(+/-) oraz komórki mikrogleju
- szpikopochodne komórki supresorowe (*ang.: myeloid-derived suppressor cells, MDSCs*), LCA(+), będące heterogenną grupą niedojrzałych komórek linii mieloidalnej
- limfocyty naciekające guz (*ang.: tumor-infiltrating lymphocytes, TILs*), LCA(+)
- komórki NK (*ang.: natural killers*), LCA(+)
- neutrofile, LCA(+)

Wśród komórek spoza układu immunologicznego, również wchodzących w skład mikrośrodowiska nowotworu, należy wymienić:

- komórki macierzyste nowotworu - małe grupy komórek nowotworowych, posiadających zdolności proliferacji, samoregeneracji oraz różnicowania (Singh i in., 2003)
- komórki glejowe (astrocyty i oligodendrocyty) oraz neurony
- fibroblasty związane z guzem (*ang.: cancer-associated fibroblasts, CAFs*)

Mikrośrodowisko obrzeża guza przechodzi płynnie w jego otoczenie, które przez swój bliski kontakt z komórkami nowotworowymi i mnogość procesów w nim zachodzących również ma wpływ na proces nowotworzenia.

1.1.5. Otoczenie nowotworu

Otoczenie nowotworu jest to obszar w bezpośrednim sąsiedztwie guza, którego morfologia i znaczenie nie są jeszcze do końca poznane i wyjaśnione. Już teraz wiadomo jednak, że w kontekście rozwoju i dalszego wzrostu

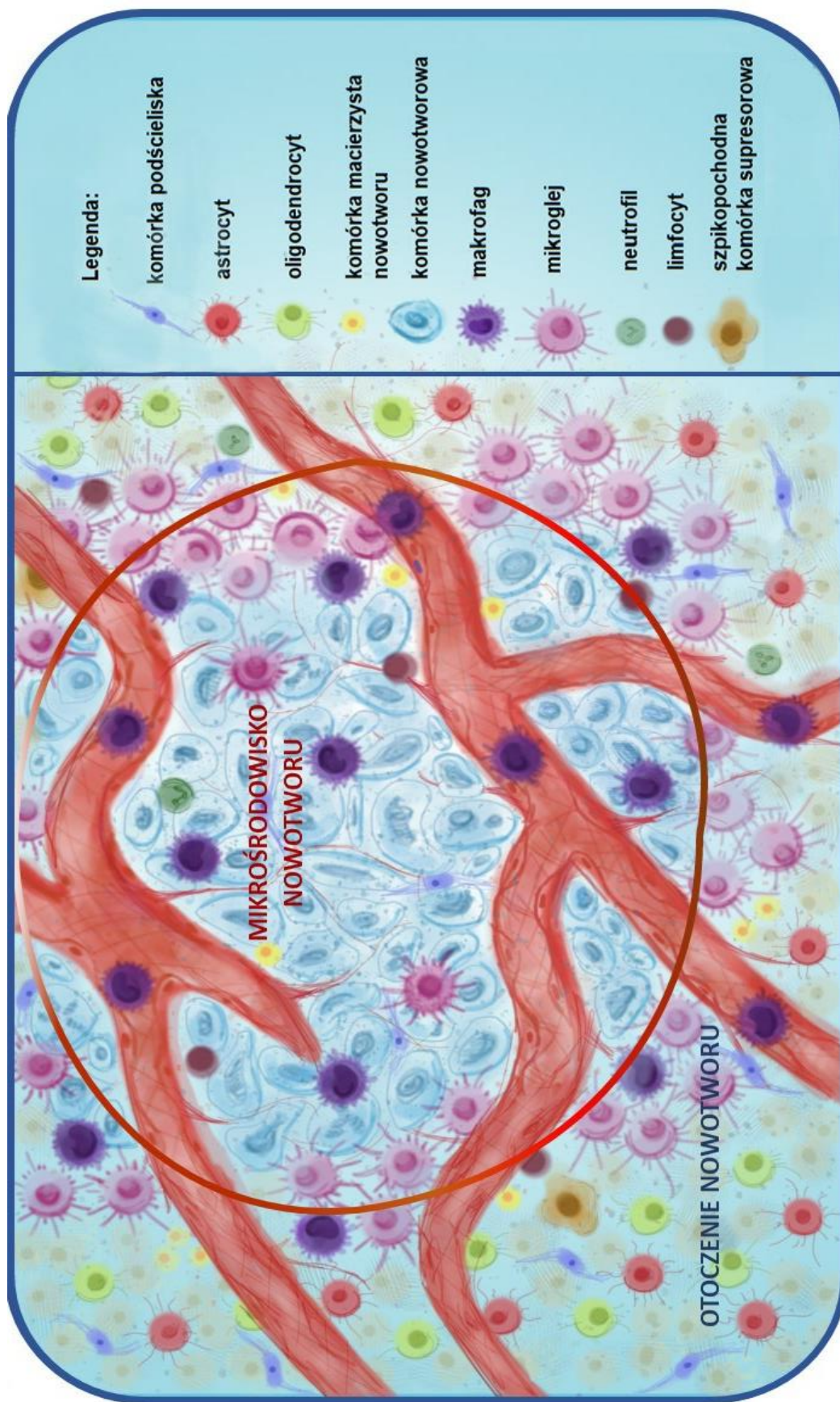
nowotworu, nie pozostaje ono bez znaczenia, co dokumentuje rosnąca liczba badań naukowych (Lemée i in., 2015; Tamura i in., 2018).

Chemicznie i histologicznie obszar otoczenia różni się zarówno od centrum guza jak i tkanki prawidłowej (Tamura i in., 2018). Stanowi ono bardziej strefę przejściową pomiędzy nimi i mimo że makroskopowo przypomina prawidłowy mózg, mikroskopowo widoczne są także pojedyncze komórki nowotworowe, a obok nich reaktywne astrocyty, makrofagi związane z guzem, szpikopochodne komórki supresorowe, limfocyty oraz komórki podścieliska. Nawet jeśli nie stwierdza się występowania w otoczeniu guza samych komórek nowotworowych, wciąż zauważalne są zmiany i reorganizacja biochemiczna, inna niż w prawidłowej tkance (D'Alessio i in., 2016).

Pojawiają się także doniesienia, że prawidłowe komórki występujące w otoczeniu nowotworu, mając kontakt z egzosomami, wydzielanymi przez komórki nowotworowe, podlegają zmianom molekularnym (Ledford, 2014), co potencjalnie może świadczyć o ich transformacji i następczemu wsparciu progresji nowotworu. Ta reakcja otoczenia może doprowadzać do rozwoju wzmożonej agresywności i przyspieszonego wzrostu guza (Geribaldi-Doldán i in., 2020).

Rozległość obszaru, kryjącego się pod pojęciem otoczenia nowotworu, nie jest do końca zdefiniowana i zazwyczaj opiera się na określeniu go w badaniach obrazowych. W literaturze pojawiają się już artykuły wskazujące na to, że największe znaczenie ma powierzchnia od marginesu nowotworu do 2-3 cm w kierunku prawidłowej tkanki, gdyż to właśnie tam według doniesień dochodzi do 90% wznów (Angelucci i in., 2018; Clavreul i in., 2015; Lemée i in., 2015). Obszar ten jest najlepiej widoczny w badaniu mikroskopowym, które pozwala na określenie marginesu guza z większą niż ocena makroskopowa dokładnością.

Jest wiele hipotez, mówiących o przyczynie tak dużego wpływu otoczenia na progresję choroby. W większości przeplata się wątek występowania w tym miejscu komórek macierzystych nowotworu, charakteryzujących się wysokimi zdolnościami samoregeneracji i proliferacji oraz będących opornymi na rutynowe leczenie i powodujących wznowę nawet po wycięciu chirurgicznym (Angelucci i in., 2018). Zależność komórek nowotworowych, ich mikrośrodowiska i otoczenia względem siebie została zaprezentowana na rycinie 2.



Rycina 2. Schemat obrazujący zależności komórek nowotworowych, ich mikrośrodowiska i otoczenia. Ilustracja własna autorki.

1.1.6. Obraz makroskopowy i mikroskopowy glejaków

Glejaki cechuje różnorodność morfologii w obrazie zarówno makroskopowym jak i mikroskopowym.

Glejaki ograniczone przyjmują zazwyczaj regularny kształt i są dobrze odgraniczone od otoczenia. W części przypadków mają formę torbielowatą. Przykładem nowotworu z tej grupy jest gwiaździak włosowatokomórkowy, w którego obrazie mikroskopowym zauważyć można dwubiegunowe komórki z długimi, cienkimi wypustkami. Nierzadko widoczne są również eozynofilne włókna Rosenthala i mikrotorbiele. W obrazie mikroskopowym nie stwierdza się martwicy ani znaczącej atypii (Kordek & Jassem, 2019; Kumar i in., 2019).

Glejaki rozlane makroskopowo prezentują się najczęściej jako nieostro odgraniczone od otoczenia szare masy, naciekające okoliczną tkankę. W najwyższym, czwartym stopniu złośliwości histologicznej, obserwuje się obraz "motyla" tj. dość symetryczne zajęcie obu półkul w stosunku do linii pośrodkowej. Wygląd pola ich przekroju zależy od utkania guza. Guzy o 2 i 3 stopniu złośliwości będą zazwyczaj mało splotte lub galaretowate, natomiast w przypadku stopnia 4 zauważalne będzie zróżnicowanie obrazu makroskopowego w związku z obecnością martwicy (barwa żółta), pół utkania nowotworu (barwa szara), krwotoków (barwa czerwona i brązowa), a także torbieli, wypełnionych masami martwiczymi (Kumar i in., 2019). Materiał pooperacyjny, zawierający utkanie glejaka, został przedstawiony na fot. 1.

Obraz mikroskopowy glejaków rozlanych różni się będzie w zależności od stopnia złośliwości histologicznej nowotworu. Im będzie on wyższy, tym wyższa będzie gęstość komórkowa i bardziej widoczne cechy atypii. Granica pomiędzy guzem a otaczającymi tkankami, ze względu na naciekanie, będzie niewyraźna. Ocena mikroskopowa glejaków rozlanych opiera się na ewaluacji:

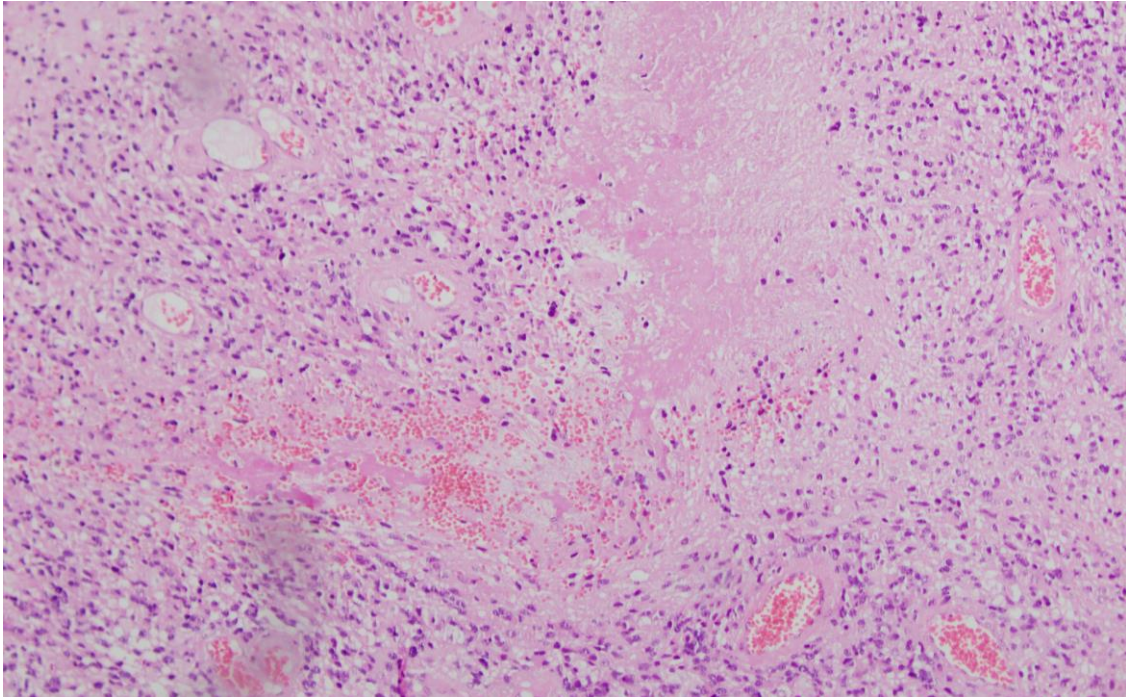
- atypii oraz istnienia nieprawidłowych mitoz
- ocenie stopnia proliferacji z wykorzystaniem Ki-67
- obecności proliferacji mikronaczyniowych
- cech martwicy, a w szczególności martwicy palisadowej



Fot. 1. Materiał pooperacyjny, utrwalony w formalinie, pochodzący z guza ośrodkowego układu nerwowego. Zdjęcie z archiwum autorki.

Glejak wielopostaciowy, będący najczęściej rozpoznawanym glejakiem (czwarty stopień złośliwości histologicznej), zbudowany jest z dużych komórek, których gęstość w obrębie zmiany jest wzmożona w stosunku do tkanki prawidłowej oraz guzów o niższym stopniu złośliwości. Zauważalny jest znaczny pleomorfizm, zarówno komórkowy jak i jądrowy, heterochromazja (nierównomierne rozmieszczenie chromatyny w jądrze) i hiperchromazja (nadbarwność) jąder. Dodatkowo zaobserwować można obecność wysokiego indeksu jądro-cytoplazmatycznego, a także wysoką aktywność mitotyczną z dużym odsetkiem nieprawidłowych figur podziału. Jedną z najważniejszych składowych architektoniki glejaka wielopostaciowego jest obecność proliferacji mikronaczyniowych (*ang.: microvascular proliferation, MVP*), charakteryzujących się zarówno wzmożoną angiogenezą - o czym świadczy bogate mikrounaczynienie mikrośrodowiska i tkanek otaczających guz (D'Alessio i in., 2016) - jak i rozrostem komórek endotelialnych istniejących już naczyń (Das & Marsden, 2013). Dodatkowo zaobserwować można obszary martwicy, najczęściej palisadowej, w której bezkomórkowe pola otoczone są palisadą

komórek nowotworowych (Kumar i in., 2019). Obraz mikroskopowy glejaka wielopostaciowego przedstawiony został na fot. 2.



Fot. 2. Obraz mikroskopowy glejaka wielopostaciowego (barwienie hematoksyliną i eozyną - H&E, powiększenie 200x). W centrum widoczna martwica palisadowa. Zdjęcie z bazy obrazów mikroskopowych, stworzonych w toku badań.

Immunohistochemiczny markerem komórek glejaka jest kwaśne białko włóknikowe (*ang.: glial fibrillary acidic protein, GFAP*) (Ahmadipour i in., 2020) oraz wimentyna (VIM) (Zhao i in., 2018). Pozytywna reakcja nie upoważnia jednakże sama w sobie do rozpoznania tego nowotworu.

1.1.7. Diagnostyka i leczenie glejaków

Pierwszym elementem diagnostyki glejaków jest badanie neurologiczne, a następnie neuroobrazowanie, umożliwiające uwidocznienie patologicznej masy w obrębie struktur OUN. Podstawowym narzędziem, spełniającym to zadanie, jest obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (*ang.: magnetic resonance*

imaging, MRI), najlepiej przed i po podaniu dożylnemu środka kontrastowego¹ (Kordek & Jassem, 2019).

Badanie to uważane jest za jedną z najlepszych, nieinwazyjnych metod diagnostyki. Powinno być wykonywane zarówno przed operacją w celu uwidocznienia patologii jak i po operacji w celu oceny doszczętności zabiegu i obejmować zarówno obrazowanie T1-zależne, jak i T2-zależne (Kordek & Jassem, 2019).

W obrazowaniu T1-zależnym istota biała ukazuje się jako obszary hiperintensywne, a istota szara i płyn mózgowo-rdzeniowy jako obszary hipointensywne. W obrazowaniu T2-zależnym istota biała ukazuje się jako obszary hipointensywne, a istota szara i płyn mózgowo-rdzeniowy jako obszary hiperintensywne². Glejaki w zależności od swojego stopnia złośliwości histologicznej, w obrazowaniu T1-zależnym będą albo dobrze odgraniczonymi od otoczenia, hipointensywnymi masami z przestrzeniami torbielowatymi (w przypadku gwiaździaków włosowatokomórkowych) albo niewyraźnie naciekającymi sąsiednie tkanki, rozlanymi obszarami (w przypadku pozostałych zmian z tej grupy). W zależności od intensywności wzmocnienia kontrastowego, możliwe jest wstępne wnioskowanie co do stopnia zaawansowania zmiany - guzy o niższym stopniu złośliwości histologicznej mają tendencję do bycia obszarami hipointensywnymi, podczas gdy te o wyższej - hiperintensywnymi¹.

Kolejnym etapem, o charakterze zarówno diagnostycznym jak i terapeutycznym, jest zabieg operacyjny. Wycięcie guza jest jednocześnie pozyskaniem materiału do badań histopatologicznych, umożliwiając tym samym postawienie ostatecznego rozpoznania w oparciu o ewaluację obrazu mikroskopowego zmiany. Doszczętność wycięcia jest także czynnikiem rokowniczym, niestety nieostre odgraniczenie nowotworu od otoczenia i obecność licznych, mniejszych ognisk guza, rozproszonych w okolicznej tkance, to cechy, których ocena makroskopowa jest trudna i które utrudniają uzyskanie pożądanego wyniku operacji. Pozostałe po niedoszczętnym wycięciu utkanie

¹ <https://www.aans.org/en/Patients/Neurosurgical-Conditions-and-Treatments/Astrocytoma-Tumors>, dostęp 01.05.2022

² https://pl.wikipedia.org/w/index.php?title=Obrazowanie_metod%C4%85_rezonansu_magnetycznego&oldid=62216581, dostęp 01.02.2021

nowotworu jest przyczyną nawrotów choroby, a także stopniowego odróżnicowania się nowotworu. Z uwagi na lokalizację zmian dążenie do całkowitej resekcji z marginesem zdrowych tkanek może wiązać się z ryzykiem poważnych powikłań, w tym zgonu ³.

Spektrum najczęstszych niepożądanych efektów obejmuje między innymi niedowład i porażenia kończyn, zaburzenia mowy, wzroku, słuchu, czy też zmiany osobowości ⁴. Komplikacje te można minimalizować, korzystając z metod mapowania, umożliwiających wyznaczenie położenia w mózgu najważniejszych funkcjonalnie ośrodków, a następnie śródoperacyjną ich kontrolą. Metodami najczęściej wykorzystywanymi do tego typu procedur są czynnościowy rezonans magnetyczny oraz obrazowanie tensora dyfuzji ⁵.

Glejaki, zwłaszcza o wysokim stopniu złośliwości histologicznej, charakteryzują się dużą agresywnością oraz słabą odpowiedzią na zastosowane leczenie. Obecnie u pacjentów rutynowo stosuje się metody skojarzone, łączące leczenie chirurgiczne, radioterapię i chemioterapię (Sayegh i in., 2014; Silantyev i in., 2019), lecz w związku z rozwojem metod biologii molekularnej coraz częściej wdraża się leczenie celowane (Esparragosa i in., 2018).

Radioterapia, w przypadku glejaków, jest stosowana zazwyczaj jako leczenie uzupełniające przy niedoszczętnym wycięciu guza. Stosuje się ją również w celu zmniejszenia masy nowotworowej i ciśnienia wewnątrzczaszkowego. Metoda ta, sama w sobie, nie pozwala na wyleczenie, a jej efekty są zazwyczaj krótkotrwałe ⁶. Częścią leczenia adjuwantowego u chorych na glejaki jest również chemioterapia. Istnieje wiele protokołów, zarówno monoterapii jak i wielolekowych schematów, mających na celu wywołanie cytotoksyczności w obrębie guza. W zależności od wykorzystywanej substancji, cytostatyki podawane są drogą dożylną, doustną lub dotętniczą. Wśród najczęściej wykorzystywanych związków wymienia się lomustynę, karmustynę, prokarbazynę, nimustynę, fotemustynę, temozolomid, irynotekan, topotekan i winkrystynę ⁶.

³ <http://www.mp.pl/social/article/270928>, dostęp 02.05.2022

⁴ <http://www.mp.pl/social/article/270928>, dostęp 02.05.2022

⁵ <http://www.mp.pl/social/article/60937>, dostęp 24.04.2022

⁶ <https://glioma-center.com/o-metodach-leczenia/radioterapia/>, dostęp 02.05.2022

Leczenie biologiczne - immunoterapia, jest obecnie coraz częściej wykorzystywane w leczeniu chorób nowotworowych. Pozwala ono na osiągnięcie lepszych efektów terapeutycznych i zmniejszenie ilości skutków ubocznych w stosunku do konwencjonalnych metod. W przypadku glejaków, a dokładniej glejaków wielopostaciowych, immunoterapia jest elementem licznych programów lekowych. Wynika to w dużej mierze z faktu odkrycia bardzo ważnej roli mikrośrodowiska nowotworu i dowiedzenia wyjątkowych zdolności komórek nowotworowych do hamowania odpowiedzi immunologicznej organizmu w trakcie procesu nowotworzenia, co stwarza punkt uchwytu do wykorzystania nowych metod leczniczych.

W Stanach Zjednoczonych od 2009 roku do leczenia pacjentów z glejakiem wielopostaciowym wykorzystuje się bewacyzumab - humanizowane przeciwciało monoklonalne, łączące się z czynnikiem wzrostu śródbłonka naczyń (*ang.: vascular endothelial growth factor, VEGF*) i hamujące angiogenezę (Diaz i in., 2017).

Dodatkowo na całym świecie wśród metod leczenia biologicznego, będących aktualnie na etapie badań klinicznych wymienia się (McGranahan i in., 2019; Yu & Quail, 2021):

- terapie z wykorzystaniem komórek linii mieloidalnej (*ang.: myeloid targeted therapies*)
- inhibitory punktów kontroli odpowiedzi immunologicznej (*ang.: immune checkpoint inhibitors, ICIs*)
- szczepionki
- terapie z wykorzystaniem chimerowych receptorów antygenowych (*ang.: chimeric antigen receptor therapies, CAR therapies*)

Mimo tak wielu stosowanych metod terapeutycznych należy pamiętać, że procedury te mają zazwyczaj jedynie charakter paliatywny, mający na celu poprawę jakości i nieznaczne wydłużenie życia pacjenta, a nie jego wyleczenie (Batash i in., 2017; Herfarth i in., 2001). W przypadku glejaka wielopostaciowego sytuacja taka ma charakter jedynie kazuistyczny (Caruso i in., 2017), a u zdecydowanej większości chorych po wyczerpaniu wszystkich dostępnych schematów leczenia, w niedługim czasie dochodzi do nawrotu choroby

(Sathornsumetee i in., 2007). Nadzieję na poprawę rokowania daje nowoczesne leczenie biologiczne oraz celowane, będące istotne głównie w przypadku pacjentów ze stwierdzonymi zaburzeniami molekularnymi w obrębie wybranych genów. Pojawiają się także doniesienia o próbach klinicznych z wykorzystaniem komórek macierzystych (Alcantara Llaguno i in., 2009).

1.1.8. Czynniki prognostyczne i predykcyjne

W glejakach zbadano wiele potencjalnych czynników, ale tylko w przypadku nielicznych z nich udało się udokumentować ich znaczenie rokownicze.

Najważniejszym czynnikiem prognostycznym w glejakach jest stopień złośliwości histologicznej nowotworu (grade). W najwyższym 4 stopniu złośliwości histologicznej, 5-letnie przeżycie wynosi obecnie około 5% (Delgado-López & Corrales-García, 2016).

Kolejnym bardzo istotnym aspektem jest wiek pacjenta - przyjmuje się, że im jest on wyższy tym gorsze rokowanie (Corell i in., 2018; Davis, 2018; Pignatti i in., 2002). Najdłuższy czas przeżycia obserwuje się u chorych w wieku rozwojowym (Bucci i in., 2004), co ma związek ze zróżnicowaniem częstości występowania typów histopatologicznych w różnych przedziałach wiekowych.

W wielu przypadkach czynniki prognostyczne i predykcyjne zazębiają się, zwłaszcza jeśli mowa o dokonanych w ostatnich latach postępach w zakresie metod diagnostyki biologii molekularnej i udowodnienie związku wielu zmian genowych na przebieg choroby u pacjentów, a tym samym rozpoczęcie prac nad terapiami celowanymi.

W odniesieniu do wpływu, jaki wywierają mutacje określonych genów na rokowanie i odpowiedź na leczenie u pacjentów, zdecydowano się wprowadzić część z nich jako element klasyfikacji nowotworów ośrodkowego układu nerwowego wg WHO, a nawet uzależnić postawienie diagnozy od konkretnego profilu molekularnego.

Obecnie profilowanie molekularne staje się coraz częstsze i zaczyna stawać się nieodłącznym elementem rutynowej diagnostyki. Należy jednak

zaznaczyć, że pomimo prognozowania opartego o ocenę uznanych czynników prognostycznych i predykcyjnych, proces chorobowy przebiega inaczej u każdego pacjenta.

1.1.9. Profilowanie molekularne

Profilowanie molekularne, dzięki określeniu charakterystycznych dla danego przypadku zmian genetycznych, pozwala na rozwój medycyny spersonalizowanej, dostosowanej do indywidualnego chorego. Sprzyja to ewolucji w podejściu do wyboru metod leczenia, co w przyszłości może zaowocować przełomem w leczeniu nowotworów (Q. Zhang i in., 2020).

Metodami wykorzystywanymi do określenia zmian genomowych są reakcja łańcuchowa polimerazy (*ang.: polymerase chain reaction, PCR*), fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (*ang.: fluorescent in situ hybridization, FISH*), metody immunohistochemiczne (*ang.: immunohistochemistry, IHC*) i mikromacierze. Ze względu na brak dostępności powyższych metod diagnostycznych w części placówek, zajmujących się diagnostyką, ich wykorzystanie jest często ograniczone (Q. Zhang i in., 2020), co w praktyce skutkuje mniej indywidualnym podejściem do terapii niż oczekiwane.

1.1.9.1. Mutacje w genach IDH1 i IDH2

Jednym z najważniejszych odkryć poczynionych w dziedzinie profilowania molekularnego w grupie nowotworów ośrodkowego układu nerwowego było stwierdzenie istnienia korelacji pomiędzy mutacjami dehydrogenazy izocytrynianu IDH1 i IDH2 a agresywnością przebiegu procesu chorobowego oraz długością czasu przeżycia pacjenta (Christians i in., 2019; Hartmann i in., 2010).

W warunkach prawidłowej ekspresji genów IDH powstają homodimeryczne białka, katalizujące przemianę izocytrynianu do α -ketoglutaratu (*ang.*: *α -keto-glutarate*, α -KG). W przypadku wystąpienia mutacji, zamiast funkcjonalnych enzymów pojawia się onkometabolit - 2-hydroksyglutarat (*ang.*:*2-hydroxyglutarate*, 2-HG), mający wpływ na proliferację nowotworu (Bhavya i in., 2020).

Istnieją przesłanki mówiące o bezpośrednim wpływie mutacji IDH 1/2 na promocję nowotworzenia, poprzez zaburzenia regulacji metabolizmu komórkowego i zapoczątkowanie zmian w szlakach sygnałowych, wpływających na proliferację (Miller i in., 2017). W nowotworach pochodzenia astrocytarnego, obecność aberracji uważa się za korzystny czynnik prognostyczny - pacjenci, u których się pojawiają charakteryzują się zazwyczaj niższym wiekiem i mniej agresywnym przebiegiem choroby (Davis, 2018; Han i in., 2020).

Zgodnie z nomenklaturą guzy z obecnością mutacji w genach IDH określa się jako IDH-mutant, natomiast te niewykazujące zmian jako IDH-wildtype. W świetle najnowszej V klasyfikacji WHO pojęcie IDH-wildtype w aspekcie glejaków rozlanych typu dorosłych jest zarezerwowane dla glioblastoma.

1.1.9.2. Kodelecja 1p19q

Kodelecja ramion 1p i 19q jest zaburzeniem chromosomalnym, związanym z korzystniejszym przebiegiem choroby (Maruno i in., 1999; Rasheed i in., 1999). Polega ono na obecności niezrównoważonej translokacji, z delecją krótkiego ramienia chromosomu 1 i długiego ramienia chromosomu 19. Klinicznie wiąże się to z dłuższym czasem przeżycia pacjentów oraz lepszą odpowiedzią na zastosowane leczenie (Kong i in., 2020).

Aktualnie, według wytycznych WHO, obecność kodelecji 1p19q jest wymagana do wyodrębnienia z grupy glejaków - skąpodrzewiaków.

1.1.9.3. Mutacja w genie ATRX

Zmiany molekularne, związane z genem regulatorowym transkrypcji ATRX, powodują dysfunkcję telomerów i utratę stabilności genomowej.

Spotyka się je u 75% pacjentów z glejakami o 2 i 3 stopniu złośliwości histologicznej, a ich obecność wiąże się z gorszym rokowaniem (Nandakumar i in., 2017).

Zmiany te w wielu przypadkach współistnieją z mutacjami w genie IDH-1 i wykluczają się z kodecją 1p19 (Davis, 2018), w związku z czym nie są rozpoznawane u pacjentów ze skąpodrzewiakami i w podobny sposób jak kodecja 1p19q pozwalają nam wyodrębnić tę właśnie grupę spośród innych glejaków.

1.1.9.4. Amplifikacja genu EGFR

Receptor naskórkowego czynnika wzrostu (*ang.: epidermal growth factor receptor*, EGFR) to glikoproteina przezłonowa, będąca członkiem rodziny receptorów kinaz tyrozynowych. Jest zaliczana do potencjalnych onkogenów, a jej największy związek w grupie nowotworów pochodzenia glejowego stwierdza się z glejakiem wielopostaciowym (Saadeh i in., 2018).

Zmiany w obrębie genu kodującego EGFR, o charakterze amplifikacji, wiążą się ze zwiększoną proliferacją, angiogenezą i inwazją (Saadeh i in., 2018). Udowodniono również, że nieprawidłowości przewodzenia sygnału z receptora naskórkowego czynnika wzrostu mają wpływ na przebieg choroby nowotworowej i mogą stać się potencjalnym celem terapeutycznym (Eskilsson i in., 2018; Hao & Guo, 2019; Saadeh i in., 2018).

1.1.9.5. Aberracje w obrębie chromosomów 7 i 10

Zgodnie z literaturą zdecydowana większość przypadków glejaka wielopostaciowego wykazuje aberracje chromosomalne pod postacią trisomii 7 i monosomii 10 (+7/-10) (Lopez-Gines i in., 2005). Pojawiają się one już w początkowych fazach procesu nowotworzenia i wiążą się z niekorzystnym rokowaniem (Cimino i in., 2018).

1.1.9.6. Mutacja w genie TERT

Mutacja w obrębie genu odwrotnej transkryptazy telomerazy (ang.: *telomerase reverse transcriptase*, TERT), będącej podjednostką katalityczną telomerazy, dotyczy najczęściej jej promotora. Na podstawie licznych badań wykazano jej znaczenie w glejakiach (Zheng i in., 2022), określając ją zarówno jako wskaźnik prognostyczny, jak i predykcyjny (Vuong i in., 2017; Yuan i in., 2016).

Obecność zmian molekularnych w obrębie genu TERT obserwuje się najczęściej u chorych z rozpoznaniem glejaka wielopostaciowego i skąpodrzewiaka, co wiąże się z gorszym rokowaniem niż u pacjentów bez stwierdzonej mutacji (Yuan i in., 2016).

W literaturze pojawiają się również wzmianki na temat potencjalnego wpływu mutacji w genie TERT nie tylko na przebieg choroby nowotworowej, lecz także na samo jej powstawanie (Walsh i in., 2015; Yuan i in., 2016) .

1.1.9.7. Homozygotyczna delecja w genach CDKN2A i CDKN2B

Geny inhibitora cyklinozależnej kinazy 2A (ang.: *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*, CDKN2A) i inhibitora cyklinozależnej kinazy 2B (ang.: *cyclin-dependent kinase inhibitor 2B*, CDKN2B) kodują białka odpowiedzialne za

prawidłowe funkcjonowanie białka p53, będącego regulatorem wielu procesów komórkowych, w tym naprawy DNA i apoptozy, potocznie zwanego "strażnikiem genomu".

Homozygotyczna delecja w obrębie genów CDKN2A i CDKN2B ze względu na upośledzenie prawidłowej roli białka tp53 wiąże się z gorszym rokowaniem i z tego względu w aktualnej klasyfikacji nowotworów ośrodkowego układu nerwowego stała się czynnikiem mającym wpływ na określenie stopnia zaawansowania histologicznego rozlanych glejaków typu dorosłych, IDH-mutant (L. E. Huang, 2022).

1.1.9.8. Hipermetylacja promotora MGMT

Spośród zaburzeń molekularnych, w kontekście terapeutycznym, ważna jest również ocena metylacji metylotransferazy O6-metyloguaniny (*ang.:O-6-methylguanine methyltransferase*, MGMT).

MGMT zaliczany jest do enzymów naprawczych DNA, a jego brak lub niedobór przyczynia się do apoptozy. W aspekcie nowotworów ośrodkowego układu nerwowego jego ekspresja zaliczana jest do grupy czynników predykcyjnych, gdyż warunkuje odpowiedź na zastosowane leczenie chemioterapeutyczne lekami alkilującymi, głównie temozolomidem (Klonowicz, 2007; Rao i in., 2018).

Komórki glejaka, które charakteryzują się występowaniem hipermetylacji promotora MGMT, są bardziej wrażliwe na działanie leków alkilujących i tym samym pacjenci z tym zaburzeniem mają lepsze rokowanie (Bell i in., 2018; Wick i in., 2014). Związane jest to z mniejszą, ze względu na mutację, ekspresją enzymu MGMT, wykazującego funkcje naprawcze zmetylowanego DNA, którego ilość wzrasta przy stosowaniu temozolomidu. Przy niedoborach metylotransferazy O6-metyloguaniny nie dochodzi do naprawy uszkodzonego przez lek DNA, w związku z czym zwiększona jest cytotoksyczność preparatu i wzmożona apoptoza komórek nowotworowych (Klonowicz, 2007).

Szacuje się, że metylacja metylotransferazy O6-metyloguaniny występuje

u 35-45% pacjentów z glejakami o wysokim stopniu złośliwości i u 80% chorych z guzami o niskim stopniu złośliwości (Davis, 2018).

1.1.9.9. Podsumowanie profilowania molekularnego i jego wpływ na diagnostykę

Klasyfikacja nowotworów ośrodkowego układu nerwowego według WHO oprócz oceny histologicznej opiera się w dużej mierze na profilowaniu molekularnym, mającym ściśle odzwierciedlenie w rokowaniu (Whitfield & Huse, 2022). Jest to skomplikowany, wieloetapowy proces, wymagający dużego zaplecza diagnostycznego z możliwością wykonywania oznaczeń najnowszymi metodami biologii molekularnej.

Pierwszym krokiem w ewaluacji glejaków rozlanych typu dorosłych jest diagnostyka w kierunku obecności mutacji IDH, dzieląc tę grupę na zmiany IDH-mutant i IDH-wildtype.

1.1.9.9.1. Postępowanie diagnostyczne z nowotworami o charakterze IDH-mutant

W glejakach rozlanych typu dorosłych o profilu IDH-mutant (*adult-type diffuse gliomas*) dokonuje się podziału na dwie grupy - skąpodrzewiaki, IDH-mutant z kodelecją 1p19q (*oligodendroglioma, IDH-mutant, 1p19q codeleted*) oraz gwiaździaki, IDH-mutant (*astrocytoma, IDH-mutant*), biorąc pod uwagę:

- obecność mutacji w genie ATRX
- obecność kodelecji 1p/19q

Otrzymane wyniki pozwalają na analizę profilu molekularnego nowotworu i ustalenie rozpoznania. Charakterystyczne zmiany molekularne obu typów nowotworów zostały przedstawione w tabeli 3.

Tabela 3. Charakterystyczne różnice molekularne pomiędzy *oligodendroglioma, IDH-mutant, 1p19q codeleted* a *astrocytoma, IDH-mutant*.

	<i>oligodendroglioma, IDH-mutant, 1p19q codeleted</i>	<i>astrocytoma, IDH-mutant</i>
mutacje w obrębie genów IDH1/2	+	+
mutacja w obrębie genu ATRX	-	+
kodelecja 1p/19q	+	-

Następnie, w przypadku obu rozpoznań, niezbędne jest określenie stopnia złośliwości histologicznej nowotworu. W *oligodendroglioma, IDH-mutant, 1p19q codeleted* ze względu na brak udowodnionych naukowo czynników molekularnych, mających przełożenie na rokowanie, odbywa się to wyłącznie na podstawie oceny obrazu histologicznego, a nowotwory mogą charakteryzować się drugim lub trzecim stopniem złośliwości histologicznej (Komori, 2022).

Rozpoznanie *astrocytoma, IDH-mutant* obejmuje natomiast trzy stopnie złośliwości histologicznej - grade 2, 3 oraz 4. Zgodnie z zaleceniami WHO oznaczeniami pozwalającymi na wyłonienie grade 4 spośród całej puli pacjentów są:

- obecność cech histologicznych typowych dla glioblastoma (ogniska martwicy i/lub proliferacja mikronaczyniowa) przy profilu IDH-mutant
- obecność mutacji CDKN2A/B - w przypadku homozygotycznej delecji w obrębie tego genu nowotworowi przypisuje się 4 stopień złośliwości histologicznej, a gdy jest on prawidłowy mamy do czynienia ze stopniem 2 lub 3 (L. E. Huang, 2022).

1.1.9.9.2. Postępowanie diagnostyczne z nowotworami o charakterze IDH-wildtype

Nowotwory IDH-wildtype o charakterystycznym dla glejaka wielopostaciowego obrazie mikroskopowym (ogniska martwicy i/lub proliferacja mikronaczyniowa) zostają automatycznie rozpoznane jako *glioblastoma, IDH-wildtype*. Przy braku przekonujących cech histologicznych należy przeprowadzić ocenę charakterystycznego dla glioblastoma profilu molekularnego pod kątem (Komori, 2022):

- obecności mutacji w genie TERT
- obecności amplifikacji w genie EGFR
- obecności aberracji chromosomalnej w postaci trisomii 7 i monosomii 10 (+7, - 10)

W przypadku stwierdzenia zmian genetycznych w którymkolwiek z wymienionych wyżej genów, mimo braku charakterystycznych cech mikroskopowych, można postawić rozpoznanie glejaka wielopostaciowego (Whitfield & Huse, 2022). Jeśli natomiast nie wykazano ich obecności należy poszukiwać diagnozy poza grupą glejaków rozlanych typu dorosłych lub też w przypadku niezgodności z żadnym z profili molekularnych zdecydować się na rozpoznanie z kategorii NEC.

1.2. Spektrometria mas

1.2.1. Spektrometria mas jako metoda badawcza

Spektrometria mas jest jedną z najbardziej przydatnych i uniwersalnych metod analitycznych, polegających na pomiarze stosunku masy do ładunku elektrycznego badanego jonu (Gross, 2011). Mimo że od wielu lat jest szeroko wykorzystywana i ceniona w wielu innych obszarach badań, dopiero od niedawna zaczęła cieszyć się zainteresowaniem naukowców prowadzących badania nowotworów o implikacjach klinicznych (Taran, 2015; Taran, Frączek, Kamiński, i in., 2015; Taran, Frączek, Sikora-Szubert, i in., 2016; Taran, Frączek, Sitkiewicz, i in., 2016; Tea i in., 2016).

1.2.2. Historia pomiarów z wykorzystaniem spektrometrii mas

Narzędziem spektrometrii mas jest spektrometr masowy. Jego skonstruowanie poprzedzone było wieloma ważnymi odkryciami naukowymi i rozwojem wiedzy w dziedzinie fizyki i chemii, które dokonały się głównie w XIX wieku. Badania nad ładunkami elektrycznymi, przewodzeniem prądu oraz określenie definicji jonu przez Faradaya (Faraday, 1834), a następnie odkrycie elektronu przez Thomsona (Thomson, 1897) wymusiły rozwój metod, mających na celu badanie owych zjawisk. Pierwszym etapem na drodze do powstania spektrometru mas było scharakteryzowanie i wprowadzenie definicji promieni katodowych, a następnie kanałowych przez Goldsteina w 1886 roku, co stało się podwaliną fizyki atomowej i pozwoliło na rozwój badań nad atomami i ich ruchem. Istnienie promieni katodowych udowodniono na podstawie analizy zjawiska świecenia rury Crooka naprzeciwko katody, natomiast promieni kanałowych, zwanych inaczej anodowymi, w wyniku dalszych badań i obserwacji nad zjawiskiem w rurce. Promienie kanałowe poruszały się w przeciwnym kierunku do promieni katodowych, w związku z czym wysunięto hipotezę, że mają przeciwny ładunek. Tym samym promienie katodowe zostały uznane za ujemnie naładowane, natomiast kanałowe za dodatnio naładowane, co niedługo później zostało ostatecznie potwierdzone. Odkrycie to spowodowało szersze zainteresowanie naukowców tym tematem, co poskutkowało wysunięciem przez Thomsona teorii o możliwości obliczenia stosunku masy do ładunku elektrycznego cząsteczki, w oparciu o promienie katodowe, składające się z ujemnie naładowanych cząstek.

Kolejne lata przyniosły wiele badań i informacji na temat wspomnianych promieni. Odkrywcami w tej dziedzinie byli J.J.Thomson i W.Wien. Prace Wiena potwierdzały naładowanie cząstek konkretnym ładunkiem elektrycznym, zawierały określenie masy elektronu oraz co najważniejsze potwierdzały wpływ zarówno pola magnetycznego jak i elektrycznego na rozdzielanie obu typów promieni (Wien, 1898). Na podstawie tych informacji naukowiec opracował pierwszy separator jonów, rozdzielające je w zależności od stosunku masy do ładunku elektrycznego.

Wynalazek ten stał się podwaliną dla działań Thomsona, który po uprzedniej modyfikacji projektów skonstruował spektrograf masowy, będący

pierwszym skaningowym spektrometrem mas. Do jego budowy użył płyty fotograficznej jako detektora, po czasie zamieniając ją na metalową płytkę z paraboliczną szczeliną. Dodatkowo wyposażył urządzenie w kubek Faradaya, podłączony do elektroskopu, który służył za kolektor jonów i zmniejszał używane ciśnienie. Zamiana płytek z fotograficznej na metalową była momentem przełomowym, który pozwolił na zamianę pomiaru jakościowego na ilościowy. Dzięki temu rozwiązaniu wynik był zapisywany już jako spektrum mas (Thomson, 1912).

Dysponując sprzętem o tak dużych możliwościach analitycznych, Thomson rozpoczął badania nad neonem. Dzięki wyraźnemu pojawieniu się kilku paraboli na wykresie obrazującym stosunki ładunku do masy jonów, mógł sformułować teorię, iż neon nie jest gazem prostym, lecz złożonym z dwóch mieszanin, w których atomy tego samego pierwiastka różnią się od siebie liczbą atomową. Tak narodziła się definicja izotopów (Thomson, 1913).

Od tego czasu, w celu zwiększenia ergonomii badań i poprawy jakości oraz zwiększenia szybkości otrzymywanych wyników, spektrometr był udoskonalany przez wielu badaczy. Jednym z nich był Francis William Aston, którego zaangażowanie znacznie poprawiło rozdzielczość aparatu i umożliwiło mu odkrycie 212 naturalnie występujących izotopów, za co otrzymał nagrodę Nobla w dziedzinie chemii (Hughes, 2009).

Jednocześnie nad rozwojem maszyny pracował Arthur Jeffrey Dempster, któremu zawdzięczamy udoskonalony analizator magnetyczny oraz wprowadzenie nowej metody jonizacji substancji - strumień elektronowy (Dempster, 1918). Tak powstał zarys budowy spektrometru, na którym opiera się współczesna aparatura.

Przez kolejne lata prowadzono prace nad usprawnieniem poszczególnych elementów, dodaniem dodatkowych cech oraz nad sprzężeniem z innymi metodami analitycznymi. Dzięki temu obecnie istnieje wiele rodzajów spektrometrów mas o różnej konstrukcji, dostosowanych do potrzeb różnych dziedzin nauki, a na rynku dostępna jest szeroka gama urządzeń o różnych parametrach. To, co łączy je wszystkie ze sobą, to występowanie stałych elementów.

Zaliczamy do nich:

- układ wprowadzania próbki
- źródło jonów
- analizator
- detektor
- system rejestracji danych

Źródło jonów to część, która umożliwi nam zjonizowanie cząsteczek badanych, których wytworzenie jest podstawą metody spektrometrii mas. W zależności od rodzaju jonizatora, badana substancja może w różnym stopniu ulegać fragmentacji do mniejszych cząsteczek, które to mogą być również następczo w różnym stopniu zjonizowane. Pośród przykładowych podtypów najczęściej używanych źródeł jonów znajdują się jonizacja elektronami, elektrorozpylanie, termorozpylanie, desorpcja laserowa czy desorpcja z udziałem matrycy. Ten, który wykorzystany jest w konkretnej aparaturze, dobierany jest na podstawie wymagań co do zakresu jego działania i stopnia jonizacji.

Kolejnym elementem spektrometru mas jest analizator, będący miejscem do którego wprowadzane są jony i w którym dochodzi do ich rozdzielenia na podstawie stosunku masy do ładunku elektrycznego. Do zastosowanych tutaj rozwiązań należą m.in. analizator czasu przelotu, sektor magnetyczny oraz elektryczny, kwadrupol czy pułapka jonowa. Detektory w sposób ilościowy przetwarzają otrzymane informacje, które następnie są przetwarzane i rejestrowane w systemie rejestracji danych jako widmo masowe.

1.2.3. Wykorzystanie spektrometrii mas

Spektrometria mas jest uniwersalną techniką analityczną. Dzięki temu, że metoda ta została wynaleziona wiele lat temu, jej możliwości oraz ograniczenia są dobrze poznane, co przekłada się na możliwość ciągłego jej udoskonalania.

Najstarsze i najszersze zastosowanie spektrometrii dotyczy ekologii i paleontologii, gdzie węgiel wykorzystuje się jako znacznik do śledzenia zmian w środowisku naturalnym (Cerling & Harris, 1999; Michener & Lajtha, 2007, s.24; Boutton i in., 1983; Sweeting, 2010; Kelly, 2000; Ghosh & Brand, 2003) .

Nie należy zapominać także o archeologii. Dane dostępne w literaturze mówią, że dzięki wykorzystaniu metody spektrometrii mas, możliwe jest istotne poszerzenie wiedzy o naszych przodkach, zwłaszcza w odniesieniu do diety człowieka pierwotnego (Klein, 2013; Chisholm i in., 1982).

Stosunkowo nowym jest zastosowanie spektrometrii mas w biologii i medycynie, początkowo w obszarze proteomiki (Aebersold & Mann, 2003; Rozanova i in., 2021), gdzie stała się niezbędną techniką do interpretacji informacji, zakodowanej w genomach. To, co zadecydowało o jej przewadze nad innymi metodami to fakt, że wielkość pojedynczych cząstek oraz ilość badanego białka może być naprawdę niewielka, a mimo to analiza cechuje się niezwykłą wiarygodnością. Ponieważ białka są zaangażowane zasadniczo we wszystkie funkcje biologiczne, proteomika jest ważną częścią badań w wielu obszarach biologii i chemii, co przekłada się na jej popularność (Rozanova i in., 2021).

Spektrometria mas jest nieoceniona również w medycynie (Kurreck i in., 2018), toksykologii i farmacji, między innymi w badaniach farmakokinetyki, farmakodynamiki, biorównoważności i dostępności biologicznej leków i substancji chemicznych (Flinders i in., 2017; Martelli i in., 2018).

Dzięki dogłębnieszemu wglądowi w procesy molekularne, toczące się po podaniu danego terapeutu, dużo łatwiejsze stało się określanie skuteczności lub przyczyny działań niepożądanych, związanych z zastosowanym leczeniem (Khatib-Shahidi i in., 2006).

Obszarami, w których wykorzystuje się spektrometrię mas są ginekologia oraz embriologia. Naukowcy za jej pomocą określają profil białkowy komórek macicy w okresie preimplantacyjnym oraz implantacyjnym (Burnum i in., 2008) oraz określają czynniki mające wpływ na prawidłowy ich przebieg (Burnum i in., 2009).

Przy użyciu spektrometrii mas bada się również metabolity. Są one odzwierciedleniem stanu chorego, więc ich analiza w przypadku procesów patologicznych okazuje się przydatna i może mieć duży wpływ na rokowanie i dalsze leczenie pacjenta (Lou i in., 2017). Przykładem takiego badania jest analiza zaburzeń metabolicznych, wynikająca z transformacji złośliwej w ludzkich rakach płuc in situ. Wykorzystanie spektrometrii mas umożliwiło analizę dysregulacji genów w tymże raku na podstawie zawartości izotopu stabilnego węgla. (Fan i in., 2009).

Proponowane jest także wykorzystanie pomiarów naturalnie występujących izotopów stabilnych wapnia jako dokładnego detektora metabolizmu tkanki kostnej (Katzenberg & Lovell, 1999; Gordon i in., 2014), natomiast izotopów węgla i azotu jako markera chorób związanych z dietą (Kraft i in., 2008).

Ponadto spektrometria mas uważana jest za niezwykle wartościowe narzędzie analityczne, które po odpowiednich modyfikacjach, w przyszłości, może zrewolucjonizować badania w dziedzinach endokrynologii (Vogeser & Parhofer, 2007), medycyny sądowej (Benson i in., 2006; Hoffmann & Jackson, 2015), diagnostyki laboratoryjnej (Weiß i in., 2014), czy farmakologii (Martelli i in., 2018). Spektrometria mas wydaje się być szczególnie przydatna w badaniach nad procesami chorobowymi, zwłaszcza przy określaniu ich etiologii, czynników prognostycznych i predykcyjnych (Caldwell & Caprioli, 2005; DeSouza i in., 2007). Ponadto jest uważana za jedno z najlepszych narzędzi analitycznych w badaniach profilowania białkowego z surowicy krwi, opierających się na poszukiwaniu biomarkerów nowotworów człowieka. Wykorzystywana była w badaniach nad:

- rakiem prostaty (Fujita & Nonomura, 2018; Kurreck i in., 2018),
- rakiem jajnika (Swiatly i in., 2018),
- rakiem piersi (He i in., 2007; M. Zhang i in., 2021)
- rakiem płuca (M.-Y. Li i in., 2019),
- rakiem pęcherza moczowego (Y.-T. Chen i in., 2019).

Wyniki części oznaczeń spektrometrycznych są bardziej wiarygodne niż te uzyskane przy użyciu klasycznych biomarkerów raka (Diamandis, 2004). Na podstawie badań komórek raka jelita grubego u myszy, wysunięto tezę, iż spektrometria mas jako metoda analityczna oferuje unikalne i bardzo dokładne podejście do profilowania białek, które jest niezbędne do zrozumienia zdarzeń molekularnych związanych z powstawaniem guza (Chaurand i in., 2001). Nie wyklucza się też, że w przyszłości pozwoli to na stosowanie tej metody do wyznaczania marginesów guza (Chaurand i in., 2002), co pozwoli zniwelować ryzyko niekompletnej resekcji nowotworów. Opracowywane są też schematy wykorzystania spektrometrii mas w połączeniu z narzędziami bioinformatycznymi do odkrywania i walidacji nowych biomarkerów (Lu i in., 2007). W przypadku raka

prostaty, bezpośrednie profilowanie białek z tkanki przy pomocy spektrometrii mas może potencjalnie uzupełnić naszą wiedzę o leżące u podstaw nowotworzenia zmiany molekularne i obok badań histopatologicznych oraz barwień immunohistochemicznych być przydatnym narzędziem w odróżnianiu tkanek prawidłowych od nowotworowych (Cazares i in., 2009). Ponadto spektrometria mas została określona przez badaczy jako narzędzie dające możliwość skorelowania konkretnych wyników analitycznych z cechami histologicznymi w badaniu mikroskopowym (Chaurand i in., 2004).

Najnowszym zastosowaniem spektrometrii mas są oznaczenia w onkologii - po raz pierwszy bezpośrednio w tkance nowotworowej "*in vivo*" (Taran, 2015; Taran, Frączek, Kamiński, i in., 2015; Taran, Frączek, Sitkiewicz, i in., 2015, 2016; Tea i in., 2016) przeprowadzone z wykorzystaniem izotopowej odmiany tej metody, w której ewaluuje się stabilne (nie promieniotwórcze) izotopy pierwiastków naturalnie występujące w tkankach prawidłowych i zmienionych patologicznie.

1.2.4. Stabilne izotopy pierwiastków

Izotopy to różne formy tego samego pierwiastka, które różnią się między sobą liczbą neutronów w jądrze, a zatem w konsekwencji mają różne masy atomowe.

Wyróżniamy izotopy nietrwałe, inaczej promieniotwórcze oraz trwałe, czyli takie które nie ulegają spontanicznym przemianom w inne - nazywane są one także izotopami stabilnymi. W przyrodzie obserwujemy kilka pierwiastków, które cechują się występowaniem więcej niż jednej stabilnej formy tj. wodór, wapń, węgiel, stront, siarkę, azot i tlen.

Izotopy tego samego pierwiastka, ze względu na tę samą liczbę atomową, mają podobne właściwości chemiczne. Mimo to ich zachowanie jako elementów reakcji chemicznej jest różne, ze względu na różnicę masową i związane z nią właściwości fizyczne. Przekłada się to i wpływa głównie na szybkość reagowania.

Fakt, że izotopy stabilne znajdują się w tkankach naturalnie sprawia, że są one idealnym materiałem do badań. Badania te w głównej mierze analizują

zmiany w czasie, np. w ekologii wykorzystuje się możliwości śledzenia przepływu azotu i węgla w kolejnych piętach łańcucha troficznego (Caut i in., 2008; Schwartz i in., 2014; Kurle, 2002; Langin i in., 2006; Layman i in., 2007; Finlay & Kendall, 2008).

Izotopowa spektrometria mas znajduje także zastosowanie w wykrywaniu procesów patologicznych, które prowadzą do zmian składu izotopowego. W badaniach na myszach dowiedziono, że zmiana stosunku stabilnych izotopów węgla w wydychanym powietrzu ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) jest markerem odpowiedzi zapalnej ostrej fazy, wyniki te potwierdzono także u ludzi (Boriosi i in., 2014). Dowiedziono także istnienia zmian w składzie izotopowym węgla i azotu w tkankach gospodarza w przypadku infekcji pasożytniczej (Doi i in., 2008).

W 2015 roku po raz pierwszy udokumentowano różnice w składzie izotopowym tkanek prawidłowych i nowotworowych "*in vivo*" oraz wskazano potencjalne implikacje kliniczne takich oznaczeń (Taran, 2015). Badane były także inne nowotwory (*hepatoblastoma* i *rhabdomyosarcoma*), w których zauważono związek otrzymanych wyników z typem histologicznym nowotworu oraz rokowaniem (Taran, Frączek, Sitkiewicz, i in., 2015, 2016). Podobne badania w przypadku guza Wilmsa zaowocowały odkryciem wcześniej nieznannej biologii nowotworu oraz określeniem nowego biomarkera, który w przyszłości może przysłużyć się do zindywidualizowania terapii pacjentów (Taran, Frączek, Sikora-Szubert, i in., 2016). W roku 2016 niezależna grupa badaczy potwierdziła, że tkanki nowotworowe wykazują inny stosunek izotopowy izotopów stabilnych węgla i azotu niż tkanki prawidłowe i podobnie wskazała na praktyczne zastosowanie pomiarów izotopowych w diagnostyce i ocenie rokowania (Tea i in., 2016).

1.2.4.1 Frakcjonowanie izotopowe

Proces prowadzący do zmiany liczby izotopów tego samego pierwiastka, wchodzących w skład danego materiału nazywany jest frakcjonowaniem izotopowym. Wynika ono z działania na substancję różnych czynników

fizycznych i chemicznych i jest procesem naturalnym i samoistnym (Benson i in., 2006).

W organizmach żywych frakcjonowanie odzwierciedla zmiany zachodzące podczas wzrostu i metabolizmu komórki (Macko i in., 1987). Proces ten wiąże się nie tylko z teoretycznymi zmianami w abundancji naturalnej izotopów, lecz także praktycznymi, na przykład we właściwościach fizycznych całego materiału. Zazwyczaj liczba izotopów lżejszych, z racji tego, że mają tendencję do tworzenia słabszych wiązań zmniejsza się, co skutkuje wzrostem liczby izotopów cięższych (Benson i in., 2006; Wolf, 2004). W efekcie pojawi się różnica w składzie stabilnych izotopów pierwiastka pomiędzy reagentami i produktami reakcji chemicznej. Ogólny poziom frakcjonowania stabilnych izotopów między określoną cząsteczką, a jej prekursorami jest kontrolowany przez wiele czynników (Macko i in., 1987).

Dla zobrazowania całości zachodzących zmian i wyrażenia ich w sposób wymierny, frakcjonowanie (α_{A-B}) między dwoma substancjami chemicznymi A i B opisuje się jako delta (δ) i przedstawia się wzorem (Wolf, 2004):

$$\alpha_{A-B} = \frac{R_A}{R_B} = \frac{(1000 + \delta_A)}{(1000 + \delta_B)}$$

Wartości α są zwykle bardzo zbliżone do 1.

Istnieją dwa główne typy frakcjonowania (Ben-David & Flaherty, 2012):

- Frakcjonowanie równowagowe - zachodzi gdy substraty i produkty reakcji chemicznej różnią się stosunkami izotopowymi, ponieważ cięższe izotopy tworzą silniejsze wiązania z substratem lub produktem. Proces zachodzi w warunkach równowagi termodynamicznej.
- Frakcjonowanie kinetyczne - występuje, gdy reakcja chemiczna jest nieodwracalna, co ma miejsce zazwyczaj wtedy, gdy jeden typ cząsteczki zmienia swoją fazę (np. z cieczy w gaz) i zostaje usunięty.

