

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
НОВОСИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМ. Н. Н. ВОРОЖЦОВА

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НОВОСИБИРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

Басов Никита Вячеславович

**Разработка и применение подхода к целевому метаболомному анализу
методом ВЭЖХ-МС/МС на монолитной колонке
на основе 1-винил-1,2,4-триазола**

1.5.4 – биохимия

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:

к.х.н. Рогачев Артем Дмитриевич

Новосибирск – 2026

Содержание

Список специальных терминов и сокращений	4
Введение	6
Глава 1. Обзор литературы	15
1.1. Введение в проблематику	15
1.2. Предпосылки развития метаболомики	17
1.3. Развитие аналитических методов для метаболомных исследований	20
1.4. Особенности хроматографического разделения метаболитов при метаболомном скрининге методом ВЭЖХ с масс-спектрометрической детекцией	24
1.5. Обращенно-фазовая ВЭЖХ в метаболомике	26
1.6. Гидрофильная хроматография в метаболомике	28
1.7. Влияние физико-химических свойств метаболитов на удерживание в режимах гидрофильной и обращенно-фазовой хроматографии	31
1.8. Механизмы удерживания и селективность в режимах гидрофильной и обращенно-фазовой хроматографии	35
1.9. Объединение гидрофильной и обращенно-фазовой хроматографии для анализа метаболитов	38
1.10. Заключение по обзору литературы	40
Глава 2. Экспериментальная часть	43
2.1 Реактивы и материалы	43
2.2 Приготовление монолитной колонки	44
2.3 Животные	44
2.4 Клетки	45
2.5 Облучение клеток терагерцовым излучением	45
2.6 Пациенты – участники исследования	46
2.6.1 Сбор образцов от пациентов с послеоперационным делирием	46
2.6.2 Сбор образцов от пациентов с глиобластомой	47
2.7 Пробоподготовка биологических образцов	48
2.7.1 Пробоподготовка образцов контроля качества (QC) плазмы крови человека	48
2.7.2 Пробоподготовка сухих пятен крови мышей	49
2.7.3 Пробоподготовка образцов плазмы крови для скрининга сфингомиелинов в образцах пациентов с ПОД	49
2.7.4 Пробоподготовка образцов глиобластомы и перитуморальных тканей	49
2.7.5 Пробоподготовка клеточных образцов	50
2.8 Высокоэффективная жидкостная хроматография и tandemная масс-спектрометрическая детекция	51
2.9 Предварительная обработка и статистический анализ данных	52

2.9.1	Статистический анализ данных метаболомного скрининга крови мышей	52
2.9.2	Анализ данных скрининга сфингомиелинов в плазме крови пациентов с ПОД...	53
2.9.3	Статистический анализ результатов метаболомного скрининга глиобластомы и перитуморального пространства.....	53
2.9.4	Анализ данных скрининга клеточных образцов	53
2.10	Анализ метаболических путей	53
Глава 3. Обсуждение результатов.....		54
3.1	Разработка метода анализа метаболитов с использованием комбинации разделения ГФХ и ОФХ на органической монолитной колонке с сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола и масс-спектрометрического детектирования	54
3.1.1	Исследование хроматографического поведения эндогенных метаболитов на монолитной колонке с сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола	54
3.1.2	Комбинация режимов ВЭЖХ с дуальным механизмом разделения	59
3.2	Применение разработанного подхода для решения практических задач метаболомики.....	68
3.2.1	Анализ образцов сухих пятен крови, полученных от мышей, облученных рентгеновским излучением.....	68
3.2.2	Исследование содержания сфинголипидов в плазме крови пациентов с послеоперационным делирием с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС.....	76
3.2.3	Изучение особенностей метаболизма глиобластомы	79
3.3	Разработка протокола пробоподготовки для метаболомного скрининга клеточных образцов.....	93
3.3.1	Особенности и ключевые этапы пробоподготовки клеточных образцов: обоснование методического подхода	93
3.3.2	Исследование метаболомного покрытия при анализе образцов клеток с разным количеством клеток	96
3.3.3	Ключевые этапы пробоподготовки клеточных культур для метаболомного анализа методом ВЭЖХ-МС/МС.....	106
3.3.3.1	Нормализация данных, основанная на количестве клеток в образце.....	107
3.4	Исследование воздействия терагерцового излучения на метаболизм клеток меланомы человека SK-MEL-28	112
4.	Заключение.....	115
5.	Выводы	116
6.	Список литературы.....	120

Список специальных терминов и сокращений

- 2D-ВЭЖХ — двумерная высокоэффективная жидкостная хроматография
- ACC — ацетил-КоА-карбоксилаза (англ. Acetyl-CoA Carboxylase)
- ACER — щелочная церамидаза (англ. Alkaline Ceramidase)
- ACS — ацетил-КоА-синтетаза (англ. Acetyl-CoA Synthetase)
- AHM — 3-(акрилоилокси)-2-гидроксипропилметакрилат (англ. 3-(acryloyloxy)-2-hydroxypropyl methacrylate)
- ASAH1 — кислая церамидаза 1 (англ. Acid Ceramidase 1)
- CERT — белок-переносчик церамида (англ. Ceramide Transfer Protein)
- CerS — церамидсинтаза (англ. Ceramide Synthase)
- DESI — десорбционная ионизация электрораспылением (англ. Desorption Electrospray Ionization)
- ESI — ионизация методом электрораспыления (англ. Electrospray Ionization)
- FACS — флуоресцентная сортировка клеток (англ. Fluorescence-Activated Cell Sorting)
- FDR — частота ложноположительных результатов (англ. False Discovery Rate)
- FIASMA — функциональный ингибитор кислой сфингомиелиназы (англ. Functional Inhibitor of Acid Sphingomyelinase)
- GCS — глюкозилцерамидсинтаза (англ. Glucosylceramide Synthase)
- KEGG — Киотская энциклопедия генов и геномов (англ. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)
- MCA — анализ метаболического контроля (англ. Metabolic Control Analysis)
- MRM — мониторинг множественных реакций (англ. Multiple Reaction Monitoring)
- miR — микроРНК (англ. microRNA)
- nano-ESI — нано-электрораспыление (англ. nano-Electrospray Ionization)
- PFP — пентафторфенилпропил (англ. Pentafluorophenylpropyl)
- QuEChERS — быстрый, простой, дешёвый, эффективный, надёжный и безопасный (англ. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)
- SMS — сфингомиелин-синтаза (англ. Sphingomyelin Synthase)
- SMSr — родственный белок сфингомиелин-синтазы (англ. Sphingomyelin Synthase-related Protein)
- SMase — сфингомиелиназа (англ. Sphingomyelinase)
- SPT — серинпальмитойлтрансфераза (англ. Serine Palmitoyltransferase)
- TAT — 1,3,5-триакрилоилгексагидро-1,3,5-триазин (англ. 1,3,5-triacryloylhexahydro-1,3,5-triazine)
- TGF- β — трансформирующий фактор роста β (англ. Transforming Growth Factor Beta)

VBS — п-стиролсульфонат натрия (англ. sodium p-styrene sulfonate)
VIP — переменная важности в проекции (англ. Variable Importance in Projection)
VTr — монолитная колонка на основе винилтриазола
АТФ – аденозинтрифосфат
АДФ – аденозиндифосфат
АМФ – аденозинмонофосфат
ГФХ — хроматография гидрофильных взаимодействий (англ. HILIC)
ГХ-МС — газовая хроматография с масс-спектрометрической детекцией
ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭЖХ-МС/МС — высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией
КЛ — кардиолипид
КоА — кофермент А
кДа — килодальтон
ЛФХ — лизофосфатидилхолин
МС/МС — тандемная масс-спектрометрия (англ. MS/MS)
НАДФ — никотинамидадениндинуклеотидфосфат
НФ – неподвижная фаза
НФ-ВЭЖХ — нормально-фазовая ВЭЖХ
ОФХ — обращенно-фазовая хроматография (англ. RP-LC)
ПОД — послеоперационный делирий
ПЦР — полимеразная цепная реакция (англ. PCR)
ПФ – подвижная фаза
СМ — сфингомиелин
ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания
ТГцИ – терагерцовое излучение
тРНК — транспортная РНК
УВЭЖХ — ультравысокоэффективная жидкостная хроматография
УФ — ультрафиолетовое излучение
ЯМР — ядерный магнитный резонанс
ЦНС — центральная нервная система
ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота

Введение

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Метабомика – новое и активно развивающееся направление в биоаналитической химии, цель которого заключается в количественной оценке совокупности малых молекул (молекулярной массой менее 1,5 кДа), присутствующих в биологической системе в любом ее физиологическом состоянии [1]. Метаболомный скрининг или анализ широкого ряда метаболитов, содержащихся в биологических образцах, является перспективным подходом к изучению биохимических процессов, протекающих в живой системе. В отличие от генома и протеома, метаболом непосредственно интегрирует результаты работы регуляторных и ферментативных каскадов, обеспечивая наиболее близкое к фенотипу описание биологических процессов. Именно поэтому метаболомные исследования находят широкое применение в фундаментальной биохимии, биомедицине, фармакологии, токсикологии и трансляционных исследованиях. Наиболее активно развивается биомедицинское применение метаболомики, включающее в себя поиск диагностических и прогностических биомаркеров в различных биологических образцах.

Современные метаболомные подходы опираются на высокопроизводительные аналитические методы, прежде всего высокоэффективную жидкостную хроматографию в сочетании с масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС/МС), обеспечивающую высокую чувствительность, селективность и возможность одновременного определения широкого спектра метаболитов. При этом важной особенностью метаболома является его высокая химическая неоднородность: метаболиты существенно различаются по полярности, кислотно-основным свойствам, молекулярной массе и структуре. Это делает невозможным их универсальное разделение и детектирование в рамках одного стандартного аналитического режима.

На практике это приводит к необходимости использования нескольких хроматографических подходов, прежде всего обращенно-фазовой хроматографии (ОФХ) и хроматографии гидрофильных взаимодействий (ГФХ, англ. Hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC), которые обладают взаимно дополняющей селективностью. ОФХ эффективно применяется для анализа липофильных и умеренно полярных метаболитов, включая жирные кислоты, липиды, стероиды и гидрофобные витамины, тогда как ГФХ является основным инструментом для разделения высокополярных соединений — аминокислот, органических кислот, нуклеотидов, сахаров и их производных. В то же время применение этих режимов, как правило, требует либо смены хроматографических колонок и условий анализа, либо реализации сложных двумерных схем разделения, что увеличивает трудоемкость, стоимость и снижает воспроизводимость метаболомных исследований.

Особую актуальность в этом контексте приобретает разработка аналитических подходов, позволяющих реализовать комбинированную селективность по отношению к метаболитам различной полярности в рамках единой хроматографической системы. Перспективным направлением является использование органических монолитных сорбентов с функционально модифицированной поверхностью, способных обеспечивать удерживание аналитов как по обращенно-фазовому, так и по гидрофильному механизму. Такие материалы потенциально позволяют проводить целевой метаболомный анализ в различных режимах хроматографирования без замены колонки и элюентов, что особенно важно при сравнительном анализе биологических образцов.

Дополнительным вызовом для метаболомных исследований является разнообразие анализируемых биологических объектов. Метаболомный профиль существенно различается между биологическими жидкостями и тканями органов, а также зависит от физиологического и патологического состояния организма. Анализ плазмы крови, цельной крови, тканей мозга, печени, опухолевых тканей и других биологических образцов предъявляет различные требования к пробоподготовке, хроматографическому разделению и масс-спектрометрической детекции. В связи с этим разработка универсального подхода, применимого к различным типам биологических образцов, представляет собой актуальную задачу современной биохимии и аналитической метаболомики.

Таким образом, разработка и применение комбинированного хроматографического подхода для целевого метаболомного анализа биологических образцов методом ВЭЖХ-МС/МС является актуальной научной задачей, находящейся на стыке биохимии, аналитической химии и системной биологии. Актуальность данного направления определяется современными требованиями к метаболомным исследованиям, включающим обеспечение широкого охвата метаболитов, воспроизводимость измерений, применимость к биологическим образцам различной природы и получение сопоставимых данных для сравнительного метаболомного анализа.

В связи с этим, целью настоящей работы являлась разработка и экспериментальное обоснование нового подхода к целевому скринингу широкого спектра метаболитов методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием монолитной колонки с сорбентом, полученным путем сополимеризации стирола, дивинилбензола и 1-винил-1,2,4-триазола, и взаимодополняющих режимов гидрофильной и обращенно-фазовой хроматографии, а также применение разработанного подхода для анализа метаболитов в биологических образцах различного происхождения.

Задачи исследования:

1. Охарактеризовать хроматографическое поведение ряда эндогенных метаболитов различной полярности в условиях гидрофильной хроматографии (ГФХ) и обращенно-фазовой (ОФХ) на монолитной колонке на основе сополимера стирола, дивинилбензола и 1-винил-1,2,4-триазола и подвижной фазы, состоящей из буферного раствора карбоната аммония ($\text{pH} = 9,8$) и ацетонитрила.
2. Разработать экспрессный подход к целевому скринингу широкого спектра метаболитов, заключающийся в анализе образца в режимах ГФХ и ОФХ и тандемной масс-спектрометрии. Сравнить метаболомное покрытие разработанного подхода с покрытием, достигающимся с использованием коммерчески доступных колонок и соответствующих им условиям хроматографирования.
3. С применением разработанного подхода провести анализ методом ВЭЖХ-МС/МС биологических образцов различной природы, включая плазму крови, сухие пятна крови и образцы биологических тканей и клеточных линий.
4. С использованием разработанного аналитического подхода выявить метаболомные различия биологических систем на примере животных, подвергшихся ионизирующему излучению; пациентов с послеоперационным делирием; образцов первичной глиобластомы и перитуморальной ткани.
5. Разработать и оптимизировать протокол пробоподготовки адгезивных клеточных культур для целевого метаболомного анализа методом ВЭЖХ-МС/МС и апробировать его при исследовании метаболомных эффектов терагерцового излучения на клеточном уровне.

Научная новизна исследования, теоретическая и научно-практическая значимость

В настоящей работе впервые экспериментально обоснована возможность использования монолитной хроматографической колонки с сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола для целевого метаболомного анализа в режимах как гидрофильной, так и обращенно-фазовой хроматографии в рамках одной аналитической платформы ВЭЖХ-МС/МС. Показано, что данный тип сорбента обеспечивает воспроизводимое удерживание и разделение метаболитов различной химической природы, включая полярные низкомолекулярные соединения и липидные молекулы.

Впервые предложен и реализован комбинированный подход к метаболомному скринингу, основанный на последовательном анализе одной и той же пробы в режимах ГФХ и ОФХ на одной монолитной колонке с использованием одной пары элюентов. Такой

подход позволил расширить охват детектируемых метаболитов без применения многомерной хроматографии и без увеличения общей сложности аналитической схемы.

Впервые проведено экспериментальное сравнение метаболомного покрытия, достигаемого при использовании монолитной колонки на основе 1-винил-1,2,4-триазола, с результатами, полученными на коммерчески доступных колонках с сорбентами различной природы (C18, пентафторфенильный, аминопропильный). Показано, что разработанный подход обеспечивает более широкий охват метаболитов при анализе плазмы крови человека по сравнению с традиционно применяемыми колонками.

Впервые с использованием единого целевого подхода методом ВЭЖХ-МС/МС, с использованием режимов гидрофильной и обращенно-фазовой хроматографии выявлены изменения липидного профиля плазмы крови у пациентов с послеоперационным делирием, а также метаболические различия между тканью глиобластомы и перитуморальным пространством, что демонстрирует универсальность разработанного аналитического решения и его применимость для исследований различной биомедицинской направленности.

Впервые показана применимость разработанного метода для анализа сухих пятен крови в задачах радиационной биологии, что позволило выявить метаболические маркеры и нарушенные метаболические пути в крови мышей после рентгеновского облучения, а также проследить их временную динамику.

Теоретическая значимость исследования

Результаты работы расширяют методологические представления о роли хроматографического разделения в метаболомике, показывая, что выбор сорбента со смешанным механизмом удерживания позволяет рассматривать гидрофильную и обращенно-фазовую хроматографию как взаимно дополняющие аналитические режимы в рамках единого подхода. Полученные данные подтверждают, что метаболомное покрытие в значительной степени определяется не только параметрами масс-спектрометрической детекции, но и архитектурой хроматографической системы, что имеет принципиальное значение для интерпретации и сопоставимости метаболомных исследований.

Работа вносит вклад в развитие концепции целевого метаболомного скрининга, демонстрируя возможность оптимального баланса между шириной охвата метаболитов, воспроизводимостью анализа и аналитической чувствительностью при масс-спектрометрической детекции

Научно-практическая значимость исследования

Разработанный подход может быть использован в научных и прикладных метаболомных исследованиях для анализа различных биологических образцов, включая

плазму крови, сухие пятна крови и тканевые образцы, без необходимости применения нескольких хроматографических колонок и сложных двумерных систем. Методика применима для работы с клиническим материалом, что подтверждено при анализе плазмы крови пациентов с послеоперационным делирием, а также тканей глиобластомы, и может быть использована при поиске метаболических и липидных маркеров патологических состояний.

Полученные результаты могут служить основой для дальнейших мультиомных исследований, включая интеграцию метаболомных данных с транскриптомным и протеомным анализом, а также для разработки прикладных диагностических и прогностических подходов в биомедицинских исследованиях.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Подход к целевому метаболомному анализу биологических образцов методом ВЭЖХ-МС/МС, основанный на использовании монолитной колонки с сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола и комбинации последовательных анализов образца в режимах гидрофильной и обращенно-фазовой хроматографии с использованием одного и того же набора элюентов, обеспечивает скрининг как полярных метаболитов, так и липидных молекул за один анализ длительностью менее 30 минут.
2. Разработанный подход позволяет проводить целевой скрининг большего числа метаболитов (полярных и липидных молекул) за один анализ по сравнению с коммерчески доступными хроматографическими колонками (с октадецильной, пентафторфенилпропильной и аминопропильной фазами).
3. Разработанный подход позволяет выявлять изменения содержания метаболитов и работы метаболических путей, отражающие характер системного метаболического ответа на ионизирующее излучение при анализе сухих пятен крови мышей до и после облучения рентгеном.
4. Метаболомный анализ с использованием разработанного подхода позволяет выявить статистически значимые изменения содержания сфингомиелинов в плазме крови пациентов с послеоперационным делирием, что указывает на вовлечение нарушений сфинголипидного обмена в патогенез данного осложнения.
5. Метаболомный анализ тканей глиобластомы и перитуморального пространства с применением разработанного подхода способен выявлять различия в липидном и энергетическом обмене, включая изменения содержания пуриновых метаболитов и церамидов.

6. Применение разработанного и оптимизированного протокола пробоподготовки адгезивных клеточных культур в сочетании с предложенным подходом целевого метаболомного анализа методом ВЭЖХ-МС/МС обеспечивает воспроизводимое извлечение метаболитов различной полярности, демонстрирует зависимость аналитического сигнала и охвата метаболома от клеточной биомассы и позволяет выявлять метаболические перестройки клеток при воздействии физических факторов на примере терагерцового излучения.

Методология и методы исследования

Методологической основой настоящей диссертации послужил системный подход к изучению метаболических изменений в биологических объектах различной природы, основанный на интеграции методов аналитической химии, клеточной биологии, биохимии и биоинформатического анализа данных. Работа выполнена в рамках метаболомики как междисциплинарного направления, ориентированного на анализ широкого спектра низкомолекулярных метаболитов и их биологическую интерпретацию.

Ключевым аналитическим методом являлась высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС/МС). Хроматографическое разделение осуществляли с использованием монолитных колонок с органическим сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола, обладающих дуальным механизмом удерживания и допускающих работу как в режиме гидрофильной, так и обращенно-фазовой хроматографии. Для расширения метаболомного охвата применяли комбинированный подход, включающий последовательный анализ одной и той же пробы в двух указанных режимах хроматографирования.

Масс-спектрометрическую детекцию проводили в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) на масс-спектрометре с источником ионизации электрораспылением и системой тройного квадруполя.

Способ пробоподготовки подбирался с учетом природы биологических образцов и задач исследования. Для анализа плазмы крови и сухих пятен крови использовали осаждение белков органическими растворителями. Для клеточных культур был разработан и оптимизирован протокол пробоподготовки, включающий стандартизированный подсчет клеток, многостадийную промывку, лизис методом циклов замораживания–оттаивания и ультразвуковой обработки, а также экстракцию метаболитов органическими растворителями с добавлением внутренних стандартов.

Исследование включало анализ образцов плазмы крови человека, сухих пятен крови лабораторных животных, опухолевой и перитуморальной ткани головного мозга, а также

клеточных культур. Эксперименты с биологическим материалом проводились в соответствии с действующими этическими нормами.

Обработка данных осуществлялась с использованием методов исследовательского анализа данных. Для статистического анализа применялись t-тест и непараметрические критерии Манна–Уитни и Куккони, а также коррекция на множественные сравнения методом Бенджамини–Хохберга. Биологическая интерпретация результатов включала анализы перепредставленности и обогащенности метаболических путей с использованием веб-интерфейса MetaboAnalyst и базы данных KEGG.

В совокупности использованная методология обеспечила разработку и апробацию подхода к целевому метаболомному анализу биологических образцов различного происхождения и достоверную интерпретацию полученных результатов.

Степень достоверности

Достоверность представленных в работе результатов обусловлена однородностью выборки объектов исследования, достаточным количеством повторных измерений для одного объекта исследования, биохимической согласованностью полученных результатов с ранее опубликованными результатами, а также теоретическим обоснованием полученных экспериментальных данных.

Личный вклад автора

Автором разработаны условия хроматографического разделения в режимах гидрофильной и обращенно-фазовой хроматографии на монолитной колонке с сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола и колонках сравнения. Автор лично провел оптимизацию параметров анализа методом ВЭЖХ-МС/МС, включая выбор элюентов, градиентов элюирования и условий масс-спектрометрической детекции. Автором выполнен основной объем экспериментальных исследований, включая анализ метаболитов плазмы крови человека, сухих пятен крови мышей после рентгеновского облучения, плазмы крови пациентов с послеоперационным делирием и образцов ткани глиобластомы и перитуморального пространства. Автор принимал непосредственное участие в отборе образцов от животных, работе с клиническими данными, пробоподготовке образцов, проведении ВЭЖХ-МС/МС анализа и контроле качества аналитических данных.

Автором самостоятельно выполнена обработка и интерпретация экспериментальных данных, включая анализ хроматографического поведения метаболитов, сравнение метаболомного покрытия при использовании монолитной и коммерческих колонок, анализ данных метаболомных скринингов с использованием методов исследовательского анализа данных и статистического анализа, а также интерпретацию выявленных метаболических

сигнатур. Анализ метаболических путей выполнен автором с использованием специализированных программных средств.

Автором проведен анализ и обобщение полученных результатов, сопоставление их с литературными данными, формулировка выводов и положений, выносимых на защиту. Автором подготовлен текст диссертации. Основная роль в подготовке иллюстративного материала и формировании структуры работы также принадлежит автору. Автором диссертационной работы внесен существенный вклад в подготовку научных публикаций по теме исследования.

Связь диссертации с основными научными темами, внедрение результатов

В диссертацию включены результаты, полученные соискателем при выполнении исследований по гранту РНФ № 22-23-01068 "Синтез новых органических монолитных сорбентов для таргетированного скрининга метаболитов сыворотки крови методом ВЭЖХ-МС/МС и поиска биомаркеров постоперационного делирия" под руководством к.х.н. А. Д. Рогачева и государственного задания FSUS-2025-0012 под руководством чл.-корр. РАН, д.м.н., проф. А. Г. Покровского.

Публикации и апробация результатов исследования

По материалам диссертации опубликованы тезисы 12 докладов, 5 статей в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus. Результаты исследования докладывались на конференциях в виде 5 устных докладов.

Результаты диссертационной работы были представлены на следующих конференциях: Международная научная студенческая конференция (Новосибирск, 2019); Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2022); Всероссийская научная конференция с международным участием «Современные проблемы органической химии» (Новосибирск, 2022); Всероссийская научная конференция с международным участием «Современные проблемы органической химии» (Новосибирск, 2023); International Symposium Medicinal Chemistry and Biomedical Materials Science (Самарканд, 2025).

Объем и структура диссертации

Работа изложена на **144** страницах машинописного текста, содержит **23** рисунка, **13** таблиц и **2** приложения. Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Библиографический список состоит из **230** литературных источников.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю, к.х.н. А. Д. Рогачеву, за постановку задач исследования, постоянное внимание к работе, обсуждение результатов и поддержку на всех этапах ее выполнения, а также за переданные знания и опыт в области ВЭЖХ и масс-спектрометрии. Особую признательность автор выражает за атмосферу открытого научного диалога, в рамках которого различия во взглядах не только допускались, но и поощрялись, становясь важным фактором формирования научного мышления. Автор благодарит чл.-корр. РАН, д.м.н., проф. А. Г. Покровского за научное наставничество, к.т.н. Е. В. Гайслера за обучение исследовательскому анализу данных и поддержку на всех этапах работы, а также заведующего Лабораторией молекулярной патологии д.б.н., проф. В. О. Пустыльняка.

Автор благодарит сотрудников Лаборатории физиологически активных веществ под руководством чл.-корр. РАН, д.х.н., проф. Н. Ф. Салахутдинова за возможность реализации совместных проектов и дружественную, теплую атмосферу. Отдельную благодарность автор выражает д.х.н. доц. О. И. Яровой и М. А. Мельченко за помощь в проведении облучения животных, д.х.н., проф. РАН К. П. Волчо и д.х.н. О. А. Лузину за внимательное прочтение текста диссертации. Автор выражает благодарность сотрудникам Лаборатории фармакологических исследований: д.б.н., проф. Т. Г. Толстиковой за предоставление животных, а также ценные советы при подготовке рукописи, к.б.н. С. В. Анькову и д.б.н., доценту М. В. Хвостову за помощь в проведении фармакологических экспериментов. Особую признательность автор выражает к.х.н. Ю. В. Патрушеву и к.х.н. Ю. С. Сотниковой за предоставление монолитных хроматографических колонок, с исследования которых началось выполнение настоящей диссертации. Автор благодарит сотрудников ИЦиГ СО РАН за помощь в проведении клеточных работ: Е. А. Бутикову и д.б.н. И. А. Разумова. Автор благодарит коллектив лаборатории 8.1 ИЯФ СО РАН и лично к.ф.-м.н. В. М. Попика за участие в совместных работах.

Особые слова благодарности автор выражает своим студентам и учащимся СУНЦ НГУ — за постоянный научный диалог, вопросы и обсуждения, которые нередко становились источником новых идей и дополнительной мотивации, в особенности П. И. Брит, М. А. Сотникову, М. К. Лысенко, Ю. А. Затолоцкую и А. С. Титенко. Автор благодарит к.х.н. А. А. Фирсову за источник мотивации при подготовке диссертации.

Автор благодарит своих учителей — к.х.н., заведующую кафедрой химии СУНЦ НГУ С. Г. Барам и с признательностью вспоминает д.х.н., доцента В. А. Емельянова, которые помогли полюбить химию. Наконец, автор выражает благодарность маме, А. В. Басовой и папе, В. А. Басову, а также близким и друзьям, в особенности Н. Д. Сидоренко, за неизменную поддержку, терпение, любовь и заботу на протяжении всех лет учебы, а также в процессе проведения исследований и написания настоящей диссертации.

Глава 1. Обзор литературы

Методологические основы и развитие хроматографического разделения метаболитов в сочетании с тандемной масс-спектрометрией для метаболомного скрининга

1.1. Введение в проблематику

Метаболомика за последние три десятилетия развилась из набора разрозненных аналитических подходов в самостоятельную область знаний, занимающую центральное место в современной биомедицинской науке. Ее становление стало возможным благодаря одновременному развитию трех компонентов: концептуального — перехода к системному представлению о метаболизме и отказу от линейной схемы «один ген – один белок – один эффект»; технологического — появлению высокопроизводительных методов масс-спектрометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии; и эпистемологического — формированию новых практик работы с высокоразмерными данными, объединяющих эксперимент, моделирование и статистический анализ. В этом контексте метаболомика выступает не только как инструмент количественного анализа низкомолекулярных метаболитов, но и как пример более широкой трансформации научной рациональности в биомедицине.

Впервые термин «метаболом» был предложен Stephen G. Oliver и соавторами в статье 1998 года, опубликованной в журнале *Trends in biotechnology* [2]. «Метаболом» был определен как полный набор низкомолекулярных метаболитов в клетке. По аналогии с геномом и протеомом, метаболом рассматривался как интегральная характеристика клеточного состояния, меняющаяся в ответ на изменения внешней среды и внутренней регуляции. В данной работе, посвященной функциональной геномике дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, в продолжении развития теории МСА, авторы подчеркивали, что поддержание стабильных потоков через метаболические пути требует от клетки способности гибко изменять концентрации отдельных метаболитов в широком диапазоне. Таким образом, внимание сместилось с отдельных ферментативных реакций на взаимосвязанную динамику метаболических сетей, отражающуюся в метаболоме.

Одним из первых приложений метаболомики в рамках функциональной геномики стало обсуждение [2], в котором предлагалась стратегия установления функций генов с неизвестной активностью путем сравнения метаболомных профилей мутантных штаммов дрожжей с делецией этих генов и штаммов с мутациями в генах известной функции. Этот подход основывался на принципе «вины по ассоциации» (*guilt by association*), согласно которому функционально связанные гены приводят к сходным изменениям в метаболоме. Концепция предполагала возможность группировки метаболомных профилей по

функциональным признакам и использовалась как основа для функциональной аннотации генов. Следует отметить, что статья Оливера имела концептуальный характер и не содержала оригинальных экспериментальных данных. Тем не менее, она опиралась на результаты экспериментальных исследований конца 1990-х годов, в которых для анализа метаболомных различий между мутантными штаммами широко применялся метод ЯМР. Использование ЯМР в этих работах позволило сравнивать изменения концентраций метаболитов при относительно ограниченном уровне чувствительности и метаболомного покрытия. И хотя применявшиеся для анализа в тот период методы ЯМР имели ограничения по числу детектируемых метаболитов, уже тогда было продемонстрировано, что даже неполные метаболомные данные позволяют группировать мутантные профили по функциональным признакам. Это подтвердило потенциал метаболомного анализа как инструмента для изучения клеточных функций на системном уровне.

Философско-исторический аспект развития метаболомики тесно связан с критикой редукционистских подходов и утверждением индивидуальности биологических систем как методологически значимого параметра. Начиная с работ R.J. Williams [3] о биохимической индивидуальности и вплоть до концепций системной биологии и теории метаболического контроля, формируется представление о метаболизме как распределенной, многоуровневой системе регуляции, в которой уровни генома, транскриптома, протеома и метаболома связаны нелинейными отношениями. Параллельно развиваются аналитические методы — газовая и жидкостная хроматография, методы мягкой ионизации, масс-спектрометрия высокого разрешения, — которые делают возможным практическое измерение метаболических профилей и их интерпретацию в системных терминах.

На этом фоне особое значение приобретает выбор и оптимизация методов хроматографического разделения как ключевого звена в метаболомных исследованиях. Именно хроматография определяет, какие регионы химического пространства метаболитов становятся доступными для детектирования, с какой воспроизводимостью и точностью можно измерять их концентрации и в какой мере получаемые данные могут быть использованы для биологической и клинической интерпретации. Развитие методов обращенно-фазовой хроматографии, хроматографии гидрофильных взаимодействий, а также их комбинаций в рамках одномерных и двумерных систем для проведения анализов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС/МС) стало определяющим фактором расширения метаболомного покрытия и повышения аналитического качества исследований.

Настоящий литературный обзор посвящен анализу предпосылок становления метаболомики, эволюции аналитических платформ для метаболомного анализа с акцентом на особенности хроматографического разделения метаболитов в режимах ОФХ и ГФХ. В обзоре последовательно рассматриваются: эпистемологические основания системного подхода к метаболизму и место метаболомики в ряду «омиксных» дисциплин; ключевые этапы формирования метаболомики как области знаний — от ранних работ по «метаболическим профилям» до введения понятий «метаболом» и «метаболомика»; развитие масс-спектрометрии и ВЭЖХ как основной аналитической платформы; механизмы удерживания и селективности в режимах ОФХ и ГФХ, влияние физико-химических свойств метаболитов на хроматографическое поведение; современные подходы к расширению метаболомного покрытия, включая комбинированные и двумерные схемы разделения и использование смешанных и многофункциональных фаз. Итогом обзора является формулирование методологических и практических задач, решение которых становится предметом диссертационной работы.

1.2. Предпосылки развития метаболомики

Одним из ранних концептуальных предшественников метаболомики можно считать Roger J. Williams, автора книги *Biochemical Individuality* (1957) [3], в которой он подчеркивал необходимость учитывать индивидуальные различия в биохимическом составе и метаболических процессах организма. Отходя от стандартного подхода в биомедицине, ориентированного на «среднего пациента», Williams настаивал на значении «исключительного», то есть вариативности как фундаментальной характеристики живых организмов. Он предложил рассматривать физиологические и биохимические параметры как уникальные для каждого индивида, тем самым заложив основу для того, что сегодня описывается термином метаболический профиль. Хотя в середине XX века еще не существовало методов, позволяющих в полном объеме изучать уникальность фенотипов, идеи Williams можно рассматривать как философско-научную предпосылку метаболомики. Его подход поднимал важные вопросы: в какой мере стандартизация в науке может игнорировать значимые биологические различия и как индивидуальность может быть учтена в построении универсальных объяснительных моделей. Тем самым Williams выступал не только как биохимик, но и как критик редукционистского подхода в науке, предвосхищая более гибкие, контекстно-чувствительные формы биомедицинского знания. Техническая реализация этого подхода стала возможной спустя десятилетие благодаря развитию методов газовой хроматографии с масс-спектрометрической детекцией (ГХ-МС). Одним из важнейших событий стало опубликование в 1966 году статьи С. Е. Dalglish и др.,

где описывалась процедура разделения широкого спектра метаболитов в моче и тканевых экстрактах с помощью ГХ-МС [4]. Это был один из первых примеров инструментального подхода к анализу метаболических профилей человека. Затем в 1971 году супруги Е. С. Horning и М. G. Horning, соавторы статьи С. E. Dalglish 1966 года, ввели в научный оборот термин *metabolic profiles* (метаболический профиль), опубликовав статью, в которой систематизировали подходы к анализу метаболитов мочи и других биологических жидкостей человека методом газовой хроматографии, положив начало концепции метаболического профилирования [5]. Эти работы ознаменовали переход от концептуальных предпосылок к практическому измерению метаболических данных. В них впервые использовались термины и подходы, ставшие впоследствии частью ядра метаболомики: исследование метаболических отпечатков в биологических жидкостях, поиск закономерностей и диагностика на основе химического состава метаболитов.

На этапе своего становления метаболомика не могла ограничиваться набором аналитических процедур, направленных на выявление метаболитов в биологических образцах. Чтобы претендовать на статус полноценной научной дисциплины, ей было необходимо выйти за пределы технологической базы и интегрироваться в более широкую биологическую и системную картину. Для интерпретации результатов метаболомного анализа следовало рассматривать метаболиты не как изолированные химические вещества, а как продукты и промежуточные звенья биохимических реакций, происходящих в клетке. Следовательно, интерпретация их количественных изменений требовала учета как ферментативных превращений, так и регуляции экспрессии соответствующих генов. Было очевидно, что продукция метаболитов опосредуется активностью ферментов, синтез которых регулируется на уровне транскрипции и трансляции. Однако ранние системные исследования показали, что изменение уровня экспрессии отдельных генов или транскриптов далеко не всегда приводит к значительным изменениям состава метаболома. Напротив, метаболом сохраняет относительную стабильность по качественному составу, при этом демонстрируя высокую вариативность по количественному содержанию. Это обстоятельство указывало на сложный, нелинейный характер регуляции биохимических путей и подчеркивало необходимость системного подхода к анализу. Таким образом формировалось представление о метаболоме как о динамической системе, которая одновременно и отражает состояние живой системы, и регулируется ею.

Основа для системного моделирования метаболических сетей была заложена в работах Kacser & Burns (1973) [6], Heinrich & Rapoport (1974) [7] и Heinrich & Schuster (1996) [8], где была сформулирована, обобщена и формализована теория метаболического контроля (Metabolic Control Analysis, MCA). Суть теории MCA заключалась в

распределении «метаболического потока» между многими ферментами, в противопоставлении сосредоточению в едином «регуляторе». В рамках МСА были введены понятия «контроля» и «чувствительности». Под «контролем» авторы понимали способность фермента (или другого компонента системы) влиять на скорость (поток) метаболического пути в целом, притом параметр контроля не приравнивался к мощности реакции: так, даже ферментативная реакция с низкой скоростью может не являться лимитирующей если изменение ее скорости не влияет на поток в целом. Чувствительность, в контексте теории МСА это способность потока или концентрации метаболита изменяться в ответ на изменение внешнего параметра (например, субстрата, ингибитора, pH и т.п.). Дальнейшее развитие теории МСА прослеживается в работах Kell & Westerhoff (1986) [9] и Kell et al. (1989) [10], где авторами обсуждалась экспериментальная реализация теории: ее применение для анализа реальных биологических систем, а также методы описания метаболических сетей.

Идейное ядро будущей метаболомики с точки зрения системной биологии (еще до появления термина «системная биология») было заложено в работах David A. Fell (1992, 1996) [11,12], ключевыми положениями которых стали выводы о распределенном характере регуляции (не существует ферментов, «управляющих» всем метаболическим путем), содержание метаболитов взаимозависимо, а МСА следует рассматривать как инструмент для анализа целостных систем, а не отдельных локальных превращений. Таким образом, было сформулировано, что понимание метаболизма требует системного подхода, а наука о метаболизме не может опираться на линейные причинные модели, как, например, «один ген - один белок - один эффект». Эти идеи стали центральными для метаболомики, с момента ее формирования в конце 1990-х и утвердили ее назначение как области знаний, связывающей измеряемые концентрации метаболитов с функционированием клеточной системы в целом.

В последние десятилетия биомедицинская наука все более ориентируется на системный подход, в рамках которого анализ отдельных молекул или процессов уступает место комплексному рассмотрению их взаимодействий и совокупных эффектов на уровне клетки и организма. Эта трансформация особенно наглядно проявляется в развитии метаболомики — дисциплины, изучающей низкомолекулярные метаболиты и динамику их содержания в биологических системах. Сформировавшись на стыке аналитической химии, биохимии, системной биологии и биоинформатики, метаболомика отражает переход от редукционистской логики к системной парадигме, в центре которой находятся взаимосвязи, вариабельность и контекст [2,13].

Развитие метаболомики связано не только с расширением экспериментальных возможностей, но и с изменением способов формирования научного знания. Высокопроизводительные аналитические методы приводят к получению сложных, высокоразмерных и трудноинтерпретируемых данных, что требует интеграции эксперимента, моделирования и статистической обработки как равноценных компонентов исследования [14]. Такой подход соотносится с более общими представлениями о смене научных парадигм, описанными в работах Thomas Samuel Kuhn [15], и может рассматриваться как проявление системного сдвига в биомедицинских науках.

Эпистемологическая специфика метаболомики заключается в том, что знание формируется не в виде линейных причинно-следственных цепочек, а как сетевая структура, отражающая взаимозависимость метаболитов, метаболических путей и потоков [6,11]. В этом смысле метаболомика опирается на концепции системной биологии и теории метаболического контроля [16], а ее становление, по Imre Lakatos, может быть рассмотрено в терминах расширяющейся исследовательской программы [16].

Особую роль в развитии метаболомики сыграл технологический прогресс, в особенности — совершенствование масс-спектрометрии, методов жидкостной хроматографии и инструментов анализа больших данных, что подчеркивает зависимость новых научных направлений от технонаучной инфраструктуры современной науки [17,18].

1.3. Развитие аналитических методов для метаболомных исследований

Одновременно с развитием биологических основ метаболомики развивались и аналитические методы. На рубеже 1990–2000-х годов масс-спектрометрия уже активно применялась в биохимических исследованиях, однако в ранних работах по функциональной метаболомике основным методом анализа метаболомных профилей оставался ядерный магнитный резонанс (ЯМР). Это было связано с возможностью получения спектров, отражающих общее изменение состава метаболитов, без необходимости глубокой структурной идентификации каждого компонента. В ранних экспериментах на модели дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* анализ проводился преимущественно на уровне общей картины изменений метаболитов, без детальной количественной идентификации всех соединений: важнее было выявить характерные сдвиги профиля, чем построить полное описание состава.

Развитие метаболомики как научной дисциплины стало возможным благодаря ряду методологических и технологических достижений в области аналитической химии, прежде всего в масс-спектрометрии и жидкостной хроматографии. Исторически развитие масс-спектрометрии для биологических исследований началось с попыток прямого анализа

биологических образцов без стадии хроматографического разделения. В авангарде стояли работы, направленные на применение масс-спектрометрии с прямым вводом, включая пиролитическую масс-спектрометрию [19]. В то же время, данные подходы ограничивались узким набором исследуемых объектов и были слабо совместимы с системным анализом метаболитов в биологических образцах.

Одним из ключевых событий стало внедрение методов мягкой ионизации — ионизации методом электрораспыления (ИЭР, electrospray ionization, ESI) и матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ). В работе J. В. Fenn и соавт. [20] была впервые продемонстрирована возможность генерации многозарядных ионов крупных биомолекул из раствора с помощью ионизации методом электрораспыления. При этом физико-химические основы электрораспыления были заложены значительно ранее в исследованиях Л. Н. Галль и соавт., посвященных распаду заряженных капель и механизмам переноса заряда при электрораспылении, включая одну из первых систематических работ, опубликованную в *Докладах АН СССР* в 1984 году [21]. Таким образом, исследования Л. Н. Галль и соавт. предвосхитили последующее развитие электрораспрей-ионизации в аналитической масс-спектрометрии, реализованное позднее в работах J. В. Fenn и соавт. Технология электрораспыления позволила анализировать крупные биомолекулы с использованием масс-спектрометров, ранее применявшихся преимущественно для низкомолекулярных соединений, благодаря уменьшению отношения массы к заряду (m/z) образующихся ионов и, тем самым, укладывающегося в рабочий диапазон детекторов.

Внедрение электрораспыления оказалась особенно ценным для анализа биологических образцов, таких как плазма крови, культуральные среды и клеточные экстракты. За это открытие J. В. Fenn впоследствии получил Нобелевскую премию по химии в 2002 году. Ионизация методом электрораспыления оказалась совместимой с жидкостной хроматографией, что привело к созданию совмещенных платформ ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС. Параллельно в 1985 году М. Karas и F. Hillenkamp [22] предложили МАЛДИ (англ. — MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Матрично-Активированная Лазерная Десорбция/Ионизация) — метод, основанный на использовании матрицы, поглощающей ультрафиолетовое излучение, которая способствует мягкой десорбции и ионизации молекул при лазерной абляции. Метод оказался эффективным для анализа высокомолекулярных соединений, особенно белков, и привел к революции в области протеомики. В дальнейшем МАЛДИ стал активно применяться также в метаболомных исследованиях.

