

## СРАВНЕНИЕ ЛИПИДНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В АСТРОЦИТОМАХ ПО МЕРЕ РОСТА ИХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ

С. И. Пеков<sup>1,2,3</sup>, К. В. Бочаров<sup>2,4</sup>, Д. С. Бормотов<sup>2</sup>, В. А. Елиферов<sup>2</sup>, Е. В. Парочкина<sup>2</sup>, А. А. Сорокин<sup>2</sup>, Е. Н. Николаев<sup>1</sup>, И. А. Попов<sup>2,3</sup>✉

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

<sup>2</sup> Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

<sup>3</sup> Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

<sup>4</sup> Федеральный исследовательский центр химической физики имени Н. Н. Семенова, Москва, Россия

Применение методов прямой масс-спектрометрии является одним из перспективных подходов к улучшению полноты резекции глиальных опухолей за счет использования дополнительного способа повышения точности определения границ опухоли непосредственно в ходе нейрохирургического вмешательства. Массивы данных, накапливаемые в ходе апробации подобных технологий, могут быть использованы и для проведения фундаментальных исследований с целью выявления метаболических изменений, сопровождающих рост опухоли. Целью работы было провести анализ изменений в липидном составе клеточных мембран диффузных и анапластических астроцитов на основе данных, собранных в ходе прямого масс-спектрометрического профилирования тканей, иссеченных в ходе планового нейрохирургического вмешательства. Липидные профили, полученные в ходе исследования образцов опухолевых тканей ( $n = 43$ ) методом проточной микроэкстракции в картридже, анализировали с использованием линейного дискриминантного анализа со сжатием, что позволило выделить набор липидов, содержание которых изменяется при увеличении степени злокачественности опухоли. Разнообразие липидов снижается по мере повышения степени злокачественности, так, содержание 13 фосфолипидов, принадлежащих к 6 различным подклассам, оказывается сниженным в анапластических опухолях по сравнению с диффузными. С ростом злокачественности опухоли уменьшаются как средний размер жирнокислотных остатков полярных липидов, так и степень их ненасыщенности. Полученные результаты хорошо согласуются с данными, полученными ранее в рамках исследования высокозлокачественных глиальных опухолей, и подтверждают биохимические представления о репрограммировании метаболизма в ходе малигнизации нейроглии.

**Ключевые слова:** масс-спектрометрия, липиды, астроцитома, нейрохирургия, молекулярная диагностика

**Финансирование:** работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования (соглашение № 075-03-2022-107, проект № 0714-2020-0006). Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП ФИЦ ХФ имени Н. Н. Семенова РАН.

**Вклад авторов:** С. И. Пеков — концепция, анализ данных, написание статьи; К. В. Бочаров — проведение эксперимента, предоставление ресурсов; Д. С. Бормотов — проведение эксперимента, анализ данных; В. А. Елиферов — проведение эксперимента, взаимодействие с хирургами; Е. В. Парочкина — проведение эксперимента; А. А. Сорокин — анализ данных, концепция; Е. Н. Николаев — предоставление ресурсов; И. А. Попов — поиск источников финансирования, руководство исследованием.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом НМИЦН имени Н. Н. Бурденко (протоколы № 40 от 12 апреля 2016 г. и № 131 от 17 июля 2018 г.), проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации (2000 г.) и ее последующих пересмотров. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании и использование биоматериалов в исследовательских целях.

✉ **Для корреспонденции:** Игорь Алексеевич Попов  
Институтский пер., д. 9, стр. 7, Долгопрудный, 141701, Россия; popov.ia@mipt.ru

**Статья получена:** 11.01.2024 **Статья принята к печати:** 07.02.2024 **Опубликована онлайн:** 24.02.2024

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2024.008

## COMPARISON OF LIPID ALTERATIONS IN ASTROCYTOMAS WITH INCREASING GRADE

Pekov SI<sup>1,2,3</sup>, Bocharov KV<sup>2,4</sup>, Bormotov DS<sup>2</sup>, Eliferov VA<sup>2</sup>, Parochkina EV<sup>2</sup>, Sorokin AA<sup>2</sup>, Nikolaev EN<sup>1</sup>, Popov IA<sup>2,3</sup> ✉