1.2.4.2. Pomiar stosunku izotopowego izotopów stabilnych

Zmiany zachodzące w badanym materiale, dotyczące składu izotopowego stały się przedmiotem zainteresowań naukowców ze względu na to, że ich analiza pozwala na dogłębniejsze zrozumienie procesów metabolicznych. Izotopami stabilnymi, których badania obejmują najliczniejszą grupę są azot, węgiel, siarka i tlen. Pierwiastki te są rozpowszechnione w przyrodzie i organizmach żywych, co czyni z nich użyteczny przedmiot badań nad materiążywioną. Każdy materiał ma swój charakterystyczny profil izotopowy, będący stosunkiem izotopu ciężkiego do izotopu lekkiego danego pierwiastka (R). Profil ten jest względnie stały dla danej próbki i może być wyliczony według wzoru (Ben-David & Flaherty, 2012) :

$$R = \frac{\text{izotop cięższy}}{\text{izotop lżejszy}}$$

Udowodniono jednak, że pod wpływem wszelakich czynników środowiskowych - chemicznych lub fizycznych - skład izotopowy może ulegać wahaniom. Różnica względna stosunków izotopów stabilnych (δ) jest aktualnie przedmiotem wielu badań naukowych, w tym interdyscyplinarnych, w największym stopniu obejmując nadal jednak zawężony obszar - biologię, chemię i fizykę. Narzędziem, pozwalającym wykryć nawet minimalne zmiany składu izotopowego pierwiastków jest spektrometr masowy izotopów stabilnych (*ang.: isotope-ratio mass spectrometry, IRMS*) (Carter & Barwick, 2012).

Przy określaniu różnicy względnej stosunków izotopów stabilnych (δ), powinniśmy korzystać ze wzoru (Ben-David & Flaherty, 2012) :

$$\delta = \frac{R_{\text{sample}}}{R_{\text{std}}} - 1$$

Wartości delta (δ) są wielkościami bezwymiarowymi, które reprezentują iloraz stosunku izotopowego próbki (R_{sample}) i punktu zerowego (R_{std}), uzgodnionego na szczeblu międzynarodowym przez Międzynarodową Agencję

Energii Atomowej (*ang.: International Atomic Energy Agency, IAEA*). Wyniki przeliczane są zazwyczaj na promile, które określają jak bardzo dana próbka różni się od standardu. Gdy stosunek izotopów ciężkich do lekkich w próbce jest wyższy niż w standardzie ($R_{\text{sample}} > R_{\text{std}}$), próbkę nazywamy wzbogaconą. Natomiast, gdy stosunek w próbce jest niższy ($R_{\text{sample}} < R_{\text{std}}$), próbka jest zubożona (Ben-David & Flaherty, 2012).

Metodą pozwalającą na ujawnienie składu izotopowego badanej próbki jest izotopowa spektrometria mas (Carter & Barwick, 2012).

1.2.5. Izotopowa spektrometria mas

Izotopowa spektrometria mas (*ang.: isotope-ratio mass spectrometry, IRMS*) to metoda, która pozwala na pomiar stosunku izotopów stabilnych pierwiastków (Michener & Lajtha, 2007). Stosunki te ulegają nieznacznym zmianom, które mają jednak duże znaczenie biologiczne. Obecnie można je nie tylko wykryć, ale i zbadać ilościowo (Ghosh & Brand, 2003). Izotopowa odmiana spektrometru mas pozwala na pomiar liczby izotopów stabilnych pierwiastków (Dunn & Carter, 2018) o niezwyklej precyzji, czego przykładem może być pomiar składu izotopowego węgla, wchodzącego w skład dwutlenku węgla (CO_2), który uległ od 0.0111073 do 0.0110906 przez ostatnie 200 lat (Ghosh & Brand, 2003).

Aparatura do pomiaru składu izotopowego weszła do użytku po II Wojnie Światowej, stając się standardowym przyrządem analitycznym (Flenker, 2012). Jej działanie opiera się na systemie sektorowym. Badane pierwiastki, krótko przed analizą, przekształcane są w proste gazy, np.: wodór, dwutlenek węgla, azot, tlenek węgla i dwutlenek siarki. Próbki są konwertowane do stanu gazowego przy użyciu różnych metod, w zależności od rozwiązania zastosowanego w danej maszynie analizującej. IRMS mierzy stosunek jonów, które odpowiadają bezpośrednio różnym formom izotopowym pierwiastków, wchodzących w skład tych gazów. Istnieje możliwość natychmiastowego wyizolowania wchodzących w skład mieszaniny cząstek i pojedyncze ich badanie oraz przekształcenie w gaz i analiza całości bez uprzedniego podziału na różne związki (Dunn & Carter, 2018).

Kolejnym etapem jest jonizacja dostarczonych cząsteczek poprzez ich interakcję z wiązką elektronową. Proces ten zachodzi w źródle jonów spektrometru mas. Nowo powstałe jony przechodzą przez pole magnetyczne, a następnie w zależności od swojej trajektorii lądują w jednym z kolektorów Faradaya. Dzięki temu rozdzielowi oraz w konsekwencji przekazaniu informacji przez system wzmacniaczy wprost do systemu rejestrującego dane, możliwe jest otrzymanie wykresu intensywności w czasie dla jonów o danym stosunku masy do ładunku, zwanego chromatogramem. Intensywność w tym przypadku przekłada się wprost proporcjonalnie na liczbę jonów (Dunn & Carter, 2018).

Izotopowa spektrometria mas dostosowuje się do rosnących potrzeb naukowców. W miarę upływu czasu stworzono możliwość sprzężonej z innymi technikami jednoczesnej analizy. Mierzenie parametrów wielu pierwiastków jednocześnie w tej samej próbce materiału jest bardzo pożądane, częściowo w celu zaoszczędzenia czasu, ograniczenia kosztów i zmniejszenia ilości wymaganego materiału, ale także dlatego, że powstałe sprzężone dane pozwalają na uzyskanie wielowymiarowego obrazu analizowanego problemu naukowego (Fry, 2007). Wspólne pomiary azotu i węgla są możliwe z powodu zastosowania metody chromatografii gazowej (*ang.: gas chromatography*, GC) i separacji gazów N₂ i CO₂, wytworzonych w analizie elementarnej. Jeśli chcemy dodatkowo zmierzyć również stosunek izotopów stabilnych siarki, możemy wykorzystać do tego celu dodatkową kolumnę chromatograficzną, dzięki czemu uzyskamy łączne informacje o wszystkich trzech pierwiastkach. Metoda opisanego sprzężenia IRMS z GC jest aktualnie wykorzystywana rutynowo (Fry, 2007).

Podstawowymi materiałami poddawany ocenie z wykorzystaniem IRMS są:

- gazy atmosferyczne (López i in., 2016; Pratt & Prather, 2012)
- zawartość zbiorników wodnych (Montiel-León i in., 2018; Suzuki i in., 2018)
- ziemia (Neves i in., 2018; Schaltegger i in., 2014)
- skały i minerały (Cho & Cohen, 2018; Piotrowski i in., 2018)
- substancje chemiczne (Khatib-Shahidi i in., 2006)
- skamieliny (Asara i in., 2007)

- tkanki roślinne (Michener & Lajtha, 2007; Perez de Souza i in., 2019)
- pióra (Bílková i in., 2019), sierść (Jang i in., 2019), płyny ustrojowe (Kurle, 2002), kości (Ishii i in., 2018)
- tkanki zwierzęce - (Boutton i in., 1983; Taran, Frączek, Kamiński, i in., 2015)
- tkanki ludzkie - kości (Charapata i in., 2018; Schaepe i in., 2018), włosy (Cappelle i in., 2018; Flinders i in., 2017), zęby (Klein, 2013), paznokcie (Ho i in., 2019; Voegel i in., 2018), płyny ustrojowe (Keshishian i in., 2017; Rolland i in., 2019), tkanki miękkie prawidłowe (P. Chaurand i in., 2001); tkanki nowotworowe (Taran, 2015; Taran, Frączek, Kamiński, i in., 2015; Taran, Frączek, Sitkiewicz, i in., 2015, 2016; Tea i in., 2016)

1.3. Białka wykorzystane w badaniu glejaków

1.3.1. Białko 15-LOX

Lipooksygenazy, nazywane w literaturze skrótem LOX (*ang. lipoxygenase*), są białkowymi enzymami z klasy oksygenaz, w większości przyspieszającymi peroksydację wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (*ang.: polyunsaturated fatty acids*, PUFAs), głównie kwasu arachidonowego, linolowego i α -linolowego (Mashima & Okuyama, 2015). Swoje właściwości oksydacyjne zawdzięczają obecności w swojej budowie Fe^{2+} , który dąży do Fe^{3+} .

Obecność lipooksygenaz stwierdzana jest u dwóch z trzech domen życia lądowego - bakterii oraz eukariota. Ludzki genom posiada sześć funkcjonalnych genów LOX, które odpowiadają za sześć różnych białek (Ivanov i in., 2015):

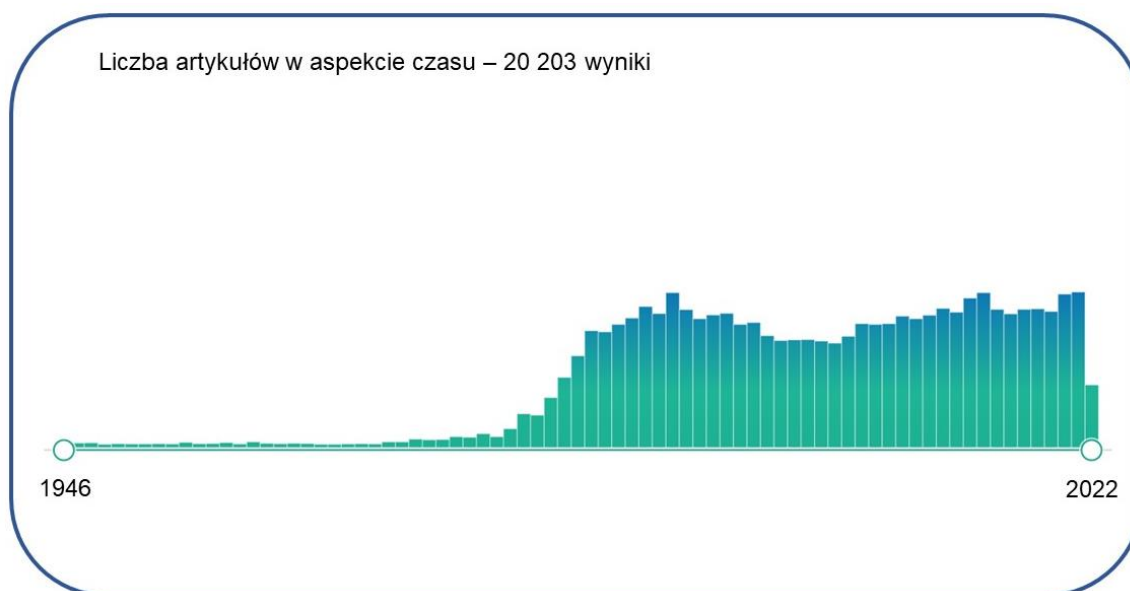
- 5-lipooksygenaza arachidonianu (*ang.: arachidonate 5-lipoxygenase*, 5-LOX)
- 12-lipooksygenaza arachidonianu (*ang.: arachidonate 12-lipoxygenase*, 12-LOX)
- 12-lipooksygenaza arachidonianu (*ang.: arachidonate 12-lipoxygenase*, 12B-LOX)
- 15-lipooksygenaza arachidonianu (*ang.: arachidonate 15-lipoxygenase*, 15-LOX)

- 15-lipooksygenaza arachidonianu typu II (*ang.: arachidonate 15-lipoxygenase type II, 15-LOX-2*)
- lipooksygenaza typu naskórkowego E3 (*ang.: epidermis-type lipoxygenase 3, E-LOX-3*) .

Produktami reakcji utleniania z ich udziałem są np. eikozanoidy, takie jak prostaglandyny, lipoksyny i leukotrieny oraz substraty, wchodzące w skład fosfolipidów i estrów cholesterolu (van Leyen, 2013).

Lipooksygenazy biorą udział w bardzo wielu procesach, toczących się w organizmie, spośród których najważniejszymi wydają się reakcje zapalne, hiperproliferacyjne, neurodegeneracyjne, nowotworzenie oraz modulacja układu odpornościowego (Kuhn i in., 2002).

W związku z tak dużym zakresem procesów, w których uczestniczą lipooksygenazy lub też związki powstałe pod ich wpływem, ilość badań nad ich działaniem i zastosowaniem w nauce, w tym także medycynie, jest ogromna. Na platformie PubMed aktualnie istnieje ponad 20 tysięcy artykułów na ten temat, a kolejne pojawiają się w ilości ponad 600 rocznie (fot. 3).



Fot. 3. Wynik przeprowadzonego dla potrzeb badań wyszukiwania liczby artykułów na temat lipooksygenaz w serwisie Pubmed ⁷.

⁷ <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=lipoxygenases&sort=date&timeline=expanded>, dostęp 04.05.2022r.

15-LOX został wyizolowany z krwi króliczej i opisany po raz pierwszy w literaturze w 1975 r. Ma on zdolność do utleniania fosfolipidów błonowych podczas rozpadu mitochondriów w procesie dojrzewania krwinek czerwonych (Schewe i in., 1975). Podobny enzym, w 1988 roku, został wykryty w ludzkich eozynofilach, a porównanie właściwości enzymatycznych obu białek doprowadziło do wniosku, że jest to ludzki ortolog króliczego 15-LOX (Sigal i in., 1988). Prawie dziesięć lat później, w 1997 r. opublikowany został artykuł, który wykazał istnienie także innego, rzadziej spotykanego typu 15-LOX (Brash i in., 1997). Jego ekspresja została ujawniona w skórze, gruczole krokowym, płucach i rogówce (Kuhn i in., 2002). W literaturze, w celu odróżnienia od siebie obu enzymów, które mimo wspólnej nazwy wykazują bardzo zróżnicowane właściwości chemiczne i fizyczne, wprowadzono nowe nazewnictwo. Enzym, który został odkryty jako pierwszy zyskał miana 15-LOX, 15-LOX-1 lub 15-LOX typu retikulocytarnego (I). Drugi natomiast otrzymał kilka synonimicznych nazw: 15-LOX typu naskórkowo - epidermalnego (II), 15-LOX-2 oraz 15-LOX-B.

Gen ALOX15 koduje 15-LOX, który ulega ekspresji na wysokim poziomie w eozynofilach, komórkach nabłonka oskrzelowo-pęcherzykowego i w monocytach. Gen ALOX15B koduje 15-LOX-2 i jest silnie wyrażony w komórkach nabłonkowych. Oba geny znajdują się na chromosomie 17.

W ciągu następných dziesięcioleci 15-LOX został bardzo szczegółowo scharakteryzowany, a jego funkcje biologiczne zostały zbadane w wielu systemach komórkowych *in vitro*, a także w różnych modelach chorób zwierząt oraz ludzi (Ivanov i in., 2015). Powstało bardzo wiele doniesień na temat jego udziału jako inicjatora i promotora w rozwoju miażdżycy (Mashima & Okuyama, 2015; Vijil i in., 2014), czynnika mającego korelację z różnym rokowaniem i powikłaniami chorób sercowo-naczyniowych (Horn i in., 2013), takich jak udar niedokrwienny mózgu (van Leyen i in., 2006; Yigitkanli i in., 2013), choroba wieńcowa i zawał mięśnia sercowego. 15-LOX występuje w dużych ilościach w eozynofilach i mimo poznanych już jego działań biologicznych, rola tego enzymu nie została jeszcze do końca poznana (Feltenmark i in., 2008). Jego zwiększony poziom stwierdza się w jednostkach chorobowych takich jak cukrzyca (Cole i in., 2013), choroba Alzheimera (Praticò i in., 2004), choroby zapalne stawów (Wan i in., 2019, 2020) czy choroby zapalne oskrzeli (Shannon i in., 1993; Stevens i in., 2020).

15-lipoksygenaza arachidonowa jest enzymem, który reaguje z wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi i wytwarza metabolity, mające swój udowodniony udział w rozwoju wielu chorób nowotworowych. Biorąc pod uwagę to odkrycie, wykorzystanie inhibitorów 15-LOX mogłoby potencjalnie prowadzić do opracowania nowych leków przeciwnowotworowych, które byłyby traktowane jako środki chemioterapeutyczne (Orafaie i in., 2018).

Użyteczność 15-LOX jako markera, czynnika predylekcyjnego oraz celu terapeutycznego była badana w różnych guzach, takich jak:

- rak sutka (Jiang i in., 2006; Kazan i in., 2020; Tavakoli-Yaraki i in., 2013)
- nowotwory łagodne i złośliwe jelita grubego (Shureiqi i in., 2005; Wu i in., 2014; H. Zhu i in., 2008; X. Zuo i in., 2012)
- rak prostaty (Hu i in., 2013; O'Flaherty i in., 2012)
- rak trzustki (Hennig i in., 2007)
- rak nerki (Gohara i in., 2012)
- rak żołądka (Liu i in., 2010)
- rak płuc (M.-Y. Li i in., 2019; Sultan i in., 2020)

W obrębie ośrodkowego układu nerwowego, badania w kierunku znaczenia ekspresji 15-LOX polegają głównie na ocenie jego roli w niedotlenieniu, chorobach neurodegeneracyjnych oraz urazach (Di Meo i in., 2017; Gaberel i in., 2019). Pojawiają się również doniesienia o znaczeniu tego enzymu w glejakach (Hsi i in., 2011; Souza i in., 2020) i jego potencjalnym wykorzystaniu jako nowego celu terapeutycznego (Pacholska i in., 2012; Viita i in., 2012).

W opublikowanych badaniach odnaleziono informacje na temat wpływu metabolizmu lipidów w obrębie makrofagów związanych z guzem (TAMs) na komórki nowotworowe, głównie poprzez mediatory lipidowe, produkowane między innymi przez lipooksygenazy (LOX), które są przedmiotem przedstawionej pracy. Wzmocniona oksydacja kwasów tłuszczowych oraz ich synteza "de novo" mogą mieć znaczący wpływ na mikrośrodowisko nowotworu, wspierając wzrost guza i przyczyniając się do jego oporności na leczenia radio- i chemioterapeutyczne (Corn i in., 2020).

15-LOX, będący jednym z ewaluowanych w niniejszej pracy białek,

ulegający ekspresji w obrębie makrofagów M2, jest jednym z enzymów biorących udział we wspomnianych procesach, mogącym być wskaźnikiem zmian molekularnych w komórkach i niosącym potencjalne implikacji kliniczne. Enzym ten charakteryzuje się właściwościami przeciwnowotworowymi, które zostają utracone wraz ze spadkiem jego ekspresji. Nadekspresja natomiast prowadzi do hamowania zapalenia poprzez inhibicję agregacji komórek nacieku zapalnego (Tian i in., 2017).

TAMs wykazują obecność dwóch istotnych w kontekście procesu nowotworowego form - klasycznie aktywowanej M1, wykazującej aktywność prozapalną i alternatywnie aktywowanej M2, wykazującej funkcję przeciwzapalną. Liczba i wzajemny stosunek obu form zmienia się wraz z postępem procesu nowotworowego (Hinshaw & Shevde, 2019; Y. Kim i in., 2017).

Makrofagi M1, stacjonujące w tkance, związane są z aktywacją klasycznego szlaku działania i nie wykazują ekspresji 15-LOX (Weigert i in., 2018). Dopiero podczas ich transformacji do formy M2, głównie pod wpływem kontaktu z IL-4 i IL-13, dochodzi do jego wzmożonej ekspresji (Kapralov i in., 2020). Pojawilo się wiele badań oceniających przydatność ewaluacji ekspresji enzymów, wchodzących w skład kompleksów regulujących oksydację lipidów, nie ma jednak wielu badań na temat roli 15-lipooksygenazy arachidonowej i jej ekspresji w komórkach układu odpornościowego w procesie nowotworzenia oraz dynamiki zmian tej ekspresji podczas progresji nowotworu (De Armas i in., 2010).

Badania nad funkcją makrofagów wiążą się z poznawaniem mikrośrodowiska środowisku nowotworów, w którym komórki te pełnią szereg funkcji, w tym promują wzrost guza oraz angiogenezę przez produkcję VEGF. Biorą one udział także w indukowaniu przerzutów. Dodatkowo, poprzez wzmaganie oporności komórek nowotworowych na leczenie, odpowiedzialne są w dużej mierze za niepowodzenia terapeutyczne (Mantovani i in., 2017; Weigert i in., 2018).

Mikrośrodowisko nowotworu jest skomplikowanym układem, a komórki wchodzące w jego skład zmieniają swoją czynność biologiczną w kontakcie z cytokinami, produkowanymi zarówno przez nowotwór jak i przez otaczające je inne komórki nienowotworowe. W literaturze wskazuje się, że makrofagi o typie M2 stanowią większość makrofagów mikrośrodowiska nowotworu. Lokalizują się

głównie w obszarach hipoksyjnych i tych o wzmożonej angiogenezie (Colby i in., 2018; Xiong i in., 2021). Wykazano jednak, że obecność hipoksji nie wpływa na wzmożoną ekspresję 15-LOX.

Warty podkreślenia jest wpływ 15-LOX na ferroptozę komórek glejaka wielopostaciowego, będącej rodzajem śmierci komórki, różniącym się zarówno od martwicy jak i apoptozy. Polega ona na akumulacji powstałych w procesie peroksydacji lipidów żelazo-zależnych nadtlenków lipidów. Jej istnienie zostało odkryte dopiero niedawno, a wpływ ekspresji enzymów utleniających na wystąpienie ferroptozy wciąż nie jest do końca poznany (Çolakoğlu i in., 2018; Mitre i in., 2022).

1.3.2. Białko LCA

Białko LCA (*ang.: leukocyte common antigen*) to wspólny antygen leukocytarny, który ulega ekspresji tylko i wyłącznie w jądrzastych komórkach układu hematopoetycznego, zarówno tych dojrzałych jak i prekursorowych. Nie stwierdza się jego obecności w erytrocytach i płytkach krwi. Jego nazwą synonimiczną, która bardzo często pojawia się w literaturze fachowej, jest CD45 (Charbonneau i in., 1988).

Związek ten należy do grupy transbłonowych receptorów białkowej fosfatazy tyrozynowej (*ang.: receptor type protein tyrosine phosphatase*, RPTP). Region cytoplazmatyczny CD45 zawiera dwie homologiczne domeny białkowej fosfatazy tyrozynowej - aktywną domenę 1 (D1) i katalitycznie upośledzoną domenę 2 (D2) (Nam i in., 2005).

LCA, ze względu na zmienny splicing znamienych eksonów (Thude i in., 1995), ma kilka izoform, a komórki mogą wykazywać obecność więcej niż jednej z nich, przez co różnią się od siebie siłą ekspresji (Ngo i in., 2007; Novak i in., 1994). Chociaż teoretycznie liczba możliwych konfiguracji antygeny jest duża, w sposób mierzalny obserwuje się głównie tylko sześć z nich: e3_8, 378 (RO), 3578 (RB), 34578 (RAB), 35678 (RBC) i 345678 (RABC) (Holmes, 2006).

LCA lokalizuje się głównie w błonie komórkowej, jednak jego niewielkie ilości znajdują się także w cytoplazmie komórek. Obecność i stosunek ilościowy

antygenów w komórce może różnić się w zależności od etapu jej dojrzewania, subpopulacji do której należy oraz tego czy była już wcześniej ekspozycja. Ekspresję LCA stwierdza się nawet w martwiczej tkance nowotworowej pochodzenia hematopoetycznego (Judkins i in., 1998).

LCA spełnia bardzo ważną rolę w działaniu układu immunologicznego, głównie poprzez inicjację szlaków sygnałowych limfocytów T. Należy jednak podkreślić, że różne izoformy wykazują różną zdolność do wspierania aktywacji tych komórek (Altin & Sloan, 1997; Novak i in., 1994). Nie zostało to jeszcze w pełni wyjaśnione, a wszystkie funkcje LCA wciąż nie są do końca poznane i stanowią materiał bardzo licznych badań. Pewne jest natomiast, że w komórkach pełnią niezbędną rolę, gdyż zaburzenia ich ekspresji u ludzi wiążą się wystąpieniem ciężkiego złożonego niedoboru odporności (*ang.*: *severe combined immunodeficiency*, SCID) (Cale i in., 1997; Kung i in., 2000; Rheinländer i in., 2018; Tchilian i in., 2001). Wskazuje się, że nawet niewielkie mutacje w obrębie genu kodującego LCA mogą prowadzić do chorób autoimmunologicznych (Jacobsen i in., 2000; Schwinzer i in., 2003; Vogel i in., 2003).

W tkankach nienowotworowych LCA zidentyfikowano między innymi na limfocytach B i T, komórkach plazmatycznych, histiocytach, monocytach i komórkach tucznych. Komórki tkanek niehematopoetycznych nie wyrażają jego ekspresji. W licznych badaniach komórek nowotworowych, obecność LCA została stwierdzona w prawie wszystkich chłoniakach nieziarniczych typu B i T, w przewlekłej białaczce limfocytowej typu B lub T, białaczce prolimfocytowej i białaczce włochatokomórkowej. U pacjentów z chłoniakiem Hodgkina komórki pozostają niereaktywne, wykryto jednak, że niektóre komórki Reeda-Sternberga mogą być pozytywne. Nowotwory niehematopoetyczne pozostają niereaktywne (Kurtin & Pinkus, 1985; Michels i in., 1987), co sprawia, że LCA może być markerem nowotworów układu krwiotwórczego pozwalającym na ich odróżnienie od nisko zróżnicowanych nowotworów złośliwych pochodzenia nabłonkowego, mezenchymalnego lub nerwowego. W literaturze opisano wprawdzie pojedyncze przypadki ekspresji antygeny LCA w nowotworach pochodzenia niehematopoetycznego (McDonnell i in., 1987; Nandedkar i in., 1998), jednak ta kazuistyka nie przekreśla roli LCA jako doskonałego wskaźnika hematopoetycznego pochodzenia zmian.

Obiektem wielu współcześnie prowadzonych badań są prekursorowe szpikowe komórki LCA dodatnie, przemieszczające się we krwi do tkanek i wpływające na wiele procesów toczących się w organizmie człowieka. Wysłunięto hipotezę, że ze względu na swoją zdolność różnicowania się w kierunku miofibroblastów, produkujących kolagen typu I, mają wpływ na powstawanie zmian włóknistych w wątrobie, skórze, płucach i nerkach (Abe i in., 2020; Madala i in., 2014; Xu i in., 2015; Xu & Kisseleva, 2015). Inne badania mówią z kolei o ich właściwościach regeneracyjnych w miejscu uszkodzenia tkanki (Baligar i in., 2016; Harb i in., 2009; Ito i in., 2001) .

Ze względu na niejednoznaczne wyniki badań dotyczących roli szpikopochodnych komórek LCA-dodatnich w różnego rodzaju procesach patologicznych liczba artykułów dotyczących tych komórek ustawicznie wzrasta. W literaturze opisywane są jako potencjalny marker, czynnik rokowniczy i target terapeutycznym wielu jednostek chorobowych, w tym glejaka wielopostaciowego (Brandenburg i in., 2017; Zaitsev i in., 2020), szpiczaka mnogiego (Hermiston i in., 2003; Oka i in., 2020), zawału mięśnia sercowego (Z. Gabbasov i in., 2014; Z. A. Gabbasov i in., 2016), HIV (K. Li, Cong, i in., 2018; Nguyen i in., 2017; Stanton i in., 2004) oraz chorób autoimmunologicznych m.in. toczenia (Szodoray i in., 2016) i reumatoidalnego zapalenia stawów (Căpitănescu i in., 2010).

Obecność komórek szpikopochodnych LCA(+) stwierdza się również w mikrośrodoisku nowotworu. Największy odsetek komórek nienowotworowych mikrośrodoiska glejaków stanowią makrofagi (Parney i in., 2009; Xiao i in., 2021). Obok nich stwierdza się także limfocyty T i B, komórki NK, szpikopochodne komórki supresorowe, neutrofile i mastocyty. Ich obecność wywiera bardzo duży wpływ na komórki nowotworowe, a wydzielane przez nie chemokiny biorą udział w procesach wzmagających proliferację guza, zapobiegających apoptozie, wzmagających angiogenezę i przyczyniających się do zwiększonej inwazji oraz przerzutowania (Hanahan & Coussens, 2012). Limfocyty wykazują przeważnie tendencję do rekrutacji komórek linii mieloidalnej i supresji limfocytów T cytotoksycznych. Makrofagi, mastocyty i supresorowe komórki szpikopochodne wykazują cechy proangiogenne, proinwazyjne, proprzerutowe, proproliferacyjne i inhibitoryjne apoptozy. Neutrofile również spełniają wszystkie te funkcje, a dodatkowo mają działanie mutagenne i rekrutują większą ilość komórek nacieku zapalnego (Hanahan & Coussens, 2012). Mimo

że pierwotną rolą wszystkich wspomnianych komórek jest ograniczenie i supresja kancerogenezy, to w miarę wzrostu guza ulega ona zmianie do funkcji wspierającej guz. W badaniach nad rakiem piersi stwierdzono, że komórki układu odpornościowego, które w normalnych warunkach pełnią rolę komórek supresorowych procesów proliferacji i angiogenezy, w przebiegu interakcji z komórkami nowotworowymi podlegają zmianom molekularnym, stając się promotorami onkogenezy i sprzyjają promocji oraz pojawieniu się przerzutów (Hui & Chen, 2015; Soysal i in., 2015).

Wiedza na temat liczby komórek szpikopochodnych LCA(+) w mikrośrodowisku nowotworu wydaje się być bardzo przydatna w kontekście procesu diagnostycznego oraz terapeutycznego. Pojawiają się prace mówiące o tym, że duża liczba szpikopochodnych komórek układu immunologicznego w obrębie guza wiąże się z występowaniem tak zwanego stanu przedprzerzutowego i koreluje z gorszym rokowaniem, zwiastując bezpośrednio pojawienie się rozsiewu komórek nowotworowych (McAllister i in., 2008; Soysal i in., 2015).

1.4. Izotopy pierwiastków wykorzystane w badaniu glejaków

1.4.1. Węgiel i stabilne izotopy tego pierwiastka

Węgiel jest pierwiastkiem chemicznym, niemetałem, o liczbie atomowej 6, a liczbie masowej 12. W przyrodzie, w formie wolnej, we wszystkich swoich odmianach alotropowych (grafit, grafen, diament, fulereny), występuje w stanie stałym. Wchodzi w skład bardzo dużej ilości organicznych związków chemicznych, których liczbę można już podawać w milionach. Posiada dwa izotopy stabilne - ^{12}C i ^{13}C . Jego właściwości fizyczne w zależności od formy są skrajnie różne, co sprawia, że możemy się spotkać z przejrzystym i niewiarygodnie twardym diamentem, a także z szarym i zdecydowanie bardziej miękkim grafitem. Gęstość odmian wynosi od 2090 do 2230 kg/m³ ⁸.

⁸ <https://www.medianauka.pl/wegiel>, dostęp 12.02.2022

Dzięki temu, że węgiel jest elementem składowym tak wielu substancji chemicznych może być wykorzystywany jako wskaźnik wielu procesów. Jego ilość w środowisku jest względnie stała, a proces jego przechodzenia i wymiany pomiędzy różnymi organizmami, atmosferą i wodą określa się jako obieg węgla w przyrodzie. Śledzenie i analiza tego procesu, bazując głównie na ilości oraz formie izotopowej węgla, są wykorzystywane w dziedzinach takich jak ekologia, przemysł, geologia czy archeologia. Ze względu na to, że węgiel jest składową związków organicznych takich jak białka, tłuszcze czy cukry uważany jest za podstawę istnienia organizmów żywych. Przekłada się to na jego badania także w medycynie.

1.4.2. Azot i stabilne izotopy tego pierwiastka

Azot jest pierwiastkiem chemicznym, niemetalem, o liczbie atomowej 7, a liczbie masowej 14. W przyrodzie, w formie wolnej, występuje w stanie gazowym i stanowi 78% składu całkowitego powietrza. Posiada dwa izotopy stabilne - ^{14}N , który stanowi 99,6% naturalnie występujących izotopów i ^{15}N , występujący znacznie rzadziej. W analizie właściwości fizycznych, cechuje się bezbarwnością i bezwonnością. Jego gęstość w formie gazowej to 1,250 g/l, natomiast temperatury topnienia i wrzenia to kolejno $-210,01\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $-195,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ⁹.

Ze względu na to, że azot, zarówno w formie wolnej jak i złożonej występuje w powietrzu, ziemi oraz roślinach, jego ewaluacja ma największe znaczenie w rolnictwie, ekologii i naukach geofizycznych (cyrkulacja azotu) określana jest jako cykl nityfikacyjny,. Dodatkowo pierwiastek ten wchodzi w skład aminokwasów, białek, nukleotydów i kwasów nukleinowych, przez co badania nad jego izotopami stabilnymi prowadzi się także wyjątkowo często w medycynie.

⁹ <https://www.medianauka.pl/azot>, dostęp 12.02.2022

2. Założenia i cele pracy

2.1. Założenia pracy

Zmiany zachodzące w komórkach nowotworowych na poziomie molekularnym znajdują swoje odzwierciedlenie w stopniu ekspresji różnych białek. Glejaki, mimo coraz wyższego zaawansowania technologicznego badań, którym są poddawane i ogromu toczących się prac, wciąż pozostają nie w pełni poznane.

Poszukiwanie markerów, które poszerzyłyby perspektywę diagnostyki i terapii glejaków jest przedmiotem wielu współczesnych badań.

Istniejące liczne prace dotyczące roli szpikopochodnych komórek LCA-dodatnich w biologii wielu nowotworów oraz ekspresji 15-LOX w komórkach wchodzących w skład mikrośrodowiska guzów, dają nadzieję, że także w przypadku charakteryzujących się tak wysoką śmiertelnością glejaków - ewaluacja tych białek może dostarczyć nowych informacji o potencjalnych implikacjach klinicznych.

Pojedyncze, istniejące prace na temat wykorzystania IRMS w badaniach transformowanych nowotworowo tkanek wskazują na związek składu izotopowego z funkcjonowaniem tkanek nowotworowych. Nie odnaleziono jednak żadnych badań w tym zakresie dotyczących glejaków.

Badanie zakłada ocenę ekspresji badanych białek w wybranych guzach OUN ze szczególnym uwzględnieniem glejaka wielopostaciowego, ich mikrośrodowiska oraz otoczeniu wraz z ewaluacją składu izotopowego azotu i węgla. Wiodącym celem pracy jest poznawanie nieznanych aspektów biologii wybranych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego oraz poszukiwanie markerów o potencjalnym znaczeniu diagnostycznym i rokowniczym z wykorzystaniem nowoczesnych interdyscyplinarnych metod badawczych. Ocena mikrośrodowiska i otoczenia nowotworu, które w ostatnich czasach okazały się być niezwykle ważne dla procesu kancerogenezy służy lepszemu zrozumieniu interakcji guza i gospodarza a określenie różnic pomiędzy zmianą a prawidłową tkanką - potencjalnemu wykorzystaniu tych informacji w praktyce klinicznej.

Projekt badawczy oparty został o najnowsze odkrycia dotyczące roli ekspresji 15-LOX oraz szpikopochodnych komórek LCA-dodatnich w złożonym procesie nowotworzenia. Badanie zakłada ocenę ekspresji badanych białek w wybranych guzach OUN ze szczególnym uwzględnieniem glejaka wielopostaciowego, ich mikrośrodowiska oraz otoczeniu wraz z ewaluacją składu izotopowego azotu i węgla.

2.2. Cele pracy

1.

Ewaluacja ekspresji produktu genu ALOX-15 (białka 15-LOX) oraz obecności szpikopochodnych komórek LCA - dodatnich w wybranych nowotworach ośrodkowego układu nerwowego pochodzenia glejowego.

2.

Wstępna ocena potencjalnej wartości diagnostycznej i prognostycznej ekspresji produktu genu ALOX-15 (białka 15-LOX) oraz szpikopochodnych komórek LCA - dodatnich w wybranych nowotworach ośrodkowego układu nerwowego pochodzenia glejowego.

3.

Ustalenie wartości stosunku izotopowego izotopów stabilnych azotu i węgla w wybranych nowotworach ośrodkowego układu nerwowego pochodzenia glejowego i ich otoczeniu.

4.

Próba oceny potencjalnych zalet i ograniczeń praktycznego zastosowania izotopowej spektrometrii mas w badaniach nowotworów ośrodkowego układu nerwowego.

3. Materiały i metody

3.1. Materiały

Na podstawie zgody Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z dnia 10 września 2019 nr RNN/350/19/KE do badania włączono 144 przypadki z rozpoznaniem nowotworu pochodzenia glejowego, w tym:

- ✓ 109 przypadków, pochodzących z archiwum Katedry Onkologii Zakładu Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, pobranych i rozpoznanych w latach 2017-2020 do przeprowadzenia badań immunohistochemicznych
- ✓ 35 przypadków pozyskanych w Oddziale Klinicznym Neurochirurgii i Onkologii Centralnego Układu Nerwowego Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. Norberta Barlickiego w Łodzi - w których dodatkowo do badań immunohistochemicznych wykonano oznaczenia składu izotopowego

Bloczki parafinowe z materiałem tkankowym pochodzącym z nowotworów ośrodkowego układu nerwowego zarówno archiwalnym, jak i pozyskanym w toku bieżących procesów diagnostyczno-leczniczych wykorzystano do badań immunohistochemicznych. W przypadku oznaczeń składu izotopowego posłużono się standardami obowiązującymi w tym zakresie, które wskazano poniżej (kryteria włączenia i wyłączenia).

Kryteria włączenia do badań izotopowych:

- ✓ wyrażenie przez pacjenta świadomej zgody na udział w badaniu
- ✓ wiek powyżej 18 roku życia
- ✓ diagnozowany/leczony operacyjnie guz ośrodkowego układu nerwowego
- ✓ skuteczne pobranie materiału do badań

Kryteria wyłączenia:

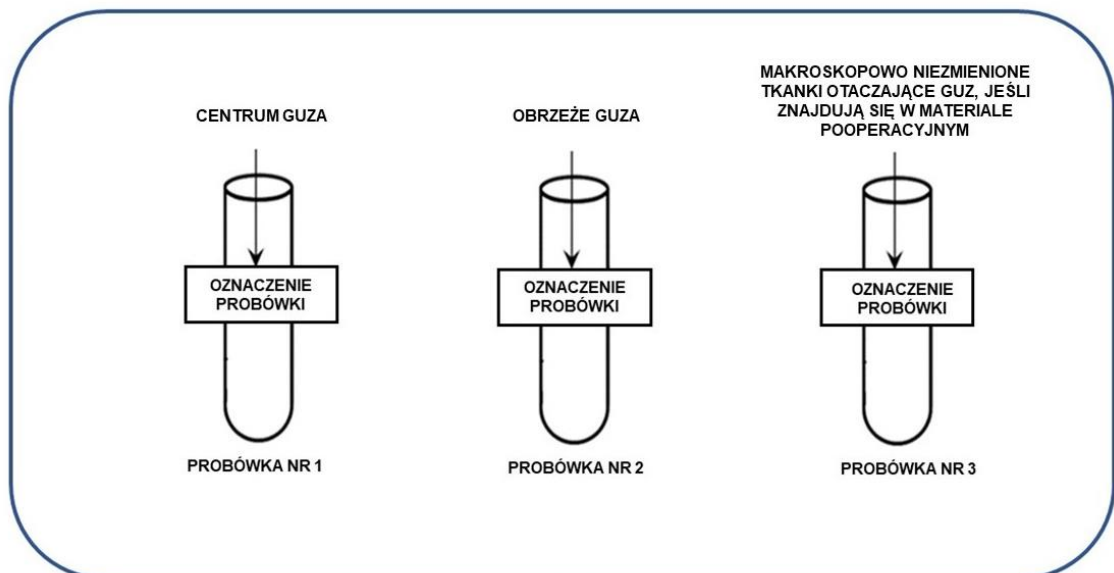
- ✓ choroby metaboliczne
- ✓ ciąża

- ✓ przewlekłe choroby wątroby i nerek
- ✓ nowotwory inne niż guz ośrodkowego układu nerwowego
- ✓ niestandardowe nawyki żywieniowe
- ✓ zamieszkanie w odległości powyżej 300 km od Łodzi

Materiał do badań składu izotopowego został pobrany bezpośrednio z materiału pooperacyjnego, tuż po wykonaniu standardowych procedur diagnostycznych oraz leczniczych przewidzianych w indywidualnym planie terapeutycznym chorego.

Pobierano 3 próbki (rycina 3) pochodzące z:

- centrum guza
- obrzeża guza na granicy pomiędzy utkaniem zmiany i tkanką makroskopowo niezmienną
- makroskopowo niezmiennych tkanek otaczających guz, znajdujących się w odległości od 1 do maksymalnie 2 mm od obrzeża guza pozostających w interakcji z guzem (Angelucci i in., 2018; Clavreul i in., 2015; Lemée i in., 2015)



Rycina 3. Schemat pobierania materiału do badania spektrometrycznego z materiału pooperacyjnego. Ilustracja własna autorki.

Materiał pobrany do oznaczeń izotopowych nie został utrwalony ani poddany jakiegokolwiek wpływowi innych substancji. Natychmiast po pobraniu tkanki były zamrażane i przechowywane w stałej, kontrolowanej temperaturze - 70°C aż do momentu ich liofilizacji, poprzedzającej przeprowadzenie badań IRMS. Cała procedura odbywała się zgodnie z uznanymi standardami dotyczącymi sposobów zabezpieczenia i przechowywania próbek, minimalizujących ryzyko zmian w składzie izotopowym tkanek (Ben-David & Flaherty, 2012; Taran, Frączek, Kamiński, i in., 2015).

Szczegółowa charakterystyka grupy badanej w ewaluacjach immunohistochemicznych została przedstawiona w tabeli 4, natomiast grupy badanej w analizie składu izotopowego w tabeli 5.

Tabela 4. Charakterystyka kliniczna grupy badanej w badaniach metodami immunohistochemicznymi.

Wiek pacjentów w latach, w momencie resekcji guza	minimum - 19 maksimum - 89 średnia - 54
Płeć	K - 49 M - 91
Typ histologiczny guza	glejaki rozlane inne niż glejak wielopostaciowy (<i>adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant</i>) - 30
	glejak wielopostaciowy (<i>glioblastoma, IDH-wildtype</i>) - 77
	gwiazdki włosowatokomórkowe (<i>pilocytic astrocytoma</i>) - 13
Lokalizacja guza względem linii pośrodkowej ciała	strona lewa - 66 strona prawa - 50
Lokalizacja guza w aspekcie struktur anatomicznych OUN	płat skroniowy - 38 płat czołowy - 46 płat ciemieniowy - 17 mózdzek - 11 płat potyliczny - 6 wyspa - 4 przysadka - 1 ciało modzelowate - 5 rdzeń - 1 inne - 16

Tabela 5. Charakterystyka kliniczna grupy badanej w analizie składu izotopowego

Wiek pacjentów w latach, w momencie resekcji guza	minimum - 19 maksimum - 79 średnia - 53
Płeć	K - 9 M - 26
Typ histologiczny guza	glejaki rozlane inne niż glejak wielopostaciowy (<i>adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant</i>) - 8 glejak wielopostaciowy (<i>glioblastoma, IDH-wildtype</i>) - 23
Lokalizacja guza względem linii pośrodkowej ciała	strona lewa - 19 strona prawa - 16
Lokalizacja guza w aspekcie struktur anatomicznych OUN	płat skroniowy - 14 płat czołowy - 14 płat ciemieniowy - 2 płat potyliczny - 2 mózdzek - 1 inne - 2

Ze względu na opisane wcześniej zmiany w klasyfikacji nowotworów ośrodkowego układu nerwowego zgodnie z najnowszą klasyfikacją WHO, do których wytyczne ukazały się w piśmiennictwie dopiero w czasie ostatniej fazy prac nad prezentowaną rozprawą, podjęto próbę ukazania wyników prezentowanych badań w kontekście nowo wprowadzonych zmian. Kompletna reklasyfikacja nie była niestety możliwa z uwagi na brak danych dotyczących części mutacji genetycznych, potrzeba ewaluacji których nie była znana w momencie tworzenia ani trwania projektu, a które obecnie są wymagane do postawienia ostatecznych diagnoz w świetle nowych regulacji.

Dla potrzeb rozprawy i jej implikacyjnych celów wyodrębniono trzy grupy nowotworów, ze szczególnym uwzględnieniem guzów o genotypie IDH-wildtype, ze względu na ich rokowanie:

- gwiazdziaki włosatokomórkowe (*pilocytic astrocytomas*), jako przedstawiciela glejaków ograniczonych
- glejaki rozlane inne niż glejak wielopostaciowy (*adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant*)
- glejaki wielopostaciowe (*glioblastoma, IDH-wildtype*)

3.2. Metody

3.2.1. Metodyka badań immunohistochemicznych

Materiał z guzów standardowo utrwalany formaliną i zatopiony w blokach parafinowych dla potrzeb prezentowanych badań skrawano przy użyciu mikrotomu na skrawki o grubości 3-4 mikrometrów, które następnie wykorzystano do badań immunohistochemicznych (*ang.: immunohistochemistry, IHC*) w systemie detekcyjnym EnVision FLEX+ Rabbit firmy Dako.

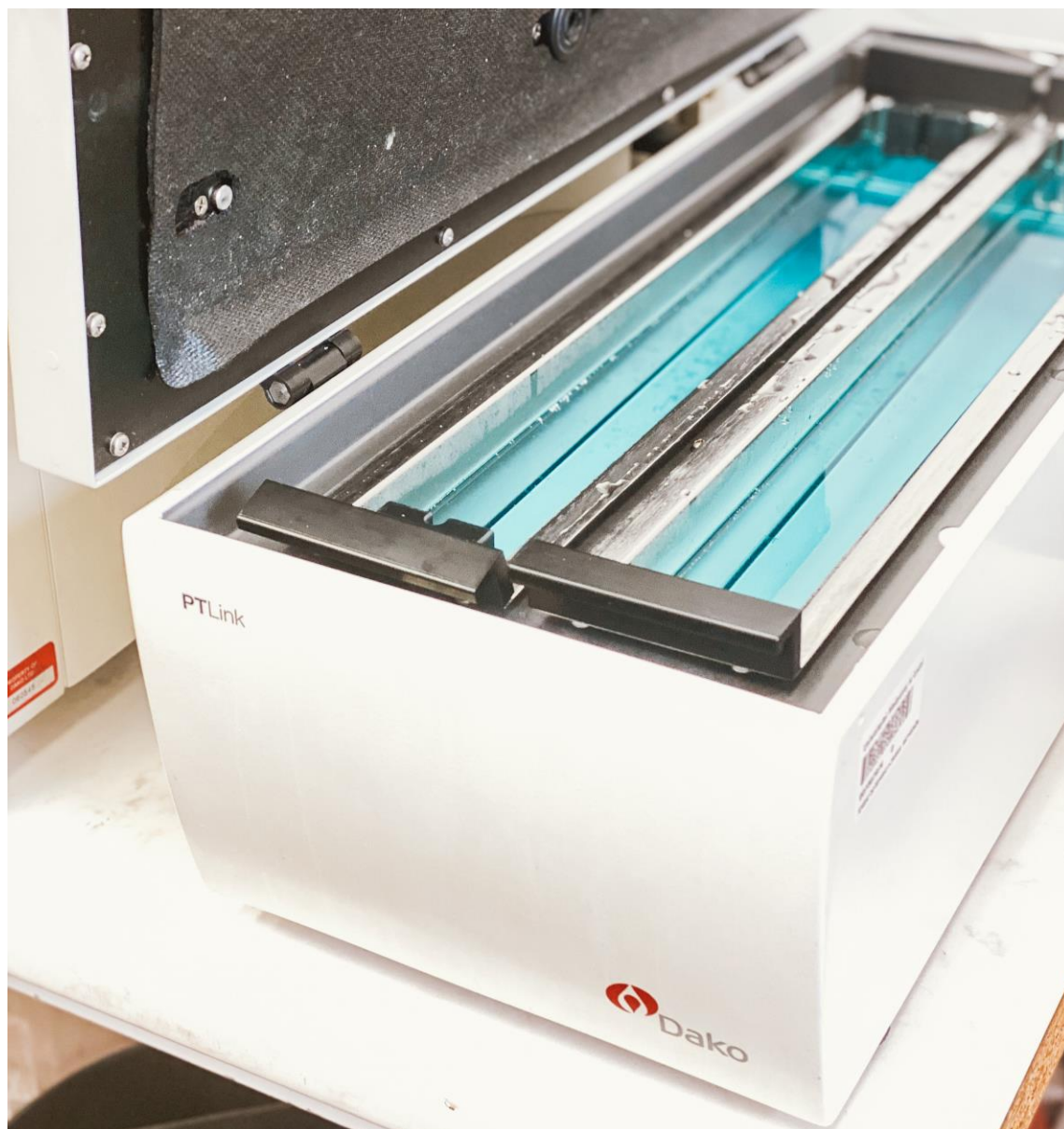
Barwienia immunohistochemiczne oparte zostały na metodzie immunoperoxydazowej z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych przeciwciał króliczych poliklonalnych skierowanych przeciw 15-LOX i LCA, użytych zgodnie z zaleceniami producenta, których parametry i finalne kryteria oceny zostały przedstawione w tabeli 6.

Przed rozpoczęciem barwień immunohistochemicznych docelowej grupy badanej wykonano barwienia kontrolne w celu dostosowania optymalnego czasu inkubacji oraz stężenia danego przeciwciała.

Tabela 6. Właściwości króliczych przeciwciał poliklonalnych dla 15-LOX i LCA.

Nazwa przeciwciała	Producent	Stężenie	Czas inkubacji	Sposób odsłonięcia antygeny	Kontrola
15-LOX	Biorbyt	1:600	60'	PT Link pH 8,0	węzeł chłonny
LCA	Biorbyt	1:600	60'	PT Link pH 8,0	węzeł chłonny

Przygotowane skrawki parafinowe zostały nałożone na szkiełka podstawowe SuperFrost i wysuszone w cieplarni w temperaturze 60°C przez 1 godzinę. Kolejnym etapem procedury było odparafinowanie oraz odsłonięcie antygenów przy użyciu aparatu PT Link (fot. 4) z wykorzystaniem odczynników EnVision Flex.



Fot. 4. Aparat PT Link Dako, użyty do odsłonięcia antygenów - Katedra Onkologii, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Zdjęcie z archiwum autorki.

Następnie hamowano aktywność endogennej peroksydazy przy użyciu 3 % roztworu H₂O₂ przez 10 minut i następnie dwukrotnie płukano w Bufor Wash.

Otrzymane szkiełka ze skrawkami poddano barwieniu immunohistochemicznemu manualnemu lub przy użyciu Dako Autostainer.

W kolejnym etapie zastosowano dwustopniowy system wizualizacji EnVision, aby uwidocznić reakcję antygen – przeciwciało. Ostatnią czynnością była 10-minutowa inkubacja szkiełek z zastosowaniem roztworu, składającego się z 1 mL buforu i 1 kropli DAB (tetrachlorek 3,3`diaminobenzzydiny), będącego substratem dla peroksydazy i dającej barwny produkt. Po uzyskaniu pozytywnej reakcji immunohistochemicznej, w celu podbarwienia jąder komórkowych wykonywano barwienie hematoksyliną i inkubowano całość przez 3 min. Aby odvodnić otrzymany preparat, skrawki przeprowadzono przez szereg odczynników, według schematu: trzykrotne zastosowanie alkoholu, dwukrotne zastosowanie acetonu, trzykrotne zastosowanie ksylenu, a następnie zaklejano bezwodnym medium zaklejającym DPX i nakrywano szkiełkiem nakrywkowym.

Kontrolą negatywną były skrawki, gdzie zamiast przeciwciał pierwotnych dodano bufor TBS i zastosowano opisaną standardową procedurę immunohistochemiczną. Kontrolą pozytywną były skrawki, dające znaną wcześniej, pozytywną reakcję w kierunku badanego antygenu.

Preparaty zostały ocenione przy użyciu mikroskopu świetlnego firmy Olympus w dużym polu widzenia - powiększenie 400x (*ang.: high power field, HPF*) niezależnie przez dwie osoby, a wyniki następnie porównane i w przypadku, gdy różnica była mniejsza niż 5%, uśredniane. W sytuacji większych rozbieżności, ewaluacja była powtarzana. Ocena mikroskopowa była kontrolowana przez specjalistę patomorfologii.

W przypadku oceny ekspresji LCA w komórkach szpikopochodnych za pozytywną uznawano reakcję o charakterze błonowym lub cytoplazmatycznym. Oceniano liczbę komórek dodatnich w miejscach o najsilniejszej reakcji (tzw. hot spot) w dużym polu widzenia oraz ich stosunek do wszystkich komórek. Z ewaluacji wykluczono obszary okołonaczyniowe oraz martwicze zgodnie z przyjętą w literaturze metodyką (Strik i in., 2004).

W przypadku oceny ekspresji 15-LOX(+) za pozytywną uznawano reakcję o charakterze cytoplazmatycznym Komórki dodatnie, będące oligodendrocytami oraz makrofagami i komórkami mikrogleju, zaklasyfikowane na podstawie oceny

morfologicznej, były zliczone w dużym polu widzenia zgodnie z przyjętą w literaturze metodyką (Haynes & van Leyen, 2013). Ewaluacja została dokonana w miejscach o największym zagęszczeniu dodatnich komórek (hot spot) zarówno w obszarze nowotworu, jak i w jego bezpośrednim otoczeniu. Poza całkowitą liczbą komórek 15-LOX(+) w HPF wzięto także pod uwagę stosunek tychże komórek do wszystkich komórek w polu widzenia. Podobnie jak w przypadku LCA z oceny wykluczono obszary martwicy.

3.2.2. Metodyka pomiarów składu izotopowego

Dokonano pomiaru stosunku izotopowego stabilnych izotopów azotu węgla a także stosunku masowego N/C.

Badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem spektrometru masowego stosunku izotopowego z przepływem ciągłym Sercon 20-22 (*ang.: Continuous Flow Isotope Ratio Mass Spectrometer, CF-IRMS, Sercon 20-22*) sprzężonego z analizatorem pierwiastkowym, umożliwiającym jednoczasową analizę węgla i azotu. System i sposób pomiarów odpowiadały procedurze opisanej wcześniej w literaturze (Fry, 2007).

Pozyskane od pacjentów tkanki, pochodzące z centrum guza, jego obrzeża oraz tkanek makroskopowo niezmiennych, o ile takowe znajdowały się w materiale pooperacyjnym, zostały zliofilizowane w Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas w Państwowej Akademii Nauk w Warszawie. Przy pomocy wagi analitycznej, w miarę możliwości starano się uzyskać próbki o suchej masie 2-3 mg. Odważony materiał umieszczano w kapsułkach cynowych o wym. 8x5mm (fot. 5), jednocześnie dodając do każdej kapsułki ok. 1 mg pięciotlenku wanadu (V_2O_5) jako utleniacza i katalizatora spalania w próbce. Całość, ze względu na ryzyko uszkodzenia i wydostania się materiału poza kapsułkę, ostrożnie zawijano, nadając kulisty kształt. Jako standardu lokalnego użyto kwasu tiobarbiturowego, umieszczanego również w kapsułkach cynowych z dodatkiem pięciotlenku wanadu (Taran, Frączek, Kamiński, i in., 2015).



Fot. 5 Kapsułka cynowa, wykorzystywana do pomiarów spektrometrycznych. Zdjęcie z archiwum autorki.

W celu uzyskania informacji na temat stosunku izotopowego i masowego stabilnych izotopów węgla i azotu dokonano serii pomiarów po 15 próbek tkankowych w każdej, wraz ze standardem lokalnym w postaci kwasu tiobarbiturowego, zgodnie z tabelą 7.

Używanymi standardami były:

- ✓ dla azotu (δAir) - azot atmosferyczny
- ✓ dla węgla (δPDB) - Pee Dee Belemnite (PDB)

Tabela 7. Schemat pomiarów metodą izotopowej spektrometrii mas.

1	kwask tiobarbiturowy	12	materiał tkankowy
2	materiał tkankowy	13	kwask tiobarbiturowy
3	materiał tkankowy	14	materiał tkankowy
4	materiał tkankowy	15	materiał tkankowy
5	kwask tiobarbiturowy	16	materiał tkankowy
6	materiał tkankowy	17	kwask tiobarbiturowy
7	materiał tkankowy	18	materiał tkankowy
8	materiał tkankowy	19	materiał tkankowy
9	kwask tiobarbiturowy	20	materiał tkankowy
10	materiał tkankowy	21	kwask tiobarbiturowy
11	materiał tkankowy		

Mierzono stosunki zawartości izotopów cięższych do lżejszych pożądanego pierwiastka, a następnie uzyskano wartości delta (δ) dla każdego z nich. Końcowym efektem było otrzymanie wartości stosunku izotopowego oraz masowego analizowanego materiału, w tym:

- ✓ wartości stosunku izotopowego stabilnych izotopów azotu $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ (δ Air)
- ✓ wartości stosunku izotopowego stabilnych izotopów węgla $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (δ PDB)
- ✓ wartości stosunku masowego azotu do węgla N/C

Wszystkie dane histokliniczne oraz wyniki oceny ekspresji badanych białek i pomiarów izotopowych zostały zakodowane w stworzonej dla celów prezentowanego badania bazie danych, a następnie poddane analizie statystycznej.

3.2.3. Metodyka analizy statystycznej

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą pakietów języka R (v. 4.1). Obejmowała ona wyniki oceny odczynów immunohistochemicznych oraz wyniki pomiarów izotopowych.

W analizie danych wzięto pod uwagę średnią, odchylenie standardowe (*ang.: standard deviation*, SD), medianę i zakres minimum oraz maksimum.

W celu porównania parametrów pomiędzy grupami wykorzystano nieparametryczny test Manna-Whitneya-Wilcoxon dla dwóch zmiennych niezależnych oraz test Kruskala-Wallisa dla trzech i więcej zmiennych niezależnych wraz z nieparametrycznym testem Wilcoxon jako testem post-hoc w przypadku istotnych porównań.

Korelacje pomiędzy poszczególnymi zmiennymi zbadano przy pomocy współczynnika korelacji rang Spearmana.

Do znalezienia ewentualnych prawidłowości między cechami pacjentów przeprowadzono analizę składowych głównych (PCA).