Параллельно с этим происходило совершенствование методов жидкостной хроматографии высокого давления – высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), из которой в 1990-х годах развилась ультравысокоэффективная жидкостная хроматография (УВЭЖХ). Это обеспечило возможность разделения сложных биологических образцов с высокой разрешающей способностью и чувствительностью. Широкое применение жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС-ВР и ВЭЖХ-МС/МС), как основной технологии в метаболомике началось лишь в начале 2000-х годов, после публикаций, заложивших стандарты для высокочувствительного и массового анализа метаболитов.

На сегодняшний день ВЭЖХ является основной платформой разделения аналитов в большинстве метаболомных исследований, обеспечивая селективное и воспроизводимое разделение метаболитов перед масс-спектрометрическим детектированием. На раннем этапе развития метаболомики применялись преимущественно обращенно-фазовые сорбенты, особенно на основе C18, C8 и фенильных заместителей, что обеспечивало эффективный анализ неполярных и умеренно полярных метаболитов, включая липиды, жирные кислоты, стероиды, витамины и некоторые аминокислоты. Однако недостаточная удерживающая способность обращенных фаз по отношению к гидрофильным соединениям (нуклеотиды, сахара, органические кислоты, амины) ограничивала охват полярного метаболома [23].

В ответ на этот вызов в 1990 году А. J. Alpert предложил метод гидрофильной хроматографии (хроматография гидрофильных взаимодействий, ГФХ; англ. – hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC) как способ эффективного удержания полярных метаболитов на полярной неподвижной фазе в условиях использования водно-органического элюента [24]. В работе был описан механизм удерживания на аминофазной колонке с использованием подвижной фазы ацетонитрил–вода, при этом ключевую роль играли диполь-дипольные, водородные и ионные взаимодействия. В дальнейшем было показано, что разделение по механизму ГФХ возможно с использованием различных неподвижных фаз: амидные (BEH Amide) [25], диольные (Diol) [26], цвиттер-ионные сульфобетаиновые фосфорилхолиновые (ZIC-HILIC) [27], цианопропильные (CN) [28] и др. Эти фазы обеспечили эффективное разделение аминокислот, сахаров, нуклеозидов и органических кислот, критически важных для изучения энергетического обмена и аминокислотного профиля.

С начала 2000-х годов гидрофильная хроматография получила широкое распространение в метаболомных исследованиях, прежде всего за счет своей способности удерживать полярные соединения, плохо удерживаемые в ОФХ. Метод оказался совместим

как с масс-спектрометрией высокого разрешения (например, Q-TOF, Orbitrap), так и с системами на базе тройных квадруполов в режиме мониторинга множественных реакций (MRM), что сделало его универсальным инструментом как для нецелевой, так и целевой метаболомики [29,30]. В сочетании с ионизацией методом электрораспыления ГФХ обеспечивает хорошую совместимость с МС-детекцией. Удерживание полярных метаболитов, таких как аминокислоты, сахара, нуклеотиды, органические кислоты, позволяет отделить их в первую очередь от фосфолипидов, что приводит к снижению эффекта подавления ионизации, улучшает воспроизводимость сигналов и обеспечивает стабильное удерживание высокополярных метаболитов [30,31]. ГФХ также активно используется в клинических исследованиях с использованием масс-спектрометров с системой тройных квадруполов, например, при определении аминокислот в крови, органических кислот в моче и при анализе метаболических нарушений [32,33]. Такой универсальный подход делает комбинацию гидрофильной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией одним из основных методов в современной метаболомике, особенно при работе с водными и внутриклеточными экстрактами.

Кроме обращенно-фазовой и гидрофильной хроматографии, в ранней метаболомике рассматривались альтернативные режимы. Например, в случае ион-парной хроматографии возможно удерживание анионных метаболитов с высокой степенью ионизации и выраженной гидратацией (например, нуклеотидов и органических кислот) в ОФХ-системах, однако использование ион-парных реагентов часто несовместимо с МС-детекцией и требует сложной пробоподготовки. Ионообменная хроматография активно используется для анализа неорганических анионов и катионов, но требует специализированных сорбентов и детекторов (например, кондуктометрии) и поэтому редко применяется в нецелевом метаболомном скрининге. Нормально-фазовая ВЭЖХ (НФ-ВЭЖХ) и гель-фильтрация применялись ограниченно, преимущественно в специфических задачах, таких как липидомика или анализ белков и нуклеиновых кислот.

Принимая во внимание данные, приведенные выше, можно сделать вывод о том, что на сегодняшний день комбинирование режимов гидрофильной и обращенно-фазовой хроматографии можно рассматривать как один из наиболее эффективных подходов в метаболомике, позволяющий анализировать как полярные метаболиты, так и липиды. Такое сочетание как правило реализуется либо через независимые анализы с заменой хроматографической колонки, либо в виде двумерной жидкостной хроматографии (2D-ВЭЖХ). Также ведется развитие «mixed-mode» сорбентов, позволяющих реализовывать гидрофильную, ионообменную и обращенно-фазовую хроматографию в зависимости от типа и используемой подвижной фазы. Однако число работ, описывающих применимость

таких неподвижных фаз для метаболомного скрининга, на сегодняшний день ограничено. Большинство методик хроматографического разделения метаболитов по-прежнему опирается на классические сорбенты для ГФХ и ОФХ. Тем не менее, эволюция ВЭЖХ в метаболомике в целом стала ключевым технологическим фактором, определившим полноту охвата метаболома, воспроизводимость и аналитическую точность исследований метаболитов в сложных биологических системах.

1.4. Особенности хроматографического разделения метаболитов при метаболомном скрининге методом ВЭЖХ с масс-спектрометрической детекцией

Метаболомный скрининг с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в сочетании с масс-спектрометрической детекцией является ключевым подходом для анализа широкого спектра метаболитов в биологических образцах [34]. Количество идентифицированных метаболитов в плазме крови человека составляет несколько тысяч [35], а их концентрации варьируются в широком диапазоне значений. Содержащиеся в биологических образцах метаболиты различаются по своим физико-химическим свойствам, таким как растворимость в воде, кислотность, наличие изомеров и т. д. По этой причине не существует универсального способа детекции абсолютно всех метаболитов одновременно [36]. Развитие инструментальных методов, особенно ВЭЖХ и масс-спектрометрии, позволило существенно расширить круг определяемых веществ, а использование масс-спектрометров высокого разрешения значительно повысило надежность их идентификации. Примеры соответствия режимов ВЭЖХ, применимых для разделения метаболитов (ГФХ, ОФХ, нормально-фазовая хроматография (НФ-ВЭЖХ) и ион-парная хроматография (ИПХ), используемым подвижным (ПФ) и неподвижным фазам (НФ) представлены в Табл. 1.

Табл. 1. Режимы разделения методом ВЭЖХ (адаптировано из [37])

Режим ВЭЖХ	НФ	ПФ	Применение
ОФХ	Неполярная (C18, C8)	Смесь воды и органического растворителя, например метанола или ацетонитрила	Анализ метаболитов, растворимых в воде, при этом удерживающихся на НФ
НФХ	Полярная (силикагель, или силикагель, модифицированный полярными функциональными группами)	Смесь воды и органического растворителя, например метанола или ацетонитрила	Анализ слаборастворимых в воде метаболитов, разделение изомеров
ГФХ	Аналогично НФХ	Аналогично ОФХ, но с избыточным содержанием органического растворителя	Метаболиты с высокой полярностью, слабо удерживаемые в режиме ОФХ
ИПХ	Аналогична ОФХ	Полярная смесь воды и органического растворителя, например метанола или ацетонитрила с добавлением ион-парного реагента (например, алкилсульфонатов, трифторуксусной кислоты)	Кислоты и основания, слабо удерживаемые в режиме ОФХ

Таким образом, сопоставление основных режимов жидкостной хроматографии, применяемых для анализа низкомолекулярных соединений, показывает, что с практической точки зрения именно ОФХ и ГФХ являются ключевыми и фактически базовыми режимами ВЭЖХ в современной метаболомике [38,39]. Нормально-фазовая хроматография, несмотря на высокую селективность при разделении изомеров, ограничена слабой совместимостью с водными биологическими образцами и практически не применяется в метаболомных исследованиях [40]. Ион-парная хроматография, в свою очередь, позволяет удерживать ионные метаболиты, однако использование ион-парных реагентов существенно снижает чувствительность и воспроизводимость масс-спектрометрической детекции при ионизации электрораспылением и затрудняет работу в режиме тандемной масс-спектрометрии, что делает данный подход малопригодным для метаболомного скрининга.

В режиме ОФХ используется неполярная неподвижная фаза (обычно, силикагель с привитыми алкильными цепями C₈ или C₁₈) и водно-органический элюент, тогда как ГФХ определяют как хроматографический режим, при котором используется нормально-фазовая неподвижная фаза и обращенно-фазовый элюент. Эти методы обеспечивают взаимно дополняющую селективность: в режиме ОФХ лучше удерживаются неполярные молекулы,

тогда как ГФХ применяется для удерживания высокополярных аналитов [29,34,41,42]. Благодаря этому, комбинация ОФХ и ГФХ используется для расширения метаболомного покрытия – числа детектируемых метаболитов, однако, как правило, всего в качестве двух независимых анализов. Зачастую в статьях прямо не указывается режим хроматографического разделения ввиду его очевидности из используемой хроматографической колонки и хроматографического градиента, однако можно оценить рост использования ВЭЖХ в метаболомных исследованиях. В базе знаний PubMed по запросу «LC metabolomics» за 20 лет насчитывается более 10 тысяч статей, и с каждым годом число публикаций возрастает, что указывает на актуальность применения жидкостной хроматографии в метаболомном скрининге.

В настоящем обзоре рассмотрены принципы и особенности ОФХ и ГФХ при анализе методом ВЭЖХ с масс спектрометрической детекцией в метаболомике, влияние физико-химических свойств метаболитов на удерживание, механизмы взаимодействия аналитов со стационарной фазой, типичные примеры разделения метаболитов, а также специфика хроматографического разделения метаболитов из разных биологических образцов.

1.5. Обращенно-фазовая ВЭЖХ в метаболомике

Обращенно-фазовая хроматография характеризуется неполярной фазой (например, силикагель, модифицированный октил- (C8) или октодецилсиланами (C18)) и относительно полярной подвижной фазой. Хроматографическое разделение происходит по принципу распределения аналитов между неподвижной фазой и более полярным элюентом: чем больше выражена гидрофобность аналита (за счет наличия неполярных заместителей и слабого дипольного момента молекулы), тем лучше он взаимодействует с неподвижной фазой. Напротив, полярные соединения слабо удерживаются и поэтому плохо разделяются. Полярные элюенты, такие как вода и водные растворы неорганических солей в ОФХ, обладают слабой элюирующей силой, тогда как добавление органического растворителя (ацетонитрила, метанола), напротив, повышает элюирующую силу. Исходя из этого, типичный градиент в ОФХ начинается с высокой доли воды и заканчивается высоким содержанием органического компонента, обеспечивая элюирование наименее полярных (липофильных) аналитов неполярных веществ в конце градиента. Режим ОФХ часто применяется к анализу водных растворов без предварительной пробоподготовки, поскольку ввод пробы, растворенной в воде, хорошо сочетается с хроматографическим градиентом и не приводит к элюированию компонентов пробы или растворителя вместе с подвижной фазой сразу после ввода, до разделения остальных веществ [43]. ОФХ является наиболее устоявшимся и широко используемым режимом хроматографического

разделения в метаболомных исследованиях. По данным исследования [44], в большинстве исследований метаболитов методом ВЭЖХ с масс-спектрометрической детекцией применяют именно ОФХ с колонкам с сорбентами C_8 и C_{18} . Это объясняется исторически длительным развитием обращенно-фазовой хроматографии, доступностью большого выбора колонок и относительной воспроизводимостью и простотой аналитических методик.

Метаболиты класса липидов, хотя и имеющие зачастую полярные группы, являются, как правило, гидрофобными и лучше всего удерживаются на колонках с сорбентом, имеющим неполярные группы (обращенно-фазовые сорбенты), а разделение их наиболее эффективно в условиях ОФХ [45–47]. В то же время многие классы липидов, такие как триглицериды и сложные эфиры холестерина, настолько прочно удерживаются на обращенно-фазовых сорбентах, что требуемое время для элюирования часто оказывается нецелесообразным даже при использовании элюентов с высокой долей органического растворителя [48]. Метод ОФХ эффективен для разделения неполярных метаболитов промежуточного обмена, таких как жирные кислоты, стероидные гормоны, некоторые органические кислоты и т. д.

Существенным ограничением в использовании ОФХ в метаболомном анализе является низкая способность обращенно-фазовых сорбентов к удерживанию полярных аналитов, таких как моносахариды, аминокислоты и нуклеотиды. Вещества с высокой полярностью могут вовсе не взаимодействовать с колонкой и элюироваться вместе с фронтом растворителя. В ряде случаев при анализе таких соединений возможно применение химической дериватизации, повышающей их гидрофобность, и, соответственно, время удерживания [49]. В частности, для анализа аминокислот применяются реакции предколоночной дериватизации (*o*-фталевый альдегид, PITC, дансилхлорид), повышающие их гидрофобность и обеспечивающие эффективное удерживание и разделение в режиме ОФХ [50–52]. Таким образом, ОФХ лучше всего применима для липофильных метаболитов, тогда как сильно полярные вещества могут не удерживаться в этом режиме, а для их анализа требуются альтернативные подходы.

Несмотря на это, ОФХ остается базовым инструментом в метаболомных исследованиях, реализуемых с использованием тандемной масс-спектрометрии благодаря универсальности, совместимости с водными пробами и надежности анализа. ОФХ успешно используется как в целевом метаболомном скрининге (например, для количественного определения липидов или гидрофобных витаминов), так и в нецелевой метаболомике, часто, в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения.

1.6. Гидрофильная хроматография в метаболомике

Гидрофильная хроматография или хроматография гидрофильных взаимодействий (от англ. Hydrophilic-interaction liquid chromatography, HILIC) – вариант нормально-фазовой хроматографии, предложенный *Andrew James Alpert* в 1990 году в работе «*Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds*» [24]. В ГФХ используется полярная стационарная фаза (например, силикагель или силикагель, модифицированный полярными функциональными группами — диол, амиды, циано и др.) и полярные водно-органические элюенты. В гидрофильной хроматографии анализ, как правило, проводят при высоком содержании органического растворителя в подвижной фазе (обычно 90–95% ацетонитрила или метанола и ~5–10% воды). В этих условиях вода адсорбируется на поверхности полярного сорбента, формируя обогащённый водный слой, который играет роль квазинепо подвижной фазы. Полярные аналиты, обладающие большей растворимостью в воде по сравнению с органической фазой, распределяются преимущественно в этом водном слое и, вследствие этого, удерживаются на колонке. При градиентном элюировании увеличение доли воды в подвижной фазе приводит к снижению различий в распределении аналитов между водным слоем и подвижной фазой, что вызывает их десорбцию и элюирование. Более гидрофильные (полярные) соединения взаимодействуют с водным слоем сильнее и, как правило, элюируются позже, чем менее полярные. В случае изократического элюирования аналогичные закономерности наблюдаются при сравнении различных составов подвижной фазы: при меньшем содержании воды удерживание полярных соединений выше, а при увеличении доли воды — снижается. Таким образом, порядок элюирования соединений в ГФХ противоположен таковому в ОФХ: наиболее полярные аналиты удерживаются сильнее и элюируются позже. Следует учитывать, что при увеличении содержания воды в подвижной фазе выше ~20–30% (конкретное значение зависит от природы сорбента и аналита) происходит постепенный переход хроматографического режима от ГФХ к ОФХ, и механизм удерживания начинает определяться преимущественно гидрофобными взаимодействиями.

После пионерской работы А. J. Alpert развитие ГФХ несколько замедлилось, однако с начала 2000-х годов популярность метода резко возросла. В 2002 году была разработана колонка на основе цвиттерионного сорбента ZIC-HILIC, что привело к росту применения ГФХ (Рис. 1).

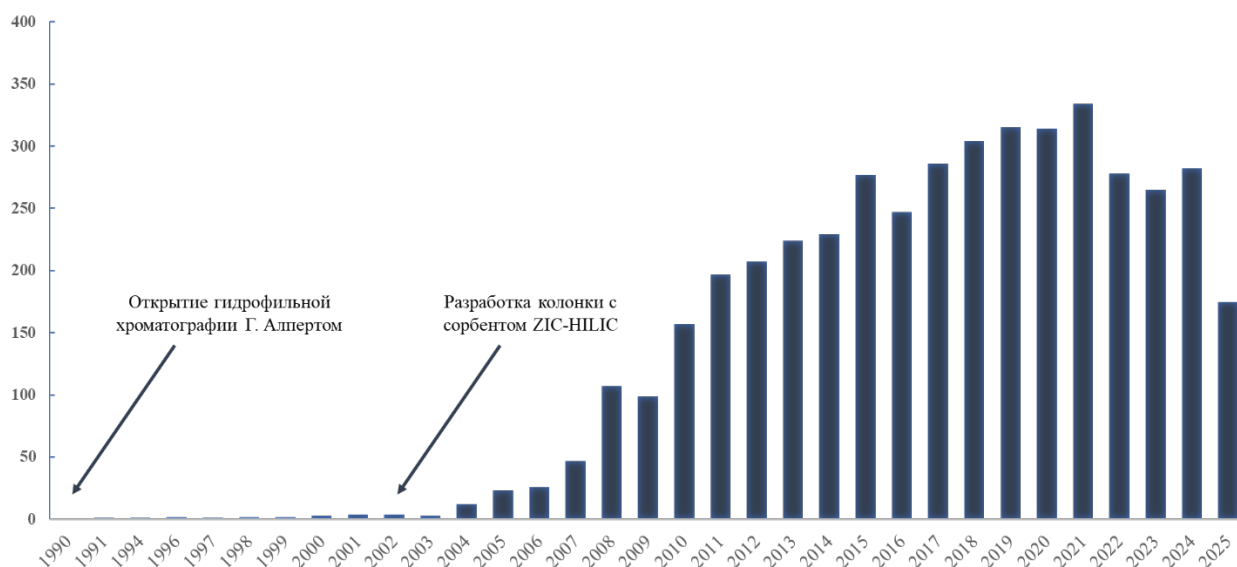


Рис. 1. Динамика публикационной активности по запросу «HILIC AND metabolomics» (число публикаций по годам, база данных PubMed) в 1990–2025 гг.

Сейчас ГФХ стала вторым по распространенности режимом ВЭЖХ в метаболомике после ОФХ [43]. ГФХ позволяет разделять и детектировать такие классы соединений, как органические кислоты, аминокислоты, биогенные амины, катехоламины, нуклеозиды и нуклеотиды и сахарофосфаты. Анализ многих из этих молекул методом ВЭЖХ с масс-спектрометрической детекцией ранее был затруднителен или даже невозможен из-за невозможности их удерживания на ОФХ-колонках. В ГФХ применяется широкий спектр полярных сорбентов. К нейтральным полярным фазам относятся силикагель без модификации, диольные, амидные, цианопропильные фазы. Аминопропильный сорбент при использовании элюентов с высокой кислотностью протонируется и является фазой с заряженной $-\text{NH}_3^+$ группой. Силанольные группы в силикагелевых колонках депротонируются при $\text{pH} > 3$ и приобретают отрицательный заряд, за счет которого усиливается взаимодействие с основными веществами. В ГФХ также используют фазы с привитыми катионо- или анионообменными группами, а также цвиттерионные сорбенты с равным числом положительно и отрицательно заряженных функциональных групп. Пример последнего – фаза типа ZIC-HILIC, содержащая сульфобетаиновые группы. Она электронейтральна в целом, но способна к ионообменным взаимодействиям как с катионами, так и с анионами. Несмотря на то, что основной вклад в удерживание в HILIC вносит распределение аналита между органической подвижной фазой и водой, адсорбированной на поверхности, общая картина механизма значительно сложнее. Обычно помимо распределительного механизма одновременно проявляются дополнительные взаимодействия, такие как ионные (электростатические) между заряженными участками

аналита и функциональными группами фаз, водородные связи и диполь-дипольные взаимодействия. В частности, ионообменный механизм может существенно влиять на порядок удерживания веществ. Показано, что различия в селективности между разными колонками для ГФХ в значительной степени определяются наличием или отсутствием заряда на функциональных группах неподвижной фазы [53]. Таким образом, селективность в ГФХ зависит от химии стационарной фазы и свойств аналитов. Для понимания механизмов разработаны модели, например линейные зависимости энергии сольватации, но пока подбор оптимальной полярной колонки для конкретной задачи часто сводится к эмпирическому поиску.

Главным преимуществом ГФХ в метаболомике является способность эффективно разделять полярные метаболиты, дополняя ОФХ [54]. В ряде работ отмечается, что анализ в режиме ГФХ с МС-детекцией позволяет детектировать больше полярных метаболитов и с более высокой интенсивностью, чем в режиме ОФХ [43,53]. С другой стороны, сложность механизма удерживания в ГФХ приводит к ряду практических трудностей. Во-первых, воспроизводимость удерживания может быть ниже: небольшие изменения содержания воды в органическом элюенте, силы элюента или состояния колонки способны влиять на времена удерживания полярных аналитов. Широкому внедрению аналитических методов с применением ГФХ препятствовала его низкая воспроизводимость и робастность в сравнении с ОФХ. Тем не менее современные ГФХ-фазы и тщательно оптимизированные методики позволяют достигать высокой повторяемости. Например, в исследовании Wernisch et al. показано, что высокоэффективное разделение сложных смесей возможно на цвиттерионной колонке в условиях ГФХ при строгом контроле условий, однако для этого требуется учитывать свойства аналитов (pK_a и полярность) во избежание систематического смещения времен удерживания [34].

Дополнительным недостатком ГФХ является тот факт, что ГФХ пики зачастую шире, чем в ОФХ, за счет меньшего числа теоретических тарелок у колонки, что снижает пиковую емкость. Увеличение ширины пиков снижает эффективность хроматографического разделения и приводит к возрастанию роли масс-спектрометрического разрешения при анализе сложных смесей. Причины уширения пиков включают сильное вторичное взаимодействие аналитов с активными участками сорбента (например, ионные или водородные связи, приводящие к асимметрии пиков), а также диффузию аналитов в неподвижном водном слое. Частично эти проблемы решаются использованием колонок с малым размером частиц (1.7 мкм) в сочетании с хроматографией высокого давления УВЭЖХ и оптимизацией состава подвижной фазы: добавление соли для экранирования ионных взаимодействий (что нежелательно сочетать с ионизацией методом

электрораспыления), или добавление небольшого количества органической кислоты/основания для удерживания pH и подавления остаточных зарядов. Несмотря на перечисленные проблемы, ГФХ активно используется в метаболомных исследованиях. В частности, в комбинации с масс-спектрометрией ГФХ чаще применяется в нецелевой метаболомике, где максимальное число детектируемых метаболитов важнее, чем стабильность времен удерживания. Для целевых исследований ГФХ применяют реже, но такие методики также развиваются (особенно для панелей метаболитов органических кислот, аминокислот и др., связанных с врожденными нарушениями метаболизма). Известным преимуществом использования ГФХ, является то, что высокая доля органического растворителя в смеси элюентов часто приводит к более высокой эффективности ионизации из-за его более высокой летучести [48].

В целом, благодаря ортогональной селективности по отношению к ОФХ и расширению охвата молярных метаболитов, ГФХ является мощным инструментом в метаболомных исследованиях. В результате именно комбинация ОФХ и ГФХ обеспечивает наилучший компромисс между универсальностью, метаболомным покрытием, воспроизводимостью и полной совместимостью с масс-спектрометрической детекцией. ОФХ остается основным режимом для анализа липофильных и умеренно полярных метаболитов, включая липиды, стероиды, жирные кислоты и гидрофобные витамины [55], тогда как ГФХ является ключевым инструментом для удерживания и разделения высокополярных соединений — аминокислот, органических кислот, нуклеотидов, сахаров и их производных, плохо удерживаемых в обращенно-фазовом режиме [56]. Именно эти два режима лежат в основе подавляющего большинства современных ВЭЖХ-МС/МС-платформ, используемых как в целевой, так и в нецелевой метаболомике, а также служат базой для разработки комбинированных и двумерных хроматографических схем, направленных на расширение метаболомного покрытия [57–60].

1.7. Влияние физико-химических свойств метаболитов на удерживание в режимах гидрофильной и обращенно-фазовой хроматографии

Удерживание аналитов в жидкостной хроматографии определяется их взаимодействием как со стационарной, так и с подвижной фазой. Ключевые молекулярные свойства, влияющие на удерживание соединений в ГФХ и ОФХ, включают их полярность (гидрофобность), наличие заряда (кислотно-основные свойства), способность к образованию водородных связей, а также размер и структура молекулы. Рассмотрим эти факторы и их эффект в контексте обращенно-фазовой и гидрофильной хроматографии.

Полярность (гидрофобность/гидрофильность)

Полярность (гидрофобность/гидрофильность) является определяющей характеристикой разделения в обоих режимах, но влияет противоположно: в ОФХ более гидрофобные (менее полярные) соединения сильнее взаимодействуют с неполярной неподвижной фазой и, следовательно, удерживаются дольше. Напротив, гидрофильные аналиты почти не удерживаются и элюируются близко к мертвому времени. Например, сахара, аминокислоты и многие низкомолекулярные органические кислоты имеют настолько высокую полярность, что при хроматографировании на колонке с обращенно-фазовым сорбентом либо не взаимодействуют с ним, либо слабо разделяются с малыми временами удерживания. В режиме ГФХ, наоборот, чем более полярен метаболит, тем больше его время удерживания за счет предпочтительного распределения в водном слое на поверхности неподвижной фазы. Неполярные же молекулы при анализе в режиме ГФХ не находят центров для выгодных взаимодействий с полярным сорбентом и быстро вымываются органическим элюентом, имея, как правило, обратный порядок элюирования относительно ОФХ. Показательно, что удерживание соединений часто коррелирует с их гидрофобностью: например, их коэффициент распределения в системе октанол/вода ($\log P$) обычно прямо пропорционален времени удерживания в ОФХ и обратно пропорционален в ГФХ. Соединения промежуточной полярности (например, некоторые менее полярные органические кислоты, дипептиды, витамины группы В и др.) могут удерживаться в обоих режимах, а их распределение между фазами зависит от тонкого баланса полярных и неполярных групп в структуре. В целом, ОФХ покрывает “гидрофобную” область химического пространства метаболитов, ГФХ – “гидрофильную”, а между ними имеется некоторая область соединений со средней полярностью.

Ионизация, кислотно-основные свойства и заряд

Многие метаболиты в растворе могут существовать в ионных формах: катионных, анионных и многозарядных, включая цвиттер-ионы. Наличие заряда существенно влияет на поведение аналита в хроматографии. В ОФХ нейтральные формы аналита обычно удерживаются сильнее, чем ионизированные, поскольку заряд увеличивает гидрофильность и сродство к полярному водному элюенту. Так, слабые органические кислоты гораздо хуже удерживаются в режиме ОФХ при pH выше, чем их pKa, то есть, когда они в анионной форме, тогда как при низких значениях pH их удерживание в молекулярной (протонированной) форме существенно возрастает. Например, при анализе аминокислот в режиме ОФХ с использованием элюентов с добавлением кислоты время удерживания аминокислот в катионной форме минимально, поэтому в классических методах аминокислоты дериватизируют гидрофобными метками перед анализом.

В ГФХ влияние заряда двойное. С одной стороны, ионные формы способны сильно удерживаться за счет распределения в водном слое. Например, аминокислоты, органические кислоты, сахарофосфаты, как правило, хорошо удерживаются на гидрофильных колонках. С другой стороны, имеют место быть прямые электростатические взаимодействия с функциональными группами сорбента. Если неподвижная фаза несет противоположный заряд, происходит дополнительное притяжение, усиливающее удерживание аналита, например, катионы сильнее удерживаются на силикагеле из-за притяжения к отрицательно заряженным силанольным группам. Обратно, если заряды одинаковые, может возникнуть электростатическое отталкивание, уменьшающее время удерживания. Таким образом, рН подвижной фазы и рКа аналита в ГФХ необходимо тщательно подбирать: например, при работе с колонками на основе силикагеля предпочтительно использовать слегка кислый буфер (рН ~3), чтобы подавить отталкивание анионов (снизить отрицательный заряд фазы) и одновременно удержать катионы. Наоборот, для анионных аналитов может быть выгодно использование фазы с положительными группами или работа при щелочном рН, когда фаза заряжена положительно. Конкретный пример – сравнение удерживания основных (катионных) метаболитов на разных гидрофильных сорбентах: было показано, что такие аналиты сильно удерживаются не только на кислых фазах (как ожидалось), но и на нейтральных амидных, отчасти благодаря образованию водородных связей и дипольных взаимодействий [61]. В целом, ионообменный компонент селективности ГФХ значительно влияет на порядок элюирования и может быть использован для оптимизации методики разделения, например, вводя в состав буфера соответствующие противоионы или выбирая неподвижные фазы с определенным зарядом. Практически это проявляется в том, что на цвиттерионных сорбентах наблюдается специфическая селективность по заряду аналитов: гидрофобные неионные молекулы имеют меньшие времена удерживания, тогда как наиболее полярные катионы (например, катионные формы аминокислот лизина и аргинина) удерживаются сильнее за счет сочетания гидрофильных и электростатических взаимодействий [34]. В ОФХ эти аминокислоты не удерживаются без ион-парных добавок.

Таким образом, заряд метаболита и условия рН влияют на хроматографическое поведение: в ОФХ заряд скорее мешает удерживанию, а в ГФХ может как значительно увеличить, так и уменьшить его – в зависимости от природы заряда у аналита и сорбента.

Функциональные группы аналита и способность к образованию водородных связей

Полярные функциональные группы, такие как $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$, определяют как гидрофильность молекулы, так возможности для специфических взаимодействий с неподвижной фазой и элюентом. Поскольку полярные группы

повышают полярность молекулы, в ОФХ наличие таких групп обычно уменьшает время удерживания. Кроме того, сильно полярные функциональные группы анализируемых соединений могут взаимодействовать с остаточными полярными центрами неподвижной фазы, в частности со свободными силанольными группами на обращенно-фазовых сорбентах. Такие взаимодействия приводят к искажению формы хроматографических пиков, включая асимметрию пика (tailing-эффект). В связи с этим в колонках для ОФХ широко применяется эндкэппинг, направленный на снижение активности остаточных силанолов. В ГФХ способность аналита образовывать водородные связи напрямую способствует удерживанию: аналит может вступать во взаимодействие либо с полярными группами сорбента (сила таких взаимодействий зависит от природы неподвижной фазы), либо с молекулами воды в поверхностном слое. Например, многоатомные спирты и сахара (полиолы) очень сильно удерживаются в ГФХ благодаря множеству гидроксильных групп, способных удерживать их в обводненной неподвижной фазе посредством водородных связей. Показано, что после учета главного фактора (ионного обмена) вторым по значимости для селективности ГФХ является именно способность к донорно-акцепторным взаимодействиям (количество гидроксильных, аминогрупп и др.) [53,62,63]. Различные гидрофильные фазы по-разному реализуют донорно-акцепторным взаимодействия: амидные и диольные, например, лучше всего удерживают вещества за счет водородных связей (они сами способны принимать и отдавать протоны), тогда как при удерживании аналита на силикагеле водородные связи будут иметь меньшее значение.

Для практики это означает, что структурно близкие метаболиты, различающиеся числом полярных групп, будут хорошо разделяться в режиме ГФХ. В ОФХ же такие молекулы могли бы элюироваться совместно из-за сходной гидрофобности. Селективность ГФХ дополняет ОФХ еще и потому, что ГФХ чувствительна к тонким различиям в функциональных группах: например, сахарозу и трегалозу (изомеры дисахаридов) практически невозможно разделить в ОФХ (оба крайне гидрофильны и элюируются в мертвом объеме колонки), тогда как в ГФХ они разделяются за счет разных конфигураций –ОН групп. Другой пример: изомеры метилпиридинов в ОФХ неотличимы по полярности, а в ГФХ могут элюироваться отдельно, так как их взаимодействия (дипольные и водородные) с неподвижной фазой различаются.

Размер и строение молекул

Метаболомный анализ, как правило, направлен на определение низкомолекулярных соединений массой <1500 Да, поэтому молекулярный размер не играет столь существенной роли, как, например, в гель-проникающей хроматографии. В ГФХ молекулы с меньшей молекулярной массой, например, глицин и серин, чаще удерживаются по

распределительному механизму, без взаимодействия непосредственно с поверхностью сорбента, тогда как молекулы с большей массой (например, олигосахариды, олигонуклеотиды) могут дополнительно адсорбироваться на поверхности сорбента. Для низкомолекулярных соединений влияние молекулярных размеров на удерживание, как правило, не является определяющим. Однако при анализе более крупных молекул, в частности пептидов, вклад размеров и молекулярной массы становится существенным. Так, при анализе гликопептидов в режиме ГФХ обнаружено, что удерживание сильно растет с увеличением длины сахарной цепи (т.е. с увеличением гидрофильной поверхности) [64]. Для малых метаболитов решающими остаются полярность и заряд.

Таким образом, физико-химические свойства метаболита определяют его предпочтительный хроматографический метод: для анализа липофильных метаболитов в молекулярной форме методом выбора будет ОФХ, тогда как гидрофильные и ионные аналиты лучше анализировать методом ГФХ или в ионообменных режимах ВЭЖХ. Знание pK_a , $LogP$ и функциональных группы метаболитов позволяет предсказать, будут ли они удерживаться в режиме ГФХ, и оптимизировать условия для улучшения разделения.

1.8. Механизмы удерживания и селективность в режимах гидрофильной и обращенно-фазовой хроматографии

ОФХ традиционно относится к методам разделения, основанным на распределении аналита между неполярной стационарной фазой и более полярной подвижной фазой. Неподвижная фаза обычно представляет собой силикагель, модифицированный длинноцепочечными алкильными группами (C_8 – C_{18}), которые формируют псевдорастворитель с высокой гидрофобностью. Градиентное элюирование, как правило, начинается с подвижной фазы, обогащенной водой, после чего доля органического растворителя постепенно увеличивается.

Распределение аналита определяется его гидрофобностью — способностью переходить в неполярную фазу по сравнению с водной. Удерживание аналита в хроматографической системе определяется его распределением между подвижной и неподвижной фазами, которое, в первом приближении, зависит от относительной растворимости аналита в этих фазах. Количественно это распределение описывается термодинамической константой распределения K , представляющей собой отношение равновесных концентраций аналита в неподвижной и подвижной фазах. Экспериментально наблюдаемой характеристикой удерживания является фактор удерживания k , который связан с константой распределения K через соотношение эффективных объемов фаз в

колонке и, таким образом, отражает не только термодинамику распределения, но и параметры конкретной хроматографической системы.

Изменение состава подвижной фазы влияет на положение равновесия распределения аналита. При увеличении доли органического растворителя снижается полярность подвижной фазы и возрастает растворимость аналита в ней, что приводит к смещению равновесия в сторону подвижной фазы, уменьшению константы распределения K и, как следствие, снижению величины фактора удерживания k .

Селективность ОФХ определяется прежде всего различиями в гидрофобности аналитов, однако играет роль и их структура: возможны специфические взаимодействия, например π – π -взаимодействия с ароматическими сорбентами (фенил- или пиридил-привитыми фазами) и диполь-дипольные взаимодействия с полярными примесями на неподвижной фазе. В целом ОФХ считается универсальным, но мало селективным по функциональным группам методом, поэтому сходные по липофильности соединения часто могут не разделяться, даже если они сильно различаются по строению. Иногда это решается подбором альтернативной неподвижной фазы, например замена фазы C_{18} на фенильную может разделить изомеры, чувствительные к ароматическим взаимодействиям. Другой важный аспект – разделение методом ОФХ очень чувствительно к наличию сильнополярных примесей: свободные силанольные группы могут вызвать нежелательную адсорбцию оснований, поэтому в современных колонках они нейтрализованы эндкэппингом. В целом механизм ОФХ давно и хорошо изучен, что позволяет прогнозировать порядок выхода по известным гидрофобным индексам, например, $\log P$. Если вещество не удерживается, используют дериватизацию либо нормально-фазовую ВЭЖХ или ГФХ.

Для описания влияния состава подвижной фазы на удерживание аналитов в системах ГФХ часто используют модели, заимствованные из нормально-фазовой и обращенно-фазовой ВЭЖХ. Особенно полезными оказываются эмпирические уравнения, связывающие коэффициент фактор удерживания k с содержанием более сильного элюента, в ГФХ — как правило — воды или водного буфера [65].

Двухпараметрическая логарифмическая модель (уравнение 1) эффективна в описании удерживания в системах с локализованной адсорбцией, как в нормально-фазовой хроматографии и некоторых ГФХ-системах [66,67]. Было установлено, что это уравнение удовлетворительно описывает удерживание во многих неводных нормально-фазовых системах с двухкомпонентными органическими подвижными фазами, содержащими неполярный (элюент А) и полярный (элюент Б) растворители [68].

$$\log k = \log k_0 - m \log \varphi \quad (1),$$

где $k = t_R/t_0 - 1$ – фактор удерживания (t_R – время элюирования образца, t_0 – мертвое время, то есть время элюирования неудерживаемого вещества), φ – объемная доля более полярного (сильного) органического растворителя в подвижной фазе, k_0 – фактор удерживания в чистом полярном растворителе (при $\varphi = 1$), m – коэффициент силы элюирования растворителя.

Коэффициент m характеризует влияние концентрации полярного растворителя на скорость снижения удерживания и в адсорбционной хроматографии соответствует числу молекул полярного растворителя, необходимому для вытеснения одной адсорбированной молекулы аналита.

Уравнение (1) может быть применено к ГФХ, и в таком случае φ будет соответствовать значению объемной доли воды (или водного буфера), которая является более полярным компонентом водно-органической подвижной фазы, а k_0 – экстраполированному (не реальному) фактору удерживания в чистой воде или водном буфере. В частности, его применимость продемонстрирована для полярных соединений (эстрогены, азотистые основания, аминокислоты, сахара) на амидных и диольных сорбентах. При содержании воды в подвижной фазе 5–40% (об./об.) более полярные органические растворители характеризуются большими значениями параметра m в уравнении (1), где m представляет собой коэффициент наклона зависимости $\log k$ от $\log \varphi$ и отражает чувствительность удерживания аналита к изменению состава подвижной фазы. Увеличение m указывает на более выраженное влияние состава элюента на удерживание, что согласуется с моделью поверхностной адсорбции [69]. Уравнение 1 не применимо при очень низких концентрациях воды (<2%) в подвижных фазах в условиях ГФХ [70]. В богатых органическими растворителями подвижных фазах в ГФХ данные удерживания могут лучше соответствовать уравнению 2, чем уравнению 1.

$$k = (a + b\varphi)^{-m} \quad (2),$$

где a , b и m – экспериментальные константы, зависящие от аналита и хроматографической системы, $a = 1/(k_a)^{(1/m)}$; k_a – фактор удерживания аналита в неполярной подвижной фазе.

В обращенно-фазовых системах с бинарными водно-органическими подвижными фазами удерживание уменьшается с увеличением концентрации органического растворителя в подвижной фазе, и влияние концентрации (объемной доли) φ органического растворителя в бинарной подвижной фазе на фактор удерживания k может быть описано уравнением 3, по крайней мере, в ограниченном диапазоне концентраций смесей метанол-вода и ацетонитрил-вода [71,72].

$$\log k = \log k_0 - m_1\varphi = a - m_1\varphi \quad (3),$$

где теоретическая константа a в уравнении 3 равна логарифму фактора удерживания аналита, растворенного в чистой воде k_0 , φ — доля органического (в случае ОФХ — сильного) элюента, а параметр m_1 увеличивается с уменьшением полярности органического растворителя и с увеличением размера молекулы аналита. Предполагается, что уравнение 3 в целом применимо в хроматографических системах, где удерживание осуществляется преимущественно по адсорбционному механизму, поэтому его иногда применяют к гидрофильным системам (ГФХ) [65].

Рассмотренные модели удерживания в обращенно-фазовой и гидрофильной хроматографии показывают, что, несмотря на существенные различия в механизмах взаимодействия аналитов со стационарной фазой, обе системы подчиняются сходным эмпирическим зависимостям, связывающим фактор удерживания с составом подвижной фазы. В ОФХ удерживание определяется преимущественно распределением между неполярной неподвижной фазой и полярной водно-органической подвижной фазой, что делает метод высокопредсказуемым и универсальным для соединений широкого диапазона липофильности. В ГФХ, несмотря на более сложную совокупность механизмов — адсорбцию, образование водной пленки, ионообменные взаимодействия и элементы распределения, — изменение содержания воды также оказывает систематический эффект на удерживание и может быть описано логарифмическими или степенными уравнениями.

1.9. Объединение гидрофильной и обращенно-фазовой хроматографии для анализа метаболитов

Перспективным подходом к анализу соединений различной полярности является метод двумерной гидрофильной–обращенно-фазовой ВЭЖХ (ГФХ×ОФХ), основанный на использовании ортогональных 2D-систем, в которых хроматографическое разделение осуществляется на двух колонках с различными механизмами удерживания. Ортогональность подхода обеспечивает значительное расширение метаболомного покрытия, позволяя одновременно анализировать как высокополярные, так и липофильные соединения в биологических образцах. Эффективность таких систем подтверждена в ряде работ: методика анализа 325 пестицидов [73], определение 104 полифенольных соединений в ягодных соках [74], а также исследование антоцианов и производных пигментов в красном вине с идентификацией 94 компонентов [75]. Концепция двумерного анализа (ГФХ×ОФХ)-МСВР также была применена для анализа широкого спектра пестицидов в сочетании с пробоподготовкой методом QuEChERS [76], демонстрируя устойчивость методики к широкому диапазону полярностей аналитов.

Отдельный интерес представляет предложенная Chapel и соавт. стратегия «обращенной гидрофильной хроматографии» (revHILIC) [77], в которой применяется чистый силикагель в сочетании с градиентом, характерным для ОФХ. Подобная инверсия механизма удерживания приводит к формированию селективности, промежуточной между ГФХ и ОФХ, что открывает возможность получения дополнительного аналитического разрешения. Комбинирование revHILIC и ОФХ обеспечивает высокую пиковую емкость и чувствительность, превосходящую традиционные двумерные варианты ОФХ×ОФХ и ГФХ×ОФХ. Такой подход подчеркивает потенциал гибридных режимов как инструмента тонкой настройки селективности под конкретную аналитическую задачу.