<sup>1</sup> Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

<sup>3</sup> Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

<sup>4</sup> Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Moscow, Russia

The use of ambient ionization mass spectrometry methods is one of the promising approaches to the improvement of glial tumor resection completeness by using an additional method to improve the tumor margin identification accuracy during the neurosurgical intervention itself. The amounts of data accumulated when testing such techniques can be also used in fundamental research to identify metabolic alterations associated with the tumor growth. The study was aimed to assess changes in the cell membrane lipid composition of diffuse and anaplastic astrocytomas based on the data acquired by ambient ionization mass spectrometry profiling of the tissues excised during the elective neurosurgical intervention. The lipid profiles obtained when assessing the tumor tissue samples ( $n = 43$ ) by flow microextraction in a cartridge were subjected to shrinkage linear discriminant analysis enabling extraction of a number of lipids, the levels of which changed with increasing tumor grade. The lipid diversity decreased with increasing grade. Thus, the levels of 13 phospholipids belonging to six different subclasses turned out to be decreased in anaplastic tumors compared to diffuse ones. Both average size of the polar lipid fatty acid residues and their degree of unsaturation decrease with increasing tumor grade. The findings agree well with the data of the earlier study of high-grade glial tumors and confirm the biochemical view of metabolic reprogramming associated with malignant transformation of neuroglia.

**Keywords:** mass spectrometry, lipids, astrocytoma, neurosurgery, molecular diagnosis

**Funding:** the study was performed within the framework of the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement № 075-03-2022-107, project № 0714-2020-0006). The study involved the use of equipment of the Semenov Federal Research Center for Chemical Physics RAS.

**Author contribution:** Pekov SI — concept, data analysis, manuscript writing; Bocharov KV — experimental procedure, resource provision; Bormotov DS — experimental procedure, data analysis; Eliferov VA — experimental procedure, communication with surgeons; Parochkina EV — experimental procedure; Sorokin AA — data analysis, concept; Nikolaev EN — resource provision; Popov IA — search of funding sources, research management.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Burdenko Research Institute of Neurosurgery (protocols № 40 dated 12 April 2016 and № 131 dated 17 July 2018) and conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki (2000) and its subsequent revisions. All patients submitted the informed consent to study participation and the use of biomaterial for scientific purposes.

✉ **Correspondence should be addressed:** Igor A. Popov  
Institutskiy per., 9, str. 7, Dolgoprudny, 141701, Russia; popov.ia@mipt.ru

**Received:** 11.01.2024 **Accepted:** 07.02.2024 **Published online:** 24.02.2024

**DOI:** 10.24075/brsmu.2024.008

Опухоли центральной нервной системы относят к числу наиболее требовательных к прецизионности хирургического вмешательства. Объем и полнота резекции являются одними из ключевых параметров, влияющих на исход комплексного лечения и общую долговременную выживаемость [1–3]. Таким образом, точность интраоперационного определения границ опухоли — важнейший параметр, контролируемый в ходе хирургического вмешательства, а хирург вынужден балансировать между требованием удаления максимального объема патологической ткани и сохранением прилежащих незатронутых функциональных областей головного мозга. Особенно сложны с этой точки зрения глиальные опухоли, характеризующиеся диффузным распространением опухолевых клеток. Интраоперационная компьютерная и магнитно-резонансная томографии и экспресс-гистологический анализ широко применяют в качестве методов, облегчающих принятие решений оперирующим хирургом, однако существенные затраты времени не позволяют применять их для непрерывного мониторинга в зоне резекции [4, 5]. Удобны и эффективны ультразвуковой контроль и флуоресцентное контрастирование, однако для ряда опухолей точность и специфичность этих методов уменьшаются до 50% [6, 7]. Методы молекулярного профилирования, основанные на масс-спектрометрическом детектировании, в настоящее время развиваются в быстрый и универсальный инструмент для сопровождения нейрохирургических операций [4, 8]. Вне зависимости от конкретной реализации метода пробоотбора и ионизации, масс-спектрометрические методы опираются на анализ метаболических особенностей опухолевых тканей, затрагивающие как изменение липидного состава пролиферирующих клеток, так и набор и концентрацию специфических метаболитов, таких как N-ацетиласпартат, 2-гидроксиглутарат и глутаминовая кислота [9–11].