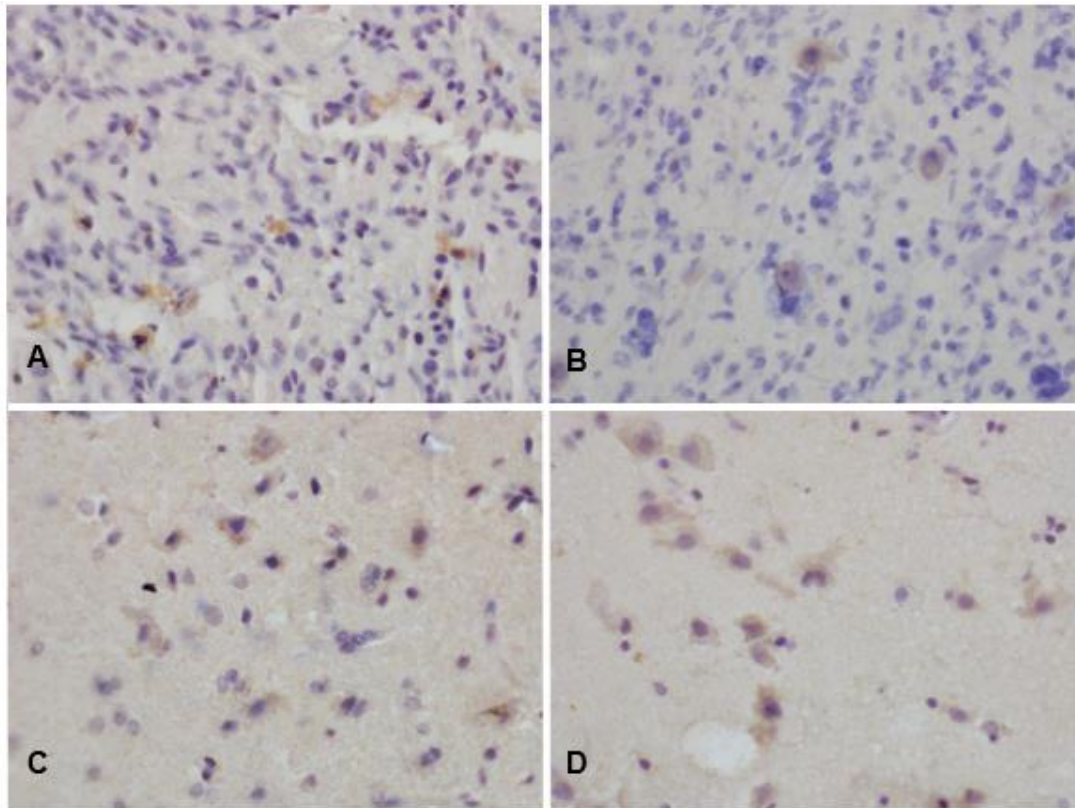
Wyniki uznawano za znamienne statystycznie dla $p < 0,05$.

4. Wyniki

4.1. Wyniki oceny immunoekspresji badanych białek

4.1.1. Immunoekspresja białka 15-LOX

Ekspresja białka 15-LOX widoczna była w komórkach mikrogleju i makrofagach szpikopochodnych. Została ona przedstawiona na fot.6.



Fot. 6. Ekspresja białka 15-LOX w komórkach mikrogleju, oligodendrocytach i makrofagach szpikopochodnych w obrębie badanych guzów OUN (A, B) i tkanek otaczających guz (C,D), u wybranych pacjentów z grupy badanej, 400x. Zdjęcie z bazy obrazów mikroskopowych, stworzonych w toku badań.

Objaśnienia:

A - Mężczyzna, 39 lat, glejak wielopostaciowy (*glioblastoma, IDH-wildtype*)

B - Mężczyzna, 41 lat, glejak rozlany inny niż glejak wielopostaciowy (*adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant*)

C - Mężczyzna, 45 lat, glejak wielopostaciowy (*glioblastoma, IDH-wildtype*)

D - Mężczyzna, 78 lat, glejak wielopostaciowy (*glioblastoma, IDH-wildtype*).

Zauważono, że zarówno średnia liczba komórek 15-LOX(+) (5 w obrębie guza, 13 w otoczeniu) jak i mediana (3 w obrębie guza, 10 w otoczeniu) są wyższe w otoczeniu nowotworu niż w obrębie guza. Wyniki przedstawione zostały w tabeli 8.

Tabela 8. Immunoekspresja białka 15-LOX w obrębie guza i w jego otoczeniu.

	minimum	maksimum	średnia	mediana	SD
komórki 15-LOX(+) w obrębie guza	0	69	5	3	±7,78
komórki 15-LOX(+) w otoczeniu guza	2	42	13	10	±9,96
stosunek liczby komórek 15-LOX(+) do całkowitej liczby komórek nowotworowych	0	0,13	0,02	0,01	±0,03
indeks 15-LOX(+)	1	45	14	13	±9

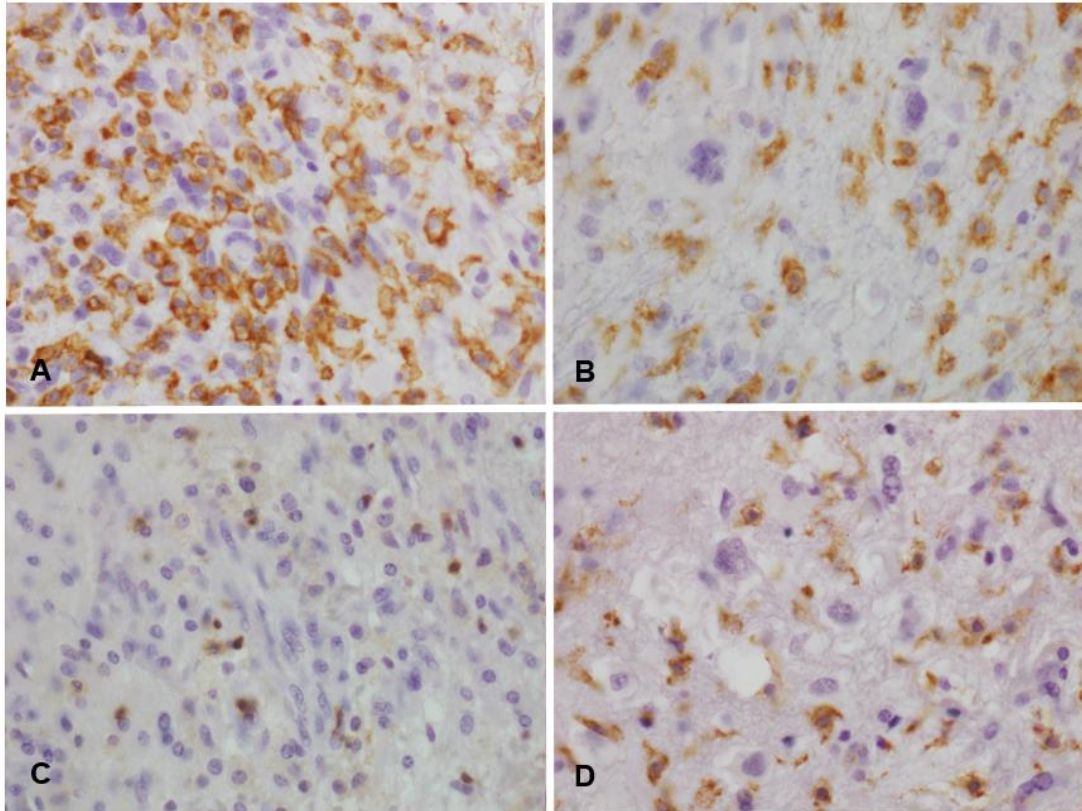
4.1.2. Immunoekspresja białka LCA

Dokonano ewaluacji liczby komórek LCA(+) / HPF w obrębie guza oraz określono ich stosunek do całkowitej liczby komórek nowotworowych w obrębie guza. Wyniki przedstawione zostały w tabeli 9.

Tabela 9. Immunoekspresja białka LCA w obrębie guza.

	minimum	maksimum	średnia	mediana	SD
komórki LCA(+) w obrębie guza	0	200	67	65	±39,58
stosunek liczby komórek LCA(+) do całkowitej liczby komórek nowotworowych	0	3	0,53	0,4	±0,45

Ekspresja białka LCA widoczna była tylko i wyłącznie w komórkach szpikopochodnych. Została ona przedstawiona na fot.7.



Fot. 7. Ekspresja białka LCA w komórkach szpikopochodnych w obrębie badanych guzów OUN u wybranych pacjentów z grupy badanej, 400x. Zdjęcie z bazy obrazów mikroskopowych, stworzonych w toku badań.

Objaśnienia:

A - Mężczyzna, 81 lat, glejak wielopostaciowy (*glioblastoma, IDH-wildtype*)

B - Kobieta, 73 lata, glejak wielopostaciowy (*glioblastoma, IDH-wildtype*)

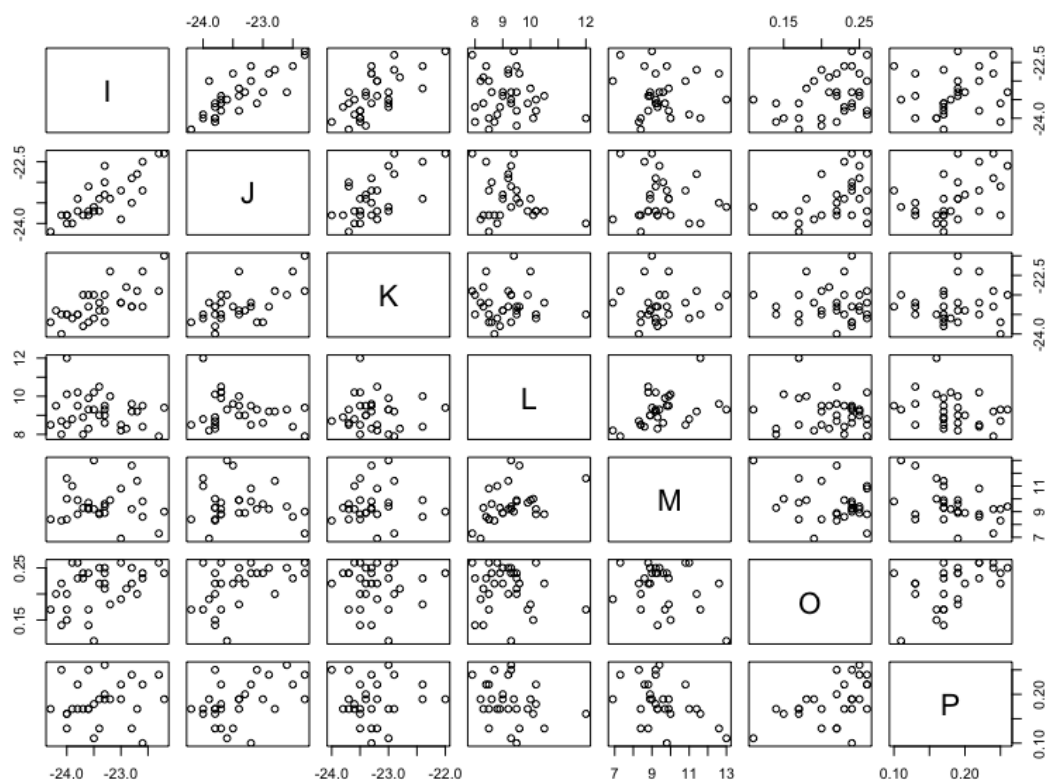
C - Kobieta, 43 lata, glejak rozlany inny niż glejak wielopostaciowy (*adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant*)

D - Mężczyzna, 85 lat, glejak wielopostaciowy (*glioblastoma, IDH-wildtype*).

4.2. Wyniki pomiarów stosunku izotopowego stabilnych izotopów azotu i węgla w glejakach

Uzyskano 284 wyniki pomiarów stosunku izotopowego stabilnych izotopów węgla $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ i azotu $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ oraz stosunku masowego N/C, w tym 101 z centrum guza, 87 z obrzeża guza i 96 z bezpośredniego otoczenia guza, będącego makroskopowo niezmiennymi tkankami. Dla każdej z grup pomiarów określono wartości maksymalne, minimalne, średnią, medianę oraz odchylenie standardowe. Utworzono wykresy rozrzutu, obrazujące korelacje pomiędzy poszczególnymi zmiennymi i przedstawiono je zbiorczo na diagramie 1.

Diagram 1. Zbiorcza prezentacja wykresów rozrzutu wybranych parametrów.



Objaśnienia:

- | | | | |
|----------|--|----------|--|
| I | stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza | M | stosunek izotopowy $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ na obrzeżu guza |
| J | stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ na obrzeżu guza | N | stosunek izotopowy $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ w tkankach otaczających guz |
| K | stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w tkankach otaczających guz | O | stosunek masowy N/C w centrum guza |
| L | stosunek izotopowy $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ w centrum guza | P | stosunek masowy N/C na obrzeżu guza |

4.2.1. Skład izotopowy centrum guza

Uzyskano 101 wyników pomiaru stosunku izotopowego stabilnych izotopów, w tym 34 węgla $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, 34 azotu $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ oraz 33 wyniki stosunku masowego N/C.

Stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza wahał się od $-24,3\text{‰}$ (minimum) do $-22,2\text{‰}$ (maksimum). Średnia wartość stosunku izotopowego stabilnych izotopów węgla wyniosła $-23,4\text{‰}$ (mediana $-23,5\text{‰}$; odchylenie standardowe $\pm 0,55$) (tabela 10).

Stosunek izotopowy $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ w centrum guza wahał się od $7,9\text{‰}$ (minimum) do 12‰ (maksimum). Średnia wartość stosunku izotopowego stabilnych izotopów azotu wyniosła $9,2\text{‰}$ (mediana $9,2\text{‰}$; odchylenie standardowe $\pm 0,84$) (tabela 10).

Wartości stosunku masowego N/C w centrum guza wahały się od 0,11 (minimum) do 0,26 (maksimum). Średnia wartość stosunku masowego N/C wyniosła 0,21 (mediana 0,22; odchylenie standardowe $\pm 0,04$) (tabela 10).

Tabela 10. Wyniki pomiarów stosunku izotopowego stabilnych izotopów węgla i azotu oraz stosunku masowego N/C w centrum guza.

	minimum	maksimum	średnia	mediana	SD
$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	$-24,3\text{‰}$	$-22,2\text{‰}$	$-23,4\text{‰}$	$-23,5\text{‰}$	$\pm 0,55$
$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	$7,9\text{‰}$	12‰	$9,2\text{‰}$	$9,2\text{‰}$	$\pm 0,84$
N/C	0,11	0,26	0,21	0,22	$\pm 0,04$

4.2.2. Skład izotopowy obrzeża guza

Uzyskano 87 wyników pomiaru stosunku izotopowego stabilnych izotopów, w tym 29 węgla $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, 29 azotu $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ oraz 29 wyników stosunku masowego N/C.

Stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza wahał się od $-24,2\text{‰}$ (minimum) do $-22,3\text{‰}$ (maksimum). Średnia wartość stosunku izotopowego stabilnych izotopów węgla wyniosła $-23,4\text{‰}$ (mediana $-23,5\text{‰}$; odchylenie standardowe $\pm 0,51$) (tabela 11).

Stosunek izotopowy $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ w centrum guza wahał się od $6,9\text{‰}$ (minimum) do 13‰ (maksimum). Średnia wartość stosunku izotopowego stabilnych izotopów azotu wyniosła $9,6$ (mediana $9,3\text{‰}$; odchylenie standardowe $\pm 1,35$) (tabela 11).

Wartości stosunku masowego N/C w centrum guza wahały się od $0,1$ (minimum) do $0,26$ (maksimum). Średnia wartość stosunku masowego N/C wyniosła $0,18$ (mediana $0,18$; odchylenie standardowe $\pm 0,04$) (tabela 11).

Tabela 11. Wyniki pomiarów stosunku izotopowego stabilnych izotopów węgla i azotu oraz stosunku masowego N/C na obrzeżu guza.

	minimum	maksimum	średnia	mediana	SD
$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	$-24,2\text{‰}$	$-22,3\text{‰}$	$-23,4\text{‰}$	$-23,5\text{‰}$	$\pm 0,51$
$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	$6,9\text{‰}$	13‰	$9,6\text{‰}$	$9,3\text{‰}$	$\pm 1,35$
N/C	$0,1$	$0,26$	$0,18$	$0,18$	$\pm 0,04$

4.2.3. Skład izotopowy makroskopowo niezmienionych tkanek otaczających guz

Uzyskano 96 wyników pomiaru stosunku izotopowego stabilnych izotopów, w tym 32 węgla $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, 32 azotu $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ oraz 32 wyniki stosunku masowego N/C.

Stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza wahał się od -24‰ (minimum) do -22‰ (maksimum). Średnia wartość stosunku izotopowego stabilnych izotopów węgla wyniosła -23,2‰ (mediana -23,3‰; odchylenie standardowe $\pm 0,43$) (tabela 12).

Stosunek izotopowy $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ w centrum guza wahał się od 2‰ (minimum) do 11,2‰ (maksimum). Średnia wartość stosunku izotopowego stabilnych izotopów azotu wyniosła 9,1‰ (mediana 9,1‰; odchylenie standardowe $\pm 1,48$) (tabela 12).

Wartości stosunku masowego N/C w centrum guza wahały się od 0,11 (minimum) do 0,26 (maksimum). Średnia wartość stosunku masowego N/C wyniosła 0,17 (mediana 0,18; odchylenie standardowe $\pm 0,04$) (tabela 12).

Tabela 12. Wyniki pomiarów stosunku izotopowego stabilnych izotopów węgla i azotu oraz stosunku masowego N/C w makroskopowo niezmienionych tkankach, otaczających guz.

	minimum	maksimum	średnia	mediana	SD
$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	-24‰	-22‰	-23,2‰	-23,3‰	$\pm 0,43$
$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	2‰	11,2‰	9,1‰	9,1‰	$\pm 1,48$
N/C	0,11	0,26	0,17	0,18	$\pm 0,04$

4.2.4. Analiza porównawcza składu izotopowego węgla w badanych lokalizacjach

Stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza był bardzo zbliżony do stosunku izotopowego $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ na obrzeżu guza oraz w makroskopowo niezmiennych tkankach otaczających guz. Wyniki zostały przedstawione w tabeli 13.

Tabela 13. Analiza porównawcza otrzymanych wyników stosunku izotopowego $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ pomiędzy centrum guza, jego obrzeżem oraz makroskopowo niezmiennymi tkankami, bezpośrednio otaczającymi guz.

$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	minimum (‰)	maksimum (‰)	średnia (‰)	mediana (‰)	SD
centrum guza	-24,3	-22,2	-23,4	-23,5	±0,55
obrzeże guza	-24,2	-22,3	-23,4	-23,5	±0,51
tkanki otaczające	-24	-22	-23,2	-23,3	±0,43

4.2.5. Analiza porównawcza składu izotopowego azotu w badanych lokalizacjach

Stosunek izotopowy $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ w centrum guza, na obrzeżu guza oraz w makroskopowo niezmiennych tkankach otaczających guz był zbliżony. Wyniki zostały przedstawione w tabeli 14.

Tabela 14. Analiza porównawcza otrzymanych wyników stosunku izotopowego $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ pomiędzy centrum guza, jego obrzeżem oraz makroskopowo niezmiennymi tkankami, bezpośrednio otaczającymi guz.

$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	minimum (‰)	maksimum (‰)	średnia (‰)	mediana (‰)	SD
centrum guza	7,9	12	9,2	9,2	±0,84
obrzeże guza	6,9	13	9,6	9,3	±1,35
tkanki otaczające	2	11,2	9,1	9,1	±1,48

4.2.6. Analiza porównawcza stosunku masowego N/C w badanych lokalizacjach

Stosunek masowy N/C wykazywał tendencję malejącą wraz z oddalaniem się od centrum guza, w którym osiągał najwyższe wartości (średnia 0,21; mediana 0,22). Wyniki zostały przedstawione w tabeli 15.

Tabela 15. Analiza porównawcza otrzymanych wyników stosunku masowego N/C pomiędzy centrum guza, jego obrzeżem oraz makroskopowo niezmiennymi tkankami, bezpośrednio otaczającymi guz.

N/C	minimum	maksimum	średnia	mediana	SD
centrum guza	0,11	0,26	0,21	0,22	±0,04
obrzeże guza	0,1	0,26	0,18	0,18	±0,04
tkanki otaczające	0,11	0,26	0,17	0,18	±0,04

4.3. Wyniki analizy statystycznej

4.3.1. Wyniki analizy statystycznej immunoekspresji badanych białek

Podczas analizy statystycznej wyników wykorzystano następujące histokliniczne zmienne grupujące:

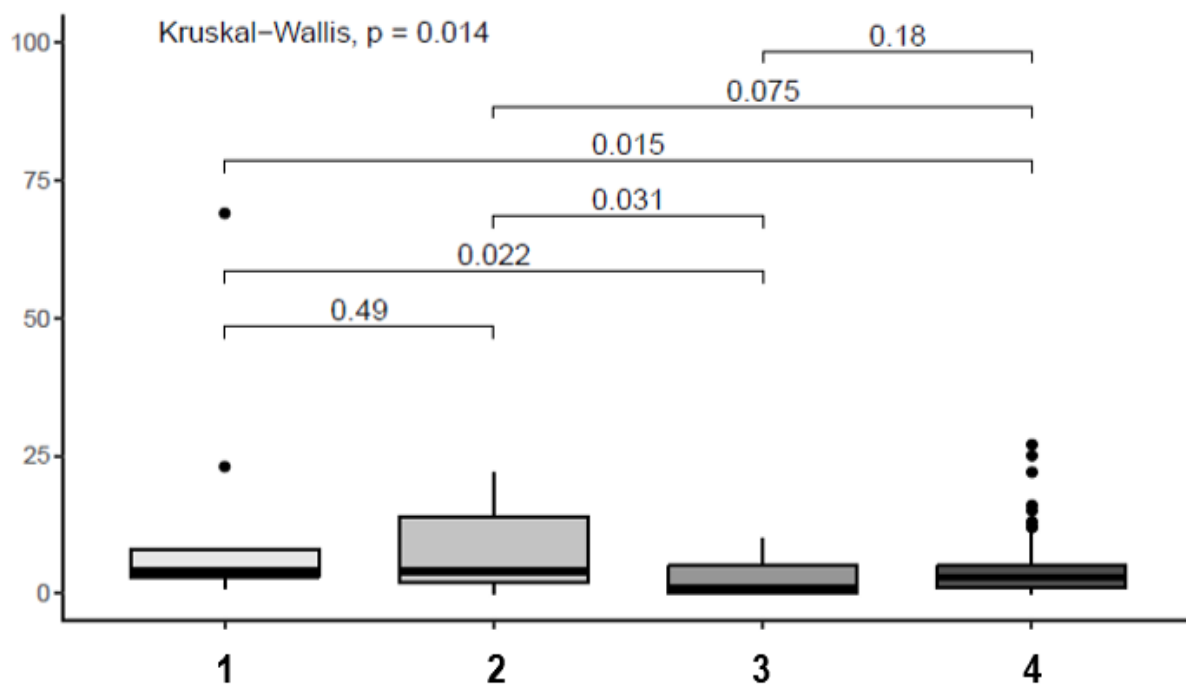
- płeć
- wiek pacjenta w momencie resekcji
- lokalizację guza względem linii pośrodkowej ciała (strona lewa, strona prawa)
- lokalizację guza względem struktur anatomicznych
- stopień złośliwości histologicznej (grade) w rozpoznaniu pierwotnym (grade 1, 2, 3 i 4)
- rozpoznanie histopatologiczne tj. grupy gwiazdziak włosatokomórkowy - *pilocytic astrocytoma*; glejak wielopostaciowy - *glioblastoma*, *IDH-wildtype*; glejaki rozlane inne niż glejak wielopostaciowy - *adult-type diffuse gliomas*, *IDH-mutant*
- indeks Ki-67

4.3.1.1. Wyniki analizy statystycznej immunoekspresji białka 15-LOX

Wykazano istotną różnicę pomiędzy liczbą komórek 15-LOX(+) / HPF w obrębie guza a stopniem złośliwości histologicznej ($p=0,014$) i zobrazowano na wykresie 1. Zauważono, że guzy o niższym stopniu złośliwości histologicznej charakteryzowały się większą liczbą komórek 15-LOX(+) / HPF w obrębie guza.

Porównania w podgrupach ujawniły ponadto istotne statystycznie różnice pomiędzy:

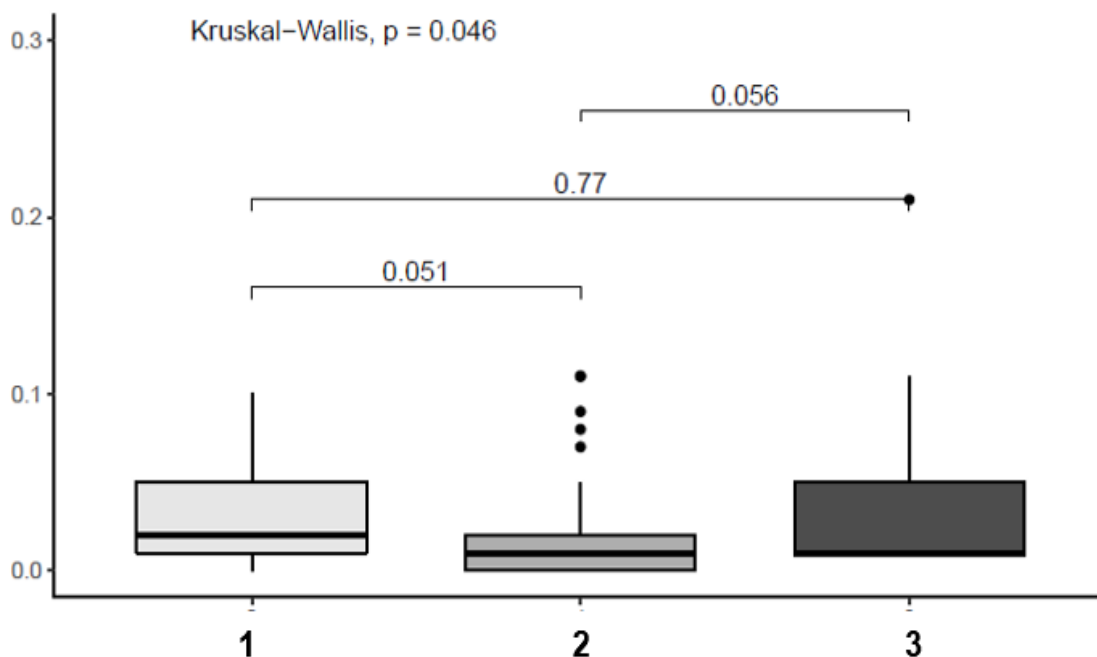
- liczbą komórek 15-LOX(+) / HPF w obrębie guza w nowotworach o pierwszym stopniu złośliwości histologicznej i w nowotworach o trzecim stopniu złośliwości histologicznej ($p=0,022$). Liczba komórek 15-LOX(+) / HPF była większa w guzach o pierwszym stopniu złośliwości histologicznej.
- liczbą komórek 15-LOX(+) / HPF w obrębie guza w nowotworach o pierwszym stopniu złośliwości histologicznej i w nowotworach o czwartym stopniu złośliwości histologicznej ($p=0,015$). Liczba komórek 15-LOX(+) / HPF była większa w guzach o pierwszym stopniu złośliwości histologicznej.
- liczbą komórek 15-LOX(+) / HPF w obrębie guza w nowotworach o drugim stopniu złośliwości histologicznej i w nowotworach o trzecim stopniu złośliwości histologicznej ($p=0,031$). Liczba komórek 15-LOX(+) / HPF była większa w guzach o drugim stopniu złośliwości histologicznej.



Wykres 1. Test Kruskala-Wallisa - istotne statystycznie różnice pomiędzy stopniem złośliwości histologicznej guza (oś X) a liczbą komórek 15 LOX(+) / HPF w obrębie guza (oś Y).

Objaśnienia: **1** - pierwszy stopień złośliwości histologicznej (grade 1), **2** - drugi stopień złośliwości histologicznej (grade 2), **3** - trzeci stopień złośliwości histologicznej (grade 3), **4** - czwarty stopień złośliwości histologicznej (grade 4)

Wykazano istotną statystycznie różnicę pomiędzy stosunkiem liczby komórek 15-LOX(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF a rozpoznaniem histopatologicznym ($p=0,046$). Wyniki zostały przedstawione na wykresie 2. Wykazano, że stosunek komórek 15-LOX(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF jest najwyższy w guzach z rozpoznaniem glejaka rozlanego innego niż glejak wielopostaciowy (*adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant*).



Wykres 2. Test Kruskala-Wallisa - istotna statystycznie różnica pomiędzy rozpoznaniem histopatologicznym (oś X) a stosunkiem liczby komórek 15-LOX(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF (oś Y).

Objaśnienia: 1 - glejaki rozlane inne niż glejak wielopostaciowy (*adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant*), 2 - glejak wielopostaciowy (*glioblastoma, IDH-wildtype*), 3 - gwiaździak włosowatokomórkowy (*pilocytic astrocytoma*)

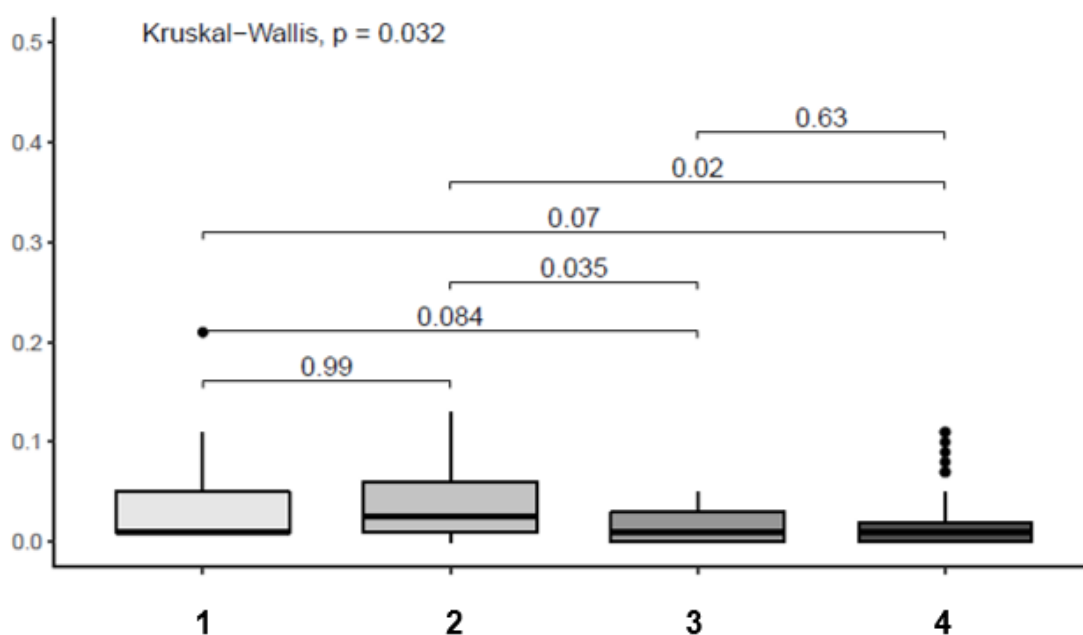
Stwierdzono istnienie istotnej statystycznie różnicy pomiędzy stosunkiem liczby komórek 15-LOX(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF a stopniem złośliwości histologicznej guza ($p=0,032$), zobrazowanej na wykresie 3. Wykazano, że stosunek komórek 15-LOX(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF jest najwyższy w guzach o drugim stopniu złośliwości.

Porównania w podgrupach ujawniły ponadto istotne statystycznie różnice pomiędzy:

- stosunkiem liczby komórek 15-LOX(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF w nowotworach o drugim stopniu złośliwości histologicznej i w nowotworach o trzecim stopniu złośliwości histologicznej ($p=0,035$). Stosunek komórek 15-LOX(+) do liczby komórek

nowotworowych / HPF był wyższy w guzach o drugim stopniu złośliwości histologicznej.

- stosunkiem liczby komórek 15-LOX(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF w nowotworach o drugim stopniu złośliwości histologicznej i w nowotworach o czwartym stopniu złośliwości histologicznej ($p=0,02$). Stosunek komórek 15-LOX(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF był wyższy w guzach o drugim stopniu złośliwości histologicznej.



Wykres 3. Test Kruskala-Wallisa - istotne statystycznie różnice pomiędzy stopniem złośliwości histologicznej guza (oś X) a stosunkiem liczby komórek 15-LOX(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF (oś Y).

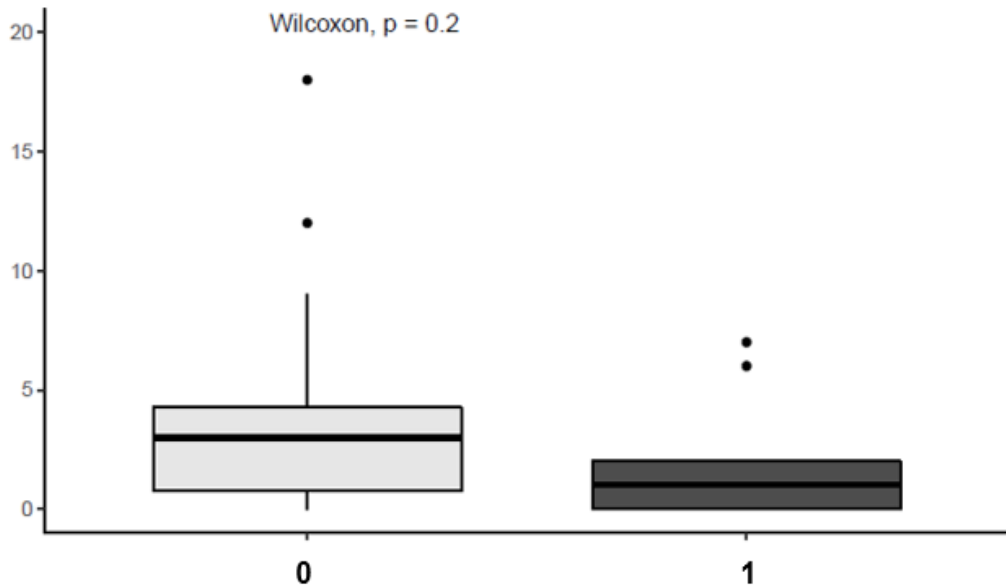
Objaśnienia: **1** - pierwszy stopień złośliwości histologicznej (grade 1), **2** - drugi stopień złośliwości histologicznej (grade 2), **3** - trzeci stopień złośliwości histologicznej (grade 3), **4** - czwarty stopień złośliwości histologicznej (grade 4)

Ponadto analiza statystyczna ujawniła następujące trendy dotyczące ekspresji białka 15-LOX:

1. Różnica pomiędzy liczbą komórek 15-LOX (+) w obrębie guza / HPF a płcią (wykres 4). Liczba komórek 15-LOX (+) w obrębie guza / HPF była większa u mężczyzn niż u kobiet.

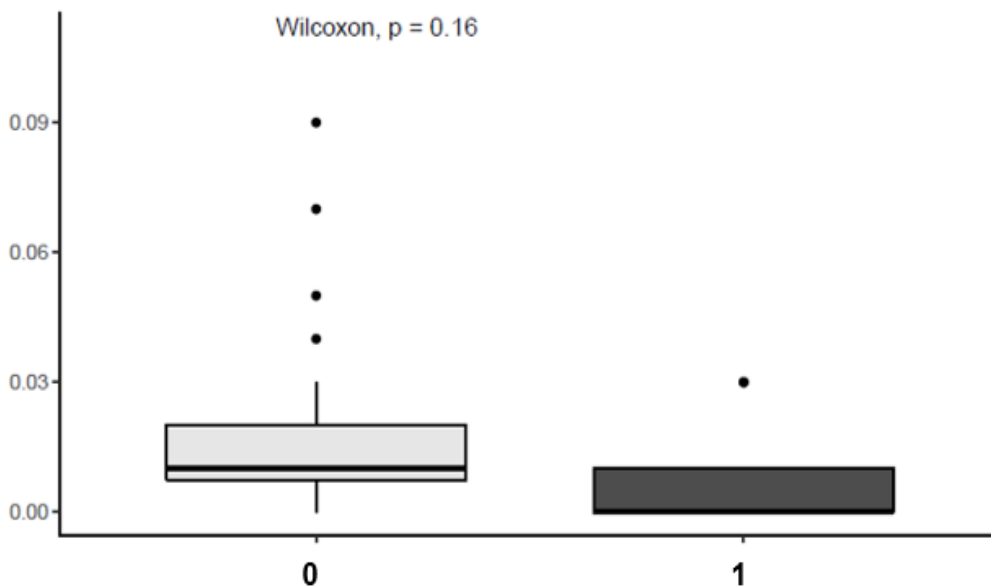
2. Różnica pomiędzy stosunkiem liczby komórek 15-LOX(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF a płcią (wykres 5). Stosunek liczby komórek 15-LOX(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF był wyższy u mężczyzn niż u kobiet.
3. Różnica pomiędzy liczbą komórek 15-LOX(+) w bezpośrednim otoczeniu nowotworu / HPF a płcią (wykres 6). Liczba komórek 15-LOX(+) w bezpośrednim otoczeniu nowotworu / HPF była większa u mężczyzn niż u kobiet.
4. Różnica pomiędzy liczbą komórek 15-LOX(+) w bezpośrednim otoczeniu nowotworu / HPF a lokalizacją guza względem struktur anatomicznych (wykres 7). Liczba komórek 15-LOX(+) w bezpośrednim otoczeniu nowotworu / HPF była większa w guzach płata skroniowego niż w guzach płata czołowego.
5. Różnica pomiędzy liczbą komórek 15-LOX(+) w bezpośrednim otoczeniu nowotworu / HPF a stopniem złośliwości histologicznej guza (wykres 8). Liczba komórek 15-LOX(+) w bezpośrednim otoczeniu nowotworu / HPF była większa w guzach o drugim stopniu złośliwości histologicznej niż w guzach o czwartym stopniu złośliwości histologicznej.
6. Różnica pomiędzy liczbą komórek 15-LOX(+) w obrębie guza / HPF a rozpoznaniem histopatologicznym (wykres 9). Liczba komórek 15-LOX(+) w obrębie guza / HPF była najmniejsza w guzach z rozpoznaniem glejaka wielopostaciowego (*glioblastoma, IDH-wildtype*).
7. Różnica pomiędzy liczbą komórek 15-LOX(+) w bezpośrednim otoczeniu nowotworu / HPF a rozpoznaniem histopatologicznym (wykres 10). Liczba komórek 15-LOX(+) w bezpośrednim otoczeniu nowotworu / HPF była większa w guzach z rozpoznaniem glejaka rozlanego innego niż glejak wielopostaciowy (*adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant*) niż w guzach z rozpoznaniem glejaka wielopostaciowego (*glioblastoma, IDH-wildtype*).
8. Różnica pomiędzy procentowym udziałem komórek 15-LOX(+) w bezpośrednim otoczeniu nowotworu / HPF a rozpoznaniem histopatologicznym (wykres 11). Procentowy udział komórek 15-LOX(+) w bezpośrednim otoczeniu nowotworu / HPF był wyższy w guzach z rozpoznaniem glejaka wielopostaciowego (*glioblastoma, IDH-wildtype*) niż w guzach z rozpoznaniem glejaka rozlanego innego niż glejak wielopostaciowy (*adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant*) i w guzach z rozpoznaniem gwiazdki włosatokomórkowego (*pilocytic astrocytoma*)

Brak istotności statystycznej mógł wynikać z małej liczby przypadków, małej homogenności grupy lub obecności odstających wyników.



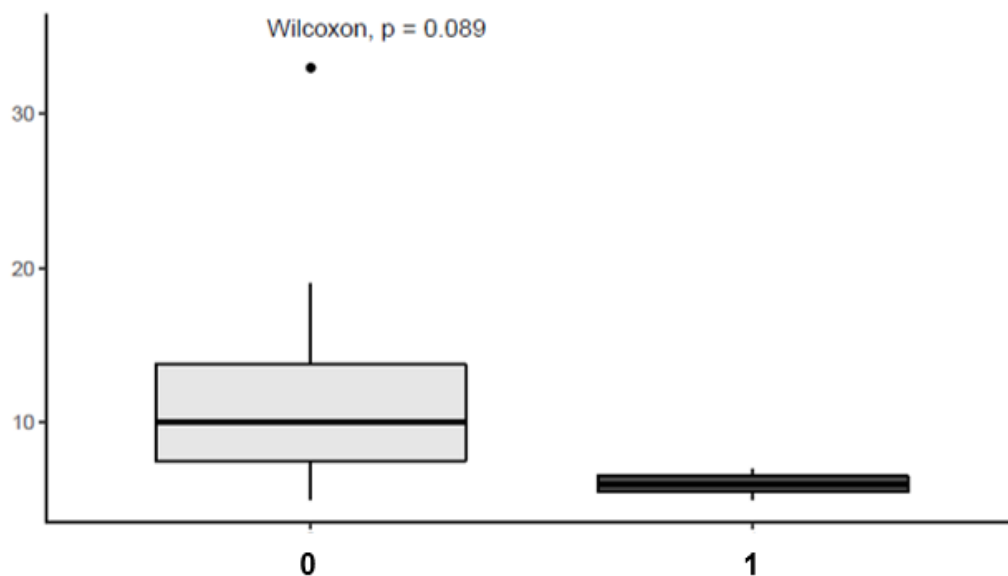
Wykres 4. Test Wilcoxona - zróżnicowanie pomiędzy płcią (oś X) a liczbą komórek 15-LOX(+) w obrębie guza / HPF (oś Y).

Objaśnienia: 0 - mężczyźni, 1 - kobiety



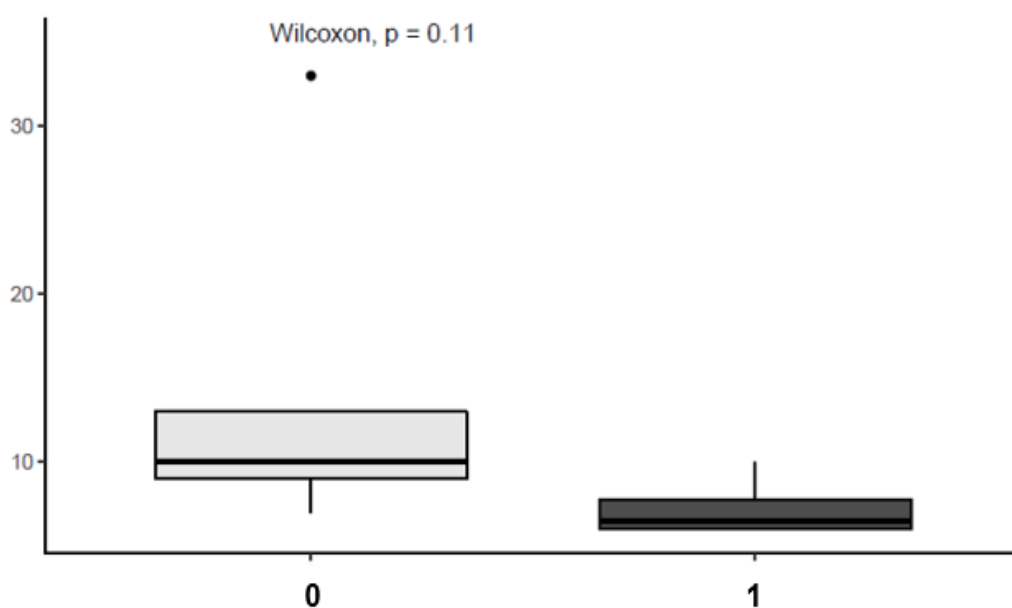
Wykres 5. Test Wilcoxona - zróżnicowanie pomiędzy płcią (oś X) a stosunkiem liczby komórek 15-LOX(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF (oś Y).

Objaśnienia: 0 - mężczyźni, 1 - kobiety



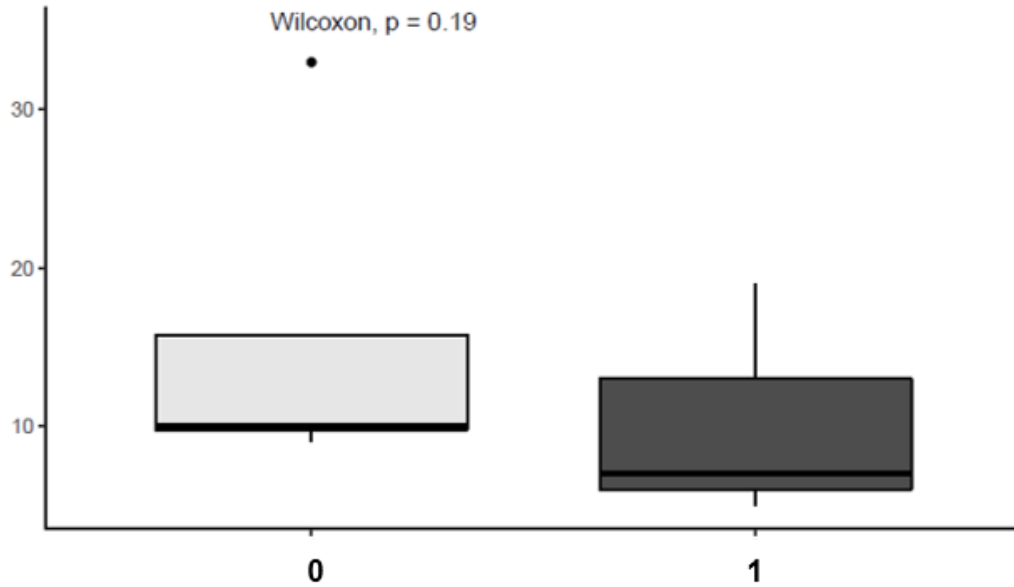
Wykres 6. Test Wilcoxona - zróżnicowanie pomiędzy płcią (oś X) a liczbą komórek 15-LOX(+) w bezpośrednim otoczeniu nowotworu / HPF (oś Y).

Objaśnienia: 0 - mężczyźni, 1 - kobiety



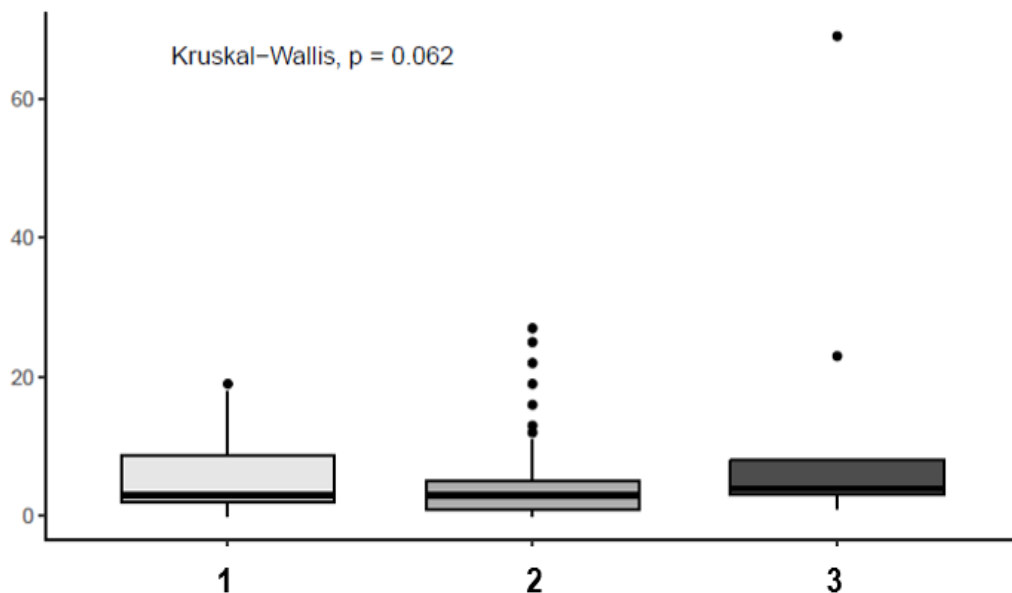
Wykres 7. Test Wilcoxona - zróżnicowanie pomiędzy lokalizacją guza względem struktur anatomicznych (oś X) a liczbą komórek 15-LOX(+) w bezpośrednim otoczeniu nowotworu / HPF.

Objaśnienia: 0 - płat skroniowy, 1 - płat czołowy



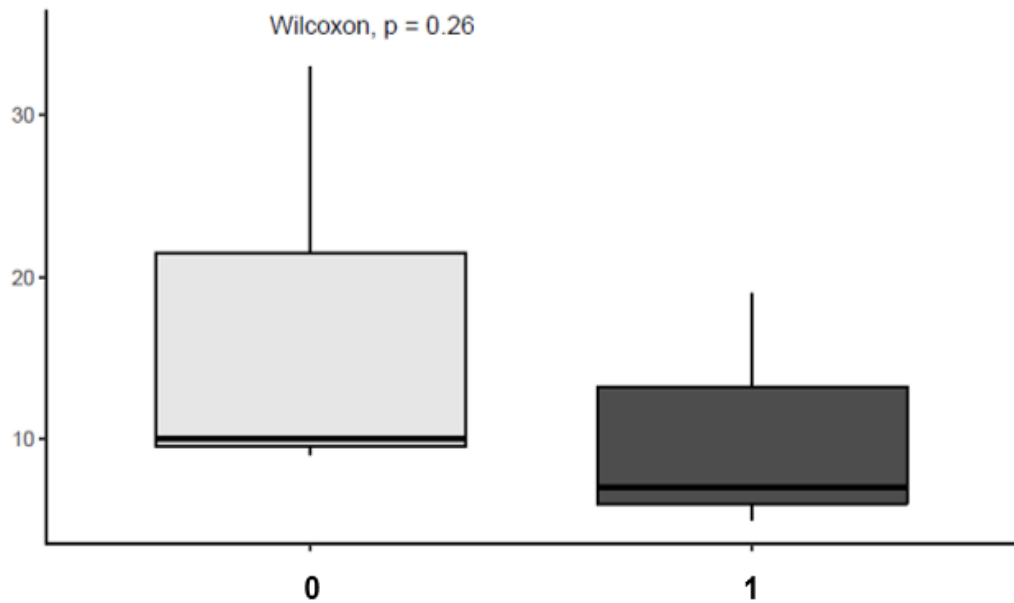
Wykres 8. Test Wilcoxona - zróżnicowanie pomiędzy stopniem złośliwości histologicznej guza (oś X), a liczbą komórek 15-LOX(+) w otoczeniu nowotworu / HPF.

Objaśnienia: 0 - drugi stopień złośliwości histologicznej (grade 2), 1 - czwarty stopień złośliwości histologicznej (grade 4)



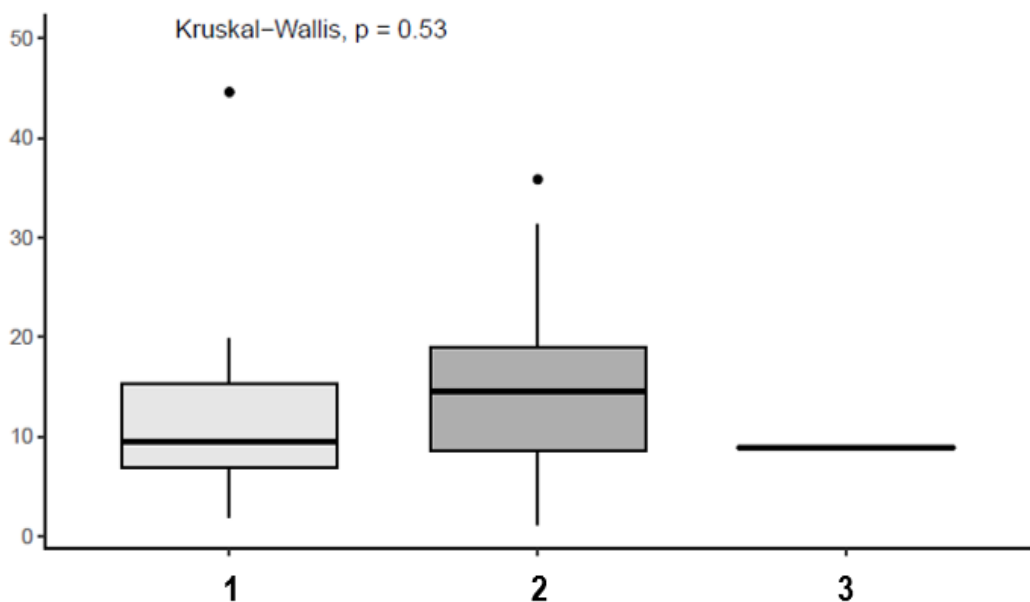
Wykres 9. Test Kruskala-Wallisa - zróżnicowanie pomiędzy rozpoznaniem histopatologicznym (oś X) a liczbą komórek 15-LOX(+) w obrębie guza / HPF (oś Y).

Objaśnienia: 1 - glejaki rozlane inne niż glejak wielopostaciowy (*adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant*), 2 - glejak wielopostaciowy (*glioblastoma, IDH-wildtype*), 3 - gwiazdziak włosowatokomórkowy (*pilocytic astrocytoma*)



Wykres 10. Test Wilcoxona - zróżnicowanie pomiędzy rozpoznaniem histopatologicznym (oś X) a liczbą komórek 15-LOX(+) w otoczeniu guza / HPF (oś Y).

Objaśnienia: 1 - glejaki rozlane inne niż glejak wielopostaciowy (*adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant*), 2 - glejak wielopostaciowy (*glioblastoma, IDH-wildtype*)



Wykres 11. Test Kruskala-Wallisa - różnica pomiędzy rozpoznaniem histopatologicznym (oś X), a procentem komórek 15-LOX(+) w otoczeniu guza / HPF.

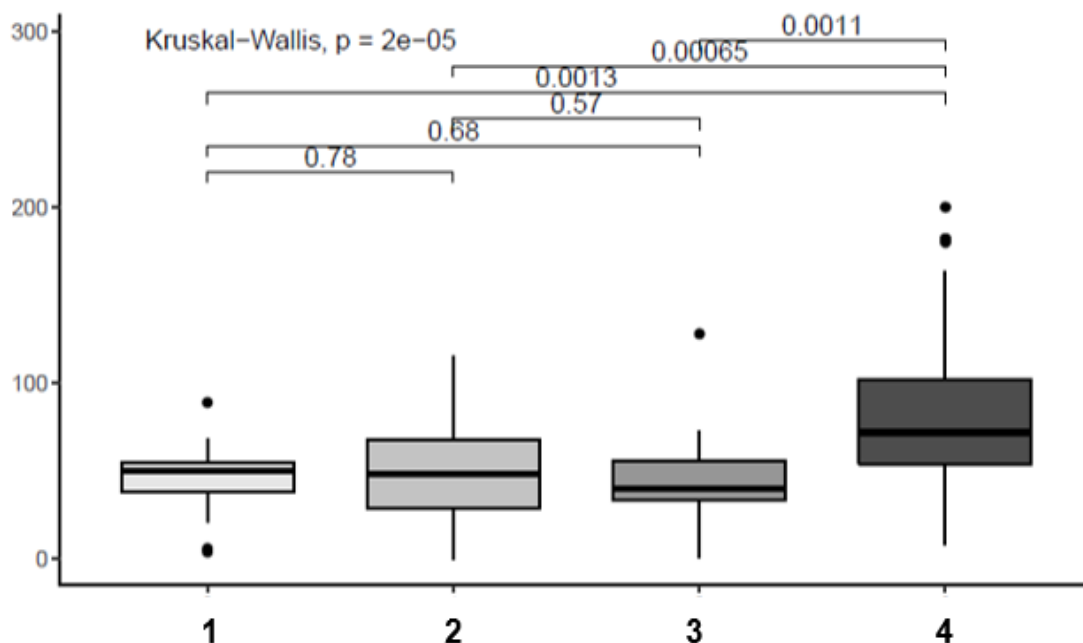
Objaśnienia: 1 - glejaki rozlane inne niż glejak wielopostaciowy (*adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant*), 2 - glejak wielopostaciowy (*glioblastoma, IDH-wildtype*), 3 - gwiazdziak włosowatokomórkowy (*pilocytic astrocytoma*)

4.3.1.2. Wyniki analizy statystycznej immunoekspresji białka LCA

Wykazano istotną statystycznie różnicę pomiędzy liczbą komórek LCA(+) / HPF a stopniem złośliwości histologicznej guza ($p=2e-05$). Liczba komórek LCA(+) / HPF była największa w guzach o czwartym stopniu złośliwości histologicznej. Dane zostały przedstawione na wykresie 12.

Porównania w podgrupach ujawniły ponadto istotne statystycznie różnice pomiędzy:

- liczbą komórek LCA(+) / HPF w guzach o pierwszym stopniu złośliwości histologicznej oraz w guzach o czwartym stopniu złośliwości histologicznej ($p=0,0013$). Liczba komórek LCA(+) / HPF była wyższy w guzach o czwartym stopniu złośliwości histologicznej.
- liczbą komórek LCA(+) / HPF w guzach o drugim stopniu złośliwości histologicznej oraz w guzach o czwartym stopniu złośliwości histologicznej ($p=0,00065$). Liczba komórek LCA(+) / HPF była wyższy w guzach o czwartym stopniu złośliwości histologicznej.
- liczbą komórek LCA(+) / HPF w guzach o trzecim stopniu złośliwości histologicznej oraz w guzach o czwartym stopniu złośliwości histologicznej ($p=0,0011$). Liczba komórek LCA(+) / HPF była wyższa w guzach o czwartym stopniu złośliwości histologicznej.



Wykres 12. Test Kruskala-Wallisa - istotne statystycznie różnice pomiędzy stopniem złośliwości histologicznej guza (oś X) a liczbą komórek LCA(+) / HPF (oś Y).

