

Real-Time Molecular Patterns to support Intraoperative Decision-Making

Citation for published version (APA):

Vaysse, P-M. (2020). *Real-Time Molecular Patterns to support Intraoperative Decision-Making*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20201028pv>

Document status and date:

Published: 01/01/2020

DOI:

[10.26481/dis.20201028pv](https://doi.org/10.26481/dis.20201028pv)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Chapter 7

Summary and outlook

Summary and Outlook

Oncologic surgery is a keystone step in the management of patients with cancer. It aims to remove all the tumour tissue to cure the patient from cancer, while sparing healthy tissues to preserve functions. While intraoperative decisions are critical for patient's outcome (9-11), on-spot macroscopic identification of tumour or healthy tissues can be difficult for surgeons. This intraoperative challenge has driven the development of real-time mass spectrometry technologies such as rapid evaporative ionization mass spectrometry (REIMS) analysis of electrosurgical vapours, to classify tissues in the operating room. It provides histopathological assessment to efficiently support surgical decisions based on molecular patterns. This work supports the vision that REIMS technology can be implemented into surgical environments around the world for routine margin assessment during cancer surgery.

First, this thesis reviewed the state of the art of the research field of tissue classification based on mass spectrometric patterns. Then, the reproducibility of the REIMS technology was assessed towards its reliability for tissue diagnostics in a multicentre study. Finally, the potential of REIMS was reported to support surgical resection on breast tissues and *in vivo*, and to characterise on-site tumour heterogeneity on liver tumour tissues. This thesis elaborates on their respective implications, and suggests investigations to pursue and expend this line of research. In addition, the lipid patterns are particularly discussed as bases of these classifiers to reflect their underlying tissue pathobiology.

Mass spectrometry imaging, contributions and directions

Chapter 1 reviewed the milestones of mass spectrometry imaging (MSI) that have led to consider molecular patterns reliable to characterize tissue pathology. Technological and methodological improvements have contributed to enhance throughput, sensitivity and spatial resolution. These have stimulated the usage of MSI in various biomedical applications including oncology before the emergence of direct sampling technologies to assist surgical decisions. This chapter addressed the current challenges of the field including data analysis, molecular identification and reproducibility towards moving MSI closer to clinical routine.

The MSI field in biomedical research has been very dynamic over the past 20 years and produced innovative investigations ranging from instrumental development to application perspectives. This review illustrated the very diverse specialities and accomplishments of the field, which are sometimes challenging to keep track with, but necessary to envision innovative approaches to push the field further. Since its publication, already numerous publications extended the field of MSI illustrating the still on-going effervescence of the research such as new methodologies to improve lipid-imaging identification (375,376) or to reach spatial resolution at the subcellular level with MALDI-MSI (377). In addition, specific tools for real-time tissue classification have been reported employing dedicated hand pieces and ambient ionization sources for surgical applications (30,31). The multitude of capabilities and technologies now available for tissue analysis by mass spectrometry could

be expected to show distinctive strength towards MSI enrolment in routine diagnostics over the coming years. Previous work has been reported exploring the link between the molecular patterns of REIMS and DESI (304), and complementary investigations in the future to build more precise libraries could be expected.

Reproducibility of rapid evaporative ionization mass spectrometry

The reliability of the REIMS technology is crucial to move from applied research to routine diagnostics use. In chapter 3, the reproducibility of REIMS is in focus for the classification of biological tissues in a round robin, multi-site study. Identical equipment and harmonized methodology were employed to analyse locally provided meat samples and breast resection tissues. Normal and tumour breast tissues could be correctly classified across several countries using models based on the data from other countries. In addition, the combination of data from multiple sites improved the classification accuracy for breast tissue recognition.