Масс-спектрометрические профили, собираемые в ходе разработки подобных методов, позволяют создавать классификационные и регрессионные модели, различающие опухолевые и неопухолевые ткани с высокой чувствительностью и специфичностью [12, 13]. Следует отметить, что подобные модели в большинстве своем опираются не на единичный маркер, а на комбинацию многочисленных пиков в спектрах, отражающих процесс метаболического перепрограммирования, происходящий в процессе малигнизации ткани [14]. Раковым клеткам для пролиферации требуется большой объем биомассы, однако гиповаскуляризация опухоли приводит к недостатку питательных веществ. Активация анаэробного гликолиза даже в присутствии кислорода (эффект Варбурга) [15] приводит также к активации синтеза жирных кислот и ускорению липогенеза. Синтез насыщенных и недостаток поступающих с пищей ненасыщенных жирных кислот приводят к значительному изменению липидного состава клеток, в том числе перераспределению жирнокислотных остатков между триглицеридами и фосфолипидами [16]. Хотя биохимические основы, объясняющие отличия липидного состава клеток глиом от здоровых глиальных клеток, известны, детального исследования липидома опухолей до сих пор не проведено, поскольку подобные работы выполняют обычно на клеточных линиях, либо ксенографтах, что не в полной мере отражает естественную биологическую вариабельность опухолей, а также их физиологическое окружение [17]. Опухоли диффузной природы остаются сложным объектом для метаболических

исследований ввиду трудностей в получении достаточного для исследования объема опухолевого материала, не содержащего включений клеток других типов.

Значительный объем данных, накапливаемый с применением методов молекулярного профилирования на основе масс-спектрометрии, позволяет исследовать метаболические изменения даже гетерогенных образцов, поскольку применение современных математических подходов дает возможность выделить характерные особенности молекулярных профилей, различающих ткани, отделив эти особенности от естественной биологической вариабельности и вклада иных клеток, присутствующих в образце [16, 18]. Цель данной работы — выявить различия липидного состава астроцитом 2-й и 3-й степени злокачественности с целью подтверждения предполагаемых метаболических изменений, сопровождающих злокачественное перерождение тканей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все образцы, включенные в исследование, были собраны выделенным для этой цели нейрохирургом, наблюдавшим за ходом операции с использованием систем нейронавигации и визуально. Основной критерий отбора — состав образца, который должен был включать в себя преимущественно опухолевую ткань. Участки, содержащие признаки некроза и большое количество сосудов, не отбирали для исследования. Образцы тканей промывали стерильным физраствором для удаления остатков крови и разделяли на две визуально схожие части. Одну часть замораживали и хранили при  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  до проведения исследования. Вторую часть подвергали гистологическому исследованию профессиональным патоморфологом в рамках стандартных протоколов. На основании гистологического заключения образцы, содержащие менее 75% опухолевых клеток, а также образцы с признаками некроза исключали из исследования. Таким образом, было отобрано 28 образцов тканей анапластической астроцитомы (3-я степень злокачественности; получены от 23 пациентов) и 15 образцов диффузной астроцитомы (2-я степень злокачественности; получены от 12 пациентов).

Все собранные образцы анализировали в случайном порядке, при этом различные образцы, полученные от одного пациента, не анализировали в один день для минимизации возможной систематической погрешности. Каждый образец ткани размораживали непосредственно перед анализом и разделяли на 2–4 части, в зависимости от размера, которые немедленно подвергали масс-спектрометрическому профилированию. Всего был собран 81 масс-спектрометрический профиль образцов анапластической астроцитомы и 46 масс-спектрометрических профилей образцов диффузной астроцитомы.