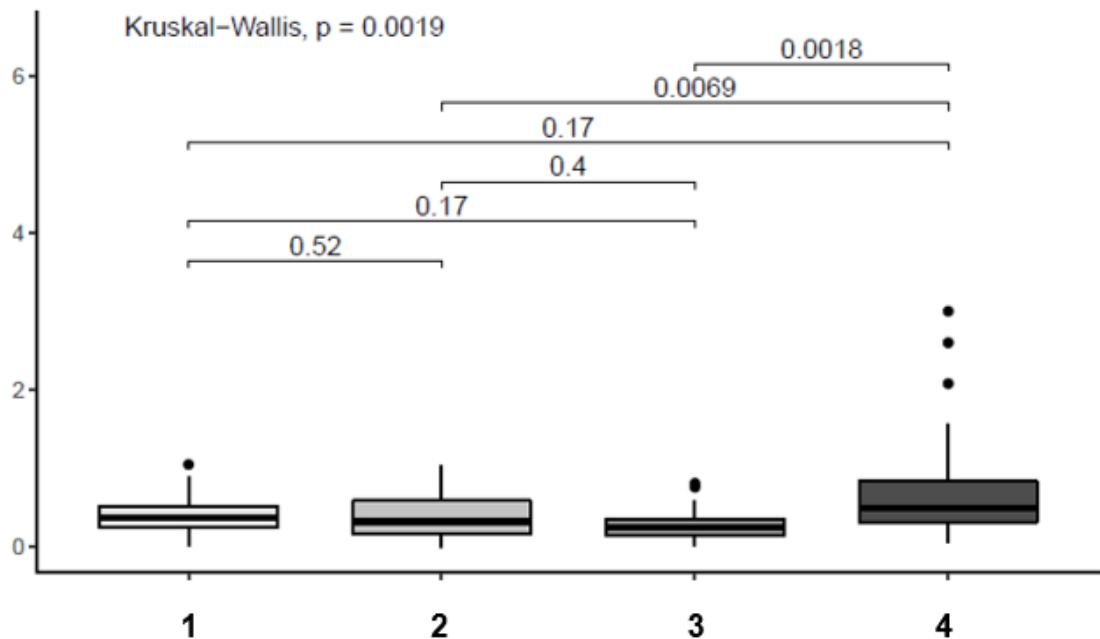
Objaśnienia: **1** - pierwszy stopień złośliwości histologicznej (grade 1), **2** - drugi stopień złośliwości histologicznej (grade 2), **3** - trzeci stopień złośliwości histologicznej (grade 3), **4** - czwarty stopień złośliwości histologicznej (grade 4)

Stwierdzono istotną statystycznie różnicę pomiędzy stosunkiem liczby komórek LCA(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF a stopniem złośliwości histologicznej guza ($p=0,0019$), co zaprezentowane zostało na wykresie 13. Stosunek liczby komórek LCA(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF był najwyższy w guzach z rozpoznaniem glejaka wielopostaciowego (*glioblastoma, IDH-wildtype*).

Porównania w podgrupach ujawniły ponadto istotne statystycznie różnice pomiędzy:

- stosunkiem liczby komórek LCA(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF w guzach o drugim stopniu złośliwości histologicznej oraz w guzach o czwartym stopniu złośliwości histologicznej ($p=0,0069$). Stosunek liczby komórek LCA(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF był wyższy w guzach o czwartym stopniu złośliwości histologicznej.

- stosunkiem liczby komórek LCA(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF w guzach o trzecim stopniu złośliwości histologicznej oraz w guzach o czwartym stopniu złośliwości histologicznej ($p=0,0018$). Stosunek liczby komórek LCA(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF był wyższy w guzach o czwartym stopniu złośliwości histologicznej.



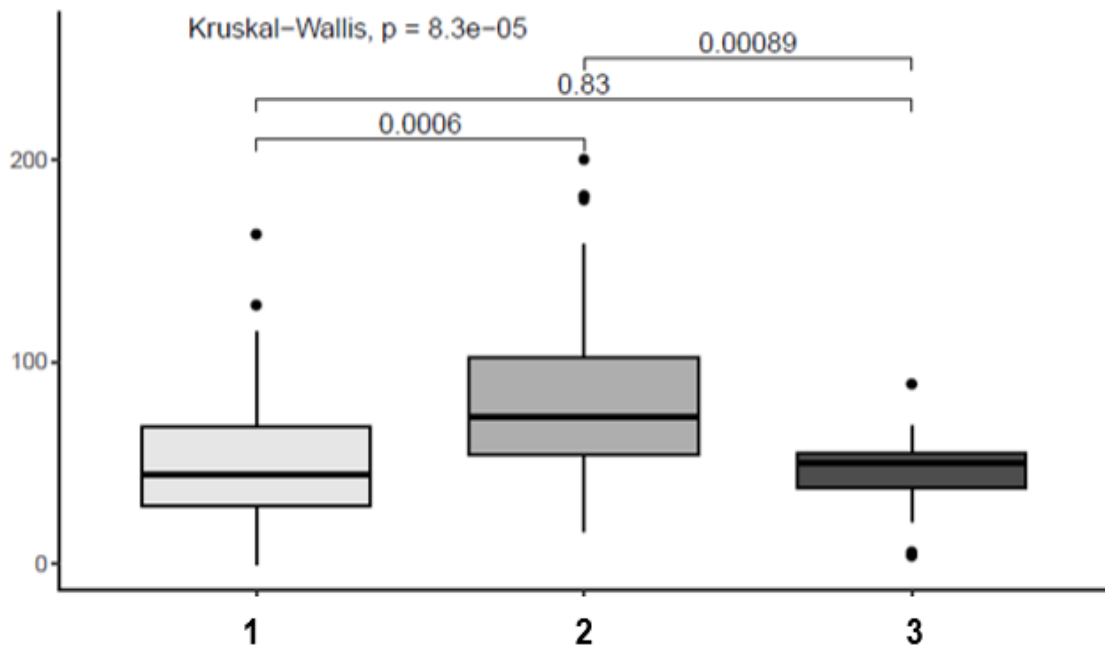
Wykres 13. Test Kruskala-Wallisa - istotne statystycznie różnice pomiędzy stopniem złośliwości histologicznej guza (oś X) a stosunkiem liczby komórek LCA(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF.

Objaśnienia: 1 - pierwszy stopień złośliwości histologicznej (grade 1), 2 - drugi stopień złośliwości histologicznej (grade 2), 3 - trzeci stopień złośliwości histologicznej (grade 3), 4 - czwarty stopień złośliwości histologicznej (grade 4)

Ujawniono istotną statystycznie różnicę pomiędzy liczbą komórek LCA(+) / HPF a rozpoznaniem histopatologicznym ($p=8,3e-05$) i przedstawiono ją na wykresie 14. Liczba komórek LCA(+) była największa w guzach z rozpoznaniem z glejaka wielopostaciowego (*glioblastoma, IDH-wildtype*).

Porównania w podgrupach ujawniły ponadto istotne statystycznie różnice pomiędzy:

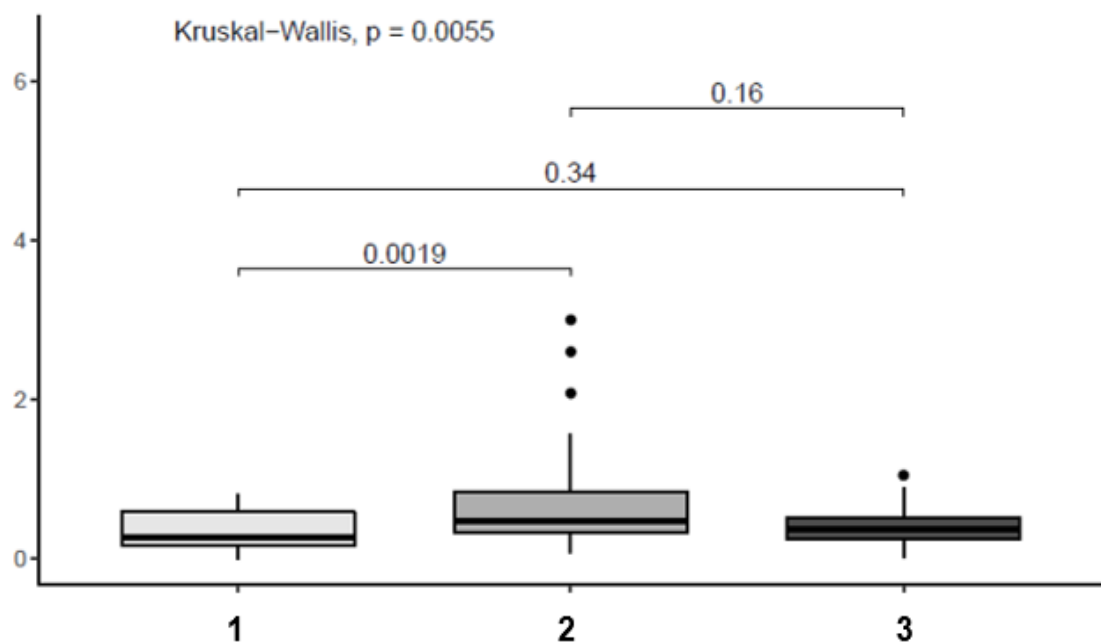
- liczbą komórek LCA(+) / HPF w guzach z rozpoznaniem glejaka wielopostaciowego (*glioblastoma, IDH-wildtype*) oraz w guzach z rozpoznaniem glejaka rozlanego innego niż glejak wielopostaciowy (*adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant*) ($p=0,0006$). Liczba komórek LCA(+) / HPF była większa w guzach z rozpoznaniem glejaka wielopostaciowego (*glioblastoma, IDH-wildtype*).
- liczbą komórek LCA(+) / HPF w guzach z rozpoznaniem glejaka wielopostaciowego (*glioblastoma, IDH-wildtype*) oraz w guzach z rozpoznaniem gwiaździka włosowatokomórkowego (*pilocytic astrocytoma*) ($p=0,00089$). Liczba komórek LCA(+) / HPF była większa w guzach z rozpoznaniem glejaka wielopostaciowego (*glioblastoma, IDH-wildtype*).



Wykres 14. Test Kruskala-Wallisa - istotne statystycznie różnice pomiędzy rozpoznaniem histopatologicznym (oś X) a liczbą komórek LCA(+) / HPF (oś Y).

Objaśnienia: **1** - glejaki rozlane inne niż glejak wielopostaciowy (*adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant*), **2** - glejak wielopostaciowy (*glioblastoma, IDH-wildtype*), **3** - gwiaździk włosowatokomórkowy (*pilocytic astrocytoma*)

Wykazano istotną statystycznie różnicę pomiędzy stosunkiem liczby komórek LCA(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF a rozpoznaniem histopatologicznym ($p=0,0055$). Dane zostały przedstawione na wykresie 15. Najwyższą istotnością statystyczną charakteryzowała się różnica pomiędzy stosunkiem liczby komórek LCA(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF w guzach z rozpoznaniem glejaka wielopostaciowego (*glioblastoma, IDH - wildtype*) oraz w guzach z rozpoznaniem glejaka rozlanego innego niż glejak wielopostaciowy (*adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant*) ($p=0,0019$). Stosunek liczby komórek LCA(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF był wyższy w guzach z rozpoznaniem glejaka wielopostaciowego (*glioblastoma, IDH-wildtype*).



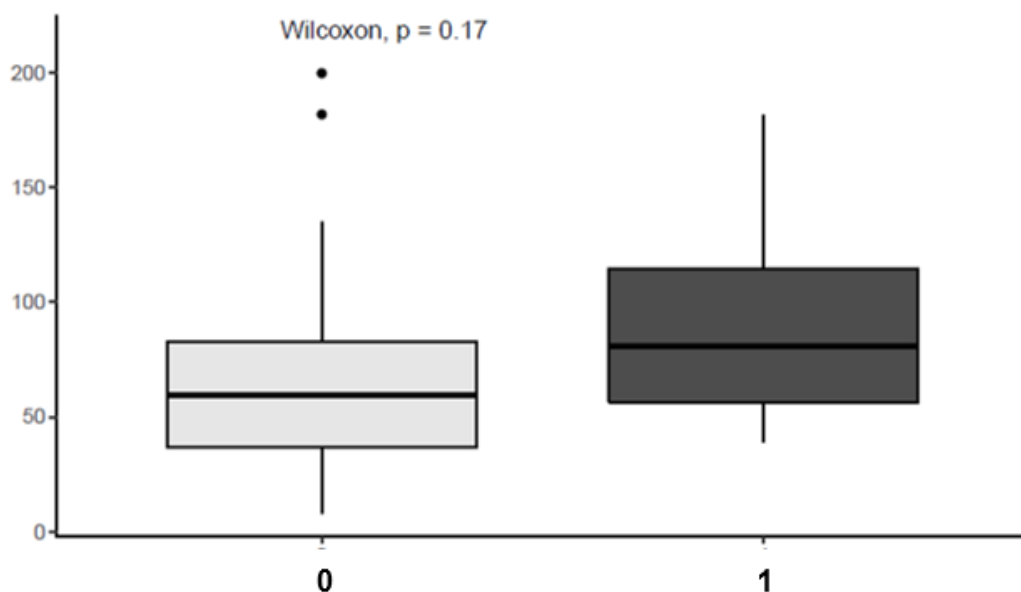
Wykres 15. Test Kruskala-Wallisa - istotne statystycznie różnice pomiędzy rozpoznaniem histopatologicznym (oś X) a stosunkiem liczby komórek LCA(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF(oś Y).

Objaśnienia: **1** - glejaki rozlane inne niż glejak wielopostaciowy (*adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant*), **2** - glejak wielopostaciowy (*glioblastoma, IDH - wildtype*), **3** - gwiazdziak włosatokomórkowy (*pilocytic astrocytoma*)

Ponadto analiza statystyczna ujawniła następujące trendy dotyczące ekspresji białka LCA:

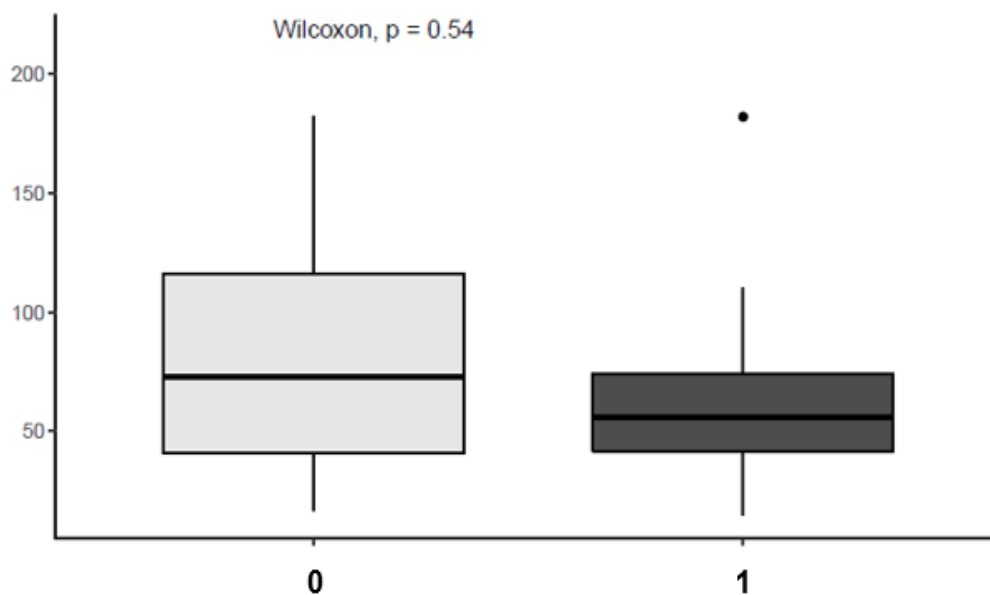
1. Różnica pomiędzy liczbą komórek LCA(+) / HPF a płcią (wykres 16). Liczba komórek LCA(+) / HPF była większa u kobiet niż u mężczyzn.
2. Różnica pomiędzy liczbą komórek LCA(+) / HPF a lokalizacją guza względem struktur anatomicznych (wykres 17). Liczba komórek LCA(+) / HPF była większa w guzach płata skroniowego, niż w guzach płata czołowego.

Brak istotności statystycznej mógł wynikać z małej liczby przypadków, małej homogenności grupy lub obecności odstających wyników.



Wykres 16. Test Wilcoxona - zróźnicowanie pomiędzy płcią (oś X) a liczbą komórek LCA(+) / HPF.

Objaśnienia: 0 - mężczyźni, 1 - kobiety



Wykres 17. Test Wilcoxona - zróżnicowanie pomiędzy lokalizacją guza względem struktur anatomicznych (oś X) a liczbą komórek LCA(+) / HPF.

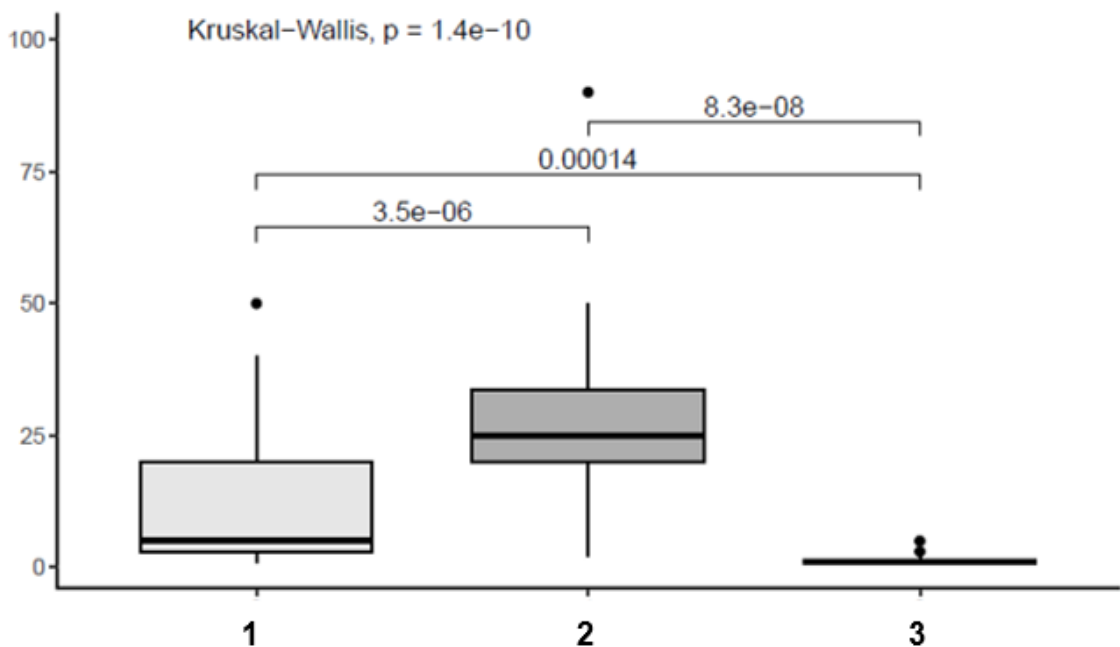
Objaśnienia: 0 - płat skroniowy, 1 - płat czołowy

Stwierdzono istotną statystycznie różnicę pomiędzy indeksem Ki-67 a rozpoznaniem histopatologicznym ($p=1,4e-10$), przedstawioną na wykresie 18. Wykazano, że przypadki z rozpoznaniem glejaka wielopostaciowego (*glioblastoma, IDH-wildtype*) charakteryzowały się istotnie wyższym indeksem Ki-67, niż przypadki z rozpoznaniem glejaka rozlanego innego niż glejak wielopostaciowy (*adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant*) oraz gwiaździaka włosowatokomórkowego (*pilocytic astrocytoma*).

Porównania w podgrupach ujawniły ponadto istotne statystycznie różnice pomiędzy:

- indeksem Ki-67 w guzach z rozpoznaniem glejaka wielopostaciowego (*glioblastoma, IDH-wildtype*) oraz w guzach z rozpoznaniem glejaka rozlanego innego niż glejak wielopostaciowy (*adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant*) ($p=3,5e-06$). Indeks Ki-67 był wyższy w guzach z rozpoznaniem glejaka wielopostaciowego (*glioblastoma, IDH-wildtype*).

- indeksem Ki-67 w guzach z rozpoznaniem glejaka wielopostaciowego (*glioblastoma, IDH-wildtype*) oraz w guzach z rozpoznaniem gwiazdki włosowatokomórkowego (*pilocytic astrocytoma*) (p=8,3e-08). Indeks Ki-67 był wyższy w guzach z rozpoznaniem glejaka wielopostaciowego (*glioblastoma, IDH-wildtype*).
- indeksem Ki-67 w guzach z rozpoznaniem glejaka rozlanego innego niż glejak wielopostaciowy (*adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant*) oraz w guzach z rozpoznaniem gwiazdki włosowatokomórkowego (*pilocytic astrocytoma*) (p=0,00014). Indeks Ki-67 był wyższy w guzach z rozpoznaniem glejaka rozlanego innego niż glejak wielopostaciowy (*adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant*).

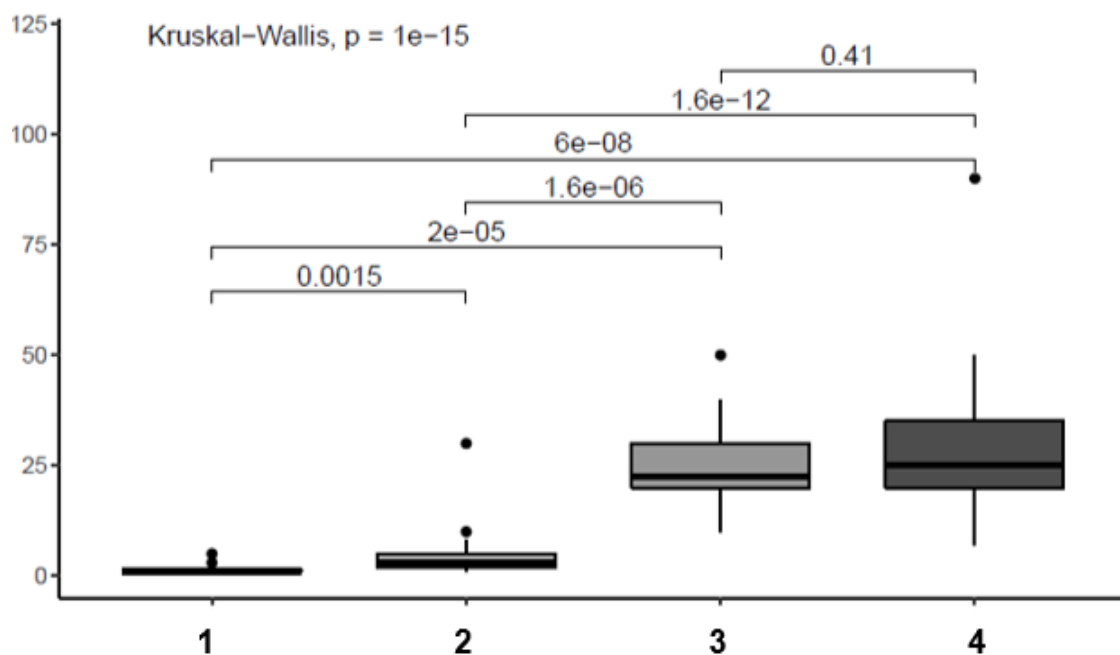


Wykres 18. Test Kruskala-Wallisa - istotne statystycznie różnice pomiędzy rozpoznaniem histopatologicznym (oś X) a indeksem Ki-67 (oś Y).

Objaśnienia: **1** - glejaki rozlane inne niż glejak wielopostaciowy (*adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant*), **2** - glejak wielopostaciowy (*glioblastoma, IDH-wildtype*), **3** - gwiazdka włosowatokomórkowy (*pilocytic astrocytoma*)

Wykazano istotną różnicę pomiędzy indeksem Ki-67, a stopniem złośliwości histologicznej guza (grade) ($p=1e-15$), przedstawione na wykresie 19. Wykazano, że guzy o wyższym stopniu złośliwości histologicznej charakteryzowały się wyższym indeksem Ki-67. Porównania w podgrupach ujawniły ponadto istotne statystycznie różnice pomiędzy:

- indeksem Ki-67 w guzach o pierwszym stopniu złośliwości histologicznej oraz w guzach o drugim stopniu złośliwości histologicznej ($p=0,0015$). Indeks Ki-67 był wyższy w guzach o drugim stopniu złośliwości histologicznej.
- indeksem Ki-67 w guzach o pierwszym stopniu złośliwości histologicznej oraz w guzach o trzecim stopniu złośliwości histologicznej ($p=2e-05$). Indeks Ki-67 był wyższy w guzach o trzecim stopniu złośliwości histologicznej.
- indeksem Ki-67 w guzach o pierwszym stopniu złośliwości histologicznej oraz w guzach o czwartym stopniu złośliwości histologicznej ($p=6e-08$). Indeks Ki-67 był wyższy w guzach o czwartym stopniu złośliwości histologicznej.
- indeksem Ki-67 w guzach o drugim stopniu złośliwości histologicznej oraz w guzach o trzecim stopniu złośliwości histologicznej ($p=1,6e-06$). Indeks Ki-67 był wyższy w guzach o trzecim stopniu złośliwości histologicznej.
- indeksem Ki-67 w guzach o drugim stopniu złośliwości histologicznej oraz w guzach o czwartym stopniu złośliwości histologicznej ($p=1,6e-12$). Indeks Ki-67 był wyższy w guzach o czwartym stopniu złośliwości histologicznej.



Wykres 19. Test Kruskala-Wallisa - istotne statystycznie różnice pomiędzy stopniem złośliwości histologicznej guza (oś X) a indeksem Ki-67 (oś Y).

Objaśnienia: **1** - pierwszy stopień złośliwości histologicznej (grade 1), **2** - drugi stopień złośliwości histologicznej (grade 2), **3** - trzeci stopień złośliwości histologicznej (grade 3), **4** - czwarty stopień złośliwości histologicznej (grade 4)

4.3.1.3. Korelacje

Otrzymane dane przeanalizowano pod kątem istnienia pomiędzy nimi istotnych korelacji i określenia kierunku oraz siły związku między zmiennymi.

Na podstawie analizy współczynnika korelacji Spearmana, stwierdzono istnienie dziewięciu powiązań, ujętych poniżej i przedstawionych na diagramie 2.

Korelacje ujemne:

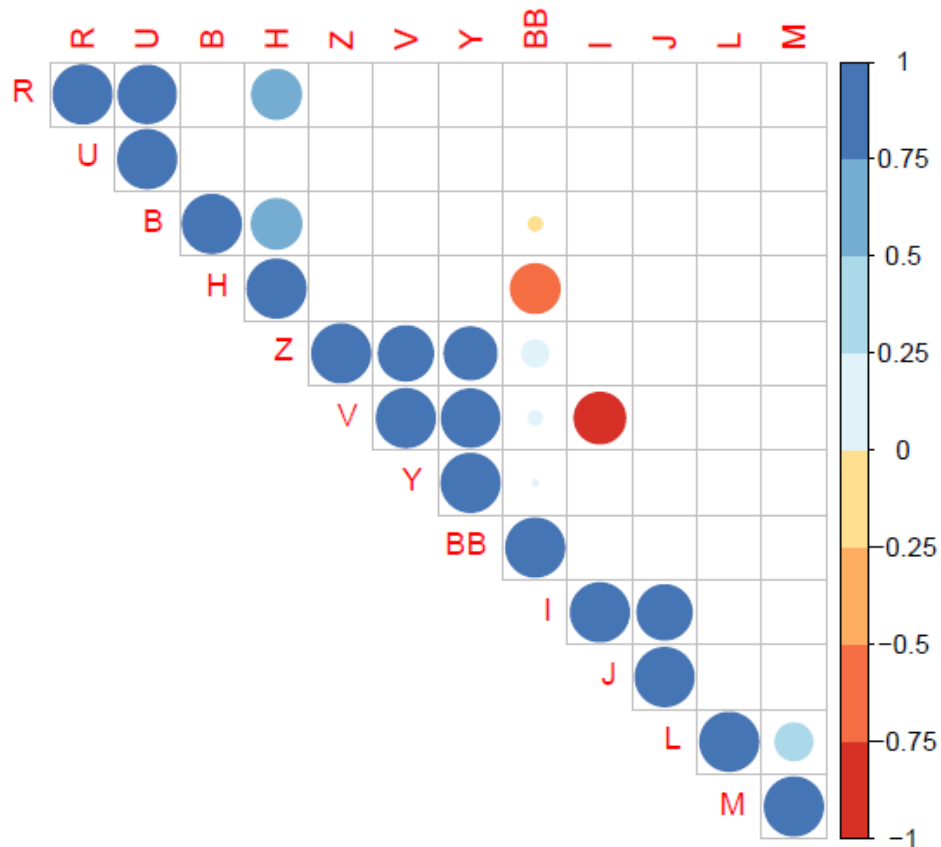
- silna pomiędzy liczbą komórek 15-LOX(+) / HPF w obrębie guza a stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza (**współczynnik korelacji -0,76**)

- silna pomiędzy procentowym udziałem komórek 15-LOX(+) w bezpośrednim otoczeniu guza / HPF a indeksem Ki-67 (**współczynnik korelacji -0,73**)

Korelacje dodatnie:

- bardzo silna pomiędzy liczbą komórek LCA(+) / HPF a stosunkiem liczby komórek LCA(+) do liczby komórek nowotworowych (**współczynnik korelacji 0,97**)
- bardzo silna pomiędzy liczbą komórek 15-LOX(+) w obrębie guza / HPF a stosunkiem liczby komórek 15-LOX(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF (**współczynnik korelacji 0,97**)
- silna pomiędzy liczbą komórek 15-LOX(+) w bezpośrednim otoczeniu nowotworu / HPF a liczbą komórek 15-LOX(+) w obrębie guza / HPF (**współczynnik korelacji 0,87**)
- silna pomiędzy stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza a stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ na obrzeżu guza (**współczynnik korelacji 0,87**)
- silna pomiędzy liczbą komórek 15-LOX(+) w bezpośrednim otoczeniu nowotworu / HPF a stosunkiem liczby komórek 15-LOX(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF (**współczynnik korelacji 0,8**)
- silna pomiędzy wiekiem pacjenta w momencie resekcji a indeksem Ki-67 (**współczynnik korelacji 0,73**)
- silna pomiędzy liczbą komórek LCA(+) / HPF a indeksem Ki-67 (**współczynnik korelacji 0,71**)

Diagram 2. Graficzne przedstawienie współczynników korelacji Spearmana.



Objaśnienia:

- B** wiek pacjenta w momencie resekcji
- BB** udział procentowy komórek 15-LOX (+) w otoczeniu guza
- H** indeks Ki-67
- I** stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza
- J** stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ na obrzeżu guza
- L** stosunek izotopowy $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ w centrum guza
- M** stosunek izotopowy $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ na obrzeżu guza
- R** liczba komórek LCA(+) / HPF
- U** stosunek liczby komórek LCA(+) do liczby komórek nowotworowych
- V** liczba komórek 15-LOX(+) w obrębie guza / HPF
- Y** stosunek liczby komórek 15-LOX(+) do liczby komórek nowotworowych
- Z** liczba komórek 15-LOX(+) w otoczeniu nowotworu

4.3.2. Wyniki analizy statystycznej pomiarów izotopowych

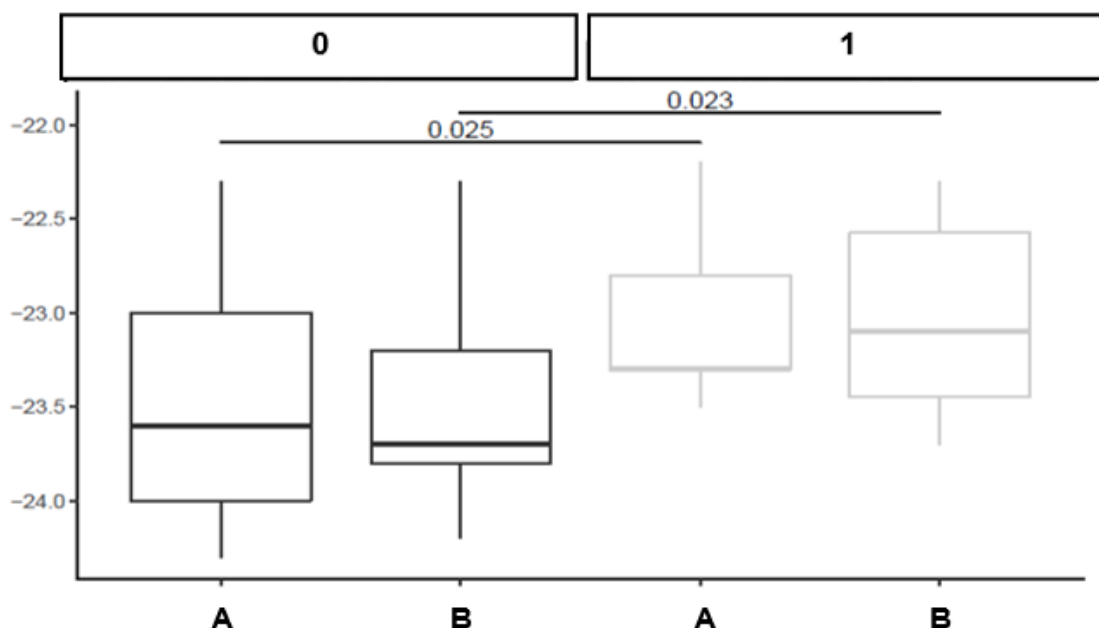
Podczas analizy statystycznej wyników wykorzystano wiele zmiennych grupujących, do których zaliczono:

- płeć
- wiek pacjenta w momencie resekcji
- lokalizację guza względem linii pośrodkowej ciała (strona lewa, strona prawa)
- lokalizację guza względem struktur anatomicznych
- stopień złośliwości histologicznej (grade) w rozpoznaniu pierwotnym (grade 1, 2, 3 i 4)
- rozpoznanie histopatologiczne tj. grupy gwiazdziak włosowatokomórkowy - *pilocytic astrocytoma*; glejak wielopostaciowy - *glioblastoma, IDH-wildtype*; glejaki rozlane inne niż glejak wielopostaciowy - *adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant*
- indeks Ki-67

4.3.2.1. Wyniki analizy statystycznej pomiarów stosunku izotopowego $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

Stwierdzono istotną statystycznie różnicę pomiędzy stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza a płcią ($p=0,025$). Stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza był wyższy u kobiet. Wyniki zostały przedstawione na wykresie 20.

Ponadto zauważono istotną statystycznie różnicę pomiędzy stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ na obrzeżu guza a płcią ($p=0,023$). Stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ na obrzeżu guza był wyższy u kobiet. Dane zostały przedstawione na wykresie 20.

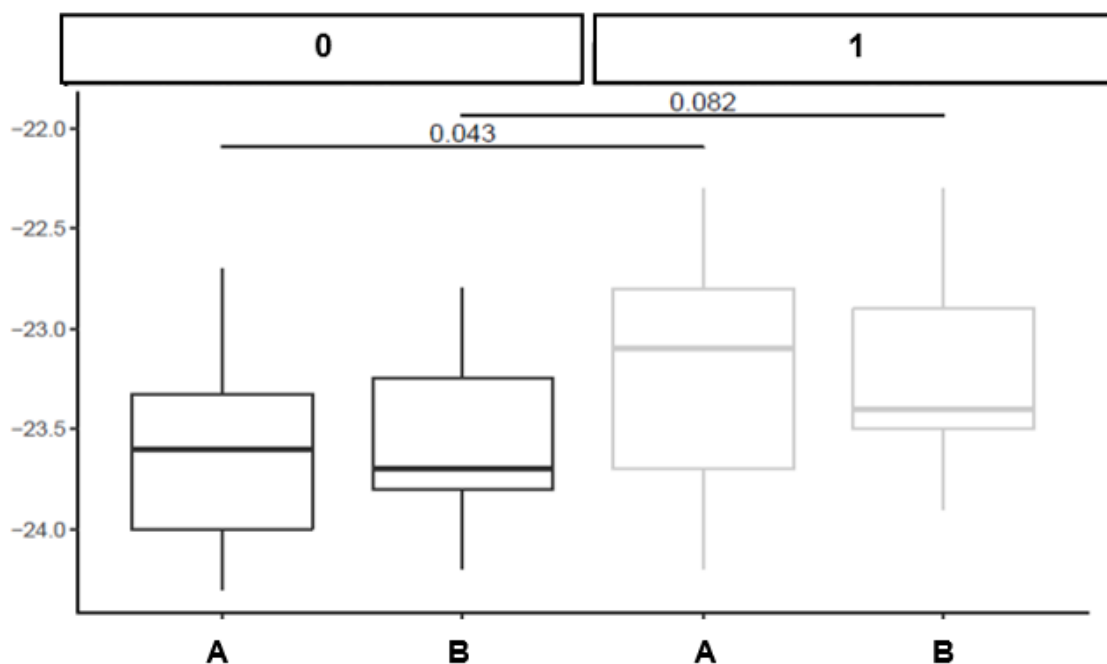


Wykres 20. Test Wilcoxona - istotne statystycznie różnice pomiędzy stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (oś Y) w centrum guza oraz na obrzeżu guza w zależności od płci (oś X).

Objaśnienia: 0 - mężczyźni, 1 - kobiety, A - centrum guza, B - obrzeże guza

Stwierdzono istotną statystycznie różnicę pomiędzy stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza a jego lokalizacją względem linii pośrodkowej ciała ($p=0,043$). Stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza był wyższy w nowotworach, znajdujących się po prawej stronie linii pośrodkowej ciała. Dane zostały przedstawione na wykresie 21.

Ponadto zauważono trend dotyczący związku pomiędzy stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ na obrzeżu guza a jego lokalizacją względem linii pośrodkowej ciała. Stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ na obrzeżu guza był wyższy w nowotworach, znajdujących się po prawej stronie linii pośrodkowej ciała (wykres 21).

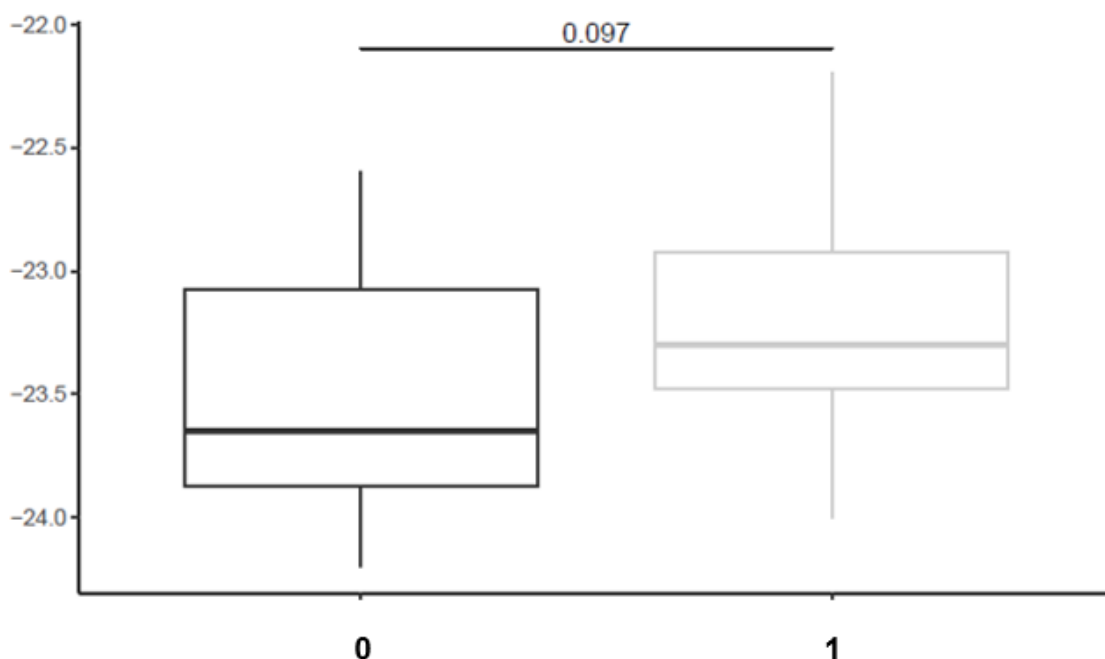


Wykres 21. Test Wilcoxona - istotna statystycznie różnica pomiędzy stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (oś Y) w centrum guza w zależności od lokalizacji guza względem linii pośrodkowej ciała (oś X) oraz trend dotyczący związku pomiędzy stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (oś Y) na obrzeżu guza w zależności od lokalizacji guza względem linii pośrodkowej ciała (oś X).

Objaśnienia: **0** - strona lewa, **1** - strona prawa, **A** - centrum guza, **B** - obrzeże guza

Ponadto analiza statystyczna ujawniła trend dotyczący związku pomiędzy stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza a lokalizacją guza względem struktur anatomicznych. Stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza był wyższy w nowotworach zlokalizowanych w płacie czołowym (wykres 22).

Brak istotności statystycznej mógł wynikać z małej liczby przypadków, małej homogenności grupy lub obecności odstających wyników.



Wykres 22. Test Kruskala-Wallisa - zróżnicowanie pomiędzy lokalizacją guza względem struktur anatomicznych (oś X) a stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza (oś Y).

Objaśnienia: 0 - płat skroniowy, 1 - płat czołowy.

4.3.2.2. Wyniki analizy statystycznej pomiarów stosunku izotopowego $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$

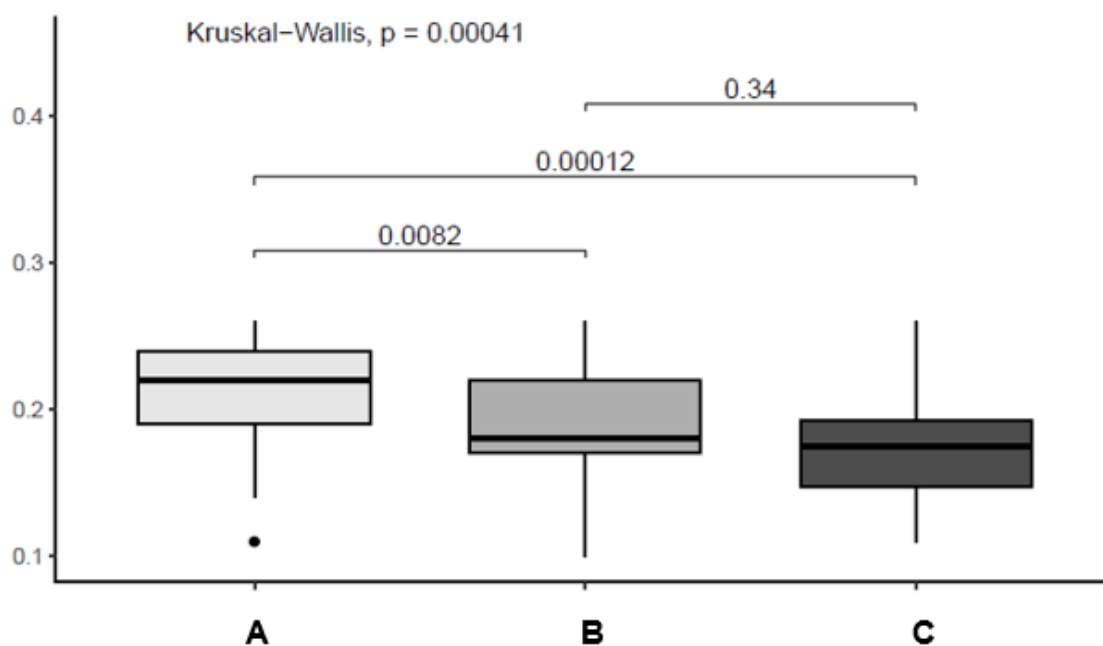
Nie stwierdzono istotności statystycznych pomiędzy stosunkiem izotopowym $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ a analizowanymi parametrami.

4.3.2.3. Wyniki analizy statystycznej pomiarów stosunku masowego N/C

Wykazano istotną statystycznie różnicę pomiędzy stosunkiem masowym N/C w centrum guza, na obrzeżu guza i w tkankach otaczających guz ($p=0,00041$). Zaprezentowano ją na wykresie 23. Stosunek masy N/C był najwyższy w centrum guza a najniższy w makroskopowo niezmiennych tkankach otaczających guz.

Porównania w podgrupach ujawniły ponadto istotne statystycznie różnice pomiędzy:

- stosunkiem masowym N/C w centrum guza a na obrzeżu guza ($p=0,0082$). Stosunek masowy N/C był wyższy w centrum guza.
- stosunkiem masowym N/C w centrum guza a w tkankach otaczających guz ($p=0,00012$). Stosunek masowy N/C był wyższy w centrum guza.



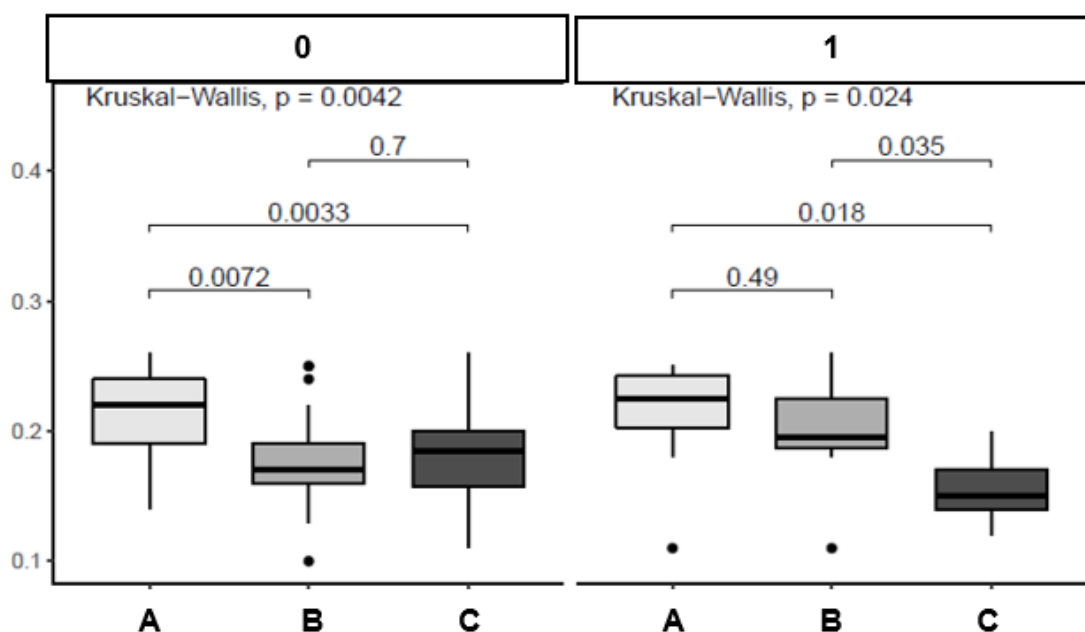
Wykres 23. Test Kruskala-Willisa - istotne statystycznie różnice pomiędzy stosunkiem masowym N/C (oś Y) w centrum guza, na obrzeżu guza i w tkance otaczającej guz (oś X).

Objaśnienia: **A** - centrum guza, **B** - obrzeże guza, **C** - tkanki otaczające guz

Wykazano istotną statystycznie różnicę pomiędzy stosunkiem masowym N/C w centrum guza, na obrzeżu guza oraz w tkankach otaczających guz w zależności od płci (wykres 24). Wartości p wynosiły $p=0,0042$ w grupie mężczyzn i $p=0,024$ w grupie kobiet. Stosunek masowy N/C, zarówno w grupie kobiet jak i mężczyzn, był najwyższy w centrum guza.

Porównania w podgrupach ujawniły ponadto istotne statystycznie różnice pomiędzy:

- stosunkiem masowym N/C w centrum guza a stosunkiem masowym N/C na obrzeżu guza u mężczyzn ($p=0,0072$). Stosunek masowy N/C był wyższy w centrum guza.
- stosunkiem masowym N/C w centrum guza a stosunkiem masowym N/C w tkankach otaczających guz u mężczyzn ($p=0,0033$). Stosunek masowy N/C był wyższy w centrum guza.
- stosunkiem masowym N/C w centrum guza a stosunkiem masowym N/C w tkankach otaczających guz u kobiet ($p=0,018$). Stosunek masowy N/C był wyższy w centrum guza.
- stosunkiem masowym N/C na obrzeżu guza a stosunkiem masowym N/C w tkankach otaczających guz u kobiet ($p=0,035$). Stosunek masowy N/C był wyższy na obrzeżu guza.



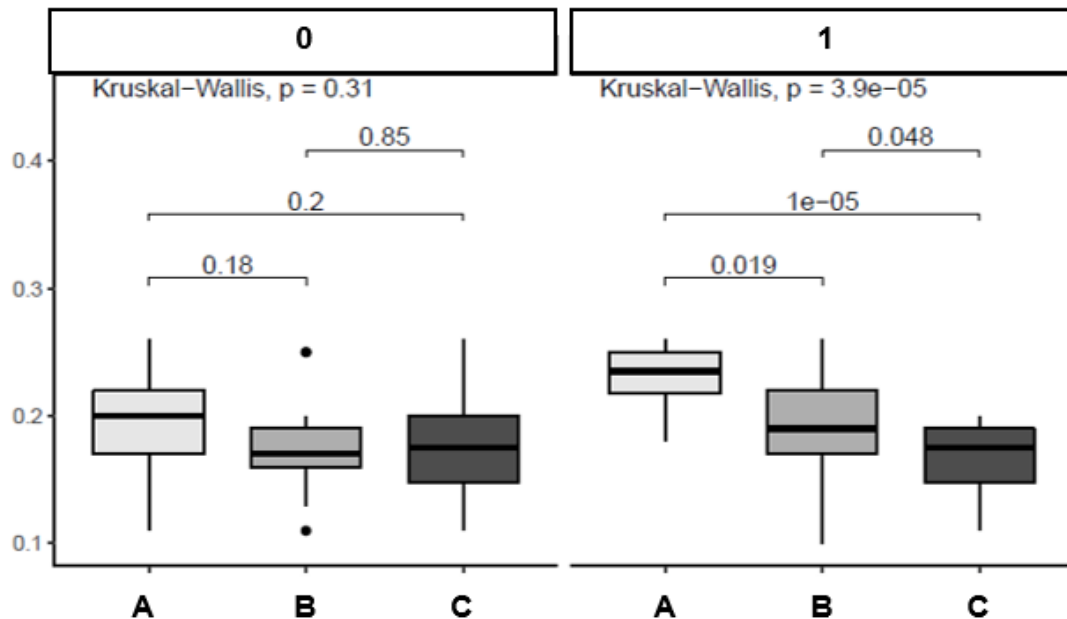
Wykres 24. Test Kruskala-Willisa - istotne statystycznie różnice pomiędzy stosunkiem masowym N/C (oś Y) w centrum guza, na obrzeżu guza i w tkance otaczającej guz w zależności od płci (oś X).

Objaśnienia: 0 - mężczyźni, 1 - kobiety, A - centrum guza, B - obrzeże guza, C - tkanki otaczające guz

Wykazano istotną statystycznie różnicę pomiędzy stosunkiem masowym N/C w centrum guza, na obrzeżu guza oraz w tkankach otaczających guz w zależności od lokalizacji guza względem linii pośrodkowej ciała, w obrębie guzów prawostronnych ($p=3,9e-05$). Wyniki zostały zaprezentowane na wykresie 25. Stosunek masowy N/C w guzach zlokalizowanych po prawej stronie linii pośrodkowej ciała był najwyższy w centrum guza.

Porównania w podgrupach ujawniły ponadto istotne statystycznie różnice pomiędzy:

- stosunkiem masowym N/C w centrum guza a stosunkiem masowym N/C na obrzeżu guza w nowotworach zlokalizowanych po prawej stronie linii pośrodkowej ciała ($p=0,019$). Stosunek masowy N/C był wyższy w centrum guza.
- stosunkiem masowym N/C w centrum guza a stosunkiem masowym N/C w tkankach otaczających guz w nowotworach zlokalizowanych po prawej stronie linii pośrodkowej ciała ($p=1e-05$). Stosunek masowy N/C był wyższy w centrum guza.
- stosunkiem masowym N/C na obrzeżu guza a stosunkiem masowym N/C w tkankach otaczających guz w nowotworach zlokalizowanych po prawej stronie linii pośrodkowej ciała ($p=0,048$). Stosunek masowy N/C był wyższy na obrzeżu guza ($p=0,048$).



Wykres 25. Test Kruskala-Willisa - istotne statystycznie różnice pomiędzy stosunkiem masowym N/C (oś Y) w centrum guza, na obrzeżu guza i w tkance otaczającej guz w zależności od lokalizacji guza względem linii pośrodkowej ciała (oś X).

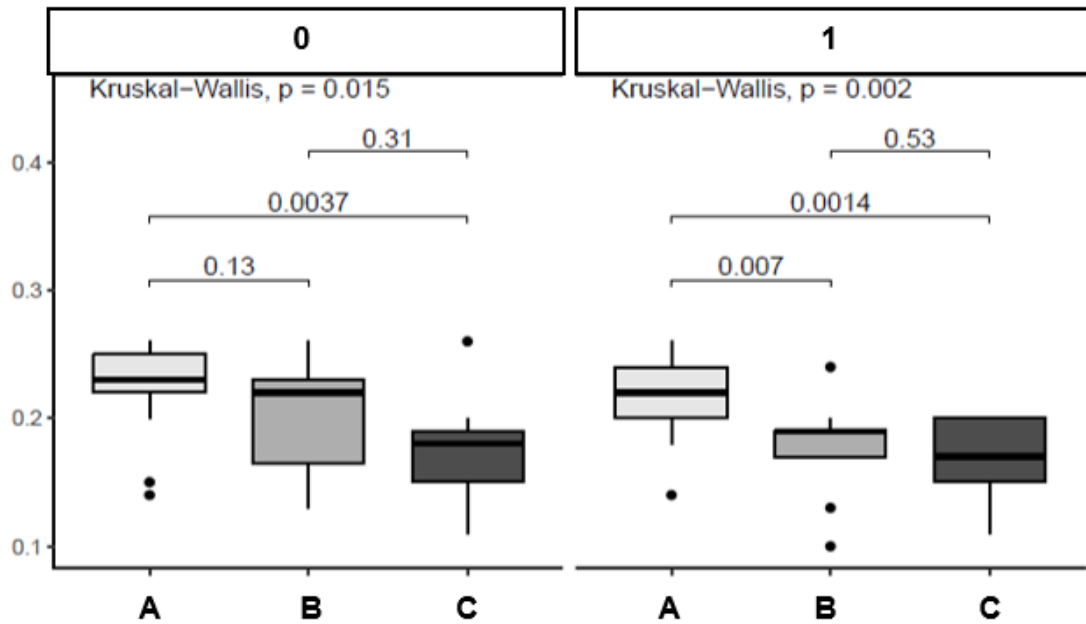
Objaśnienia: **0** - strona lewa, **1** - strona prawa, **A** - centrum guza, **B** - obrzeże guza, **C** - tkanki otaczające guz

Stwierdzono istotną statystycznie różnicę pomiędzy stosunkiem masowym N/C w centrum guza, na obrzeżu guza oraz w tkankach otaczających guz w zależności od lokalizacji guza względem struktur anatomicznych (wykres 26). Wartości p wynosiły $p=0,015$ w guzach płata skroniowego i $p=0,002$ w guzach płata czołowego. Stosunek masowy N/C, zarówno w guzach płata skroniowego, jak i w guzach płata czołowego, był najwyższy w centrum guza.

Porównania w podgrupach ujawniły ponadto istotne statystycznie różnice pomiędzy:

- stosunkiem masowym N/C w centrum guza a stosunkiem masowym N/C w tkankach otaczających guz, w guzach płata skroniowego ($p=0,0037$). Stosunek masowy N/C był wyższy w centrum guza.

- stosunkiem masowym N/C w centrum guza a stosunkiem masowym N/C na obrzeżu, w guzach płata czołowego ($p=0,007$). Stosunek masowy N/C był wyższy w centrum guza.
- stosunkiem masowym N/C w centrum guza a stosunkiem masowym N/C w tkankach otaczających guz, w guzach płata czołowego ($p=0,0014$). Stosunek masowy N/C był wyższy w centrum guza.



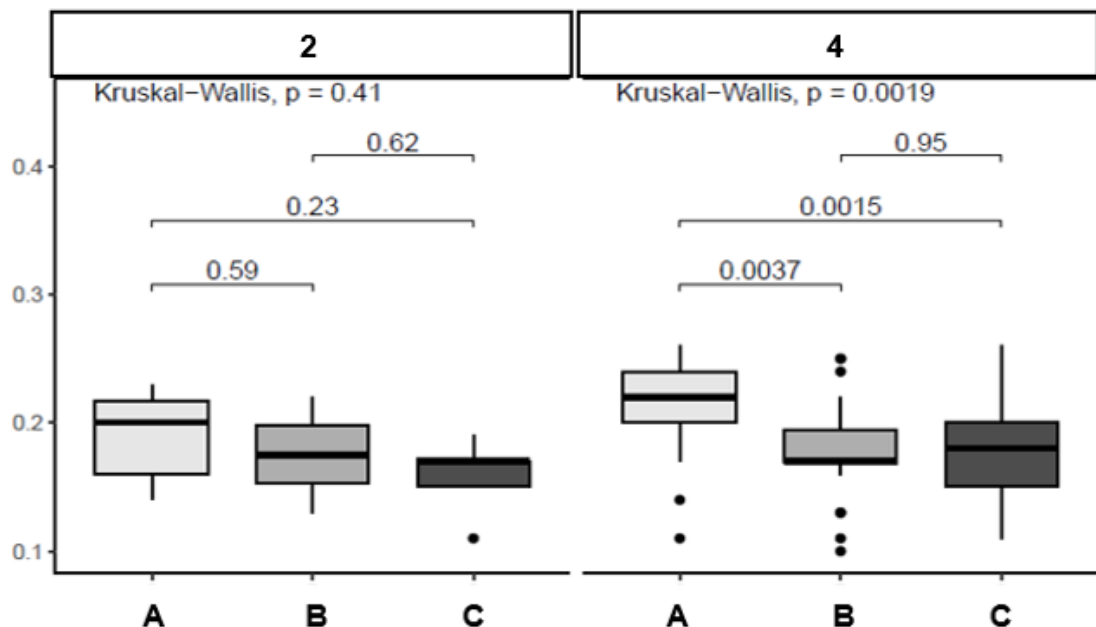
Wykres 26. Test Kruskala-Willisa - istotne statystycznie różnice pomiędzy stosunkiem masowym N/C (oś Y) w centrum guza, na obrzeżu guza i w tkance otaczającej guz w zależności od lokalizacji guza względem struktur anatomicznych (oś X).

Objaśnienia: **0** - płatek skroniowy, **1** - płatek czołowy, **A** - centrum guza, **B** - obrzeże guza, **C** - tkanki otaczające guz

Wykazano istotną statystycznie różnicę pomiędzy stosunkiem masowym N/C w centrum guza, na obrzeżu guza oraz w tkankach otaczających guz w zależności od stopnia złośliwości histologicznej guza, w obrębie guzów o czwartym stopniu złośliwości histologicznej ($p=0,0019$). Stosunek masowy N/C był najwyższy w centrum guza. Wyniki zostały zaprezentowane na wykresie 27.