Высокая эффективность двумерной ВЭЖХ определяется широким охватом химических свойств аналитов и возможностью использования значительно более широкого диапазона составов подвижных фаз по сравнению с одномерными методами. Системы ГФХ×ОФХ обладают высокой степенью ортогональности, совместимы с тандемной масс-спектрометрией и способны обеспечивать одновременный скрининг полярных и неполярных метаболитов [78]. В то же время, за расширением аналитических возможностей следует и усложнение аппаратной реализации: двумерные системы требуют две или более хроматографические колонки, управляемые переключением потоков, независимые градиенты и зачастую — отдельные наборы элюентов. Это увеличивает стоимость оборудования, усложняет оптимизацию условий анализа и предъявляет более высокие требования к стабильности системы.

В качестве альтернативы двумерной хроматографии развивается направление применения сорбентов, способных обеспечивать удерживание аналитов в нескольких режимах одновременно. Примером является тримодальная колонка на основе нанополимерного силикагеля [79] внутренняя поверхность которого модифицирована для реализации обращенно-фазовых и анионообменных взаимодействий, тогда как внешняя поверхность содержит катионообменный полимер. Такой сорбент демонстрирует удерживание в режимах ОФХ, катионообменной, анионообменной хроматографии, а при высоких концентрациях ацетонитрила — также элементы гидрофильного механизма. Многообразие взаимодействий расширяет диапазон детектируемых соединений и позволяет адаптировать профиль селективности без смены колонки.

Таким образом, развитие одномерных и двумерных систем ВЭЖХ, а также появление мультифункциональных сорбентов отражает общий вектор эволюции метаболомных аналитических подходов: переход от универсальных, но ограниченных методов к гибридным и ортогональным схемам, обеспечивающим максимальное метаболомное покрытие. Двумерная ВЭЖХ и колонки с комбинированными механизмами

удерживания становятся ключевыми инструментами при работе со сложными матрицами и метаболитами с высокой полярностью, однако их применение требует тщательного контроля условий, глубокого понимания механизмов удерживания и существенных ресурсных затрат. В результате именно баланс аналитической эффективности, воспроизводимости и технической сложности определяет выбор подхода в современных метаболомных исследованиях.

1.10. Заключение по обзору литературы

Проведенный анализ показал, что формирование метаболомики как научной дисциплины представляет собой пример комплексного сдвига в биомедицинской науке, затрагивающего одновременно уровень философских оснований, методологии и инструментария. На концептуальном уровне метаболомика продолжает линию идей о биохимической индивидуальности и распределенном контроле метаболизма, сформулированных в работах R. J. Williams, H. Kacser, J. A. Burns, R. Heinrich, S. Schuster и D. A. Fell. Эти идеи привели к отказу от представлений о «главных регуляторах» и к развернутой картине метаболических сетей, где концентрации метаболитов и потоки рассматриваются как согласованно регулируемые параметры целостной системы. Эпистемологически метаболомика опирается на работу с высокоразмерными, частично неполными и контекстно зависимыми данными, требующими интеграции экспериментальных измерений, статистического анализа и моделирования.

Исторически становление метаболомики неотделимо от развития аналитической техники. Переход от первых «метаболических профилей» на основе ГХ-МС и ЯМР к современным платформам ВЭЖХ-МС/МС стал возможен благодаря внедрению методов мягкой ионизации (ESI, MALDI), развитию ВЭЖХ и УВЭЖХ и совершенствованию масс-спектрометров высокого разрешения и на основе тройных квадруполей. Эти технологические инновации радикально расширили метаболомное покрытие, повысили чувствительность и специфичность анализа и позволили интегрировать метаболомные данные в контексте геномики, протеомики и системной биологии.

Ключевым результатом эволюции инструментальной базы стало формирование двух комплементарных режимов разделения — обращенно-фазовой хроматографии и хроматографии гидрофильных взаимодействий, которые совместно охватывают значительную часть химического пространства метаболитов. ОФХ остается основным методом для анализа липофильных и умеренно полярных соединений, обладает высокой робастностью и хорошо разработанной теорией удерживания. ГФХ, в свою очередь, обеспечила доступ к полярным метаболитам — аминокислотам, органическим кислотам,

нуклеотидам, сахарам и их производным, — и стала второй по значимости хроматографической платформой в метаболомике. При этом сложный механизм удерживания в ГФХ, включающий распределение, ионообменные и донорно-акцепторные взаимодействия, одновременно расширяет селективность и предъявляет повышенные требования к контролю условий анализа и воспроизводимости.

Особое место занимают подходы, направленные на объединение преимуществ ОФХ и ГФХ: использование двумерных ГФХ×ОФХ-систем, последовательное применение ортогональных режимов, а также развитие смешанных и мультифункциональных сорбентов, сочетающих гидрофобные и ионообменные свойства и/или элементы ГФХ. Эти решения позволяют существенно расширить охват полярностей, повысить пиковую емкость и степень разрешения, но сопряжены с ростом сложности аппаратной реализации, увеличением времени анализа и затрат на разработку методик.

С позиции задач метаболомного скрининга можно выделить несколько ключевых выводов. Во-первых, не существует единой «универсальной» хроматографической методики, способной одинаково эффективно разделять все классы метаболитов в рамках одного анализа: выбор режима ВЭЖХ, типа сорбента и состава подвижной фазы неизбежно связан с компромиссом между шириной метаболомного покрытия, чувствительностью, воспроизводимостью и длительностью анализа. Во-вторых, физико-химические свойства метаболитов (полярность, заряд, кислотно-основные характеристики, функциональные группы) определяют не только режим хроматографирования, но и оптимальные условия работы МС-детектора, что требует рассматривать хроматографическую и масс-спектрометрическую часть метода как единую систему. В-третьих, несмотря на значительный прогресс, остаются нерешенными проблемы стандартизации методик, влияния матричных эффектов, переносимости методик между лабораториями и платформами, а также формализации критериев «достаточного» метаболомного покрытия для конкретных биологических и клинических задач.

Обобщая материалы обзора, можно заключить, что дальнейшее развитие метаболомики в значительной степени зависит от рационального выбора и комбинирования хроматографических режимов, оптимизации условий ВЭЖХ-МС/МС с учетом физико-химических свойств целевых метаболитов и структуры анализируемых образцов, а также от внедрения методологически обоснованных стратегий дизайна эксперимента и обработки данных. Эти аспекты определяют актуальность дальнейших исследований, направленных на разработку методик метаболомного скрининга, обеспечивающих одновременно высокую информативность, воспроизводимость и применимость в фундаментальных и

прикладных биомедицинских задачах. Именно решению таких задач посвящены последующие разделы диссертационной работы.

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1 Реактивы и материалы

Для синтеза монолитных колонок использовали следующие реактивы. Для обработки внутренней поверхности стеклянных трубок использовали 3-(триметоксисилил)пропилметакрилат (ТМСПМ). Для синтеза монолитных сорбентов применяли: стирол (99 %), дивинилбензол (80 %, смесь изомеров), 1-винил-1,2,4-триазол (99 %), 1-метил-2-пирролидон (99 %), пероксид бензоила (75 %), Pluronic 10R5 (бифункциональный блок-сополимер полипропиленгликоль–полиэтиленгликоль–полипропиленгликоль) в качестве порообразователя. Все реактивы производства Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Германия.

Метанол и ацетонитрил, использованные для пробоподготовки и анализа, относились к градиентной ВЭЖХ и /или для ВЭЖХ-МС и были приобретены в компаниях «Химмед» (Москва, Россия), «Eva Science» (Санкт-Петербург, Россия), «Concord Technology» (Тяньцзинь, Китай). Очищенную воду готовили на установке Sartorius arium 611DI. Элюент А готовили в соответствии с протоколом, описанным в [82]: к 904 мл очищенной воды добавляли раствор 40 мл 0.5 М карбоната аммония, далее приливали 50 мл ацетонитрила, затем раствор доводили 25 % раствором аммиака до установления pH 9.8. 3-хинуклидинол и 2-иодоаненозин, используемые как внутренние стандарты при анализе клеточных образцов, были производства «Sigma» (США).

Для работы с клетками использовали клеточную среду DMEM/F12 (1:1) с 15 мМ NEPES («Биолот», Россия), дополненную 10% фетальной бычьей сывороткой («Cargicorn», Германия), гентамицин («Дальхимфарм», Россия), инкубатор с дотацией CO₂ (Sanyo, Япония), микроскоп Axio Zeiss (Германия), трипановый синий (Sigma, США), клеточный счетчик Invitrogen™ Countess™ Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific, США).

Хроматографическое разделение проводили с использованием хроматографа LC-20AD Prominence (Shimadzu, Япония), оснащенного автодозатором SIL-20AC (Shimadzu, Япония), термостатированным при 10 °С. Масс-спектрометрическую детекцию метаболитов проводили в режиме MRM в виде положительных и отрицательных ионов с использованием масс-спектрометра API 6500 QTRAP (AB SCIEX, США), оснащенного источником ионизации методом электрораспыления.

2.2 Приготовление монолитной колонки¹

Монолитный материал синтезировали в трубках из свинцового стекла С87-2 с внутренним диаметром 2 мм. Для того, чтобы обеспечить ковалентное связывание дивинилбензол-стирольного монолита внутренней стенкой стеклянной трубки, ее поверхность предварительно обрабатывали ТМСПМ, как это описано в [80]. Готовили полимеризационную смесь, состоящую из сомономеров стирол/дивинилбензол/1-винил-1,2,4-триазол в объемных соотношениях 10:50:40 соответственно. Общий объем мономеров составлял 2 мл, объем порообразователя Pluronic 10R5 – 3 мл. В качестве инициатора полимеризации выступал пероксид бензоила, содержание которой составляло 1 % от суммарной массы мономеров. Предварительно обработанную стеклянную трубку заполняли полимеризационной смесью и запаивали оба конца. Далее трубку помещали в воздушный термостат на 4 ч при температуре 80 °С. После этого трубку с образовавшимся монолитом охлаждали и обрезали концы для получения колонки длиной 60 мм.

Колонку устанавливали в хроматограф при помощи стандартных фитингов. Для удаления порообразующего растворителя и остатков полимеризационной смеси колонку промывали ацетонитрилом объемом 1 мл со скоростью 0.01 мл/мин, далее скорость постепенно увеличивали до 0.1 мл/мин. Общий объем ацетонитрила для промывки колонки составлял 20 мл. После этого колонка была готова к работе.

2.3 Животные

В работе использовали аутбредных лабораторных мышей-самцов CD-1 ($n = 7$) массой 23–29 г, возрастом 5-недель. Все животные были получены из ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия). Мыши содержались в клетках при температуре 22–25 °С в режиме 12-часового цикла "свет-темнота" и получали воду, и обычный корм для грызунов *ad libitum*. Перед частичным острым торакоабдоминальным облучением мышей наркотизировали тиопенталом натрия 0,1 мл на 10 г, затем фиксировали на ретракторе и облучали на рентгеновской установке X-Rad320 (Precision X-Ray Inc., Брэдфорд, СТ, США). Использовались следующие условия: фильтр (1,5 мм Al, 0,25 мм Cu, 0,75 мм Sn) с мощностью дозы ~0,98 Гр/мин и суммарной дозой 5 Гр при расстоянии от источника до поверхности 50 см, коллиматор диаметром 3 см. Образцы крови брали из орбитального синуса под общим обезболиванием до облучения (день 0), на 4, 7 и 11-й день. Перед забором крови на кожу наносили местный офтальмологический анестетик.

¹ Приготовление колонок для ВЭЖХ осуществлялось к.х.н. Ю. С. Сотниковой и к.х.н. Ю. В. Патрушевым в ИК СО РАН

Все экспериментальные процедуры при работе с животными были одобрены этическим комитетом Новосибирского института органической химии имени Н. Н. Ворожцова СО РАН в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей 2010 г., а также требованиями и рекомендациями руководства по уходу и использованию лабораторных животных.

2.4 Клетки

В эксперименте использовали клеточные линии меланомы человека SK-MEL-28 и меланомы мыши B16, полученные из коллекции Центра генетических ресурсов лабораторных животных Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия). Клетки выращивали в среде DMEM/F12 (1:1) с 15 мМ HEPES, дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой и 50 мкг/мл гентамицина. Культивирование проводилось при температуре 37°C в инкубаторе с дотацией 5% CO₂. Размеры клеток были определены с использованием микроскопа Axio Zeiss (Германия). Подсчет клеток проводился с помощью прибора Invitrogen™ Countess™ Automated Cell Counter в соответствии с инструкцией производителя после окраски трипановым синим.

2.5 Облучение клеток терагерцовым излучением²

Исследование проводилось на экспериментальной установке «Исследование воздействия терагерцового излучения на живые системы» [12]. Источником высокоинтенсивного когерентного терагерцового излучения в данной работе являлся Новосибирский лазер на свободных электронах (НЛСЭ), расположенный в Сибирском центре терагерцового и синхротронного излучения. Эксперименты выполнялись на одноступенчатом ускорителе-рекуператоре с энергией электронов 12 МэВ, формирующем излучение с длиной волны 130 мкм (2,3 ТГц) и плотностью мощности $I_0 = 0,05574$ Вт/см².

Распределение мощности в пучке описывалось двумерной гауссовой функцией (уравнение 3), где $\sigma_1 = 0,666$ см и $\sigma_2 = 1,5$ см:

$$I = I_0 \times e^{-\frac{x^2}{2\sigma_1^2}} \times e^{-\frac{y^2}{2\sigma_2^2}} \quad (3)$$

Все параметры НЛСЭ приведены в табл. 2.

² Облучение клеток проводилось м.н.с. НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН Бутиковой Екатериной Алексеевной совместно с коллективом НЛСЭ (лаборатория 8.1 ИЯФ СО РАН).

Табл. 2. Основные параметры Новосибирского лазера на свободных электронах

Параметр	Значение
Частота, ТГц; длина волны, мкм	3,3–0,75; 90–400
Частота следования импульсов, МГц	5,6–22,4
Длительность импульса, пс	40–100
Средняя мощность, Вт	≤ 500
Пиковая мощность, МВт	$\leq 0,8$
Минимальная относительная ширина линии, %	0,2–2,0

Культуральные флаконы с клеточными культурами закреплялись на вращающейся платформе, подвешенной вблизи выхода терагерцового источника, и вращались с постоянной скоростью. Выходящее излучение отражалось медным зеркалом снизу вверх и фокусировалось на колбе, на дне которой были зафиксированы клетки. Колбы облучались последовательно, при этом время облучения каждой колбы рассчитывалось как общее время воздействия, делённое на их количество ($n=5$). Температура среды в колбах во время терагерцового облучения поддерживалась на уровне $+37,0 \pm 0,9^\circ\text{C}$ и контролировалась с помощью высокоточного тепловизора TKVr-SVIT101 (Институт физики полупроводников им. А. В. Ржанова СО РАН, Новосибирск, Россия) с точностью до $0,03^\circ\text{C}$. В качестве контроля культуральные флаконы ($n=5$) с клетками помещались в термостат при температуре $+37^\circ\text{C}$, расположенный рядом с установкой для терагерцового облучения, на то же время, что и экспериментальная группа.

2.6 Пациенты – участники исследования

2.6.1 Сбор образцов от пациентов с послеоперационным делирием³

В исследование были включены пациенты старше 65 лет (половозрастная характеристика пациентов представлена в табл. 3), которым проводилась кардиохирургическая операция в условиях искусственного кровообращения. Критериями исключения были: экстренное вмешательство, операция на аорте, гемодинамически значимые стенозы сонных артерий, болезнь Паркинсона, цирроз печени (Чайлд В или С), прием антихолинэргических препаратов, антидепрессантов, противоэпилептических и химиотерапевтических препаратов. Набор пациентов осуществлялся с июня 2019 года по

³ Отбор пациентов для исследования, взятие образцов крови и предоставление клинических данных проводилось сотрудниками национального медицинского исследовательского центра им. Е. Н. Мешалкина (Новосибирск, Россия) Г. Б. Морозом, В. В. Плеско под руководством В. В. Ломиворотова.

январь 2021 года. Всего в исследование было включено 39 пациентов. В течение 5 дней после операции пациенты оценивались на наличие послеоперационного делирия при помощи теста CAM-ICU (Confusion Assessment Method for the Intensive Care Unit). Первый тест проводился через 6–8 часов после операции, далее оценка проводилась два раза в сутки. Наличием делирия считалось если тест CAM-ICU был положительным хотя бы один раз.

Табл. 3. Половозрастная характеристика пациентов – участников исследования прогностических биомаркеров послеоперационного делирия.

Группа	Пол (М/Ж)	Возраст, лет				
		Мин.	Макс.	Средний	Медиана	Станд. отклон
Пациенты без ПОД	11/16	65	75	69.6	70	3.0
Пациенты с ПОД	5/7	65	79	69.7	69.5	4.3

Образцы крови были собраны у пациентов через 24 часа после проведения кардиохирургической операции. Венозную кровь собирали в пробирки BD Vacutainer® KEDTA объемом 10 мл, содержащие ЭДТА калия в качестве антикоагулянта. Плазму отделяли от клеток крови центрифугированием в течение 15 мин при 2000 g и 4°C, разделяли на аликвоты и хранили в замороженном виде при -80°C до дальнейшего использования.

Анализ сфингомиелинов в плазме крови пациентов с ПОД был одобрен этическим комитетом национального медицинского исследовательского центра им. Е. Н. Мешалкина (Новосибирск, Россия).

2.6.2 Сбор образцов от пациентов с глиобластомой⁴

Для получения ткани опухолей в исследование были включены пациенты, подвергшиеся оперативному лечению в нейрохирургических отделениях Новосибирского Научно-исследовательского института травматологии и ортопедии (НИИТО) им. Я. Л. Цивьяна (Новосибирск, Россия) по поводу впервые выявленной ГБМ в 2019–2022 году и включали пациентов с глиомами IV класса, госпитализированных для хирургической

⁴ Отбор пациентов для исследования, взятие образцов ткани и предоставление клинических данных проводилось сотрудниками НИИТО к.м.н. С. В. Мишиновым и д.м.н. В. В. Ступаком

резекции опухоли. Диагноз был подтвержден МРТ и гистопатологическим исследованием эксцизионного образца биопсии. Окончательный диагноз ставился на основании гистологического исследования и заключения двух патоморфологов в соответствии с классификацией ВОЗ. Образцы опухолей были собраны интраоперационно и анонимизированы для исследователей. Всего в исследование было включено 17 пациентов (половозрастная характеристика представлена в табл. 4).

Табл. 4. Половозрастная характеристика пациентов – участников исследования метаболических особенностей глиобластомы.

Пол (М/Ж)	Возраст, лет				
	Мин.	Макс.	Средний	Медиана	Станд. отклон
8/9	28.2	69.6	54.9	63.2	15.9

Исследование образцов глиобластомы и тканей перитуморального пространства рассмотрено Комитетом по этике Института медицины и психологии Зельмана Новосибирского государственного университета (протокол заседания от 04–1/2018), и все экспериментальные протоколы были утверждены. Идентификатор клинических исследований NCT03865355. Все процедуры с участием людей были признаны соответствующими этическим стандартам институционального исследовательского комитета и Хельсинкской декларации 1964 г. и последующим поправкам к ней или аналогичным этическим стандартам. Форма информированного согласия была заполнена и подписана каждым объектом исследования. Исследование одобрено Локальным этическим комитетом Новосибирского НИИТО им. Я. Л. Цивьяна (протокол заседания от 11 сентября 2017 года № 050/17), информированное добровольное согласие получено у всех участников.

2.7 Пробоподготовка биологических образцов

2.7.1 Пробоподготовка образцов контроля качества (QC) плазмы крови человека

Для исследования хроматографического поведения метаболитов и разработки подхода к скринингу широкого спектра метаболитов использовались пулированные образцы плазмы крови человека (образцы контроля качества, QC) Образцы плазмы крови человека были получены ранее в рамках исследований, проводимых в Новосибирском государственном университете, и хранились при температуре - 70°C. Аликвоты по 100 мкл

десяти образцов плазмы смешивались для получения модельного образца контроля качества плазмы (QC). Весь объем объединенного образца плазмы QC делился на аликвоты по 100 мкл, которые замораживались и хранились при -70°C до использования. Перед анализом отбирался свежий образец QC, размораживался и обрабатывался в соответствии с протоколом, описанным в [82]. К 100 мкл плазмы крови прибавляли 400 мкл охлажденной смеси метанола и ацетонитрила в равных объемах. Образцы встряхивали на шейкере, затем центрифугировали при 4°C и 16000g в течение 15 мин. Супернатант переносили в вialу и анализировали. Каждый образец анализировался дважды.

2.7.2 Пробоподготовка сухих пятен крови мышей

Образцы венозной крови мышей собирали с помощью предметных стекол, обработанных гепарином. Образцы высушенных пятен крови (Dried blood spot, DBS) готовились путем пипетирования 10 мкл цельной крови на бумажные карточки Whatman 903TM (GE Healthcare, #10534612, Чикаго, США). Карточки DBS высушивались на воздухе при комнатной температуре в течение 3 ч и хранились при температуре -70°C до момента подготовки. Диски выбивали из DBS с помощью дырокола диаметром 5 мм. Все образцы обрабатывались одновременно в соответствии с протоколом, описанным в работе [82]. Диск, диаметром 5 мм переносили в пробирку объемом 0,5 мл и добавляли 150 мкл экстракционного буфера, состоящего из предварительно охлажденной смеси метанола, ацетонитрила и воды (40:40:20, об./об./об.) и инкубировали при $+4...+5^{\circ}\text{C}$ в течение 20 мин, затем образец центрифугировали при 16 000 g в течение 10 мин при $+4^{\circ}\text{C}$. Супернатант переносили в вialу и анализировали. Каждый образец анализировался дважды.

2.7.3 Пробоподготовка образцов плазмы крови для скрининга сфингомиелинов в образцах пациентов с ПОД

Все образцы были подготовлены одновременно, по методике, описанной в разделе 3.6.1. По той же методике готовили образец контроля качества, полученный путем смешивания равных объемов образцов плазмы крови от пациентов с ПОД и группы контроля.

2.7.4 Пробоподготовка образцов глиобластомы и перитуморальных тканей

Фрагменты опухолевой ткани получали во время циторедуктивного оперативного вмешательства. Свежие фрагменты опухоли немедленно помещали в физиологический раствор и хранили при -70°C до обработки. Фрагменты опухолей разной локализации (центра опухоли и перитуморальная ткань) разделялись с помощью хирургического

инструмента на фрагменты размером от 2×2×2 до 5×5×5 мм, заворачивались в пакеты из стерильной фольги, замораживались в жидком азоте и хранились в дальнейшем в низкотемпературном холодильнике (-80°C). В общей сложности, в исследовании были использованы образцы глиобластомы от 17 пациентов и образцы ткани перитуморального пространства от 15 пациентов.

2.7.5 Пробоподготовка клеточных образцов

Перед пробоподготовкой клетки отделяли от поверхности культуральных флаконов с использованием раствора трипсин–версен в соотношении 1:1, после чего переносили, ресуспендировали и подсчитывали с помощью автоматического счетчика клеток Countess™ (Invitrogen, Карлсбад, США) после окрашивания 0,4%-ным трипановым синим для исключения нежизнеспособных клеток. В рамках данного исследования жизнеспособность клеток составляла 92–95%.

Для валидации точности измерений в лаборатории была проведена внутренняя проверка: три независимых оператора выполняли ручной подсчет клеток с использованием камеры Горяева (гемоцитометра). Сравнение показало, что расхождение между автоматическим и ручным методами не превышало 5–10%, что согласуется с литературными данными. Кроме того, перед использованием прибор автоматически калибровался для каждого типа клеток. Далее из пробирки Falcon отбирали аликвоты и переносили их в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл в следующих количествах клеток: (а) 10 000–12 000; (б) 100 000–120 000; (в) 250 000–270 000; (г) 400 000–450 000; (д) 500 000–550 000; (е) 700 000–750 000; (ж) 1 000 000–1 200 000 клеток. Требуемый объем клеточной суспензии рассчитывали исходя из исходного содержания клеток. Образцы готовили в четырех биологических повторах.

Фактическое число клеток в каждой аликвоте повторно проверяли с использованием автоматического счетчика клеток. Для дальнейшего анализа принимали только те образцы, в которых реальное число клеток было не ниже номинального значения (например, $\geq 100\,000$ клеток для группы «100k»); образцы с меньшим числом клеток отбраковывали и готовили заново.

Затем образцы центрифугировали в течение 5 минут при 1000 g при комнатной температуре для предотвращения повреждения клеток. Культуральную среду удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в 1 мл DPBS. Процедуру промывки повторяли дважды при тех же условиях. После финальной промывки DPBS удаляли, и к клеточному осадку добавляли 100 мкл воды Milli-Q. Образцы тщательно пипетировали для обеспечения полной ресуспензии.

Полученные образцы замораживали и хранили при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до транспортировки в аналитическую лабораторию. Перед анализом образцы оттаивали при комнатной температуре. Каждый образец подвергали двум циклам замораживания–оттаивания (замораживание при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ и оттаивание при комнатной температуре) для обеспечения полного разрушения мембранных структур. После этого образцы подвергали ультразвуковой обработке в течение 5 минут при комнатной температуре. Затем 100 мкл полученного лизата переносили в чистую пробирку объемом 1,5 мл и смешивали с 400 мкл охлажденной смеси метанол:ацетонитрил (1:1, об./об.), содержащей внутренние стандарты — 3-хинуклидинол и 2-иодаденозин — каждый в конечной концентрации 250 нг/мл. Образцы встряхивали на термощейкере в течение 20 минут при $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ и 900 об/мин, после чего центрифугировали при 16 000 g в течение 15 минут при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Супернатант переносили во флаконы для анализа методом ВЭЖХ-МС/МС.

2.8 Высокоэффективная жидкостная хроматография и тандемная масс-спектрометрическая детекция

В экспериментах по исследованию хроматографического поведения метаболитов из плазмы крови, при анализе образцов плазмы крови и тканей объем пробы составлял 2 мкл. Для анализа клеток объем пробы составлял 10 мкл. При разработке подхода к метаболомному скринингу методом ВЭЖХ-МС/МС модельные образцы анализировались в соответствующих условиях, характерных для используемой колонки и представленных в табл. ААА. Анализ сфингомиелинов в плазме крови человека проводился в условиях ОФХ на монолитной колонке. Анализ метаболитов в образцах сухих пятен крови, клетках, тканях глиобластомы и перитуморального пространства, а также анализ сфингомиелинов в плазме крови пациентов с ПОД проводился в режимах ГФХ и ОФХ на монолитной колонке в условиях, представленных в табл. 6, приведенной в разделе «Обсуждение результатов».

Основные масс-спектрометрические параметры: напряжение ионного распыления (IS) – 5500 В для режима положительной ионизации и -4500 В для режима отрицательной ионизации; температура газа-осушителя (TEM) – $475\text{ }^{\circ}\text{C}$, газ в ячейке соударений (CAD) – Medium, давление газа-распылителя (GS1), газа-осушителя (GS2) и газовой завесы (CUR) – 33, 33 и 30 psi соответственно. Потенциал декластеризации (DP) составлял ± 91 В, потенциал входа (EP) – ± 10 В, потенциал на выходе из ячейки соударений (CXP) – ± 9 В. Время сканирования перехода MRM (dwell time) – 5 мс. Переходы ионов-предшественников и фрагментных ионов, названия метаболитов, время фрагментации и соответствующие энергии столкновений были адаптированы из работ [82,85]. При исследовании содержания сфингомиелинов в плазме крови пациентов с ПОД детектировали 9 сфингомиелинов:

CM(d18:1/22:2 OH), CM(d18:1/24:0), CM(d18:1/24:1), CM(d18:1/22:2), CM(d18:1/18:0), CM(d18:1/22:1), CM(d18:1/20:1), CM(d18:1/20:0), CM(d18:1/24:2). В метаболомном скрининге образцов глиобластомы и перитуморальных тканей детектировали 489 метаболитов. При анализе клеточных образцов детектировали 568 метаболитов (358 анализируемых в режиме ГФХ и 210 в режиме ОФХ), а также использовали внутренние стандарты – 3-хинуклидинол и 2-иодаденозин, параметры масс-спектрометрической детекции которых представлены в табл. 5.

Табл. 5. Параметры масс-спектрометрической детекции внутренних стандартов

Внутренний стандарт	Ион-предшественник (<i>m/z</i>)	Дочерний ион (<i>m/z</i>)	CE (V)
3-Хинуклидинол	128.2	82.1 (количественный ион)	45
		41.2 (подтверждающий ион)	55
2-Иодаденозин	394.0	262.0 (количественный ион)	35
		135.1 (подтверждающий ион)	49
CE – энергия соударений (collision energy).			

Управление устройством и сбор информации осуществляли с помощью программного обеспечения Analyst 1.6.3 (AB SCIEX). Хроматограммы обрабатывали в программном обеспечении MultiQuant (AB SCIEX).

2.9 Предварительная обработка и статистический анализ данных

Данные площадей пиков метаболитов были нормализованы методом диапазонного шкалирования (min-max scaling) в диапазон [0;1].

2.9.1 Статистический анализ данных метаболомного скрининга крови мышей

Для сравнения метаболического профиля мышей до облучения с метаболическим профилем на 4, 7 и 11-й дни после облучения были выбраны метаболиты, внесшие наиболее существенный вклад в формирование метаболомных сигнатур облучения. Сравнение проводилось по площадям пиков, для чего был проведен статистический анализ с использованием t-теста Стьюдента и отобраны метаболиты с $p < 0,05$.

2.9.2 Анализ данных скрининга сфингомиелинов в плазме крови пациентов с ПОД

Исходные данные были предварительно обработаны для заполнения пропущенных значений содержания метаболитов в анализируемых пробах, следующим образом. В случае если число проб с пропусками не превышало 5% от общего числа значений по 39 пациентам, то в качестве значения содержания метаболита бралось значение медианы, рассчитанной по остальным пробам. Такой подход обусловлен робастностью медианы к выбросам. Оценка статистических различий по содержанию метаболитов в пробах плазмы крови в группе пациентов с ПОД и группе без ПОД проводилась с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни.

2.9.3 Статистический анализ результатов метаболомного скрининга глиобластомы и перитуморального пространства

Статистический анализ результатов метаболомного скрининга глиобластомы и перитуморального пространства проводился при использовании теста Манна-Уитни и теста Кукокони (Cucconi test). Тест Манна-Уитни был проведен в Microsoft Office Excel 2019 без использования дополнительных надстроек, а тест Кукокони был реализован в Python. Коррекция выбросов осуществлялась следующим образом. Выбросом считалось значение, выходящее за полтора межквартильного интервала. Если значение было определено как выброс, оно заменялось на скорректированное по следующему правилу: замена производилась на значение, равное $1.5 \times \text{значение межквартильного интервала} \pm 10^{-5}$ (значение вычиталось при выбросах «вверх» и прибавлялось при выбросах «вниз»).

2.9.4 Анализ данных скрининга клеточных образцов

Для оценки метаболомного покрытия проводилось сравнение площадей пиков метаболитов в образцах с каждым из содержаний клеток со значениями площадей пиков, детектируемых в чистом растворителе при использовании пермутационного теста.

2.10 Анализ метаболических путей

Для выявления метаболических путей на основе установленных метаболитов с высокой значимостью использовалось онлайн-программное обеспечение MetaboAnalyst 5.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>) [229] с инструментами «Анализ обогащения (Enrichment Analysis)» и «Анализ путей (Pathway Analysis)». Все диаграммы Венна была построена с помощью инструмента jvenn [230].

Глава 3. Обсуждение результатов

3.1 Разработка метода анализа метаболитов с использованием комбинации разделения ГФХ и ОФХ на органической монолитной колонке с сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола и масс-спектрометрического детектирования

3.1.1 Исследование хроматографического поведения эндогенных метаболитов на монолитной колонке с сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола

При сополимеризации стирола, дивинилбензола и модифицирующего мономера формируется полимерный монолит, ковалентно связанный с поверхностью стеклянной трубки и представляющий собой трёхмерную сетчатую структуру. В работах [80,81] были получены и охарактеризованы монолитные колонки на основе 1-винил-1,2,4-триазола, обеспечивающего полярные свойства сорбента. Показано, что изменение содержания данного мономера позволяет регулировать полярность материала и хроматографические характеристики колонок, пригодных для работы в режимах ОФХ и ГФХ.

Важным этапом разработки методик метаболомного скрининга является подбор подвижной фазы, совместимой с масс-спектрометрическим детектированием. Существенный вклад в развитие подходов к метаболомному анализу внесли Kefeng Li и соавт. [82], показавшие, что использование 20 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ при pH 9.8 повышает эффективность ионизации гидрофильных метаболитов в источнике ESI и обеспечивает одновременное определение более 600 соединений методом ВЭЖХ-МС/МС. Также было продемонстрировано, что щелочной карбонатный буфер обеспечивает более стабильный аналитический сигнал по сравнению с формиатными и ацетатными системами. Работа в щелочной области pH требует применения химически устойчивых стационарных фаз. В связи с этим использование органических полимерных монолитных колонок стало перспективным решением для задач метаболомного анализа.

Для оценки хроматографического поведения метаболитов различной химической природы на разработанной монолитной колонке были выбраны классы соединений, охватывающие широкий диапазон полярности, характерный для метаболома плазмы крови. В качестве представителей более полярных соединений анализировали аминокислоты и ацилкарнитины, тогда как в качестве менее полярных — липиды, включая церамиды, фосфатидилхолины и фосфатидилинозитолы. Методом ВЭЖХ-МС/МС были получены хроматограммы пуллированного образца плазмы крови человека, включающие 36 аминокислот, 41 ацилкарнитин, 18 церамидов, 19 фосфатидилхолинов и 9 фосфатидилинозитолов. На рис. 2 представлены структурные формулы исследуемых классов соединений в обобщённом виде.

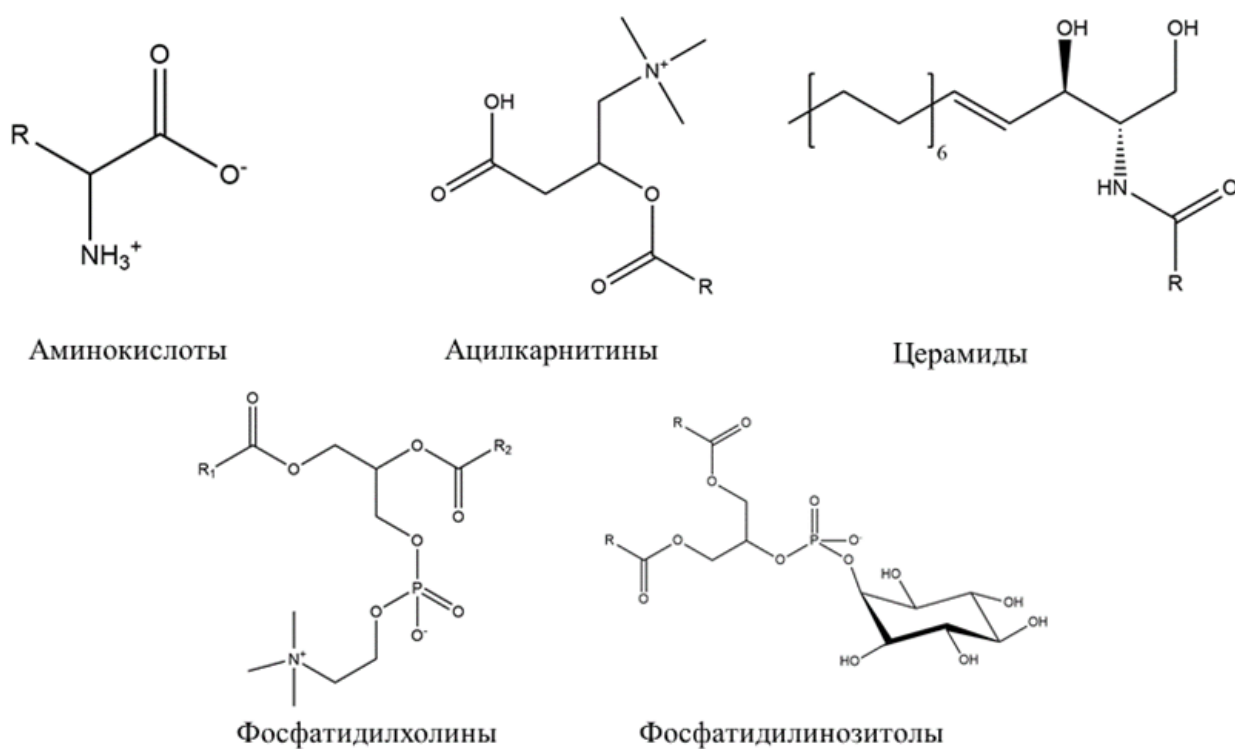


Рис. 2. Структурные формулы исследованных классов метаболитов.

Анализ выбранных метаболитов в образце плазмы крови показал, что по своим хроматографическим свойствам их можно разделить на несколько групп. Так, некоторые метаболиты удерживались сорбентом и имели хроматографический пик в условиях ГФХ, а в условиях ОФХ не давали сигнала либо выходили в мертвом объеме. Часть веществ давали аналитический сигнал в обоих режимах хроматографии, но при этом элюировались в мертвом объеме в условиях ГФХ и удерживались сорбентом в условиях ОФХ. Примеры хроматограмм, иллюстрирующих описанное поведение метаболитов, приведены на рис. 3.

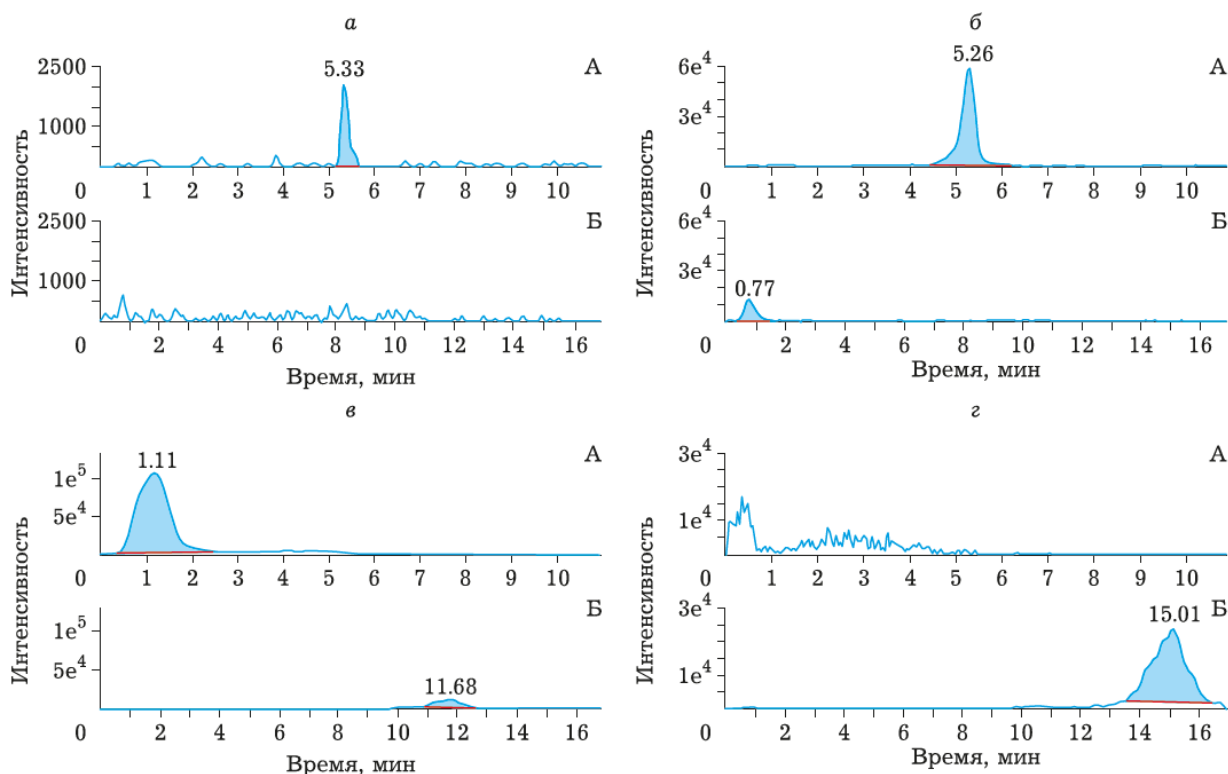


Рис. 3. Хроматограммы метаболитов в режиме гидрофильной (А) и обращено-фазовой хроматографии (Б): *а* – глицин; *б* – аланин; *в* – фосфатидилхолин (32:2); *г* – церамид (18:1/24:0).

Аминокислоты — органические соединения, содержащие как минимум одну аминогруппу и как минимум одну карбоксильную группу. Аминокислоты при элюировании чистым элюентом А – водным раствором карбоната аммония, доведенным аммиаком до pH 9.8, – элюируются в виде карбоксилата, т. е. депротонированы по карбоксильной группе. Таким образом, аминокислоты при любом режиме хроматографирования должны элюироваться при высокой доле элюента А. Исследованные в нашей работе аминокислоты (36 соединений) проявлялись в виде хроматографического пика в условиях ГФХ, при этом 31 соединение имело время удерживания от 5 до 6 мин, а оставшиеся 5 метаболитов элюировались в мертвом объеме колонки (см. рис. 3, б). При смене режима элюирования на ОФХ хроматографический пик наблюдался у 26 аминокислот из 36, однако все они элюировались в мертвом объеме. Отсутствие сигнала у остальных 10 метаболитов данного класса (например, глицина, см. рис. 3, а), наиболее вероятно, обусловлено подавлением ионизации, вызванным компонентами биологического образца. Наблюдаемое хроматографическое поведение аминокислот указывает на то, что их взаимодействие с монолитной колонкой на основе винилтриазола происходит по механизму только гидрофильного взаимодействия, а при элюировании в обращенно-

фазовом режиме аминокислоты, содержащиеся в образце, не удерживаются и элюируются в мертвом объеме.

Церамиды являются подклассом липидов – производных сфингозина и жирной кислоты. Они выполняют не только строительную функцию, участвуя в формировании клеточных мембран, но также могут принимать участие в дифференциации и пролиферации клеток и апоптозе [83,84]. В нашей работе было проанализировано 17 метаболитов данного класса и было отмечено, что все эти соединения элюируются чистым органическим элюентом Б, а их ионизация существенно зависит от наличия гидроксильной группы в заместителе R. При этом для метаболитов, являющихся производными гидроксилсодержащих жирных кислот, не наблюдали пики на хроматограммах в обоих режимах элюирования, за исключением церамида 18:1/24:0-ОН, имеющего время удерживания около 14.7 мин в режиме ОФХ. Такое поведение может указывать на следующее: либо происходит необратимая адсорбция веществ данного класса на колонке, либо их содержание в исследованном образце было мало. В отличие от гидроксильрованных церамидов, для метаболитов данной группы, имеющих остаток незамещенной жирной кислоты, наблюдался уширенный пик на хроматограмме со временем удерживания 14–15 мин.