Все образцы анализировали с использованием картриджной микроэкстракции (Inline Cartridge Extraction, ICE) [19]. Образец ткани объемом около  $1\text{ мм}^3$  помещали в одноразовый картридж, представляющий собой трубку из нержавеющей стали, на одном конце которой располагается кварцевый эмиттер электрораспыления, а с противоположной стороны трубка запечатывается при помощи входного капилляра из полиэфирэтилкетона. Кварцевый эмиттер защищен от попадания частиц ткани благодаря фильтру из стеклянного волокна. Образец в картридже промывали 100 мкл раствора, состоящего из изопропанола, метанола, ацетонитрила и воды (3 : 3 : 3 : 1 об.)

с добавлением 0,1% (об.) муравьиной кислоты, после чего картридж помещали в ионный источник масс-спектрометра. Экстракцию осуществляли непрерывной подачей упомянутого ранее растворителя со скоростью потока, равной 3 мкл/мин. Регистрацию масс-спектров проводили с использованием масс-спектрометра LTQ XL Orbitrap ETD (ThermoFisher Scientific; Сан-Хосе, США) с разрешением 30 000 (при  $m/z$  400) в диапазоне  $m/z$  500–1000, в двух полярностях последовательно.

В масс-спектрах удаляли пики с соотношением сигнал–шум менее 2, после чего удаляли пики, присутствующие менее чем в 25% индивидуальных сканов в каждой группе. В дальнейшем анализировали только пики, интенсивность которых в спектрах была выше медианной. Выделение пиков, характеризующих каждую из групп образцов, проводили с помощью дискриминантного анализа со сжатием (shrinkage discriminant analysis) [20]. Значимость каждого из выделенных пиков оценивали при помощи критерия *l*fd<sub>r</sub> (local false discovery rate), показывающего вероятность того, что индивидуальный пик не будет оказывать влияния на классификацию образцов. Пороговое значение *l*fd<sub>r</sub> было выбрано 33%.

По два образца ткани наибольшего объема из каждой группы были также использованы для идентификации липидов. Для этого примерно 10 мг ткани гомогенизировали в 400 мкл указанного ранее раствора на льду. Гомогенат обрабатывали в ультразвуковой ванне в течение 5 мин и центрифугировали при 21 000 *g* в течение 15 мин при 4 °С. Супернатант переносили в хроматографическую вialу и выпаривали под вакуумом. Липиды перерастворяли в 20 мкл раствора, состоящего из *n*-бутанола, изопропанола и воды (8 : 21 : 69 об.) с добавлением 5 мМ ортофосфорной кислоты. Анализ липидов проводили с применением обращенно-фазовой нанопоточной ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения с использованием указанного выше масс-спектрометра. Идентификацию липидов проводили с использованием ПО LipiDex.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ограниченный динамический диапазон масс-анализаторов не позволяет делать однозначных количественных выводов о содержании молекул в исходной биологической пробе. Однако изменение относительных интенсивностей пиков между собой пропорционально изменению содержания соответствующих молекул на фоне других соединений выбранного класса. Используемая в работе смесь растворителей эффективно растворяет липиды, особенно полярные липиды клеточных мембран, которые легко ионизируются и детектируются в выбранном диапазоне масс. Таким образом, молекулярные профили, собираемые в рамках данного исследования, соответствуют преимущественно липидной компоненте клетки. Применение SDA [20], подвида линейного дискриминантного анализа, учитывающего внутренние корреляции, вызываемые наличием естественного распределения стабильных изотопов в биологических молекулах (для липидов это преимущественно <sup>13</sup>C), позволяет выделить ионы, интенсивность которых различается между образцами анализируемых групп. Рассчитываемый при этом CAT-score (correlation adjusted *t*-score) является аналогом *t*-статистики Стьюдента, учитывающим как внутренние корреляции и высокую размерность исходных данных, так и отклонение распределения интенсивности пиков от нормального. Величина CAT-score демонстрирует отклонение интенсивности индивидуального пика от среднего в сторону соответствующей группы. В результате, было выделено 13 ионов липидов, уровень которых повышен, в образцах диффузной астроцитомы по сравнению с образцами анапластической, и три иона липида, повышенных в спектрах, соответствующих образцам анапластической астроцитомы (таблица). Химическую идентификацию ионов проводили при помощи тандемной хромато-масс-спектрометрии на основе экстракции липидов из образцов