Porównania w podgrupach ujawniły ponadto istotne statystycznie różnice pomiędzy:

- stosunkiem masowym N/C w centrum guza, a stosunkiem masowym N/C na obrzeżu guza, w obrębie guzów o czwartym stopniu złośliwości histologicznej ($p=0,0037$). Stosunek masowy N/C był wyższy w centrum guza.
- stosunkiem masowym N/C w centrum guza, a stosunkiem masowym N/C w tkankach otaczających guz, w obrębie guzów o czwartym stopniu złośliwości histologicznej ($p=0,0015$). Stosunek masowy N/C był wyższy w centrum guza.



Wykres 27. Test Kruskala-Willisa - istotne statystycznie różnice pomiędzy stosunkiem masowym N/C (oś Y) w centrum guza, na obrzeżu guza i w tkance otaczającej guz w zależności od stopnia złośliwości histologicznej guza (oś X).

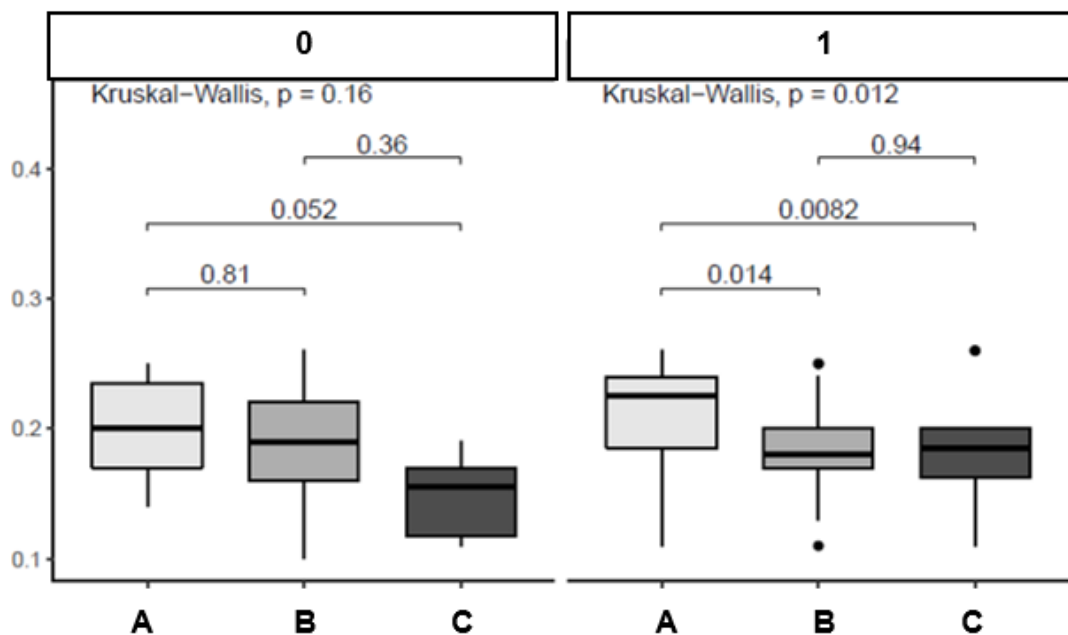
Objaśnienia: **2** - drugi stopień złośliwości histologicznej (grade 2), **4** - czwarty stopień złośliwości histologicznej (grade 4), **A** - centrum guza, **B** - obrzeże guza, **C** - tkanki otaczające guz

Wykazano istnienie istotnej statystycznie różnicy pomiędzy stosunkiem masowym N/C w centrum guza, na obrzeżu guza oraz w tkankach otaczających guz w zależności od rozpoznania histopatologicznego, w obrębie guzów z rozpoznaniem *glioblastoma, IDH-wildtype* ($p=0,012$). Wyniki zostały zaprezentowane na wykresie 28. Stosunek masowy N/C był najwyższy w centrum guza.

Porównania w podgrupach ujawniły ponadto istotne statystycznie różnice pomiędzy:

- stosunkiem masowym N/C w centrum guza a stosunkiem masowym N/C na obrzeżu guza w guzach z rozpoznaniem *glioblastoma, IDH-wildtype* ($p=0,014$). Stosunek masowy N/C był wyższy w centrum guza.
- stosunkiem masowym N/C w centrum guza a stosunkiem masowym N/C w tkankach otaczającej guz w guzach z rozpoznaniem *glioblastoma, IDH-wildtype* ($p=0,0082$). Stosunek masowy N/C był wyższy w centrum guza.

Ponadto zauważono trend dotyczący związku pomiędzy stosunkiem masowym N/C w centrum guza, a stosunkiem masowym N/C w tkankach otaczających guz, w obrębie guzów z rozpoznaniem glejaków rozlanych innych niż glejak wielopostaciowy (*adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant*) (wykres 28). Stosunek masowy N/C był wyższy w centrum guza.



Wykres 28. Test Kruskala-Willisa - istotne statystycznie różnice pomiędzy stosunkiem masowym N/C (oś Y) w centrum guza, na obrzeżu guza i w tkance otaczającej guz w obrębie guzów z rozpoznaniem *glioblastoma, IDH-wildtype* (oś X).

Objaśnienia: **0** - glejaki rozlane inne niż glejak wielopostaciowy (*adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant*), **1** - glejak wielopostaciowy (*glioblastoma, IDH-wildtype*), **A** - centrum guza, **B** - obrzeże guza, **C** - tkanki otaczające guz

4.3.2.4. Korelacje

Otrzymane dane przeanalizowano pod kątem istnienia pomiędzy nimi istotnych korelacji i określenia kierunku oraz siły związku między zmiennymi.

Na podstawie analizy współczynnika korelacji Spearmana, stwierdzono istnienie ośmiu powiązań, ujętych poniżej i zaprezentowanych na diagramie 3.

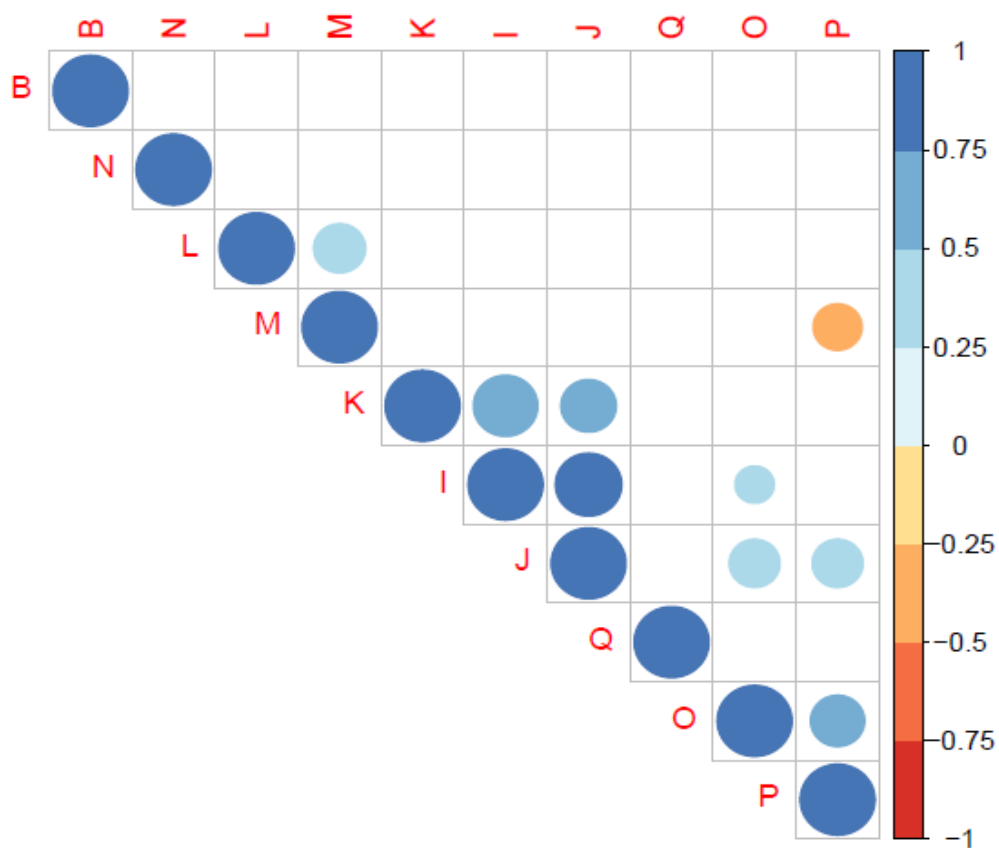
Korelacje ujemne:

- średnia pomiędzy stosunkiem izotopowym $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ na obrzeżu guza a stosunkiem masowym N/C na obrzeżu guza (**współczynnik korelacji - 0,43**)

Korelacje dodatnie:

- silna pomiędzy stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza a stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ na obrzeżu guza (**współczynnik korelacji 0,79**)
- silna pomiędzy stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza a stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w tkankach otaczających guz (**współczynnik korelacji 0,74**)
- średnia pomiędzy stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ na obrzeżu guza a stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w tkankach otaczających guz (**współczynnik korelacji 0,55**)
- średnia pomiędzy stosunkiem masowym N/C w centrum guza a stosunkiem masowym N/C na obrzeżu guza (**współczynnik korelacji 0,52**)
- średnia pomiędzy stosunkiem izotopowym $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ w centrum guza a stosunkiem izotopowym $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ na obrzeżu guza (**współczynnik korelacji 0,48**)
- średnia pomiędzy stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ na obrzeżu guza a stosunkiem masowym N/C w centrum guza (**współczynnik korelacji 0,46**)
- średnia pomiędzy stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ na obrzeżu guza a stosunkiem masowym N/C na obrzeżu guza (**współczynnik korelacji 0,46**)

Diagram 3. Graficzne przedstawienie współczynników korelacji Spearmana dotyczących badań izotopowych.

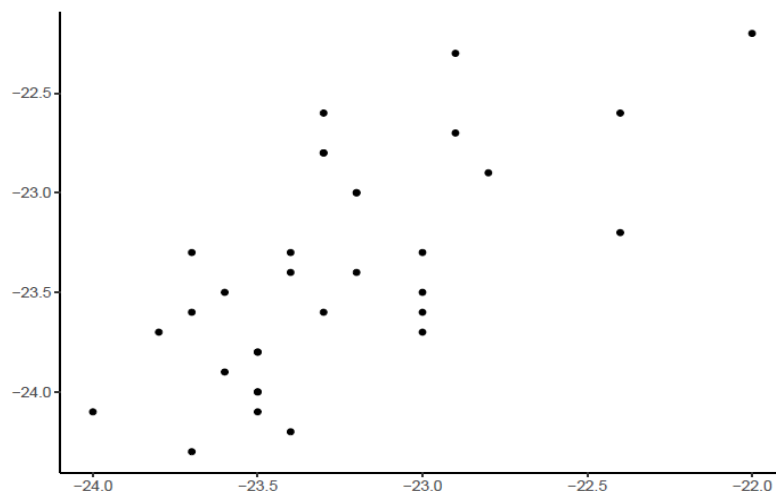


Objaśnienia:

- B** wiek pacjenta w momencie resekcji
- I** stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza
- J** stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ na obrzeżu guza
- K** stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w tkankach otaczających guz
- L** stosunek izotopowy $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ w centrum guza
- M** stosunek izotopowy $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ na obrzeżu guza
- N** stosunek izotopowy $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ w tkankach otaczających guz
- O** stosunek masowy N/C w centrum guza
- P** stosunek masowy N/C na obrzeżu guza
- Q** stosunek masowy N/C w tkankach otaczających guz

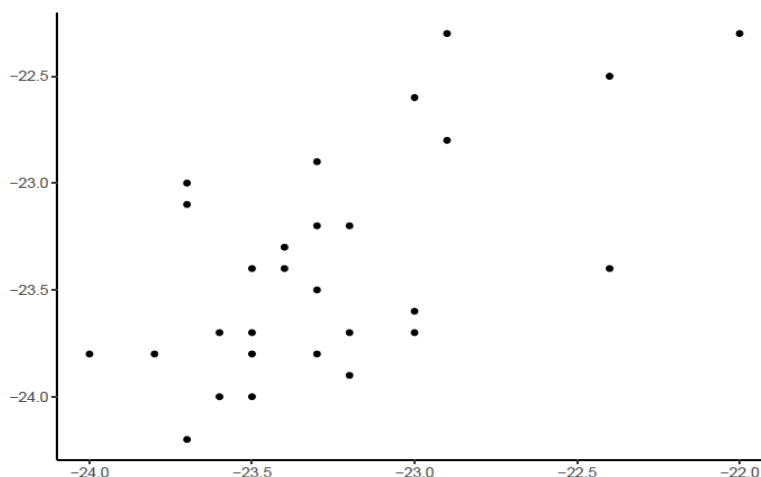
Ponadto wykonano wykresy rozrzutu i stwierdzono istnienie dodatnich korelacji pomiędzy:

- stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza, a stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w tkankach otaczających guz (wykres 29)



Wykres 29. Korelacja dodatnia pomiędzy stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza (oś Y) a stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w tkankach otaczających guz (oś X).

- stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ na obrzeżu guza, a stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w tkankach otaczających guz (wykres 30)



Wykres 30. Korelacja dodatnia pomiędzy stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ na obrzeżu guza (oś Y) a stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w tkankach otaczających guz (oś X).

4.3.2.5. Analizy składowych głównych grupowania przestrzennego

Analizę składowych głównych grupowania przestrzennego przeprowadzono pod kątem lokalizacji guza względem linii pośrodkowej ciała oraz rozpoznania histopatologicznego. Następnie zastosowano metodę redukcji zmiennych i zaobserwowano przestrzenne grupowanie się pacjentów również pod kątem złośliwości histologicznej guza. Efektem był także wzrost sumarycznej wariacji modelu.

Na podstawie kompletu zmiennych, analiza składowych głównych ujawniła przestrzenne grupowanie pacjentów w wymiarach PC1 i PC2 (diagram 4) dotyczące lokalizacji guza względem linii pośrodkowej ciała.

Guzy zlokalizowane po prawej stronie linii pośrodkowej ciała charakteryzują się:

- wyższym stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza
- wyższym stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ na obrzeżu guza
- wyższym stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w tkankach otaczających guz
- wyższym stosunkiem masowym N/C w centrum guza
- wyższym stosunkiem masowym N/C na obrzeżu guza

Guzy zlokalizowane po lewej stronie linii pośrodkowej ciała charakteryzują się:

- wyższym stosunkiem izotopowym $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ w centrum guza
- wyższym stosunkiem izotopowym $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ na obrzeżu guza
- w wyższym stosunkiem izotopowym $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ w tkankach otaczających guz
- wyższym stosunkiem liczby komórek LCA(+) do liczby komórek nowotworowych

Sumaryczna wariancja wynosi 39,5%. Dane zostały przedstawione na diagramie 4 i diagramie 7.

Analiza składowych głównych pokazała przestrzenne zróżnicowanie dotyczące rozpoznania histopatologicznego w przestrzeni PCA2 (diagram 5). Wykazano, że nowotwory o rozpoznaniu *glioblastoma, IDH-wildtype* charakteryzowały się:

- wyższym indeksem Ki-67
- starszym wiekiem pacjenta w momencie resekcji guza
- wyższym stosunkiem izotopowym $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ w centrum guza
- wyższym stosunkiem izotopowym $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ na obrzeżu guza
- wyższym stosunkiem izotopowym $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ w tkankach otaczających guz
- wyższym stosunkiem masowym N/C na obrzeżu guza
- wyższym stosunkiem liczby komórek LCA(+) do liczby komórek nowotworowych

Sumaryczna wariancja wynosi 39,5%. Dane zostały przedstawione na diagramie 5 i diagramie 7.

Po zastosowaniu redukcji zmiennych analiza składowych głównych pokazała przestrzenne zróżnicowanie dotyczące stopnia złośliwości histologicznej guza w rozpoznaniu pierwotnym w przestrzeni PCA2 (diagram 6). Wykazano różnicę pomiędzy guzami o trzecim stopniu złośliwości histologicznej (grade 3) a guzami o drugim i czwartym stopniu złośliwości histologicznej (grade 2 i grade 4).

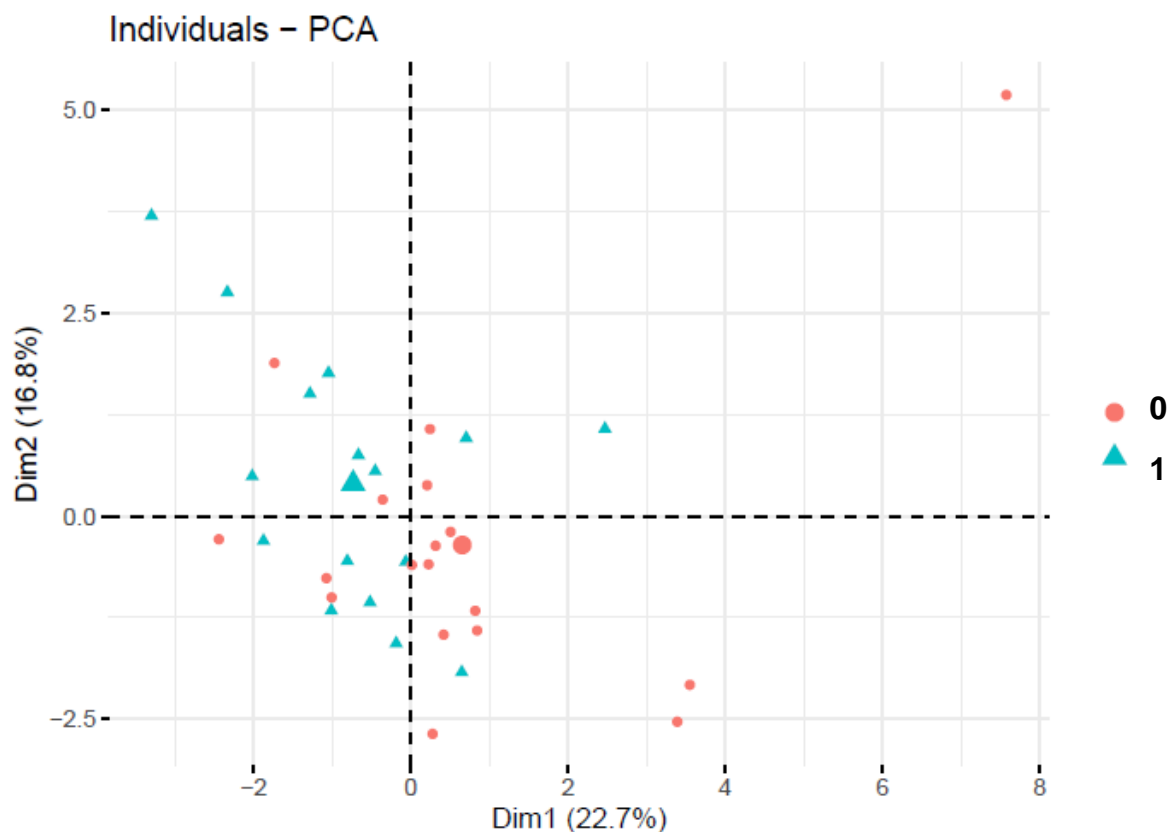
Nowotwory o trzecim stopniu złośliwości histologicznej charakteryzowały się:

- wyższym stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza
- wyższym stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ na obrzeżu guza
- wyższym stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w tkankach otaczających guz

Sumaryczna wariancja wynosi 60,2%. Dane zostały przedstawione na diagramie 6 i diagramie 8.

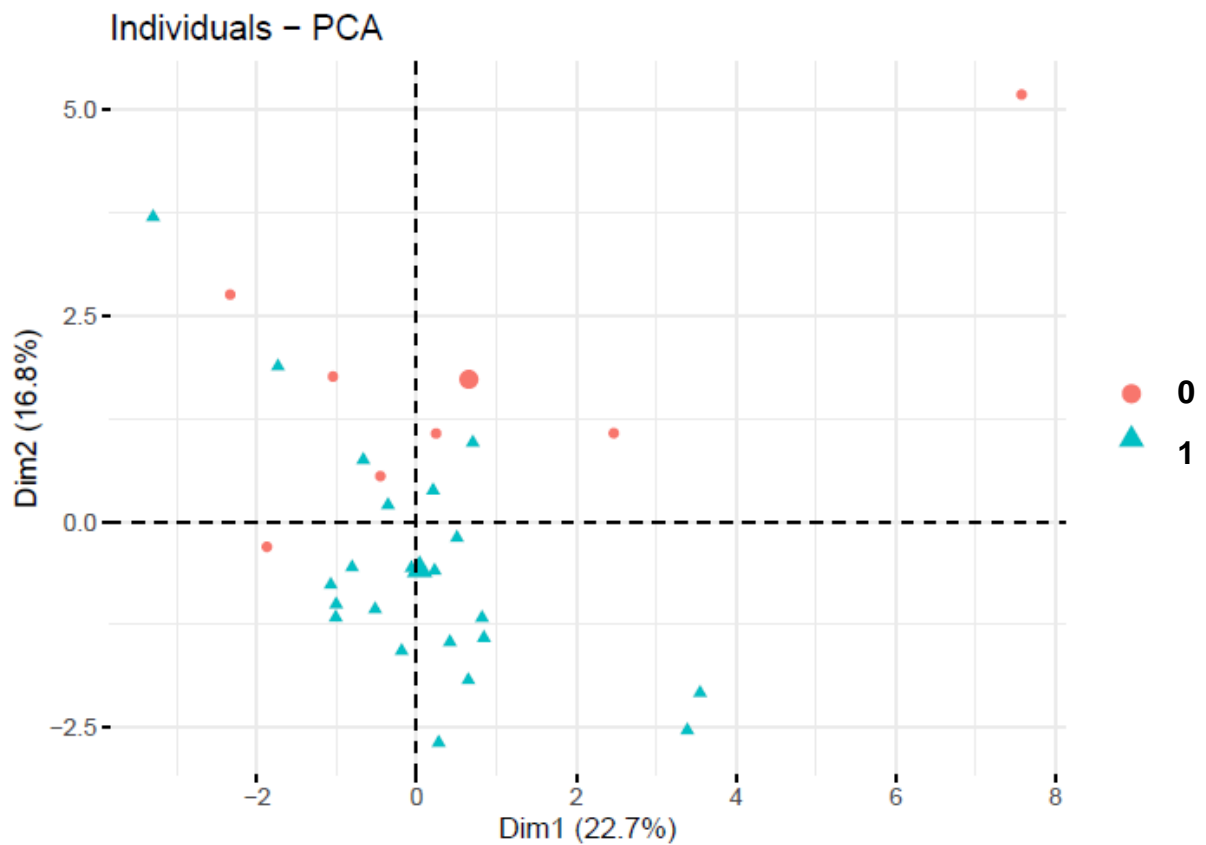
Opisane grupowania wynikają wyłącznie z pomiarów, a cecha kliniczna została nałożona jako kolorowanie i nie uczestniczyła bezpośrednio w analizie.

Diagram 4. Analiza składowych głównych grupowania przestrzennego w wymiarach PCA1 i PCA2 dotycząca lokalizacji guza względem linii pośrodkowej ciała.



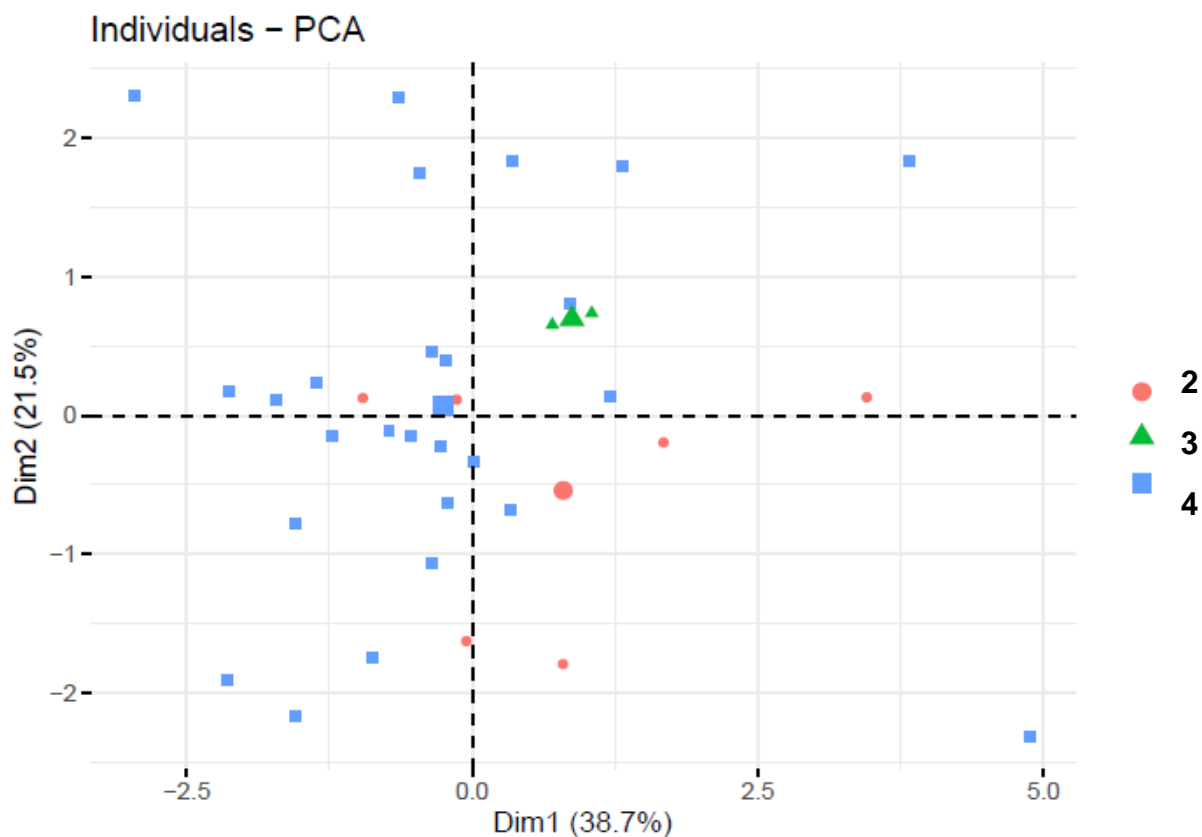
Objaśnienia: 0 - guzy zlokalizowane po lewej stronie linii pośrodkowej ciała,
1 - guzy zlokalizowane po prawej stronie linii pośrodkowej ciała

Diagram 5. Analiza składowych głównych grupowania przestrzennego pacjentów w wymiarach PCA1 i PCA2 dotycząca rozpoznania histopatologicznego.



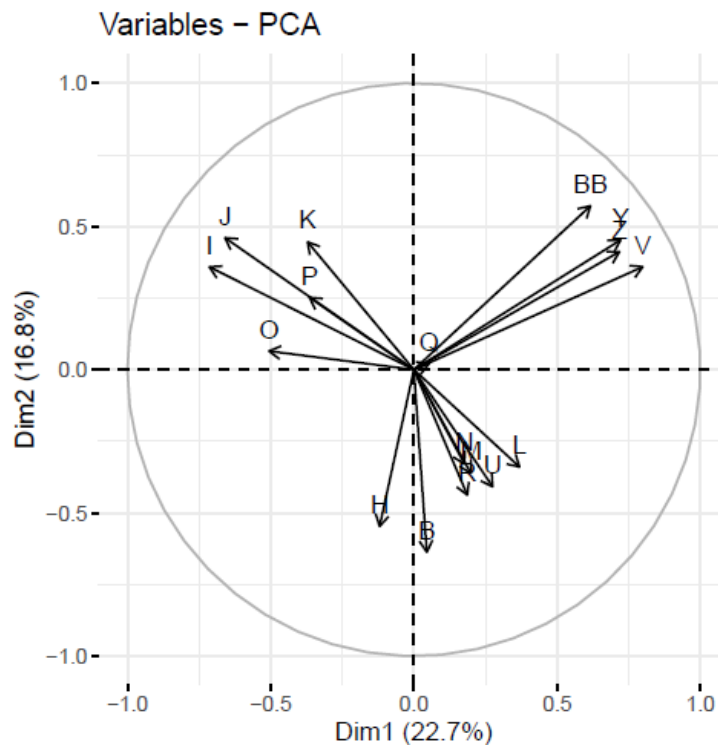
Objaśnienia: **0** - glejaki rozlane inne niż glejak wielopostaciowy (*adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant*), **1** - glejak wielopostaciowy (*glioblastoma, IDH-wildtype*)

Diagram 6. Analiza składowych głównych grupowania przestrzennego pacjentów w wymiarach PCA1 i PCA2 dotycząca stopnia złośliwości histologicznej guza.



Objaśnienia: 2 - guzy o drugim stopniu złośliwości histologicznej (grade 2), 3 - guzy o trzecim stopniu złośliwości histologicznej (grade 3), 4 - guzy o czwartym stopniu złośliwości histologicznej (grade 4)

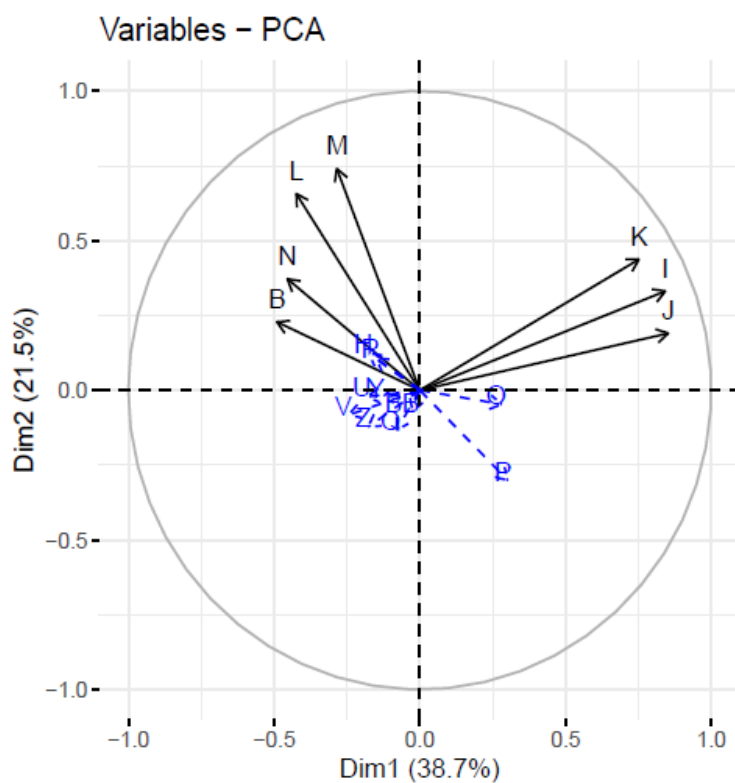
Diagram 7. Diagram zmiennych analizy składowych głównych.



Objaśnienia:

B	wiek pacjenta w momencie resekcji	O	stosunek masowy N/C w centrum guza
H	indeks Ki-67	P	stosunek masowy N/C na obrzeżu guza
I	stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza	Q	stosunek masowy N/C w tkankach otaczających guz
J	stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ na obrzeżu guza	U	stosunek liczby komórek LCA(+) do liczby komórek nowotworowych
K	stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w tkankach otaczających guz	Y	stosunek liczby komórek 15-LOX(+) do liczby komórek nowotworowych
L	stosunek izotopowy $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ w centrum guza	Z	komórki 15-LOX(+) w tkankach otaczających guz / HPF
M	stosunek izotopowy $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ na obrzeżu guza	V	komórki 15-LOX(+) w obrębie guza / HPF
N	stosunek izotopowy $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ w tkankach otaczających guz	BB	indeks 15-LOX(+) / HPF

Diagram 8. Diagram zmiennych analizy składowych głównych dotyczących pomiarów składu izotopowego .



Objaśnienia:

- B** wiek pacjenta w momencie resekcji
- I** stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza
- J** stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ na obrzeżu guza
- K** stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w tkankach otaczających guz
- L** stosunek izotopowy $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ w centrum guza
- M** stosunek izotopowy $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ na obrzeżu guza
- N** stosunek izotopowy $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ w tkankach otaczających guz

4.3.3. Podsumowanie wyników analizy statystycznej

4.3.3.1. Podsumowanie wyników analizy statystycznej immunoekspresji badanych białek

Podsumowanie istotnych statystycznie wyników immunoekspresji badanych białek zostało przedstawione w tabeli 16.

Tabela 16. Podsumowanie istotnych statystycznie wyników analizy statystycznej badań immunohistochemicznych.

Analizowane parametry	Wartość p		Zależność
Liczba komórek 15-LOX(+) w obrębie guza / HPF w zależności od stopnia złośliwości histologicznej guza (grade).	p=0,014	p=0,022	Liczba komórek 15-LOX (+) w obrębie guza / HPF była większa w guzach o 1 stopniu złośliwości histologicznej niż w 3.
		p=0,031	Liczba komórek 15-LOX (+) w obrębie guza / HPF była większa w guzach o 2 stopniu złośliwości histologicznej niż w 3.
		p=0,015	Liczba komórek 15-LOX (+) w obrębie guza / HPF była większa w guzach o 1 stopniu złośliwości histologicznej niż w 4.
Stosunek liczby komórek 15-LOX(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF w zależności od stopnia złośliwości histologicznej guza (grade).	p=0,032	p=0,035	Stosunek liczby komórek 15-LOX(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF był wyższy w guzach o 2 stopniu złośliwości histologicznej niż w 3.
		p=0,02	Stosunek liczby komórek 15-LOX(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF był wyższy w guzach o 2 stopniu złośliwości histologicznej niż w 4.

<p>Stosunek liczby komórek 15-LOX(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF w zależności od rozpoznania histopatologicznego.</p>	<p>p=0,046</p>	<p>Stosunek liczby komórek 15-LOX(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF był wyższy w glejakiach rozlanych innych niż glejak wielopostaciowy (<i>adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant</i>) niż w glejakiach wielopostaciowych (<i>glioblastoma, IDH - wildtype</i>).</p>
<p>Liczba komórek LCA(+) / HPF w zależności od stopnia złośliwości histologicznej guza (grade).</p>	<p>p=2e-05</p>	<p>p=0,0013</p> <p>Liczba komórek LCA(+) / HPF była większa w guzach o 4 stopniu złośliwości histologicznej niż w 1.</p>
		<p>p=0,00065</p> <p>Liczba komórek LCA(+) / HPF była większa w guzach o 4 stopniu złośliwości histologicznej niż w 2.</p>
		<p>p=0,0011</p> <p>Liczba komórek LCA(+) / HPF była większa w guzach o 4 stopniu złośliwości histologicznej niż w 3.</p>
<p>Liczba komórek LCA(+) / HPF w zależności od rozpoznania histopatologicznego.</p>	<p>p=8,3e-05</p>	<p>p=0,0006</p> <p>Liczba komórek LCA(+) / HPF była większa w glejakiach wielopostaciowych (<i>glioblastoma, IDH-wildtype</i>) niż w glejakiach rozlanych innych niż glejak wielopostaciowy (<i>adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant</i>).</p>
		<p>p=0,00089</p> <p>Liczba komórek LCA(+) / HPF była większa w glejakiach wielopostaciowych (<i>glioblastoma, IDH-wildtype</i>) niż w gwiaździakach włosowatokomórkowych (<i>pilocytic astrocytoma</i>).</p>

<p>Stosunek liczby komórek LCA(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF w zależności od stopnia złośliwości histologicznej guza (grade).</p>	<p>p=0,0019</p>	<p>p=0,0069</p>	<p>Stosunek liczby komórek LCA(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF był wyższy w guzach o 4 stopniu złośliwości histologicznej niż w 2.</p>
		<p>p=0,0018</p>	<p>Stosunek liczby komórek LCA(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF był wyższy w guzach o 4 stopniu złośliwości histologicznej niż w 3.</p>
<p>Stosunek liczby komórek LCA(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF w zależności od rozpoznania histopatologicznego.</p>	<p>p=0,0055</p>	<p>p=0,0019</p>	<p>Stosunek liczby komórek LCA(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF był wyższy w glejakach wielopostaciowych (<i>glioblastoma, IDH-wildtype</i>) niż w glejakach rozlanych innych niż glejak wielopostaciowy (<i>adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant</i>).</p>
<p>Indeks Ki-67 w zależności od stopnia złośliwości histologicznej guza (grade).</p>	<p>p=1e-15</p>	<p>p=0,0015</p>	<p>Indeks Ki-67 był wyższy w guzach o 2 stopniu złośliwości histologicznej niż w 1.</p>
		<p>p=2e-05</p>	<p>Indeks Ki-67 był wyższy w guzach o 3 stopniu złośliwości histologicznej niż w 1.</p>
		<p>p=1,6e-06</p>	<p>Indeks Ki-67 był wyższy w guzach o 3 stopniu złośliwości histologicznej niż w 2.</p>
		<p>p=6e-08</p>	<p>Indeks Ki-67 był wyższy w guzach o 4 stopniu złośliwości histologicznej niż w 1.</p>
		<p>p=1,6e-12</p>	<p>Indeks Ki-67 był wyższy w guzach o 4 stopniu złośliwości histologicznej niż w 2.</p>

<p>Indeks Ki-67 w zależności od rozpoznania histopatologicznego.</p>	<p>p=1,4e-10</p>	<p>p=3,5e-06</p>	<p>Indeks Ki-67 był wyższy w glejakiach wielopostaciowych (<i>glioblastoma, IDH - wildtype</i>) niż w glejakiach rozlanych innych niż glejak wielopostaciowy (<i>adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant</i>).</p>
		<p>p=0,00014</p>	<p>Indeks Ki-67 był wyższy w glejakiach rozlanych innych niż glejak wielopostaciowy (<i>adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant</i>) niż w gwiaździakach włosowatokomórkowych (<i>pilocytic astrocytoma</i>).</p>
		<p>p=8,3e-08</p>	<p>Indeks Ki-67 był wyższy w glejakiach wielopostaciowych (<i>glioblastoma, IDH - wildtype</i>) niż w gwiaździakach włosowatokomórkowych (<i>pilocytic astrocytoma</i>).</p>

4.3.3.2. Podsumowanie wyników analizy statystycznej pomiarów izotopowych

Podsumowanie istotnych statystycznie wyników analizy statystycznej badań pomiarów izotopowych zostało przedstawione w tabeli 17.

Tabela 17. Podsumowanie istotnych statystycznie wyników analizy statystycznej badań izotopowych metodą spektrometrii mas.

Analizowane parametry	Wartość p		Zależność
Stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza i na obrzeżu guza w zależności od płci.	p=0,025 w centrum guza	Stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza był wyższy u kobiet niż u mężczyzn.	
	p=0,023 na obrzeżu guza	Stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ na obrzeżu guza był wyższy u kobiet niż u mężczyzn.	
Stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza w zależności od lokalizacji guza względem linii pośrodkowej ciała.	p=0,043 w centrum guza	Stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza był wyższy w guzach zlokalizowanych po prawej stronie linii pośrodkowej ciała niż po lewej.	
Stosunek masowy N/C w centrum guza, na obrzeżu guza oraz w tkankach otaczających guz.	p=0,00041	p=0,0082	Stosunek masowy N/C w centrum guza był wyższy niż na obrzeżu guza.
		p=0,00012	Stosunek masowy N/C w centrum guza był wyższy niż w tkankach otaczających guz.
Stosunek masowy N/C w centrum guza, na obrzeżu guza oraz w tkankach otaczających guz w zależności od płci.	p=0,0042 u mężczyzn	p=0,0072	Stosunek masowy N/C w centrum guza był wyższy niż na obrzeżu guza.
		p=0,0033	Stosunek masowy N/C w centrum guza był wyższy niż w tkankach otaczających guz.
	p=0,024 u kobiet	p=0,018	Stosunek masowy N/C w centrum guza był wyższy niż w tkankach otaczających guz.
		p=0,035	Stosunek masowy N/C na obrzeżu guza był wyższy niż w tkankach otaczających guz.

<p>Stosunek masowy N/C w centrum guza, na obrzeżu guza oraz w tkankach otaczających guz w zależności od lokalizacji guza względem linii pośrodkowej ciała.</p>	<p>p=3,9e-05 w guzach po prawej stronie linii pośrodkowej ciała</p>	<p>p=0,019</p>	<p>Stosunek masowy N/C w centrum guza był wyższy niż na obrzeżu guza.</p>
		<p>p=1e-05</p>	<p>Stosunek masowy N/C w centrum guza był wyższy niż w tkankach otaczających guz.</p>
		<p>p=0,048</p>	<p>Stosunek masowy N/C na obrzeżu guza był wyższy niż w tkankach otaczających guz.</p>
<p>Stosunek masowy N/C w centrum guza, na obrzeżu guza oraz w tkankach otaczających guz w zależności od stopnia złośliwości histologicznej guza (grade).</p>	<p>p=0,0019 w guzach grade 4</p>	<p>p=0,0037</p>	<p>Stosunek masowy N/C w centrum guza był wyższy niż na obrzeżu guza.</p>
		<p>p=0,0015</p>	<p>Stosunek masowy N/C w centrum guza był wyższy niż w tkankach otaczających guz.</p>
<p>Stosunek masowy N/C w centrum guza, na obrzeżu guza oraz w tkankach otaczających guz w zależności od lokalizacji guza względem struktur anatomicznych.</p>	<p>p=0,015 w guzach płata skroniowego</p>	<p>p=0,0037</p>	<p>Stosunek masowy N/C w centrum guza był wyższy niż w tkankach otaczających guz.</p>
	<p>p=0,002 w guzach płata czołowego</p>	<p>p=0,007</p>	<p>Stosunek masowy N/C w centrum guza był wyższy niż na obrzeżu guza.</p>
		<p>p=0,0014</p>	<p>Stosunek masowy N/C w centrum guza był wyższy niż w tkankach otaczających guz.</p>
	<p>p=0,012 w glejakach wielopostaciowych (<i>glioblastoma, IDH-wildtype</i>)</p>	<p>p=0,014</p>	<p>Stosunek masowy N/C w centrum guza był wyższy niż na obrzeżu guza.</p>
<p>p=0,0082</p>		<p>Stosunek masowy N/C w centrum guza był wyższy niż w tkankach otaczających guz.</p>	

5. Dyskusja

Niezwykły postęp jaki dokonuje się we współczesnej medycynie przekłada się na poprawę diagnostyki i leczenia chorych oraz zwiększa zainteresowanie medycyną spersonalizowaną, która bierze pod uwagę znaczące różnice pomiędzy przebiegiem choroby w indywidualnych przypadkach. Warunkiem tak szczególnego podejścia do procesu leczenia jest odkrycie nieznanej dotąd wiedzy na temat chorób nowotworowych ze szczególnym uwzględnieniem czynników rokowniczych i jej wykorzystywanie w diagnostyce i terapii. Udokumentowano w literaturze, że ekspresja białek, 15-LOX i LCA oraz skład izotopowy guzów, będących przedmiotem prezentowanej pracy wykazują związek z chorobą nowotworową, jednak potencjalne implikacje kliniczne takich oznaczeń są zaledwie zarysowane. Szczególne wysiłki badaczy obejmują nowotwory o najgorszym rokowaniu w których potrzeba ujawnienia nowych czynników rokowniczych wydaje się szczególnie nagląca.

Wśród glejaków najczęstszym i jednocześnie najgorzej rokującym guzem jest glejak wielopostaciowy - przyczyna większości porażek terapeutycznych w guzach ośrodkowego układu nerwowego. Mimo wielu, w tym eksperymentalnych, prób leczenia oraz dziesiątkom badań nad patofizjologią glejaków, wiedza na ich temat pozostaje wciąż niekompletna. Pomimo że aktualnie znanych jest wiele czynników prognostycznych i predykcyjnych, umożliwiających bardziej dokładną ocenę rokowania i modyfikację leczenia, to ostateczny efekt jest daleki od oczekiwanego, a terapie umożliwiające wyleczenie chorych pozostają nieznane. Związane jest to prawdopodobnie z obecnością innych jeszcze czynników, wciąż nieznanymi. W tej sytuacji prowadzenie badań mających na celu odkrycie nowych markerów o potencjalnej wartości diagnostycznej i prognostycznej w tej grupie jest obecnie intensyfikowane. W okresie kilku ostatnich lat pojawiło się wiele doniesień na temat roli zarówno mikrośrodowiska jak i otoczenia nowotworu na proces inicjacji, promocji i progresji guza, co było przyczyną zapoczątkowania również prezentowanego badania.

W literaturze odnajdujemy informacje na temat złożonych reakcji chemicznych pomiędzy komórkami nowotworowymi a ich nienowotworowym środowiskiem. W miarę upływu czasu dochodzi do zmian w komórkach

mikrośrodowiska guza, których rolą w prawidłowych warunkach jest przeciwdziałanie kancerogenezie. Pod wpływem obecności guza w prawidłowo dotychczas funkcjonujących komórkach dochodzi do przeprogramowania w kierunku działania pronowotworowego, skutkującego promocją wzrostu, angiogenezy oraz supresją reakcji obronnych organizmu.

Szczególnie liczne są badania nad wpływem makrofagów w obrębie guza (TAMs) na zachowanie komórek nowotworowych i przebieg procesu nowotworzenia. Pod uwagę brane są przede wszystkim ich dwie formy - klasycznie aktywowana - M1 i alternatywnie aktywowana - M2. Udowodniono, że ich liczba i wzajemny stosunek zmieniają się wraz z postępem choroby nowotworowej (Hinshaw & Shevde, 2019; Y. Kim i in., 2017). W opublikowanych doniesieniach odnaleziono informacje na temat wpływu metabolizmu lipidów w obrębie makrofagów M2 na komórki nowotworowe, głównie poprzez mediatory lipidowe, produkowane między innymi przez lipooksygenazy (LOX), które są przedmiotem przedstawianej pracy. Wykazano, że wzmożona oksydacja kwasów tłuszczowych oraz ich synteza "*de novo*" mogą mieć znaczący wpływ na mikrośrodowisko nowotworu, wspierając wzrost guza i przyczyniając się do jego oporności na leczenie radio- i chemioterapeutyczne (Corn i in., 2020).

Znaczenie metabolizmu lipidów udokumentowano również w powstawaniu i progresji glejaków. Dotychczas nie poznano jednak wiarygodnych metod jego oceny w przypadku chorób nowotworowych ośrodkowego układu nerwowego. Dużym zainteresowaniem cieszą się badania nad zaburzeniami metabolizmu kwasu arachidonowego i linolowego. Enzymy, biorące w nim udział, pośród których jest także 15-LOX, będący przedmiotem prezentowanej pracy, okazały się ważnymi związkami w procesach nowotworzenia. Przemiana kwasu linolowego pod wpływem 15-LOX doprowadza do powstania związku 13-HODE, który w mikrośrodowisku nowotworu inhibituje proliferację oraz promuje neowaskularyzację i angiogenezę. Stąd też guzy z nadekspresją 15-LOX charakteryzują się lepszym rokowaniem (Çolakoğlu i in., 2018).

W literaturze wskazuje się na obecność mRNA 15-LOX w 62% wszystkich glejaków, niezależnie od stopnia złośliwości histologicznej. Nie stwierdzono jednak istotności statystycznej związku pomiędzy tą ekspresją a stopniem złośliwości histologicznej, płcią, wiekiem czy rozpoznaniem histopatologicznym (De Armas i in., 2010). Białko 15-LOX będące przedmiotem prezentowanej pracy

ulega ekspresji w makrofagach M2 i jest jednym z enzymów biorących udział w kancerogenezie, a także potencjalnym wskaźnikiem zmian molekularnych w komórkach o potencjalnych implikacjach klinicznych.

W przedstawianym badaniu stwierdzono liczne i różnorodne związki ekspresji 15-LOX z wybranymi cechami histoklinicznymi glejaków. Wykazano zróżnicowanie liczby komórek 15-LOX(+) i zauważono, że maleje ona wraz ze wzrostem stopnia złośliwości histologicznej guza, osiągając najniższe wartości w glioblastoma. Stwierdzono istotne statystycznie różnice w liczbie komórek 15-LOX(+) pomiędzy guzami o pierwszym i trzecim, drugim i trzecim oraz pierwszym i czwartym stopniu złośliwości histologicznej. Ponadto wykazano, że stosunek liczby komórek 15-LOX(+) do liczby komórek nowotworowych, również maleje wraz ze wzrostem stopnia złośliwości histologicznej guza. Istotna statystycznie różnica obserwowana była pomiędzy guzami o drugim i trzecim oraz o drugim i czwartym stopniu złośliwości histologicznej. Wykazano również silną ujemną korelację pomiędzy indeksem Ki-67 a ekspresją 15-LOX. Można to wiązać ze spadkiem ekspresji 15-LOX wraz ze wzrostem złośliwości histologicznej, a więc agresywności nowotworu pozostającej zawsze w związku z nasiloną proliferacją. Ponadto stwierdzono silną dodatnią korelację pomiędzy liczbą komórek 15-LOX(+) w obrębie guza a liczbą komórek 15-LOX(+) w jego bezpośrednim otoczeniu, co pozostaje w zgodności z wiedzą o współudziale otoczenia w procesie kancerogenezy .

W literaturze nie odnaleziono prac na temat ewolucji ekspresji 15-LOX w komórkach mikrośrodowiska nowotworu, istnieją natomiast badania ukazujące zmiany w immunoekspresji w komórkach nowotworowych. Badania te wykazały, że ekspresja 15-LOX w większości badanych nowotworów złośliwych jest niższa niż w tkance prawidłowej, a sam enzym charakteryzuje się właściwościami przeciwnowotworowymi, które zostają utracone wraz ze spadkiem jego ekspresji (Tian i in., 2017). Obniżoną ekspresję 15-LOX zaobserwowano również w raku płuc, gdzie wskazano, że enzym związany jest także z procesem różnicowania komórek i im słabiej zróżnicowany był nowotwór tym słabszą wykazywał ekspresję 15-LOX (Moussalli i in., 2011). Badania te były przeprowadzane tylko na populacji komórek nowotworowych, nie oceniano natomiast ekspresji w komórkach układu immunologicznego, wchodzących w skład mikrośrodowiska. Wyniki prezentowanych badań pozostają w zgodności

z powyższymi doniesieniami.

W badaniach nad rakiem jelita grubego stwierdzono, że 15-LOX ma właściwości supresyjne i zmniejsza angiogenezę, a zwiększenie jego ekspresji poprawia rokowanie i zmniejsza neowaskularyzację nowotworową (Tunçer i in., 2017), dlatego też obserwuje się spadek ekspresji tego białka w miarę postępu procesu nowotworowego i wzrostu stopnia złośliwości histologicznej zmian. W ewaluacji raka jasnokomórkowego nerki także przeanalizowano zmiany 15-LOX w komórkach nowotworowych i wykazano wyższy poziom ekspresji białek na początku choroby, który następnie malał w miarę jej postępu (Gohara i in., 2012). W badaniach nad rakiem piersi również stwierdzono zmniejszoną ekspresję 15-LOX w komórkach nowotworowych, z najniższym jej poziomem u pacjentów w najwyższym stadium choroby nowotworowej, czyli tych, u których wystąpiły już przerzuty odległe (Jiang i in., 2006). Kolejne doniesienia potwierdziły spadek ekspresji 15-LOX wraz z rozwojem choroby nowotworowej gruczołu piersiowego (Sak i in., 2016). Podobne wyniki zaobserwowano również w przypadku raka pęcherza moczowego, w którym wskazano na istnienie ujemnej korelacji pomiędzy ekspresją 15-LOX w komórkach nowotworowych a stopniem zaawansowania nowotworu (Philips i in., 2008). W przedstawianej pracy również zaobserwowano spadek ekspresji 15-LOX wraz ze wzrostem stopnia złośliwości guza, jednakże w komórkach nacieku zapalnego, możliwości interpretacji i porównanie z istniejącymi badaniami w tym zakresie są więc ograniczone.

Ponadto w literaturze pojawiły się także doniesienia o spadku poziomu ekspresji 15-LOX wraz z postępowaniem rozwoju guza i o jego reekspresji jako czynnika poprawiającym rokowanie u pacjentów, tym samym wskazując na ważną funkcję badanej lipooksygenazy na przebieg procesu nowotworzenia (Hennig i in., 2007).

Należy jednak zauważyć, że istnieją również publikacje na temat nadekspresji 15-LOX w niektórych nowotworach, np. gruczolakoraku prostaty (O'Flaherty i in., 2012) i trwają już badania nad lekami osłabiającymi działanie lipooksygenaz (Aghasizadeh i in., 2022).

Przegląd literatury dostarcza wielu informacji na temat ekspresji 15-LOX, jednakże analizy dokonywane były głównie w aspekcie ekspresji tego białka w komórkach nowotworowych, natomiast źródeł mówiących o jego roli

w mikrośrodowisku jest niewiele (Colby i in., 2018; Tian i in., 2017). Wydaje się, że szczególnie ważnym jest stwierdzenie ekspresji 15-LOX w makrofagach M2 i jej braku w makrofagach M1 (Ebert i in., 2020; Weigert i in., 2018). Wykazano, że zaburzony stosunek makrofagów M1 do M2 towarzyszy chorobie nowotworowej. Do transformacji makrofagów z formy M1 do formy M2 potrzebny jest ich kontakt z IL-4 i IL-13, w wyniku czego dochodzi również do wzmożonej ekspresji 15-LOX (Heydeck i in., 1998; Kapralov i in., 2020). Dotychczasowe badania glejaków wykazały istnienie ujemnej korelacji pomiędzy stopniem złośliwości histologicznej guza a liczbą makrofagów M1 oraz istnienie dodatniej korelacji pomiędzy stopniem złośliwości histologicznej a liczbą makrofagów M2 (Y. Zhu i in., 2022). Pomimo danych literaturowych wskazujących na wzrost liczby makrofagów M2 wraz ze wzrostem stopnia złośliwości histologicznej (Y. Zhu i in., 2022) i wzmożonej ekspresji 15-LOX w tychże komórkach (Heydeck i in., 1998; Kapralov i in., 2020) w prezentowanej pracy nie zaobserwowano wzrostu immunoekspresji 15-LOX w guzach o wyższym stopniu złośliwości histologicznej, co może sugerować złożoność procesu i wpływ także innych czynników.

W literaturze odnaleziono doniesienia na temat wpływu komórek nowotworowych na ekspresję białka 15-LOX w makrofagach, wchodzących w skład mikrośrodowiska nowotworu. W celu wykazania obecności interakcji pomiędzy TAMs a guzem przeprowadzono badanie na liniach komórkowych nowotworów nabłonkowych i stwierdzono istnienie modulacji profilu ekspresji enzymów odpowiedzialnych za metabolizm lipidowy przez czynniki produkowane przez komórki nowotworowe. Ukazano istnienie trendu wzrostowego w ekspresji 15-LOX w makrofagach M2 po kontakcie z komórkami guza (Werner i in., 2020).

W przypadku raka piersi ujawniono wiele istotnych informacji na temat roli mikrośrodowiska guza i samych makrofagów - obecność makrofagów związanych z nowotworem sprzyja inwazji, angiogenezie oraz zwiększa ryzyko przerzutów poprzez produkcję wspierających proliferację cytokin (Soysal i in., 2015). TAMs są związane z wyższym stopniem złośliwości histologicznej i wiążą się z gorszym rokowaniem. Ich liczba w nowotworach takich jak rak żołądka, piersi czy płuc zwiększa się wraz z progresją choroby (Hinshaw & Shevde, 2019), a ponadto ściśle wiąże się z nasileniem angiogenezy i liczbą samych naczyń krwionośnych.

W ośrodkowym układzie nerwowym liczba makrofagów i komórek mikrogleju wzrasta wraz ze stopniem złośliwości guza. Komórki te wydzielają cytokiny, które rekrutują limfocyty do centrum, co także zwiększa ich ilość (Gieryng i in., 2017; Y. Zhu i in., 2022). Udowodniono także wpływ obniżonej ekspresji 15-LOX w makrofagach na oporność komórek nowotworowych na stosowane leczenie i ich resensytyzację po zwiększeniu tej ekspresji (Kazan i in., 2020; Tsai i in., 2022).

Tego typu badanie przeprowadzane było również w raku jelita grubego, gdzie stosunek makrofagów M1 do M2 okazał się być przesunięty na korzyść makrofagów M2 (15-LOX+). Udokumentowano również, że w prawidłowej błonie śluzowej stosunek ten jest odwrotny (Isidro & Appleyard, 2016). Dowodzi to istnienia dynamicznych zmian liczby makrofagów 15-LOX(+) podczas rozwoju choroby nowotworowej. Przeprowadzenie dodatkowych ewaluacji obejmujących korelację pomiędzy liczbą makrofagów M2 i ekspresją 15-LOX w tych komórkach w grupie glejaków, wydaje się naturalną kontynuacją prezentowanych badań i interesującym projektem o potencjalnych implikacjach klinicznych.

W przedstawianej pracy ujawniono, że stosunek liczby komórek 15-LOX(+) do liczby komórek nowotworowych był wyższy w glejakach rozlanych innych niż glejak wielopostaciowy (*adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant*) niż w samym glejaku wielopostaciowym (*glioblastoma, IDH-wildtype*). Wykazano również zgodny z powyższym znaleziskiem trend w liczbie komórek 15-LOX(+) w obrębie guza, która okazała się być najmniejsza w glioblastoma. Ponadto trend ten zaobserwowano również w bezpośrednim otoczeniu guza.

Prezentowane badanie jest jednym z bardzo nielicznych, oceniających ekspresję 15-LOX w komórkach nacieku zapalnego w obrębie mikrośrodowiska guza. Nie odnaleziono niestety prac, bezpośrednio mówiących o ekspresji 15-LOX w komórkach nienowotworowych w obrębie guzów ośrodkowego układu nerwowego, co ogranicza możliwości interpretacji i porównania uzyskanych wyników.

W literaturze, zarówno w guzach IDH-mutant jak i IDH-wildtype, makrofagi M2 to najliczniejsza grupa komórek nienowotworowych. Badania wskazują, że ich liczba jest bardzo dobrym czynnikiem prognostycznym, specyficznym dla glejaków (Mehani i in., 2022), stąd analiza ekspresji różnorodnych białek w tych komórkach może wnieść wiele nowych informacji na temat biologii tych

nowotworów i roli w niej mikrośrodowiska.