Из исследованных в данной работе ацилкарнитинов (41 метаболит), имеющих разную длину цепи жирнокислотного заместителя, все вещества детектировались при анализе в режиме ГФХ, однако при этом часть из них не удерживались и не проявлялись на хроматограмме в виде пика в режиме ОФХ. К таким метаболитам относятся ацилкарнитины с длиной цепи менее C_{10} , а также ацилкарнитины с большей длиной цепи, но при этом имеющие гидроксигруппу в качестве заместителя по ацильной группе. В отличие от этих метаболитов, ацилкарнитины с заместителем C_{10} – C_{18} , в том числе ненасыщенные и не имеющие гидроксигрупп, удерживались сорбентом при анализе в режиме ОФХ.

В ходе анализа фосфатидилхолинов были получены однотипные результаты: все исследованные метаболиты данной группы элюировались в мертвом объеме в режиме ГФХ, тогда как при анализе в условиях ОФХ их время удерживания составляло 11–12 мин. Родственные им по структуре фосфатидилинозитолы проявлялись в виде пиков на хроматограммах только при использовании режима ГФХ с близкими значениями времен удерживания (около 5 мин). При этом пиков веществ на хроматограммах, полученных в режиме ОФХ, не наблюдалось.

По результатам анализа времен удерживания метаболитов в разных режимах анализа был построен график, отражающий поведение исследованных метаболитов в условиях ОФХ и ГФХ (рис. 4). Данный график построен в координатах нормированных времен

удерживания в двух режимах соответственно. Так, кластер 1 образован главным образом ацилкарнитинами с короткой углеродной цепью, не удерживающимися на колонке ни в режиме ГФХ, ни в режиме ОФХ. Аминокислоты образовали кластер 2, а длинноцепочечные ацилкарнитины и фосфатидилхолины как метаболиты, удерживающиеся сорбентом в режиме ОФХ и выходящие в мертвом объеме колонки, – кластер 3.

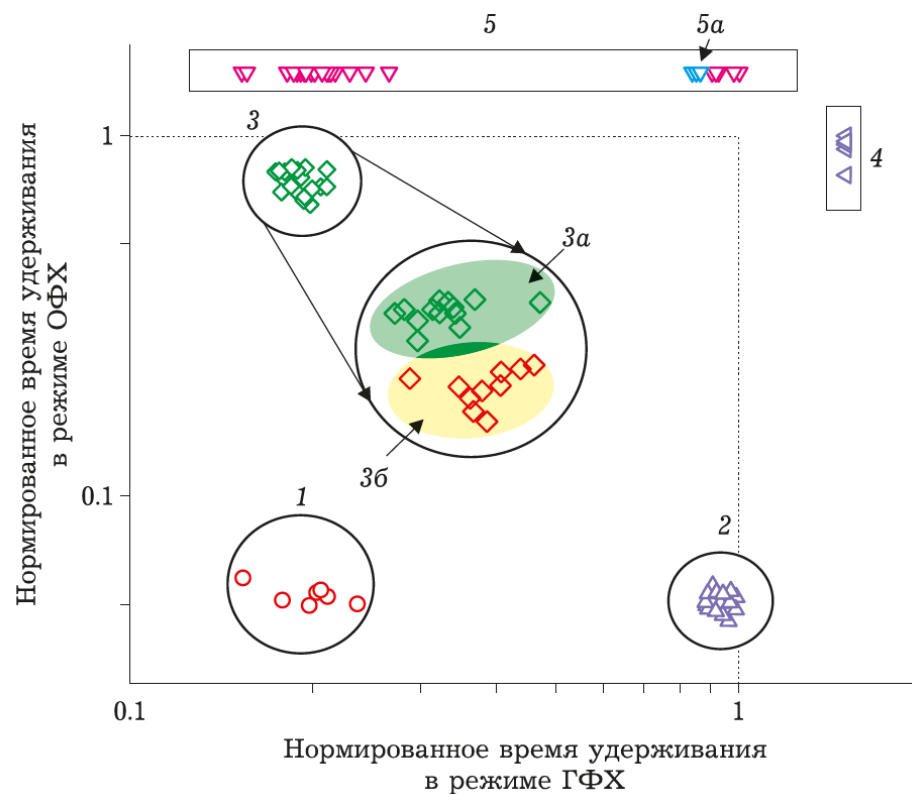


Рис. 4. Распределение метаболитов по временам удерживания в режиме обращенно-фазовой (ОФХ) и гидрофильной хроматографии (ГФХ): 1 – ацилкарнитины $R < C_{10}$; 2 – аминокислоты; 3а – фосфатидилхолины; 3б – ацилкарнитины с $R \geq C_{10}$; 4 – соединения, удерживающиеся в режиме ОФХ и не удерживающиеся в режиме ГФХ (церамиды); 5 – соединения, удерживающиеся в режиме ГФХ и не удерживающиеся в режиме ОФХ; 5а – фосфатидилинозитолы.

Кластеры 4 и 5 соответствуют метаболитам, для которых наблюдался пик на хроматограмме в одном режиме и не наблюдался в другом. При этом первый из них состоит только из церамидов, а второй можно разделить на две подгруппы: метаболиты, не удерживающиеся в режиме ГФХ, но при этом не проявляющиеся в виде пика в режиме ОФХ.

Таким образом, метаболиты, выбранные для анализа, позволяют однозначно продемонстрировать поведение как полярных молекул, так и гидрофобных или амфифильных молекул липидного ряда при каждом из используемых режимов

хроматографирования. Обнаружено, что при смене режима хроматографирования происходит инверсия очередности выхода групп метаболитов, имеющих вариативность в химическом строении и гидрофильности, а применение двух режимов хроматографирования при метаболомном скрининге является взаимно дополняющим и может способствовать увеличению охвата метаболитов из различных метаболических путей.

3.1.2 Комбинация режимов ВЭЖХ с дуальным механизмом разделения

Поскольку на предыдущем этапе работы нами была показана возможность использования колонки с монолитным сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола для скрининга метаболитов в режимах как обращенно-фазовой, так и гидрофильной хроматографии, мы решили провести анализ расширенного списка метаболитов, охватывающего основные метаболические пути.

В ходе предварительного обзора литературы был отобран ряд работ, описывающих обобщенный подход к скринингу метаболома с использованием масс-спектрометров на основе тройного квадруполя, подобных имеющемуся в нашем распоряжении. Ключевым требованием к таким работам было подробное описание экспериментальной части и наличие дополнительной информации, содержащей параметры MRM-перехода для обнаружения метаболитов. В результате за основу были выбраны работы [82,85], которые позиционируются как универсальные подходы, позволяющие проводить метаболомный скрининг широкого спектра метаболитов. Путем объединения MRM-переходов метаболитов, исключения повторяющихся переходов и переходов внутренних стандартов, а также включения ряда переходов из других работ, был составлен список из 726 MRM-переходов. На следующем этапе этот список был случайным образом разделен на две примерно равные группы (далее - группа №1 и группа №2), каждая из которых включала MRM-переходы аналитов, детектируемых как в положительном, так и в отрицательном режимах ионизации. Этот шаг был предпринят для сокращения времени цикла сканирования всех MRM-переходов с целью повышения качества обнаружения соединений. Анализируемые метаболиты в каждой из двух групп представляли собой соединения различной полярности и гидрофильности и включали такие классы соединений, как аминокислоты и их производные, биогенные амины и их производные, ацилкарнитины, витамины, липиды и липидоподобные молекулы. Обе группы тестировались на образце человеческой плазмы, представляющем собой смесь различных образцов плазмы, собранных ранее в других метаболомных исследованиях [86,87]. Образец обрабатывался в соответствии с протоколом, описанным в работе [82], и анализировался на монолитной колонке на основе 1-винил-1,2,4-триазола (VTr) как в режиме ГФХ, так и в режиме ОФХ.

Состав подвижной фазы был выбран на основании анализа литературных данных, представленных в главе 1 «Обзор литературы». В качестве элюентов в обоих случаях использовали водный раствор 20 мМ карбоната аммония, доведенный водным раствором аммиака до установления $\text{pH} = 9,8$ (элюент А) и ACN (элюент Б), разница заключалась лишь в градиенте элюирования. Данные, демонстрирующие стабильность времен удерживания метаболитов при анализе серии образцов на колонках VTr представлены в Приложении 1.

В каждом режиме ВЭЖХ проводился скрининг метаболитов, входящих в группы 1 и 2, а полученные хроматограммы обрабатывались вручную. При оценке хроматографического поведения метаболитов в первую очередь оценивалось время удерживания метаболита, и для анализа выбирался тот режим хроматографирования, в котором время удерживания превышало время мертвого объема колонки. Если метаболит удерживался на колонке в обоих хроматографических режимах, то оценивалась площадь его хроматографического пика и предпочтение отдавалось режиму с большим значением.

Эффективность метода скрининга метаболома на основе монолитной колонки сравнивалась с методами, основанными на использовании коммерчески доступных колонок. Для этого были проанализированы метаболиты из групп 1 и 2 с использованием следующих колонок с сорбентами различной природы: 1) пентафторфенилпропильный сорбент (F5); 2) октадецилсилильная фаза (C18); 3) аминопропильный сорбент (Amino). Выбор этих сорбентов был обусловлен тем, что в литературе имеются примеры их использования как для целевого, так и для нецелевого метаболомного скрининга [54,85,88–90]. Для метаболомного анализа с использованием указанных коммерчески доступных колонок анализировали образцы плазмы крови человека, которые ранее были проанализированы на колонке VTr. Названия колонок, их параметры, используемые элюенты и условия хроматографического разделения приведены в табл. 6.

Табл. 6. Параметры колонок и условия хроматографирования

Колонка и ее параметры	Элюенты и хроматографические условия
Монолитная колонка на основе 1-винил-1,2,4-триазола (VTr), 2 × 60 мм.	Элюент А: 5% ACN в водном растворе 20 мМ (NH ₄) ₂ CO ₃ , доведенный до pH = 9.8 водным раствором аммиака. Элюент Б: 100% ACN. Градиент ГФХ: 0 мин - 98% Б, 2 мин - 98% Б, 6 мин - 0% Б, 10 мин - 0% Б. Далее колонка уравнивалась на протяжении 4 минут. Градиент ОФХ: 0 мин - 0% Б, 1 мин - 0% Б, 6 мин - 98% Б, 16 мин - 98% Б. Далее колонка уравнивалась на протяжении 3 минут. Скорость потока в каждом из анализов составляла 300 мкл/мин.
Phenomenex Kinetex F5, 2 × 50 мм, 5 мкм, (F5)	Элюент А: 0.1% раствор HCOOH. Элюент Б: 100% ACN. Градиент: от 0 до 2 мин - 0% Б; от 2 до 5 мин содержание Б возрастало до 95% и поддерживалось до 9 мин. Далее колонка уравнивалась на протяжении 2.4 минут при 0% Б. Скорость потока 200 мкл/мин.
Econova ProntoSIL 120-5 C18 AQ, 2.1 × 75 мм, 5 мкм (C18)	Элюент А: 0.1% раствор HCOOH. Элюент Б: 100% ACN. Градиент: от 0 до 2 мин - 3% Б; от 2 до 7 мин содержание Б возрастало до 10%, от 7 до 10 мин содержание Б возрастало до 90%, от 10 до 12 мин содержание Б возрастало до 100% поддерживалось до 16.5 мин. Далее колонка уравнивалась на протяжении 3.4 мин при 3% Б. Скорость потока 200 мкл/мин.
Econova ProntoSIL 120-5 NH ₂ , 2.1 × 75 мм, 5 мкм (Amino)	Элюент А: 5% ACN в водном растворе 20 мМ CH ₃ COONH ₄ , доведенный до pH = 9.0 водным раствором аммиака. Элюент Б: 100% ACN. Градиент ГФХ: 0 мин - 98% Б, 3 мин - 85% Б, 4 мин - 30% Б, 10 мин - 0% Б, 14.5 мин - 0% Б. Далее колонка уравнивалась на протяжении 4 минут. Скорость потока 250 мкл/мин. Градиент ОФХ: 0 мин - 3% Б, 2 мин - 3% Б, 7 мин - 10% Б, 10 мин - 90% Б, от 10 до 12 мин содержание Б возрастало до 100% и поддерживалось до 16.5 мин. Далее колонка уравнивалась на протяжении 3.4 мин. Скорость потока 200 мкл/мин.

Отметим, что анализ метаболитов на колонке с аминопропильным сорбентом проводился как в режиме ГФХ, так и в режиме ОФХ, аналогично колонке с монолитным сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола. Полученные хроматограммы были обработаны однотипно.

Анализ образцов плазмы показал, что при использовании монолитной колонки с сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола режим ГФХ оптимален для обнаружения 289 MRM-переходов, а условия ОФХ наиболее подходят для обнаружения 109 MRM-переходов. Общее количество детектированных переходов ($n = 398$) составило более половины от исходного набора ($n = 726$) и соответствовало 390 индивидуальным соединениям (с учетом 8 дополнительных квалификационных переходов), включая аминокислоты, ацилкарнитины, кетокислоты, фосфатидилхолины, фосфатидилинозитолы и другие классы метаболитов, что превышало число индивидуальных соединений при использовании коммерчески доступных колонок. Примеры хроматограмм некоторых метаболитов, полученных при анализе образца плазмы крови на исследуемых колонках, приведены на рис. 5.

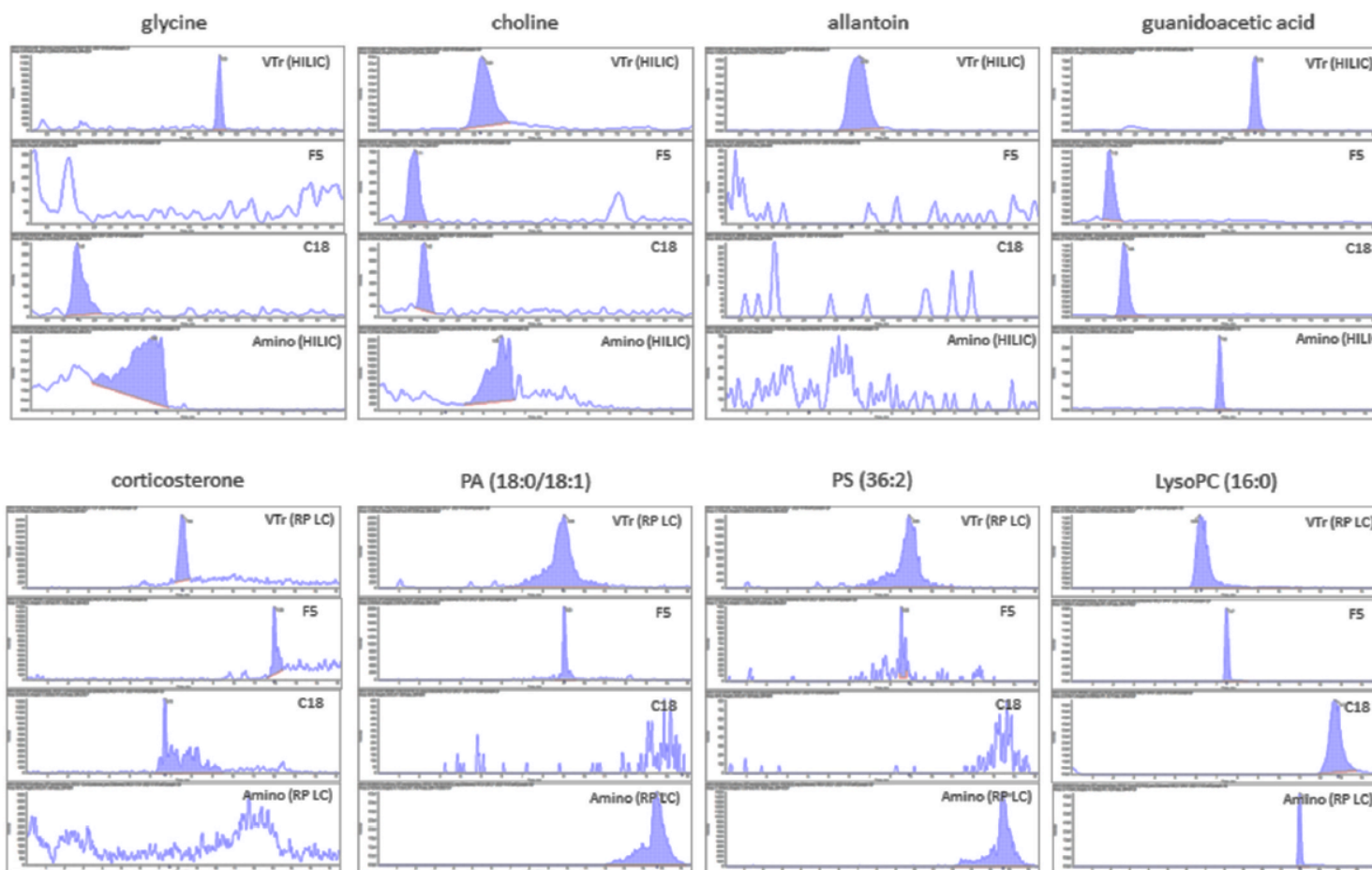


Рис. 5. Примеры хроматограмм выбранных метаболитов, полученных при анализе образца плазмы крови с использованием различных колонок в соответствующих хроматографических градиентах (параметры колонки и условия ВЭЖХ приведены в разделе 3.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография, табл. 6). На хроматограммах указаны названия соответствующих колонок и режимы хроматографического разделения. По оси ординат указана интенсивность сигнала

Для каждой из указанных хроматографических колонок были составлены списки метаболитов, детектируемых на них, после чего мы сравнили покрытие метаболома в эксперименте на монолитной колонке VTr с данными, полученными на колонках с пентафторфенилпропильным, октадецилсилильным и аминопропильным сорбентами (F5, C18 и Amino, соответственно). На рис. 6А представлена диаграмма Венна, отражающая сравнение метаболомного покрытия при анализе образцов плазмы крови в различных условиях. Как видно из рисунка, наиболее эффективным методом скрининга метаболома из исследованных в данной работе является анализ образца на монолитной колонке, модифицированной 1-винил-1,2,4-триазолом, с использованием буферного раствора 20 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3 + \text{NH}_3$ с добавлением 5% ACN (pH = 9.8). Как уже отмечалось выше, при анализе с использованием монолитной колонки было обнаружено 398 метаболитов (289 в режиме ГФХ и 109 в режиме ОФХ, рис. 6Б). Среди других колонок наибольшее количество метаболитов было обнаружено на колонке с аминопропильным сорбентом (342 из 726). В то же время на хроматограммах, полученных в условиях анализа на колонке Amino, дополнительно присутствуют сигналы 28 метаболитов, не обнаруженных при анализе с колонкой VTr.

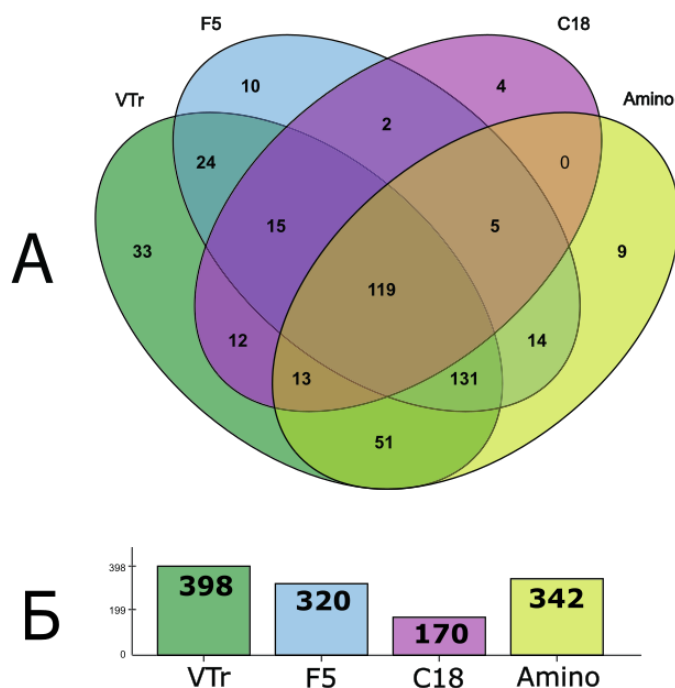


Рис. 6. Сравнение метаболомного покрытия, полученного при анализе метаболитов на хроматографических колонках в различных условиях: А) диаграмма Венна, показывающая охват метаболитов при использовании различных колонок; Б) общее количество детектируемых метаболитов при анализе на соответствующих колонках.

Мы предполагаем, что значительно больший охват метаболома, наблюдаемый при использовании колонки VTr, может быть связан в первую очередь с используемым элюентом: как отмечалось выше, применение элюентов с высоким pH приводит к более эффективной ионизации полярных метаболитов. При анализе образца плазмы в условиях ОФХ с использованием колонок F5 и C18 в обоих случаях наблюдалось меньшее покрытие метаболома. В то же время следует отметить более высокую эффективность анализа при использовании колонки с пентафторфенильным сорбентом по сравнению с C18. По-видимому, более полярные группы колонки F5 позволяют сильнее удерживать полярные метаболиты, которые на колонке C18 элюируются в мертвом объеме и плохо ионизируются.

В нашей работе в качестве элюента А использовался буферный раствор 20 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3 + \text{NH}_3$ (pH = 9,8) в воде, предложенный ранее для метаболомного скрининга в исследовании [82]. Преимущества использования водных растворов с высокими значениями pH неоднократно подчеркивались в ряде исследований, использующих масс-спектрометрию в качестве метода детектирования. Так, в работе [91] было показано, что при анализе ряда соединений, включая симвастатин, периндоприл, диклофенак, кофеин, нифедипин и др. отношение сигнал/шум было выше при использовании элюента А с pH = 9,0, что свидетельствует о более высокой чувствительности метода и дает возможность снижения предела обнаружения этих соединений. В работе [92] показано, что хроматографическое поведение лизофосфатидилхолинов и фосфатидилхолинов (ФХ) при низких и высоких pH сходно, однако удерживание РС несколько возрастает при высоких pH и для элюирования требуется элюент с более высоким содержанием органических компонентов. Использование элюента с pH = 9,8 позволило Matuszewski et al. существенно повысить ионизацию финастерида, имеющего стероидную природу, при анализе плазмы крови человека [93]. Оригинальный подход использовали авторы работы [94]: они разработали полимерную колонку со смешанными аминами, состоящую из полимерных частиц на основе метакрилата с первичными, вторичными, третичными и четвертичными аминами в качестве функциональных групп, которая работает в широком диапазоне pH. При исследовании полярных метаболитов система с полимерной колонкой и элюентом при pH = 9,8 показала высокие результаты по сравнению с колонками с голым кремнеземом (pH 7,0), аминокремнеземом (pH 7,0) и цвиттерионно-полимерной колонкой (iHILIC- Fusion (P); pH 7,0). Использование высокоосновного элюента было связано с образованием узких интенсивных пиков ряда анализируемых метаболитов.

В литературе присутствуют примеры применения систем, включающих комбинацию 2D-хроматографии ГФХ/ОФХ, для метаболомных исследований. Так, в работе [48] проводилось сравнение различных парных комбинаций хроматографических колонок

для анализа метаболитов сыворотки крови. Авторы работы выделяют наиболее эффективные пары для анализа сыворотки: пары ZIC-HILIC в тандеме с RP-амидной колонкой (Halo) из-за характеристик формы пика, или комбинация силикагель-PFP из-за общего количества метаболитов, ионизация которых не была подавлена, вследствие чего их удалось детектировать в условиях электрораспыления.

Иной подход заключается в использовании сорбентов, способных удерживать вещества как по гидрофильному, так и по обращенно-фазовому механизму. Так, в работе [95] показана возможность эффективного разделения линейных алкилбензолов (с заместителями C₁-C₂), производных тиомочевины, ди- и трехатомных фенолов в хроматографических режимах ОФХ или ГФХ на одной колонке на основе на основе стиролсодержащего полимерного монолитного сорбента poly(VBS-co-TAT-co-AHM), полученного *in situ* сополимеризацией п-стиролсульфоната натрия (VBS) со сшивающими агентами 3-(акрилоилокси)-2-гидроксипропилметакрилатом (AHM) и 1,3,5-триакрилоилгексагидро-1,3,5-триазином (TAT). В работе [96] была исследована возможность ортогонального разделения на одной полярной колонке (Luna HILIC, Phenomenex) фенольных кислот и биофлавоноидов комбинацией анализов, выполняемых в режиме разделения ГФХ и ОФХ. Авторы работы применяли повторный ввод пробы на одну колонку с чередующимися градиентами увеличения (ОФХ) и уменьшения (ГФХ) концентрации органического растворителя в подвижной фазе. Преимущество таких систем заключается в использовании стандартного оборудования для одномерной ВЭЖХ без необходимости подключения дополнительных колонок и систем многоканальной подачи элюентов.

Хроматографическое разделение в режиме ГФХ на монолитной колонке VTr, использованной в нашей работе, начинается с элюента, содержащего в своем составе около 95% ACN, и заканчивается элюентом, содержащим 5% ACN. В то же время, анализ образцов в режиме ОФХ начинается с элюента, имеющего данный состав. Исходя из этого, в работе предложен комбинированный метод скрининга метаболитов биологических образцов, состоящий из двух последовательных анализов в разных режимах: первый анализ, выполняемый в режиме ГФХ, обеспечивает скрининг 298 MRM-переходов, затем следует повторный ввод той же пробы и ее анализ в режиме ОФХ с детектированием 109 MRM-переходов, не входящих в первый список.

На рис. 7 схематично показан профиль изменения концентрации ацетонитрила при совмещении анализов в двух режимах - ГФХ и ОФХ. Общее время анализа составило 28 мин, включая два этапа промывки между двумя режимами ВЭЖХ, необходимые для

заполнения иглы автодозатора соответствующим элюентом и предотвращения размывания образца при нанесении на колонку.

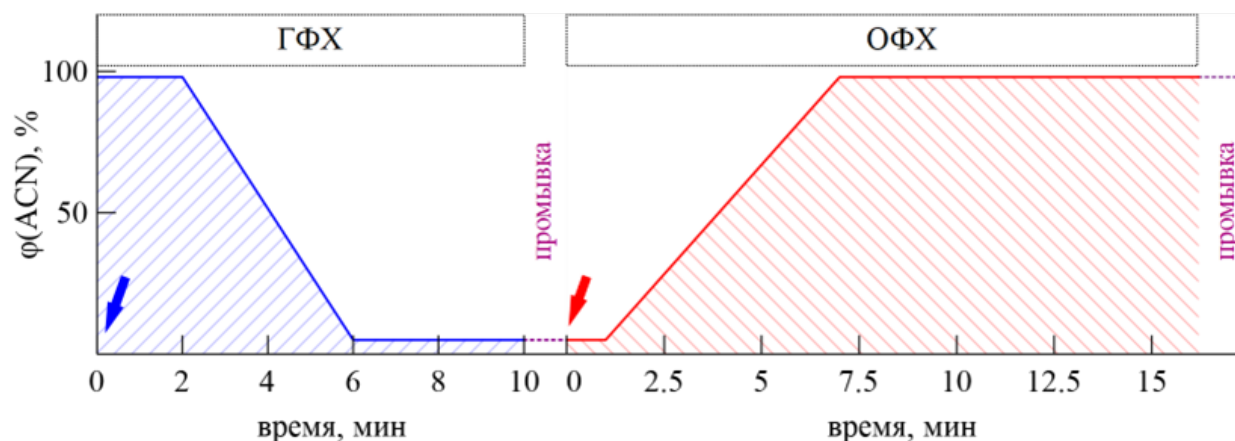


Рис. 7. Диаграмма изменения объемной доли АСН в подвижной фазе в комбинации чередующихся градиентов ГФХ и ОФХ для анализа метаболитов на монолитной колонке на основе 1-винил-1,2,4-триазола. Градиент представляет собой комбинацию условий анализа ГФХ и ОФХ из табл. 6 за исключением этапов уравнивания (элюент А – водный 20 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3 + \text{NH}_3$, $\text{pH} = 9,8$; элюент Б - АСН). Стрелками указаны соответствующие точки введения пробы.

Реализованный в работе подход аналогичен предложенному авторами работы [96]: путем анализа пробы в двух различных хроматографических режимах (ГФХ и ОФХ) на одной колонке с использованием одной и той же пары элюентов был предложен метод определения широкого спектра метаболитов. При этом работ, предлагающих данный прием к метаболомному скринингу, в литературе обнаружено не было.

Преимуществом предлагаемого подхода является значительное сокращение общего времени анализа за счет исключения двух стадий уравнивания колонки, необходимых при повторном градиентном элюировании в одном и том же режиме. Так, известно, что для уравнивания колонок с полярными сорбентами, используемых для разделения полярных соединений в режиме ГФХ, требуется пропустить через колонку 15–20 объемов элюента для уравнивания [97]. Обращенно-фазовые колонки также требуют уравнивания, хотя и с меньшим объемом элюента. В предлагаемой комбинации анализов этап промывки колонки чистым элюентом А, которым заканчивается градиент ГФХ, является этапом уравнивания колонки для последующего анализа в режиме ОФХ. В то же время промывка колонки в конце режима ОФХ является стадией уравнивания колонки для анализа следующего образца в режиме ГФХ. Комбинация анализов может быть использована для анализа образцов, приготовленных из одного и того же биологического объекта по разным протоколам, с целью скрининга полярных

метаболитов и липидов по отдельности. Как уже было указано, использованная в данной работе база данных включает 289 и 109 метаболитов, анализируемых в режиме ГФХ и ОФХ, соответственно, но может быть расширена за счет добавления новых MRM-переходов или сокращена для анализа некоторой выбранной группы метаболитов.

3.2 Применение разработанного подхода для решения практических задач метаболомики

3.2.1 Анализ образцов сухих пятен крови, полученных от мышей, облученных рентгеновским излучением

Предложенный подход к анализу метаболитов был апробирован в метаболомном скрининге образцов сухих пятен крови, взятых у мышей до и после рентгеновского облучения. Целью данного исследования являлось изучение метаболических изменений, индуцированных частичным торакоабдоминальным рентгеновским облучением, на животной модели. Данный тип облучения моделирует воздействие, применяемое в клинической практике при лучевой терапии опухолей органов грудной и брюшной полости. Выбранная доза излучения (5 Гр)⁵, которая считается сублетальной для мышей при полном облучении [98], обеспечивала развитие системного метаболического ответа при сохранении высокой выживаемости животных, что позволяло исследовать ранние и отсроченные метаболические. Данная модель предназначена для выявления метаболических маркеров радиационного воздействия и может служить экспериментальной основой для оценки эффективности радиопротекторных и радиосенсибилизирующих соединений.

Образцы крови были взяты до облучения (контрольная точка), а также через 4, 7 и 11 дней после него (рис. 8А), их пробоподготовка проводилась согласно протоколу, описанному в работе [82] (рис. 8Б). Анализ метаболитов проводили в комбинированном методе, описанном в разделе 2.2.1.

⁵ Облучение мышей проводилось м.н.с. ЛФАВ НИОХ СО РАН М. А. Мельченко. Отбор образцов крови и дальнейшие манипуляции с ними - автором диссертационной работы.

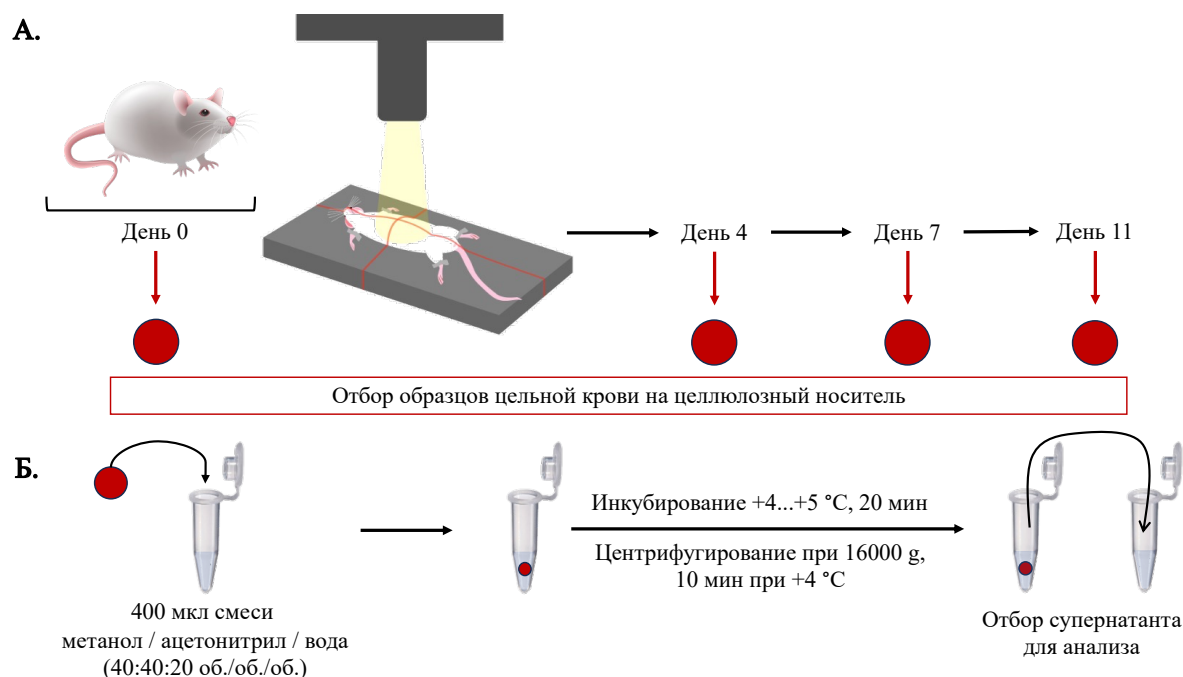


Рис 8. А) Схема проведения эксперимента; Б) Схема пробоподготовки сухих пятен крови.

В результате метаболомного скрининга и обработки полученных хроматограмм удалось выявить 12 метаболитов, содержание которых после облучения существенно отличалось от исходного уровня во все три дня измерений (рис. 9). Все 12 метаболитов были детектированы в режиме гидрофильной хроматографии. Эти метаболиты можно разделить на две подгруппы: метаболиты, содержание которых после облучения всегда было повышенным (1-метилникотинамид, 3-гидроксилинолеилкарнитин, карнозин, гипоксантин, рис. 9А), и метаболиты, содержание которых после облучения было всегда пониженным (аргинин, цитруллин, индоксилсульфат, L-лизин, L-метионин, пантотеновая кислота, серотонин, мочеви́на, рис. 9Б) по сравнению с исходным значением. При этом мы наблюдали компенсаторное восстановление содержания всех указанных метаболитов на 7-й день и изменение их содержания на 4-й и 11-й день.

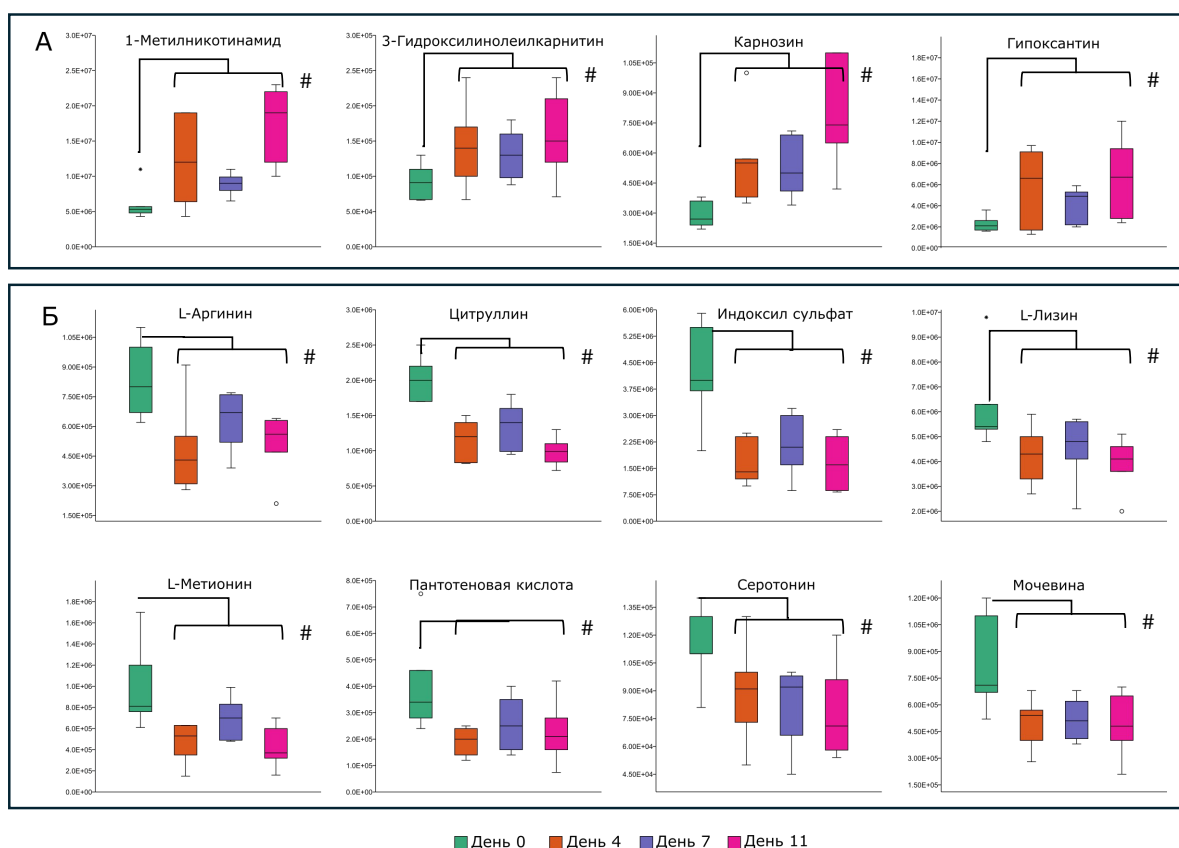


Рис. 9. Метаболиты крови мышей, содержание которых достоверно (# – $p < 0,05$) изменилось на 4, 7 и 11-е сутки после облучения по сравнению с необлученными животными (0-е сутки): А) с положительной динамикой; Б) с отрицательной динамикой. По оси ординат указана площадь пика в абсолютных значениях.

Этот эффект наиболее выражен для цитруллина, но наблюдался с высокой статистической значимостью и для других метаболитов. Помимо представленных на рис. 9, были определены и другие метаболиты, для которых были продемонстрированы статистически значимые различия хотя бы в один из дней (4-й, 7-й или 11-й) после облучения. Они были сгруппированы с метаболитами, представленными на рис. 9, после чего был проведен поиск метаболических путей, наиболее значимо измененных после облучения. Для этого для каждого сравнения были получены баллы переменной важности в проекции (VIP), а соответствующие метаболиты были проанализированы с помощью площади пика и одномерного статистического анализа ($p < 0,05$). Для моделей использовался 95%-й доверительный интервал, а результаты анализа метаболических путей представлены в виде пузырьковых графиков «bubble plot» (рис. 10). Все вовлеченные пути представлены в виде кругов, цвет каждого круга меняется в зависимости от значения p (более значительные изменения метаболитов в пути показаны более темным цветом), а оценка влияния пути отражается размером круга. Для наглядности аннотированы пути

(соответствуют №1–14, табл. 3), оказавшие наибольшее влияние ($p < 0,05$) на метаболом и имеющие наиболее высокие показатели статистической значимости.

Методом обогащения служил гипергеометрический тест, топологическим анализом – относительная междуцентровость; в качестве эталонного метаболома использовались все компоненты библиотеки путей *Mus musculus* (KEGG).

Основные метаболические пути, затронутые облучением, связаны с синтезом белка, метаболизмом азотистых оснований, биосинтезом и катаболизмом аминокислот (табл. 7). Кроме того, на 4-е и 11-е сутки значительные изменения по сравнению с исходным состоянием наблюдались в метаболических процессах, связанных с обменом липидов, а на 7-е сутки, как уже отмечалось выше, наблюдалась частичная компенсация метаболических нарушений.

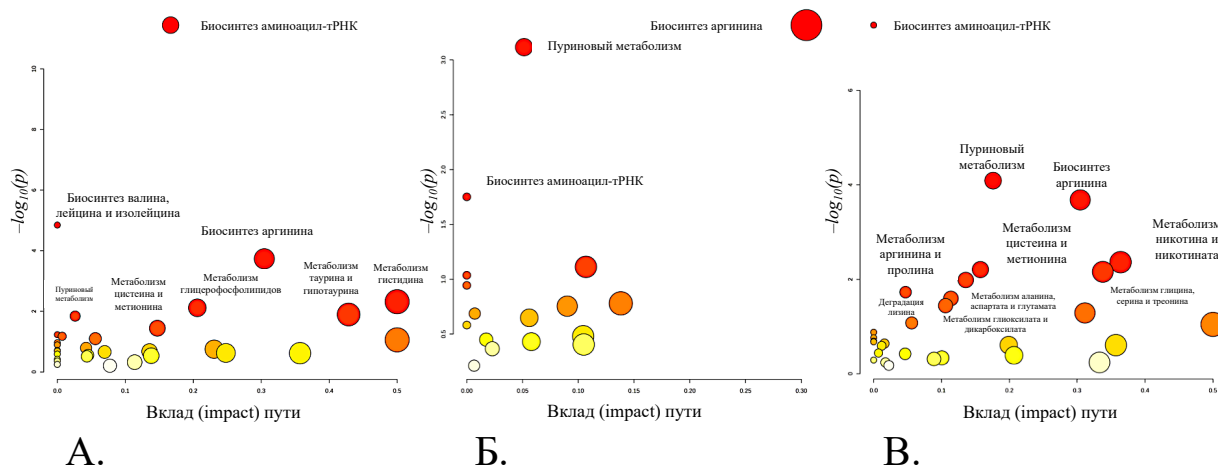


Рис. 10. Анализ метаболических путей, проведенный для метаболитов крови, которые статистически значимо отличались на четвертый (А), седьмой (В) и одиннадцатый (С) дни после облучения по сравнению со здоровыми животными. По оси абсцисс показано влияние пути, а по оси ординат - $\log(p)$.

Полный список метаболитов со значимыми различиями в содержании в каждый из дней в сравнении со здоровыми животными представлен в прил. 2.