**Таблица.** Значимость ионов полярных липидов при отнесении спектров к группам диффузной или анапластической астроцитомы. Объединены результаты анализов как положительно-заряженных, так и отрицательно-заряженных ионов

CAT-score	$m/z$	Ион
Ионы, характерные для образцов диффузной астроцитомы		
71,4	742,55	[PE(36:2)-H] <sup>-</sup>
61,9	782,58	[PC(34:1)+Na] <sup>+</sup>
53	786,57	[PS(36:2)-H] <sup>-</sup>
52,3	780,57	[PC(34:2)+Na] <sup>+</sup>
47,3	700,53	[PA(36:2)-H] <sup>-</sup>
46,3	857,59	[PI(36:4)-H] <sup>-</sup>
45,9	754,55	[PC(32:1)+Na] <sup>+</sup>
45,3	794,55	[PE(40:4)-H] <sup>-</sup>
44	797,61	[PG(38:4)-H] <sup>-</sup>
43	820,57	[PC(34:0)-H] <sup>-</sup>
40,8	792,53	[PC(32:0)-H] <sup>-</sup>
39,6	920,71	[PC(44:2)+Na] <sup>+</sup>
39,4	808,56	[PC(36:2)+Na] <sup>+</sup>
Ионы, характерные для образцов анапластической астроцитомы		
48	772,53	[PE(38:1)-H] <sup>-</sup>
44,1	762,58	[PC(30:1)-H] <sup>-</sup>
40,2	646,62	[PA(32:1)-H] <sup>-</sup>

тканей, отличающихся наибольшим размером, что было бы невозможно для большинства образцов, ввиду малого объема доступного биоматериала. Таким образом, за счет применения масс-спектрометрического профилирования тканей без прободготовки была решена задача сохранения естественной биологической вариабельности анализируемых опухолей и учета межпациентной вариабельности.

Все выделенные пики не относятся к наиболее интенсивным в масс-спектрах и принадлежат ко второму и третьему квартилям распределения по интенсивностям. Это связано с тем, что наиболее и наименее интенсивные пики сильно связаны с естественной вариабельностью и могут значительно изменяться между пациентами, что делает их внутригрупповую вариабельность сравнимой с межгрупповой на данном размере выборки. Однако полученные результаты демонстрируют снижение разнообразия в липидном составе по мере роста злокачественности, что соответствует общей картине, представленной ранее при сравнении глиальных опухолей 4-й степени злокачественности с образцами неопухолевого контроля [16].

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наблюдаемые различия в липидном составе между астроцитомами 2-й и 3-й степени злокачественности демонстрируют снижение содержания фосфолипидов, содержащих полиненасыщенные жирные кислоты, что свидетельствует о росте доли *de novo* синтезированных жирных кислот в мембранах клеток глиом при повышении степени их злокачественности. Наблюдается также снижение содержания фосфолипидов с полностью насыщенными жирнокислотными остатками, поскольку, согласно предыдущим исследованиям, наиболее злокачественные клетки глиом накапливают насыщенные жирные кислоты в липидных каплях, чтобы использовать их для поддержания метаболической активности на более поздних стадиях развития заболевания, при которых доступность питательных веществ будет снижена в еще большей степени [15, 21].

Следует отметить, что относительное содержание фосфатидилихолинов PC(32:1), PC(34:1) и PC(34:2) не однозначно соотносится с общей картиной роста астроцитом. Так, было показано, что эти липиды в значительной мере характеризуют именно высокозлокачественную, а не неопухолевую, мозговую ткань [16], в то время как при сравнении диффузных и анапластических астроцитом эти липиды оказались