Further investigations on the reproducibility of REIMS for the classification of biological tissues are warranted. The multicentre study focused on the establishment of the methodology and was limited to a few clinical samples per site (< 10) on 3 sites. A broader study including more samples and more sites would be a next step. Future research should separate two main objectives, which are the intrinsic reproducibility of the REIMS technology itself and the reproducibility of REIMS for the application to the classification of clinical tissues.

First, there is a necessity to provide robust results of the REIMS technology itself for classification of biological samples. This involves solely testing the reproducibility of REIMS using samples and a sampling method that present the less possible variability. The tissue samples could be 3 to 5 standard samples that can be produced with high reproducibility. For instance, they could be controls provided by the national institute of standards and technology that provide decent signals for comparison, or cell lines, already proven to be suitable for REIMS analysis in high throughput fashion (378).

The sampling could be performed using a CO₂ laser set up that provides better precision (306) than electrocautery. It would lead measurements to be independent from the variability induced by the handling of an operator – even if shown not significant in this study, and from the utilization of diverse heat generators. This would enable to compare results on multiple sites, independently from the affiliations to clinical sites, which should enable the coordination of more partners. Experiments should be performed regularly, repeated and reproduced over months, under the same conditions to focus the investigations purely on the assessment of the REIMS technology itself. This investigation could be put in perspective with the influence of technical parameters, such as the detector gain check, the influence of the pressures, the flowrate of solvent, etc.

Next, the application of REIMS for the classification of clinical tissues needs to focus on the clinical methodology and deal with the potential biological variance of tumour

heterogeneity. The constitution of a database built on the data acquired on multiple centres would enable better cross-validation results and therefore more sites have to be included in a future study. In addition, each site has to provide a significant amount of samples to cover the heterogeneity of the pathology of the resection tumour entity. The differences in ethnicity of the local population could be expected to lead to distinct tumour molecular patterns. Moreover, cross validation of pathology examination between sites appear also as a nice strategy to align the potential subjective sampling examination and to constitute more accurate databases. Finally, recognition of *in vivo* signals generated on multiple sites could appear as an important proof of principle to increase the external validity of the technology towards surgical implementation.

Molecular margin of resection and *in vivo* record of aerosols in the operating room

Real-time mass spectrometric tissue classifiers were developed to assist surgeons during tumour resection. In chapter 4, REIMS was used to build a library of *ex vivo* molecular patterns on resected tissues from patients operated for breast tumour surgery. The model was validated with histopathology and classified adipose, stroma and tumour tissues. This model enabled recognition of tissue types *in vivo* by analysing the electrosurgical vapours during a breast-conserving surgery. Moreover, tumour border stroma and tumour remote stroma were classified with both REIMS and DESI-MS. These results demonstrated the potential of breast stroma towards reaching in real-time knowledgeable information about tumour localisation to perform more precise breast-conserving surgeries.

Better characterisation of the stromal changes surrounding breast tumours is required to evaluate the existence of a molecular margin and to show its detection during surgery. A precise sampling of tumour-tissue margin is needed to establish how far from the tumour stromal changes can be detected. Moreover, this phenomenon could be heterogeneous between tumours, therefore its characterisation for diverse tumour types should be considered.

The hardware of the mobile mass spectrometer needs to be improved to meet the requirements in the operation room. Substantial modifications towards implementation beyond the research purpose should be considered such as reduction of the noise level to avoid disturbance of communication between the operating staff. In addition, the development of portable mass spectrometers (379) could inspire the new designs of such instruments to facilitate their handling and their incorporation in operating rooms.

The next steps for the analysis of electrosurgical vapours *in vivo* by REIMS need to involve a better methodology to correlate localisation of tissue dissected by the surgeon in time and space, and molecular pattern signal. The employed methodology based on the synchronisation of video records can assure with confidence *in vivo* tissue sampling and molecular signal, but remains laborious and challenging. Combination of REIMS *in vivo* measurement with post-resection micro-CT performed on the resection specimen (380) or even the integration of a spatially navigated surgical electrocautery with the real-time lipid

patterns (381) are promising directions to enable more knowledgeable acquisition of data in the operating room.