Należy zwrócić uwagę, że liczba makrofagów M2, będących jedynymi komórkami w obrębie mikrośrodowiska nowotworów OUN, w których ekspresji ulega 15-LOX zwiększa się wraz z postępem choroby i wzrostem stopnia złośliwości histologicznej guza. W prezentowanym badaniu nie stwierdzono jednak dodatkowej korelacji pomiędzy immunoekspresją 15-LOX a stopniem złośliwości histologicznej guza, co generuje pytanie w jakim mechanizmie dochodzi do jej obniżenia przy jednoczesowym wzroście makrofagów M2 i czy w przyszłości może to stanowić przydatną informację w aspekcie progresji zmian.

W literaturze podaje się kilka potencjalnych przyczyn obniżenia ekspresji 15-LOX w glioblastoma w porównaniu do glejaków rozlanych innych niż glejak wielopostaciowy, jednakże mechanizmy odpowiadające za te procesy są bardzo złożone, a analiza tych procesów nie jest zakończona.

Do wyjaśnienia tego zjawiska mogłaby posłużyć współczesna wiedza na temat interleukin. IL-4 i IL-13 są enzymami, powodującymi transformację makrofagów M1 do makrofagów M2 i jednocześnie jedynymi znanymi aktywatorami ekspresji 15-LOX w makrofagach, bez których nie ma możliwości inicjacji tego procesu. W literaturze pojawia się wiele informacji na temat obecności i roli interleukin 4 i 13 w glejaku wielopostaciowym. Pojawiają się prace sugerujące ich powiązanie z przekaźnikiem sygnału i aktywatorem transkrypcji STAT6 w patogenezie glejaka wielopostaciowego (Ruan i in., 2011), a mechanizm regulacji ekspresji białka przez TAMs wydaje się być od niego zależny, gdyż przy upośledzeniu jego działania, nawet po podaniu egzogennych interleukin nie dochodzi do wzrostu ekspresji 15-LOX (Ackermann i in., 2017; Heydeck i in., 1998). Ponadto pojawiają się artykuły, wskazujące na istnienie zmian genetycznych w receptorach dla IL-4 i IL-13 w glejakach o wyższym stopniu złośliwości histologicznej (Shimamura i in., 2006). Wykazano, że ekspresja receptora IL-13R α 2, mającego duże powinowactwo do IL-13, jest zwiększona w przypadku glejaków o wyższym stopniu złośliwości histologicznej (Mintz i in., 2002), co inhibituje wpływ interleukiny na makrofagi i obniża ekspresję 15-LOX. W glejaku wielopostaciowym wyciszenie receptora IL-13R α 2 doprowadza do reekspresji 15-LOX, do redukcji rozmiarów guza i wzmożonej apoptozy komórek nowotworowych. Stwierdzono, że glejaki wielopostaciowe charakteryzują się występowaniem znaczącej liczby IL-13R α 2 (Joshi i in., 2000),

które to receptory poprzez związanie z IL-13 hamują szlak IL-13-zależny, co z kolei powoduje spadek ekspresji 15-LOX i jej metabolitów, które w normalnych warunkach, poprzez PPAR-gamma inhibują wzrost guza, indukując apoptozę komórek nowotworowych (Hsi i in., 2011). Nadekspresja receptora IL-13R α 2 stwierdzana jest w aż 78% przypadków glejaków wielopostaciowych (Bhardwaj i in., 2018). W glejaku wielopostaciowym udokumentowano, że komórki mimo zachowanej prawidłowej funkcji szlaków sygnałowych nie reagowały na zastosowane egzogennych IL-4 i IL-13. Przypuszczalną przyczyną tego zjawiska była właśnie ekspresja białka przezłonowego IL-13R α 2, wiążącego interleukiny i inhibującego aktywację STAT6 (Rahaman i in., 2002), a tym samym obniżającego ekspresję 15-LOX. Dla pełnego poznania tego mechanizmu należałoby jednocześnie oznaczyć liczbę receptorów IL-13R α 2, stężenie IL-13, liczbę makrofagów M2, ekspresję 15-LOX oraz ich zmianę w czasie, badania takie mogłyby stanowić kolejny potencjalny kierunek ewaluacji rozpoczętych w prezentowanej rozprawie.

W przedstawionych badaniach stwierdzono niezwykle interesujący trend wiążący ekspresję 15-LOX w TAMs z płcią. Liczba komórek 15-LOX(+) była większa u mężczyzn, zarówno w obrębie guza jak i w jego otoczeniu. W literaturze odnajdujemy badania na temat różnic w poziomie ekspresji lipooksygenaz u kobiet i u mężczyzn. W badaniach na zwierzętach (myszach) stwierdzono wyższy poziom 15-LOX u samców tego gatunku. Wyrównywał się on po orchidektomii, co wskazywałoby na dodatnią korelację pomiędzy poziomem męskich hormonów płciowych a ekspresją 15-LOX (Troisi i in., 2022). W innych badaniach również wskazano, że poziom eikozanoidów, produkowanych między innymi przy udziale lipooksygenaz również różni w zależności od płci, na co wpływ ma zarówno poziom estrogenów jak i androgenów (Gautam i in., 2019; Gerges & El-Kadi, 2022). Nie odnaleziono ewaluacji sugerujących bezpośredni wpływ płci na ekspresję 15-LOX w komórkach nowotworowych lub komórkach nienowotworowych mikrośrodowiska nowotworu, ale ujawnienie takiego trendu w przedstawianej pracy może wskazywać na potrzebę zgłębienia takiego zjawiska.

W prezentowanych badaniach stwierdzono również wystąpienie trendu dotyczącego różnicy w liczbie komórek 15-LOX(+) w otoczeniu nowotworu pomiędzy płatem skroniowym a czołowym. Większa liczba makrofagów

15-LOX(+) stwierdzana była w płacie skroniowym. W literaturze zmiany w liczbie makrofagów 15-LOX(+) w zależności od struktur anatomicznych OUN opisano tylko w przypadku chorób neurodegeneracyjnych. W przebiegu choroby Alzheimera dochodzi do zwiększenia liczby makrofagów M2, za czym idzie również zwiększenie ekspresji 15-LOX. Opisano, że poziom ekspresji białka oraz stężenie substancji, powstającej w wyniku jego działania, w obrębie struktur OUN były wyższe właśnie w płacie skroniowym niż czołowym (Praticò i in., 2004). Dokładne określenie zależności pomiędzy lokalizacją a reaktywnością makrofagów w kierunku ekspresji 15-LOX w patologiach OUN wymaga dodatkowych badań.

Drugim z badanych w przedstawianej rozprawie markerów było białko LCA ulegające ekspresji w obrębie powstających obwodowo jądrzastych komórek szpikopochodnych. Do ich rekrutacji do miejsca nowotworzenia dochodzi za sprawą różnorodnych czynników chemicznych, produkowanych przez guz oraz okoliczne komórki nienowotworowe w okresie inicjacji. Mikrośrodowisko nowotworowe jest bardzo zróżnicowane i wraz z upływem czasu podlega zmianom, a jego analiza pozwala lepiej zrozumieć zaawansowane procesy, towarzyszące kancerogenezie. W literaturze jest ono określane mianem miecza obosiecznego, ponieważ w zależności od zaawansowania choroby i stężenia chemokin nań działających, pełni rolę zarówno supresorową w stosunku do nowotworu, jak i promującą wzrost guza (S. Zuo i in., 2020)

W prezentowanym badaniu wykazano zróżnicowanie ekspresji LCA i zauważono, że liczba komórek LCA(+) wzrasta ze wzrostem stopnia złośliwości histologicznej guza, osiągając najwyższe wartości w guzach o czwartym stopniu złośliwości histologicznej. Stwierdzono istotne statystycznie różnice w liczbie komórek LCA(+) pomiędzy guzami o pierwszym i czwartym, drugim i czwartym oraz trzecim i czwartym stopniu złośliwości histologicznej. Ponadto wykazano również zróżnicowanie stosunku liczby komórek LCA(+) do liczby komórek nowotworowych, który to rósł wraz ze wzrostem stopnia złośliwości histologicznej guza. Istotna statystycznie różnica obserwowana była pomiędzy nowotworami o drugim i czwartym oraz o trzecim i czwartym stopniu złośliwości histologicznej.

W literaturze odnaleziono wiele odniesień, dotyczących związku pomiędzy liczbą komórek szpikopochodnych a progresją i stopniem złośliwości histologicznej nowotworów. W raku jelita grubego duża liczba komórek nacieku

zapalnego wiązała się z niższym stadium zaawansowania choroby i lepszym rokowaniem (X. Zhang i in., 2020). Podobne spostrzeżenia poczynione zostały na przykładzie czerniaków skóry (R. Huang i in., 2020). W badaniach nad nowotworami głowy i szyi również stwierdzono, że zmiany w liczbie komórek nacieku zapalnego w obrębie mikrośrodowiska mają związek ze stadium choroby nowotworowej i przekładają się na rokowanie. Badacze zauważyli, że w dużej mierze mają one związek z zaburzeniami molekularnymi. Guzy, w których wykrywane były mutacje w obrębie genu TP53 prezentowały mniejszą liczbę komórek nacieku zapalnego, natomiast te ze zmianami w genie HRAS - większą. Chorzy z większą liczbą komórek nacieku zapalnego w mikrośrodowisku guza odznaczyli się lepszym rokowaniem (Lyu i in., 2019). Świadczy to o tym, jak silny jest związek pomiędzy funkcjonowaniem nowotworu a obecnością i liczbą komórek nacieku zapalnego i jak ważny jest w aspekcie rokowania i leczenia.

W literaturze podaje się, że w przypadku 11 na 32 badanych nowotworów liczba komórek układu odpornościowego w mikrośrodowisku nowotworu ma znaczenie prognostyczne. Stwierdzono, że w raku nadnerczy, szyjki macicy, dróg żółciowych, raku płaskonabłonkowym głowy i szyi, wątrobowokomórkowym, raku gruczołowym płuc oraz w mięśniakach i czerniakach skóry wpływ obecności tych komórek był pozytywny. Natomiast w przypadku glejaka wielopostaciowego, glejaków o niższym stopniu złośliwości i czerniaka oka - wpływ liczby komórek szpikopochodnych na rokowanie był negatywny (S. Zuo i in., 2020). Według autora liczba komórek nacieku zapalnego w glejakach wzrasta wraz ze wzrostem stopnia złośliwości histologicznej, tak, jak w prezentowanej pracy. Ponadto, wydaje się, że nie tylko liczba, lecz również udział procentowy poszczególnych komórek będących komponentą nacieku zapalnego ma znaczenie prognostyczne (S. Zuo i in., 2020). Uzupełnienie przedstawionych badań o analizę udziału procentowego poszczególnych komórek i obserwacja potencjalnych zmian składu komórkowego wraz ze wzrostem stopnia złośliwości histologicznej mogłaby być bardzo cenna i wykazywać wartość praktyczną.

W badaniach nad liczbą komórek nacieku zapalnego w grupie glejaków zaobserwowano zwiększanie się liczby komórek nacieku zapalnego LCA(+) wraz z progresją nowotworu (Müller i in., 2015). Kolejne badania potwierdziły, że liczba komórek szpikopochodnych LCA(+) rośnie wraz ze stopniem złośliwości nowotworu, a wyjątkowo licznie są one reprezentowane w glioblastoma

(Brandenburg i in., 2017; A. R. Kim i in., 2021). Wyniki otrzymane w przedstawionym badaniu pozostają w zgodności z tymi doniesieniami .

Dodatkowo w piśmiennictwie wykazano różnicę pomiędzy naciekiem zapalnym w nowotworach o niższym stopniu złośliwości (grade 2 i 3) i wyższym stopniu złośliwości (grade 4). Udowodniono, że łączna liczba komórek szpikopochodnych jest wyższa w guzach o wyższym stopniu złośliwości histologicznej, co zostało również wykazane w niniejszym badaniu. Ponadto udokumentowano w literaturze istnienie ujemnej korelacji pomiędzy liczbą komórek nacieku zapalnego a rokowaniem. Głównymi składnikami nacieku zapalnego w cytowanej pracy były makrofagi, limfocyty T i komórki dendrytyczne. Według autorów ujawniony związek może wynikać ze zwiększonej ilości chemokin prozapalnych, zwiększonej ekspresji immunostymulatorów oraz wzmożonej prezentacji antygenów w obrębie guzów o czwartym stopniu złośliwości histologicznej (Xiao i in., 2021).

W piśmiennictwie pojawia się stwierdzenie, że w glejakach wielopostaciowych liczba komórek LCA(+) może być czynnikiem prognostycznym, ponieważ przypadki z większą łączną liczbą komórek nacieku zapalnego charakteryzowały się gorszym rokowaniem (S. Zuo i in., 2020). Ponadto, czas przeżycia chorych z glejakiem wielopostaciowym jest dłuższy, gdy liczba komórek szpikopochodnych jest mniejsza (Jia i in., 2018). Dodatkowo stwierdzono, że liczba szpikopochodnych komórek może wzrastać po chemioterapii, promując angiogenezę co może tłumaczyć wzrost guza po zakończonym leczeniu (Fremder i in., 2014). Zjawisko gorszego rokowania w glejakach o wyższym stopniu złośliwości histologicznej nie jest jednak do końca wyjaśnione. Prawdopodobnym jest, że rekrutacja szpikopochodnych komórek nacieku zapalnego i ich następcza modyfikacja wynikają z wpływu samego nowotworu, kreującego mikrośrodowisko zapewniające optymalny wzrost i rozwój komórek nowotworowych i będącego swoistą ochroną przed antynowotworową odpowiedzią organizmu (Bryukhovetskiy i in., 2016). W praktyce, w procesie terapeutycznym wydaje się to informacją kluczową, która oznacza rozważenie modyfikacji terapii w kierunku supresji a nie rekrutacji komórek nacieku zapalnego.

W badaniach nad glejakiem wielopostaciowym dowiedziono już, że w warunkach hipoksji nadekspresji ulegają geny kodujące białka prozapalne

i rekrutujące komórki nacieku zapalnego do miejsca kancerogenezy. Występowanie hipoksji w glejakiach jest bardzo dobrze udokumentowane i ma duży wpływ na rozwój i postęp choroby (Tafari i in., 2011), co w świetle informacji o roli komórek LCA(+) wyjaśniałoby obecność większej liczby komórek szpikopochodnych w glejakiach wielopostaciowych niż w glejakiach o niższym stopniu złośliwości histologicznej.

W przedstawionych badaniach również wykazano, że liczba komórek LCA(+) była wyższa w glejaku wielopostaciowym (*glioblastoma, IDH-wildtype*) niż w glejakiach rozlanych innych niż glejak wielopostaciowy (*adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant*) oraz glejakiach włosowatokomórkowych (*pilocytic astrocytoma*). Ponadto, stosunek liczby komórek LCA(+) do liczby komórek nowotworowych był wyższy w glejaku wielopostaciowym (*glioblastoma, IDH-wildtype*) niż w glejakiach rozlanych innych niż glejak wielopostaciowy (*adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant*).

Bieżąca zmiana klasyfikacji WHO nowotworów ośrodkowego układu nerwowego niestety ogranicza jednoznaczną interpretację wyników prezentowanych badań jak i możliwości ich porównania z danymi literaturowymi odnoszącymi się do uprzedniego podziału. Dokonano więc analizy dotyczącej głównej różnicy pomiędzy dwoma analizowanymi grupami tj. glejakiem wielopostaciowym (*glioblastoma, IDH-wildtype*) i glejakami rozlany innymi niż glejak wielopostaciowy (*adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant*), jaką jest obecność mutacji IDH.

W literaturze opisano, że występowanie mutacji IDH ma wpływ na liczbę komórek nacieku zapalnego LCA(+). Liczba ta jest większa w guzach IDH-wildtype. Wynik taki uzyskano także w prezentowanej pracy. Ponadto w piśmiennictwie wskazano, że obecność mutacji w genach IDH jest związana ze zmniejszoną chemotaksją leukocytów, mającą wpływ na mniejszą gęstość nacieku zapalnego w obrębie guza, co ze względu na immunosupresyjny charakter mikrośrodowiska glejaków jest pozytywnym czynnikiem prognostycznym. Według autorów jest to jedna z prawdopodobnych przyczyn lepszego rokowania u chorych z guzami IDH-mutant (Amankulor i in., 2017).

Ponadto odnaleziono badanie opisujące istnienie korelacji pomiędzy guzami IDH-wildtype, dużą liczbą komórek LCA(+) w mikrośrodowisku nowotworu i złym rokowaniem (N. Zhang i in., 2021). W prezentowanej pracy

również zaobserwowano taki związek.

W literaturze ukazano, że liczba komórek LCA(+) w glejakach, zarówno w guzach IDH-mutant jak i IDH-wildtype jest większa w porównaniu do tkanki prawidłowej. Wykazano także, że liczba komórek LCA(+) wraz z ich procentową zawartością w obrębie guza jest większa w guzach IDH-wildtype (Klemm i in., 2020). Guzy o genotypie IDH-wildtype cechują się zwiększoną liczbą komórek szpikopochodnych, zwłaszcza makrofagów oraz limfocytów T w stosunku do guzów o genotypie IDH-mutant (Friebel i in., 2020), co również zaobserwowano w przedstawionej pracy.

Według źródeł literaturowych, w obrębie nowotworów IDH-mutant dochodzi do produkcji R-2-hydroksyglutaratu, który wywiera negatywne działanie na komórki nowotworowe i ich mikrośrodowisko, co potencjalnie może się wiązać z mniejszą liczbą komórek LCA(+) w guzach o tym genotypie niż w guzach IDH-wildtype. Makrofagi ulegają przemianie do swojej immunosupresyjnej wersji M2 i w efekcie inhibują rekrutację innych komórek LCA(+), w tym głównie limfocytów, co wyjaśniałoby stwierdzaną mniejszą ich liczbę w guzach o genotypie IDH-mutant. Ponadto zauważono wpływ R-2-hydroksyglutaratu na katabolizm tryptofanu w komórkach linii mieloidalnej i wpływ na ich różnicowanie poprzez aktywację alternatywnych szlaków dojrzewania (Dierendonck i in., 2021; Friedrich i in., 2021). Dodatkowo metylacja genów w komórkach szpikopochodnych, aktywowana przez obecność mutacji w genach IDH, wpływa na represję genów odpowiedzialnych za rekrutację komórek nacieku zapalnego i indukcję odpowiedzi immunologicznej (Amankulor i in., 2017; De Leo i in., 2020).

Większa liczba komórek LCA(+) w glejaku wielopostaciowym niż w glejakach rozlanych innych niż glejak wielopostaciowy oraz glejakach włosowatokomórkowych może mieć również związek z tym, że glejaki wielopostaciowe są nowotworami o wyższym stopniu złośliwości histologicznej i w związku z tym, zgodnie z przedstawionymi powyżej danymi mają większą liczbą komórek LCA(+) w swoim mikrośrodowisku. Ponadto, odnaleziono badania, zgodnie z którymi stopień infiltracji przez limfocyty T oraz makrofagi był wyższy w glejakach wielopostaciowych niż w glejakach włosowatokomórkowych zarówno w strefach okołonaczyniowych, jak i w centrum guza (Yang i in., 2011), to ostatnie znalezisko pokrywa się z obserwacjami w przedstawianej pracy.

W prezentowanych badaniach stwierdzono istnienie silnej dodatniej

korelacji pomiędzy liczbą komórek LCA(+) a indeksem Ki-67. Pozostaje to w zgodzie z literaturą, gdzie na przykładzie raka jelita grubego również wykazano istnienie silnej korelacji pomiędzy indeksem Ki-67 a liczbą komórek LCA(+) (Zadka i in., 2021). Dodatkowo, w przypadku glejaków, występowanie wyższego indeksu Ki-67 wiąże się również z wyższym stopniem histologicznym, którego związek z liczbą komórek LCA(+) został już wykazany. Wzrastająca liczba proliferujących komórek wraz ze zwiększającym się stopniem złośliwości histologicznej i agresywnością guza należy do fundamentalnych zjawisk w przebiegu choroby nowotworowej.

Dalsze badania ekspresji białek w komórkach mikrośrodowiska mogą poszerzyć wiedzę o nowotworzeniu i samym przebiegu choroby nowotworowej, dając nadzieję na ujawnienie nowego punktu uchwytu dla terapii celowanych (Hui & Chen, 2015; Soysal i in., 2015). Poszukiwania takie wydają się niezmiernie ważne, biorąc pod uwagę osiągnięcie przełomu w leczeniu różnych typów nowotworów np. w raku piersi poprzez wprowadzenie leków blokujących receptor HER2, czy w przewlekłej białaczce szpikowej dzięki zastosowaniu inhibitorów kinazy tyrozynowej. Znaczenie komórek szpikopochodnych w glejakach zostało już docenione, a wywieranie na nie wpływu już teraz wykorzystuje się jako jeden z elementów nowoczesnego leczenia celowanego np. w przypadku immunoterapii CAR-T, w której wywiera się wpływ na limfocyty T obecne w mikrośrodowisku guza (Hinshaw & Shevde, 2019). Dalsze badania, mające na celu analizę skomplikowanych mechanizmów oddziaływania komórek nowotworowych i ich mikrośrodowiska mogą przysłużyć się do lepszego zrozumienia procesu nowotworzenia oraz przynieść potencjalne nowe czynniki prognostyczne, predykcyjne czy punkty uchwytu terapii celowanych, co w grupie glejaków niesie nadzieję na tak długo oczekiwaną zmianę rokowania i obniżenie śmiertelności .

Powstanie i rozwój nowotworu wiąże się ze zmianami metabolicznymi, a w ich aspekcie szczególnie ważne wydają się badania nad stosunkiem izotopów stabilnych węgla i azotu, ze względu na obecność tych pierwiastków w związkach biorących udział w wielu procesach związanych ze wzrostem i proliferacją komórek (Tea i in., 2021); a pomiary izotopowe przeprowadzane z wykorzystaniem izotopowej spektrometrii mas odznaczają się niezwykle precyzją, co stanowi bardzo dużą zaletę przy niewielkich ilościowo, lecz

znaczących dla biologii komórki - zmian.

W przedstawianych badaniach nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w składzie izotopowym azotu ani węgla pomiędzy guzem a otaczającymi tkankami. Ujawniono natomiast istnienie dodatnich korelacji między stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza, na jego obrzeżu oraz w tkankach otaczających. W literaturze znajdujemy informacje na temat badań izotopowych nowotworu i tkanek go otaczających, w których stwierdzono różnice w składzie izotopowym węgla $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ i azotu $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ pomiędzy guzem a tkankami prawidłowymi, ale nie bezpośrednim otoczeniem guza. Badacze ujawnili wzbogacenie węgla i zubożenie azotu w obrębie tkanki nowotworu. Według autorów potencjalną przyczyną zmian izotopowych w obrębie tkanek nowotworowych są zmiany metaboliczne w szlaku glutaminolizy i cyklu ornitynowego. W efekcie tych zmian z powodu wzmożonej aktywności cyklu moczniowego oraz proporcjonalnie mniejszego wydalania argininy zubożonej w ^{15}N dochodzi do ogólnego zubożenia materii organicznej w ^{15}N . Cykl moczniowy obejmuje również metabolizm wodorowęglanu (naturalnie wzbogaconego w ^{13}C), a zatem nagromadzenie argininy przyczynia się do wzbogacenia w ^{13}C w komórkach (Tea i in., 2016).

Można zauważyć, że ze względu na specyfikę badanego materiału i aspekty etyczne jego pozyskiwania w przypadku guzów OUN, trudne byłoby stworzenie grupy kontrolnej z niezmiennych patologicznie odległych od guza tkanek prawidłowych (wycinków mózgu), na wzór badań przeprowadzonych w raku piersi (wycinki z raka piersi i tkanki gruczołu z materiału pooperacyjnego), co uniemożliwia szczegółowe porównanie i odniesienie się do danych literaturowych. Uzyskane wyniki zwracają jednak uwagę na inny związek. W prezentowanych badaniach spostrzeżono silną ujemną korelację pomiędzy stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza a liczbą komórek 15-LOX(+) w obrębie zmiany. W literaturze odnaleziono informację na temat enzymów, odpowiedzialnych za syntezę i metabolizm lipidów i ich powiązanie ze stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Wykazano w nich mniejszą ilość enzymów syntezujących lipidy w tkankach nowotworowych niż nienowotworowych, a zmieniony metabolizm lipidowy wskazano jako jedną z wiodących przyczyn powstania różnic pomiędzy składem izotopowym tkanki prawidłowej i nowotworowej (Tea i in., 2016).

W przedstawianych badaniach stwierdzono istnienie istotnych statystycznie różnic pomiędzy stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum i na obrzeżu guza w zależności od płci. Wykazano, że stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ jest wyższy u kobiet niż u mężczyzn, zarówno w centrum jak i na obrzeżu guza. Nie odnaleziono danych literaturowych, oceniających zmiany stosunku izotopowego $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w tkance nowotworowej w zależności od płci, jednakże samo zróżnicowanie składu izotopowego węgla pomiędzy płciami w tkankach prawidłowych jest zjawiskiem znanym i szeroko udokumentowanym. Stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w dużej mierze zależy od diety. Dieta krajów zachodnich w ciągu ostatnich stuleci zmieniła się w kierunku zwiększonego spożycia węglowodanów oraz białek. Wywarło to wpływ na zwiększony stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Dieta bogata w produkty mięsne skutkuje podwyższonym stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w porównaniu do diety opartej na produktach pochodzenia roślinnego, dlatego z powodu przewagi diety mięsnej nad roślinną ilość cięższego izotopu węgla jest wyższa u mężczyzn niż u kobiet (Ehleringer i in., 2020; Petzke i in., 2005; Redfern i in., 2019). Jednakże w prezentowanych badaniach zależność była odwrotna, to w guzach powstałych w organizmach kobiet, ujawniono znamienne więcej ciężkich izotopów węgla.

W przedstawianych badaniach wykazano również, że stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza jest wyższy w guzach ośrodkowego układu nerwowego zlokalizowanych po prawej stronie linii pośrodkowej ciała niż w guzach ośrodkowego układu nerwowego zlokalizowanych po lewej stronie linii pośrodkowej ciała. Podobnie zaobserwowano istnienie trendu wskazującego na wyższy stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ także na obrzeżu guzów OUN zlokalizowanych po prawej stronie linii pośrodkowej ciała. Także i te wyniki nie znajdują wyjaśnienia w literaturze przedmiotu. Znaleźiska te są zastanawiające, ale podobnie jak kolejne opisane poniżej, na obecnym zupełnie początkowym etapie badań izotopowych nowotworów OUN nie mogą zostać w pełni wiarygodnie wyjaśnione, a jako jednostkowe mogą być także przypadkowe.

Odmienność guzów ośrodkowego układu nerwowego nie pozwoliła na przeprowadzenie analizy zmiany składu izotopowego w aspekcie jednego z wiodących w całej onkologii czynników rokowniczych jakim jest stopień zaawansowania klinicznego choroby (stage). W literaturze odnaleziono doniesienia na temat zmian w stosunku izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w guzie Wilmsa

w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego. Wykazano różnicę w stosunku izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ pomiędzy guzami o niższym stopniu zaawansowania klinicznego (stage 1,2) a guzami o wyższym stopniu zaawansowania klinicznego (stage 3,4,5). Stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ był wyższy w guzach o wyższym stopniu zaawansowania klinicznego (Taran, Frączek, Sikora-Szubert, i in., 2016). Podobnie w przypadku badań składu izotopowego azotu $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ w przebiegu choroby nowotworowej udokumentowano statystycznie istotne różnice pomiędzy kolejnymi stadiami z przełomem w momencie uogólniania się choroby nowotworowej (Taran, 2015). W guzie Wilmsa stwierdzono różnicę w stosunku izotopowym $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ pomiędzy guzami o niższym stopniu zaawansowania klinicznego (stage 1,2) a guzami o wyższym stopniu zaawansowania klinicznego (stage 3,4,5). Stosunek izotopowy $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ był wyższy w guzach o niższym stopniu zaawansowania klinicznego (Taran, Frączek, Sikora-Szubert, i in., 2016). Niestety znalezisk tych nie można wykorzystać, gdyż w przedstawionej pracy nie brano pod uwagę stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu, ze względu na brak oceny stajingu w przypadku nowotworów OUN.

W badaniach na modelu mysim glejaka wielopostaciowego opisano, że stosunek izotopowy $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ jest istotnie niższy w masie guza niż w tkankach otaczających (Straub i in., 2021). W raku piersi udokumentowano, że metabolizm związków azotu jest zmieniony w porównaniu z tkankami prawidłowymi, co pociąga za sobą zmiany w składzie izotopowym $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ (Tea i in., 2016). W *hepatoblastoma* oraz *rhabdomyosarcoma* obserwacja zmian składu izotopowego pozwoliła na powiązanie ich z rokowaniem - stosunek izotopowy $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ różnił się w zależności od typu histologicznego guza (Taran, Frączek, Sitkiewicz, i in., 2015, 2016). Prezentowane badanie nie ujawniło istnienia podobnych zależności, zaobserwowano natomiast istnienie dodatniej korelacji pomiędzy stosunkiem izotopowym $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ w centrum guza i na jego obrzeżu.

W procesie kancerogenezy metabolizm zarówno węgla jak i azotu zmienia się. Wykazano, że komórki nowotworowe mają wysokie zapotrzebowanie na azot, związane ze wzmożoną produkcją aminokwasów. W związku z tym dochodzi do zwiększenia wychwytu między innymi glutaminy, będącej donorem azotu przez komórki i w konsekwencji zwiększenia jego ilości w tkance nowotworowej (Pavlova & Thompson, 2016; Rivera i in., 1988).

W przedstawionym badaniu stwierdzono, że stosunek masowy N/C zarówno w centrum, na obrzeżu jak i w otoczeniu guza jest zróżnicowany i zmienia się w zależności od wielu zmiennych tj.: płci, lokalizacji guza względem linii pośrodkowej ciała, stopnia złośliwości histologicznej, lokalizacji guza względem struktur anatomicznych i rozpoznania histopatologicznego. W każdym z przypadków obserwuje się obniżanie wartości stosunku masowego N/C wraz z oddalaniem się od centrum guza. Wykazano, że stosunek masowy N/C jest wyższy w centrum guza niż na jego obrzeżu oraz w tkankach otaczających. Odkryto też zgodną z powyższymi wynikami dodatnią korelację pomiędzy stosunkiem masowym N/C w centrum guza i na obrzeżu guza.

W literaturze odnajdujemy doniesienia o wyższej elementarnej zawartości azotu w obrębie tkanki nowotworu niż w tkankach prawidłowych (Bayram i in., 2020). Efekt ten może być skutkiem obniżonego tempa przemian azotowych w komórce lub wyższej zawartości białek i aminokwasów w tkance nowotworowej. Badacze uważają za mało prawdopodobne, że zmiany te wynikają z charakteru diety lub odmienności osobniczych, przypisując je zaburzeniom metabolizmu komórek nowotworowych (Deshmukh i in., 2021; Krishnamurthy i in., 2017; Tea i in., 2016). Pojawiają się także bezpośrednie doniesienia, że stosunek masowy N/C w tkance nowotworowej jest wyższy niż tkanek prawidłowych (Straub i in., 2021). Nie odnaleziono prac, ukazujących różnice w stosunku masowym N/C pomiędzy różnymi strefami guza oraz tkankami otaczającymi guz, które ujawniono w prezentowanym badaniu, tj. większej wartości stosunku masowego N/C w centrum guza w porównaniu z jego obrzeżem i tkankami otaczającymi. Ponadto stwierdzono, że stosunek masowy N/C w guzach zlokalizowanych po prawej stronie linii pośrodkowej ciała był wyższy niż po stronie lewej. Nie odnaleziono literatury, z którą można by porównać otrzymane wyniki, widoczny jest jednak trend obniżania się wartości stosunku masowego N/C od centrum guza w kierunku otoczenia zmiany. Aby w pełni przeanalizować to zjawisko niezbędne byłoby pozyskanie materiału z niezmiennych patologicznie obszarów w coraz większej odległości od centrum nowotworu, co w przypadku guzów OUN potencjalnie mogłoby mieć miejsce w badaniu pośmiertnym.

Liczba prac dotyczących roli stabilnych izotopów węgla, azotu, tlenu i wodoru w procesach fizjologicznych wzrastała wykładniczo w ciągu ostatnich

trzech dekad (Michener & Lajtha, 2007, s. 22), a spektrometria mas jako metoda analityczna znalazła swoje zastosowanie także w medycynie. Jak każda metoda ma ona swoje zalety i ograniczenia. Szybkość pomiarów i niespotykana dokładność wyników czynią spektrometrię mas niezwykle wartościowym, pomimo że nadal mało dostępnym narzędziem. Jednakże istotnym jest pamiętać, że w celu uzyskania wiarygodnych pomiarów stosunków izotopów stabilnych, należy przestrzegać ściśle określonych zasad, systematyzujących postępowanie i mających na celu uniknięcie zanieczyszczenia próbek. Biorąc pod uwagę fakt, że wykorzystywany do badania materiał jest bardzo mały - około 2-3 mg zliofilizowanej substancji - każdy niepożądany element może w istotny sposób wpłynąć na wynik oznaczeń (Ben-David & Flaherty, 2012). Należy także wziąć pod uwagę, że badanie izotopów trwałych jest dużo bardziej problematyczne niż izotopów radioaktywnych (Kendall & McDonnell, 1998). W przypadku izotopów stabilnych nie można przyjąć jednej stałej wartości odnoszącej się do procesów frakcjonowania izotopowego, lecz trzeba ją ustalać osobno dla każdej badanej próbki (K. A. Hobson & Clark, 1992), biorąc pod uwagę wiele aspektów jak np. wpływ czynników środowiskowych czy diety (Fuller i in., 2005; Gaye-Siessegger i in., 2003, 2004; K. Hobson i in., 1993). Ponadto stosując standardowy spektrometr mas, uzyskujemy informacje dotyczące składu atomowego analizowanego materiału. W trakcie badania materiał traci swoją przestrzenną strukturę. Rozwiązaniem tego problemu jest wykorzystanie MALDI-IMS, która umożliwia identyfikację białka, wyizolowanego bezpośrednio z tkanki, przy jednoczesnym zachowaniu przestrzennej integralności próbki, co pozwala na uwzględnienie heterogenności materiału (Groseclose i in., 2007; Vaysse i in., 2017).

Spektrometria mas jest jedną z niewielu metod, oferujących możliwość badania nawet nanogramowych próbek (Gross, 2011), co wydaje się być szczególną zaletą w odniesieniu do tak trudnego do pozyskania i pozyskiwanego z jakże poważnymi konsekwencjami materiału z ośrodkowego układu nerwowego. Niestety pomiar składu izotopowego powoduje bezpowrotne zniszczenie próbki. Zazwyczaj nie stanowi to problemu w badaniach, ponieważ ilość wykorzystywanego materiału jest znikoma i przeznaczona w całości do tego konkretnego celu, jednakże w oznaczeniach o implikacjach klinicznych w onkologii może to być istotnym mankamentem.

Podsumowując, największą zaletą izotopowej spektrometrii mas w potencjalnych badaniach nowotworów ośrodkowego układu nerwowego wydaje się być możliwość uzyskania wiarygodnego wyniku oznaczeń z minimalnej w porównaniu ze standardowym badaniem histopatologicznym ilości materiału. Do ograniczeń praktycznego zastosowania prezentowanej metody należy przede wszystkim ograniczona dostępność aparatury oraz bezpowrotne zniszczenie materiału w procesie analitycznym.

Ustalenie składu izotopowego węgla i azotu w grupie glejaków ma na obecnym etapie zaawansowania badań izotopowych zmian nowotworowych charakter poznawczy i może przyczynić się do lepszego zrozumienia złożonej biologii tych zmian oraz roli procesów frakcjonowania izotopowego w chorobie nowotworowej.

Ocena składu izotopowego może również uzupełniać tak dynamicznie poszerzającą się obecnie wiedzę na temat mikrośrodowiska i otoczenia nowotworu oraz toczących się w nich procesów metabolicznych. Kontynuacja badań w tym obszarze może pomóc ujawnić potencjalne implikacje diagnostyczne i prognostyczne oznaczeń izotopowych.

6. Wnioski

1. W glejakiach, ekspresja białka 15-LOX, zarówno w guzie jak i jego otoczeniu, jest zróżnicowana. Immunoekspresja 15-LOX oraz stosunek liczby komórek 15-LOX(+) do liczby komórek nowotworowych maleją wraz ze wzrostem stopnia złośliwości histologicznej, a ponadto stosunek liczby komórek 15-LOX(+) do liczby komórek nowotworowych jest wyższy w glejakiach rozlanych innych niż glejak wielopostaciowy (*adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant*) niż w samym glejaku wielopostaciowym (*glioblastoma, IDH-wildtype*). Immunoekspresja LCA w komórkach mikrośrodowiska glejaków nie jest jednorodna. Zarówno liczba komórek LCA(+) jak i ich stosunek do liczby komórek nowotworowych są większe w guzach o wyższym stopniu złośliwości histologicznej. Ponadto liczba komórek LCA(+) oraz ich stosunek do liczby komórek nowotworowych są większe w glejaku wielopostaciowym (*glioblastoma, IDH-wildtype*) niż w glejakiach rozlanych innych niż glejak wielopostaciowy (*adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant*).
2. Ujawnione w badaniach zróżnicowanie ekspresji badanych białek pozostaje w znamienych statystycznie związkach z uznanymi czynnikami o znaczeniu prognostycznym tj. ze stopniem złośliwości histologicznej guza wg uprzedniej klasyfikacji oraz z typem histopatologicznym nowotworu w odniesieniu do nowej klasyfikacji, co pośrednio może wiązać ekspresję 15-LOX i LCA z rokowaniem. W kontekście wprowadzenia obowiązującego – molekularnego podłoża podziału guzów OUN wg najnowszej klasyfikacji WHO nie wydaje się by inne czynniki mogły być równorzędnymi odpowiednikami badań molekularnych w diagnostyce tych rozrostów, jednakże zróżnicowanie wartości ekspresji badanych białek pomiędzy typami histopatologicznymi wydaje się interesującym znaleziskiem, którego przyczyny mogłyby być przedmiotem dalszych badań.
3. Wartości stosunku izotopowego izotopów stabilnych azotu i węgla w badanych tkankach nowotworowych i ich otoczeniu nie różniły się istotnie. Jednakże stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza i na obrzeżu guza okazał się zależeć od płci (znamiennie wyższy u kobiet), a także od lokalizacji guza względem linii pośrodkowej ciała (znamiennie wyższy po stronie prawej). Znaleziska te są zastanawiające, ale jako tylko jednostkowe na obecnym zupełnie początkowym etapie badań izotopowych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego nie mogą zostać w pełni wiarygodnie wyjaśnione.
4. Największą zaletą izotopowej spektrometrii mas w potencjalnych badaniach guzów ośrodkowego układu nerwowego wydaje się być możliwość uzyskania wiarygodnego wyniku oznaczeń z minimalnej, w porównaniu ze standardowym badaniem histopatologicznym, ilości materiału. Do ograniczeń praktycznego zastosowania prezentowanej metody należy przede wszystkim niewielka dostępność aparatury oraz bezpowrotne zniszczenie materiału w procesie analitycznym.

7. Bibliografia i netografia

1. Abe, S., Sato, S., Aono, Y., Azuma, M., Kishi, M., Koyama, K., Takahashi, N., Kagawa, K., Kawano, H., & Nishioka, Y. (2020). Functional analysis of human fibrocytes derived from monocytes reveals their profibrotic phenotype through paracrine effects. *The Journal of Medical Investigation: JMI*, 67(1.2), 102–112. <https://doi.org/10.2152/jmi.67.102>
2. Ackermann, J. A., Hofheinz, K., Zaiss, M. M., & Krönke, G. (2017). The double-edged role of 12/15-lipoxygenase during inflammation and immunity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862(4), 371–381. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.07.014>
3. Aebersold, R., & Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422(6928), 198–207. <https://doi.org/10.1038/nature01511>
4. Aghasizadeh, M., Moghaddam, T., Bahrami, A. R., Sadeghian, H., Alavi, S. J., & Matin, M. M. (2022). 8-Geranyloxycarbostryl as a potent 15-LOX-1 inhibitor showed great anti-tumor effects against prostate cancer. *Life Sciences*, 293, 120272. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120272>
5. Ahmadipour, Y., Gembruch, O., Pierscianek, D., Sure, U., & Jabbarli, R. (2020). Does the expression of glial fibrillary acid protein (GFAP) stain in glioblastoma tissue have a prognostic impact on survival? *Neuro-Chirurgie*, 66(3), 150–154. <https://doi.org/10.1016/j.neuchi.2019.12.012>
6. Alcantara Llaguno, S. R., Chen, J., & Parada, L. F. (2009). Signaling in malignant astrocytomas: Role of neural stem cells and its therapeutic implications. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(23), 7124–7129. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0433>
7. Altin, J. G., & Sloan, E. K. (1997). The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunology and Cell Biology*, 75(5), 430–445. <https://doi.org/10.1038/icb.1997.68>
8. Amankulor, N. M., Kim, Y., Arora, S., Kargl, J., Szulzewsky, F., Hanke, M., Margineantu, D. H., Rao, A., Bolouri, H., Delrow, J., Hockenbery, D., Houghton, A. M., & Holland, E. C. (2017). Mutant IDH1 regulates the tumor-associated immune system in gliomas. *Genes & Development*, 31(8), 774–786. <https://doi.org/10.1101/gad.294991.116>
9. Angelucci, C., D'Alessio, A., Lama, G., Binda, E., Mangiola, A., Vescovi, A. L., Proietti, G., Masuelli, L., Bei, R., Fazi, B., Ciafrè, S. A., & Sica, G. (2018). Cancer stem cells from peritumoral tissue of glioblastoma multiforme: The possible missing link between tumor development and progression. *Oncotarget*, 9(46), 28116–28130. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25565>
10. Arneth, B. (2019). Tumor Microenvironment. *Medicina*, 56(1), 15. <https://doi.org/10.3390/medicina56010015>
11. Asara, J. M., Schweitzer, M. H., Freimark, L. M., Phillips, M., & Cantley, L. C. (2007). Protein sequences from mastodon and Tyrannosaurus rex revealed by mass spectrometry. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5822), 280–285. <https://doi.org/10.1126/science.1137614>
12. *Astrocytoma Tumors – Symptoms, Diagnosis and Treatments*. (2022, maj 1). <https://www.aans.org/en/Patients/Neurosurgical-Conditions-and-Treatments/Astrocytoma-Tumors>
13. Aubry, M., de Tayrac, M., Etcheverry, A., Clavreul, A., Saikali, S., Menei, P., & Mosser, J. (2015). From the core to beyond the margin: A genomic picture of glioblastoma intratumor heterogeneity. *Oncotarget*, 6(14), 12094–12109. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3297>
14. Baligar, P., Mukherjee, S., Kochat, V., Rastogi, A., & Mukhopadhyay, A. (2016). Molecular and Cellular Functions Distinguish Superior Therapeutic Efficiency of

- Bone Marrow CD45 Cells Over Mesenchymal Stem Cells in Liver Cirrhosis. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 34(1), 135–147. <https://doi.org/10.1002/stem.2210>
15. Batash, R., Asna, N., Schaffer, P., Francis, N., & Schaffer, M. (2017). Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and Treatment; Recent Literature Review. *Current Medicinal Chemistry*, 24(27), 3002–3009. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170516123206>
 16. Bayram, S., Fürst, S., Forbes, M., & Kempa, S. (2020). Analysing central metabolism in ultra-high resolution: At the crossroads of carbon and nitrogen. *Molecular Metabolism*, 33, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.12.002>
 17. Bell, E. H., Zhang, P., Fisher, B. J., Macdonald, D. R., McElroy, J. P., Lesser, G. J., Fleming, J., Chakraborty, A. R., Liu, Z., Becker, A. P., Fabian, D., Aldape, K. D., Ashby, L. S., Werner-Wasik, M., Walker, E. M., Bahary, J.-P., Kwok, Y., Yu, H. M., Laack, N. N., ... Chakravarti, A. (2018). Association of MGMT Promoter Methylation Status With Survival Outcomes in Patients With High-Risk Glioma Treated With Radiotherapy and Temozolomide: An Analysis From the NRG Oncology/RTOG 0424 Trial. *JAMA Oncology*, 4(10), 1405–1409. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.1977>
 18. Ben-David, M., & Flaherty, E. A. (2012). Stable isotopes in mammalian research: A beginner's guide. *Journal of Mammalogy*, 93(2), 312–328. <https://doi.org/10.1644/11-MAMM-S-166.1>
 19. Benson, S., Lennard, C., Maynard, P., & Roux, C. (2006). Forensic applications of isotope ratio mass spectrometry—A review. *Forensic Science International*, 157(1), 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.03.012>
 20. Bhardwaj, R., Suzuki, A., Leland, P., Joshi, B. H., & Puri, R. K. (2018). Identification of a novel role of IL-13R α 2 in human Glioblastoma multiforme: Interleukin-13 mediates signal transduction through AP-1 pathway. *Journal of Translational Medicine*, 16, 369. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1746-6>
 21. Bhavya, B., Anand, C. R., Madhusoodanan, U. K., Rajalakshmi, P., Krishnakumar, K., Easwer, H. V., Deepti, A. N., & Gopala, S. (2020). To be Wild or Mutant: Role of Isocitrate Dehydrogenase 1 (IDH1) and 2-Hydroxy Glutarate (2-HG) in Gliomagenesis and Treatment Outcome in Glioma. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 40(1), 53–63. <https://doi.org/10.1007/s10571-019-00730-3>
 22. Bilková, Z., Adámková, M., Albrecht, T., & Šimek, Z. (2019). Determination of testosterone and corticosterone in feathers using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, 1590, 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.12.069>
 23. Boriosi, J. P., Maki, D. G., Yngsdal-Krenz, R. A., Wald, E. R., Porter, W. P., Cook, M. E., & Bütz, D. E. (2014). Changes in breath carbon isotope composition as a potential biomarker of inflammatory acute phase response in mechanically ventilated pediatric patients. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 29(4), 599–605. <https://doi.org/10.1039/C3JA50331C>
 24. Boutton, T. W., Arshad, M. A., & Tieszen, L. L. (1983). Stable isotope analysis of termite food habits in East African grasslands. *Oecologia*, 59(1), 1–6. <https://doi.org/10.1007/BF00388065>
 25. Brandenburg, S., Turkowski, K., Mueller, A., Radev, Y. T., Seidlitz, S., & Vajkoczy, P. (2017). Myeloid cells expressing high level of CD45 are associated with a distinct activated phenotype in glioma. *Immunologic Research*, 65(3), 757–768. <https://doi.org/10.1007/s12026-017-8915-1>
 26. Brash, A. R., Boeglin, W. E., & Chang, M. S. (1997). Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(12), 6148–6152. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.12.6148>
 27. Brüstle, O., Ohgaki, H., Schmitt, H. P., Walter, G. F., Ostertag, H., & Kleihues, P. (1992). Primitive neuroectodermal tumors after prophylactic central nervous system irradiation in children. Association with an activated K-ras gene. *Cancer*,

- 69(9), 2385–2392. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19920501\)69:9<2385::AID-CNCR2820690929>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19920501)69:9<2385::AID-CNCR2820690929>3.0.CO;2-3)
28. Bryukhovetskiy, I. S., Dyuizen, I. V., Shevchenko, V. E., Bryukhovetskiy, A. S., Mischenko, P. V., Milkina, E. V., & Khotimchenko, Y. S. (2016). Hematopoietic stem cells as a tool for the treatment of glioblastoma multiforme. *Molecular Medicine Reports*, 14(5), 4511–4520. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5852>
 29. Bucci, M. K., Maity, A., Janss, A. J., Belasco, J. B., Fisher, M. J., Tochner, Z. A., Rorke, L., Sutton, L. N., Phillips, P. C., & Shu, H.-K. G. (2004). Near complete surgical resection predicts a favorable outcome in pediatric patients with nonbrainstem, malignant gliomas: Results from a single center in the magnetic resonance imaging era. *Cancer*, 101(4), 817–824. <https://doi.org/10.1002/cncr.20422>
 30. Buonfiglioli, A., & Hambarzumyan, D. (2021). Macrophages and microglia: The cerberus of glioblastoma. *Acta Neuropathologica Communications*, 9(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s40478-021-01156-z>
 31. Burnum, K. E., Cornett, D. S., Puolitaival, S. M., Milne, S. B., Myers, D. S., Tranguch, S., Brown, H. A., Dey, S. K., & Caprioli, R. M. (2009). Spatial and temporal alterations of phospholipids determined by mass spectrometry during mouse embryo implantation. *Journal of Lipid Research*, 50(11), 2290–2298. <https://doi.org/10.1194/jlr.M900100-JLR200>
 32. Burnum, K. E., Tranguch, S., Mi, D., Daikoku, T., Dey, S. K., & Caprioli, R. M. (2008). Imaging Mass Spectrometry Reveals Unique Protein Profiles during Embryo Implantation. *Endocrinology*, 149(7), 3274–3278. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0309>
 33. Caldwell, R. L., & Caprioli, R. M. (2005). Tissue profiling by mass spectrometry: A review of methodology and applications. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 4(4), 394–401. <https://doi.org/10.1074/mcp.R500006-MCP200>
 34. Cale, C. M., Klein, N. J., Novelli, V., Veys, P., Jones, A. M., & Morgan, G. (1997). Severe combined immunodeficiency with abnormalities in expression of the common leucocyte antigen, CD45. *Archives of Disease in Childhood*, 76(2), 163–164. <https://doi.org/10.1136/adc.76.2.163>
 35. Căpitănescu, B., Simionescu, C., Stepan, A., Mărgăritescu, C., Georgescu, C. V., & Roșu, A. (2010). CD20cy and CD45RO immunorexpression in early rheumatoid arthritis synovium. *Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine De Morphologie Et Embryologie*, 51(1), 49–54.
 36. Cappelle, D., Lai, F. Y., Covaci, A., Vermassen, A., Crunelle, C. L., Neels, H., & van Nuijs, A. L. N. (2018). Assessment of ethyl sulphate in hair as a marker for alcohol consumption using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*, 10(10), 1566–1572. <https://doi.org/10.1002/dta.2410>
 37. Carter, J. F., & Barwick, V. (2012). *Good Practice Guide For Isotope Ratio Mass Spectrometry*.
 38. Caruso, R., Pesce, A., & Wierzbicki, V. (2017). A very rare case report of long-term survival: A patient operated on in 1994 of glioblastoma multiforme and currently in perfect health. *International Journal of Surgery Case Reports*, 33, 41–43. <https://doi.org/10.1016/j.ijscr.2017.02.025>
 39. Caut, S., Angulo, E., & Courchamp, F. (2008). Discrimination factors ($\Delta^{15}\text{N}$ and $\Delta^{13}\text{C}$) in an omnivorous consumer: Effect of diet isotopic ratio. *Functional Ecology*, 22(2), 255–263. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2007.01360.x>
 40. Cazares, L. H., Troyer, D., Mendrinos, S., Lance, R. A., Nyalwidhe, J. O., Beydoun, H. A., Clements, M. A., Drake, R. R., & Semmes, O. J. (2009). Imaging mass spectrometry of a specific fragment of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase 2 discriminates cancer from uninvolved prostate tissue. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(17), 5541–5551. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2892>

41. Cerling, T. E., & Harris, J. M. (1999). Carbon isotope fractionation between diet and bioapatite in ungulate mammals and implications for ecological and paleoecological studies. *Oecologia*, 120(3), 347–363. <https://doi.org/10.1007/s004420050868>
42. Charapata, P., Horstmann, L., Jannasch, A., & Misarti, N. (2018). A novel method to measure steroid hormone concentrations in walrus bone from archaeological, historical, and modern time periods using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 32(23), 1999–2023. <https://doi.org/10.1002/rcm.8272>
43. Chaurand, P., DaGue, B. B., Pearsall, R. S., Threadgill, D. W., & Caprioli, R. M. (2001). Profiling proteins from azoxymethane-induced colon tumors at the molecular level by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Proteomics*, 1(10), 1320–1326. [https://doi.org/10.1002/1615-9861\(200110\)1:10<1320::AID-PROT1320>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/1615-9861(200110)1:10<1320::AID-PROT1320>3.0.CO;2-G)
44. Chaurand, P., Schwartz, S. A., Billheimer, D., Xu, B. J., Crecelius, A., & Caprioli, R. M. (2004). Integrating histology and imaging mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 76(4), 1145–1155. <https://doi.org/10.1021/ac0351264>
45. Chaurand, P., Schwartz, S. A., & Caprioli, R. M. (2002). Imaging mass spectrometry: A new tool to investigate the spatial organization of peptides and proteins in mammalian tissue sections. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6(5), 676–681. [https://doi.org/10.1016/s1367-5931\(02\)00370-8](https://doi.org/10.1016/s1367-5931(02)00370-8)
46. Chen, J., & Dahiya, S. M. (2020). Update on Circumscribed Gliomas and Glioneuronal Tumors. *Surgical Pathology Clinics*, 13(2), 249–266. <https://doi.org/10.1016/j.path.2020.02.004>
47. Chen, Y.-T., Tsai, C.-H., Chen, C.-L., Yu, J.-S., & Chang, Y.-H. (2019). Development of biomarkers of genitourinary cancer using mass spectrometry-based clinical proteomics. *Journal of Food and Drug Analysis*, 27(2), 387–403. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.09.005>
48. Chisholm, B. S., Nelson, D. E., & Schwarcz, H. P. (1982). Stable-carbon isotope ratios as a measure of marine versus terrestrial protein in ancient diets. *Science (New York, N.Y.)*, 216(4550), 1131–1132. <https://doi.org/10.1126/science.216.4550.1131>
49. Cho, Y., & Cohen, B. A. (2018). Dating igneous rocks using the Potassium-Argon Laser Experiment (KArLE) instrument: A case study for ~380 Ma basaltic rocks. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 32(20), 1755–1765. <https://doi.org/10.1002/rcm.8214>
50. Christians, A., Adel-Horowski, A., Banan, R., Lehmann, U., Bartels, S., Behling, F., Barrantes-Freer, A., Stadelmann, C., Rohde, V., Stockhammer, F., & Hartmann, C. (2019). The prognostic role of IDH mutations in homogeneously treated patients with anaplastic astrocytomas and glioblastomas. *Acta Neuropathologica Communications*, 7(1), 156. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0817-0>
51. Cimino, P. J., Kim, Y., Wu, H.-J., Alexander, J., Wirsching, H.-G., Szulzewsky, F., Pitter, K., Ozawa, T., Wang, J., Vazquez, J., Arora, S., Rabadan, R., Levine, R., Michor, F., & Holland, E. C. (2018). Increased HOXA5 expression provides a selective advantage for gain of whole chromosome 7 in IDH wild-type glioblastoma. *Genes & Development*, 32(7–8), 512–523. <https://doi.org/10.1101/gad.312157.118>
52. Clavreul, A., Etcheverry, A., Tétaud, C., Rousseau, A., Avril, T., Henry, C., Mosser, J., & Menei, P. (2015). Identification of two glioblastoma-associated stromal cell subtypes with different carcinogenic properties in histologically normal surgical margins. *Journal of Neuro-Oncology*, 122(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11060-014-1683-z>
53. Çolakoğlu, M., Tunçer, S., & Banerjee, S. (2018). Emerging cellular functions of the lipid metabolizing enzyme 15-Lipoxygenase-1. *Cell Proliferation*, 51(5), e12472. <https://doi.org/10.1111/cpr.12472>

54. Colby, J. K., Jaoude, J., Liu, F., & Shureiqi, I. (2018). Oxygenated lipid signaling in tumor-associated macrophages—Focus on colon cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, *37*(2), 289–315. <https://doi.org/10.1007/s10555-018-9743-z>
55. Cole, B. K., Lieb, D. C., Dobrian, A. D., & Nadler, J. L. (2013). 12- and 15-Lipoxygenases in Adipose Tissue Inflammation. *Prostaglandins & other lipid mediators*, *0*, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2012.07.004>
56. Corell, A., Carstam, L., Smits, A., Henriksson, R., & Jakola, A. S. (2018). Age and surgical outcome of low-grade glioma in Sweden. *Acta Neurologica Scandinavica*, *138*(4), 359–368. <https://doi.org/10.1111/ane.12973>
57. Corn, K. C., Windham, M. A., & Rafat, M. (2020). Lipids in the tumor microenvironment: From cancer progression to treatment. *Progress in Lipid Research*, *80*, 101055. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2020.101055>
58. Cui, X., Ma, C., Vasudevaraja, V., Serrano, J., Tong, J., Peng, Y., Delorenzo, M., Shen, G., Frenster, J., Morales, R.-T. T., Qian, W., Tsirigos, A., Chi, A. S., Jain, R., Kurz, S. C., Sulman, E. P., Placantonakis, D. G., Snuderl, M., & Chen, W. (2020). Dissecting the immunosuppressive tumor microenvironments in Glioblastoma-on-a-Chip for optimized PD-1 immunotherapy. *ELife*, *9*. <https://doi.org/10.7554/eLife.52253>
59. D'Alessio, A., Proietti, G., Lama, G., Biamonte, F., Lauriola, L., Moscato, U., Vescovi, A., Mangiola, A., Angelucci, C., & Sica, G. (2016). Analysis of angiogenesis related factors in glioblastoma, peritumoral tissue and their derived cancer stem cells. *Oncotarget*, *7*(48), 78541–78556. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12398>
60. Dallavalasa, S., Beeraka, N. M., Basavaraju, C. G., Tulimilli, S. V., Sadhu, S. P., Rajesh, K., Aliev, G., & Madhunapantula, S. V. (2021). The Role of Tumor Associated Macrophages (TAMs) in Cancer Progression, Chemoresistance, Angiogenesis and Metastasis—Current Status. *Current Medicinal Chemistry*, *28*(39), 8203–8236. <https://doi.org/10.2174/0929867328666210720143721>
61. Davis, M. E. (2018). Epidemiology and Overview of Gliomas. *Seminars in Oncology Nursing*, *34*(5), 420–429. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2018.10.001>
62. De Armas, R., Durand, K., Guillaudeau, A., Weinbreck, N., Robert, S., Moreau, J.-J., Caire, F., Acosta, G., Pebet, M., Chaunavel, A., Marin, B., Labrousse, F., & Denizot, Y. (2010). MRNA levels of enzymes and receptors implicated in arachidonic acid metabolism in gliomas. *Clinical Biochemistry*, *43*(10), 827–835. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.03.017>
63. De Leo, A., Ugolini, A., & Veglia, F. (2020). Myeloid Cells in Glioblastoma Microenvironment. *Cells*, *10*(1), 18. <https://doi.org/10.3390/cells10010018>
64. Delgado-López, P. D., & Corrales-García, E. M. (2016). Survival in glioblastoma: A review on the impact of treatment modalities. *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, *18*(11), 1062–1071. <https://doi.org/10.1007/s12094-016-1497-x>
65. Dempster, A. J. (1918). A new Method of Positive Ray Analysis. *Physical Review*, *11*(4), 316–325. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.11.316>
66. Deshmukh, R., Allega, M. F., & Tardito, S. (2021). A map of the altered glioma metabolism. *Trends in Molecular Medicine*, *27*(11), 1045–1059. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2021.07.011>
67. DeSouza, L. V., Grigull, J., Ghanny, S., Dubé, V., Romaschin, A. D., Colgan, T. J., & Siu, K. W. M. (2007). Endometrial carcinoma biomarker discovery and verification using differentially tagged clinical samples with multidimensional liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, *6*(7), 1170–1182. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600378-MCP200>
68. Di Meco, A., Li, J.-G., Blass, B. E., Abou-Gharbia, M., Lauretti, E., & Praticò, D. (2017). 12/15-Lipoxygenase Inhibition Reverses Cognitive Impairment, Brain Amyloidosis, and Tau Pathology by Stimulating Autophagy in Aged Triple