характерны для менее злокачественной формы. Это наблюдение свидетельствует о неравномерности уменьшения содержания липидов различных классов по мере роста злокачественности, что приводит к увеличению наблюдаемой доли перечисленных выше лецитинов в диффузных астроцитомах, и одновременно демонстрирует ограничение, накладываемое прямым масс-спектрометрическим профилированием на возможность анализировать липидный состав без дополнительного применения более информативных методов хромато-масс-спектрометрии. Анализ суммарного жирнокислотного состава отдельных липидов, который возможен с использованием прямой масс-спектрометрии, не позволяет различать изомерные липиды. Так, например, фосфолипид PC(34:1) может состоять из остатков пальмитолеиновой и стеариновой кислот, равно как и из остатков пальмитиновой и олеиновой кислот. Среди жирных кислот именно пальмитиновая наиболее доступна для включения в состав липидов по мере роста злокачественности, поскольку является основным продуктом, выделяющимся в ходе функционирования НАДФ·Н-зависимой синтазы жирных кислот [14]. Следует отметить, что активируемый благодаря эффекту Варбурга пентозофосфатный путь приводит к повышенной генерации НАДФ·Н опухолевой клеткой [22]. Таким образом, при повышении злокачественности можно наблюдать как расходование пула фосфолипидов, содержащих 32–34 атома углерода в жирнокислотных цепях [21, 23], так и их активное замещение изомерными липидами, содержащими синтезированные *de novo* жирнокислотные цепи, при переходе к астроцитомам 4-й степени злокачественности.

## ВЫВОДЫ

Применение методов молекулярного профилирования позволяет исследовать изменения в липидном составе опухолевых тканей различной степени злокачественности с учетом их естественной биологической вариабельности. По мере роста злокачественности астроцитом прослеживается тенденция к уменьшению разнообразия полярных липидов в составе клеточных мембран. Уменьшаются также длина и степень ненасыщенности жирнокислотных остатков, составляющих эти липиды. Данный эффект связан с активацией синтеза жирных кислот вследствие метаболического перепрограммирования глиальных клеток в процессе их малигнизации, а в случае с высокозлокачественными глиальными опухолями и с активацией пути бета-окисления жирных кислот для поддержания жизнедеятельности клетки.

## Литература

1. Kreatsoulas D, Damante M, Gruber M, et al. Supratotal surgical resection for low-grade glioma: a systematic review. *Cancers (Basel)*. 2023; 15 (9): 2493.
2. Karschnia P, Vogelbaum MA, van den Bent M, et al. Evidence-based recommendations on categories for extent of resection in diffuse glioma. *Eur J Cancer*. 2021; 149: 23–33.
3. Chanbour H, Chotai S. Review of intraoperative adjuncts for maximal safe resection of gliomas and its impact on outcomes. *Cancers (Basel)*. 2022; 14: 22.
4. Bogusiewicz J, Wojko B. Insight into new opportunities in intra-surgical diagnostics of brain tumors. *TrAC — Trends Anal Chem. Elsevier B.V.* 2023; 162: 117043.
5. Cordova JS, Gurbani SS, Olson JJ, et al. A systematic pipeline for the objective comparison of whole-brain spectroscopic MRI with histology in biopsy specimens from grade 3 glioma. *Tomography*. 2016; 2 (2): 106–16.
6. Schupper AJ, Rao M, Mohammadi N, et al. Fluorescence-guided surgery: a review on timing and use in brain tumor surgery. *Front Neurol*. 2021; 12.
7. Behbahania M, Martirosyan NL, Georges J, et al. Intraoperative fluorescent imaging of intracranial tumors: a review. *Clin Neurol Neurosurg. Elsevier B.V.* 2013; 115 (5): 517–28.
8. Pekov SI, Bormotov DS, Nikitin PV, et al. Rapid estimation of tumor cell percentage in brain tissue biopsy samples using inline