The implementation of the *in vivo* measurements in the operating rooms of Maastricht University Medical Centre+ is expected to be beneficial to other investigations. Beyond breast surgeries, *in vivo* measurements were also performed during head and neck and sarcoma surgeries employing a diathermic knife. These generated intense and different molecular patterns of potential interest towards extending the utilisation of REIMS for these surgical specialties. In addition, investigations of the combination of a CO₂ laser sampling with REIMS should benefit *in vivo* measurements during tumour resections of the pharynx and the larynx and the development of new investigations such as the prediction of fracture-healing (382).

Lipid patterns to characterise tumour heterogeneity and cell death

Tumour heterogeneity affects clinical decisions beyond the surgery room. In chapter 5, REIMS was used on resected liver tissues to demonstrate the benefit of real-time lipid patterns for cancer precision medicine. Its use was illustrated on two biological questions. First, primary tumour (hepatocellular carcinoma, HCC) patterns were shown to be more similar to liver parenchyma patterns than secondary tumour (metastatic adenocarcinoma, MAC) patterns. Moreover, tumour heterogeneity appeared greater in HCC than MAC based on lipid patterns. Then, MAC and other tumours were reported to share a common molecular lipid to discriminate necrotic from viable tumours. Closely related sphingolipids, including ceramides, bioactive lipids involved in cell death characterized this pattern. Targeted analysis on these lipids enabled sub classification of tumours based specific metabolic shifts. These results opened new perspectives for tumour characterization based on specific tumour metabolic pathways.

The investigation was performed using a needle to generate electrosurgical vapours with a head generator. As the end-message was not focused on the use of lipid patterns for intraoperative surgical decisions but more towards tailoring diverse clinical interventions to the tumour metabolic phenotype, using a more delicate, less destructive tool could be a more suitable option.

Besides, the biological variance of the lipid patterns, to reflect tumour heterogeneity and to depict metabolic shifts in necrosis need to be better understood. For instance, the study of necrosis could be explored using biological assays with cell lines analyses to characterise the effect of ischemic or hypoxic conditions on the lipid patterns of dead cells.

Eclectic molecular patterns to reflect tissue pathology

The mass spectrometry modality can offer high confidence for structural characterisation of molecules. Tissue classification investigations can be complemented by experiments for higher level of molecular identification and bring an understanding to the molecular pathobiology underlying histopathological changes between tissue types. Chapters 4 and 5

illustrate the diversity of the molecular patterns that can reflect tissue classification. Principal component analysis of the lipid pattern libraries enabled to screen mass features discriminative of tissue types to lead for potential biological interpretation of these classifiers.

In chapter 4, the main 3 tissue components of breast cancer resection, which are tumour, stroma and adipose, were classified by lipid patterns mainly characterized by intense glycerophospholipids, fatty acids and triglycerides respectively. The heterogeneity of these lipid classes can be associated with the very heterogeneous histology of healthy and tumour breast tissues. However, no particular biological link can be established between these tissues, being simply classified by diverse lipid patterns, certainly representative their main lipid composition.

In chapter 5, the classification of liver parenchyma, hepatocellular carcinoma and metastatic adenocarcinoma show an alignment along the principal component 1 to screen discriminative mass features. However, the multiple potential species using a resolution of a time-of-flight analyser limited the confidence in the lipid identification. Moreover, the biological links between the diverse glycerophospholipid classes are difficult to establish limiting again any biological meaning. Interestingly, ceramides and related sphingolipids discriminated necrotic from viable metastatic adenocarcinomas and in other human tumours. Metabolic links have been reported between ceramides, acylceramides, lactosylceramides and sphingomyelins and their involvement in the process and the regulation of cell death gave an interesting perspective for biological interpretation.