- Transgenic Mice. *Biological Psychiatry*, 81(2), 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.05.023>
69. Diamandis, E. P. (2004). Mass spectrometry as a diagnostic and a cancer biomarker discovery tool: Opportunities and potential limitations. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 3(4), 367–378. <https://doi.org/10.1074/mcp.R400007-MCP200>
 70. Diaz, R. J., Ali, S., Qadir, M. G., De La Fuente, M. I., Ivan, M. E., & Komotar, R. J. (2017). The role of bevacizumab in the treatment of glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology*, 133(3), 455–467. <https://doi.org/10.1007/s11060-017-2477-x>
 71. Dierendonck, X. A. M. H. van, Goede, K. E. de, & Bossche, J. V. den. (2021). IDH-Mutant Brain Tumors Hit the Achilles' Heel of Macrophages with R-2-Hydroxyglutarate. *Trends in Cancer*, 7(8), 666–667. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2021.06.003>
 72. Doi, H., Yurlova, N. I., Vodyanitskaya, S. N., Kikuchi, E., Shikano, S., Yadrenkina, E. N., & Zuykova, E. I. (2008). Parasite-induced changes in nitrogen isotope signatures of host tissues. *The Journal of Parasitology*, 94(1), 292–295. <https://doi.org/10.1645/GE-1228.1>
 73. Dunn, P., & Carter, J. F. (2018). *Good Practice Guide for Isotope Ratio Mass Spectrometry Second Edition 2018*.
 74. Ebert, R., Cumbana, R., Lehmann, C., Kutzner, L., Toewe, A., Ferreirós, N., Parnham, M. J., Schebb, N. H., Steinhilber, D., & Kahnt, A. S. (2020). Long-term stimulation of toll-like receptor-2 and -4 upregulates 5-LO and 15-LO-2 expression thereby inducing a lipid mediator shift in human monocyte-derived macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1865(9), 158702. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2020.158702>
 75. Ehleringer, J. R., Covarrubias Avalos, S., Tipple, B. J., Valenzuela, L. O., & Cerling, T. E. (2020). Stable isotopes in hair reveal dietary protein sources with links to socioeconomic status and health. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(33), 20044–20051. <https://doi.org/10.1073/pnas.1914087117>
 76. Eskilsson, E., Røslund, G. V., Solecki, G., Wang, Q., Harter, P. N., Graziani, G., Verhaak, R. G. W., Winkler, F., Bjerkvig, R., & Miletic, H. (2018). EGFR heterogeneity and implications for therapeutic intervention in glioblastoma. *Neuro-Oncology*, 20(6), 743–752. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox191>
 77. Esparragosa, I., Díez-Valle, R., Tejada, S., & Gállego Pérez-Larraya, J. (2018). Management of diffuse glioma. *Presse Medicale (Paris, France: 1983)*, 47(11-12 Pt 2), e199–e212. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2018.04.014>
 78. Fan, T. W. M., Lane, A. N., Higashi, R. M., Farag, M. A., Gao, H., Bousamra, M., & Miller, D. M. (2009). Altered regulation of metabolic pathways in human lung cancer discerned by (13)C stable isotope-resolved metabolomics (SIRM). *Molecular Cancer*, 8, 41. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-41>
 79. Faraday, M. (1834). VI. Experimental researches in electricity.-Seventh Series. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 124, 77–122. <https://doi.org/10.1098/rstl.1834.0008>
 80. Feltenmark, S., Gautam, N., Brunnström, Å., Griffiths, W., Backman, L., Edenius, C., Lindbom, L., Björkholm, M., & Claesson, H.-E. (2008). Eoxins are proinflammatory arachidonic acid metabolites produced via the 15-lipoxygenase-1 pathway in human eosinophils and mast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(2), 680–685. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710127105>
 81. Flenker, U. (2012). Isotope ratio mass spectrometry – history and terminology in brief. *Drug Testing and Analysis*, 4(12), 893–896. <https://doi.org/10.1002/dta.1399>
 82. Flinders, B., Cuypers, E., Porta, T., Varesio, E., Hopfgartner, G., & Heeren, R. M. A. (2017). Mass Spectrometry Imaging of Drugs of Abuse in Hair. *Methods in*

- Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1618, 137–147. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7051-3_12
83. Fremder, E., Munster, M., Aharon, A., Miller, V., Gingis-Velitski, S., Voloshin, T., Alishekevitz, D., Bril, R., Scherer, S. J., Loven, D., Brenner, B., & Shaked, Y. (2014). Tumor-derived microparticles induce bone marrow-derived cell mobilization and tumor homing: A process regulated by osteopontin. *International Journal of Cancer*, 135(2), 270–281. <https://doi.org/10.1002/ijc.28678>
 84. Friebel, E., Kapolou, K., Unger, S., Núñez, N. G., Utz, S., Rushing, E. J., Regli, L., Weller, M., Greter, M., Tugues, S., Neidert, M. C., & Becher, B. (2020). Single-Cell Mapping of Human Brain Cancer Reveals Tumor-Specific Instruction of Tissue-Invasive Leukocytes. *Cell*, 181(7), 1626–1642.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.055>
 85. Friedrich, M., Sankowski, R., Bunse, L., Kilian, M., Green, E., Ramallo Guevara, C., Pusch, S., Poschet, G., Sanghvi, K., Hahn, M., Bunse, T., Münch, P., Gegner, H. M., Sonner, J. K., von Landenberg, A., Cichon, F., Aslan, K., Trobisch, T., Schirmer, L., ... Platten, M. (2021). Tryptophan metabolism drives dynamic immunosuppressive myeloid states in IDH-mutant gliomas. *Nature Cancer*, 2(7), 723–740. <https://doi.org/10.1038/s43018-021-00201-z>
 86. Fry, B. (2007). Coupled N, C and S stable isotope measurements using a dual-column gas chromatography system. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21(5), 750–756. <https://doi.org/10.1002/rcm.2892>
 87. Fujita, K., & Nonomura, N. (2018). Urinary biomarkers of prostate cancer. *International Journal of Urology: Official Journal of the Japanese Urological Association*, 25(9), 770–779. <https://doi.org/10.1111/iju.13734>
 88. Fuller, B. T., Fuller, J. L., Sage, N. E., Harris, D. A., O'Connell, T. C., & Hedges, R. E. M. (2005). Nitrogen balance and delta15N: Why you're not what you eat during nutritional stress. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 19(18), 2497–2506. <https://doi.org/10.1002/rcm.2090>
 89. Gaberel, T., Gakuba, C., Zheng, Y., Lépine, M., Lo, E. H., & van Leyen, K. (2019). Impact of 12/15-Lipoxygenase on Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke*, 50(2), 520–523. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.022325>
 90. Gautam, Y., Afanador, Y., Abebe, T., López, J. E., & Mersha, T. B. (2019). Genome-wide analysis revealed sex-specific gene expression in asthmatics. *Human Molecular Genetics*, 28(15), 2600–2614. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz074>
 91. Gaye-Siessegger, J., Focken, U., Abel, H., & Becker, K. (2004). Dietary lipid content influences the activity of lipogenic enzymes in the liver and on whole body delta13C values of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 40(3), 181–190. <https://doi.org/10.1080/10256010410001726897>
 92. Gaye-Siessegger, J., Focken, U., Abel, H. J., & Becker, K. (2003). Feeding level and diet quality influence trophic shift of C and N isotopes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* (L.)). *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 39(2), 125–134. <https://doi.org/10.1080/1025601031000113556>
 93. Gerges, S. H., & El-Kadi, A. O. S. (2022). Sex differences in eicosanoid formation and metabolism: A possible mediator of sex discrepancies in cardiovascular diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 234, 108046. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.108046>
 94. Geribaldi-Doldán, N., Fernández-Ponce, C., Quiroz, R. N., Sánchez-Gomar, I., Escorcia, L. G., Velásquez, E. P., & Quiroz, E. N. (2020). The Role of Microglia in Glioblastoma. *Frontiers in Oncology*, 10, 603495. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.603495>
 95. Ghosh, P., & Brand, W. (2003). Stable Isotope Ratio Mass Spectrometry in Global Climate Change Research. *International Journal of Mass Spectrometry*, 228, 1–33. [https://doi.org/10.1016/S1387-3806\(03\)00289-6](https://doi.org/10.1016/S1387-3806(03)00289-6)

96. Gieryng, A., Pszczolkowska, D., Walentynowicz, K. A., Rajan, W. D., & Kaminska, B. (2017). Immune microenvironment of gliomas. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 97(5), 498–518. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2017.19>
97. Gohara, A., Eltaki, N., Sabry, D., Murtagh, D., Jankun, J., Selman, S. H., & Skrzypczak-Jankun, E. (2012). Human 5-, 12- and 15-lipoxygenase-1 coexist in kidney but show opposite trends and their balance changes in cancer. *Oncology Reports*, 28(4), 1275–1282. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1924>
98. Gordon, G. W., Monge, J., Channon, M. B., Wu, Q., Skulan, J. L., Anbar, A. D., & Fonseca, R. (2014). Predicting multiple myeloma disease activity by analyzing natural calcium isotopic composition. *Leukemia*, 28(10), 2112–2115. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.193>
99. Groseclose, M. R., Andersson, M., Hardesty, W. M., & Caprioli, R. M. (2007). Identification of proteins directly from tissue: In situ tryptic digestions coupled with imaging mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry: JMS*, 42(2), 254–262. <https://doi.org/10.1002/jms.1177>
100. Gross, J. H. (2011). *Mass Spectrometry: A Textbook* (2. wyd.). Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-10711-5>
101. Han, S., Liu, Y., Cai, S. J., Qian, M., Ding, J., Larion, M., Gilbert, M. R., & Yang, C. (2020). IDH mutation in glioma: Molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *British Journal of Cancer*, 122(11), 1580–1589. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0814-x>
102. Hanahan, D., & Coussens, L. M. (2012). Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3), 309–322. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.022>
103. Hao, Z., & Guo, D. (2019). EGFR mutation: Novel prognostic factor associated with immune infiltration in lower-grade glioma; an exploratory study. *BMC Cancer*, 19(1), 1184. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6384-8>
104. Harb, R., Xie, G., Lutzko, C., Guo, Y., Wang, X., Hill, C. K., Kanel, G. C., & DeLeve, L. D. (2009). Bone marrow progenitor cells repair rat hepatic sinusoidal endothelial cells after liver injury. *Gastroenterology*, 137(2), 704–712. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.05.009>
105. Hartmann, C., Hentschel, B., Wick, W., Capper, D., Felsberg, J., Simon, M., Westphal, M., Schackert, G., Meyermann, R., Pietsch, T., Reifenberger, G., Weller, M., Loeffler, M., & von Deimling, A. (2010). Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: Implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathologica*, 120(6), 707–718. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0781-z>
106. Haynes, R. L., & van Leyen, K. (2013). 12/15-lipoxygenase expression is increased in oligodendrocytes and microglia of periventricular leukomalacia. *Developmental Neuroscience*, 35(2–3), 140–154. <https://doi.org/10.1159/000350230>
107. He, J., Gornbein, J., Shen, D., Lu, M., Rovai, L. E., Shau, H., Katz, J., Whitelegge, J. P., Faull, K. F., & Chang, H. R. (2007). Detection of breast cancer biomarkers in nipple aspirate fluid by SELDI-TOF and their identification by combined liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *International Journal of Oncology*, 30(1), 145–154.
108. Hennig, R., Kehl, T., Noor, S., Ding, X.-Z., Rao, S. M., Bergmann, F., Fürstenberger, G., Büchler, M. W., Friess, H., Krieg, P., & Adrian, T. E. (2007). 15-lipoxygenase-1 production is lost in pancreatic cancer and overexpression of the gene inhibits tumor cell growth. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 9(11), 917–926. <https://doi.org/10.1593/neo.07565>
109. Herfarth, K. K., Gutwein, S., & Debus, J. (2001). Postoperative radiotherapy of astrocytomas. *Seminars in Surgical Oncology*, 20(1), 13–23. <https://doi.org/10.1002/ssu.1012>

110. Hermiston, M. L., Xu, Z., & Weiss, A. (2003). CD45: A critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annual Review of Immunology*, *21*, 107–137. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.140946>
111. Hernández, A., Domènech, M., Muñoz-Mármol, A. M., Carrato, C., & Balana, C. (2021). Glioblastoma: Relationship between Metabolism and Immunosuppressive Microenvironment. *Cells*, *10*(12), 3529. <https://doi.org/10.3390/cells10123529>
112. Heydeck, D., Thomas, L., Schnurr, K., Trebus, F., Thierfelder, W. E., Ihle, J. N., & Kühn, H. (1998). Interleukin-4 and -13 induce upregulation of the murine macrophage 12/15-lipoxygenase activity: Evidence for the involvement of transcription factor STAT6. *Blood*, *92*(7), 2503–2510.
113. Hinshaw, D. C., & Shevde, L. A. (2019). The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer research*, *79*(18), 4557–4566. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3962>
114. Ho, W.-T., Li, Y., & Yang, S. (2019). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry is effective for analysis of ergosterol in fungal-infected nails. *Clinical and Experimental Dermatology*, *44*(4), e133–e139. <https://doi.org/10.1111/ced.13933>
115. Hobson, K. A., & Clark, R. G. (1992). Assessing Avian Diets Using Stable Isotopes II: Factors Influencing Diet-Tissue Fractionation. *The Condor*, *94*(1), 189–197. JSTOR. <https://doi.org/10.2307/1368808>
116. Hobson, K., Alisauskas, R., & Clark, R. (1993). Stable-Nitrogen Isotope Enrichment in Avian Tissues Due to Fasting and Nutritional Stress: Implications for Isotopic Analyses of Diet. *The Condor*, *95*, 388. <https://doi.org/10.2307/1369361>
117. Hoffmann, W. D., & Jackson, G. P. (2015). Forensic Mass Spectrometry. *Annual Review of Analytical Chemistry (Palo Alto, Calif.)*, *8*, 419–440. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071114-040335>
118. Holmes, N. (2006). CD45: All is not yet crystal clear. *Immunology*, *117*(2), 145–155. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02265.x>
119. Horn, T., Ivanov, I., Di Venere, A., Kakularam, K. R., Reddanna, P., Conrad, M. L., Richter, C., Scheerer, P., & Kuhn, H. (2013). Molecular basis for the catalytic inactivity of a naturally occurring near-null variant of human ALOX15. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1831*(12), 1702–1713. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2013.08.004>
120. Hoshida, R., & Jandial, R. (2016). 2016 World Health Organization Classification of Central Nervous System Tumors: An Era of Molecular Biology. *World Neurosurgery*, *94*, 561–562. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2016.07.082>
121. Hsi, L. C., Kundu, S., Palomo, J., Xu, B., Ficco, R., Vogelbaum, M. A., & Cathcart, M. K. (2011). Silencing IL-13R α 2 promotes glioblastoma cell death via endogenous signaling. *Molecular Cancer Therapeutics*, *10*(7), 1149–1160. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-1064>
122. Hu, Y., Sun, H., O'Flaherty, J. T., & Edwards, I. J. (2013). 15-Lipoxygenase-1-mediated metabolism of docosahexaenoic acid is required for syndecan-1 signaling and apoptosis in prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, *34*(1), 176–182. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs324>
123. Huang, L. E. (2022). Impact of CDKN2A/B Homozygous Deletion on the Prognosis and Biology of IDH-Mutant Glioma. *Biomedicines*, *10*(2), 246. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020246>
124. Huang, R., Mao, M., Lu, Y., Yu, Q., & Liao, L. (2020). A novel immune-related genes prognosis biomarker for melanoma: Associated with tumor microenvironment. *Aging (Albany NY)*, *12*(8), 6966–6980. <https://doi.org/10.18632/aging.103054>
125. Hughes, J. (2009). Making isotopes matter: Francis Aston and the mass-spectrograph. *Dynamis*, *29*. <https://doi.org/10.4321/s0211-95362009000100007>
126. Hui, L., & Chen, Y. (2015). Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Letters*, *368*(1), 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.039>

127. Ishii, C., Nakayama, S. M. M., Kataba, A., Ikenaka, Y., Saito, K., Watanabe, Y., Makino, Y., Matsukawa, T., Kubota, A., Yokoyama, K., Mizukawa, H., Hirata, T., & Ishizuka, M. (2018). Characterization and imaging of lead distribution in bones of lead-exposed birds by ICP-MS and LA-ICP-MS. *Chemosphere*, 212, 994–1001. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.149>
128. Isidro, R. A., & Appleyard, C. B. (2016). Colonic macrophage polarization in homeostasis, inflammation, and cancer. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 311(1), G59–G73. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00123.2016>
129. Ito, T., Suzuki, A., Imai, E., Okabe, M., & Hori, M. (2001). Bone Marrow Is a Reservoir of Repopulating Mesangial Cells during Glomerular Remodeling. *Journal of the American Society of Nephrology*, 12(12), 2625–2635.
130. Ivanov, I., Kuhn, H., & Heydeck, D. (2015). Structural and functional biology of arachidonic acid 15-lipoxygenase-1 (ALOX15). *Gene*, 573(1), 1–32. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.07.073>
131. Jacobsen, M., Schweer, D., Ziegler, A., Gaber, R., Schock, S., Schwinzer, R., Wonigeit, K., Lindert, R. B., Kantarci, O., Schaefer-Klein, J., Schipper, H. I., Oertel, W. H., Heidenreich, F., Weinshenker, B. G., Sommer, N., & Hemmer, B. (2000). A point mutation in PTPRC is associated with the development of multiple sclerosis. *Nature Genetics*, 26(4), 495–499. <https://doi.org/10.1038/82659>
132. Jang, W.-J., Choi, J. Y., Park, B., Seo, J. H., Seo, Y. H., Lee, S., Jeong, C.-H., & Lee, S. (2019). Hair Metabolomics in Animal Studies and Clinical Settings. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(12). <https://doi.org/10.3390/molecules24122195>
133. Jia, D., Li, S., Li, D., Xue, H., Yang, D., & Liu, Y. (2018). Mining TCGA database for genes of prognostic value in glioblastoma microenvironment. *Aging (Albany NY)*, 10(4), 592–605. <https://doi.org/10.18632/aging.101415>
134. Jiang, W. G., Watkins, G., Douglas-Jones, A., & Mansel, R. E. (2006). Reduction of isoforms of 15-lipoxygenase (15-LOX)-1 and 15-LOX-2 in human breast cancer. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 74(4), 235–245. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2006.01.009>
135. Joshi, B. H., Plautz, G. E., & Puri, R. K. (2000). Interleukin-13 receptor alpha chain: A novel tumor-associated transmembrane protein in primary explants of human malignant gliomas. *Cancer Research*, 60(5), 1168–1172.
136. Judkins, A. R., Montone, K. T., LiVolsi, V. A., & van de Rijn, M. (1998). Sensitivity and specificity of antibodies on necrotic tumor tissue. *American Journal of Clinical Pathology*, 110(5), 641–646. <https://doi.org/10.1093/ajcp/110.5.641>
137. Kapoor, M., & Gupta, V. (2020). Astrocytoma. *W StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559042/>
138. Kapralov, A. A., Yang, Q., Dar, H. H., Tyurina, Y. Y., Anthonymuthu, T. S., Kim, R., St. Croix, C. M., Mikulska-Ruminska, K., Liu, B., Shrivastava, I. H., Tyurin, V. A., Ting, H.-C., Wu, Y. L., Gao, Y., Shurin, G. V., Artyukhova, M. A., Ponomareva, L. A., Timashev, P. S., Domingues, R. M., ... Kagan, V. E. (2020). Redox Lipid Reprogramming Commands Susceptibility of Macrophages and Microglia to Ferroptotic Death. *Nature chemical biology*, 16(3), 278–290. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0462-8>
139. Kazan, H. H., Urfali-Mamatoglu, C., Yalcin, G. D., Bulut, O., Sezer, A., Banerjee, S., & Gunduz, U. (2020). 15-LOX-1 has diverse roles in the resensitization of resistant cancer cell lines to doxorubicin. *Journal of Cellular Physiology*, 235(5), 4965–4978. <https://doi.org/10.1002/jcp.29375>
140. Kendall, C., & McDonnell, J. J. (1998). *Isotope Tracers in Catchment Hydrology*. Elsevier.
141. Keshishian, H., Burgess, M. W., Specht, H., Wallace, L., Clauser, K. R., Gillette, M. A., & Carr, S. A. (2017). Quantitative, multiplexed workflow for deep analysis of

- human blood plasma and biomarker discovery by mass spectrometry. *Nature Protocols*, 12(8), 1683–1701. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.054>
142. Khatib-Shahidi, S., Andersson, M., Herman, J. L., Gillespie, T. A., & Caprioli, R. M. (2006). Direct molecular analysis of whole-body animal tissue sections by imaging MALDI mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 78(18), 6448–6456. <https://doi.org/10.1021/ac060788p>
 143. Kim, A. R., Choi, K. S., Kim, M.-S., Kim, K.-M., Kang, H., Kim, S., Chowdhury, T., Yu, H. J., Lee, C. E., Lee, J. H., Lee, S.-T., Won, J. K., Kim, J. W., Kim, Y.-H., Kim, T. M., Park, S.-H., Choi, S. H., Shin, E.-C., & Park, C.-K. (2021). Absolute quantification of tumor-infiltrating immune cells in high-grade glioma identifies prognostic and radiomics values. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 70(7), 1995–2008. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02836-w>
 144. Kim, Y., Jeon, H., & Othmer, H. (2017). The Role of the Tumor Microenvironment in Glioblastoma: A Mathematical Model. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 64(3), 519–527. <https://doi.org/10.1109/TBME.2016.2637828>
 145. Kitanaka, C., Shitara, N., Nakagomi, T., Nakamura, H., Genka, S., Nakagawa, K., Akanuma, A., Aoyama, H., & Takakura, K. (1989). Postradiation astrocytoma. Report of two cases. *Journal of Neurosurgery*, 70(3), 469–474. <https://doi.org/10.3171/jns.1989.70.3.0469>
 146. Klein, R. (2013). Stable carbon isotopes and human evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307308110>
 147. Klemm, F., Maas, R. R., Bowman, R. L., Kornete, M., Soukup, K., Nassiri, S., Brouland, J.-P., Iacobuzio-Donahue, C. A., Brennan, C., Tabar, V., Gutin, P. H., Daniel, R. T., Hegi, M. E., & Joyce, J. A. (2020). Interrogation of the Microenvironmental Landscape in Brain Tumors Reveals Disease-Specific Alterations of Immune Cells. *Cell*, 181(7), 1643-1660.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.007>
 148. Klonowicz, M. (2007). *Pooperacyjna radiochemioterapia—Nowy standard w leczeniu glejaka wielopostaciowego? 4.*
 149. Komori, T. (2022). Grading of adult diffuse gliomas according to the 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System. *Laboratory Investigation*, 102(2), 126–133. <https://doi.org/10.1038/s41374-021-00667-6>
 150. Kong, P. L., Cheah, P. L., Mun, K. S., Chiew, S. F., Lau, T. P., Koh, C. C., Teoh, K. H., Nazarina, A. R., & Looi, L. M. (2020). FISHing for 1p19q code in oligodendroglioma. *The Malaysian Journal of Pathology*, 42(3), 369–376.
 151. Kordek & Jassem. (2019). *Onkologia. Podręcznik dla studentów i lekarzy, wyd. 5.* <https://www.ikamed.pl/onkologia-podrecznik-dla-studentow-i-lekarzy-wyd-5-VMG01250>
 152. Kordek, R., Jassem, J., & Jeziorski, A. (2007). *ONKOLOGIA. Podręcznik dla studentów i lekarzy (III)*. Gdańsk : Wydaw. ViaMedica.
 153. Kraft, R. A., Jahren, A. H., & Saudek, C. D. (2008). Clinical-scale investigation of stable isotopes in human blood: $\Delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ from 406 patients at the Johns Hopkins Medical Institutions. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22(22), 3683–3692. <https://doi.org/10.1002/rcm.3780>
 154. Krishnamurthy, R. V., Suryawanshi, Y. R., & Essani, K. (2017). Nitrogen isotopes provide clues to amino acid metabolism in human colorectal cancer cells. *Scientific Reports*, 7(1), 2562. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02793-y>
 155. Kuhn, H., Walther, M., & Kuban, R. J. (2002). Mammalian arachidonate 15-lipoxygenases structure, function, and biological implications. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 68–69, 263–290. [https://doi.org/10.1016/s0090-6980\(02\)00035-7](https://doi.org/10.1016/s0090-6980(02)00035-7)
 156. Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2019). *Patologia Robbins (X)*. /ksiazka_medyczna/patologia-robbins

157. Kung, C., Pingel, J. T., Heikinheimo, M., Klemola, T., Varkila, K., Yoo, L. I., Vuopala, K., Poyhonen, M., Uhari, M., Rogers, M., Speck, S. H., Chatila, T., & Thomas, M. L. (2000). Mutations in the tyrosine phosphatase CD45 gene in a child with severe combined immunodeficiency disease. *Nature Medicine*, 6(3), 343–345. <https://doi.org/10.1038/73208>
158. Kurle, C. (2002). Stable-isotope ratios of blood components from captive northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) and their diet: Applications for studying the foraging ecology of wild otariids. *Canadian Journal of Zoology-revue Canadienne De Zoologie - CAN J ZOOL*, 80, 902–909. <https://doi.org/10.1139/z02-069>
159. Kurreck, A., Vandergrift, L. A., Fuss, T. L., Habbel, P., Agar, N. Y. R., & Cheng, L. L. (2018). Prostate cancer diagnosis and characterization with mass spectrometry imaging. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 21(3), 297–305. <https://doi.org/10.1038/s41391-017-0011-z>
160. Kurtin, P. J., & Pinkus, G. S. (1985). Leukocyte common antigen--a diagnostic discriminant between hematopoietic and nonhematopoietic neoplasms in paraffin sections using monoclonal antibodies: Correlation with immunologic studies and ultrastructural localization. *Human Pathology*, 16(4), 353–365. [https://doi.org/10.1016/s0046-8177\(85\)80229-x](https://doi.org/10.1016/s0046-8177(85)80229-x)
161. Larjavaara, S., Mäntylä, R., Salminen, T., Haapasalo, H., Raitanen, J., Jääskeläinen, J., & Auvinen, A. (2007). Incidence of gliomas by anatomic location. *Neuro-Oncology*, 9(3), 319–325. <https://doi.org/10.1215/15228517-2007-016>
162. Ledford, H. (2014). Cancer cells can ‘infect’ normal neighbours. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature.2014.16212>
163. Lemée, J.-M., Clavreul, A., & Menei, P. (2015). Intratumoral heterogeneity in glioblastoma: Don't forget the peritumoral brain zone. *Neuro-Oncology*, 17(10), 1322–1332. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov119>
164. Li, K., Cong, Z., Peng, Z., Chen, T., Xue, J., & Wei, Q. (2018). CD45RO regulates the HIV-1 gp120-mediated apoptosis of T cells by activating Lck. *Biological Chemistry*, 399(6), 583–591. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0211>
165. Li, K., Lu, D., Guo, Y., Wang, C., Liu, X., Liu, Y., & Liu, D. (2018). Trends and patterns of incidence of diffuse glioma in adults in the United States, 1973-2014. *Cancer Medicine*, 7(10), 5281–5290. <https://doi.org/10.1002/cam4.1757>
166. Li, M.-Y., Liu, L.-Z., Li, W., Ng, C. S. H., Liu, Y., Kong, A. W. Y., Zhao, Z., Wang, S., Qi, H., Jia, H., Yang, S., Du, J., Long, X., Ho, R. L. K., Chak, E. C. W., Wan, I. Y. P., Mok, T. S. K., Underwood, M. J., Gali, N. K., ... Chen, G. G. (2019). Ambient fine particulate matter inhibits 15-lipoxygenases to promote lung carcinogenesis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 38(1), 359. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1380-z>
167. Liu, S. H., Shen, C. C., Yi, Y. C., Tsai, J. J., Wang, C. C., Chueh, J. T., Lin, K. L., Lee, T. C., Pan, H. C., & Sheu, M. L. (2010). Honokiol inhibits gastric tumorigenesis by activation of 15-lipoxygenase-1 and consequent inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and COX-2-dependent signals. *British Journal of Pharmacology*, 160(8), 1963–1972. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00804.x>
168. Lopez-Gines, C., Cerda-Nicolas, M., Gil-Benso, R., Pellin, A., Lopez-Guerrero, J. A., Callaghan, R., Benito, R., Roldan, P., Piquer, J., Llacer, J., & Barbera, J. (2005). Association of chromosome 7, chromosome 10 and EGFR gene amplification in glioblastoma multiforme. *Clinical Neuropathology*, 24(5), 209–218.
169. Lou, S., Balluff, B., Clevon, A. H. G., Bovée, J. V. M. G., & McDonnell, L. A. (2017). Prognostic Metabolite Biomarkers for Soft Tissue Sarcomas Discovered by Mass Spectrometry Imaging. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 28(2), 376–383. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1544-4>
170. 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. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central

- Nervous System: A summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
171. 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., Soffietti, R., von Deimling, A., & Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Neuro-Oncology*, 23(8), 1231–1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>
 172. López, A., Yusà, V., Millet, M., & Coscollà, C. (2016). Retrospective screening of pesticide metabolites in ambient air using liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Talanta*, 150, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.11.068>
 173. Lu, M., Faull, K. F., Whitelegge, J. P., He, J., Shen, D., Saxton, R. E., & Chang, H. R. (2007). Proteomics and Mass Spectrometry for Cancer Biomarker Discovery. *Biomarker Insights*, 2, 347–360.
 174. Lyu, H., Li, M., Jiang, Z., Liu, Z., & Wang, X. (2019). Correlate the TP53 Mutation and the HRAS Mutation with Immune Signatures in Head and Neck Squamous Cell Cancer. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 1020–1030. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.07.009>
 175. Macko, S., Fogel, M., Hare, P. E., & Hoering, T. C. (1987). Isotopic Fractionation of Nitrogen and Carbon in the Synthesis of Amino Acids by Microorganisms. *Chemical Geology (Isotope Geoscience Section)*, 65, 79–92. [https://doi.org/10.1016/0168-9622\(87\)90064-9](https://doi.org/10.1016/0168-9622(87)90064-9)
 176. Madala, S. K., Edukulla, R., Schmidt, S., Davidson, C., Ikegami, M., & Hardie, W. D. (2014). Bone Marrow-Derived Stromal Cells Are Invasive and Hyperproliferative and Alter Transforming Growth Factor- α -Induced Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 50(4), 777–786. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0042OC>
 177. Mantovani, A., Marchesi, F., Malesci, A., Laghi, L., & Allavena, P. (2017). Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14(7), 399–416. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.217>
 178. Martelli, C., Marzano, V., Marini, F., Scotognella, T., Fratoddi, I., Venditti, I., Rotili, D., Solfaroli-Camillocchi, E., Collamati, F., Mancini-Terracciano, C., Morganti, S., Maccora, D., Faccini, R., Cartoni, A., Giordano, A., & Castagnola, M. (2018). Mass spectrometry characterization of DOTA-Nimotuzumab conjugate as precursor of an innovative β -tracer suitable in radio-guided surgery. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 156, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.03.018>
 179. Maruno, M., Yoshimine, T., Muhammad, A. K., Ninomiya, H., Kato, A., & Hayakawa, T. (1999). Chromosomal aberrations detected by comparative genomic hybridization (CGH) in human astrocytic tumors. *Cancer Letters*, 135(1), 61–66. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(98\)00266-3](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(98)00266-3)
 180. Mashima, R., & Okuyama, T. (2015). The role of lipoxygenases in pathophysiology; new insights and future perspectives. *Redox Biology*, 6, 297–310. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.006>
 181. McAllister, S. S., Gifford, A. M., Greiner, A. L., Kelleher, S. P., Saelzler, M. P., Ince, T. A., Reinhardt, F., Harris, L. N., Hylander, B. L., Repasky, E. A., & Weinberg, R. A. (2008). Systemic endocrine instigation of indolent tumor growth requires osteopontin. *Cell*, 133(6), 994–1005. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.045>
 182. McDonnell, J. M., Beschorner, W. E., Kuhajda, F. P., & deMent, S. H. (1987). Common leukocyte antigen staining of a primitive sarcoma. *Cancer*, 59(8), 1438–1441. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19870415\)59:8<1438::aid-cncr2820590809>3.0.co;2-k](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19870415)59:8<1438::aid-cncr2820590809>3.0.co;2-k)
 183. McGranahan, T., Therkelsen, K. E., Ahmad, S., & Nagpal, S. (2019). Current State of Immunotherapy for Treatment of Glioblastoma. *Current Treatment Options in Oncology*, 20(3), 24. <https://doi.org/10.1007/s11864-019-0619-4>

184. Mehani, B., Asanigari, S., Chung, H.-J., Dazelle, K., Singh, A., Hannenhalli, S., & Aldape, K. (2022). Immune cell gene expression signatures in diffuse glioma are associated with IDH mutation status, patient outcome and malignant cell state, and highlight the importance of specific cell subsets in glioma biology. *Acta Neuropathologica Communications*, 10, 19. <https://doi.org/10.1186/s40478-022-01323-w>
185. Michels, S., Swanson, P. E., Frizzera, G., & Wick, M. R. (1987). Immunostaining for leukocyte common antigen using an amplified avidin-biotin-peroxidase complex method and paraffin sections. A study of 735 hematopoietic and nonhematopoietic human neoplasms. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 111(11), 1035–1039.
186. Michener, R., & Lajtha, K. (Ed.). (2007). *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science 2e* (2 edition). WB.
187. Miller, J. J., Shih, H. A., Andronesi, O. C., & Cahill, D. P. (2017). Isocitrate dehydrogenase-mutant glioma: Evolving clinical and therapeutic implications. *Cancer*, 123(23), 4535–4546. <https://doi.org/10.1002/cncr.31039>
188. Mintz, A., Gibo, D. M., Slagle-Webb, B., Christensen, N. D., & Debinski, W. (2002). IL-13R α 2 is a Glioma-Restricted Receptor for Interleukin-13. *Neoplasia (New York, N. Y.)*, 4(5), 388–399.
189. Mitre, A.-O., Florian, A. I., Buruiana, A., Boer, A., Moldovan, I., Soritau, O., Florian, S. I., & Susman, S. (2022). Ferroptosis Involvement in Glioblastoma Treatment. *Medicina*, 58(2), 319. <https://doi.org/10.3390/medicina58020319>
190. Montiel-León, J. M., Duy, S. V., Munoz, G., Amyot, M., & Sauvé, S. (2018). Evaluation of on-line concentration coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the quantification of neonicotinoids and fipronil in surface water and tap water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(11), 2765–2779. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0957-2>
191. Moussalli, M. J., Wu, Y., Zuo, X., Yang, X. L., Wistuba, I. I., Raso, M. G., Morris, J. S., Bowser, J. L., Minna, J. D., Lotan, R., & Shureiqi, I. (2011). Mechanistic contribution of ubiquitous 15-lipoxygenase-1 expression loss in cancer cells to terminal cell differentiation evasion. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 4(12), 1961–1972. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0280>
192. Müller, A., Brandenburg, S., Turkowski, K., Müller, S., & Vajkoczy, P. (2015). Resident microglia, and not peripheral macrophages, are the main source of brain tumor mononuclear cells. *International Journal of Cancer*, 137(2), 278–288. <https://doi.org/10.1002/ijc.29379>
193. Nam, H.-J., Poy, F., Saito, H., & Frederick, C. A. (2005). Structural basis for the function and regulation of the receptor protein tyrosine phosphatase CD45. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(3), 441–452. <https://doi.org/10.1084/jem.20041890>
194. Nandakumar, P., Mansouri, A., & Das, S. (2017). The Role of ATRX in Glioma Biology. *Frontiers in Oncology*, 7, 236. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00236>
195. Nandedkar, M. A., Palazzo, J., Abbondanzo, S. L., Lasota, J., & Miettinen, M. (1998). CD45 (leukocyte common antigen) immunoreactivity in metastatic undifferentiated and neuroendocrine carcinoma: A potential diagnostic pitfall. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 11(12), 1204–1210.
196. Neves, V. M., Heidrich, G. M., Hanzel, F. B., Muller, E. I., & Dressler, V. L. (2018). Rare earth elements profile in a cultivated and non-cultivated soil determined by laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Chemosphere*, 198, 409–416. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.165>
197. Ngo, N., Patel, K., Isaacson, P. G., & Naresh, K. N. (2007). Leucocyte common antigen (CD45) and CD5 positivity in an “undifferentiated” carcinoma: A potential diagnostic pitfall. *Journal of Clinical Pathology*, 60(8), 936–938. <https://doi.org/10.1136/jcp.2006.044750>

198. Nguyen, P. V., Wessels, J. M., Mueller, K., Vahedi, F., Anipindi, V., Verschoor, C. P., Chew, M., Deshiere, A., Karniychuk, U., Mazzulli, T., Tremblay, M. J., Ashkar, A. A., & Kaushic, C. (2017). Frequency of Human CD45+ Target Cells is a Key Determinant of Intravaginal HIV-1 Infection in Humanized Mice. *Scientific Reports*, 7(1), 15263. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15630-z>
199. Novak, T. J., Farber, D., Leitenberg, D., Hong, S. C., Johnson, P., & Bottomly, K. (1994). Isoforms of the transmembrane tyrosine phosphatase CD45 differentially affect T cell recognition. *Immunity*, 1(2), 109–119. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(94\)90104-x](https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90104-x)
200. O’Flaherty, J. T., Hu, Y., Wooten, R. E., Horita, D. A., Samuel, M. P., Thomas, M. J., Sun, H., & Edwards, I. J. (2012). 15-Lipoxygenase Metabolites of Docosahexaenoic Acid Inhibit Prostate Cancer Cell Proliferation and Survival. *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045480>
201. Oka, S., Ono, K., & Nohgawa, M. (2020). Clinical effects of CD45 on the prognosis of extramedullary myeloma relapse. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 45(1), 144–151. <https://doi.org/10.1111/jcpt.13045>
202. Orafaie, A., Matin, M. M., & Sadeghian, H. (2018). The importance of 15-lipoxygenase inhibitors in cancer treatment. *Cancer Metastasis Reviews*, 37(2–3), 397–408. <https://doi.org/10.1007/s10555-018-9738-9>
203. Ostrom, Q. T., Bauchet, L., Davis, F. G., Deltour, I., Fisher, J. L., Langer, C. E., Pekmezci, M., Schwartzbaum, J. A., Turner, M. C., Walsh, K. M., Wrensch, M. R., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2014). The epidemiology of glioma in adults: A “state of the science” review. *Neuro-Oncology*, 16(7), 896–913. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou087>
204. Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Stetson, L., Virk, S., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2018). Epidemiology of Intracranial Gliomas. *Progress in Neurological Surgery*, 30, 1–11. <https://doi.org/10.1159/000464374>
205. Pacholska, A., Wirth, T., Samaranayake, H., Pikkarainen, J., Ahmad, F., & Ylä-Herttuala, S. (2012). Increased invasion of malignant gliomas after 15-LO-1 and HSV-tk/ganciclovir combination gene therapy. *Cancer Gene Therapy*, 19(12), 870–874. <https://doi.org/10.1038/cgt.2012.76>
206. Parney, I. F., Waldron, J. S., & Parsa, A. T. (2009). Flow cytometry and in vitro analysis of human glioma-associated macrophages. *Journal of neurosurgery*, 110(3), 572–582. <https://doi.org/10.3171/2008.7.JNS08475>
207. Patel, A. P., Fisher, J. L., Nichols, E., Abd-Allah, F., Abdela, J., Abdelalim, A., Abraha, H. N., Agius, D., Alahdab, F., Alam, T., Allen, C. A., Anber, N. H., Awasthi, A., Badali, H., Belachew, A. B., Bijani, A., Bjørge, T., Carvalho, F., Catalá-López, F., ... Fitzmaurice, C. (2019). Global, regional, and national burden of brain and other CNS cancer, 1990–2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, 18(4), 376–393. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30468-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30468-X)
208. Pavlova, N. N., & Thompson, C. B. (2016). THE EMERGING HALLMARKS OF CANCER METABOLISM. *Cell metabolism*, 23(1), 27–47. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>
209. Perez de Souza, L., Alseekh, S., Naake, T., & Fernie, A. (2019). Mass Spectrometry-Based Untargeted Plant Metabolomics. *Current Protocols in Plant Biology*, 4(4), e20100. <https://doi.org/10.1002/cppb.20100>
210. Petrecca, K., Guiot, M.-C., Panet-Raymond, V., & Souhami, L. (2013). Failure pattern following complete resection plus radiotherapy and temozolomide is at the resection margin in patients with glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology*, 111(1), 19–23. <https://doi.org/10.1007/s11060-012-0983-4>
211. Petzke, K. J., Boeing, H., Klaus, S., & Metges, C. C. (2005). Carbon and nitrogen stable isotopic composition of hair protein and amino acids can be used as biomarkers for animal-derived dietary protein intake in humans. *The Journal of Nutrition*, 135(6), 1515–1520. <https://doi.org/10.1093/jn/135.6.1515>

212. Philips, B. J., Dhir, R., Hutzley, J., Sen, M., & Kelavkar, U. P. (2008). Polyunsaturated fatty acid metabolizing 15-Lipoxygenase-1 (15-LO-1) expression in normal and tumorigenic human bladder tissues. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 16(2), 159–164. <https://doi.org/10.1097/pai.0b013e31805baa41>
213. Pignatti, F., van den Bent, M., Curran, D., Debruyne, C., Sylvester, R., Therasse, P., Afra, D., Cornu, P., Bolla, M., Vecht, C., Karim, A. B. M. F., European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Cooperative Group, & European Organization for Research and Treatment of Cancer Radiotherapy Cooperative Group. (2002). Prognostic factors for survival in adult patients with cerebral low-grade glioma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 20(8), 2076–2084. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.08.121>
214. Piotrowski, P. K., Tasker, T. L., Burgos, W. D., & Dorman, F. L. (2018). Applications of thermal desorption coupled to comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry for hydrocarbon fingerprinting of hydraulically fractured shale rocks. *Journal of Chromatography. A*, 1579, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.10.021>
215. Praticò, D., Zhukareva, V., Yao, Y., Uryu, K., Funk, C. D., Lawson, J. A., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (2004). 12/15-lipoxygenase is increased in Alzheimer's disease: Possible involvement in brain oxidative stress. *The American Journal of Pathology*, 164(5), 1655–1662. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63724-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63724-8)
216. Pratt, K. A., & Prather, K. A. (2012). Mass spectrometry of atmospheric aerosols--recent developments and applications. Part II: On-line mass spectrometry techniques. *Mass Spectrometry Reviews*, 31(1), 17–48. <https://doi.org/10.1002/mas.20330>
217. Rahaman, S. O., Sharma, P., Harbor, P. C., Aman, M. J., Vogelbaum, M. A., & Haque, S. J. (2002). IL-13R(alpha)2, a decoy receptor for IL-13 acts as an inhibitor of IL-4-dependent signal transduction in glioblastoma cells. *Cancer Research*, 62(4), 1103–1109.
218. Rahimi Koshkaki, H., Minasi, S., Ugolini, A., Trevisi, G., Napoletano, C., Zizzari, I. G., Gessi, M., Giangaspero, F., Mangiola, A., Nuti, M., Buttarelli, F. R., & Rughetti, A. (2020). Immunohistochemical Characterization of Immune Infiltrate in Tumor Microenvironment of Glioblastoma. *Journal of Personalized Medicine*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/jpm10030112>
219. Rao, A. M., Quddusi, A., & Shamim, M. S. (2018). The significance of MGMT methylation in Glioblastoma Multiforme prognosis. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 68(7), 1137–1139.
220. Rasheed, B. K., Wiltshire, R. N., Bigner, S. H., & Bigner, D. D. (1999). Molecular pathogenesis of malignant gliomas. *Current Opinion in Oncology*, 11(3), 162–167. <https://doi.org/10.1097/00001622-199905000-00004>
221. Redfern, R. C., DeWitte, S. N., Beaumont, J., Millard, A. R., & Hamlin, C. (2019). A new method for investigating the relationship between diet and mortality: Hazard analysis using dietary isotopes. *Annals of Human Biology*, 46(5), 378–387. <https://doi.org/10.1080/03014460.2019.1662484>
222. Rheinländer, A., Schraven, B., & Bommhardt, U. (2018). CD45 in human physiology and clinical medicine. *Immunology Letters*, 196, 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.01.009>
223. Rivera, S., Azcón-Bieto, J., López-Soriano, F. J., Miralpeix, M., & Argilés, J. M. (1988). Amino acid metabolism in tumour-bearing mice. *Biochemical Journal*, 249(2), 443–449.
224. Rodini, C. O., Gonçalves da Silva, P. B., Assoni, A. F., Carvalho, V. M., & Okamoto, O. K. (2018). Mesenchymal stem cells enhance tumorigenic properties of human

- glioblastoma through independent cell-cell communication mechanisms. *Oncotarget*, 9(37), 24766–24777. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25346>
225. Rodriguez, F. J., Lim, K. S., Bowers, D., & Eberhart, C. G. (2013). Pathological and Molecular Advances in Pediatric Low Grade Astrocytoma. *Annual review of pathology*, 8, 361–379. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020712-164009>
 226. Rolland, D. C. M., Lim, M. S., & Elenitoba-Johnson, K. S. J. (2019). Mass spectrometry and proteomics in hematology. *Seminars in Hematology*, 56(1), 52–57. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2018.05.009>
 227. Rozanova, S., Barkovits, K., Nikolov, M., Schmidt, C., Urlaub, H., & Marcus, K. (2021). Quantitative Mass Spectrometry-Based Proteomics: An Overview. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2228, 85–116. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1024-4_8
 228. Ruan, Z., Zhao, Y., Yan, L., Chen, H., Fan, W., Chen, J., Wu, Q., Qian, J., Zhang, T., Zhou, K., Mao, Y., Zhou, L., Huang, Y., & Lu, D. (2011). Single nucleotide polymorphisms in IL-4Ra, IL-13 and STAT6 genes occurs in brain glioma. *Frontiers in Bioscience-Elite*, 3(1), 33–45. <https://doi.org/10.2741/E217>
 229. Saadeh, F. S., Mahfouz, R., & Assi, H. I. (2018). EGFR as a clinical marker in glioblastomas and other gliomas. *The International Journal of Biological Markers*, 33(1), 22–32. <https://doi.org/10.5301/ijbm.5000301>
 230. Sak, M. E., Alanbay, I., Rodriguez, A., Gokaslan, T., Borahay, M., Shureiqi, I., & Kilic, G. S. (2016). The role of 15-lipoxygenase-1 expression and its potential role in the pathogenesis of endometrial hyperplasia and endometrial adenocarcinomas. *European Journal of Gynaecological Oncology*, 37(1), 36–40.
 231. Sathornsumetee, S., Rich, J. N., & Reardon, D. A. (2007). Diagnosis and treatment of high-grade astrocytoma. *Neurologic Clinics*, 25(4), 1111–1139, x. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2007.07.004>
 232. Sayegh, E. T., Oh, T., Fakurnejad, S., Oyon, D. E., Bloch, O., & Parsa, A. T. (2014). Principles of surgery for malignant astrocytomas. *Seminars in Oncology*, 41(4), 523–531. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2014.06.011>
 233. Schaepe, K., Bhandari, D. R., Werner, J., Henss, A., Pirkl, A., Kleine-Boymann, M., Rohnke, M., Wenisch, S., Neumann, E., Janek, J., & Spengler, B. (2018). Imaging of Lipids in Native Human Bone Sections Using TOF-Secondary Ion Mass Spectrometry, Atmospheric Pressure Scanning Microprobe Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Orbitrap Mass Spectrometry, and Orbitrap-Secondary Ion Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 90(15), 8856–8864. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00892>
 234. Schaltegger, U., Wotzlaw, J.-F., Ovtcharova, M., Chiaradia, M., & Spikings, R. (2014). Mass spectrometry in Earth sciences: The precise and accurate measurement of time. *Chimia*, 68(3), 124–128. <https://doi.org/10.2533/chimia.2014.124>
 235. Scheithauer, B. W. (2009). Development of the WHO classification of tumors of the central nervous system: A historical perspective. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 19(4), 551–564. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2008.00192.x>
 236. Schewe, T., Halangk, W., Hiebsch, C., & Rapoport, S. M. (1975). A lipoxygenase in rabbit reticulocytes which attacks phospholipids and intact mitochondria. *FEBS Letters*, 60(1), 149–152. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(75\)80439-x](https://doi.org/10.1016/0014-5793(75)80439-x)
 237. Schwinzer, R., Witte, T., Hundrieser, J., Ehlers, S., Momot, T., Hunzelmann, N., Krieg, T., Schmidt, R. E., & Wonigeit, K. (2003). Enhanced frequency of a PTPRC (CD45) exon A mutation (77C-->G) in systemic sclerosis. *Genes and Immunity*, 4(2), 168–169. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6363894>
 238. Seki, T., Hida, K., Yano, S., Aoyama, T., Koyanagi, I., & Houkin, K. (2015). Surgical Outcomes of High-Grade Spinal Cord Gliomas. *Asian Spine Journal*, 9(6), 935–941. <https://doi.org/10.4184/asj.2015.9.6.935>
 239. Shannon, V. R., Chanez, P., Bousquet, J., & Holtzman, M. J. (1993). Histochemical evidence for induction of arachidonate 15-lipoxygenase in airway disease. *The*

- American Review of Respiratory Disease*, 147(4), 1024–1028. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/147.4.1024>
240. Shimamura, T., Husain, S. R., & Puri, R. K. (2006). The IL-4 and IL-13 pseudomonas exotoxins: New hope for brain tumor therapy. *Neurosurgical Focus*, 20(4), E11. <https://doi.org/10.3171/foc.2006.20.4.6>
 241. Shureiqi, I., Wu, Y., Chen, D., Yang, X. L., Guan, B., Morris, J. S., Yang, P., Newman, R. A., Broaddus, R., Hamilton, S. R., Lynch, P., Levin, B., Fischer, S. M., & Lippman, S. M. (2005). Critical Role of 15-Lipoxygenase-1 in Colorectal Epithelial Cell Terminal Differentiation and Tumorigenesis. *Cancer research*, 65(24), 11486–11492. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2180>
 242. Sigal, E., Grunberger, D., Cashman, J. R., Craik, C. S., Caughey, G. H., & Nadel, J. A. (1988). Arachidonate 15-lipoxygenase from human eosinophil-enriched leukocytes: Partial purification and properties. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 150(1), 376–383. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(88\)90531-1](https://doi.org/10.1016/0006-291x(88)90531-1)
 243. Silantyev, A. S., Falzone, L., Libra, M., Gurina, O. I., Kardashova, K. Sh., Nikolouzakis, T. K., Nosyrev, A. E., Sutton, C. W., Mitsias, P. D., & Tsatsakis, A. (2019). Current and Future Trends on Diagnosis and Prognosis of Glioblastoma: From Molecular Biology to Proteomics. *Cells*, 8(8), 863. <https://doi.org/10.3390/cells8080863>
 244. Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., & Dirks, P. B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Research*, 63(18), 5821–5828.
 245. Souza, F. da C., Ferreira, M. T., & Colquhoun, A. (2020). Influence of Lipoxygenase Inhibition on Glioblastoma Cell Biology. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21). <https://doi.org/10.3390/ijms21218395>
 246. Soysal, S. D., Tzankov, A., & Muenst, S. E. (2015). Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiology: Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology*, 82(3–4), 142–152. <https://doi.org/10.1159/000430499>
 247. Stanton, T., Boxall, S., Bennett, A., Kaleebu, P., Watera, C., Whitworth, J., French, N., Dawes, R., Hill, A. V. S., Bodmer, W., Beverley, P. C. L., & Tchilian, E. Z. (2004). CD45 variant alleles: Possibly increased frequency of a novel exon 4 CD45 polymorphism in HIV seropositive Ugandans. *Immunogenetics*, 56(2), 107–110. <https://doi.org/10.1007/s00251-004-0668-z>
 248. Stevens, W. W., Staudacher, A. G., Hulse, K. E., Carter, R. G., Winter, D. R., Kato, A., Suh, L., Norton, J. E., Huang, J. H., Peters, A. T., Grammer, L. C., Price, C. P. E., Conley, D. B., Shintani-Smith, S., Tan, B. K., Welch, K. C., Kern, R. C., & Schleimer, R. P. (2020). Activation of the 15-lipoxygenase pathway in aspirin-exacerbated respiratory disease. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.04.031>
 249. Straub, M., Sigman, D. M., Auderset, A., Ollivier, J., Petit, B., Hinnenberg, B., Rubach, F., Oleynik, S., Vozenin, M.-C., & Martínez-García, A. (2021). Distinct nitrogen isotopic compositions of healthy and cancerous tissue in mice brain and head&neck micro-biopsies. *BMC Cancer*, 21, 805. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08489-x>
 250. Strik, H. M., Stoll, M., & Meyermann, R. (2004). Immune cell infiltration of intrinsic and metastatic intracranial tumours. *Anticancer Research*, 24(1), 37–42.
 251. Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R. O., ... National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 352(10), 987–996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>

252. Sultan, M., Ben-Shushan, D., Peled, M., Kamari, Y., Isman, S., Barshack, I., Kuban, R.-J., Kühn, H., Harats, D., & Shaish, A. (2020). Specific overexpression of 15-lipoxygenase in endothelial cells promotes cancer cell death in an in vivo Lewis lung carcinoma mouse model. *Advances in Medical Sciences*, 65(1), 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2019.11.006>
253. Suzuki, Y., Niina, K., Matsuwaki, T., Nukazawa, K., & Iguchi, A. (2018). Bacterial flora analysis of coliforms in sewage, river water, and ground water using MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 53(2), 160–173. <https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1383128>
254. Swiatly, A., Plewa, S., Matysiak, J., & Kokot, Z. J. (2018). Mass spectrometry-based proteomics techniques and their application in ovarian cancer research. *Journal of Ovarian Research*, 11(1), 88. <https://doi.org/10.1186/s13048-018-0460-6>
255. Szodoray, P., Stanford, S. M., Molberg, Ø., Munthe, L. A., Bottini, N., & Nakken, B. (2016). T-helper signals restore B-cell receptor signaling in autoreactive anergic B cells by upregulating CD45 phosphatase activity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(3), 839–851.e8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.01.035>
256. Tafani, M., Di Vito, M., Frati, A., Pellegrini, L., De Santis, E., Sette, G., Eramo, A., Sale, P., Mari, E., Santoro, A., Raco, A., Salvati, M., De Maria, R., & Russo, M. A. (2011). Pro-inflammatory gene expression in solid glioblastoma microenvironment and in hypoxic stem cells from human glioblastoma. *Journal of Neuroinflammation*, 8, 32. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-32>
257. Tamura, R., Ohara, K., Sasaki, H., Morimoto, Y., Kosugi, K., Yoshida, K., & Toda, M. (2018). Difference in Immunosuppressive Cells Between Peritumoral Area and Tumor Core in Glioblastoma. *World Neurosurgery*, 120, e601–e610. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.08.133>
258. Taran, K. (2015). *Izotopowa spektrometria mas (IRMS) jako nowe narzędzie w badaniach patomechanizmów choroby nowotworowej z uwzględnieniem mapy izotopowej organizmów dzieci w regionie łódzkim: Rozprawa habilitacyjna. Uniwersytet Medyczny.*
259. Taran, K., Frączek, T., Kamiński, R., Sitkiewicz, A., Kobos, J., & Paneth, P. (2015). The first protocol of stable isotope ratio assessment in tumor tissues based on original research. *Polish Journal of Pathology: Official Journal of the Polish Society of Pathologists*, 66(3), 288–295. <https://doi.org/10.5114/pjp.2015.54963>
260. Taran, K., Frączek, T., Sikora-Szubert, A., Sitkiewicz, A., Młynarski, W., Kobos, J., & Paneth, P. (2016). The first investigation of Wilms' tumour atomic structure-nitrogen and carbon isotopic composition as a novel biomarker for the most individual approach in cancer disease. *Oncotarget*, 7(47), 76726–76734. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12521>
261. Taran, K., Frączek, T., Sitkiewicz, A., Paneth, P., & Kobos, J. (2015). Rhabdomyosarcoma in children in the light of isotope ratio mass spectrometry. *Polish Journal of Pathology: Official Journal of the Polish Society of Pathologists*, 66(4), 383–388. <https://doi.org/10.5114/pjp.2015.57251>
262. Taran, K., Frączek, T., Sitkiewicz, A., Sikora-Szubert, A., Kobos, J., & Paneth, P. (2016). Hepatoblastoma Biology Using Isotope Ratio Mass Spectrometry: Utility of a Unique Technique for the Analysis of Oncological Specimens. *Postępy Higieny i Medycyny Doswiadczałnej (Online)*, 70(0), 797–802. <https://doi.org/10.5604/17322693.1209211>
263. Tavakoli-Yaraki, M., Karami-Tehrani, F., Salimi, V., & Sirati-Sabet, M. (2013). Induction of apoptosis by Trichostatin A in human breast cancer cell lines: Involvement of 15-Lox-1. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 34(1), 241–249. <https://doi.org/10.1007/s13277-012-0544-7>