- cartridge extraction mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem. Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2021; 413 (11): 2913–22.
9. Brown HM, Alfaro CM, Pirro V, et al. Intraoperative mass spectrometry platform for IDH mutation status prediction, glioma diagnosis, and estimation of tumor cell infiltration. *J Appl Lab Med*. 2021; 6 (4): 902–16.
  10. Eberlin LS, Dill AL, Golby AJ, et al. Discrimination of human astrocytoma subtypes by lipid analysis using desorption electrospray ionization imaging mass spectrometry. *Angew Chemie - Int Ed*. 2010; 49 (34): 5953–6.
  11. Bormotov D, Shamraeva M, Kuzin A, et al. Ambient ms profiling of meningiomas: intraoperative oncometabolite-based monitoring. *Bull Russ State Med Univ*. 2022; 2022 (6): 74–81.
  12. King ME, Lin M, Spradlin M, et al. Advances and emerging medical applications of direct mass spectrometry technologies for tissue analysis. *Annu Rev Anal Chem*. 2023; 16: 1–25.
  13. Eberlin LS, Margulis K, Planell-Mendez I, et al. Pancreatic cancer surgical resection margins: molecular assessment by mass spectrometry imaging. *PLOS Med*. 2016; 13 (8): e1002108.
  14. Sorokin A, Shurkhay V, Pekov S, et al. Untangling the metabolic reprogramming in brain cancer: discovering key molecular players using mass spectrometry. *Curr Top Med Chem*. 2019; 19 (17): 1521–34.
  15. Duraj T, García-Romero N, Carrión-Navarro J, et al. Beyond the Warburge effect: oxidative and glycolytic phenotypes coexist within the metabolic heterogeneity of glioblastoma. *Cells*. 2021; 10 (2): 202.
  16. Pekov SI, Sorokin AA, Kuzin AA, et al. Analysis of phosphatidylcholines alterations in human glioblastomas ex vivo. *Biochem Suppl Ser B Biomed Chem* 2021; 15 (3): 241–7.
  17. McNeill RS, Vitucci M, Wu J, et al. Contemporary murine models in preclinical astrocytoma drug development. *Neuro Oncol*. 2015; 17 (1): 12–28.
  18. Mason SE, Manoli E, Alexander JL, et al. Lipidomic profiling of colorectal lesions for real-time tissue recognition and risk-stratification using rapid evaporative ionization mass spectrometry. *Ann Surg*. 2023; 277 (3): e569–e577.
  19. Bormotov DS, Elifero VA, Peregudova OV, et al. Incorporation of a disposable ESI emitter into inline cartridge extraction mass spectrometry improves throughput and spectra stability. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2023; 34 (1): 119–22.
  20. Ahdesmäki M, Strimmer K. Feature selection in omics prediction problems using cat scores and false nondiscovery rate control. *Ann Appl Stat*. 2010; 4 (1): 503–19.
  21. Wu X, Geng F, Cheng X, et al. Lipid droplets maintain energy homeostasis and glioblastoma growth via autophagic release of stored fatty acids. *Science*. Elsevier Inc., 2020; 23 (10): 101569.
  22. Jaráz-Rodríguez M, del Prado L, Balsa E. Metabolic remodeling in astrocytes: paving the path to brain tumor development. *Neurobiol Dis*. 2023; 188: 106327.
  23. Panov A, Orynbayeva Z, Vavilin V, et al. Fatty acids in energy metabolism of the central nervous system. *Biomed Res Int*. 2014; 2014.