While the classification of remote tumour stroma and tumour border stroma surrounding breast tumours reported mainly a single mass feature for their discrimination by DESI-MS, assigned as lactate dimer, same comparison by REIMS led to the impossibility to attribute the classification to any specific molecules, as the PCA did not enable screening for discriminative mass features. Mass features with low intensity and therefore not depicted by PCA are probably substantial for the classification obtained after the critical contribution of the supervision by LDA.

Mass spectrometric molecular patterns may range from “a silver bullet” to “uncharacterised molecular pattern”, similarly to already routinely used diagnostics biomarkers, such as for breast cancer with one single marker (*BRCA1*, *HER2*, etc.) or a combination of biomarkers (MammaPrint). It may depend on the analytical platform and the biological comparison due to the eclectic regulations. Accumulation or deficit of molecules can come in play to picture metabolic phenotypes that can then be detected. Nevertheless, worth mentioning that while molecular patterns have the benefit to provide rapid measurement to assess disease state, they appear by definition less prone to predict the susceptibility of disease developments in comparison to genetic biomarkers. The strength of mass spectrometric molecular patterns may mainly reside on the analysis of present phenotypes for diagnostic and prognostic.

Samenvatting in het Nederlands

Oncologische chirurgie is een hoeksteen in de behandeling van patiënten met kanker. Het heeft tot doel al het tumorweefsel te verwijderen om de patiënt van kanker te genezen, terwijl gezonde weefsels worden gespaard om biologische functies te behouden. Intraoperatieve beslissingen bij de uitvoering van een resectie zijn van cruciaal belang voor het resultaat voor de patiënt (9-11). Dit is deels te wijten aan het feit dat de macroscopische identificatie ter plaatse van tumor of gezond weefsel vaak lastig is voor chirurgen. Deze intraoperatieve analytische uitdaging heeft geleid tot de ontwikkeling van real-time massaspectrometrische methoden en technologieën zoals snelle REIMS-analyse (Rapid Electrospray Ionization Mass Spectrometry) van elektrochirurgische dampen, om weefsels in de operatiekamer te classificeren en daarom histopathologische beoordeling te bieden ter ondersteuning van efficiënte chirurgische beslissingen op basis van moleculaire patronen. Het werk beschreven in dit proefschrift ondersteunt de visie dat de REIMS-technologie kan worden geïmplementeerd in chirurgische omgevingen over de hele wereld voor routinematige, intraoperatieve beoordeling van de tumor marge tijdens chirurgische resectie van een tumor.

Dit proefschrift bespreekt de stand van de techniek van het onderzoeksveld van weefselclassificatie op basis van massaspectrometrische patronen. Daarin zijn de reproduceerbaarheid van de REIMS-technologie, de betrouwbaarheid ervan voor diagnostisch gebruik en de toepassingen ervan ter ondersteuning van chirurgische resectie essentiële elementen. In dit proces speelt tumor heterogeniteit een cruciale rol. We gaan in op de respectieve implicaties, stellen onderzoeken voor om deze lijn van werk voort te zetten en uit te breiden, en bespreken de lipidenpatronen, de basis van deze classificatie die de onderliggende weefsel-pathobiologie weerspiegelen.

Beeldvormende Massaspectrometrie, bijdragen en onderzoeksrichtingen

In hoofdstuk 1 hebben we de evolutie van beeldvormende massaspectrometrie (MSI) besproken die hebben geleid tot het visualiseren van moleculaire patronen die weefselpathologie betrouwbaar karakteriseren. Technologische en methodologische verbeteringen hebben bijgedragen tot een verbeterde doorvoer, gevoeligheid en ruimtelijke resolutie. Dit heeft het gebruik van MSI in verschillende biomedische toepassingen, waaronder oncologie, gestimuleerd vóór de opkomst van directe bemonsteringstechnologieën om beter gefundeerde chirurgische beslissingen te faciliteren. We hebben de huidige uitdagingen in het veld onderzocht en verder ontwikkeld, waaronder gegevensanalyse, moleculaire identificatie en reproduceerbaarheid, om de klinische translatie van MSI makkelijker te maken.