264. Tchilian, E. Z., Wallace, D. L., Wells, R. S., Flower, D. R., Morgan, G., & Beverley, P. C. (2001). A deletion in the gene encoding the CD45 antigen in a patient with SCID. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 166(2), 1308–1313. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.2.1308>
265. Tea, I., De Luca, A., Schiphorst, A.-M., Grand, M., Barillé-Nion, S., Mirallié, E., Druil, D., Krempf, M., Hankard, R., & Tcherkez, G. (2021). Stable Isotope Abundance and Fractionation in Human Diseases. *Metabolites*, 11(6), 370. <https://doi.org/10.3390/metabo11060370>
266. Tea, I., Martineau, E., Antheaume, I., Lalande, J., Mauve, C., Gilard, F., Barillé-Nion, S., Blackburn, A. C., & Tcherkez, G. (2016). ¹³C and ¹⁵N natural isotope abundance reflects breast cancer cell metabolism. *Scientific Reports*, 6(1), 34251. <https://doi.org/10.1038/srep34251>
267. Thomson. (1897). XL. Cathode Rays - by J.J. Thomson. *Philosophical Magazine Letters*, 87(5), 303–326. <https://doi.org/10.1080/09500830701306165>
268. Thomson, J. J. (1912). XIX. Further experiments on positive rays. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 24(140), 209–253. <https://doi.org/10.1080/14786440808637325>
269. Thomson, J. J. (1913). Bakerian Lecture:—Rays of positive electricity. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 89(607), 1–20. <https://doi.org/10.1098/rspa.1913.0057>
270. Thude, H., Hundrieser, J., Wonigeit, K., & Schwinzer, R. (1995). A point mutation in the human CD45 gene associated with defective splicing of exon A. *European Journal of Immunology*, 25(7), 2101–2106. <https://doi.org/10.1002/eji.1830250745>
271. Tian, R., Zuo, X., Jaoude, J., Mao, F., Colby, J., & Shureiqi, I. (2017). ALOX15 as a suppressor of inflammation and cancer: Lost in the link. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 132, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2017.01.002>
272. Torrisi, F., Alberghina, C., D'Aprile, S., Pavone, A. M., Longhitano, L., Giallongo, S., Tibullo, D., Di Rosa, M., Zappalà, A., Cammarata, F. P., Russo, G., Ippolito, M., Cuttone, G., Li Volti, G., Vicario, N., & Parenti, R. (2022). The Hallmarks of Glioblastoma: Heterogeneity, Intercellular Crosstalk and Molecular Signature of Invasiveness and Progression. *Biomedicines*, 10(4), 806. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10040806>
273. Troisi, F., Pace, S., Jordan, P. M., Meyer, K. P. L., Bilancia, R., Ialenti, A., Borrelli, F., Rossi, A., Sautebin, L., Serhan, C. N., & Werz, O. (2022). Sex Hormone-Dependent Lipid Mediator Formation in Male and Female Mice During Peritonitis. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 818544. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.818544>
274. Tsai, Y.-T., Lo, W.-L., Chen, P.-Y., Ko, C.-Y., Chuang, J.-Y., Kao, T.-J., Yang, W.-B., Chang, K.-Y., Hung, C.-Y., Kikkawa, U., Chang, W.-C., & Hsu, T.-I. (2022). Reprogramming of arachidonate metabolism confers temozolomide resistance to glioblastoma through enhancing mitochondrial activity in fatty acid oxidation. *Journal of Biomedical Science*, 29, 21. <https://doi.org/10.1186/s12929-022-00804-3>
275. Tunçer, S., Keşküş, A. G., Çolakoğlu, M., Çimen, I., Yener, C., Konu, Ö., & Banerjee, S. (2017). 15-Lipoxygenase-1 re-expression in colorectal cancer alters endothelial cell features through enhanced expression of TSP-1 and ICAM-1. *Cellular Signalling*, 39, 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.07.022>
276. van Leyen, K. (2013). Lipoxygenase: An Emerging Target for Stroke Therapy. *CNS & neurological disorders drug targets*, 12(2), 191–199.
277. van Leyen, K., Kim, H. Y., Lee, S.-R., Jin, G., Arai, K., & Lo, E. H. (2006). Baicalein and 12/15-lipoxygenase in the ischemic brain. *Stroke*, 37(12), 3014–3018. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000249004.25444.a5>
278. Vaysse, P.-M., Heeren, R. M. A., Porta, T., & Balluff, B. (2017). Mass spectrometry imaging for clinical research – latest developments, applications, and current limitations. *Analyst*, 142(15), 2690–2712. <https://doi.org/10.1039/C7AN00565B>

279. Viita, H., Pacholska, A., Ahmad, F., Tietäväinen, J., Naarala, J., Hyvärinen, A., Wirth, T., & Ylä-Herttuala, S. (2012). 15-Lipoxygenase-1 induces lipid peroxidation and apoptosis, and improves survival in rat malignant glioma. *In Vivo (Athens, Greece)*, 26(1), 1–8.
280. Vijil, C., Hermansson, C., Jeppsson, A., Bergström, G., & Hultén, L. M. (2014). Arachidonate 15-lipoxygenase enzyme products increase platelet aggregation and thrombin generation. *PloS One*, 9(2), e88546. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088546>
281. Voegel, C. D., La Marca-Ghaemmaghami, P., Ehlert, U., Baumgartner, M. R., Kraemer, T., & Binz, T. M. (2018). Steroid profiling in nails using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Steroids*, 140, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2018.09.015>
282. Vogel, A., Strassburg, C. P., & Manns, M. P. (2003). 77 C/G mutation in the tyrosine phosphatase CD45 gene and autoimmune hepatitis: Evidence for a genetic link. *Genes and Immunity*, 4(1), 79–81. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6363918>
283. Vogeser, M., & Parhofer, K. G. (2007). Liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS)—Technique and applications in endocrinology. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 115(9), 559–570. <https://doi.org/10.1055/s-2007-981458>
284. Vuong, H. G., Altibi, A. M. A., Duong, U. N. P., Ngo, H. T. T., Pham, T. Q., Chan, A. K.-Y., Park, C.-K., Fung, K.-M., & Hassell, L. (2017). TERT promoter mutation and its interaction with IDH mutations in glioma: Combined TERT promoter and IDH mutations stratifies lower-grade glioma into distinct survival subgroups—A meta-analysis of aggregate data. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 120, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.09.013>
285. Walsh, K. M., Wiencke, J. K., Lachance, D. H., Wiemels, J. L., Molinaro, A. M., Eckel-Passow, J. E., Jenkins, R. B., & Wrensch, M. R. (2015). Telomere maintenance and the etiology of adult glioma. *Neuro-Oncology*, 17(11), 1445–1452. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov082>
286. Wan, Y., Li, D., Lv, Y., Wu, M., Li, L., & Yin, Z. (2019). Elevated levels of 15-lipoxygenase-1 contribute to the abnormal phenotypes of osteoblasts in human osteoarthritis. *Life Sciences*, 239, 116980. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116980>
287. Wan, Y., Lv, Y., Li, L., & Yin, Z. (2020). 15-Lipoxygenase-1 in osteoblasts promotes TGF- β 1 expression via inhibiting autophagy in human osteoarthritis. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 121, 109548. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109548>
288. Weigert, A., Strack, E., Snodgrass, R. G., & Brüne, B. (2018). MPGES-1 and ALOX5/-15 in tumor-associated macrophages. *Cancer and Metastasis Reviews*, 37(2), 317–334. <https://doi.org/10.1007/s10555-018-9731-3>
289. Weiß, F., van den Berg, B. H. J., Planatscher, H., Pynn, C. J., Joos, T. O., & Poetz, O. (2014). Catch and measure-mass spectrometry-based immunoassays in biomarker research. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1844(5), 927–932. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.09.010>
290. Werner, M., Pace, S., Czapka, A., Jordan, P. M., Gerstmeier, J., Koeberle, A., & Werz, O. (2020). Communication between human macrophages and epithelial cancer cell lines dictates lipid mediator biosynthesis. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 77(21), 4365–4378. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03413-w>
291. Whitfield, B. T., & Huse, J. T. (2022). Classification of adult-type diffuse gliomas: Impact of the World Health Organization 2021 update. *Brain Pathology*, n/a(n/a), e13062. <https://doi.org/10.1111/bpa.13062>

292. Wick, W., Weller, M., van den Bent, M., Sanson, M., Weiler, M., von Deimling, A., Plass, C., Hegi, M., Platten, M., & Reifenberger, G. (2014). MGMT testing—The challenges for biomarker-based glioma treatment. *Nature Reviews. Neurology*, *10*(7), 372–385. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.100>
293. Wien, W. (1898). *Untersuchungen über die elektrische Entladung in verdünnten Gasen*.
294. Wolf, B. O. (2004). *Mass-Balance Models for Animal Isotopic Ecology*.
295. Wu, Y., Mao, F., Zuo, X., Moussalli, M. J., Elias, E., Xu, W., & Shureiqi, I. (2014). 15-LOX-1 suppression of hypoxia-induced metastatic phenotype and HIF-1 α expression in human colon cancer cells. *Cancer Medicine*, *3*(3), 472–484. <https://doi.org/10.1002/cam4.222>
296. Xiao, G., Gao, X., Li, L., Liu, C., Liu, Z., Peng, H., Xia, X., Yi, X., & Zhou, R. (2021). An Immune-Related Prognostic Signature for Predicting Clinical Outcomes and Immune Landscape in IDH-Mutant Lower-Grade Gliomas. *Journal of Oncology*, *2021*, 3766685. <https://doi.org/10.1155/2021/3766685>
297. Xiong, Z., Liu, H., He, C., & Li, X. (2021). Hypoxia Contributes to Poor Prognosis in Primary IDH-wt GBM by Inducing Tumor Cells MES-Like Transformation Trend and Inhibiting Immune Cells Activity. *Frontiers in Oncology*, *11*, 782043. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.782043>
298. Xu, J., Cong, M., Park, T. J., Scholten, D., Brenner, D. A., & Kisseleva, T. (2015). Contribution of bone marrow-derived fibrocytes to liver fibrosis. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition*, *4*(1), 34–47. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2015.01.01>
299. Xu, J., & Kisseleva, T. (2015). Bone marrow-derived fibrocytes contribute to liver fibrosis. *Experimental Biology and Medicine*, *240*(6), 691–700. <https://doi.org/10.1177/1535370215584933>
300. Yang, I., Han, S. J., Sughrue, M. E., Tihan, T., & Parsa, A. T. (2011). Immune cell infiltrate differences in pilocytic astrocytoma and glioblastoma: Evidence of distinct immunological microenvironments that reflect tumor biology. *Journal of Neurosurgery*, *115*(3), 505–511. <https://doi.org/10.3171/2011.4.JNS101172>
301. Yigitkanli, K., Pekcec, A., Karatas, H., Pallast, S., Mandeville, E., Joshi, N., Smirnova, N., Gazaryan, I., Ratan, R. R., Witztum, J. L., Montaner, J., Holman, T. R., Lo, E. H., & van Leyen, K. (2013). Inhibition of 12/15-lipoxygenase as therapeutic strategy to treat stroke. *Annals of neurology*, *73*(1), 129–135. <https://doi.org/10.1002/ana.23734>
302. Yu, M. W., & Quail, D. F. (2021). Immunotherapy for Glioblastoma: Current Progress and Challenges. *Frontiers in Immunology*, *12*, 676301. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.676301>
303. Yuan, Y., Qi, C., Maling, G., Xiang, W., Yanhui, L., Ruofei, L., Yunhe, M., Jiewen, L., & Qing, M. (2016). TERT mutation in glioma: Frequency, prognosis and risk. *Journal of Clinical Neuroscience*, *26*, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2015.05.066>
304. Zadka, Ł., Chabowski, M., Grybowski, D., Piotrowska, A., & Dzięgiel, P. (2021). Interplay of stromal tumor-infiltrating lymphocytes, normal colonic mucosa, cancer-associated fibroblasts, clinicopathological data and the immunoregulatory molecules of patients diagnosed with colorectal cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *70*(9), 2681–2700. <https://doi.org/10.1007/s00262-021-02863-1>
305. Zaitsev, S., Sharma, H. S., Sharma, A., Manzhulo, I., Polevshchikov, A., Kudriavtsev, I., Khotimchenko, Y., Pak, O., Bryukhovetskiy, A., & Bryukhovetskiy, I. (2020). Pro-inflammatory modification of cancer cells microsurrroundings increases the survival rates for rats with low differentiated malignant glioma of brain. *International Review of Neurobiology*, *151*, 253–279. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2020.03.027>
306. Zhang, M., Zhang, Y., Wang, H., Li, N., Li, B., Xiao, H., Bian, W., & Cai, Z. (2021). [Mass spectrometry imaging technology and its application in breast cancer

- research]. *Se Pu = Chinese Journal of Chromatography*, 39(6), 578–587. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1123.2020.10005>
307. Zhang, N., Zhang, H., Wang, Z., Dai, Z., Zhang, X., Cheng, Q., & Liu, Z. (2021). Immune Infiltrating Cells-Derived Risk Signature Based on Large-scale Analysis Defines Immune Landscape and Predicts Immunotherapy Responses in Glioma Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 12, 691811. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.691811>
 308. Zhang, Q., Fu, Q., Bai, X., & Liang, T. (2020). Molecular Profiling–Based Precision Medicine in Cancer: A Review of Current Evidence and Challenges. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2020.532403>
 309. Zhang, X., Zhao, H., Shi, X., Jia, X., & Yang, Y. (2020). Identification and validation of an immune-related gene signature predictive of overall survival in colon cancer. *Aging (Albany NY)*, 12(24), 26095–26120. <https://doi.org/10.18632/aging.202317>
 310. Zhao, J., Zhang, L., Dong, X., Liu, L., Huo, L., & Chen, H. (2018). High Expression of Vimentin is Associated With Progression and a Poor Outcome in Glioblastoma. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology: AIMM*, 26(5), 337–344. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000420>
 311. Zheng, W., Zhang, R., Huang, Z., Li, J., Wu, H., Zhou, Y., Zhu, J., & Wang, X. (2022). A Qualitative Signature to Identify TERT Promoter Mutant High-Risk Tumors in Low-Grade Gliomas. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, 806727. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.806727>
 312. Zhu, H., Glasgow, W., George, M. D., Chrysovergis, K., Olden, K., Roberts, J. D., & Eling, T. (2008). 15-lipoxygenase-1 activates tumor suppressor p53 independent of enzymatic activity. *International Journal of Cancer*, 123(12), 2741–2749. <https://doi.org/10.1002/ijc.23855>
 313. Zhu, Y., Song, Z., Wang, Z., & Chen, G. (2022). Protective Prognostic Biomarkers Negatively Correlated with Macrophage M2 Infiltration in Low-Grade Glioma. *Journal of Oncology*, 2022, 3623591. <https://doi.org/10.1155/2022/3623591>
 314. Zuo, S., Wei, M., Wang, S., Dong, J., & Wei, J. (2020). Pan-Cancer Analysis of Immune Cell Infiltration Identifies a Prognostic Immune-Cell Characteristic Score (ICCS) in Lung Adenocarcinoma. *Frontiers in Immunology*, 11, 1218. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01218>
 315. Zuo, X., Peng, Z., Wu, Y., Moussalli, M. J., Yang, X. L., Wang, Y., Parker-Thornburg, J., Morris, J. S., Broaddus, R. R., Fischer, S. M., & Shureiqi, I. (2012). Effects of Gut-Targeted 15-LOX-1 Transgene Expression on Colonic Tumorigenesis in Mice. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 104(9), 709–716. <https://doi.org/10.1093/jnci/djs187>
 316. <https://www.aans.org/en/Patients/Neurosurgical-Conditions-and-Treatments/Astrocytoma-Tumors>, dostęp 01.05.2022
 317. https://pl.wikipedia.org/w/index.php?title=Obrazowanie_metod%C4%85_rezonansu_magnetycznego&oldid=62216581, dostęp 01.02.2021
 318. <http://www.mp.pl/social/article/270928>, dostęp 02.05.2022
 319. <http://www.mp.pl/social/article/60937>, dostęp 24.04.2022
 320. <https://glioma-center.com/o-metodach-leczenia/radioterapia/>, dostęp 02.05.2022
 321. <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=lipoxygenases&sort=date&timeline=expanded>, dostęp 04.05.2022r.
 322. <https://www.medianauka.pl/wegiel>, dostęp 12.02.2022
 323. <https://www.medianauka.pl/azot>, dostęp 12.02.2022

8. Aneks

8.1. Alfabetyczny wykaz skrótów i akronimów wykorzystanych w tekście

Skrót	Nazwa w języku polskim	Nazwa w języku angielskim
12B-LOX	12-lipooksygenaza arachidonianowa	<i>arachidonate 12-lipoxygenase</i>
12-LOX	12-lipooksygenaza arachidonianowa	<i>arachidonate 12-lipoxygenase</i>
15-LOX	15-lipooksygenaza arachidonianowa	<i>arachidonate 15-lipoxygenase</i>
2-HG	2-hydroksyglutarat	<i>2-hydroxyglutarate</i>
5-LOX	5-lipooksygenaza arachidonianowa	<i>arachidonate 5-lipoxygenase</i>
ALOX	lipooksygenaza arachidonowa	<i>arachidonate lipoxygenase</i>
ATRX	regulator transkrypcji ATRX	<i>alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked gene</i>
BRAF	gen kodujący białko B-Raf	<i>gene that encodes a protein called B-Raf</i>
CAFs	fibroblasty związane z guzem	<i>cancer-associated fibroblast</i>
CAR	chimerowy receptor antygenowy	<i>chimeric antigen receptor</i>
CD45	kompleks różnicowania 45	<i>cluster of differentiation 45</i>
CDKN2A	inhibitor cyklinozależnej kinazy 2A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CDKN2B	inhibitor cyklinozależnej kinazy 2B	<i>inhibitor cyklinozależnej kinazy 2B</i>
EBM	medycyna oparta na faktach	<i>evidence based medicine</i>

EGFR	receptor naskórkowego czynnika wzrostu	<i>epidermal growth factor receptor</i>
E-LOX-3	lipooksygenaza typu naskórkowego E3	<i>epidermis-type lipoxygenase 3</i>
FISH	fluorescencyjna hybrydyzacja in situ	<i>fluorescent in situ hybridization</i>
GC	chromatografia gazowa	<i>gas chromatography</i>
GFAP	kwaśne białko włóknikowe	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GSCs	nowotworowe komórki macierzyste glioblastoma	<i>glioblastoma stem-like cells</i>
H3 K27M	metylacja lizyny w pozycji 27 histonu 3	<i>histone H3 lysine 27 methylation</i>
IAEA	Międzynarodowa Agencja Energii Atomowej	<i>International Atomic Energy Agency</i>
ICIs	inhibitory punktów kontroli odpowiedzi immunologicznej	<i>immune checkpoint inhibitors</i>
IDH1	dehydrogenaza izocytrynianowa 1	<i>isocitrate dehydrogenase 1</i>
IDH2	dehydrogenaza izocytrynianowa 2	<i>isocitrate dehydrogenase 2</i>
IHC	immunohistochemia	<i>immunohistochemistry</i>
IRMS	spektrometr masowy izotopów stabilnych	<i>isotope-ratio mass spectrometry</i>
LCA	wspólny antygen leukocytny	<i>leukocyte common antigen</i>
LOX	lipoksygenaza	<i>lipoxygenase</i>
MDSCs	szpikopochodne komórki supresorowe	<i>myeloid-derived suppressor cells</i>
MGMT	metylotransferaza O-6-metyloguaniny	<i>O-6-methylguanine methyltransferase</i>

MRI	obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego	<i>magnetic resonance imaging</i>
MVP	proliferacja mikronaczyniowa	<i>microvascular proliferation</i>
NEC	not elsewhere classified	<i>niesklasyfikowany nigdzie indziej</i>
NK	limfocyty NK	<i>natural killers</i>
NOS	nieokreślony, niedający się sklasyfikować	<i>not otherwise specified</i>
OUN	ośrodkowy układ nerwowy	<i>central nervous system</i>
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy	<i>polymerase chain reaction</i>
PUFAs	wielonienasycone kwasy tłuszczowe	<i>polyunsaturated fatty acids</i>
RPTP	receptor białkowej fosfatazy tyrozynowej	<i>receptor type protein tyrosine phosphatase</i>
SCID	ciężki złożony niedobór odporności	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SD	odchylenie standardowe	<i>standard deviation</i>
TAMs	makrofagi związane z guzem	<i>tumor-associated macrophages</i>
TERT	odwrotna transkryptaza telomerazy	<i>telomerase reverse transcriptase</i>
TILs	limfocyty naciekające guz	<i>tumor-infiltrating lymphocytes</i>
VEGF	czynnik wzrostu śródbłonna naczyń	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia	<i>World Health Organization</i>
α-KG	α-ketoglutarat	<i>α-keto-glutarate</i>

8.2. Spis tabel

Tabela 1. Fragment klasyfikacji nowotworów OUN, dotyczący glejaków, według WHO, edycja IV, 2016. Wersja oryginalna.	12
Tabela 2. Fragment klasyfikacji nowotworów OUN, dotyczący glejaków, według WHO, edycja V, 2021. Wersja oryginalna.	13
Tabela 3. Charakterystyczne różnice molekularne pomiędzy <i>oligodendroglioma, IDH-mutant, 1p19q codeleted</i> a <i>astrocytoma, IDH-mutant</i>	34
Tabela 4. Charakterystyka kliniczna grupy badanej w badaniach metodami immunohistochemicznymi.	61
Tabela 5. Charakterystyka kliniczna grupy badanej w analizie składu izotopowego.	62
Tabela 6. Właściwości króliczych przeciwciał poliklonalnych dla 15-LOX i LCA.	63
Tabela 7. Schemat pomiarów metodą izotopowej spektrometrii mas.	68
Tabela 8. Immunoekspresja białka 15-LOX w obrębie guza i w jego otoczeniu.	71
Tabela 9. Immunoekspresja białka LCA w obrębie guza.	71
Tabela 10. Wyniki pomiarów stosunku izotopowego stabilnych izotopów węgla i azotu oraz stosunku masowego N/C w centrum guza.	74
Tabela 11. Wyniki pomiarów stosunku izotopowego stabilnych izotopów węgla i azotu oraz stosunku masowego N/C na obrzeżu guza.	75
Tabela 12. Wyniki pomiarów stosunku izotopowego stabilnych izotopów węgla i azotu oraz stosunku masowego N/C w makroskopowo niezmiennych tkankach, otaczających guz.	76
Tabela 13. Analiza porównawcza otrzymanych wyników stosunku izotopowego $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ pomiędzy centrum guza, jego obrzeżem oraz makroskopowo niezmiennymi tkankami, bezpośrednio otaczającymi guz.	77
Tabela 14. Analiza porównawcza otrzymanych wyników stosunku izotopowego $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ pomiędzy centrum guza, jego obrzeżem oraz makroskopowo niezmiennymi tkankami, bezpośrednio otaczającymi guz.	77
Tabela 15. Analiza porównawcza otrzymanych wyników stosunku masowego N/C pomiędzy centrum guza, jego obrzeżem oraz makroskopowo niezmiennymi tkankami, bezpośrednio otaczającymi guz.	78
Tabela 16. Podsumowanie istotnych statystycznie wyników analizy statystycznej badań immunohistochemicznych.	122
Tabela 17. Podsumowanie istotnych statystycznie wyników analizy statystycznej badań izotopowych metodą spektrometrii mas.	126

8.3. Spis wykresów

Wykres 1. Test Kruskala-Wallisa - istotne statystycznie różnice pomiędzy stopniem złośliwości histologicznej guza (oś X) a liczbą komórek 15-LOX(+) / HPF w obrębie guza (oś Y)..	80
Wykres 2. Test Kruskala-Wallisa - istotna statystycznie różnica pomiędzy rozpoznaniem histopatologicznym (oś X) a stosunkiem liczby komórek 15-LOX(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF (oś Y).	81
Wykres 3. Test Kruskala-Wallisa - istotne statystycznie różnice pomiędzy stopniem złośliwości histologicznej guza (oś X) a stosunkiem liczby komórek 15-LOX(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF (oś Y).	82
Wykres 4. Test Wilcoxon - zróżnicowanie pomiędzy płcią (oś X) a liczbą komórek 15-LOX(+) w obrębie guza / HPF (oś Y)..	84
Wykres 5. Test Wilcoxon - zróżnicowanie pomiędzy płcią (oś X) a stosunkiem liczby komórek 15-LOX(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF (oś Y)..	84
Wykres 6. Test Wilcoxon - zróżnicowanie pomiędzy płcią (oś X) a liczbą komórek 15-LOX(+) w bezpośrednim otoczeniu nowotworu / HPF (oś Y)..	85
Wykres 7. Test Wilcoxon - zróżnicowanie pomiędzy lokalizacją guza względem struktur anatomicznych (oś X) a liczbą komórek 15-LOX(+) w bezpośrednim otoczeniu nowotworu / HPF.	85
Wykres 8. Test Wilcoxon - zróżnicowanie pomiędzy stopniem złośliwości histologicznej guza (oś X), a liczbą komórek 15-LOX(+) w bezpośrednim otoczeniu nowotworu / HPF.	86
Wykres 9. Test Kruskala-Wallisa - zróżnicowanie pomiędzy rozpoznaniem histopatologicznym (oś X) a liczbą komórek 15-LOX(+) w obrębie guza / HPF (oś Y).	86
Wykres 10. Test Wilcoxon - zróżnicowanie pomiędzy rozpoznaniem histopatologicznym (oś X) a liczbą komórek 15-LOX(+) w otoczeniu guza / HPF (oś Y).	87
Wykres 11. Test Kruskala-Wallisa - różnica pomiędzy rozpoznaniem histopatologicznym (oś X) a procentem komórek 15-LOX(+) w otoczeniu guza / HPF.	87
Wykres 12. Test Kruskala-Wallisa - istotne statystycznie różnice pomiędzy stopniem złośliwości histologicznej guza (oś X) a liczbą komórek LCA(+) / HPF (oś Y).	89
Wykres 13. Test Kruskala-Wallisa - istotne statystycznie różnice pomiędzy stopniem złośliwości histologicznej guza (oś X) a stosunkiem liczby komórek LCA(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF..	90
Wykres 14. Test Kruskala-Wallisa - istotne statystycznie różnice pomiędzy rozpoznaniem histopatologicznym (oś X) a liczbą komórek LCA(+) / HPF (oś Y).....	91
Wykres 15. Test Kruskala-Wallisa - istotne statystycznie różnice pomiędzy rozpoznaniem histopatologicznym (oś X) a stosunkiem liczby komórek LCA(+) do liczby komórek nowotworowych / HPF(oś Y).....	92
Wykres 16. Test Wilcoxon - zróżnicowanie pomiędzy płcią (oś X) a liczbą komórek LCA(+) / HPF..	93
Wykres 17. Test Wilcoxon - zróżnicowanie pomiędzy lokalizacją guza względem struktur anatomicznych (oś X) a liczbą komórek LCA(+) / HPF.	94

Wykres 18. Test Kruskala-Wallisa - istotne statystycznie różnice pomiędzy rozpoznaniem histopatologicznym (oś X) a indeksem Ki-67 (oś Y).	95
Wykres 19. Test Kruskala-Wallisa - istotne statystycznie różnice pomiędzy stopniem złośliwości histologicznej guza (oś X) a indeksem Ki-67 (oś Y).	97
Wykres 20. Test Wilcoxon - istotne statystycznie różnice pomiędzy stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (oś Y) w centrum guza oraz na obrzeżu guza w zależności od płci (oś X).	101
Wykres 21. Test Wilcoxon - istotna statystycznie różnica pomiędzy stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (oś Y) w centrum guza w zależności od lokalizacji guza względem linii pośrodkowej ciała (oś X) oraz trend dotyczący związku pomiędzy stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (oś Y) na obrzeżu guza w zależności od lokalizacji guza względem linii pośrodkowej ciała (oś X).	102
Wykres 22. Test Kruskala-Wallisa - Test Kruskala-Wallisa - zróżnicowanie pomiędzy lokalizacją guza względem struktur anatomicznych (oś X) a stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza (oś Y).	103
Wykres 23. Test Kruskala-Willisa - istotne statystycznie różnice pomiędzy stosunkiem masowym N/C (oś Y) w centrum guza, na obrzeżu guza i w tkance otaczającej guz (oś X).	104
Wykres 24. Test Kruskala-Willisa - istotne statystycznie różnice pomiędzy stosunkiem masowym N/C (oś Y) w centrum guza, na obrzeżu guza i w tkance otaczającej guz w zależności od płci (oś X).	105
Wykres 25. Test Kruskala-Willisa - istotne statystycznie różnice pomiędzy stosunkiem masowym N/C (oś Y) w centrum guza, na obrzeżu guza i w tkance otaczającej guz w zależności od lokalizacji guza względem linii pośrodkowej ciała (oś X).	107
Wykres 26. Test Kruskala-Willisa - istotne statystycznie różnice pomiędzy stosunkiem masowym N/C (oś Y) w centrum guza, na obrzeżu guza i w tkance otaczającej guz w zależności od lokalizacji guza względem struktur anatomicznych (oś X).	108
Wykres 27. Test Kruskala-Willisa - istotne statystycznie różnice pomiędzy stosunkiem masowym N/C (oś Y) w centrum guza, na obrzeżu guza i w tkance otaczającej guz w zależności od stopnia złośliwości histologicznej guza (oś X).	109
Wykres 28. Test Kruskala-Willisa - istotne statystycznie różnice pomiędzy stosunkiem masowym N/C (oś Y) w centrum guza, na obrzeżu guza i w tkance otaczającej guz w obrębie guzów z rozpoznaniem <i>glioblastoma, IDH-wildtype</i> (oś X).	111
Wykres 29. Korelacja dodatnia pomiędzy stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza (oś Y) a stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w tkankach otaczających guz (oś X).	114
Wykres 30. Korelacja dodatnia pomiędzy stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ na obrzeżu guza (oś Y) a stosunkiem izotopowym $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w tkankach otaczających guz (oś X).	114

8.4. Spis diagramów

Diagram 1. Zbiorcza prezentacja wykresów rozrzutu wybranych parametrów.	73
Diagram 2. Graficzne przedstawienie współczynników korelacji Spearmana.	99
Diagram 3. Graficzne przedstawienie współczynników korelacji Spearmana dotyczących badań izotopowych.....	113
Diagram 4. Analiza składowych głównych grupowania przestrzennego w wymiarach PCA1 i PCA2 dotycząca lokalizacji guza względem linii pośrodkowej ciała.....	117
Diagram 5. Analiza składowych głównych grupowania przestrzennego pacjentów w wymiarach PCA1 i PCA2 dotycząca rozpoznania histopatologicznego.	118
Diagram 6. Analiza składowych głównych grupowania przestrzennego pacjentów w wymiarach PCA1 i PCA2 dotycząca stopnia złośliwości histologicznej guza.....	119
Diagram 7. Diagram zmiennych analizy składowych głównych.....	120
Diagram 8. Diagram zmiennych analizy składowych głównych dotyczących pomiarów składu izotopowego.	121

8.5. Spis fotografii

Fot. 1. Materiał pooperacyjny, utrwalony w formalinie, pochodzący z guza ośrodkowego układu nerwowego. Zdjęcie z archiwum autorki.....	22
Fot. 2. Obraz mikroskopowy glejaka wielopostaciowego (barwienie hematoksyliną i eozyną - H&E, powiększenie 200x). W centrum widoczna martwica palisadowa. Zdjęcie z bazy obrazów mikroskopowych, stworzonych w toku badań.	23
Fot. 3. Wynik przeprowadzonego dla potrzeb badań wyszukiwania liczby artykułów na temat lipooksygenaz w serwisie Pubmed.....	48
Fot. 4. Aparat PT Link Dako, użyty do odsłonięcia antygenów - Katedra Onkologii, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Zdjęcie z archiwum autorki.	64
Fot. 5 Kapsułka cynowa, wykorzystywana do pomiarów spektrometrycznych. Zdjęcie z archiwum autorki.....	67
Fot. 6. Ekspresja białka 15-LOX w komórkach mikrogleju, oligodendrocytach i makrofagach szpikopochodnych w obrębie badanych guzów OUN (A, B) i tkanek otaczających guz (C,D), u wybranych pacjentów z grupy badanej, 400x. Zdjęcie z bazy obrazów mikroskopowych, stworzonych w toku badań.	70
Fot. 7. Ekspresja białka LCA w komórkach szpikopochodnych w obrębie badanych guzów OUN u wybranych pacjentów z grupy badanej, 400x. Zdjęcie z bazy obrazów mikroskopowych, stworzonych w toku badań.....	72

8.6. Spis rycin

Rycina 1. Fragmenty klasyfikacji glejaków rozlanych wg WHO z 2016 i 2021 roku. Schemat na podstawie Whitfield & Huse, 2022. Legenda: granatowe strzałki - korelacje silne, żółte strzałki - korelacje potencjalne.....	15
Rycina 2. Schemat obrazujący zależności komórek nowotworowych, ich mikrośrodowiska i otoczenia. Ilustracja własna autorki.	20
Rycina 3. Schemat pobierania materiału do badania spektrometrycznego z materiału pooperacyjnego. Ilustracja własna autorki.....	60

9. Streszczenie

9.1. Streszczenie w języku polskim

Glejaki są nowotworami złośliwymi ośrodkowego układu nerwowego (OUN) wywodzącymi się z komórek, pełniących funkcję podporową i odżywczą. Stanowią liczną i niejednorodną grupę nowotworów, których typy różnią się między sobą pochodzeniem, lokalizacją, stopniem złośliwości histologicznej oraz podłożem molekularnym.

Glejaki stanowią najczęstszą grupę nowotworów OUN u osób dorosłych, charakteryzującą się nie w pełni przewidywalnym przebiegiem i w większości dużą agresywnością. Efekty leczenia chorych z glejakami nie są zadowalające a wyleczalność niska w stosunku do podejmowanych wysiłków terapeutycznych. W glejakach o najwyższym stopniu złośliwości histologicznej nawet przy zastosowaniu najnowocześniejszych metod leczenia w większości przypadków nie udaje się osiągnąć przeżycia powyżej 2 lat. Wskaźnik 5-letniego przeżycia dla glioblastoma waha się w granicach 5%. Najczęściej jednak chorzy umierają w ciągu roku. Pomimo że w ostatnich latach notuje się spadek zachorowalności na glejaki u dorosłych, procentowy udział rozpoznań glejaka wielopostaciowego w tej grupie wciąż wzrasta, co w powiązaniu z niekorzystnym rokowaniem czyni glioblastoma modelowym obiektem licznych badań naukowych nad glejakami, a poszukiwanie nowych aspektów złożonej biologii tego nowotworu i innych niż dotychczas ujawnione czynników rokowniczych staje się narastającą potrzebą współczesnej onkologii.

Lipooksygenazy (LOX) są białkowymi enzymami z klasy oksygenaz, w większości przyspieszającymi peroksydację wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, głównie kwasu arachidonowego, linolowego i α -linolowego. 15-lipooksygenaza arachidonowa (15-LOX) jest kodowana przez gen ALOX15. Jest enzymem, który reaguje z wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi i charakteryzuje się właściwościami przeciwnowotworowymi, które zostają utracone wraz ze spadkiem ekspresji tego białka. Nadekspresja 15-LOX prowadzi natomiast do hamowania zapalenia poprzez inhibicję agregacji komórek nacieku zapalnego.

W opublikowanych badaniach odnaleziono informacje na temat wpływu

metabolizmu lipidów w makrofagach związanych z guzem (TAMs) na komórki nowotworowe, głównie poprzez mediatory lipidowe, produkowane między innymi przez lipooksygenazy (LOX), które są przedmiotem przedstawionej pracy. Wzmożona oksydacja kwasów tłuszczowych oraz ich synteza "de novo" mogą mieć znaczący wpływ na mikrośrodowisko nowotworu, wspierając wzrost guza i przyczyniając się do jego oporności na leczenia radio- i chemioterapeutyczne.

Białko LCA to wspólny antygen leukocytny, który ulega ekspresji tylko i wyłącznie w jądrzastych komórkach układu hematopoetycznego, zarówno tych dojrzałych jak i prekursorowych. LCA spełnia bardzo ważną rolę w działaniu układu immunologicznego, głównie poprzez inicjację szlaków sygnałowych limfocytów T. Prekursorowe szpikowe komórki LCA dodatkowo są obiektem wielu współcześnie prowadzonych badań.

W literaturze opisywane są jako potencjalny marker, czynnik rokowniczy i target terapeutyczny wielu jednostek chorobowych, w tym glejaka wielopostaciowego.

Obecność komórek szpikopochodnych LCA(+) stwierdza się również w mikrośrodowisku nowotworu. Największy odsetek komórek nienowotworowych mikrośrodowiska glejaków stanowią makrofagi. Obok nich stwierdza się także limfocyty T i B, komórki NK, szpikopochodne komórki supresorowe, neutrofile i mastocyty. Ich obecność wywiera bardzo duży wpływ na komórki nowotworowe, a wydzielane przez nie chemokiny biorą udział w procesach wzmagających proliferację guza, zapobiegających apoptozie, wzmagających angiogenezę i przyczyniających się do zwiększonej inwazji oraz przerzutowania

Istniejące liczne prace dotyczące roli szpikopochodnych komórek LCA-dodatnich w biologii wielu nowotworów oraz ekspresji 15-LOX w komórkach wchodzących w skład mikrośrodowiska guzów, dają nadzieję, że także w przypadku charakteryzujących się tak wysoką śmiertelnością glejaków - ewaluacja tych białek może dostarczyć nowych informacji o potencjalnych implikacjach klinicznych.

Spektrometria mas jest jedną z najbardziej przydatnych i uniwersalnych metod analitycznych, polegających na pomiarze stosunku masy do ładunku elektrycznego badanego jonu. Proces prowadzący do zmiany liczby izotopów tego samego pierwiastka, wchodzących w skład danego materiału nazywany jest frakcjonowaniem izotopowym. Wynika on z działania na substancję różnych

czynników fizycznych i chemicznych i jest procesem naturalnym i samoistnym. W organizmach żywych frakcjonowanie odzwierciedla zmiany zachodzące podczas wzrostu i metabolizmu komórki. Metodą pozwalającą na ujawnienie składu izotopowego badanej próbki jest izotopowa spektrometria mas. Różnica względna stosunków izotopów stabilnych (δ) jest aktualnie przedmiotem wielu badań naukowych, w tym interdyscyplinarnych, w największym stopniu obejmując nadal jednak zawężony obszar - biologię, chemię i fizykę. Najnowszym zastosowaniem spektrometrii mas są oznaczenia w onkologii - po raz pierwszy bezpośrednio w tkance nowotworowej "*in vivo*" przeprowadzone z wykorzystaniem izotopowej odmiany tej metody, w której ewaluuje się stabilne (nie promieniotwórcze) izotopy pierwiastków naturalnie występujące w tkankach prawidłowych i zmienionych patologicznie.

Projekt badawczy oparty został o najnowsze odkrycia dotyczące roli ekspresji 15-LOX oraz szpikopochodnych komórek LCA-dodatnich w złożonym procesie nowotworzenia. Pojedyncze, istniejące prace na temat wykorzystania IRMS w badaniach transformowanych nowotworowo tkanek wskazują na związek składu izotopowego z funkcjonowaniem tkanek nowotworowych. Nie odnaleziono jednak żadnych badań w tym zakresie dotyczącym glejaków. Badanie zakłada ocenę ekspresji badanych białek w wybranych guzach OUN, ze szczególnym uwzględnieniem glejaka wielopostaciowego, ich mikrośrodowisku oraz otoczeniu wraz z ewaluacją składu izotopowego azotu i węgla. Wiodącym celem pracy jest poznawanie nieznanych aspektów biologii wybranych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego oraz poszukiwanie markerów o potencjalnym znaczeniu diagnostycznym i rokowniczym z wykorzystaniem nowoczesnych interdyscyplinarnych metod badawczych. Ocena mikrośrodowiska i otoczenia nowotworu, które w ostatnich czasach okazały się być niezwykle ważne dla procesu kancerogenezy służy lepszemu zrozumieniu interakcji guza i gospodarza, a określenie różnic pomiędzy zmianą a prawidłową tkanką - potencjalnemu wykorzystaniu tych informacji w praktyce klinicznej

Cele pracy:

1. Ewaluacja ekspresji produktu genu ALOX-15 (białka 15-LOX) oraz obecności szpikopochodnych komórek LCA - dodatnich w wybranych nowotworach ośrodkowego układu nerwowego pochodzenia glejowego.

2. Wstępna ocena potencjalnej wartości diagnostycznej i prognostycznej ekspresji produktu genu ALOX-15 (białka 15-LOX) oraz szpikopochodnych komórek LCA - dodatnich w wybranych nowotworach ośrodkowego układu nerwowego pochodzenia glejowego.
3. Ustalenie wartości stosunku izotopowego izotopów stabilnych azotu i węgla w wybranych nowotworach ośrodkowego układu nerwowego pochodzenia glejowego i ich otoczeniu.
4. Próba oceny potencjalnych zalet i ograniczeń praktycznego zastosowania izotopowej spektrometrii mas w badaniach nowotworów ośrodkowego układu nerwowego.

Na podstawie zgody Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z dnia 10 września 2019 nr RNN/350/19/KE do badania włączono 144 przypadki z rozpoznaniem nowotworu pochodzenia glejowego, w tym 109 przypadków, pochodzących z archiwum Katedry Onkologii Zakładu Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, pobranych i rozpoznanych w latach 2017-2020 do przeprowadzenia badań immunohistochemicznych oraz 35 przypadków pozyskanych w Oddziale Klinicznym Neurochirurgii i Onkologii Centralnego Układu Nerwowego Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. Norberta Barlickiego w Łodzi - w których dodatkowo do badań immunohistochemicznych wykonano oznaczenia składu izotopowego.

Badania składu izotopowego azotu i węgla zostały przeprowadzone z wykorzystaniem spektrometru masowego stosunku izotopowego z przepływem ciągłym Sercon 20-22 sprzężonego z analizatorem pierwiastkowym.

Materiał z guzów standardowo utrwalany formaliną i zatopiony w blokach parafinowych dla potrzeb prezentowanych badań skrawano przy użyciu mikrotomu na skrawki o grubości 3-4 mikrometrów, które następnie wykorzystano do badań immunohistochemicznych. Barwienia immunohistochemiczne oparte zostały na metodzie immunoperoksydazowej z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych przeciwciał króliczych poliklonalnych skierowanych przeciw 15-LOX i LCA.

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą pakietów języka R (v. 4.1), Obejmowała ona wyniki oceny odczynów immunohistochemicznych oraz wyniki pomiarów izotopowych . Wzięto pod uwagę: minimum, maksimum,

średnią, medianę, odchylenie standardowe oraz zakres wartości przeprowadzonych oznaczeń. W celu porównania parametrów pomiędzy grupami wykorzystano nieparametryczny test Manna-Whitneya-Wilcoxon dla dwóch zmiennych niezależnych oraz test Kruskala-Wallisa dla trzech i więcej zmiennych niezależnych wraz z nieparametrycznym testem Wilcoxon jako testem post-hoc w przypadku istotnych porównań. Korelacje pomiędzy poszczególnymi zmiennymi zbadano przy pomocy współczynnika korelacji rang Spearmana. Do znalezienia ewentualnych prawidłowości między cechami przeprowadzono analizę składowych głównych (PCA). Wszystkie wyniki analizy uznawano za znamienne statystycznie dla $p < 0,05$.

Wykazano istnienie 20 istotnych statystycznie związków pomiędzy immunoekspresją badanych białek 15-LOX oraz LCA a wybranymi cechami histoklinicznymi, 3 znamienne statystycznie różnice w składzie izotopowym węgla w zależności od płci i lokalizacji guza względem linii pośrodkowej ciała oraz 24 znamienne statystycznie różnice w stosunku masowym N/C w zależności od zastosowanych zmiennych grupujących. Ponadto ujawniono 13 trendów, 17 korelacji oraz 3 przestrzenne grupowania badanych parametrów.

Badania doprowadziły do następujących wniosków:

1. W glejakiach, ekspresja białka 15-LOX, zarówno w guzie jak i jego otoczeniu, jest zróżnicowana. Immunoekspresja 15-LOX oraz stosunek liczby komórek 15-LOX(+) do liczby komórek nowotworowych maleją wraz ze wzrostem stopnia złośliwości histologicznej, a ponadto stosunek liczby komórek 15-LOX(+) do liczby komórek nowotworowych jest wyższy w glejakiach rozlanych innych niż glejak wielopostaciowy (*adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant*) niż w samym glejaku wielopostaciowym (*glioblastoma, IDH-wildtype*). Immunoekspresja LCA w komórkach mikrośrodowiska glejaków nie jest jednorodna. Zarówno liczba komórek LCA(+) jak i ich stosunek do liczby komórek nowotworowych są większe w guzach o wyższym stopniu złośliwości histologicznej. Ponadto liczba komórek LCA(+) oraz ich stosunek do liczby komórek nowotworowych są większe w glejaku wielopostaciowym (*glioblastoma, IDH-wildtype*) niż w glejakiach rozlanych innych niż glejak wielopostaciowy (*adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant*).

2. Ujawnione w badaniach zróżnicowanie ekspresji badanych białek pozostaje w znamienych statystycznie związkach z uznanymi czynnikami o znaczeniu prognostycznym tj. ze stopniem złośliwości histologicznej guza wg uprzedniej klasyfikacji oraz z typem histopatologicznym nowotworu w odniesieniu do nowej klasyfikacji, co pośrednio może wiązać ekspresję 15-LOX i LCA z rokowaniem. W kontekście wprowadzenia obowiązującego – molekularnego podłoża podziału guzów OUN wg najnowszej klasyfikacji WHO nie wydaje się by inne czynniki mogły być równorzędnymi odpowiednikami badań molekularnych w diagnostyce tych rozrostów, jednakże zróżnicowanie wartości ekspresji badanych białek pomiędzy typami histopatologicznymi wydaje się interesującym znaleziskiem, którego przyczyny mogłyby być przedmiotem dalszych badań.
3. Wartości stosunku izotopowego izotopów stabilnych azotu i węgla w badanych tkankach nowotworowych i ich otoczeniu nie różniły się istotnie. Jednakże stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w centrum guza i na obrzeżu guza okazał się zależeć od płci (znamiennie wyższy u kobiet), a także od lokalizacji guza względem linii pośrodkowej ciała (znamiennie wyższy po stronie prawej). Znaleziska te są zastanawiające, ale jako tylko jednostkowe na obecnym zupełnie początkowym etapie badań izotopowych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego nie mogą zostać w pełni wiarygodnie wyjaśnione.
4. Największą zaletą izotopowej spektrometrii mas w potencjalnych badaniach guzów ośrodkowego układu nerwowego wydaje się być możliwość uzyskania wiarygodnego wyniku oznaczeń z minimalnej, w porównaniu ze standardowym badaniem histopatologicznym, ilości materiału. Do ograniczeń praktycznego zastosowania prezentowanej metody należy przede wszystkim niewielka dostępność aparatury oraz bezpowrotne zniszczenie materiału w procesie analitycznym.

Ustalenie składu izotopowego węgla i azotu w grupie glejaków ma na obecnym etapie zaawansowania badań izotopowych zmian nowotworowych charakter poznawczy i może przyczynić się do lepszego zrozumienia złożonej biologii tych zmian oraz roli procesów frakcjonowania izotopowego w chorobie nowotworowej, a badanie mające na celu analizę skomplikowanych

mechanizmów oddziaływania komórek nowotworowych i ich mikrośrodowiska mogą przysłużyć się do lepszego zrozumienia procesu nowotworzenia glejaków oraz przynieść potencjalne nowe czynniki prognostyczne, predykcyjne czy punkty uchwytu terapii celowanych.

9.2. Streszczenie w języku angielskim – abstract

Assessment of the potential diagnostic and prognostic value of the expression of the product of the gene ALOX-15 and bone marrow derived LCA-positive cells in the neoplasms of the central nervous system and the role of the processes of isotopic fractionation in the neoplastic tissue and its environment.

Gliomas are malignant neoplasms of the central nervous system (CNS) that originate in cells that provide support and nutrition. They constitute a numerous and heterogeneous group of neoplasms, the types of which differ in origin, location, histological grade and molecular basis.

Gliomas are the most common group of CNS neoplasms in adults characterized by an incompletely predictable course and mostly high aggressiveness. The effects of treatment in patients with glioblastoma are not satisfactory and the cure rate is low in relation to the undertaken therapeutic efforts. In glioblastomas with the highest histological malignancy, even with the use of the most modern methods of treatment, in most cases it is not possible to achieve survival over 2 years. The 5-year survival rate for glioblastoma is around 5%. Most often, however, patients die within a year. Despite the fact that in recent years there has been a decline in the incidence of gliomas in adults, the percentage of glioblastoma diagnoses in this group is still increasing, what in relation to the unfavorable prognosis, makes glioblastoma a model object of numerous scientific studies on gliomas. The search for new aspects of the complex biology of this cancer and prognostic factors other than those disclosed so far becomes a growing necessity of modern oncology.

Lipoxygenases (LOX) are protein enzymes from the oxygenase class, mostly accelerating the peroxidation of polyunsaturated fatty acids, mainly arachidonic, linoleic and α -linoleic acids. Arachidonate 15-lipoxygenase (15-LOX) is encoded by the ALOX15 gene. It is an enzyme that reacts with polyunsaturated fatty acids and is characterized by anti-cancer properties that are lost as the expression of this protein decreases. The overexpression of 15-LOX leads to the restraint of inflammation by inhibiting aggregation of inflammatory cells.

Published studies revealed the information on the impact of lipid metabolism in tumor-associated macrophages (TAMs) on tumor cells, mainly through lipid mediators produced, inter alia, by lipoxygenases (LOX) which are the subject of the presented study. Increased oxidation of fatty acids and their "*de novo*" synthesis may have a significant impact on the tumor microenvironment, supporting tumor growth and contributing to its resistance to radio- and chemotherapeutic treatments.

The LCA protein is a common leukocyte antigen that is expressed only and exclusively in nucleated cells of the hematopoietic system, both mature and precursor cells. LCA plays a very important role in the function of the immune system, mainly through the initiation of T-lymphocyte signaling pathways. LCA positive precursor myeloid cells are the subject of many contemporary studies.

In the literature they are described as a potential marker, prognostic factor and therapeutic target of many disease entities, including glioblastoma.

The presence of LCA(+) myeloid cells is also found in the tumor microenvironment. The largest percentage of non-neoplastic cells in the glioblastoma microenvironment are macrophages. Apart from them, there are also T and B lymphocytes, NK cells, myeloid suppressor cells, neutrophils and mast cells. Their presence has a great influence on neoplastic cells and the chemokines secreted by them are involved in the processes of enhancing tumor proliferation, preventing apoptosis, enhancing angiogenesis and contributing to increased invasion and metastasis.

The numerous existing studies on the role of LCA-positive myeloid cells in the biology of many cancers and the expression of 15-LOX in cells that are part of the tumor microenvironment give expectation that also in the case of gliomas characterized by such a high mortality - the evaluation of these proteins may

provide new information about potential clinical implications.

Mass spectrometry is one of the most useful and universal analytical methods, consisting in measuring the mass to electric charge ratio of the tested ion. The process of alteration of the the number of isotopes of the same element in a material is called isotope fractionation. It results from the action of various physical and chemical factors on a substance and is a natural and spontaneous process. In living organisms, fractionation reflects changes that occur during cell growth and metabolism. The method that allows to reveal the isotopic composition of the tested sample is isotopic mass spectrometry. The relative difference in the ratios of stable isotopes (δ) is currently the subject of many scientific research, including interdisciplinary ones, however its greatest use still covers a narrow area of biology, chemistry and physics. The most recent application of mass spectrometry are the analyses in oncology - for the first time directly in neoplastic tissue "*in vivo*" carried out with the use of an isotope version of this method, in which stable (non-radioactive) isotopes of elements naturally occurring in normal and pathologically changed tissues are evaluated.

The research project was based on the latest discoveries regarding the role of 15-LOX expression and LCA-positive myeloid cells in the complex process of neoplasia. Single, existing studies on the use of IRMS in the study of transformed tissues indicate a relationship between the isotope composition and the function of neoplastic tissues. However, no studies in this fields have been found regarding gliomas. The research assumes the evaluation of the expression of the studied proteins in selected CNS tumors, with particular emphasis on glioblastoma, their microenvironment and the cancer-adjacent tissues, along with the evaluation of the isotopic composition of nitrogen and carbon. The main aim of the study is to learn about the unknown aspects of the biology of selected tumors of the central nervous system and to search for markers of potential diagnostic and prognostic importance with the use of modern interdisciplinary research methods. The assessment of the tumor microenvironment and cancer-adjacent tissues, which has recently turned out to be extremely important for the process of carcinogenesis, serves to better understand the interaction of the tumor and the host and the determination of the differences between the tumor and normal tissue - the potential use of this information in clinical practice.

The aims of the study appeared as follow:

1. Evaluation of the expression of the ALOX-15 gene product (15-LOX protein) and the presence of myeloid-derived LCA positive cells in selected neoplasms of glial origin of the central nervous system.
2. Initial assessment of the potential diagnostic and prognostic value of the expression of the ALOX-15 gene product (15-LOX proteins) and myeloid-derived LCA positive cells in selected neoplasms of glial origin of the central nervous system.
3. Establishment of the value of the isotope ratio of stable nitrogen and carbon isotopes in selected neoplasms of glial origin of the central nervous system and their environment.
4. An attempt to evaluate the potential advantages and limitations of the practical application of isotope mass spectrometry in the study of tumors of the central nervous system.

Based on the consent of the Bioethics Committee of the Medical University of Lodz of September 10, 2019 No. RNN / 350/19 / KE, the study included 144 cases diagnosed with glial neoplasms, including 109 cases from the archives of the Department of Oncology, Department of Pathomorphology, Medical University of Lodz, collected and diagnosed in 2017-2020 for immunohistochemical tests and 35 cases obtained at the Clinical Department of Neurosurgery and Oncology of the Central Nervous System of the Norbert Barlicki University Teaching Hospital No. 1 - in which, in addition to immunohistochemical tests, isotope composition analyses were performed.

The study of the isotopic composition of nitrogen and carbon was carried out with the use of a Sercon 20-22 continuous flow isotope mass spectrometer coupled with an elemental analyzer.

The material from tumors, as standard fixed with formalin and embedded in paraffin blocks for the purposes of the presented study, was cut using a microtome into sections with a thickness of 3-4 micrometers, which were then used for immunohistochemistry. Immunohistochemical staining was based on the immunoperoxidase method with the use of commercially available polyclonal rabbit antibodies directed against 15-LOX and LCA.

Statistical analysis was performed with the use of R language packages

(v. 4.1). It included the results of the evaluation of immunohistochemical staining and the results of isotope measurements. The following were taken into account: minimum, maximum, mean, median, standard deviation and the range of values of the performed determinations. In order to compare the parameters between the groups, the non-parametric Mann-Whitney-Wilcoxon test for two independent variables and the Kruskal-Wallis test for three and more independent variables were used, along with the non-parametric Wilcoxon test as a post-hoc test for significant comparisons. Correlations between individual variables were tested using the Spearman's rank correlation coefficient. Principal components analysis (PCA) was performed to find possible regularities between the analyzed data. All the results of the analysis were considered statistically significant for $p < 0.05$.

The conducted evaluation revealed the existence of 20 statistically significant relationships between the immunoexpression of the studied 15-LOX and LCA proteins and selected histoclinical features, 3 statistically significant differences in the carbon isotope composition depending on sex and tumor location relative to the midline of the body, and 24 statistically significant differences in the mass ratio N / C depending on the grouping variables. Moreover, 13 trends, 17 correlations and 3 spatial groupings of the examined parameters were revealed.

It was concluded that:

1. In gliomas, the expression of the 15-LOX protein, both in the tumor and in its environment, is variable. 15-LOX immunoexpression and the ratio of 15-LOX(+) cells to the number of neoplastic cells decrease with increasing histological level of malignancy, and moreover the ratio of 15-LOX(+) cells to the number of neoplastic cells is higher in diffuse gliomas other than glioblastoma (adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant) than in glioblastoma, IDH-wildtype. The immunoexpression of LCA in the cells of the glioblastoma microenvironment is not uniform. Both the number of LCA(+) cells and their ratio to the number of neoplastic cells are higher in tumors with a higher grade. In addition, the number of LCA(+) cells and their ratio to the number of neoplastic cells are greater in glioblastoma, IDH-wildtype than in diffuse gliomas other than glioblastoma, IDH-wildtype (adult-type diffuse gliomas, IDH-mutant).

2. The differences in the expression of the studied proteins revealed in the research project remain in statistically significant relations with the recognized prognostic factors, i.e. with the grade of the tumor according to the previous classification, and with the histopathological type of the tumor in relation to the new classification, which may indirectly link the expression of 15-LOX and LCA with prognosis. In the context of introducing the obligatory - molecular basis for the division of CNS tumors according to the newest WHO classification, it does not seem that other factors could be equivalent to molecular tests in the diagnosis of these neoplasms, however, the differentiation of the expression of the studied proteins between the histopathological types seems to be an interesting finding, the causes of which could be the subject of further research.
3. The values of the isotopic ratio of stable nitrogen and carbon isotopes in the examined neoplastic tissues and their environment did not differ significantly. However, the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio in the center of the tumor and on the periphery of the tumor turned out to be sex-dependent (significantly higher in women) as well as on the tumor location relative to the midline of the body (significantly higher on the right side). These findings are thought-provoking, but as only individual, at the presently very early stage of isotope studies of central nervous system neoplasms, they cannot be fully and reliably explained.
4. The greatest advantage of isotope mass spectrometry in potential studies of central nervous system tumors seems to be the possibility of obtaining a reliable test result with a minimal amount of material compared to standard histopathological examination. The limitations of the practical application of the presented method include, first of all, the low availability of the equipment and the irreversible destruction of the material in the analytical process.

At the present stage of advancement in isotopic research on neoplastic tissues, the determination of the isotopic composition of carbon and nitrogen in the group of gliomas is of a cognitive nature and may contribute to a better understanding of the complex biology of these changes and the role of isotope fractionation processes in neoplastic disease. The research aimed at analyzing the complex mechanisms of the interaction of cancer cells and their microenvironment may contribute to a better understanding of the glioblastoma

neoplastic process and bring potential new prognostic, predictive factors and checkpoints for targeted therapies.