## References

1. Kreatsoulas D, Damante M, Gruber M, et al. Supratotal surgical resection for low-grade glioma: a systematic review. *Cancers (Basel)*. 2023; 15 (9): 2493.
2. Karschnia P, Vogelbaum MA, van den Bent M, et al. Evidence-based recommendations on categories for extent of resection in diffuse glioma. *Eur J Cancer*. 2021; 149: 23–33.
3. Chanbour H, Chotai S. Review of intraoperative adjuncts for maximal safe resection of gliomas and its impact on outcomes. *Cancers (Basel)*. 2022; 14: 22.
4. Bogusiewicz J, Bojko B. Insight into new opportunities in intra-surgical diagnostics of brain tumors. *TrAC — Trends Anal Chem*. Elsevier B.V. 2023; 162: 117043.
5. Cordova JS, Gurbani SS, Olson JJ, et al. A systematic pipeline for the objective comparison of whole-brain spectroscopic MRI with histology in biopsy specimens from grade 3 glioma. *Tomography*. 2016; 2 (2): 106–16.
6. Schupper AJ, Rao M, Mohammadi N, et al. Fluorescence-guided surgery: a review on timing and use in brain tumor surgery. *Front Neurol*. 2021; 12.
7. Behbahaninia M, Martirosyan NL, Georges J, et al. Intraoperative fluorescent imaging of intracranial tumors: a review. *Clin Neurol Neurosurg*. Elsevier B.V. 2013; 115 (5): 517–28.
8. Pekov SI, Bormotov DS, Nikitin PV, et al. Rapid estimation of tumor cell percentage in brain tissue biopsy samples using inline cartridge extraction mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem. Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2021; 413 (11): 2913–22.
9. Brown HM, Alfaro CM, Pirro V, et al. Intraoperative mass spectrometry platform for IDH mutation status prediction, glioma diagnosis, and estimation of tumor cell infiltration. *J Appl Lab Med*. 2021; 6 (4): 902–16.
10. Eberlin LS, Dill AL, Golby AJ, et al. Discrimination of human astrocytoma subtypes by lipid analysis using desorption electrospray ionization imaging mass spectrometry. *Angew Chemie - Int Ed*. 2010; 49 (34): 5953–6.
11. Bormotov D, Shamraeva M, Kuzin A, et al. Ambient ms profiling of meningiomas: intraoperative oncometabolite-based monitoring. *Bull Russ State Med Univ*. 2022; 2022 (6): 74–81.
12. King ME, Lin M, Spradlin M, et al. Advances and emerging medical applications of direct mass spectrometry technologies for tissue analysis. *Annu Rev Anal Chem*. 2023; 16: 1–25.
13. Eberlin LS, Margulis K, Planell-Mendez I, et al. Pancreatic cancer surgical resection margins: molecular assessment by mass spectrometry imaging. *PLOS Med*. 2016; 13 (8): e1002108.
14. Sorokin A, Shurkhay V, Pekov S, et al. Untangling the metabolic reprogramming in brain cancer: discovering key molecular players using mass spectrometry. *Curr Top Med Chem*. 2019; 19 (17): 1521–34.
15. Duraj T, García-Romero N, Carrión-Navarro J, et al. Beyond the Warburge effect: oxidative and glycolytic phenotypes coexist within the metabolic heterogeneity of glioblastoma. *Cells*. 2021; 10 (2): 202.
16. Pekov SI, Sorokin AA, Kuzin AA, et al. Analysis of phosphatidylcholines alterations in human glioblastomas ex vivo. *Biochem Suppl Ser B Biomed Chem* 2021; 15 (3): 241–7.
17. McNeill RS, Vitucci M, Wu J, et al. Contemporary murine models in preclinical astrocytoma drug development. *Neuro Oncol*. 2015; 17 (1): 12–28.
18. Mason SE, Manoli E, Alexander JL, et al. Lipidomic profiling of colorectal lesions for real-time tissue recognition and risk-stratification using rapid evaporative ionization mass spectrometry. *Ann Surg*. 2023; 277 (3): e569–e577.
19. Bormotov DS, Elifero VA, Peregudova OV, et al. Incorporation of a disposable ESI emitter into inline cartridge extraction mass spectrometry improves throughput and spectra stability. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2023; 34 (1): 119–22.
20. Ahdesmäki M, Strimmer K. Feature selection in omics prediction problems using cat scores and false nondiscovery rate control. *Ann Appl Stat*. 2010; 4 (1): 503–19.
21. Wu X, Geng F, Cheng X, et al. Lipid droplets maintain energy homeostasis and glioblastoma growth via autophagic release of stored fatty acids. *Science*. Elsevier Inc., 2020; 23 (10): 101569.
22. Jaráz-Rodríguez M, del Prado L, Balsa E. Metabolic remodeling in astrocytes: paving the path to brain tumor development. *Neurobiol Dis*. 2023; 188: 106327.
23. Panov A, Orynbayeva Z, Vavilin V, et al. Fatty acids in energy metabolism of the central nervous system. *Biomed Res Int*. 2014; 2014.