Табл. 7. Метаболические пути, на которые влияет рентгеновское облучение, и уровни значимости влияния

№	Наименование метаболического пути	<i>p</i> -value		
		4 сутки ^{а)}	7 сутки	11 сутки
1	Биосинтез аминоксил-тРНК	$3,60 \times 10^{-12}$	$1,80 \times 10^{-2}$	$4,20 \times 10^{-8}$
2	Биосинтез аргинина	$1,90 \times 10^{-4}$	$4,80 \times 10^{-4}$	$2,10 \times 10^{-4}$
3	Метаболизм пуринов	$1,40 \times 10^{-2}$	$7,60 \times 10^{-4}$	$8,10 \times 10^{-5}$
4	Метаболизм цистеина и метионина	$3,60 \times 10^{-2}$	- ^{б)}	$6,20 \times 10^{-3}$
5	Биосинтез валина, лейцина и изолейцина	$1,40 \times 10^{-5}$	-	-
6	Метаболизм глицерофосфолипидов	$7,70 \times 10^{-3}$	-	-
7	Метаболизм гистидина	$4,80 \times 10^{-3}$	-	-
8	Метаболизм таурина и гипотаурина	$1,30 \times 10^{-2}$	-	-
9	Метаболизм глицина, серина и треонина	-	-	$6,90 \times 10^{-3}$
10	Метаболизм аргинина и пролина	-	-	$1,00 \times 10^{-2}$
11	Деградация лизина	-	-	$1,90 \times 10^{-2}$
12	Метаболизм аланина, аспарагиновой и глутаминовой кислот	-	-	$2,50 \times 10^{-2}$
13	Метаболизм глиоксилатов и дикарбоновых кислот	-	-	$3,60 \times 10^{-2}$
14	Метаболизм никотиновой кислоты и никотинамида	-	-	$4,30 \times 10^{-3}$

а) Значения, представленные в таблице, характеризуют достоверное изменение в функционировании метаболических путей ($p < 0,05$)

б) статистически достоверных отличий не наблюдалось.

В исследовании показано, что на четвертые сутки после облучения в крови повышается уровень 1-метилникотинамида (1-MNA). Этот метаболит представляет собой метилированный амид никотиновой кислоты и является продуктом метаболизма кофермента никотинамид-аденин-динуклеотида [99]. 1-MNA образуется как в печени, так и в почках и является экскретируемой формой никотинамида. Долгое время 1-MNA считался биологически неактивным метаболитом никотинамида, однако различные исследования показывают, что он может обладать противовоспалительными,

антитромботическими, вазопротекторными и гастропротекторными свойствами. В работе [100] обнаружено повышение уровня 1-MNA в моче мышей через 7 дней после облучения в дозе 8 Гр. Было показано, что 1-MNA выступает в качестве метаболического фермента, регулирующего клеточный метаболизм, и может запускать эпигенетическое ремоделирование при раке почек и яичников [101]. На протяжении всего эксперимента мы наблюдали повышение уровня карнозина в крови мышей с максимумом на 11-й день. Этот метаболит представляет собой эндогенный дипептид, состоящий из аминокислот β -гистидина и L-аланина. Биологическая роль карнозина до конца не выяснена, однако в ряде исследований было показано, что этот пептид обладает антиоксидантными свойствами и нейтрализует свободные радикалы, в том числе образующиеся под действием ионизирующего излучения. Карнозин защищает от радиационного повреждения и способствует заживлению ран. Его антиоксидантное действие обусловлено способностью нейтрализовать свободные радикалы за счет супероксиддисмутазы (СОД-подобной) активности [102]. В работе [103] изучалось влияние карнозина на H_2O_2 -индуцированную секрецию воспалительных цитокинов в иммортализованных клетках аденокарциномы толстой кишки (Caco-2). При предварительной обработке клеток карнозином индуцированное H_2O_2 увеличение секреции интерлейкина-8 подавлялось. Эти результаты позволяют предположить, что карнозин участвует в защите эпителиальных клеток кишечника от окислительного стресса после облучения [102]. Анализ результатов метаболомного скрининга показал увеличение уровня гипоксантина с пиком на 4-й и 11-й дни; на 7-й день уровень снизился, но был выше исходного.

Гипоксантин является промежуточным метаболитом в системе деградации пуринов, поэтому его повышение является следствием повреждения нуклеиновых кислот. Гипоксантин также служит субстратом для синтеза аденозинтрифосфата (АТФ), который необходим клетке для восстановительных процессов после воздействия радиации [104].

К другим метаболитам, для которых были показаны статистически значимые различия в каждой из временных точек, относится, в частности, ряд аминокислот (аргинин, лизин, метионин). Так, например, в работе [105] было показано, что аргинин в ткани печени является метаболомным биодозиметрическим маркером действия ионизирующего гамма-излучения на мышей. Путь биосинтеза аргинина статистически достоверно нарушается на 4-й и 7-й дни эксперимента (рис. 10). Анализ сыворотки крови крыс после облучения как в высоких, так и в низких дозах, проведенный в работе [106], показал повышение уровня лизина при различных дозах гамма-облучения, тогда как в нашем исследовании показано достоверное снижение уровня лизина после действия рентгеновского излучения. Это может быть связано с тем, что в эксперименте облучалось все тело крыс. В нашей работе показано

снижение уровня метионина с неполной коррекцией на 7-й день. Метионин связывают с эффективностью лечения рака при проведении химио- и радиотерапии [107]. Три перечисленные аминокислоты являются компонентами пути биосинтеза аминоксил-тРНК, что показывает высокую статистическую значимость изменений на 4-й и 7-й дни эксперимента (рис. 10).

По результатам метаболомного анализа мы наблюдали снижение уровня пантотеновой кислоты на 4-й день с коррекцией к 7-му дню. Результаты, свидетельствующие о снижении уровня пантотеновой кислоты, коррелируют с работой [108], где авторы показали снижение уровня этого метаболита в моче после облучения мышей. Это можно объяснить тем, что пантотеновая кислота является предшественником биосинтеза коэнзима А (КоА), необходимого для превращения пирувата в ацетил-КоА в рамках пути получения энергии. Полученный ацетил-КоА затем используется для синтеза АТФ в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК). Снижение уровня рибофлавина и пантотеновой кислоты в моче, по мнению авторов, соответствует резкому уменьшению экскреции с мочой промежуточных продуктов цикла ЦТК - цитрата и малата.

Повышение уровня 3-гидроксилиноилкарнитина в крови после облучения, насколько нам известно, в литературе не описано, однако имеются данные, свидетельствующие об изменении других ацилкарнитинов. Авторы работы [109] показали увеличение содержания тиглилкарнитина в моче мышей в экспериментах с высокой мощностью дозы и снижение в экспериментах с низкой мощностью дозы. В обзоре [110] тиглилкарнитин и гексаноилкарнитин, наряду с другими метаболитами, были отнесены к биомаркерам мочи мышей, облученных пучком с высокой или низкой мощностью дозы, а также к маркерам облучения с низкой мощностью дозы у мышей, получавших $^{85/90}\text{SrCl}_2$.

Также наблюдались статистически значимые изменения содержания мочевины в плазме крови мышей после облучения животных, однако исследований, демонстрирующих подобные результаты, нами в литературе не обнаружено. Тем не менее эти изменения коррелируют с данными, свидетельствующими о нарушении цикла мочевины после облучения [110,111], что подтверждается и наблюдаемым снижением содержания цитруллина и аргинина. Анализ метаболомных путей демонстрирует изменения в пуриновом метаболическом пути, включающем мочевину, гипоксантин и другие метаболиты, отклонение уровней которых в указанные дни статистически значимо.

Одним из ранних проявлений радиационного поражения является нарушение метаболизма кишечной флоры и повреждение кишечного эпителия [112]. В литературе показано, что концентрация цитруллина в плазме крови может быть надежным биохимическим маркером дисфункции кишечника [113]. Было обнаружено, что уровень

цитруллина в крови мышей снижался на 4-й день после воздействия, затем частично корректировался к 7-му дню, а на 11-й день вновь снижался, достигая своего минимума (рис. 9), что согласуется с литературными данными. В работе [114] было показано, что цитруллин плазмы, небелковый аминокислотный продукт метаболизма глутамина в энтероцитах тонкой кишки, является надежным маркером массы энтероцитов. Концентрация цитруллина значительно снижается в зависимости от дозы облучения и объема облученной тонкой кишки, и он был предложен в качестве биомаркера радиационно-индуцированного повреждения слизистой оболочки тонкой кишки [115]. В исследовании [116] повреждение желудочно-кишечного тракта оценивалось в сравнении с уровнем цитруллина в плазме крови. В этой работе уровень цитруллина снижался примерно через 3–7 дней после абдоминального облучения в дозах 11 и 12 Гр, однако авторы наблюдали восстановление уровня к 10-му дню, когда мы обнаруживаем снижение уровня цитруллина к 11-му дню. Авторы предполагают, что уровень цитруллина в плазме может быть эффективным биомаркером радиационно-индуцированного гастроинтестинального синдрома. Согласно исследованиям [117–119], цитруллин, наряду с другими метаболитами, является наиболее идентифицированным и подтвержденным как в исследованиях на животных, так и на пациентах биомаркером радиационного повреждения.

Мы также наблюдали снижение уровня индоксилсульфата на 4-й день, с небольшой коррекцией на 7-й день и снижением на 11-й день. Известно, что триптофан метаболизируется бактериями с образованием индола и его производных в просвете толстой кишки. Индол метаболизируется в печени с образованием индоксилсульфата, избыток которого токсичен для многих тканей и органов [120]. Авторы исследования предполагают, что снижение уровня индоксилсульфата после облучения может быть связано с его прямым или косвенным влиянием на микробное разнообразие. В литературе отмечается, что рентгеновское облучение в высоких дозах приводит к значительным нарушениям в клеточной ткани и слизистой оболочке кишечника [121–123].

Известно, что облучение приводит к разрушению кишечного барьера, в результате чего кишечные бактерии попадают в кровоток [121,122]. Снижение уровня серотонина, наблюдаемое на 4-й и 11-й дни после воздействия, может служить доказательством подавления кишечной микробиоты, поскольку около 60–90% серотонина в организме человека вырабатывается в желудочно-кишечном тракте [124]. В кишечнике серотонин, выделяемый эпителиальными клетками в ответ на люминальные химические и механические стимулы, является важнейшим активатором многих рефлексов желудочно-кишечного тракта, передавая сигналы через различные рецепторы, расположенные на внутренних и внешних афферентных нервных волокнах [125]. Эффективность антагониста

серотонинергических рецепторов ондансетрона в терапии радиационно-индуцированной рвоты была показана в работах [126,127], что является доказательством важности серотонина в радиационном повреждении органов желудочно-кишечного тракта. В работе [128] показано, что серотонин-зависимые механизмы, по-видимому, участвуют в выработке сигналов свидетелей в ответ на радиацию при облучении клеточных культур. По данным [129], серотонин играет активную роль в качестве сигнальной молекулы и участвует в эффекте свидетеля у пациентов, перенесших внутритканевую брахитерапию с высокой мощностью дозы. Около 60 лет назад был продемонстрирован радиопротекторный эффект серотонина [130], что в совокупности с полученными результатами подтверждает актуальность изучения роли микробиома кишечника в эффектах лучевой терапии.

Таким образом, в ходе работы были установлены метаболиты крови мышей, содержание которых после облучения изменилось по сравнению с исходным состоянием, а также метаболические пути, активность которых нарушается при воздействии рентгеновского излучения. Полученные экспериментальные данные (маркерные метаболиты и динамика метаболомных изменений) имеют прямую связь с литературными данными.

3.2.2 Исследование содержания сфинголипидов в плазме крови пациентов с послеоперационным делирием с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС

Послеоперационный делирий (ПОД) – серьезное осложнение раннего послеоперационного периода. В сердечно-сосудистой хирургии его частота составляет 52 % [131]. Развитие ПОД приводит к ухудшению прогноза, в том числе к увеличению длительности госпитализации, росту количества осложнений и летальности, нарушению когнитивных функций и физического состояния, а также повышению расходов на лечение пациента [132,133]. Делирий и послеоперационные когнитивные нарушения чаще всего возникают у пациентов старше 60 лет [134]. Этому способствуют такие факторы, как гипоксия ЦНС, эмболии, выброс нейротрансмиттеров, системный воспалительный ответ и другие нарушения, включая метаболические [135,136].

На базе разработанного метода было реализовано исследование, заключающееся в метаболомном анализе плазмы крови у пациентов, перенесших кардиохирургические операции, для выявления потенциальных липидных молекул, нарушение функции которых может лежать в основе механизмов развития послеоперационного делирия. Предложенный нами подход по анализу метаболитов в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС был применен для анализа липидов в крови пациентов с ПОД. В данной работе был проведен анализ содержания ряда фосфолипидов, относящихся к классу сфингомиелинов, в плазме

крови пациентов, перенесших операцию на сердце. В качестве метода анализа липидов был выбран метод обращенно-фазовой хроматографии при использовании колонки VTr.

Поскольку нарушение метаболизма сфингомиелинов может отражать процессы, лежащие в основе развития делирия, целью анализа было изучение их роли в осложнении ПОД. Было проведено исследование содержания ряда сфингомиелинов в плазме крови пациентов с ПОД по сравнению с группой пациентов, у которых не развился ПОД после проведенного кардиохирургического вмешательства. В табл. 8 представлен список проанализированных в данной работе сфингомиелинов, а также уровень статистической значимости результатов сравнения их содержания между группами.

Табл. 8. Статистическая значимость различий между группой пациентов с ПОД и контрольной группой по содержанию метаболитов в образцах плазмы крови при сравнении по критерию Манна-Уитни.

Метаболит	Пациенты с ПОД [#]	Пациенты без ПОД [#]	<i>p</i> -value
CM (d18:1/22:2 OH)	0,35±0,18	0,40±0,27	< 0,05
CM (d18:1/24:0)	0,31±0,17	0,44±0,24	< 0,05
CM (d18:1/24:1)	0,35±0,20	0,45±0,26	< 0,05
CM (d18:1/22:2)	0,34±0,23	0,43±0,26	< 0,05
CM (d18:1/18:0)	0,39±0,18	0,42±0,24	> 0,05
CM (d18:1/22:1)	0,42±0,27	0,49±0,26	> 0,05
CM (d18:1/20:1)	0,38±0,27	0,37±0,25	> 0,05
CM (d18:1/20:0)	0,37±0,20	0,41±0,23	> 0,05
CM (d18:1/24:2)	0,38±0,26	0,43±0,23	> 0,05

[#] Представлены нормализованные значения средней площади пика ± стандартное отклонение

Согласно критерию Манна-Уитни, из 9 анализируемых сфингомиелинов 4 (CM(d18:1/22:2 OH), CM(d18:1/24:0), CM(d18:1/24:1) и CM(d18:1/22:2)) показали статистически значимые ($p < 0,05$) различия между исследуемыми группами пациентов (рис. 11).

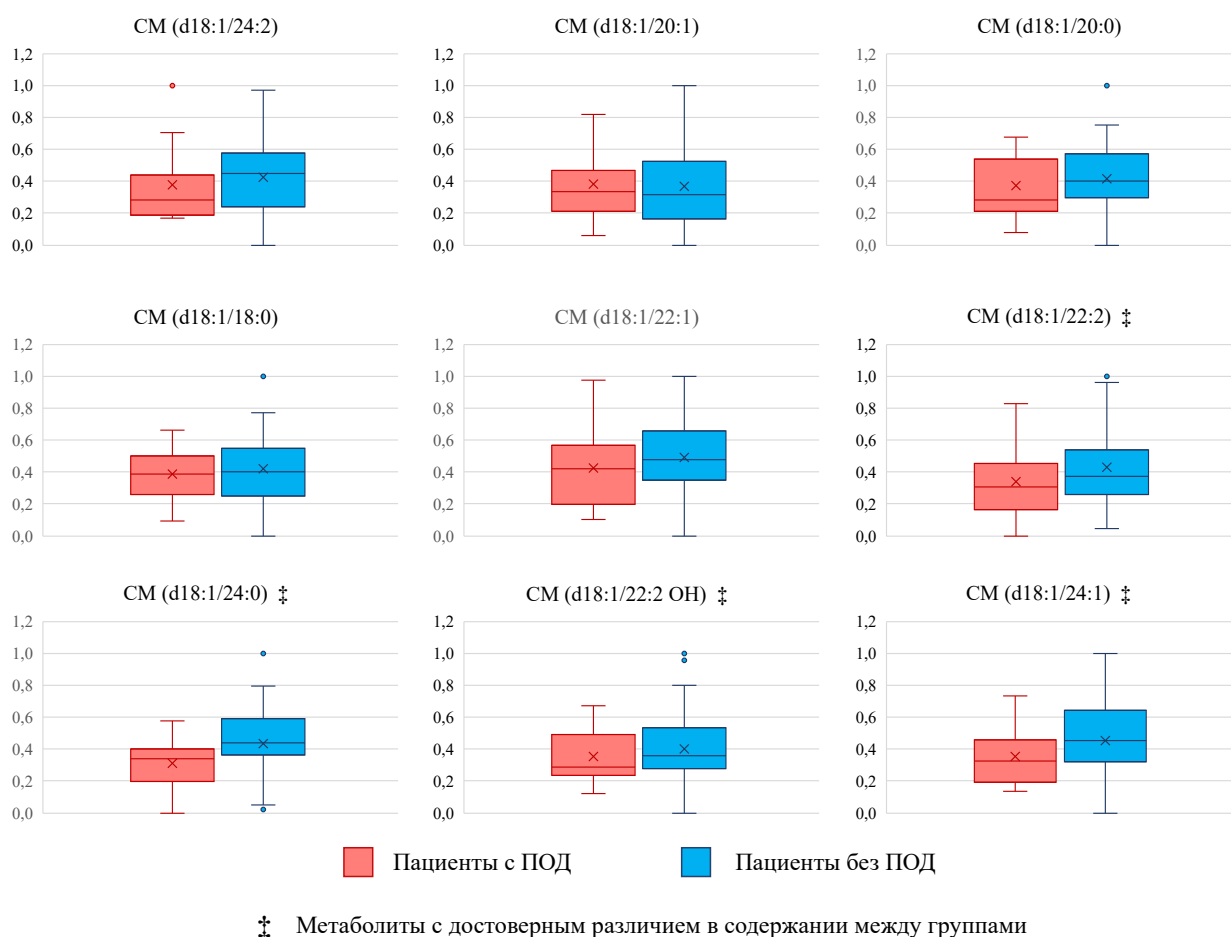


Рис. 11. Относительное содержание сфингомиелинов в плазме крови пациентов после кардиохирургического вмешательства с послеоперационным делирием и пациентов, у которых после кардиохирургического вмешательства делирий не был диагностирован. По оси ординат указаны нормализованные значения площадей пиков.

Поскольку было предположено, что нарушение метаболизма сфинголипидов может быть связано с нарушением пути их биосинтеза и тем самым с нарушениями, лежащими в основе патогенеза делирия, необходимо было провести поиск этих метаболических путей с использованием существующих алгоритмов. Для проверки данной гипотезы с помощью программно-информационной системы ANDSystem нашими коллегами из ИЦиГ СО РАН (В. А. Иванисенко и сотр.) была проведена реконструкция и анализ генной сети, описывающей регуляцию экспрессии генов, кодирующих ферменты метаболического пути KEGG “Sphingolipid metabolism”, а также регуляцию транспорта, активности и деградации данных ферментов.

В результате анализа перепредставленности заболеваний к.б.н. доц. В. А. Иванисенко и сотр. было обнаружено, что с данными регуляторными белками ассоциированы такие группы патологий, как нервно-психические заболевания, патологии

сердца и почек, воспалительные процессы, оперативное вмешательство. Функция регуляторов, ассоциированных с сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ), могла быть нарушена у пациентов с ПОД в связи с перенесенной операцией на сердце и медицинских процедур, таких как искусственное кровообращение [137]. Тем не менее, поскольку операция на сердце была перенесена всеми испытуемыми, то можно ожидать, что изменение функции этих регуляторных белков могло в равной степени повлиять как на группу с ПОД, так и на пациентов без ПОД. В связи с этим, функция группы регуляторов, ассоциированных с нервно-психическими заболеваниями, могла быть специфически нарушена у пациентов с ПОД, что и обусловило снижение содержания сфинголипидов в плазме крови у этих пациентов.

Сфингомиелины являются одними из основных фосфолипидов, составляющих гидрофобный матрикс плазматических мембран клеток млекопитающих, однако в ответ на стресс сфингомиелины могут расщепляться сфингомиелиназой на фосфатидилхолин и церамид, которые выполняют сигнальную функцию. Изменения в метаболизме сфингомиелинов могут влиять на баланс нейромедиаторов в мозгу, нарушение нейронных связей и индукцию нейровоспаления, что делает их важным объектом для изучения механизмов патогенеза делирия [134,138]. В результате работы было выявлено 4 статистически значимо отличающихся сфингомиелина по содержанию у пациентов с ПОД по сравнению с пациентами, у которых не развился ПОД (контрольная группа). Полученные данные могут быть использованы для планирования экспериментов транскриптомного и протеомного анализа для изучения молекулярно-генетических механизмов данного осложнения.

Как результат, было показано использование разработанного нами подхода метаболомного скрининга для поиска липидных маркеров с помощью анализа плазмы крови методом ВЭЖХ-МС/МС.

3.2.3 Изучение особенностей метаболизма глиобластомы

В рамках исследования были собраны и проанализированы образцы глиобластомы и ткани головного мозга, прилегающие к опухоли (17 образцов глиобластомы и 15 образцов ткани перитуморального пространства). Анализ проводился при использовании разработанного подхода методом ВЭЖХ-МС/МС. Полученные хроматограммы обрабатывали, интегрируя пик каждого метаболита, после чего было проведено сравнение сигнала каждого метаболита между образцами глиобластомы и перитуморальной ткани.

В качестве основного подхода к статистическому анализу результатов метаболомного скрининга был использован тест Манна-Уитни со значением $p < 0.05$. Таким образом, в исследуемых группах достоверно различалось содержание 38 метаболитов

(табл. 9). К результатам теста Манна-Уитни была применена поправка на множественное сравнение (False Discovery Rate, FDR) Бенджамини-Хохберга для контроля над групповой вероятностью ошибки. После применения поправки на множественное сравнение, при частоте ложных открытий 0,05 ни один метаболит не показал статистически достоверного различия (табл. 9, столбец «FDR»).

Табл. 9. Метаболиты с достоверно различающимся содержанием между образцами глиобластомы и перитуморального пространства ($p < 0.05$) согласно тесту Манна-Уитни

№	Название метаболита на английском языке	Название метаболита на русском языке (при наличии)	Тест Манна-Уитни (p-value)	FDR
1	Malonyl-CoA	Малонил-КоА	$1,17 \times 10^{-4}$	$5,21 \times 10^{-2}$
2	SM (d18:1/22:0 OH)	Сфингомиелин (d18:1/22:0 OH)	$2,52 \times 10^{-3}$	$3,72 \times 10^{-1}$
3	Octanoylcarnitine	Октаноилкарнитин	$4,10 \times 10^{-3}$	$3,72 \times 10^{-1}$
4	Ceramide (d18:1/16:0 OH)	Церамид (d18:1/16:0 OH)	$4,62 \times 10^{-3}$	$3,72 \times 10^{-1}$
5	Pyroglutamic acid	Пироглутамовая кислота	$4,62 \times 10^{-3}$	$3,72 \times 10^{-1}$
6	3-Phosphoglyceric acid	3-Фосфоглицериновая кислота	$5,20 \times 10^{-3}$	$3,72 \times 10^{-1}$
7	THC 18:1/20:0	—	$7,33 \times 10^{-3}$	$3,72 \times 10^{-1}$
8	Hexose Disaccharide Pool	Пул дисахаридов гексоз	$8,20 \times 10^{-3}$	$3,72 \times 10^{-1}$
9	4-Phosphopantothenate	4-Фосфопантотеновая кислота	$8,20 \times 10^{-3}$	$3,72 \times 10^{-1}$
10	2-Octenoylcarnitine	2-Октеноилкарнитин	$9,17 \times 10^{-3}$	$3,72 \times 10^{-1}$
11	Ceramide (d18:1/16:0)	Церамид (d18:1/16:0)	$9,17 \times 10^{-3}$	$3,72 \times 10^{-1}$
12	Ceramide (d18:1/22:0)	Церамид (d18:1/22:0)	$1,14 \times 10^{-2}$	$3,72 \times 10^{-1}$
13	Coenzyme A	Кофермент А (КоА)	$1,27 \times 10^{-2}$	$4,35 \times 10^{-1}$
14	Pyridoxal	Пиридоксаль	$1,41 \times 10^{-2}$	$4,49 \times 10^{-1}$
15	N-carbamoyl-L-aspartate	N-карбамоил-L-аспартат	$1,74 \times 10^{-2}$	$5,16 \times 10^{-1}$
16	Citrulline	Цитруллин	$1,92 \times 10^{-2}$	$5,26 \times 10^{-1}$
17	Decanoylcarnitine	Деканоилкарнитин	$2,12 \times 10^{-2}$	$5,26 \times 10^{-1}$
18	Dodecanoylcarnitine	Додеканоилкарнитин	$2,12 \times 10^{-2}$	$5,26 \times 10^{-1}$
19	GC(18:2/16:0)	Глицерохолин (18:2/16:0)	$2,35 \times 10^{-2}$	$5,37 \times 10^{-1}$
20	PI (34:2)	Фосфатидилинозитол (34:2)	$3,14 \times 10^{-2}$	$5,37 \times 10^{-1}$
21	Purine	Пурин	$3,45 \times 10^{-2}$	$5,37 \times 10^{-1}$

22	SM (d18:1/20:1)	Сфингомиелин (d18:1/20:1)	$3,45 \times 10^{-2}$	$5,37 \times 10^{-1}$
23	1-Pyrroline-5-carboxylic acid	1-Пирролин-5-карбоновая кислота	$3,77 \times 10^{-2}$	$5,37 \times 10^{-1}$
24	Cysteine-S-sulfate	Цистеин-S-сульфат	$3,78 \times 10^{-2}$	$5,37 \times 10^{-1}$
25	Deoxyadenosine monophosphate	Дезоксиаденозинмонофосфат	$3,78 \times 10^{-2}$	$5,37 \times 10^{-1}$
26	PS(34:2)	Фосфатидилсерин (34:2)	$3,78 \times 10^{-2}$	$5,37 \times 10^{-1}$
27	Anandamide	Анандамид	$4,14 \times 10^{-2}$	$5,37 \times 10^{-1}$
28	Ceramide (d18:1/16:2)	Церамид (d18:1/16:2)	$4,14 \times 10^{-2}$	$5,37 \times 10^{-1}$
29	Hexanoylcarnitine	Гексаноилкарнитин	$4,53 \times 10^{-2}$	$5,37 \times 10^{-1}$
30	Citric and isocitric acid	Лимонная и изолимонная кислоты	$4,53 \times 10^{-2}$	$5,37 \times 10^{-1}$
31	SM (d18:1/20:2)	Сфингомиелин (d18:1/20:2)	$4,53 \times 10^{-2}$	$5,37 \times 10^{-1}$
32	N-oleylethanolamine	N-олеилэтаноламин	$4,53 \times 10^{-2}$	$5,37 \times 10^{-1}$
33	Ceramide (d18:1/16:1 OH)	Церамид (d18:1/16:1 OH)	$4,53 \times 10^{-2}$	$5,37 \times 10^{-1}$
34	Butyrylcarnitine	Бутирилкарнитин	$4,95 \times 10^{-2}$	$5,37 \times 10^{-1}$
35	Ceramide (d18:1/16:1)	Церамид (d18:1/16:1)	$4,95 \times 10^{-2}$	$5,37 \times 10^{-1}$
36	Glycerophosphocholine	Глицерофосфохолин	$4,95 \times 10^{-2}$	$5,37 \times 10^{-1}$
37	Nicotinamide	Никотинамид	$4,96 \times 10^{-2}$	$5,37 \times 10^{-1}$
38	L-Tyrosine	L-тирозин	$4,96 \times 10^{-2}$	$5,37 \times 10^{-1}$

Расчет частоты ложноположительных результатов (false discovery rate, FDR) применяется при анализе биологических данных для оценки доли ложноположительных находок среди общего числа выявленных различий. В работе Benjamini и Hochberg [148] FDR впервые был предложен как подход к анализу больших биологических массивов данных и определяется как ожидаемое отношение ложноположительных классификаций к общему числу положительных результатов. Для задач клинической валидации биомаркеров особенно важно поддержание низкого уровня ложноположительных результатов, как правило, в диапазоне 1–5% FDR.

Однако при анализе метаболомных данных применение строгих поправок на множественное сравнение может приводить к чрезмерному снижению чувствительности анализа и исключению потенциально значимых метаболитов, ассоциированных с патологическим процессом. Это особенно характерно для исследований с ограниченным числом образцов и большим количеством одновременно анализируемых метаболитов, где

даже выраженные различия между группами могут не сохранять статистическую значимость после коррекции FDR. В связи с этим в метаболомике наряду с контролем FDR нередко используются дополнительные подходы к подтверждению различий, основанные на сочетании нескольких статистических критериев.

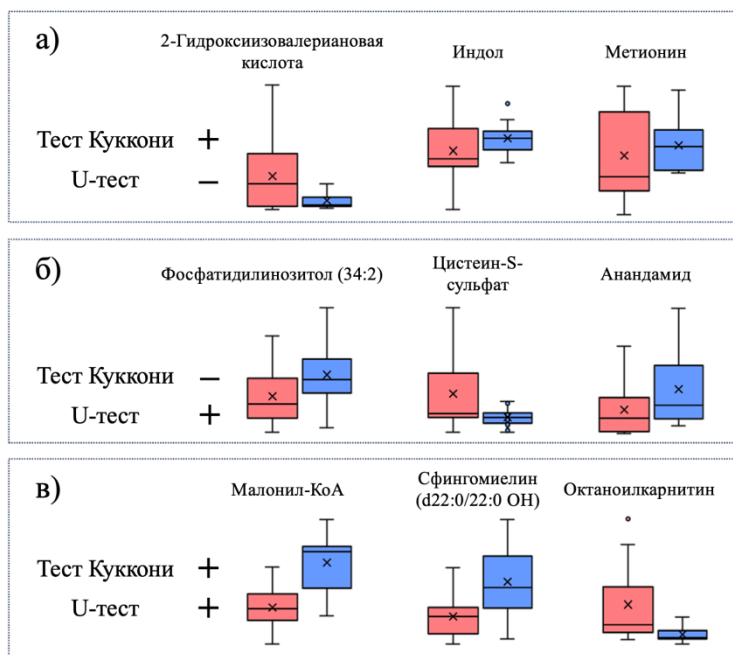
Одной из проблем статистического анализа результатов метаболомного скрининга является выбор наиболее подходящего критерия сравнения групп. Поскольку метаболомные данные зачастую характеризуются неоднородностью распределения и различием дисперсий, для сравнения выборок широко применяется U-тест Манна–Уитни, основанный на рангах наблюдений, а не на абсолютных значениях. Данный тест обладает сравнительно небольшим числом ограничений и может использоваться при малых выборках и отсутствии нормального распределения [141]. Вместе с тем методы Монте–Карло показали, что U-тест Манна–Уитни может давать ложноположительные результаты при сравнении выборок с одинаковыми средними значениями, но различными дисперсиями [139]. Альтернативой в случае данных, приближенных к нормальному распределению, является t-тест Стьюдента, более устойчивый при сравнении выборок с различными дисперсиями [140]. При анализе метаболомных данных также применяются другие статистические критерии, включая тест Колмогорова–Смирнова [142,143] и критерий Крамера–фон Мизеса [144].

Отдельный интерес представляет тест Куккони — непараметрический критерий, одновременно учитывающий различия как в положении, так и в масштабе распределений [145]. Несмотря на то, что данный тест ранее применялся преимущественно в технических [146] и гидрологических [147] задачах, его характеристики позволяют рассматривать его как перспективный инструмент для поиска метаболитов — потенциальных биомаркеров патологических процессов.

Поскольку использование теста Манна–Уитни с поправкой Бонферрони не позволило выделить список метаболитов — потенциальных маркеров, в качестве альтернативного подхода к подтверждению различий между уровнями метаболитов в группах было предложено применение бикритериального анализа. В этом подходе метаболит считался соответствующим требованиям различия между группами в том случае, когда он достоверно различался при использовании двух различных статистических тестов без применения поправок на множественное сравнение. Как дополнительный тест сравнения групп мы использовали непараметрический тест Куккони. При сравнении исследуемых групп с использованием теста Куккони число метаболитов, содержание которых достоверно различалось между группами ($p < 0.05$), составило 64. Мы сопоставили списки метаболитов, удовлетворяющих каждому из тестов при $p < 0.05$ и получили три

группы метаболитов: 1) удовлетворяющие только тесту Куккони, 2) только тесту Манна-Уитни и 3) удовлетворяющих обоим тестам. При пересечении групп, число метаболитов, удовлетворяющих обоим тестам, составило 22 (таб. 5, рис 12Б).

А.



Б.

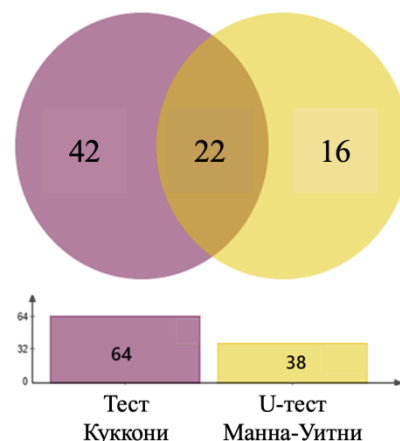


Рис. 10. А) Диаграммы иллюстрируют уровни метаболитов, достоверно ($p < 0.05$): а) различающихся согласно тесту Куккони, но не имеющих достоверных различий согласно тесту Манна-Уитни; б) различающихся согласно тесту Манна-Уитни, но не имеющих достоверных различий согласно тесту Куккони; в) различающихся согласно обоим тестам. В) Пересечение множеств метаболитов, содержание которых в исследуемых группах достоверно ($p < 0.05$) различается при использовании тестов Куккони и Манна-Уитни.

Из диаграмм на рис. 12А видно, что для теста Куккони наиболее значимыми оказались метаболиты, имеющие наибольшее различие в масштабах значений (прямо коррелирующим с дисперсией), тогда как тест Манна-Уитни учитывает только взаимное расположение рангов, которые заменяют собой сравниваемые величины. Использование тестов Куккони и Манна-Уитни при анализе одного набора данных позволило выделить метаболиты, значения площадей пиков которых в группах слабо перекрываются по критерию Манна-Уитни и при этом имеют различные дисперсии по критерию Куккони.

Табл. 10. Метаболиты, содержание которых достоверно ($p < 0.05$) различается в образцах глиобластомы и перитуморального пространства при сравнении по критерию Манна-Уитни и тесту Куккони.

№	Название метаболита на английском языке	Название метаболита на русском языке (при наличии)	Тест Куккони (p-value)	Тест Манна-Уитни (p-value)
1	Malonyl-CoA	Малонил-КоА	$9,99 \times 10^{-4}$	$1,17 \times 10^{-4}$
2	SM (d18:1/22:0 OH)	Сфингомиелин (d18:1/22:0 OH)	$3,00 \times 10^{-3}$	$2,52 \times 10^{-3}$
3	Octanoylcarnitine	Октаноилкарнитин	$8,99 \times 10^{-3}$	$4,10 \times 10^{-3}$
4	Pyroglutamic acid	Пироглутамовая кислота	$2,00 \times 10^{-3}$	$4,62 \times 10^{-3}$
5	Ceramide (d18:1/16:0 OH) §	Церамид (d18:1/16:0 OH)	$3,00 \times 10^{-3}$	$4,62 \times 10^{-3}$
6	3-Phosphoglyceric acid	3-Фосфоглицериновая кислота	$1,20 \times 10^{-2}$	$5,20 \times 10^{-3}$
7	THC 18:1/20:0	–	$1,60 \times 10^{-2}$	$7,33 \times 10^{-3}$
8	Hexose Disaccharide Pool	Пул дисахаридов гексоз	$1,30 \times 10^{-2}$	$8,20 \times 10^{-3}$
9	4-Phosphopantothenate	4-Фосфопантотеновая кислота	$2,80 \times 10^{-2}$	$8,20 \times 10^{-3}$
10	2-Octenoylcarnitine	2-Октеноилкарнитин	$2,80 \times 10^{-2}$	$4,10 \times 10^{-3}$
11	Ceramide (d18:1/16:0) §	Церамид (d18:1/16:0)	$4,00 \times 10^{-3}$	$9,17 \times 10^{-3}$
12	Ceramide (d18:1/22:0) §	Церамид (d18:1/22:0)	$8,99 \times 10^{-3}$	$1,14 \times 10^{-2}$
13	Coenzyme A	Кофермент А (КоА)	$4,00 \times 10^{-2}$	$1,27 \times 10^{-2}$
14	Pyridoxal	Пиридоксаль	$3,10 \times 10^{-2}$	$1,41 \times 10^{-2}$
15	N-carbamoyl-L-aspartate	N-карбамоил-L-аспартат	$4,40 \times 10^{-2}$	$1,74 \times 10^{-2}$
16	Citrulline	Цитруллин	$2,50 \times 10^{-2}$	$1,92 \times 10^{-2}$
17	Decanoylcarnitine	Деканоилкарнитин	$4,70 \times 10^{-2}$	$2,12 \times 10^{-2}$
18	GC (18:2/16:0)	Глицерохолин (18:2/16:0)	$2,40 \times 10^{-2}$	$2,35 \times 10^{-2}$
19	Purine	Пурин	$2,00 \times 10^{-2}$	$3,45 \times 10^{-2}$
20	Ceramide (d18:1/16:2) §	Церамид (d18:1/16:2)	$3,20 \times 10^{-2}$	$4,14 \times 10^{-2}$
21	Ceramide (d18:1/16:1 OH) §	Церамид (d18:1/16:1 OH)	$2,50 \times 10^{-2}$	$4,53 \times 10^{-2}$
22	Glycerophosphocholine	Глицерофосфохолин	$3,00 \times 10^{-2}$	$4,95 \times 10^{-2}$

§ – метаболиты, относящиеся к классу церамидов

Для полученного набора метаболитов (табл. 10) с использованием MetaboAnalyst 6.0 был проведен анализ перепредставленности метаболических путей KEGG (табл. 11). Данный анализ показал, что статистически значимым перепредставленным метаболическим путем является метаболизм сфинголипидов (Sphingolipid metabolism). Еще

одним обогащенным маркерами путем оказался метаболический путь KEGG “Pantothenate and CoA biosynthesis” ($p\text{-value} = 0,012$), однако после поправки на множественное сравнение значение $p\text{-value}$ превысило порог значимости 0.05.

Табл. 11. Перепредставленные метаболические пути KEGG для набора метаболомных маркеров. FDR – поправка на множественное сравнение.

Метаболический путь (KEGG)	P-value	FDR
Метаболизм сфинголипидов	7.95×10^{-5}	6.36×10^{-3}
Биосинтез пантотеновой кислоты и КоА	11.5×10^{-3}	4.6×10^{-1}

Среди 22 метаболитов, которых можно отнести к потенциальным маркерам, пять соединений (~23%) относились к церамидам – классу липидных молекул, являющихся основным компонентом клеточных мембран (рис. 13), а 3 метаболита (4-фосфопантотеновая кислота, малонил-КоА и кофермент А) – к основным предшественникам в биосинтезе липидов *de novo* (рис. 14). Содержание церамидов было в 2 и более раза выше в ткани опухоли, чем в ткани перитуморального пространства, кроме того, в группе образцов глиобластомы дисперсия была значительно выше, что свидетельствует о большей гетерогенности группы (рис. 13).

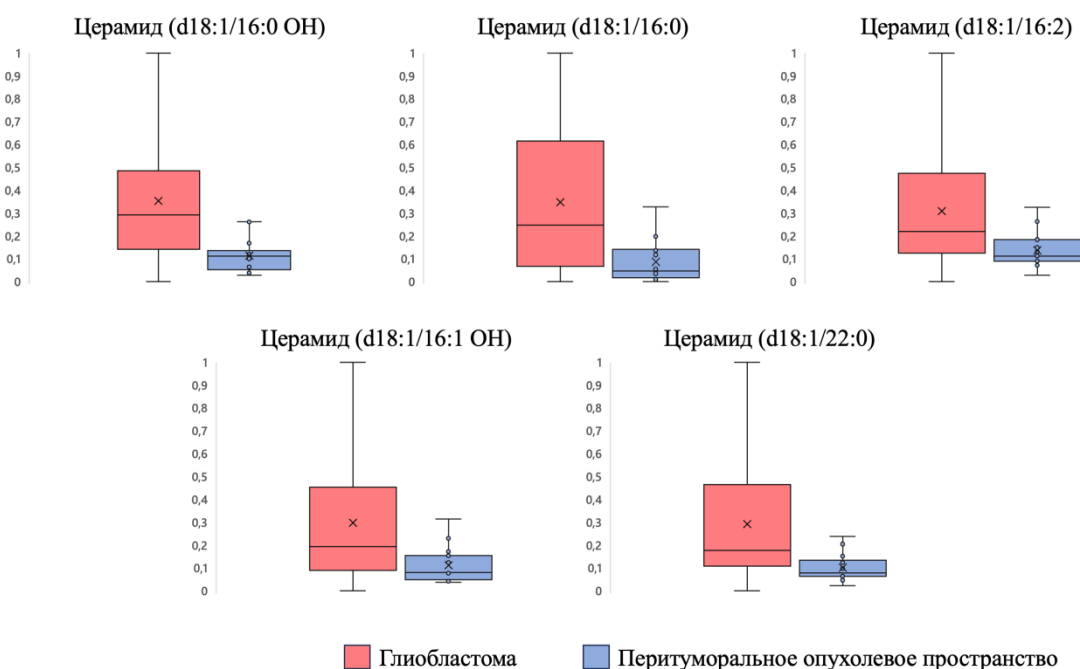


Рис. 13. Содержание маркерных церамидов в ткани опухоли и перитуморального пространства. По оси ординат указаны нормализованные значения площадей пиков.

Содержание КоА и его метаболитов в тканях опухоли было достоверно снижено (рис. 14), что может свидетельствовать о их активном расходовании на биосинтез липидов.

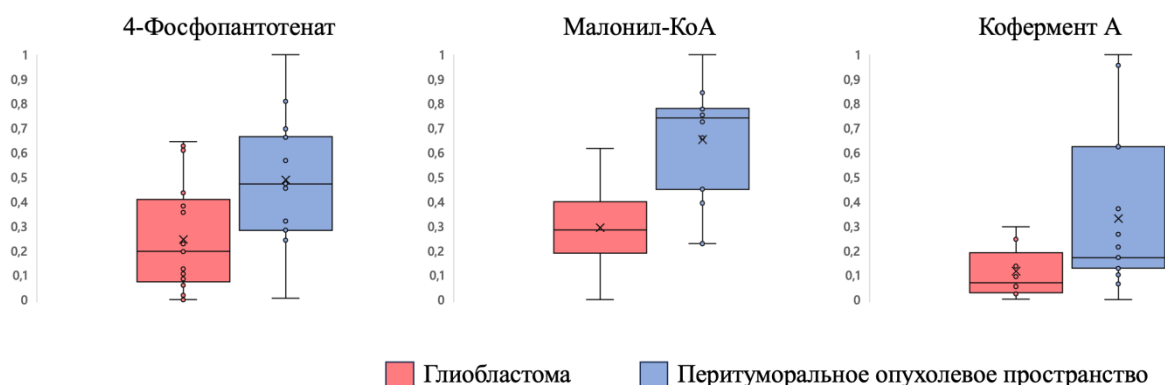


Рис. 14. Содержание КоА и связанных с ним метаболитов в ткани опухоли и перитуморального пространства. По оси ординат указаны нормализованные значения площадей пиков.