Het MSI-veld in biomedisch onderzoek is zeer dynamisch en heeft innovatieve studies opgeleverd, variërend van instrumentele ontwikkeling tot toepassingsperspectieven. Ons overzicht illustreerde de zeer diverse specialiteiten, disciplines en doorbraken in het veld, die noodzakelijk zijn om innovatieve benaderingen te implementeren, die op hun beurt dit onderzoeksveld versneld voortduwen. Sinds de publicatie van hoofdstuk 2 hebben al talrijke

publicaties het gebied van MSI uitgebreid, wat de onderzoeksdynamiek illustreert. Nieuwe methodes om de identificatie van lipidenbeeldvorming te verbeteren (375,376) of om een ruimtelijke resolutie op subcellulair niveau te bereiken met MALDI-MSI (377) zijn daar concrete voorbeelden van. Bovendien zijn er specifieke tools voor real-time weefselclassificatie gerapporteerd die speciale chirurgische gereedschappen en omgevingsionisatiebronnen gebruiken voor chirurgische toepassingen (30,31). De veelheid aan mogelijkheden en technologieën die nu beschikbaar zijn voor weefselanalyse door middel van massaspectrometrie, zal naar verwachting de komende jaren het onderscheidende vermogen van MSI in routinematige diagnostiek verder groeien. Eerder werk is gerapporteerd waarin het verband tussen de moleculaire patronen van REIMS en DESI (304) is onderzocht en we kunnen in de toekomst meer complementair onderzoek verwachten om nauwkeurigere bibliotheken te bouwen.

Reproduceerbaarheid van snelle verdampingsionisatie-massaspectrometrie (REIMS)

De betrouwbaarheid van de REIMS-technologie is cruciaal om te bewijzen dat toegepast onderzoek ingezet kan worden voor diagnostisch gebruik. In hoofdstuk 3 hebben we de reproduceerbaarheid van REIMS bestudeerd voor de classificatie van biologische weefsels in een round-robin, multi-center studie. Identieke apparatuur en methodologie werd gebruikt om lokaal verstrekte dierlijke monsters en weefsels van borstsectie te analyseren. Normaal borstweefsel en tumorweefsel kunnen in meerdere landen correct worden geclassificeerd met behulp van modellen die zijn gebaseerd op gegevens uit andere landen. Bovendien verbeterde de combinatie van gegevens van meerdere locaties de classificatienauwkeurigheid voor de herkenning van borstweefsel.

Verder onderzoek naar de reproduceerbaarheid van REIMS voor de classificatie van biologische weefsels is nodig. Onze multi-center studie was gericht op het vaststellen van de methodologie en was beperkt tot enkele klinische monsters per site (<10) op slechts 3 sites. Een bredere studie met meer monsters en meer sites zou een volgende stap naar validatie zijn. Toekomstig onderzoek zou twee hoofddoelstellingen moeten scheiden, namelijk de intrinsieke reproduceerbaarheid van de REIMS-technologie zelf en de reproduceerbaarheid van REIMS voor de toepassing op de classificatie van klinische weefsels.

Hiervoor is het ten eerste nodig om robuuste resultaten van de REIMS-technologie zelf te realiseren voor de classificatie van biologische monsters. Dit houdt in dat alleen de reproduceerbaarheid van REIMS wordt getest met behulp van steekproeven middels een steekproefmethode die zo min mogelijk variabiliteit vertoont. De weefselmonsters kunnen 3 tot 5 standaardmonsters zijn die kunnen worden geproduceerd met een hoge reproduceerbaarheid, zoals de controles kunnen worden geleverd door een nationale instituut voor normen en technologie met fatsoenlijke signalen die een goed vergelijking mogelijk maken. Cellijnen waarvan al is bewezen dat ze geschikt zijn voor REIMS-analyse met een korte doorlooptijd (378) zijn daarvoor ook zeer geschikt. De bemonstering kan worden uitgevoerd met behulp van een CO₂-laseropstelling die een betere precisie (306)