При изучении метаболических основ патогенеза глиобластомы с целью поиска новых терапевтических мишеней большее внимания стало уделяться метаболизму жирных кислот, который является критическим в патогенезе глиобластомы [157]. Например, в работе [158] показано, что добавление пальмитата (16:0) клеткам глиобластомы, а также намеренное нарушение баланса жирных кислот с целью накопления пальмитата повышало чувствительность глиобластомы к алкилирующему противоопухолевому препарату темозоломиду. В нашей работе было установлено сниженное содержание КоА и малонил-КоА в тканях глиобластомы в сравнении с тканями перитуморального пространства. В основе липидного синтеза опухолевые клетки глиобластомы должны производить жирные кислоты, для синтеза которых *de novo* глиобластома должна генерировать цитозольный ацетил-КоА, который может образовываться из цитрата под действием АТФ-цитратлиазы или из ацетата под действием ацетил-КоА-синтетазы [159]. В работе [160] авторами показано, что опухоли головного мозга разного клеточного происхождения обладают способностью окислять введенный ацетат. Авторы утверждают, что для окисления ацетата клетка путем повышения экспрессии активирует изоформу ацетил-КоА-синтетазы ACSS2. Повышенная экспрессия ACSS2 при GBM по сравнению с глиомами более низкой степени злокачественности подтверждает утверждение о том, что активация этого фермента связана с увеличением окисления ацетата опухолью. Также в работе [161] было показано, что при дефиците ASCC-2 у моделей мышей с гепатоцеллюлярной карциномой снижалась опухолевая нагрузка и ингибировался рост опухоли.

Процесс биосинтеза малонил-КоА из ацетил-КоА протекает при катализе ферментом ацетил-КоА карбоксилазой (АСС). У животных описаны две основные изоформы этого фермента: АСС1 и АСС2 [162]. Изоформа АСС1 является преобладающей формой, экспрессируемой в цитоплазме липогенных тканей, таких как жировая ткань, печень и молочная железа, где она играет важную роль в их обеспечении малонил-КоА как источника углерода для синтеза жирных кислот. Изоформа АСС2, напротив, связана с внешней митохондриальной мембраной и экспрессируется в основном в сердечной и скелетной мышцах - тканях с очень низкой липогенной способностью, а также в некоторой степени в печени. В этих тканях малонил-КоА, продуцируемый изоформой АСС2, функционирует главным образом как негативный регулятор карнитин-пальмитоилтрансферазы-I и тем самым контролирует поток жирных кислот в митохондрии для β -окисления [163]. С другой стороны, условия, приводящие к низким клеточным концентрациям малонил-КоА, благоприятствуют окислению жирных кислот, поскольку ингибирование карнитин-пальмитоилтрансферазы-I ослабевает. Таким образом, содержание малонил-КоА определяет направление метаболизма жирных кислот: будет ли жирная кислота участвовать в синтезе триглицеридов или подвергаться окислению [164]. Ранее в литературе отмечалось, что ингибирование β -окисления жирных кислот в клетках глиобластомы человека этаноксиром, ингибитором карнитин-пальмитоилтрансферазы-1, заметно снижает уровень АТФ, НАДФ и восстановленного глутатиона в клетках, что оказывает влияние на их жизнеспособность [165]. По всей видимости, β -окисление связано с устойчивостью к окислительному стрессу в клетках глиобластомы, а продемонстрированные нами результаты могут свидетельствовать о подтверждении этой гипотезы. Кроме того, имеются данные о связи содержания малонил-КоА с применением различных химиотерапевтических агентов. Так, в работе [166] на клеточной модели рака груди показано, что уровень малонил-КоА заметно повышается при ингибировании синтазы жирных кислот (авторы использовали церуленин и новое соединение С75) и снижался при ингибировании ацетил-КоА карбоксилазы 5-тетрадецилокси-2-фурановой кислотой. Авторами была установлена связь содержания малонил-КоА с цитотоксичностью терапевтического агента и сделано предположение о восприимчивости опухолевых клеток к изменению содержания малонил-КоА. Ключевые метаболические пути, такие как гликолиз и ЦТК, характеризуются наличием множества микроРНК, которые участвуют в регуляции этапов этих путей. Раковые клетки в основном используют аэробный гликолиз вместо ЦТК, что позволяет им поддерживать высокий уровень АТФ для обеспечения биосинтетических потребностей [167].

В нашей работе было выявлено возрастание содержания 4-фосфопантотената, что согласуется с изменениями липидного профиля. Синтез 4-фосфопантотената осуществляется при катализе ферментом пантотенаткиназой – первым ферментом в биосинтетическом пути КоА. Связь пантотенаткиназы с изменениями в глиобластоме активно обсуждается в литературе. Так, в работе [168] показано, что рост клеток линии глиомы U373 снижался при сайленсинге пантотенаткиназы-2. Содержание ацетил-КоА и липидов может контролироваться микроРНК miR-103 и miR-107 [169]. В свою очередь, литературные данные свидетельствуют о ингибировании miR-103 пролиферации и миграции глиобластомы [170] и ингибировании ангиогенеза глиобластомы при повышении экспрессии miR-107 [171].

Церамиды представляют собой липидные медиаторы класса сфинголипидов, участвующие в сигнальных путях, контролирующих пролиферацию, дифференцировку и гибель клеток [172]. В работе показано, что содержание церамидов (16:0), (16:0 ОН), (16:2), (16:1 ОН), (22:0) – производных сфингомиелина (18:1) повышено в ткани опухоли в сравнении с тканью перитуморального пространства. Ткань перитуморального пространства в нашей работе использовалась как контроль ввиду возможности ее получения образцов от пациентов оперативным путем без вреда для прогноза лечения. Исходя из повышения содержания церамидов в опухолевой ткани можно предположить изменения на уровне ферментных систем биосинтеза и деградации церамидов, которые могут быть связаны с опухолевым ростом и уходом опухолевых клеток от апоптоза.

Литературная справка.

Существует три основных пути образования церамидов. Сфингомиелиназный путь включает действие фермента сфингомиелиназы, который расщепляет сфингомиелин в клеточной мембране для высвобождения церамидов. Церамиды также могут синтезироваться путем de novo синтеза из более простых молекул. Реутилизационный путь (Salvage pathway) включает повторное использование сфинголипидов, которые расщепляются до сфингозина, через их реалкилирование для образования церамида.

Ключевой фермент сфингомиелиназного пути – сфингомиелиназа (SMase), которая катализирует гидролиз сфингомиелина. Поскольку сфингомиелин является одним из наиболее представленных в клеточной мембране фосфолипидов, значимость этого пути синтеза церамидов заключается в том, что клеточная мембрана становится мишенью для внеклеточных сигналов, приводящих к программированной гибели клеток и клеточному стрессу [173]. Различают три основных типа SMase: aSMase, nSMase и Alk-SMase. Стимуляция активности сфингомиелиназы может быть вызвана различными

факторами, включая противоопухолевые препараты. Ингибиторы сфингомиелиназы, такие как перфеназин и флуфеназин, входящие в состав FIASMA (функционального ингибитора кислой сфингомиелиназы), могут использоваться в терапии рака, хотя необходимы дальнейшие исследования для подтверждения их эффективности [174]. Недавно синтезированный ингибитор ARC39 ингибирует как лизосомальную, так и секреторную *aSMase in vitro* в клетках L929, HepG2 и B16 [175] и светоиндуцируемый ингибитор PCAI способный ингибировать *aSMase* [176]. Кроме того, сфингомиелиназа имеет важное значение в метаболизме сфинголипидов, что может оказывать влияние на развитие рака [177]. Ингибирование сфингомиелиназы и его влияние на экзосомы представляют интерес для дальнейших исследований в области рака и терапии [178].

Семейство сфингомиелин-синтаз (SMS), состоящее из трех представителей: SMS1, SMS2 и SMS-родственного белка (SMSr) [179] катализирует синтез сфингомиелинов из церамидов и фосфатидилхолина, тем самым высвобождая диацилглицерин. Было продемонстрировано, что селективное ингибирование SMS вызывает увеличение концентрации церамидов в эндоплазматическом ретикулуме и запускает аутофагию в нейронах гиппокампа [180]. Однако при глиобластоме было замечено, что лечение 2-гидроксиолеиновой кислотой, противоопухолевым препаратом, вызывало повышение активности SMS. Активация SMS2 вызывает снижение уровня церамидов и стимулирует пролиферацию клеток посредством активации сигнального пути трансформирующего фактора роста- β (TGF- β)/Smad. Напротив, ингибирование SMS2 специфической мiPHK приводило к накоплению церамидов и ускорению гибели клеток [181]. Кроме того, в недавних работах было обнаружено, что SMS2 активируется при раке молочной железы и индуцирует поляризацию макрофагов и прогрессирование опухоли [182]. Более того, ингибирование SMS2 с помощью нокдауна снижало высвобождение цитокинов, которые стимулируют поляризацию макрофагов, уменьшая рост опухоли [182]. Было показано, что у пациентов с метастатической меланомой была обнаружена понижающая регуляция SMS1, которая была связана с ухудшением прогноза из-за дисбаланса между уровнями сфингомиелина и глюкозилцерамида [183].

Синтез церамидов *de novo* начинается с конденсации пальмитата и серина с образованием 3-кетодигидросфингозина. Эта реакция катализируется ферментом серинопальмитоилтрансферазой и является этапом, ограничивающим скорость синтеза. В свою очередь, 3-кетодигидросфингозин восстанавливается до дигидросфингозина, за которым затем следует ацилирование ферментом (дигидро)церамидсинтазой с образованием дигидроцерамида. Конечная реакция получения церамидов катализируется дигидроцерамиддесатуразой. Синтез церамида *de novo* происходит в эндоплазматическом

ретиккулуме. Затем церамиды транспортируются в аппарат Гольджи либо везикулярным путем, либо с помощью белка-переносчика церамида (CERT). Попадая в аппарат Гольджи, церамиды могут подвергаться дальнейшему метаболизму с образованием других сфинголипидов, таких как сфингомиелин и сложные гликосфинголипиды [184].

Серинопальмитоилтрансфераза (SPT) – гетеромерный фермент, состоящий из трех субъединиц, который катализирует первый этап синтеза церамидов *de novo*. SPT катализирует конденсацию L-серина и пальмитоил-кофермента A с образованием 3-кетосфинганина. В нескольких исследованиях описано повышение активности SPT в ответ на химиотерапию и лучевую терапию при различных видах рака. К настоящему времени были описаны некоторые ингибиторы SPT, которые блокируют рост опухоли. В частности, мириоцин (также известный как ISP-1) является мощным ингибитором SPT [185]. Показано, что лечение мириоцином вызывало ингибирование роста клеток рака молочной железы [186] и меланомы B16F10 за счет остановки фазы G2/M [187]. Существует положительная корреляция между ингибированием фермента SPT и подавлением роста клеточной линии аденокарциномы легкого человека (HCC4006) [188]. Кроме того, ингибирование SPT мириоцином или снижение экспрессии фермента с помощью специфической мРНК ингибировало пролиферацию клеток глиобластомы человека U87MG, действие, которое было связано с подавлением внутриклеточных уровней сфингозин-1-фосфата [189]. Было высказано предположение, что противоопухолевая активность SPT обусловлена повышением уровня проапоптотических церамидов. На самом деле, у некоторых противоопухолевых препаратов, по крайней мере, часть терапевтической активности происходит за счет активации SPT. В частности, фенретинид, синтетический ретиноид, оказывающий цитотоксический эффект для различных раковых клеток, повышал концентрации дезоксицерамидов и церамидов, что приводило к апоптозу клеток нейробластомы, что было связано с взаимодействием этого препарата с SPT [190].

Церамидсинтаза (CCB) участвует как в процессе синтеза церамидов *de novo*, так и в *salvage pathway*. CCB — это семейство из шести различных изоформ, каждая из которых синтезирует церамиды с различной длиной цепи жирного ацил-КоА, что приводит к определенной активности. Этот факт важен, поскольку, например, CerS1 генерирует церамиды (18:0), для которых показано ингибирование роста опухоли [191], тогда как CerS5/6 продуцирует церамиды (16:0) – антиапоптотические метаболиты при плоскоклеточном раке головы и шеи человека [192]. Было описано, что специфический ингибитор CerS1, называемый P053, снижает уровень церамида (18:0) в клетках рака почек HEK 293 [193]. Интересно, что аналоги, полученные из финголимода (FTY720),

специфически ингибируют изоформы CCB в клетках HCT-106 и HeLa. В частности, ингибиторы ST1058 и ST1074 преимущественно ингибируют CerS2 и CerS4, тогда как ST1072 блокирует активность CerS4 и CerS6, а ST1060 ингибирует CerS2 [194].

Дигидроцерамиддесатураза (*Des1*, *DEGS1*) является последним ферментом в процессе синтеза церамида *de novo*. Этот фермент катализирует превращение дигидроцерамида в церамид путем введения транс-двойной связи в положении (C4-C5). Нокдаун *Des1* с помощью miРНК приводил к остановке клеточного цикла в клетках нейробластомы человека [195]. Например, было показано, что ресвератрол, который является полифенолом с хорошо известными антиоксидантными свойствами, ингибирует *Des1*, вызывая аутофагию в клетках рака желудка HGC27 [196]. Другие ингибиторы *Des1*, включая γ -токотриенол, феноксодиол или целекоксиб, индуцируют аутофагию путем накопления дигидроцерамида в клеточных линиях глиобластомы T98G и U87MG путем ингибирования *Des1* [196]. N-[(1R,2SHTTP)-2-гидрокси-1-гидроксиметил-2-(2-тридецил-1-циклопропенил)этил]октанамид является специфическим ингибитором *Des1*, который эффективно активирует аутофагию и апоптоз клеточной линии глиомы человека U87MG. Кроме того, лечение тетрагидроканнабинолом вызывает изменение липидного состава эндоплазматического ретикулума и, наряду с этим, накопление дигидроцерамида из-за снижения экспрессии *Des1*, что приводит к стимуляции аутофагии и апоптоза в клетках глиомы U87MG человека [197].

Основная деградация сфинголипидов и гликосфинголипидов происходит в кислых субклеточных компартментах, поздних эндосомах и лизосомах, с конечной целью получения сфингозина. В случае гликосфинголипидов экзогидролазы вызывают постепенное высвобождение моносахаридных звеньев с концов олигосахаридных цепей, оставляя только сфингозиновую часть молекулы, которая затем может способствовать образованию церамидов. Церамид может быть дополнительно гидролизован кислой церамидазой с образованием сфингозина и свободной жирной кислоты, которые, в отличие от церамида, способны покидать лизосому. Длинноцепочечные сфингоидные основания, высвобождающиеся из лизосом, могут затем повторно поступать на пути синтеза церамида и/или сфингозин-1-фосфата. В процессе восстановления длинноцепочечные сфингоидные основания повторно используются для образования церамида под действием церамидсинтазы. Таким образом, представители семейства церамидсинтаз, вероятно, удерживают свободный сфингозин, высвобождающийся из лизосом, на поверхности эндоплазматического ретикулума или в связанных с эндоплазматическим ретикулулом мембранах. Этот путь восстановления обеспечивает от 50% до 90% биосинтеза сфинголипидов [198].

Глюкозилцерамидсинтаза (GCS) – лизосомальный фермент, который осуществляет гликозилирование церамидов с образованием гликозилцерамидов. Было обнаружено, что уровень GCS повышается при различных типах рака, что связано с устойчивостью к противоопухолевым методам лечения [199].

Церамидаза – фермент, отщепляющий остатки жирных кислот от церамидов с образованием сфингозинов. Избыточная экспрессия кислой церамидазы (ASAH1) была обнаружена в меланомах, что, вероятно, приводит к резистентности к химиотерапии. Было обнаружено участие ASAH1 в функционировании митохондрий и клеточной аутофагии в клетках меланомы [200]. Было описано, что щелочная церамидаза (ACER) тесно связана с ростом, миграцией и инвазией опухолевых клеток [201]. Структурные аналоги церамидов продемонстрировали свою эффективность в качестве селективных ингибиторов ACER, блокирующих рост клеток и являющихся подходящими кандидатами для противоопухолевого лечения [202].

Многие индукторы клеточного стресса приводят к накоплению церамидов, как правило, в результате активации сфингомиелиназы, а также в результате ингибирования клиренса церамидов, опосредованного сфингомиелинсинтазой или церамидазами [192]. Индукторы церамидов включают химиотерапевтические агенты, стрессовые факторы окружающей среды и цитокины (фактор некроза опухоли (TNF-α), синтазу жирных кислот и фактор роста нервов). Ингибирование ферментов, участвующих в метаболизме церамидов, уменьшает или блокирует рост опухоли. Для ингибитора серинопальмитоилтрансферазы – мириоцина - показано уменьшение роста клеток рака молочной железы, аденокарциномы легкого и глиобластомы человека. С другой стороны, активатор серинопальмитоилтрансферазы – фенритидин приводит к апоптозу клеток нейробластомы. Ингибиторы церамидсинтазы также снижают уровни церамидов в глиоме и замедляют ее рост. Ингибиторы дигидроцерамиддесатуразы: γ-токотриенол феноксодиол и целекоксиб индуцируют аутофагию на клеточных линиях глиобластомы. Структурные аналоги церамидов (ингибиторы церамидазы) рассматриваются как перспективные противоопухолевые препараты.

Совокупность обнаруженных нами изменений в содержании церамидов явно свидетельствует о повышении экспрессии ферментов биосинтеза церамидов в опухоли. Дополнительным подтверждением этой гипотезы служит установленное нами синхронное снижение предшественников биосинтеза липидов в образцах глиобластомы. Как в нашей работе, так и в литературных данных активация биосинтеза церамидов ассоциирована с опухолевым ростом. Таким образом, совокупность литературных данных и полученных

нами результатов обосновывают перспективность применения препаратов – блокаторов ферментов биосинтеза церамидов при химиотерапии пациентов с глиобластомой.

3.3 Разработка протокола пробоподготовки для метаболомного скрининга клеточных образцов

3.3.1 Особенности и ключевые этапы пробоподготовки клеточных образцов: обоснование методического подхода

Протокол пробоподготовки клеточных образцов был разработан на основе методик, описанных в работах [203,204]. Для оценки применимости разработанного подхода к пробоподготовке и анализу клеточных образцов были выбраны две адгезивные линии меланомы: человеческая линия SK-MEL-28 и мышиная линия B16. Указанные клеточные линии обладают сходными морфологическими и таксономическими характеристиками, что позволяет предположить определенное сходство протекающих в них метаболических процессов. Исходя из этого, ожидалось, что внутриклеточные концентрации анализируемых метаболитов, а также содержание мембранных липидов будут соотноситься с размером клетки.

Использование автоматического счетчика клеток обеспечивало быстрый и воспроизводимый количественный учет клеток, существенно упрощая контроль качества образцов. Данный подход, наряду с микроскопией и подсчетом с использованием камеры Горяева (гемоцитометра), является стандартным методом определения количества клеток в биологических образцах. Вместе с тем, существенным ограничением такого подхода является невозможность анализа отдельных клеточных субпопуляций, присутствующих в образце, что может иметь критическое значение при необходимости разделения жизнеспособных и апоптотических клеток либо изоляции клеток, экспрессирующих специфические рецепторы.

В рамках настоящей работы клеточная сортировка не применялась, однако разработанный протокол может быть модифицирован с использованием магнитных наночастиц для селективной изоляции целевых клеточных субпопуляций. Включение стадии сортировки перед анализом позволило бы повысить специфичность метода за счет исключения нежелательных клеточных фракций, таких как апоптотические клетки или клетки, не экспрессирующие целевые маркеры, что представляется перспективным направлением дальнейшего развития методики. Следует отметить, что процедуры клеточной сортировки требуют дорогостоящего оборудования, высококвалифицированного персонала и характеризуются относительно низкой пропускной способностью, что ограничивает их применение в рутинных исследованиях. В

отличие от этого, использование автоматического счетчика клеток (например, Countess) представляет собой простой и быстрый подход, обеспечивающий достаточную точность оценки клеточного содержания в образце.

После подсчета клетки дважды промывали раствором фосфатно-солевого буфера Дульбекко (Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS) с целью удаления компонентов культуральной среды и потенциально мешающих веществ. Ключевой особенностью разработанного метода пробоподготовки являлась последующая замена DPBS на воду высокой степени очистки (Milli-Q). В предварительных экспериментах при сравнении образцов, содержащих 1×10^6 клеток, промытых либо DPBS, либо водой, было установлено, что использование воды приводит к значительному увеличению площадей пиков метаболитов, в том числе аминокислот (рис. 15, А–В). Кроме того, ряд полярных метаболитов, не детектируемых в образцах, промытых DPBS, формировал отчетливые пики на хроматограммах при использовании воды (рис. 15, Г–Е).

Полученные результаты указывают на возможное подавление ионизации анализируемых соединений неорганическими солями, присутствующими в составе DPBS, что приводит к снижению чувствительности масс-спектрометрического детектирования. Замена буферного раствора на воду позволила минимизировать матричные эффекты и повысить эффективность детектирования полярных метаболитов при анализе клеточных образцов методом ВЭЖХ-МС/МС.

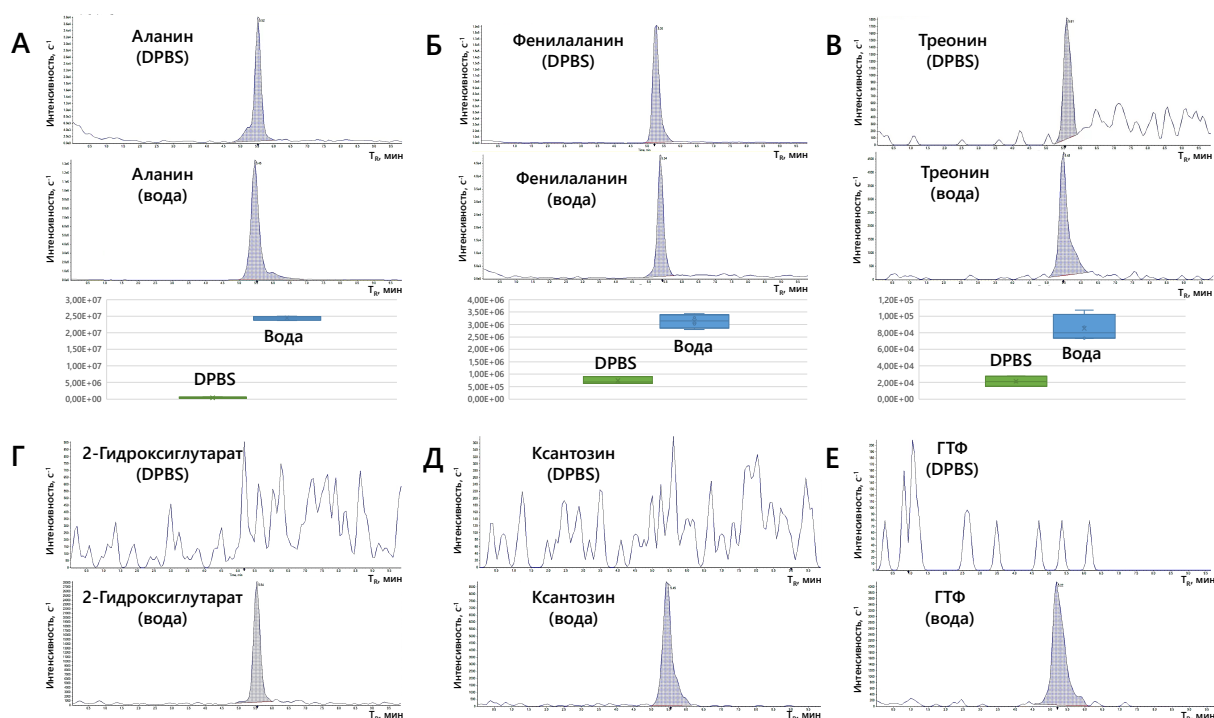


Рис. 15. Хроматограммы метаболитов из образцов, содержащих 1×10^6 клеток, подготовленных с использованием DPBS или воды высокой степени очистки (Milli-Q). (А–В) Примеры метаболитов (аланин, фенилаланин и треонин), детектируемых в обоих условиях пробоподготовки, однако характеризующихся более высокой интенсивностью аналитического сигнала при замене DPBS на воду. (Г–Е) Полярные метаболиты (2-гидроксиглутарат, ксантиозин и гуанозинтрифосфат), не детектируемые при использовании DPBS, но отчетливо идентифицируемые в образцах, подготовленных с применением воды. Диаграммы распределения отражают вариацию площадей пиков соответствующих метаболитов в зависимости от используемой среды пробоподготовки. По оси ординат указана интенсивность сигнала.

Клетки центрифугировали при комнатной температуре в растворе DPBS при $1000 \times g$ — условиях, не индуцирующих клеточный стресс [205]. После этого надосадочную жидкость полностью удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в 100 мкл воды. На данном этапе метаболическая активность прекращалась вследствие лизиса клеток в гипотонической среде. Использование воды вместо DPBS в качестве среды замораживания оказалось критически важным для повышения интенсивности аналитического сигнала. Это обусловлено тем, что неорганические соли, присутствующие в DPBS, коэлюируют со многими полярными метаболитами в условиях ГФХ, снижая эффективность ионизации и, как следствие, чувствительность метода.

В то же время данный подход имеет определенные ограничения. Поскольку клеточный осадок может быть слабо различим визуально, особенно при малом количестве

клеток, требуется особая аккуратность при удалении надосадочной жидкости во избежание потери осадка (и тем самым образца) при аспирации наконечником автоматической пипетки. В частности, осадок, соответствующий 10 000 клеток, практически неразличим невооруженным глазом и требует повышенного внимания при работе. Все этапы — от подсчета клеток до замораживания образцов — могут быть выполнены в стандартной лаборатории клеточных культур с использованием минимального набора оборудования и реактивов, что делает предложенный метод удобным и доступным для широкого применения.

Для осаждения белков из клеточного лизата использовали смесь метанола и ацетонитрила в соотношении 1:1 (об./об.), как было предложено Yuan и соавт. [85] и ранее применялось в настоящей диссертации. Для нормализации аналитических сигналов метаболитов использовали внутренние стандарты: 3-квинуклидинол — для анализа в режиме гидрофильной хроматографии и 2-иодoadенозин — для анализа в режиме обращенно-фазовой хроматографии. Параметры масс-спектрометрического детектирования представлены в экспериментальной части. Для каждого образца площадь пика каждого метаболита нормировали на площадь пика соответствующего внутреннего стандарта, зарегистрированного в том же хроматографическом режиме. Все последующие расчеты и статистический анализ проводили с использованием нормализованных значений площадей пиков.

3.3.2 Исследование метаболомного покрытия при анализе образцов клеток с разным количеством клеток

Как уже было сказано выше, конечный образец представляет собой раствор метаболитов, полученных из соответствующего количества клеток, в 500 мкл смеси воды (из аликвоты с известным количеством клеток), метанола и ацетонитрила (1:2:2, v/v/v). В ходе анализа были получены, хроматограммы 568 метаболитов для всех образцов, содержащих клетки, а также для контрольных образцов чистого растворителя, подготовленных одновременно с клеточными образцами. Далее проводили интегрирование пиков с соотношением сигнал/шум ≥ 5 , после чего проводилась оценка метаболомного покрытия, то есть числа достоверно детектируемых метаболитов в образцах с различным содержанием клеток. Для этого площади пиков каждого метаболита сравнивались с соответствующими значениями в контрольном растворителе с использованием критерия Манна-Уитни. Значимые различия фиксировались при значении статистики $U \leq 1$ (допускалась одна перестановка рангов), при этом учитывалось, что средняя площадь пика в клеточных образцах превышает соответствующее значение в контрольном растворителе.

Различия в метаболомном покрытии при анализе клеточной линии V16 представлены на рис. 15, где показаны примеры двух метаболитов с различными порогами детекции. Так, саркозин детектируется уже при минимальном содержании клеток в образце (10 тыс. клеток, рис. 16А). По мере увеличения количества клеток в образце относительная площадь его пика возрастает. Динамика роста площади пика на графике свидетельствует о том, что саркозин присутствует в клетках в значительном количестве и может быть надежно детектирован даже при относительно малом содержании клеток. На рис. 16 Б представлены хроматограммы и график зависимости площади пика 3-аминоизомасляной кислоты, которая не обнаруживается в образцах с 10 000 клетками и для обнаружения которой требуется более высокие их концентрации. Пик 3-аминоизомасляной кислоты становится отчетливо видимым только при содержании клеток 100 тыс. и выше, и его площадь заметно возрастает при дальнейшем увеличении содержания клеток в образце. Таким образом, для надежной детекции этого метаболита необходимо большее количество клеток, чем для саркозина, что свидетельствует о различных порогах обнаружения метаболитов в зависимости от их концентрации в клетках.

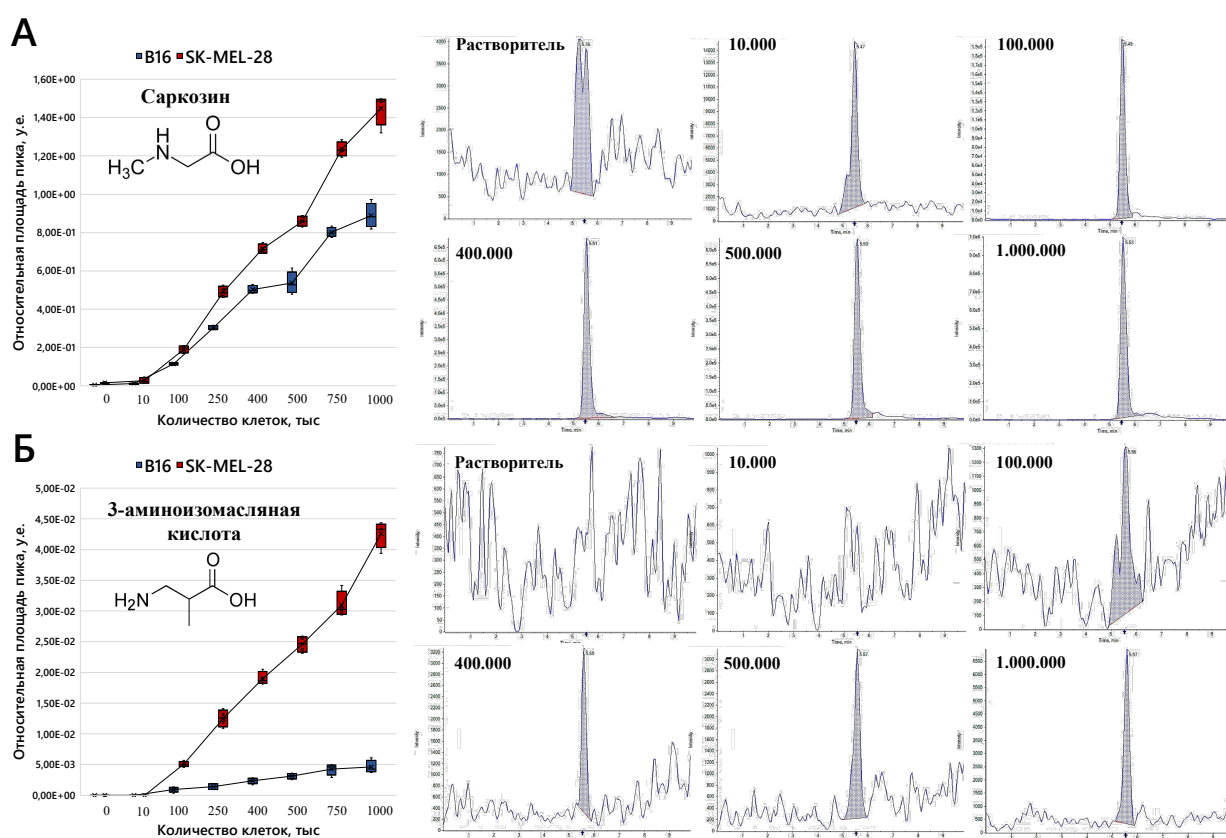


Рис. 16. Диаграммы значений площади пиков для (А) саркозина и (Б) 3-аминоизомасляной кислоты. Приведены примеры хроматограмм для этих метаболитов, обнаруженных в образцах клеточной линии V16 с разным количеством клеток.

Для оценки зависимости числа детектируемых метаболитов от количества клеток был проведен анализ образцов, содержащих от 10 000 до 1 000 000 клеток на пробу. Охват метаболома оценивали путем сравнения значений площадей пиков метаболитов в образцах, содержащих клетки, с соответствующими значениями в контрольных образцах, представляющих собой чистый растворитель, с использованием непараметрического критерия Манна—Уитни.

На рис. 17 представлены данные об охвате метаболома при различных количествах клеток в режимах ГФХ и ОФХ, а также диаграммы Венна, иллюстрирующие уникальные и общие метаболиты, детектируемые при разных концентрациях клеток для двух клеточных линий — B16 и SK-MEL-28.

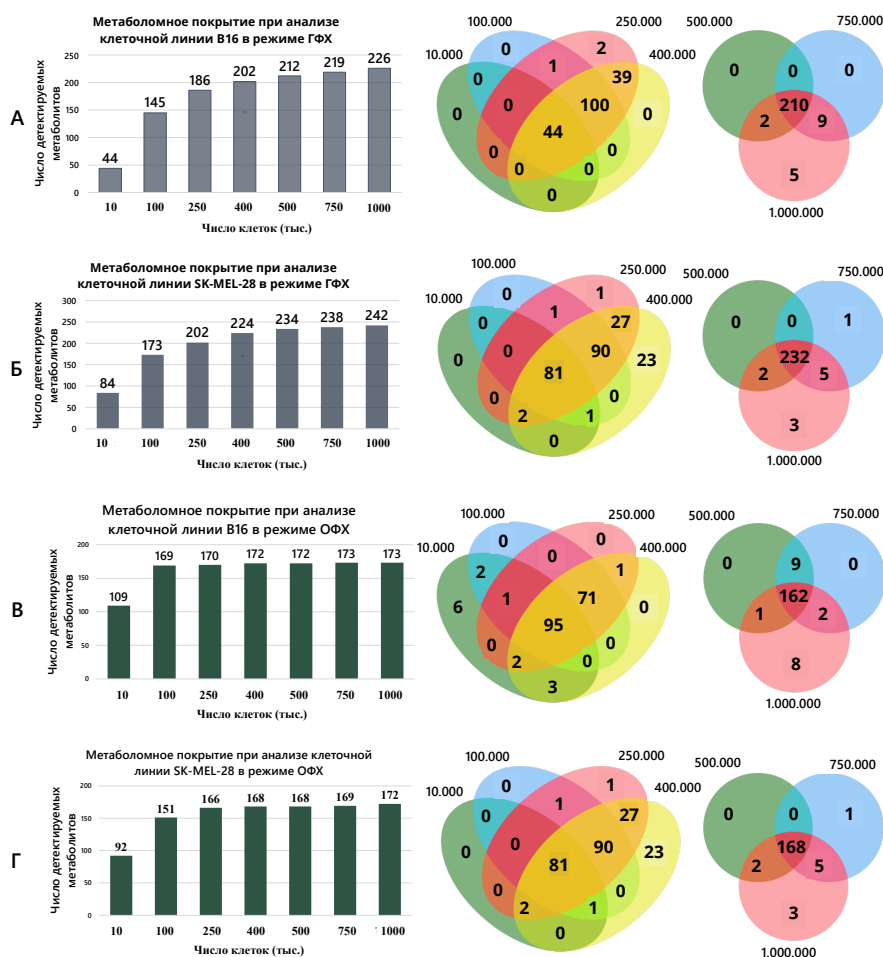


Рис. 17. Зависимость метаболомного охвата от количества клеток в клеточных линиях B16 и SK-MEL-28 при анализе в режимах ГФХ и ОФХ. Клеточные линии и режимы ВЭЖХ: А — B16, ГФХ; Б — B16, ОФХ; В — SK-MEL-28, ГФХ; Г — SK-MEL-28, ОФХ. В левой части каждого блока приведены столбчатые диаграммы числа детектируемых метаболитов в зависимости от количества клеток в образце (10, 100, 250, 400, 500, 750 и 1000 тыс.). В правой части представлены диаграммы пересечения (Венна) для соответствующих наборов. Для вариантов 10, 100, 250 и 400 тыс. клеток использованы следующие цветовые обозначения: 10 тыс. — зеленый, 100 тыс. — голубой, 250 тыс. — розовый, 400 тыс. — жёлтый. Для вариантов 500, 750 и 1000 тыс. клеток: 500 тыс. — зеленый, 750 тыс. — голубой, 1000 тыс. — красный. Числа в секторах диаграмм соответствуют количеству метаболитов, выявленных исключительно в данном наборе или общих для нескольких наборов (в областях перекрывания).

Как видно из столбчатых диаграмм, для образцов клеточной линии B16, проанализированных в режиме гидрофильной хроматографии (рис. 17А), наблюдается выраженное увеличение числа детектируемых метаболитов при увеличении количества клеток с 10 000 до 100 000 — с 44 до 145 из 358 анализируемых соединений. Это указывает

на то, что при малом числе клеток содержание ряда метаболитов может быть недостаточным для их надежного обнаружения, особенно в случае низких внутриклеточных концентраций. Однако при дальнейшем увеличении числа клеток рост охвата метаболома постепенно замедляется. Так, при увеличении количества клеток с 500 000 до 1 000 000 число детектируемых метаболитов возросло лишь незначительно — с 219 до 226. Это свидетельствует о том, что при используемых аналитических условиях и протоколе пробоподготовки охват метаболома достигает плато на уровне примерно 500 000 клеток, а дальнейшее увеличение количества клеток не приводит к существенному расширению числа детектируемых соединений.

Для клеточной линии SK-MEL-28 наблюдалась сходная динамика обнаружения метаболитов. В режиме ГФХ (рис. 17 Б) число детектируемых метаболитов увеличивалось с 84 при анализе образцов, содержащих 10 000 клеток, до 173 при 100 000 клеток. При дальнейшем увеличении числа клеток рост охвата метаболома становился более плавным: при 500 000 клеток было обнаружено 238 метаболитов, а при 1 000 000 клеток — 242. Эти результаты также указывают на то, что чувствительность обнаружения полярных метаболитов в режиме ГФХ достигает своего предела при количестве клеток порядка 500 000.

Аналогичная тенденция была выявлена и при анализе метаболитов клеточных линий B16 и SK-MEL-28 в режиме обращенно-фазовой хроматографии (рис. 17 В, Г). Резкое увеличение охвата метаболома наблюдалось при росте числа клеток с 10 000 до 100 000: число детектируемых метаболитов возросло с 109 до 169 (из 210 анализируемых) для линии B16 и с 92 до 151 — для линии SK-MEL-28. При дальнейшем увеличении числа клеток влияние этого фактора на количество детектируемых метаболитов становилось значительно менее выраженным: при уровне 500 000 клеток охват метаболома составлял 172 и 168 соединений соответственно, а увеличение количества клеток до 1 000 000 приводило лишь к незначительным изменениям — до 173 и 172 метаболитов для линий B16 и SK-MEL-28 соответственно. Диаграммы Венна подтвердили, что переход от низкого к промежуточному числу клеток сопровождается появлением значительного числа уникальных метаболитов, тогда как увеличение числа клеток от промежуточного к высокому вносит лишь незначительный вклад в расширение набора детектируемых соединений. Это дополнительно подтверждает, что в режиме ОФХ детекционная способность метода для клеточных образцов достигает плато при количестве клеток порядка 500 000.

Ожидаемо, увеличение числа клеток сопровождалось ростом площадей пиков метаболитов. На рис. 18 представлены зависимости средних нормированных площадей

пиков для выбранных метаболитов клеточной линии B16, относящихся к различным химическим классам и проанализированных в режиме ГФХ: аминокислоты (рис. 18 А), пурины и их производные (рис. 18 Б), ацилкарнитины (рис. 18 В), а также пиримидины и их производные (рис. 18 Г). Для дополнительного подтверждения корректности идентификации метаболитов в образцах с различным числом клеток была оценена воспроизводимость времен удерживания соединений различных структурных классов. Следует отметить, что предел обнаружения существенно варьируется для разных метаболитов. Так, например, глутамин детектировался только в образцах, содержащих не менее 250 000 клеток, что подчеркивает необходимость индивидуальной оценки чувствительности метода для каждого конкретного соединения.

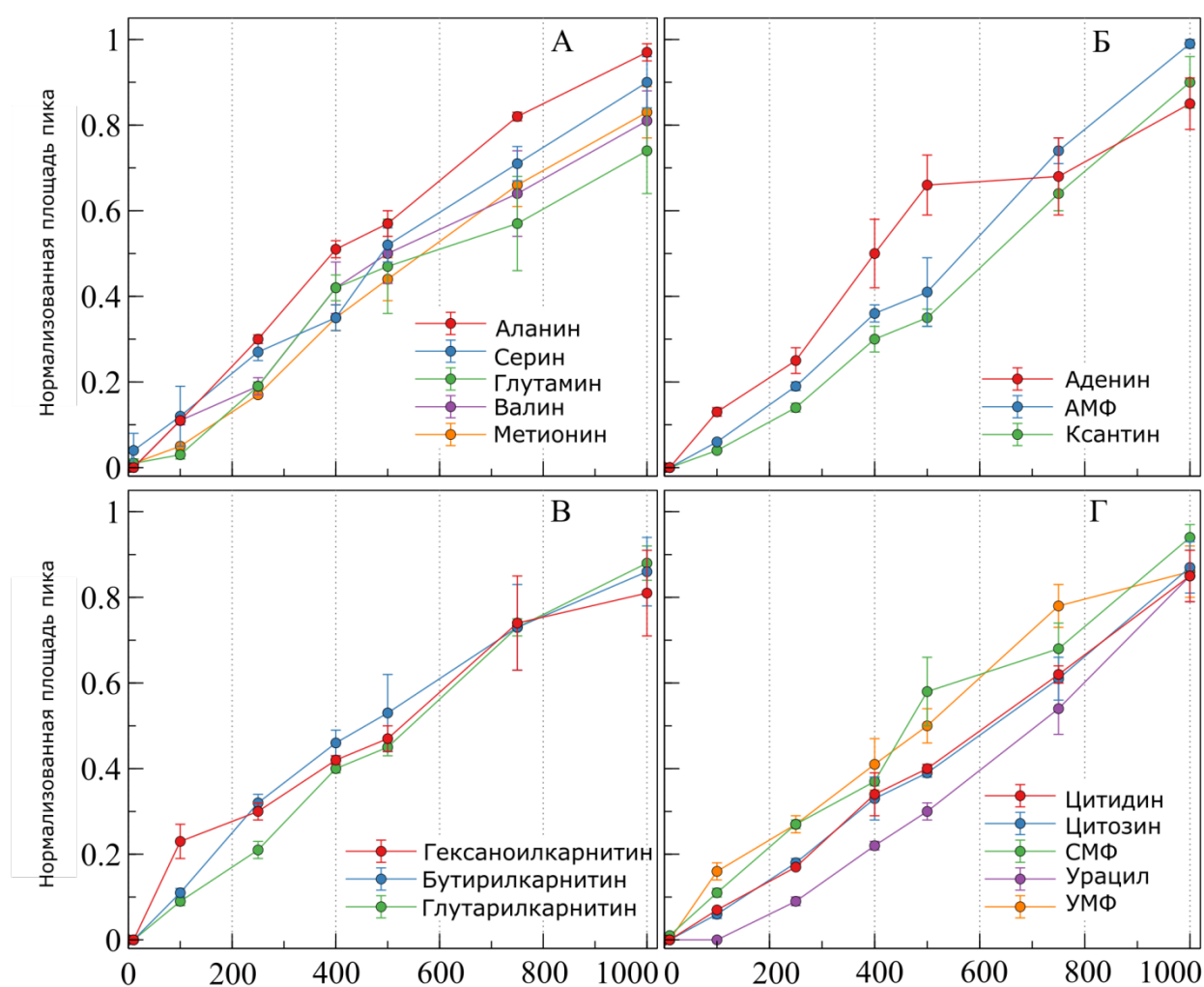


Рис. 18. Зависимость средних площадей пиков некоторых метаболитов в клетках B16 при анализе в режиме ГФХ от количества клеток в образце. По оси абсцисс представлено количество клеток в образце $\times 1000$.