biedt dan elektro-cauterisatie. Hiermee wordt een studie ook onafhankelijk van de operator variabiliteit - zelfs als deze niet significant is gebleken in ons onderzoek. Dit zou het mogelijk maken om resultaten op meerdere sites te vergelijken, onafhankelijk van de klinische sites, wat de inclusie van meer partners mogelijk zou moeten maken. Experimenten moeten regelmatig worden uitgevoerd, herhaald en gedurende maanden worden gereproduceerd, onder dezelfde omstandigheden, om het onderzoek uitsluitend te richten op de beoordeling en kwaliteitscontrole van de REIMS-technologie zelf. Hierbij kan de invloed van technische parameters zoals de detectorversterkingscontrole, de invloed van de drukken, de stroomsnelheid van oplosmiddel, enz eenvoudig meegenomen worden.

Vervolgens moet de toepassing van REIMS voor de classificatie van klinische weefsels zich concentreren op de klinische methodologie en de mogelijke biologische variantie gerelateerd van tumorheterogeniteit in kaart brengen. De samenstelling van een database die is gebaseerd op de gegevens die over meerdere centra zijn verzameld, zou betere kruisvalidatie mogelijk maken. Juist daarom moeten meer sites worden opgenomen in een toekomstige studie. Bovendien moet elke site een aanzienlijk aantal monsters leveren om de heterogeniteit van de pathologie van de het resectie materiaal goed in kaart te brengen. De verschillen in etniciteit van de lokale bevolking zullen naar verwachting leiden tot verschillende moleculaire metabole patronen van tumoren. Bovendien lijkt kruisvalidatie van pathologieonderzoek tussen locaties ook een mooie strategie om het potentiële subjectieve steekproefonderzoek op elkaar af te stemmen en om nauwkeurigere, internationale databases te realiseren. Ten slotte zou herkenning van in-vivo signalen, die op meerdere sites worden gegenereerd, chirurgische implementatie van de technologie en de externe validatie ervan vergroten.

Moleculaire resectie marge en in vivo opname van aerosolen in de operatiekamer

Realtime massaspectrometrische weefselclassificatoren werden ontwikkeld om chirurgen te assisteren tijdens tumorresecties. In hoofdstuk 4 hebben we REIMS gebruikt om een bibliotheek op te bouwen van ex vivo moleculaire patronen van weggesneden weefsels van patiënten die geopereerd zijn voor borstkanker. We valideerden het model met histopathologie en classificeerden adipeus, stroma en tumorweefsel. Dit model maakte herkenning van verschillende typen weefsels in vivo~ mogelijk door de analyse van elektrochirurgische dampen tijdens een borstsparende operatie. Bovendien hebben we tumorgrensende stroma en tumorafgelegen stroma geclassificeerd met REIMS en DESI-MS. Deze resultaten demonstreren het potentieel van borststroma om in realtime kennis over tumorlokalisatie te verkrijgen en zo nauwkeurigere borstsparende operaties uit te kunnen voeren.

Een betere karakterisering van de stromale veranderingen rond borsttumoren is vereist om de moleculaire marge rond de tumor te evalueren en deze tijdens een operatie preciezer aan te tonen. Een nauwkeurige bemonstering van de tumorweefselmarge laat zien hoe ver van de tumor stromale veranderingen kunnen worden gedetecteerd. Dit fenomeen kan

tussen tumoren verschillen, daarom moet de karakterisering ervan worden uitgebreid met verschillende tumortypen.