Метаболиты, детектируемые в режиме обращенно-фазовой жидкостной хроматографии, отличаются от соединений, анализируемых в режиме гидрофильной

хроматографии, прежде всего по полярности. ОФХ преимущественно обеспечивает обнаружение гидрофобных и умеренно полярных соединений, тогда как ГФХ более пригодна для анализа гидрофильных метаболитов, включая аминокислоты, органические кислоты, нуклеотиды и их производные.

На рис. 19 представлена зависимость средних нормированных площадей пиков выбранных метаболитов, относящихся к различным классам липидов, от количества клеток для четырех соединений: фосфатидилхолина ФХ(30:0), сфингомиелина СМ (d18:1/18:2 ОН), кардиолипина КЛ (18:2/18:2/18:1/18:1) и фосфатидной кислоты ФК (18:1/18:1). Полученные графики показывают, что в начальном диапазоне концентраций (до ~750 000 клеток) наблюдается рост аналитического сигнала, что указывает на квазипропорциональную зависимость между концентрацией метаболита и числом клеток в пробе.

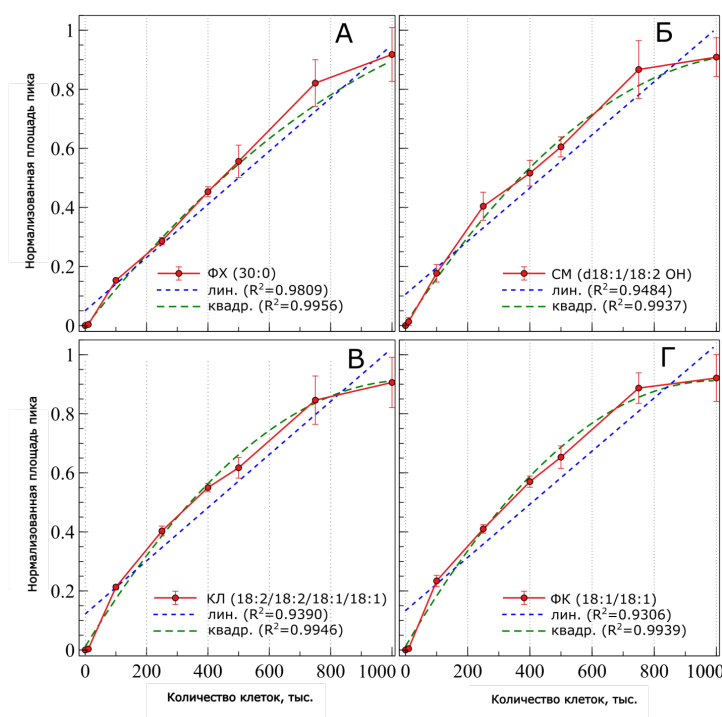


Рис. 19. Зависимость нормированной площади пика выбранных метаболитов из клеток линии V16 от количества клеток при анализе в режиме обращенно-фазовой хроматографии: **А)** Фосфатидилхолин (30:0); **Б)** Сфингомиелин (d18:1/18:2 ОН); **В)** Кардиолипин(18:2/18:2/18:1/18:1); **Г)** Фосфатидовая кислота (18:1/18:1). Точками показаны средние значения аналитического сигнала; вертикальные отрезки соответствуют ± 1 стандартному отклонению ($n = 4$ биологических повтора). Синяя пунктирная линия соответствует линейной аппроксимации, зеленая пунктирная линия — квадратичной полиномиальной аппроксимации; в легенде приведены значения коэффициента детерминации (R^2) для каждой модели. По оси абсцисс представлено количество клеток в образце $\times 1000$.

Полученные результаты указывают на наличие нелинейного эффекта, который, вероятнее всего, связан с подавлением ионизации в источнике ионизации методом электрораспыления при высоких концентрациях липидных метаболитов. Для более детального изучения данного явления представляется целесообразным проведение отдельного анализа липидных метаболитов с целью установления характера зависимости площадей пиков от количества клеток в пробе и оценки вклада матричных эффектов в формирование аналитического сигнала.

Статистический анализ с использованием критерия Манна—Уитни показал, что площади пиков таких метаболитов, как ФХ (30:0) и СМ (d18:1/18:2 ОН), не различались статистически значимо между образцами, содержащими 750 000 и 1 000 000 клеток (U Манна—Уитни = 4), несмотря на ожидаемое увеличение аналитического сигнала. Это указывает на то, что в случае, если для экспериментальной группы предполагается рост концентрации указанных метаболитов под действием исследуемого фактора, такой эффект может остаться недетектируемым при анализе образцов, содержащих 750 000 клеток, поскольку аналитический сигнал уже достигает области насыщения. Подобное явление может приводить к ложным выводам об отсутствии изменений концентраций метаболитов в условиях, когда реальные биологические различия присутствуют, но линейный динамический диапазон метода уже превышен.

Полученные результаты подчеркивают важность корректного выбора диапазона клеточной биомассы при проведении метаболомных исследований. На примере клеточных линий В16 и SK-MEL-28 было показано, что определение рабочего диапазона количества клеток в образце является принципиально важным этапом методологии. Для исследованных клеточных линий обоснованным представляется использование минимального количества 100 000 клеток и максимального — 500 000 клеток, поскольку при более высоких клеточных нагрузках анализ липидных метаболитов в режиме обращенно-фазовой хроматографии может давать искаженные результаты. В этом диапазоне наблюдается выход на плато по охвату метаболома, при котором дальнейшее увеличение числа клеток не приводит к существенному росту количества детектируемых метаболитов. Использование большего числа клеток может сопровождаться нелинейными эффектами и требует особой осторожности при интерпретации данных. Данный эффект особенно критичен для сравнительных исследований, в которых реальные биологические различия между группами могут маскироваться насыщением аналитического сигнала. С учетом изложенного рекомендуется строить калибровочные зависимости для каждой клеточной линии с целью учета возможных нелинейных эффектов и корректной интерпретации количественных различий между образцами.

Размер клеток играет принципиально важную роль в клеточной метаболомике, что продемонстрировано в настоящей работе при сравнении клеточных линий B16 и SK-MEL-28. Клетки линии SK-MEL-28 характеризуются большим средним размером по сравнению с B16 и обеспечивают больший охват метаболома при одинаковом количестве клеток. Это может быть объяснено тем, что более крупные клетки содержат больший объем цитоплазмы и развитую мембранную систему, являющиеся основными компартментами локализации анализируемых метаболитов. В результате образец, содержащий одинаковое число более крупных клеток, включает большее количество биологического материала по сравнению с образцом из мелких клеток.

Сравнение клеточных линий B16 и SK-MEL-28 показало, что клетки SK-MEL-28 стабильно демонстрируют несколько больший охват метаболома как в режиме гидрофильной, так и обращенно-фазовой хроматографии при одинаковом числе клеток. Так, при количестве 500 000 клеток в условиях ГФХ было детектировано 219 метаболитов в образцах B16 и 238 метаболитов в образцах SK-MEL-28. Данное различие может быть обусловлено как различиями в размерах клеток, так и особенностями их метаболической активности. Предполагается, что наблюдаемые различия в охвате метаболома в значительной степени связаны с фенотипическими характеристиками клеток. Согласно микроскопическим измерениям, средний диаметр клеток B16 составляет приблизительно 15–20 мкм, тогда как для клеток SK-MEL-28 он составляет порядка 20–25 мкм (рис. 20).

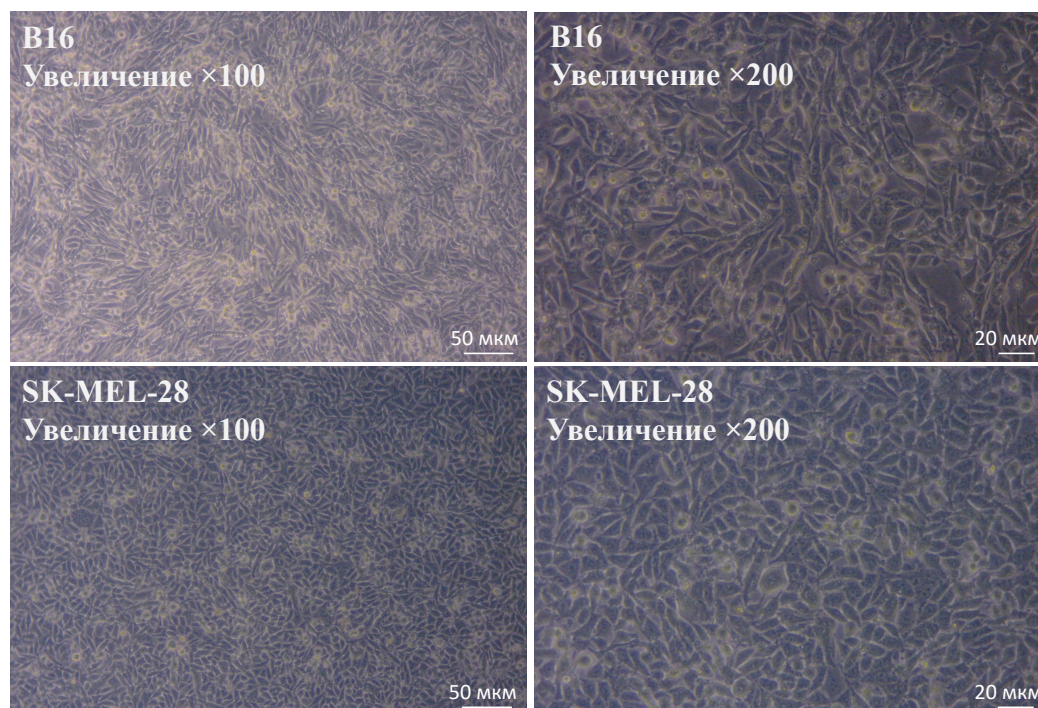


Рис. 20. Микроскопические изображения клеток⁶ SK-MEL-28 и B16 при увеличении 100× и 200×.

При аппроксимации клеток SK-MEL-28 и B16 сферической формой отношение их объемов соответствует кубу отношения радиусов и варьирует в диапазоне от $(20/15)^3 = 2,37$ до $(25/20)^3 = 1,95$, со средним значением около 2,2. Аналогично, отношение площадей поверхности клеток, пропорциональное квадрату отношения радиусов, составляет от $(20/15)^2 = 1,78$ до $(25/20)^2 = 1,56$. Поскольку большинство метаболитов, анализируемых в режиме обращенно-фазовой хроматографии, представляют собой липидные соединения, преимущественно локализованные в клеточных мембранах, а полярные метаболиты, определяемые в режиме ГФХ, преимущественно находятся в цитоплазме, можно предположить, что содержание липидных метаболитов в образце масштабируется квадратично по радиусу клетки, тогда как содержание полярных метаболитов — кубически.

Результаты настоящего исследования подчеркивают, что как размер клеток, так и их количество являются критическими параметрами при планировании метаболомных экспериментов. Увеличенный размер клеток обеспечивает больший охват метаболома при одинаковом числе клеток за счет увеличенного объема цитоплазмы и площади мембран, что повышает накопление и доступность метаболитов для анализа. Следовательно, для

⁶ Изображения получены м.н.с. НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН Бутиковой Екатериной Алексеевной.

клеточных линий с меньшим средним размером клеток может потребоваться большее число клеток для достижения сопоставимого уровня детектирования метаболитов.

3.3.3 Ключевые этапы пробоподготовки клеточных культур для метаболомного анализа методом ВЭЖХ-МС/МС

Метаболомный анализ клеточных культур требует стандартизированного протокола пробоподготовки, определяемого типом клеток, спектром анализируемых метаболитов и используемой аналитической платформой. Общая схема пробоподготовки включает удаление культуральной среды, остановку метаболической активности клеток, разрушение клеточных мембран и экстракцию метаболитов. На основании проведенных исследований нами предложена следующая схема пробоподготовки клеточных образцов для метаболомного анализа методом ВЭЖХ-МС/МС (рис. 21):

1. подсчет количества клеток;
2. удаление культуральной среды и промывка клеток DPBS с последующей заменой на дистиллированную воду;
3. проведение 2–3 циклов замораживания–оттаивания с последующей ультразвуковой обработкой;
4. осаждение белков органическим растворителем с внутренним стандартом;
5. анализ образцов.

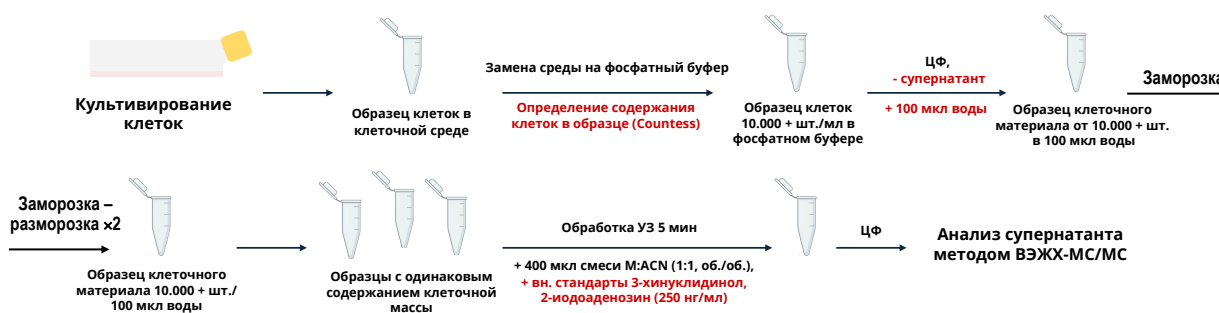


Рис. 21. Схема протокола пробоподготовки клеточных образцов для метаболомного анализа методом ВЭЖХ-МС/МС. ЦФ – центрифугирование; УЗ – обработка ультразвуком.

Удаление культуральной среды является критически важным этапом пробоподготовки, поскольку среда содержит как экзометаболиты, так и соли, способные вызывать выраженное подавление ионизации в источнике ESI. В литературе описаны различные подходы к промывке клеток: от полного отказа от данной стадии [206] до последовательной промывки DPBS и дистиллированной водой [207]. Также показано, что использование холодного физиологического раствора позволяет минимизировать осмотические эффекты и снизить утечку метаболитов [208]. При анализе полярных

метаболитов в режиме гидрофильной хроматографии предпочтительным представляется использование воды для минимизации влияния солей на эффективность ионизации.

После удаления культуральной среды требуется эффективное разрушение клеточных мембран для максимального извлечения внутриклеточных метаболитов. Для этого применяются циклы замораживания–оттаивания, ультразвуковая обработка и механическая гомогенизация. В настоящем исследовании использовали обработку клеток водой с последующими циклами замораживания–оттаивания и ультразвуковой обработкой, обеспечивающими воспроизводимую гомогенизацию образца.

Важным этапом пробоподготовки является использование органических растворителей, обеспечивающих осаждение белков и экстракцию метаболитов. Состав экстрагирующих смесей существенно варьирует в зависимости от аналитической задачи. В литературе описано применение метанола, ацетонитрила, хлороформа и их смесей [203,204], [206], [207]. [209]. В настоящем исследовании для пробоподготовки использовали смесь метанола и ацетонитрила с внутренними стандартами, что обеспечивало воспроизводимость анализа и повышение стабильности аналитического сигнала. Процедура пробоподготовки клеточных образцов, разработанная в настоящем исследовании основана на подходах, описанных в работах [203,204].

3.3.3.1 Нормализация данных, основанная на количестве клеток в образце

Метаболомные исследования требуют точной нормализации аналитического сигнала по числу клеток в образце для обеспечения воспроизводимости и достоверности результатов. Выбор оптимального способа нормализации имеет принципиальное значение, поскольку различные подходы обладают своими преимуществами и ограничениями, способными существенно повлиять на точность и устойчивость последующего анализа данных. В настоящее время существует несколько основных подходов к нормализации по числу клеток на этапе, предшествующем пробоподготовке, каждый из которых имеет свои особенности.

Одним из наиболее точных методов является прямой подсчет клеток, который может осуществляться с использованием автоматических счетчиков или камер Горяева (гемоцитометров) в сочетании с окрашиванием трипановым синим [210]. Данный подход позволяет формировать образцы с точно заданным числом клеток и оценивать долю нежизнеспособных клеток в пробе. Вместе с тем он имеет ряд ограничений: метод не позволяет дифференцировать клеточные субпопуляции без предварительного сортирования и применим только к жизнеспособным клеткам, что делает его непригодным для фиксированных или замороженных образцов. Кроме того, возможны ошибки, связанные с

аликвотированием и переносом проб, а также задержка этапа остановки метаболизма, что потенциально может приводить к искажению метаболического профиля [211].

Другим широко используемым подходом является нормализация по содержанию белка, основанная на колориметрических методах (тесты Брэдфорда или Лоури) либо УФ-спектрофотометрии при 280 нм [210]. Данный метод удобен и применим как к суспензионным, так и к адгезивным клеткам, а также менее чувствителен к потерям образца на этапах экстракции. Однако его применение ограничено чувствительностью колориметрических детекторов и необходимостью использования относительно больших объемов образца, что может вносить дополнительные погрешности в нормализацию [212]. К числу недостатков также относится возможное искажение результатов вследствие деградации белков и вариабельности их содержания между различными типами клеток.

Альтернативным подходом является нормализация по содержанию ДНК, основанная на количественном определении с использованием флуоресцентных красителей (PicoGreen, Hoechst) либо ПЦР-анализа с амплификацией специфических участков геномной ДНК [213]. Данный метод характеризуется большей стабильностью по сравнению с нормализацией по белку и применим к фиксированным и замороженным образцам. Содержание ДНК линейно коррелирует с числом клеток [214], однако эффективность экстракции ДНК может варьировать, что требует строгого контроля воспроизводимости методики.

Нормализация по эндогенным метаболитам предполагает использование определенных внутриклеточных соединений (например, инозитола и пантотената [215] или фенилаланина [212]), а также внутренних стандартов. Такой подход учитывает метаболическую активность клеток и позволяет избежать артефактов, связанных с потерями образца. Вместе с тем он требует тщательного подбора референтных метаболитов, поскольку их концентрации могут существенно изменяться в зависимости от экспериментальных условий.

К методам нормализации по общей клеточной биомассе относятся измерение оптической плотности (OD₆₀₀) для микробных культур [216], определение сухой массы или количественная оценка площади клеток методом микроскопии. Эти подходы широко применяются в микробиологии, однако ограниченно применимы для клеток млекопитающих, поскольку результаты могут искажаться присутствием внеклеточного материала и вариабельностью внутриклеточного состава.

Выбор метода нормализации определяется задачами конкретного эксперимента. Прямой подсчет клеток является наиболее точным подходом, однако ограничен применением к жизнеспособным клеткам и не позволяет без сортировки разделять

субпопуляции. Методы нормализации по белку и ДНК удобны, но могут вносить систематические смещения. Нормализация по эндогенным метаболитам функционально обоснована, однако требует тщательной валидации. Подходы, основанные на биомассе, хорошо подходят для микробиологических исследований, но имеют ограниченную применимость для клеток млекопитающих. Наиболее надежные результаты могут быть получены при комбинировании нескольких стратегий нормализации с целью минимизации экспериментальных артефактов и повышения аналитической точности. Тем не менее, благодаря своей простоте и доступности, прямой подсчет клеток остается одним из наиболее широко используемых методов нормализации. В литературе описаны примеры построения калибровочных зависимостей концентраций метаболитов от известного количества клеточного материала [217]. Однако, в литературе не были обнаружены исследования, специально посвященные оценке охвата метаболома в образцах с различным количеством клеток или анализу линейности отклика аналитического сигнала. Таким образом, определение диапазона концентраций клеточного материала, в пределах которого возможно корректное количественное определение метаболитов, является важной методологической задачей метаболомных исследований.

Разработанный протокол пробоподготовки и анализа метаболитов клеточных линий, продемонстрированный на примере линий меланомы B16 и SK-MEL-28, характеризуется высокой чувствительностью и воспроизводимостью, что делает его перспективным для широкого круга исследований метаболизма опухолевых клеток. Несмотря на то, что метод был апробирован на адгезивных клеточных линиях меланомы, его принципы могут быть адаптированы для других типов клеток, включая суспензионные культуры и клетки опухолей иного происхождения, таких как карциномы или саркомы. Данный подход особенно удобен для исследований метаболического ответа клеток на внешние воздействия, включая лекарственные препараты или изменения условий культивирования (например, уровня глюкозы или кислорода). Метод позволяет детектировать ряд метаболитов в образцах, содержащих всего 10 000 клеток, что представляет существенное преимущество при работе с редкими клеточными субпопуляциями или ограниченным количеством биологического материала. Кроме того, данный подход применим для изучения метаболических изменений при апоптозе, делении и дифференцировке клеток.

Включение этапа клеточного сортирования перед пробоподготовкой может дополнительно повысить аналитическую специфичность за счет фокусирования на определенных субпопуляциях и исключения апоптотических клеток либо клеток с нерелевантными поверхностными маркерами. В ряде недавних исследований, включая [218], показано, что параметры отбора проб существенно влияют на липидомный профиль

при анализе на уровне отдельных клеток, подчеркивая важность таких факторов, как коррекция фонового сигнала, объем аспирации и тип капиллярного наконечника.

Влияние размера клетки и общей биомассы на эффективность извлечения метаболитов остается одним из ключевых ограничений при интерпретации метаболомных данных, особенно в исследованиях первичных клеток, редких популяций или медленно пролиферирующих типов клеток. Исследования в области клеточной метаболомики показали, что пикомолярный объем отдельной клетки определяет как абсолютное количество доступных метаболитов, так и чувствительность их последующей детекции. Даже при использовании современных масс-спектрометрических методов — таких как ионизация методом нано-электрораспыления (nano-ESI), десорбционная ионизация электрораспылением (DESI) или капельные подходы — потери на этапе пробоподготовки могут достигать 30–70 %, особенно для нестабильных или слабо полярных соединений [219]. Это обстоятельство особенно важно для экспериментальных моделей, в которых нормализация по числу клеток затруднена, и требуется применение альтернативных стратегий — нормализации по объему образца, содержанию белка или другим биофизическим параметрам.

Дополнительной проблемой, особенно актуальной для липидомных исследований, является насыщение аналитического детектора. Избыточное содержание легко ионизируемых молекул, таких как фосфолипиды или триглицериды, может приводить к подавлению ионизации менее представленных липидных видов и, как следствие, искажению биологической интерпретации данных [220].

В свою очередь, разработанный подход представляет собой универсальное и доступное решение для проведения метаболомного анализа без необходимости использования дорогостоящих реагентов или оборудования при сохранении широкого охвата детектируемых метаболитов, в том числе в условиях варьирования клеточной навески и связанных с этим эффектов, описанных выше (влияние биомассы, потери при пробоподготовке и насыщение детектора). Протокол отличается гибкостью и может быть адаптирован под конкретные экспериментальные задачи и условия, включая выбор оптимального количества клеток в зависимости от требуемого аналитического охвата и чувствительности, что делает его применимым как для фундаментальных исследований, так и для разработки диагностических и терапевтических подходов на основе метаболомных данных. Одним из текущих ограничений метода является невозможность анализа гетерогенных клеточных субпопуляций без предварительных процедур сортировки, что может затруднять интерпретацию метаболомных профилей в смешанных или недостаточно охарактеризованных образцах. Перспективы дальнейшего развития метода

связаны с его адаптацией для сложных типов клеток — первичных культур, стволовых клеток и редких субпопуляций — путем интеграции флуоресцентной сортировки клеток (FACS), оптимизации этапов остановки метаболизма и подбора стратегий нормализации по белку, биомассе или ДНК. Несмотря на то, что настоящее исследование было сосредоточено на клеточных популяциях, изложенные принципы контролируемой пробоподготовки и нормализации данных могут быть использованы для повышения надежности метаболомных исследований в широком спектре биологических моделей и аналитических масштабов.

Таким образом, разработанный протокол пробоподготовки в сочетании с ранее оптимизированной методикой целевого метаболомного скрининга на основе ВЭЖХ-МС/МС обеспечивает эффективное детектирование широкого спектра метаболитов в образцах клеток меланомы, начиная с количества 10 000 клеток. Оптимальным диапазоном числа клеток для анализа линий SK-MEL-28 и B16 является 400 000–500 000, что позволяет выявлять широкий набор метаболитов, включая как полярные соединения, так и липиды. Протокол характеризуется высокой доступностью за счет использования простых реагентов и минимального набора лабораторного оборудования, что делает его удобным для внедрения в исследовательских лабораториях.

Несмотря на очевидные преимущества, метод имеет ограничения, связанные с невозможностью селективного удаления апоптотических клеток или разделения клеточных субпопуляций. Вместе с тем данное ограничение может быть частично устранено за счет применения дополнительных подходов, таких как обогащение с использованием магнитных наночастиц. В связи с этим разработанный протокол наиболее целесообразен для метаболомного скрининга образцов, подвергнутых нелетальным воздействиям, при которых выделение отдельных клеточных состояний не является необходимым.

Полученные результаты также подчеркивают критическую роль как размера клетки, так и их количества для успешного проведения метаболомного анализа. Показано, что одинаковое число клеток, различающихся по размеру, может приводить к различным значениям концентраций метаболитов и, соответственно, к различному охвату метаболома. На основании проведенного исследования рекомендуется строить калибровочные зависимости для каждой клеточной линии при планировании метаболомных экспериментов. Такой подход является особенно важным в области клеточной фармакометабономики, где корректная количественная интерпретация метаболитов имеет принципиальное значение для анализа биологических эффектов.

3.4 Исследование воздействия терагерцового излучения на метаболизм клеток меланомы человека SK-MEL-28⁷

Изучение влияния терагерцового излучения на живые системы представляет собой актуальное направление современной биомедицины, поскольку данный диапазон электромагнитного спектра активно внедряется в технологии диагностики, визуализации и телекоммуникаций. При этом молекулярные механизмы взаимодействия ТГцИ с биологическими объектами остаются недостаточно изученными, особенно на уровне клеточного метаболизма. В этой связи метаболомный анализ позволяет выявлять ранние биохимические изменения, отражающие ответ клеток на воздействие ТГцИ.

Применение разработанного протокола пробоподготовки адгезивных клеточных культур в сочетании с целевым метаболомным скринингом методом ВЭЖХ-МС/МС позволило зафиксировать изменения метаболомного профиля клеток SK-MEL-28 после воздействия терагерцового излучения (ТГцИ). Были установлены различия в содержании пуриновых метаболитов, связанных с пулом аденозиновых нуклеотидов и продуктов их метаболизма, а также для ряда липидных соединений, включая церамиды.

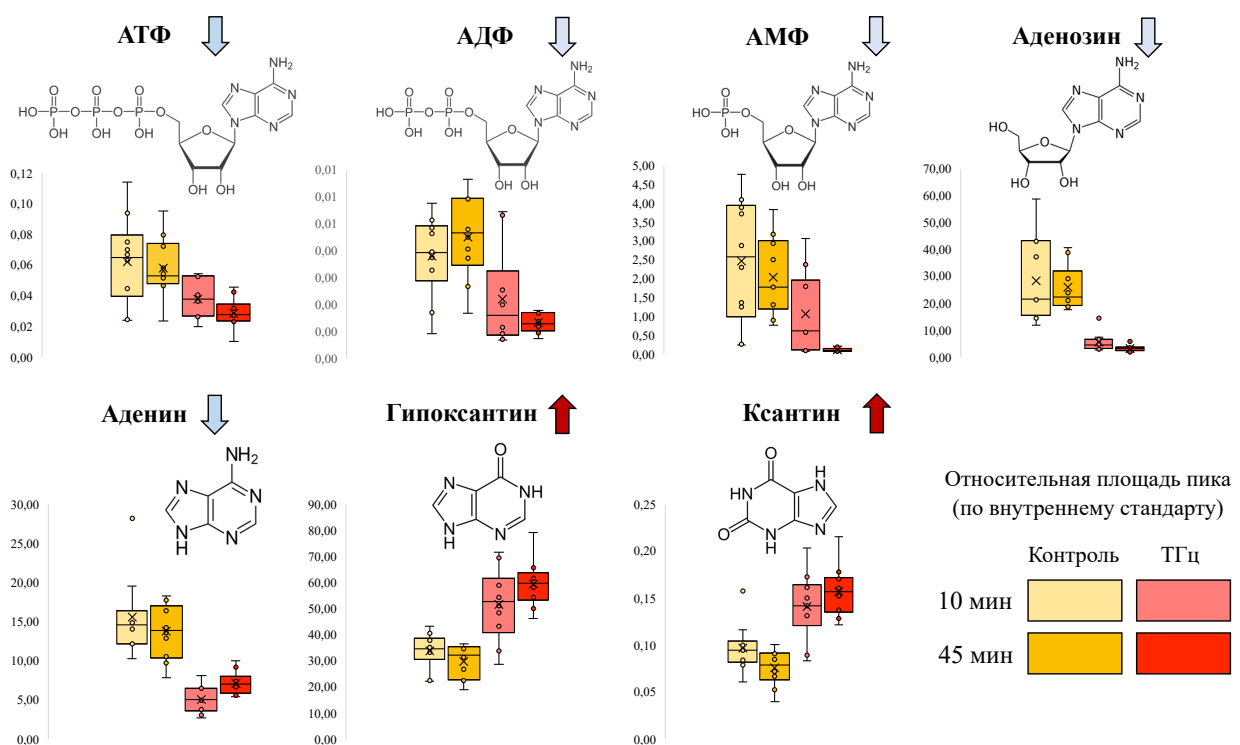


Рис. 22. Относительное содержание пуриновых метаболитов в клетках линии SK-MEL-28 после воздействия терагерцового излучения в сравнении с контрольными клетками.

⁷ Клетки были предоставлены д.б.н. Разумовым И. А. (SPF-виварий ИЦиГ СО РАН). Облучение клеток проводилось м.н.с. НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН Бутиковой Екатериной Алексеевной совместно с коллективом НЛСЭ (Лаборатория 8.1 ИЯФ СО РАН)

Воздействие ТГцИ сопровождалось согласованными изменениями относительного содержания метаболитов пуринового ряда: снижением содержания АТФ, АДФ, АМФ, аденозина и аденина и повышением содержания продуктов их деградации (гипоксантина и ксантина) (рис. 22). Смещение метаболомного профиля в сторону продуктов катаболизма пуринов может отражать изменение окислительно-восстановительных процессов в клетке, поскольку АТФ и его метаболиты не только обеспечивают запасание энергии в макроэргических связях, но и служат медиаторами клеточного метаболизма. В литературе ксантин рассматривается как маркер гипоксических и других стрессовых условий и связан с нарушениями клеточной жизнеспособности в ряде моделей [221], что согласуется с тем, что в ответ на физическое воздействие могут приводить к изменениям в содержании пуриновых метаболитов до фенотипических проявлений. Дополнительный биологический контекст наблюдаемым изменениям в содержании метаболитов придает роль пуринового обмена в опухолевом росте. Для пролиферации опухолевых клеток требуется непрерывное пополнение пуриновых нуклеотидов. Так, например, пуриносомы — ферментные комплексы, функционально сопряжённые с митохондриями и цитоскелетом, обеспечивают непрерывный биосинтез пуринов [222].

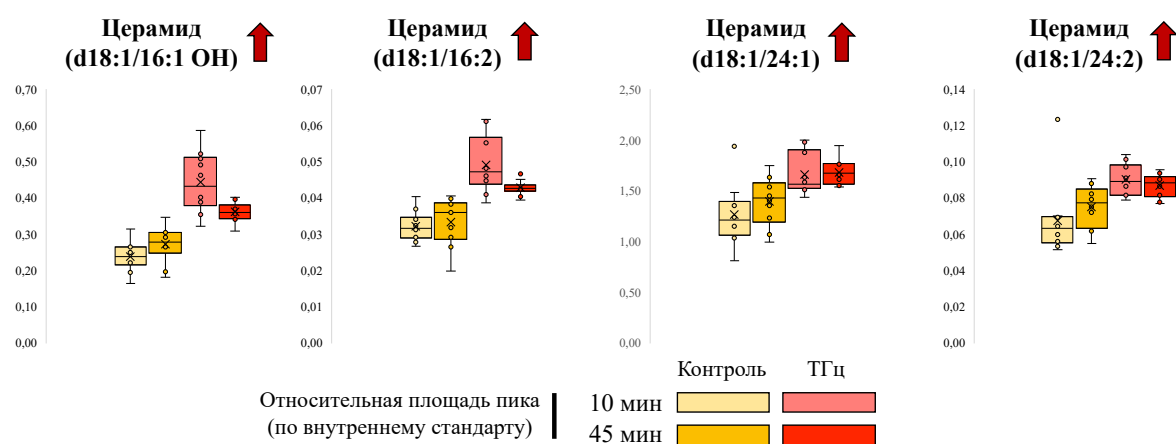


Рис. 23. Относительное содержание ряда церамидов в клетках линии SK-MEL-28 после воздействия терагерцового излучения в сравнении с контрольными клетками.

На рис. 23 представлены изменения в содержании отдельных церамидов. Церамиды являются функционально значимым классом сфинголипидов, которые участвуют в регуляции ответов на клеточный стресс и метаболической адаптации. Ферментные активности, связанные с метаболизмом церамидов, описаны не только в эндомембранных компартментах, но и на уровне митохондрий и митохондриально-ассоциированных мембран [223–225]. Поэтому повышение содержания церамидов соотносится с гипотезой о

вовлечении митохондриально-связанных процессов в клеточный ответ на ТГцИ. Для интерпретации наблюдаемых изменений липидного профиля целесообразно обратиться к литературным данным, посвященным метаболическим эффектам электромагнитных воздействий в близких диапазонах частот. При облучении клеточных моделей миллиметровыми волнами (в частности, 60 ГГц) авторами работы [226] наблюдались воспроизводимые изменения липидного состава, включая содержание сфинголипидов и церамидов. В ряде работ также обсуждаются изменения физических свойств биологических и модельных мембран под действием электромагнитного излучения, включая изменения упорядоченности и проницаемости липидного бислоя, зависящие от параметров облучения [227,228]. Эти данные позволяют рассматривать липиды как молекулы, чувствительные к электромагнитным воздействиям, хотя прямое перенесение выявленных механизмов на условия терагерцового диапазона требует осторожности и дополнительного экспериментального подтверждения.

Известно, что митохондрии играют ключевую роль в регуляции энергетического обмена и функционально сопряжены с метаболизмом сфинголипидов; описано участие митохондриально-ассоциированных ферментов в синтезе и превращениях церамидов [223–225]. Установленные изменения содержания пуриновых метаболитов и церамидов позволяют предположить вовлечение митохондриально-связанных процессов в клеточный ответ на воздействие ТГцИ.

На основании полученных метаболомных данных и результатов реконструкции генных сетей Е.А. Бутиковой (НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН), к.ф.-м.н. В.М. Попиком и коллективом НЛСЭ ИЯФ СО РАН, а также к.б.н., доц. В.А. Иванисенко и сотрудниками лаборатории компьютерной протеомики ИЦиГ СО РАН была сформулирована гипотеза о том, что первичной мишенью терагерцового излучения могут являться митохондриальные мембраны и ассоциированные с ними липидные рафты. Предполагается, что воздействие ТГцИ приводит к обратимому нарушению макромолекулярной организации липидных рафтов, что сопровождается изменением транспорта метаболитов и регуляции митохондриальных процессов при сохранении структурной целостности белков. Данная гипотеза согласуется с выявленными изменениями обмена пуринов, церамидов и кофермента А, а также с данными литературы о чувствительности мембранных структур к воздействию электромагнитного излучения в близких диапазонах частот.

4. Заключение

Разработан и апробирован подход к целевому метаболомному анализу биологических образцов различной природы на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС/МС) с использованием органической монолитной колонки на основе сополимеров стирола, дивинилбензола и 1-винил-1,2,4-триазола. Ключевой особенностью предложенного подхода является возможность проведения анализа в режимах ГФХ и ОФХ с использованием одной колонки и одной пары элюентов, что позволяет расширить охват детектируемых метаболитов без применения двумерных хроматографических схем.

Показано, что сочетание полимерного монолитного сорбента, устойчивого в щелочной области pH, с летучей карбонатной буферной системой обеспечивает эффективный анализ широкого спектра эндогенных метаболитов, включая полярные низкомолекулярные соединения и липидные молекулы, с высокой чувствительностью, стабильностью и воспроизводимостью хроматографических характеристик. Была показана применимость разработанного подхода к метаболомному анализу плазмы крови, сухих пятен крови, образцов биологических тканей и клеточных культур.

С использованием разработанного подхода были установлены статистически значимые метаболомные различия при исследовании патогенеза послеоперационного делирия и опухолевого роста глиобластомы, а также метаболомный ответ на рентгеновское и терагерцовое излучение *in vivo* и *in vitro*, соответственно. На основе полученных метаболомных данных сформулированы гипотезы о молекулярных механизмах патологических процессов. Разработан и методически обоснован протокол пробоподготовки адгезивных клеточных культур, адаптированный к задачам целевого метаболомного анализа, что расширяет возможности использования предложенного подхода для клеточных исследований.

В целом полученные результаты свидетельствуют о том, что разработанный подход представляет собой воспроизводимую и универсальную аналитическую платформу, пригодную для решения широкого круга задач метаболомных исследований биологических систем различной сложности.

5. Выводы

1. Показано, что монолитная колонка на основе 1-винил-1,2,4-триазола обеспечивает разделение метаболитов как в режиме обращённо-фазовой, так и гидрофильной хроматографии. Последовательное применение двух режимов является комплементарным, увеличивает охват метаболитов различных классов и позволяет детектировать около 400 соединений за суммарное время анализа менее 30 мин. Сравнение разработанного метода с методами, использующими коммерчески доступные колонки с сорбентами различных типов, показало, что он обеспечивает более широкий метаболомный охват.
2. Для клеточных линий меланомы человека SK-MEL-28 и мыши B16 оптимизирован протокол пробоподготовки для целевого метаболомного анализа методом ВЭЖХ-МС/МС. Протокол позволяет детектировать метаболиты в образцах, содержащих от 10 000 клеток, а оптимальный метаболомный охват достигается при анализе 400 000–500 000 клеток.
3. С использованием разработанного подхода в плазме крови пациентов старше 65 лет до операции на сердце в условиях искусственного кровообращения выявлены четыре сфингомиелина — СМ(d18:1/22:2 ОН), СМ(d18:1/24:0), СМ(d18:1/24:1) и СМ(d18:1/22:2), содержание которых у пациентов с послеоперационным делирием было статистически значимо снижено по сравнению с контрольной группой.
4. В тканях первичной глиобластомы по сравнению с перитуморальной тканью выявлено повышенное содержание церамидов и сниженное содержание кофермента А и малонил-КоА, а также статистически значимое изменение содержания ряда других метаболитов, что в совокупности может указывать на изменение β -окисления жирных кислот. Анализ метаболических путей показал статистически значимые изменения метаболизма сфинголипидов в ткани глиобластомы.
5. Разработанный подход позволил выявить метаболические изменения при воздействии ионизирующего и неионизирующего излучения: анализ метаболитов крови мышей после облучения рентгеном в полулетальной дозе показал изменения в метаболизме, указывающие на дисрегуляцию путей биосинтеза аминоксил-т-РНК, аргинина, а также метаболизма пуринов и ряда аминокислот, а после воздействия терагерцового излучения на клетки меланомы SK-MEL-28 — изменение содержания 40 метаболитов, преимущественно связанных с обменом пуринов и пиримидинов.

Приложение 1.

Исследование стабильности времен удерживания ряда метаболитов при анализе с использованием монолитной колонки

Для оценки стабильности синтезированного монолитного сорбента при проведении анализов были исследованы две колонки VTr, №1 и №2, приготовленные в разные дни. Первая колонка использовалась при отработке представленного подхода на плазме крови человека, а вторая – для скрининга метаболитов, выделенных из образцов сухих пятен крови мышей. Через каждые 6 анализов вводились соответствующие контрольные образцы качества, и сравнивалось время удерживания метаболитов в двух группах.

На рис. S1 представлена диаграмма времен удерживания ряда метаболитов в режимах ГФХ и ОФХ. Как видно из рис. S1, метаболиты различной химической природы имеют очень близкие времена удерживания при анализе на двух разных колонках.