De hardware van de mobiele massaspectrometer moet worden verbeterd om aan de eisen in de operatiekamer te voldoen. Aanzienlijke wijzigingen in de richting van implementatie, die verder gaan dan het onderzoeksdoel beschreven in dit proefschrift, zijn noodzakelijk. Zo moet het geluidsniveau worden verminderd om de communicatie tussen het personeel in de OK niet te verstoren. Bovendien zou de ontwikkeling van draagbare massaspectrometers (379) een nieuwe ontwerp van dergelijke instrumenten mogelijk maken die het gebruik van op MS gebaseerde intra-operatieve diagnostiek in operatiekamers vergemakkelijken.

De volgende stappen voor de analyse van elektrochirurgische dampen *in vivo* door REIMS moeten zich richten op een betere methodologie om de lokalisatie van door de chirurg verwijderd weefsel ruimtelijk en tijdopgelost te correleren met de beschikbare patiënt informatie (CT, MRI, operatie gebied). Dit maakt het mogelijk om het lipidenpatroonsignaal preciezer te acquireren in de operatiekamer. De combinatie in-vivo REIMS metingen met post-resectie micro-CT (380) of zelfs de integratie van een ruimtelijk genavigeerde chirurgische elektrocauterisatie met de real-time lipidenpatronen (381) zijn veelbelovende onderzoeksrichtingen voor de toekomst.

De uitvoering van de in-vivo metingen in de operatiekamers van het Maastricht Universitair Medisch Centrum zijn verwachting gunstig voor ander toepassingsgericht onderzoek. Naast borstoperaties hebben we ook in vivo metingen uitgevoerd tijdens hoofd/nek tumor-resecties alsmede sarcoomoperaties met behulp van een diathermisch mes. Deze resultaten lieten intense en verschillende moleculaire patronen die van belang zijn voor het gebruik van REIMS in deze chirurgische specialiteiten. Onderzoek naar de combinatie van CO₂-lasersampling met REIMS tijdens in-vivo metingen bij tumorresecties van de keelholte en het strottenhoofd laten veelbelovende resultaten zien. De ontwikkeling van nieuwe toepassingen, zoals de voorspelling van fractuurgenezing (382), laten zien dat dit veld nog volop in ontwikkeling is.

Lipidenpatronen om tumorheterogeniteit en celdood te karakteriseren

Tumor-heterogeniteit beïnvloedt klinische beslissingen buiten de operatiekamer. In hoofdstuk 5 hebben we REIMS op weggesneden leverweefsel toegepast gebaseerd op real-time lipidenpatronen ten behoeve van precisiegeneskunde in leveroncologie. We hebben deze techniek toegepast op twee biomedische studies. Ten eerste hebben we aangetoond dat patronen van primaire tumoren (hepatocellulair carcinoom, HCC) een grotere gelijkenis vertonen met patronen van leverparenchym dan patronen van secundaire tumoren (gemetastaseerd adenocarcinoom, MAC). De heterogeniteit van de tumor lijkt groter in HCC dan in MAC. Ten tweede werd vastgesteld dat MAC en andere tumoren een gemeenschappelijk lipidenpatroon delen waarmee necrotisch weefsel onderscheiden kan worden van levensvatbare tumoren. Een groep sphingolipiden, waaronder ceramides, bioactieve lipiden die betrokken zijn bij celdood, kenmerken dit patroon. Een gerichte

analyse van deze lipiden maakt een subclassificatie van tumoren mogelijk op basis van specifieke metabole verschuivingen. Dit resulteerde in nieuwe perspectieven voor tumorkarakterisering op basis van tumor metabolisme.

Een fundamentele studie naar het gebruik van lipidenpatronen voor intraoperatieve chirurgische diagnostiek vereist het gebruik van een delicaat, minder destructief hulpmiddel. Om die reden is een elektrochirurgische naald gebruikt om een beter inzicht te verschaffen in de REIMS techniek. Daarmee is een beter inzicht verkregen in de biologische variantie van de lipidenpatronen gerelateerd aan de HCC en MAC tumorheterogeniteit. De metabole verschuivingen van ceramiden in necrotisch weefsel zijn daarin meegenomen. De studie van necrose zou verder onderzocht kunnen worden met behulp van biologische assays die gebruik maken van cellijnen om het effect van ischemische of hypoxische aandoeningen op de lipidenpatronen van dode cellen te karakteriseren.

Eclectische moleculaire patronen in weefselpathologie

Massaspectrometrie biedt ongekende mogelijkheden voor structurele karakterisering van moleculen. Weefselclassificatie is aangevuld met experimenten voor betrouwbare moleculaire identificatie en heeft inzicht gegeven in de moleculaire pathobiologie die ten grondslag ligt aan histopathologische veranderingen tussen weefseltypen. Hoofdstukken 4 en 5 illustreren de diversiteit van de moleculaire patronen die voor weefselclassificatie worden gebruikt. Principale componenten analyse van de lipidenpatronen maakte het mogelijk om functies te screenen die onderscheid maken tussen weefseltypen en deze te koppelen aan biologische interpretatie van deze classificatoren.

In hoofdstuk 4 werden de drie belangrijkste weefselcomponenten van de resectie van borstkanker, namelijk tumor, stroma en vetweefsel, geïdentificeerd op basis van lipidenpatronen die voornamelijk worden gekenmerkt door respectievelijk intense glycerofosfolipiden, vetzuren en triglyceriden. De heterogeniteit van deze lipidenklassen is geassocieerd met de histologie van zowel tumorweefsel en van gezond borstweefsel. Er kan echter geen specifiek biologisch verband worden gelegd tussen deze weefsels.

In hoofdstuk 5 laat de classificatie van leverparenchym, hepatocellulair carcinoom en gemetastaseerd adenocarcinoom een verdeling zien langs de hoofdcomponent 1. De beperkte resolutie van een time-of-flight-analysator, beperkte de mogelijkheden voor lipidenidentificatie. Bovendien zijn de biologische verbanden tussen de diverse glycerofosfolipidenklassen moeilijk vast te stellen, wat het trekken van biologische conclusies bemoeilijkt. Wel vonden we dat ceramiden en verwante sfingolipiden necrotisch weefsel onderscheiden van levensvatbare metastatische adenocarcinomen en andere menselijke tumoren. Er zijn metabolische verbanden gerapporteerd tussen ceramiden, acylceramiden, lactosylceramiden en sfingomyelines en hun betrokkenheid bij de regulering van celdood.

De classificatie van afgelegen tumorstroma en tumorgrensstroma rond borsttumoren voornamelijk door een enkel DESI-MS moleculaire piek gediscrimineerd. Dit is geïdentificeerd als een lactaate dimeer. PCA screening op discriminerende massa-eigenschappen bleek niet mogelijk te zijn. Massa-kenmerken met lage intensiteit zijn waarschijnlijk substantieel voor de classificatie die is verkregen na gesuperviseerde LDA.

Net als bij reeds routinematige diagnostische biomarkers zoals voor borstkanker met één enkele marker (*BRCA1*, HER2, enz.) of een combinatie van biomarkers (MammaPrint), kunnen massaspectrometrische moleculaire patronen variëren van 'een wondermiddel' tot 'niet-gekaracteriseerd moleculair patroon'. Het succes van de methode hangt af van het analytische platform, de biologische vergelijking, moleculair accumulatie of consumptie die allen een rol spelen bij het in beeld brengen van metabole fenotypes. Dit proefschrift laat zien dat lipidenpatronen het voordeel hebben dat ze een snelle meting bieden om de ziekte-toestand te beoordelen, maar dat ze minder gevoeligheid hebben om ziekteontwikkelingen te voorspellen in vergelijking met genetische biomarkers. De kracht van massaspectrometrische moleculaire patronen ligt voornamelijk in de analyse van de moleculaire fenotypes voor diagnostiek en prognostiek.