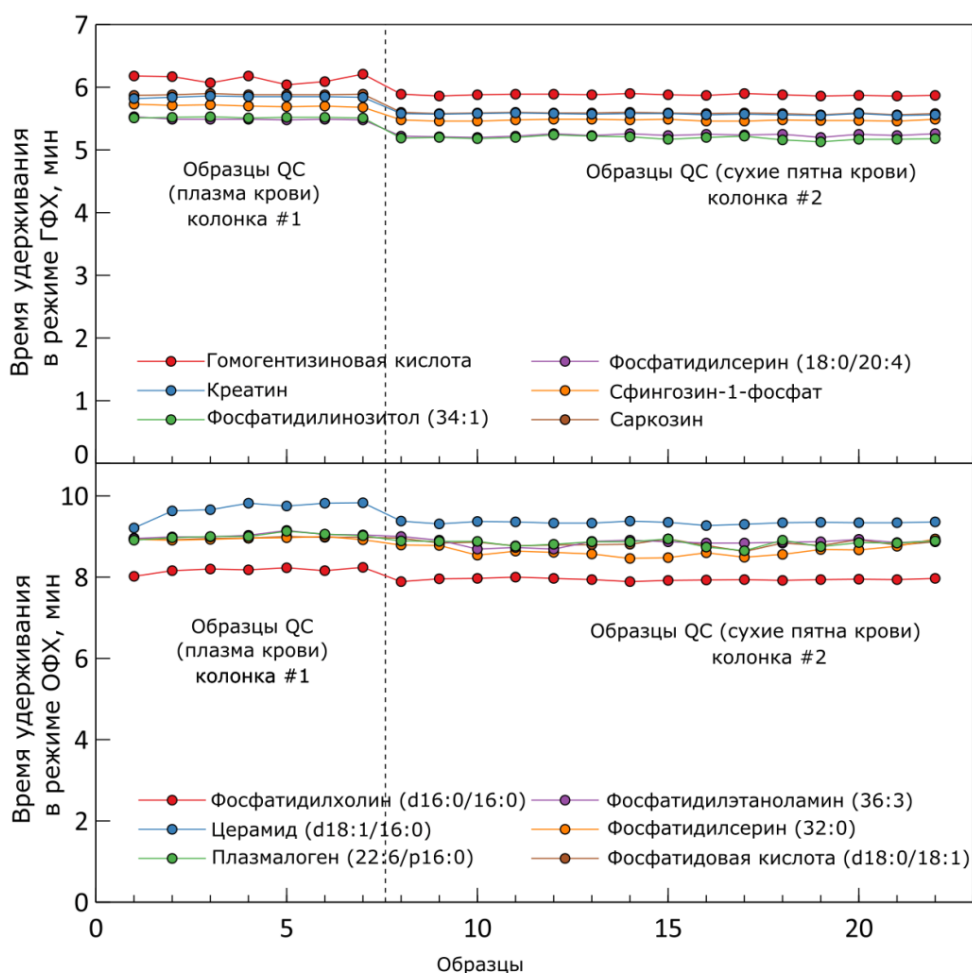


Рис. S1. Время удерживания некоторых метаболитов в плазме крови человека и цельной крови мыши в режимах ГФХ и ОФХ.

Сдвиг времен удерживания на 10% может быть обусловлен вариацией состава сорбента, его морфологией и/или разной природой образца: доля воды в подготовленных

образцах может отличаться из-за разного ее содержания в плазме и высушенном пятне крови. Тем не менее, селективность колонок не меняется, поскольку порядок элюирования метаболитов одинаков для обеих колонок, что позволяет сравнивать данные, полученные в разных экспериментах. После проведения большого количества анализов на колонке (300–400 образцов, около 150–200 рабочих часов) мы провели ее повторное тестирование с использованием той же тестовой смеси и отметили снижение эффективности колонки всего на 10%. Это снижение не сопровождалось потерей селективности колонки, что позволило нам продолжить ее использование.

Приложение 2.

Метаболиты со значимыми различиями в содержании в каждый из дней после облучения рентгеном в сравнении со здоровыми животными

Табл. S1. Относительное содержание метаболитов в цельной крови мышей до и через различные промежутки времени (4, 7, 11 дней) после облучения.

4 дня	7 дней	11 дней
Citrulline	Citrulline	Citrulline
Indoxyl sulfate	Carnosine	1-Methylnicotinamide
Threonine	Indoxyl sulfate	Indoxyl sulfate
Histamine	Xanthine	Carnosine
Arginine	Serotonin	Arachidonic Acid
L-Methionine	Urea	Threonine
5-Methylthioadenosine	1-Methylnicotinamide	Trimethylamine-N-oxide
Urea	Orotidine monophosphate	Arginine
Pantothenic acid	Hypoxanthine	Inosine
L-Phenylalanine	Taurocholic acid	L-Methionine
Carnosine	homocysteic acid	L-Kynurenine
2-Arachidonylglycerol	2-Keto-L-gluconate	Serotonin
L-Proline	LysoPC(24:1)	L-Proline
Zymosterol	Arginine	SM(d18:1/25:0) or SM(d18:1/24:1 OH)
Taurine	Xanthosine	Adenosine diphosphate
arginine	3-Hydroxylinoleylcarnitine	Urea
1-Methylnicotinamide	Thymine	arginine
Taurocholic acid	Aldosterone	L-Lysine
Hypoxanthine	Guanosine	LysoPC(24:1)
2-Keto-L-gluconate	L-Lysine	Methylcysteine
L-Lysine	Pantothenic acid	Hypoxanthine
Isovalerylcarnitine	L-Methionine	3-Hydroxylinoleylcarnitine
N-alpha-Acetylarginine	CL(18:2/18:2/18:2/22:6)	Saccharopine
Serotonin		LysoPC(22:0)
L-leucine + L-Isoleucine		Glycine
Orotidine monophosphate		L-Phenylalanine

9-Hexadecenoylcarnitine	Nicotinamide
Adenine	N-acetyl-L-alanine
3-Hydroxylinoleylcarnitine	Pantothenic acid
N-acetyl spermine	Guanosine monophosphate
L-Histidine	Alpha-Tocopherol
PC(20:5/P-16:0)	aminoimidazole carboxamide ribonucleotide
L-Serine	2-Arachidonylglycerol
Docosahexaenoic acid	Docosahexaenoic acid
L-Valine	Epinephrine
L-Glutamine	3-Hydroxydodecanoylcarnitine
Cytosine	S-adenosyl-L-methionine
LysoPC(16:0)	Uridine
Ethanolamine	Nicotinamide ribotide
3-Hydroxyoleoylcarnitine	3-Hydroxyoleoylcarnitine
Inosine triphosphate	L-Glutamine
Glycerol 3-phosphate	Inosine triphosphate
L-Tryptophan	LysoPC(16:0)
Eicosapentaenoic acid	Pimelylcarnitine
	9-Hexadecenoylcarnitine
	Linoleylcarnitine
	Pyruvic acid
	L-Glutaryl carnitine
	L-Histidine
	Ceramide(d18:1/20:1 OH)
	Pipecolic acid
	DL-O-Phosphoserine
	L-Asparagine

6. Список литературы

1. Griffiths W.J., Koal T., Wang Y., Kohl M., Enot D.P., Deigner H.P. Targeted metabolomics for biomarker discovery // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2010. – V. 49. – Is. 32. – P. 5426–5445. doi:10.1002/ANIE.200905579.
2. Oliver S.G., Winson M.K., Kell D.B., Baganz F. Systematic functional analysis of the yeast genome // *Trends Biotechnol.* – 1998. – V. 16. – Is. 9. – P. 373–378. DOI: 10.1016/S0167-7799(98)01214-1.
3. Williams R.J. Biochemical individuality. The basis for the genetotrophic concept // *AIBS Bull.* – 1957. – V. 7. – Is. 2. – P. 22–25. – DOI: 10.2307/1292230.
4. Dalgliesh C., Horning E., Horning M., Knox K., Yarger K. A gas-liquid-chromatographic procedure for separating a wide range of metabolites occurring in urine or tissue extracts // *Biochemical Journal.* – 1966. – V. 101. – Is. 3. – P. 792–810. doi:10.1042/bj1010792.
5. Horning E.C., Horning M.G. Metabolic profiles: gas-phase methods for analysis of metabolites // *Clin. Chem.* – 1971. – V. 17. – Is. 8. – P. 802–809. DOI: 10.1093/clinchem/17.8.802.
6. Kacser H., Burns J.A., Fell D.A. The control of flux // *Biochem. Soc. Trans.* – 1995. – V. 23. – Is. 2. – P. 341–366. DOI: 10.1042/bst0230341.
7. Heinrich R., Rapoport T.A. A linear steady-state treatment of enzymatic chains: General properties, control and effector strength // *Eur. J. Biochem.* – 1974. – V. 42. – Is. 1. – P. 89–95. doi:10.1111/j.1432-1033.1974.tb03318.x.
8. Heinrich R., Schuster S. *The Regulation of Cellular Systems.* — Berlin ; Heidelberg : Springer-Verlag, 1996.
9. Kell D.B., Westerhoff H. V. Metabolic control theory: its role in microbiology and biotechnology // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1986. – V. 2. – Is. 4. – P. 305–320. DOI: 10.1016/0378-1097(86)90020-0.
10. Burns J. A., Cornish-Bowden A., Groen A. K., Heinrich R., Kacser H., Porteous J. W., Rapoport S. M., Rapoport T. A., Stucki J. W., Tager J. M., Wanders R. J. A., Westerhoff H. V. Control analysis of metabolic systems // *Trends Biochem. Sci.* – 1985. – V. 10. – Is. 1. – P. 16–22. doi:10.1016/0968-0004(85)90008-8.
11. Fell D.A. Metabolic control analysis: A survey of its theoretical and experimental development // *Biochemical Journal.* – 1992. – V. 286. – Is. 2. – P. 313–330. doi:10.1042/bj2860313.
12. Fell D.A. *Understanding the control of metabolism.* – London: Portland Press, 1996. – 301 p. – (Frontiers in Metabolism; V. 2).
13. Nicholson J.K., Lindon J.C., Holmes E. “Metabonomics”: Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of

- biological NMR spectroscopic data // *Xenobiotica*. – 1999. – V. 29. – Is. 11. – P. 1181– 1189. DOI: 10.1080/004982599238047.
14. Cetina K. K. *Epistemic cultures: How the sciences make knowledge*. – Harvard university press, 1999.
 15. Kuhn, T. S. (2012). *The structure of scientific revolutions* (4th ed.). University of Chicago Press. (Original work published 1962).
 16. Lakatos I. *The methodology of scientific research programmes*. — Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1978.
 17. Bijker W. E., Latour B. Science in action: how to follow scientists and engineers through society // *Technol. Cult.* – 1988. – V. 29. – Is. 4. – P. 923–924. doi:10.2307/3105094.
 18. Rheinberger H.-J. *Toward a History of Epistemic Things: Synthesizing Proteins in the Test Tube*. – Stanford: Stanford University Press, 1997. – 340 p.
 19. Williams R. Pyrolysis mass spectrometry of recent and fossil biomaterials. *Compendium and atlas* // *Forensic Sci. Int.* – 1984. – V. 25. – Is. 2. – P. 151–152. – DOI: 10.1016/0379-0738(84)90025-2.
 20. Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules // *Science*. – 1989. – V. 246. – Is. 4926. – P. 64–71. doi:10.1126/science.2675315.
 21. Александров М.Л., Галль Л.Н., Краснов Н.В., Николаев В.И., Павленко В.А., Шкуров В.А. Электрораспыление растворов и перенос заряда // *Докл. Акад. наук СССР*. – 1984. – Т. 277. – № 2. – С. 379–382.
 22. Fiehn O., Kopka J., Dörmann P., Altmann T., Trethewey R.N., Willmitzer L. Metabolite profiling for plant functional genomics // *Nature Biotechnology*. – 2000. – V. 18. – Is. 11. – P. 1157– 1161. doi:10.1038/81137.
 23. Dettmer K., Aronov P.A., Hammock B.D. Mass spectrometry-based metabolomics // *Mass Spectrometry Reviews*. – 2007. – V. 26. – Is. 1. – P. 51–78. doi:10.1002/mas.20108.
 24. Alpert A. J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds // *J. Chromatogr. A*. – 1990. – V. 499. – P. 177–196. doi:10.1016/S0021-9673(00)96972-3.
 25. Cajka T., Fiehn O. Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography–mass spectrometry // *TrAC Trends Anal. Chem.* – 2014. – V. 61. – P. 192–206. doi:10.1016/j.trac.2014.04.017.
 26. Šofranko J., Gondáš E., Murín R. Application of the Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC-MS) Novel Protocol to Study the Metabolic Heterogeneity of

- Glioblastoma Cells // *Metabolites*. – 2024. – V. 14. – Is. 6. – P. 297. – DOI: 10.3390/metabo14060297.
27. Hosseinkhani F., Huang L., Dubbelman A.C., Guled F., Harms A.C., Hankemeier T. Systematic evaluation of HILIC stationary phases for global metabolomics of human plasma // *Metabolites*. – 2022. – V. 12. – Is. 2. – P. 165. DOI: 10.3390/metabo12020165.
28. Liao W.R., Lin J.T., Lin P.C., Chen C.C., Huang C.F., Chen H.M., Chen S.F. Advancing targeted metabolomics using cyanopropyl-based liquid chromatography tandem mass spectrometry // *Anal. Chem.* – 2024. – V. 96. – Is. 47. – P. 18625–18634. DOI: 10.1021/acs.analchem.4c01939.
29. Buszewski B., Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) – a powerful separation technique // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2012. – V. 402. – Is. 1. – P. 231–247. doi:10.1007/s00216-011-5308-5.
30. Tolstikov V.V., Fiehn O. Analysis of highly polar compounds of plant origin: Combination of hydrophilic interaction chromatography and electrospray ion trap mass spectrometry // *Anal. Biochem.* – 2002. – V. 301. – Is. 2. – P. 298–307. – DOI: 10.1006/abio.2001.5513.
31. Roux A., Lison D., Junot C., Heilier J.-F. Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: A review // *Clin. Biochem.* – 2011. – V. 44. – Is. 1. – P. 119–135. – DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2010.08.016.
32. Schriewer A., Heilen K.J., Hayen H., Jiang W. Direct analysis of amino acids by HILIC-ESI-MS // *LC GC Eur.* – 2017. – V. 30. – Is. 2. – P. 386–387.
33. Huang Y., Tian Y., Zhang Z., Peng C. A HILIC-MS/MS method for the simultaneous determination of seven organic acids in rat urine as biomarkers of exposure to realgar // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2012. – V. 905. – P. 37–42. DOI: 10.1016/j.jchromb.2012.07.038.
34. Wernisch S., Pennathur S. Evaluation of coverage, retention patterns, and selectivity of seven liquid chromatographic methods for metabolomics // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2016. – V. 408. – Is. 22. – P. 6079–6091. – DOI: 10.1007/s00216-016-9716-4.
35. Psychogios N., Hau D.D., Peng J., Guo A.C., Mandal R., Bouatra S., Sinelnikov I., Krishnamurthy R., Eisner R., Gautam B., Young N., Xia J., Knox C., Dong E., Huang P., Hollander Z., Pedersen T.L., Smith S.R., Bamforth F., Greiner R., McManus B., Newman J.W., Goodfriend T., Wishart D.S. The Human Serum Metabolome // *PLoS One*. – 2011. – V. 6. – Is. 2. – P. e16957. – DOI: 10.1371/journal.pone.0016957.
36. Lu W., Su X., Klein M.S., Lewis I.A., Fiehn O., Rabinowitz J.D. Metabolite measurement: pitfalls to avoid and practices to follow // *Annu. Rev. Biochem.* – 2017. – V. 20. – Is. 86. – P. 277–304. DOI: 10.1146/annurev-biochem-061516-044952.

37. Pereira J., Gonçalves J., Silva C.L., Mendes B., Silva P., Alves V., Figueira J., Câmara J.S. Metabolomic applications of liquid chromatography: From food bioactive metabolites to disease biomarkers research // *Liquid Chromatography: Principles, Technology and Applications* / Ed. F. Ramos. – New York: Nova Science Publishers, 2013. – P. 269–290. – ISBN 978-1-62618-678-1.
38. Gika H.G., Theodoridis G.A., Plumb R.S., Wilson I.D. Current practice of liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics and metabonomics // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2014. – V. 87. – Is. 0. – P. 12–25. doi:10.1016/j.jpba.2013.06.032.
39. Zhou B., Xiao J.F., Tuli L., Ressom H.W. LC-MS-based metabolomics // *Mol. Biosyst.* – 2012. – V. 8. – Is. 2. – P. 470–481. – DOI: 10.1039/c1mb05350g.
40. Virgiliou C., Gika H.G., Theodoridis G. HILIC-MS/MS multi-targeted method for metabolomics applications // *Methods Mol. Biol.* – 2018. – V. 1738. – P. 65–81. – DOI: 10.1007/978-1-4939-7643-0_5
41. Muller M., de Villiers A. A detailed evaluation of the advantages and limitations of online RP-LC×HILIC compared to HILIC×RP-LC for phenolic analysis // *J. Chromatogr. A.* – 2023. – V. 1692. – P. 463843. DOI: 10.1016/j.chroma.2023.463843.
42. Wei B., Dai L., Zhang K. Applications of hydrophilic interaction and mixed-mode liquid chromatography in pharmaceutical analysis // *J. Chromatogr. A.* – 2025. – V. 1739. – P. 465524. – DOI: 10.1016/j.chroma.2024.465524.
43. Ovbude S.T., Sharmeen S., Kyei I., Olupathage H., Jones J., Bell R.J., Powers R., Hage D.S. Applications of chromatographic methods in metabolomics: A review // *J. Chromatogr. B.* – 2024. – V.16. – Is. 1239. – P. 124124. DOI: 10.1016/j.jchromb.2024.124124.
44. Ren J.L., Zhang A.H., Kong L., Wang X.J. Advances in mass spectrometry-based metabolomics for investigation of metabolites // *RSC Adv.* – 2018. – V. 8. – Is. 40. – P. 22335–22350. – DOI: 10.1039/c8ra01574k.
45. Cajka T., Fiehn O. Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography–mass spectrometry // *TrAC Trends Anal. Chem.* – 2014. – V. 61. – P. 192–206. doi:10.1016/j.trac.2014.04.017.
46. Harrieder E.M., Kretschmer F., Böcker S., Witting M. Current state-of-the-art of separation methods used in LC-MS based metabolomics and lipidomics // *J. Chromatogr. B.* – 2022. – V. 1188. – P. 123069. doi:10.1016/j.jchromb.2021.123069.
47. Wang S., Blair I.A. Analytical methods for mass spectrometry-based metabolomics studies // *Advancements of Mass Spectrometry in Biomedical Research* / Ed. by Woods A.G., Darie C.C. – Cham: Springer International Publishing, 2019. – P. 635–647. – DOI: 10.1007/978-3-030-15950-4_38.

48. Chalcraft K. R., McCarry B. E. Tandem LC columns for the simultaneous retention of polar and nonpolar molecules in comprehensive metabolomics analysis // *J. Sep. Sci.* – 2013. – V. 36. – Is. 21–22. – P. 3478–3485. doi:10.1002/jssc.201300779.
49. David V., Moldoveanu S.C., Galaon T. Derivatization procedures and their analytical performances for HPLC determination in bioanalysis // *Biomedical Chromatography*. – 2021. – V. 35. – Is. 1. – P. e5008. doi:10.1002/bmc.5008.
50. Gray N., Zia R., King A., Patel V.C., Wendon J., McPhail M.J.W., Coen M., Plumb R.S., Wilson I.D., Nicholson J.K. High-speed quantitative UPLC-MS analysis of multiple amines in human plasma and serum via precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate: Application to acetaminophen-induced liver failure // *Anal. Chem.* – 2017. – V. 89. – Is. 4. – P. 2478–2487. doi:10.1021/acs.analchem.6b04623.
51. Kang X., Xiao J., Huang X., Gu Z. Optimization of dansyl derivatization and chromatographic conditions in the determination of neuroactive amino acids of biological samples // *Clin. Chim. Acta.* – 2006. – V. 366. – Is. 1–2. – P. 352–356. DOI: 10.1016/j.cca.2005.11.011.
52. Soma Y., Izumi Y., Shimohira T., Takahashi M., Imado Y., Tominaga S., Tokito K., Hata K., Shinadama S., Oshiro M., Hayakawa Y., Bamba T. In-Needle Pre-Column Derivatization for Amino Acid Quantification (iPDAQ) Using HPLC // *Metabolites*. – 2022. – V. 12. – Is. 9. – P. 807. – DOI: 10.3390/metabo12090807.
53. Gilar M., Berthelette K.D., Walter T.H. Contribution of ionic interactions to stationary phase selectivity in hydrophilic interaction chromatography // *J. Sep. Sci.* – 2022. – V. 45. – Is. 17. – P. 3264–3275. doi:10.1002/jssc.202200165.
54. Tang D.Q., Zou L., Yin X.X., Ong C.N. HILIC-MS for metabolomics: An attractive and complementary approach to RPLC-MS // *Mass Spectrom. Rev.* – 2016. – V. 35. – Is. 5. – P. 574–600. – DOI: 10.1002/mas.21445.
55. Want E.J., Wilson I.D., Gika H., Theodoridis G., Plumb R.S., Shockcor J., Holmes E., Nicholson J.K. Global metabolic profiling procedures for urine using UPLC-MS // *Nat. Protoc.* – 2010. – V. 5. – Is. 6. – P. 1005–1018. – DOI: 10.1038/nprot.2010.50.
56. Spagou K., Tsoukali H., Raikos N., Gika H., Wilson I.D., Theodoridis G. Hydrophilic interaction chromatography coupled to MS for metabonomic/metabolomic studies // *J. Sep. Sci.* – 2010. – V. 33. – Is. 6–7. – P. 716–727. – DOI: 10.1002/jssc.200900803.
57. Ivanisevic J., Zhu Z.J., Plate L., Tautenhahn R., Chen S., O'Brien P.J., Johnson C.H., Marletta M.A., Patti G.J., Siuzdak G. Toward 'omic scale metabolite profiling: A dual separation-mass spectrometry approach for coverage of lipid and central carbon metabolism // *Anal. Chem.* – 2013. – V. 85. – Is. 14. – P. 6876–6884. DOI: 10.1021/ac401140h.

58. Dunn W.B., Broadhurst D., Begley P., Zelena E., Francis-McIntyre S., Anderson N., Brown M., Knowles J.D., Halsall A., Haselden J.N., Nicholls A.W., Wilson I.D., Kell D.B., Goodacre R. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry // *Nature Protocols*. – 2011. – V. 6. – Is. 7. – P. 1060–1083. doi:10.1038/nprot.2011.335.
59. Naz S., García A., Barbas C. Multiplatform analytical methodology for metabolic fingerprinting of lung tissue // *Anal. Chem.* – 2013. – V. 85. – Is. 22. – P. 10941– 10948. DOI: 10.1021/ac402411n.
60. Cubbon, S., Antonio, C., Wilson, J., Thomas-Oates, J. Metabolomic applications of HILIC-LC-MS // *Mass spectrometry reviews* – 2010. – V. 29. – Is. 5. – P. 671–684. <https://doi.org/10.1002/mas.20252>
61. McCalley D.V. Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2017. – V. 1523. – P. 49–71. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.06.026.
62. Schuster G., Lindner W. Additional investigations into the retention mechanism of hydrophilic interaction liquid chromatography by linear solvation energy relationships // *J. Chromatogr. A.* – 2013. – V. 1301. – P. 98–110. – DOI: 10.1016/j.chroma.2013.05.065.
63. Dinh N.P., Jonsson T., Irgum K. Probing the interaction mode in hydrophilic interaction chromatography // *Journal of Chromatography A.* – 2011. – V. 1218. – Is. 35. – P. 5880–5891. doi:10.1016/j.chroma.2011.06.037.
64. Kozlik P., Goldman R., Sanda M. Hydrophilic interaction liquid chromatography in the separation of glycopeptides and their isomers // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2018. – V. 410. – Is. 20. – P. 5001–5008. DOI: 10.1007/s00216-018-1150-3.
65. Jandera P. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: A review // *Anal. Chim. Acta.* – 2011. – V. 692. – Is. 1-2. – P. 1–25. DOI: 10.1016/j.aca.2011.02.047.
66. Snyder L.R. Role of the Solvent in Liquid-Solid Chromatography—A Review // *Anal. Chem.* – 1974. – V. 46. – Is. 11. – P. 1384–1393. – DOI: 10.1021/ac60347a052.
67. Jandera P., Churáček J. Gradient elution in liquid chromatography. I. The influence of the composition of the mobile phase on the capacity ratio (retention volume, band width, and resolution) in isocratic elution – theoretical considerations // *J. Chromatogr. A.* – 1974. – V. 91. – P. 207–221. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)97901-4.
68. Snyder L.R., Poppe H. Mechanism of solute retention in liquid–solid chromatography and the role of the mobile phase in affecting separation: Competition versus “sorption.” // *J. Chromatogr. A.* – 1980. – V. 184. – Is. 4. – P. 363–413. – DOI: 10.1016/S0021-9673(00)93872-X.

69. Wu J.Y., Bicker W., Lindner W. Separation properties of novel and commercial polar stationary phases in hydrophilic interaction and reversed-phase liquid chromatography mode // J. Sep. Sci. – 2008. – V. 31. – Is. 9. – P. 1493–1500. – DOI: 10.1002/jssc.200800017.
70. Jandera P., Hájek T. Utilization of dual retention mechanism on columns with bonded PEG and diol stationary phases for adjusting the separation selectivity of phenolic and flavone natural antioxidants // J. Sep. Sci. – 2009. – V. 32. – Is. 21. – P. 3603–3619. DOI: 10.1002/JSSC.200900344.
71. Snyder L.R., Dolan J.W., Gant J.R. Gradient elution in high-performance liquid chromatography. I. Theoretical basis for reversed-phase systems // J. Chromatogr. A. – 1979. – V. 165. – Is. 1. – P. 3–30. – DOI: 10.1016/S0021-9673(00)85726-X.
72. Jandera P., Churáček J., Svoboda L. Gradient elution in liquid chromatography. X. Retention characteristics in reversed-phase gradient elution chromatography // J. Chromatogr. A. – 1974. – V. 91. – P. 223–235. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)87035-1.
73. Hemmler D., Heinzmann S.S., Wöhr K., Schmitt-Kopplin P., Witting M. Tandem HILIC–RP liquid chromatography for increased polarity coverage in food analysis // Electrophoresis. – 2018. – V. 39. – Is. 13. – P. 1645–1653. doi:10.1002/elps.201800038.
74. Arena K., Cacciola F., Miceli N., Taviano M. F., Cavò E., Murphy R. E., Dugo P., Mondello L. Determination of the polyphenolic content of berry juices using focusing-modulated comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry detection // Anal. Bioanal. Chem. – 2022. – doi:10.1007/s00216-022-04216-y.
75. Willemse C.M., Stander M.A., Vestner J., Tredoux A.G.J., De Villiers A. Comprehensive two-dimensional hydrophilic interaction chromatography × reversed-phase liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry analysis of anthocyanins and derived pigments in red wine // Anal. Chem. – 2015. – V. 87. – Is. 24. – P. 12006–12015. – DOI: 10.1021/acs.analchem.5b03615.
76. Jost U., Habedank F. Two-dimensional hydrophilic interaction and reversed phase liquid chromatography easily extracted pesticides and polar pesticides multi-residue method — A concept // J. Chromatogr. A. – 2020. – V. 1621. – P. 461040. DOI: 10.1016/J.CHROMA.2020.461040.
77. Chapel S., Rouvière F., Guillaume D., Heinisch S. Reversed HILIC gradient: a powerful strategy for on-line comprehensive 2D-LC // Molecules. – 2023. – V. 28. – Is. 9. – Article 3907. doi:10.3390/molecules28093907.
78. Pérez-Cova M., Tauler R., Jaumot J. Two-Dimensional Liquid Chromatography in Metabolomics and Lipidomics // Neuromethods. – Springer, 2021. – P. 25–47. – DOI: 10.1007/978-1-0716-0864-7_3.

79. Liu X., Pohl C.A. HILIC behavior of a reversed-phase/cation-exchange/anion-exchange trimode column // *J. Sep. Sci.* – 2010. – V. 33. – Is. 6–7. – P. 779–786. DOI: 10.1002/jssc.200900645.
80. Patrushev Y. V., Sotnikova Y.S., Sidel'nikov V.N. A monolithic column with a sorbent based on 1-vinyl-1,2,4-triazole for hydrophilic HPLC // *Prot. Met. Phys. Chem. Surf.* – 2020. – V. 56. – Is. 1. – P. 49–53. DOI: 10.1134/S2070205119060248.
81. Patrushev Y., Sotnikova Y., Sidelnikov V. Dead volume determination of the HPLC monolithic rod columns with organic sorbents // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* – 2019. – V. 42. – Is. 17–18. – P. 575–581. DOI: 10.1080/10826076.2019.1642917.
82. Li K., Naviaux J.C., Bright A.T., Wang L., Naviaux R.K. A robust, single-injection method for targeted, broad-spectrum plasma metabolomics // *Metabolomics.* – 2017. – V. 13. – P. 122. DOI: 10.1007/s11306-017-1264-1.
83. Sheridan M., Ogretmen B. The role of ceramide metabolism and signaling in the regulation of mitophagy and cancer therapy // *Cancers (Basel).* – 2021. – V. 13. – Is. 10. – P. 2475. – DOI: 10.3390/cancers13102475.
84. Liu Y., He N., Lu Y., Li W., He X., Li Z., Chen Z. A benzenesulfonic acid-modified organic polymer monolithic column with reversed-phase/hydrophilic bifunctional selectivity for capillary electrochromatography // *J. Pharm. Anal.* – 2023. – V. 13. – Is. 2. – P. 209–215. DOI: 10.1016/J.JPHA.2022.10.006.
85. Yuan M., Breitkopf S.B., Yang X., Asara J.M. A positive/negative ion-switching, targeted mass spectrometry-based metabolomics platform for bodily fluids, cells, and fresh and fixed tissue // *Nat. Protoc.* – 2012. – V. 7. – Is. 5. – P. 872–881. – DOI: 10.1038/nprot.2012.024.
86. Rogachev A.D., Alemasov N.A., Ivanisenko V.A., Ivanisenko N.V., Gaisler E.V., Oleshko O.S., Cheresiz S.V., Mishinov S.V., Stupak V.V., Pokrovsky A.G. Correlation of Metabolic Profiles of Plasma and Cerebrospinal Fluid of High-Grade Glioma Patients // *Metabolites.* – 2021. – V. 11. – Is. 3. – P. 133. – DOI: 10.3390/metabo11030133.
87. Ivanisenko V.A., Gaisler E.V., Basov N.V., Rogachev A.D., Cheresiz S.V., Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Mishchenko E.L., Khripko O.P., Khripko Yu.I., Voevoda S.M., Karpenko T.N., Velichko A.J., Voevoda M.I., Kolchanov N.A., Pokrovsky A.G. Plasma metabolomics and gene regulatory networks analysis reveal the role of nonstructural SARS-CoV-2 viral proteins in metabolic dysregulation in COVID-19 patients // *Sci. Rep.* – 2022. – V. 12. – Is. 1. – P. 19977. DOI: 10.1038/s41598-022-24170-0.
88. Virgiliou C., Gika H.G., Witting M., Bletsou A.A., Athanasiadis A., Zafrakas M., Thomaidis N.S., Raikos N., Makrydimas G., Theodoridis G.A. Amniotic fluid and maternal serum

- metabolic signatures in the second trimester associated with preterm delivery // *J. Proteome Res.* – 2017. – V. 16. – Is. 2. – P. 898–910. – DOI: 10.1021/acs.jproteome.6b00845.
89. Bonte R., Bongaerts M., Demirdas S., Langendonk J. G., Huidekoper H. H., Williams M., Onkenhout W., Jacobs E. H., Blom H. J., Ruijter G. J. G. Untargeted metabolomics-based screening method for inborn errors of metabolism using semi-automatic sample preparation with an UHPLC–Orbitrap-MS platform // *Metabolites.* – 2019. – V. 9. – Is. 12. – P. 289. doi:10.3390/metabo9120289.
90. Witting M., Böcker S. Current status of retention time prediction in metabolite identification // *J. Sep. Sci.* – 2020. – V. 43. – Is. 9–10. – P. 1746–1754. – DOI: 10.1002/jssc.202000060.
91. Kafeenah H.I.S., Osman R., Bakar N.K.A. Effect of mobile phase pH on the electrospray ionization efficiency and qualitative analysis of pharmaceuticals in ESI+ LC-MS/MS // *J. Chromatogr. Sci.* – 2019. – V. 57. – Is. 9. – P. 847–854. DOI: 10.1093/chromsci/bmz061.
92. Chambers E., Wagrowski-Diehl D. M., Lu Z., Mazzeo J. R. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2007. – V. 852. – Is. 1–2. – P. 22–34. doi:10.1016/j.jchromb.2006.12.030.
93. Matuszewski B. K., Constanzer M. L., Chavez-Eng C. M. Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: A method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations // *Anal. Chem.* – 1998. – V. 70. – Is. 5. – P. 882–889.
94. Nakatani K., Izumi Y., Takahashi M., Bamba T. Unified-Hydrophilic-Interaction/Anion-Exchange Liquid Chromatography Mass Spectrometry (Unified-HILIC/AEX/MS): A Single-Run Method for Comprehensive and Simultaneous Analysis of Polar Metabolome // *Anal. Chem.* – 2022. – V. 94. – Is. 48. – P. 16877–16886. DOI: 10.1021/acs.analchem.2c03986.
95. Liu Y., He N., Lu Y., Li W., He X., Li Z., Chen Z. A benzenesulfonic acid-modified organic polymer monolithic column with reversed-phase/hydrophilic bifunctional selectivity for capillary electrochromatography // *J. Pharm. Anal.* – 2023. – V. 13. – Is. 2. – P. 209–215. DOI: 10.1016/J.JPHA.2022.10.006.
96. Jandera P., Hájek T., Škeříková V., Soukup J. Dual hydrophilic interaction–RP retention mechanism on polar columns: structural correlations and implementation for 2-D separations on a single column // *J. Sep. Sci.* – 2010. – V. 33. – Is. 6–7. – P. 841–852. DOI: 10.1002/JSSC.200900678.
97. McCalley D.V. Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2017. – V. 1523. – P. 49–71. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.06.026.

98. Williams J. P., Brown S.L., Georges G.E., Hauer-Jensen M., Hill R.P., Huser A.K., Kirsch D.G., Macvittie T.J., Mason K.A., Medhora M.M., Moulder J.E., Okunieff P., Otterson M.F., Robbins M.E., Smathers J.B., McBride W.H. Animal models for medical countermeasures to radiation exposure // *Radiation research*. – 2010. – V. 173. – Is. 4. – P. 557-578. – DOI: 10.1667/RR1880.1
99. Hoshino J., Schluter U., Kr H. Nicotinamide methylation and its relation to NAD synthesis in rat liver tissue culture: biochemical basis for the physiological activities of 1-methylnicotinamide // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. – 1984. – V. 798. – Is. 1. – P. 10–15. DOI: 10.1016/0304-4165(84)90074-6.
100. Chen C., Brenner D. J., Brown T. R. Identification of urinary biomarkers from X-irradiated mice using NMR spectroscopy // *Radiat. Res.* – 2011. – V. 175. – Is. 5. – P. 622–630. doi:10.1667/RR2388.1.
101. Wang W., Yang C., Wang T., Deng H. Complex roles of nicotinamide N-methyltransferase in cancer progression // *Cell Death Dis.* – 2022. – V. 13. – Is. 3. – P. 267. – DOI: 10.1038/s41419-022-04713-z.
102. Guney Y., Ozel Turkcü U., Hicsonmez A., Nalca Andrieu M., Guney H.Z., Bilgihan A., Kurtman C. Carnosine may reduce lung injury caused by radiation therapy // *Med. Hypotheses*. – 2006. – V. 66. – Is. 5. – P. 957–959. doi:10.1016/j.mehy.2005.11.023.
103. Son D.O., Satsu H., Kiso Y., Shimizu M. Characterization of carnosine uptake and its physiological function in human intestinal epithelial Caco-2 cells // *BioFactors*. – 2004. – V. 21. – Is. 1–4. – P. 395–398. – DOI: 10.1002/biof.552210177.
104. Fujiwara M., Sato N., Okamoto K. Hypoxanthine reduces radiation damage in vascular endothelial cells and mouse skin by enhancing ATP production via the salvage pathway // *Radiation Research*. – 2022. – V. 197. – Is. 6. – P. 583–593. doi:10.1667/RADE-21-00223.1.
105. Xiao X., Hu M., Liu M., Hu J. Z. 1H NMR metabolomics study of spleen from C57BL/6 mice exposed to gamma radiation // *Metabolomics (Los Angel)*. – 2016. – V. 6. – Is 1. – P. 1–11. – DOI: 10.4172/2153-0769.1000165
106. Liu H. и др. Selection of candidate radiation biomarkers in the serum of rats exposed to gamma-rays by GC/TOFMS-based metabolomics // *Radiat. Prot. Dosimetry*. 2013. T. 154, № 1. С. 9–17.
107. Gao X., Sanderson S.M., Dai Z., Reid M.A., Cooper D.E., Lu M., Richie J.P., Ciccarella A., Calcagnotto A., Mikhael P.G., Mentch S.J., Liu J., Ables G., Kirsch D.G., Hsu D.S., Nichenametla S.N., Locasale J.W. Dietary methionine influences therapy in mouse cancer models and alters human metabolism // *Nature*. – 2019. – V. 572. – Is. 7769. – P. 397–401. DOI:10.1038/s41586-019-1437-3.

108. Goudarzi M., Weber W.M., Mak T.D., Chung J., Doyle-Eisele M., Melo D.R., Strawn S.J., Brenner D.J., Guilmette R.A., Fornace A.J. A comprehensive metabolomic investigation in urine of mice exposed to strontium-90 // *Radiat. Res.* – 2015. – V. 183. – Is. 6. – P. 665–674. doi:10.1667/RR14011.1.
109. Goudarzi M., Mak T.D., Chen C., Smilenov L.B., Brenner D.J., Fornace A.J. The effect of low dose rate on metabolomic response to radiation in mice // *Radiat. Environ. Biophys.* – 2014. – V. 53. – Is. 4. – P. 645–657. doi:10.1007/s00411-014-0558-1.
110. Pannkuk E.L., Fornace A.J., Laiakis E.C. Metabolomic applications in radiation biodosimetry: Exploring radiation effects through small molecules // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2017. – V. 93. – Is. 10. – P. 1151–1176. DOI: 10.1080/09553002.2016.1269218.
111. Pannkuk E.L., Laiakis E.C., Authier S., Wong K., Fornace A.J. Targeted metabolomics of nonhuman primate serum after exposure to ionizing radiation: Potential tools for high-throughput biodosimetry // *RSC Adv.* – 2016. – V. 6. – Is. 56. – P. 51192–51202. DOI: 10.1039/c6ra07757a.
112. Maan K., Tyagi R., Dutta A., Bakhshi R., Rana P. Comparative metabolic profiles of total and partial body radiation exposure in mice using an untargeted metabolomics approach // *Metabolomics.* – 2020. – V. 16. – Is. 12. – P. 124. DOI: 10.1007/s11306-020-01742-7.
113. Fragkos K.C., Forbes A. Citrulline as a marker of intestinal function and absorption in clinical settings: A systematic review and meta-analysis // *United European Gastroenterology Journal.* – 2018. – V. 6. – Is. 2. – P. 181–191. doi:10.1177/2050640617737632.
114. Crenn P., Vahedi K., Lavergne-Slove A., Cynober L., Matuchansky C., Messing B. Plasma citrulline: A marker of enterocyte mass in villous atrophy-associated small bowel disease // *Gastroenterology.* – 2003. – V. 124. – Is. 5. – P. 1210–1219. DOI: 10.3390/metabo14100515.
115. Lutgens L.C.H.W., Deutz N., Granzier-Peeters M., Beets-Tan R., De Ruyscher D., Gueulette J., Cleutjens J., Berger M., Wouters B., Von Meyenfeldt M., Lambin P. Plasma citrulline concentration: A surrogate end point for radiation-induced mucosal atrophy of the small bowel. A feasibility study in 23 patients // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2004. – V. 60. – Is. 1. – P. 275–285. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2004.02.052.
116. Ito Y., Kinoshita M., Yamamoto T., Sato T., Obara T., Saitoh D., Seki S., Takahashi Y. A combination of pre- and post-exposure ascorbic acid rescues mice from radiation-induced lethal gastrointestinal damage // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – V. 14. – Is. 10. – P. 19618–19635. DOI: 10.3390/ijms141019618.
117. Vicente E., Vujaskovic Z., Jackson I.L. A systematic review of metabolomic and lipidomic candidates for biomarkers in radiation injury // *Metabolites.* – 2020. – V. 10. – Is. 6. – P. 259. – DOI: 10.3390/metabo10060259.

118. Jones J.W., Tudor G., Bennett A., Farese A.M., Moroni M., Booth C., MacVittie T.J., Kane M.A. Development and validation of a LC-MS/MS assay for quantitation of plasma citrulline for application to animal models of the acute radiation syndrome across multiple species // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2014. – V. 406. – Is. 19. – P. 4663–4675. DOI: 10.1007/s00216-014-7870-0.
119. Jones J.W., Tudor G., Li F., Tong Y., Katz B., Farese A.M., MacVittie T.J., Booth C., Kane M.A. Citrulline as a biomarker in the murine total-body irradiation model: Correlation of circulating and tissue citrulline to small intestine epithelial histopathology // *Health Phys.* – 2015. – V. 109. – Is. 5. – P. 452–465. DOI: 10.1097/HP.0000000000000346.
120. Zhang L.S., Davies S.S. Microbial metabolism of dietary components to bioactive metabolites: Opportunities for new therapeutic interventions // *Genome Med.* – 2016. – V. 8. – Is. 1. – P. 46. – DOI: 10.1186/s13073-016-0296-x.
121. Ghosh S.P., Singh R., Chakraborty K., Kulkarni S., Uppal A., Luo Y., Kaur P., Pathak R., Kumar K.S., Hauer-Jensen M., Cheema A.K. Metabolomic changes in gastrointestinal tissues after whole body radiation in a murine model // *Molecular BioSystems.* – 2013. – V. 9. – Is. 4. – P. 723–731. doi:10.1039/c3mb25454b.
122. Shao L., Luo Y., Zhou D. Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation // *Antioxid. Redox Signal.* – 2014. – V. 20. – Is. 9. – P. 1447–1462. – DOI: 10.1089/ars.2013.5635.
123. Wang Z., Klipfell E., Bennett B.J., Koeth R., Levison B.S., DuGar B., Feldstein A.E., Britt E.B., Fu X., Chung Y.-M., Wu Y., Schauer P., Smith J.D., Allayee H., Tang W.H.W., DiDonato J.A., Lusis A.J., Hazen S.L. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease // *Nature.* – 2011. – V. 472. – Is. 7341. – P. 57–63. – DOI: 10.1038/nature09922.
124. Peghini P.L., Annibale B., Azzoni C., Milione M., Corleto V.D., Gibril F., Venzon D.J., Delle Fave G., Bordi C., Jensen R.T. Effect of chronic hypergastrinemia on human enterochromaffin-like cells: Insights from patients with sporadic gastrinomas // *Gastroenterology.* – 2002. – V. 123. – Is. 1. – P. 68–85. DOI: 10.1053/gast.2002.34231.
125. Mawe G.M., Hoffman J.M. Serotonin signalling in the gut: functions, dysfunctions and therapeutic targets // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* – 2013. – V. 10. – Is. 8. – P. 473–486. DOI: 10.1038/nrgastro.2013.105.
126. Salvo N., Doble B., Khan L., Amirthevasar G., Dennis K., Pasetka M., Deangelis C., Tsao M., Chow E. Prophylaxis of radiation-induced nausea and vomiting using 5-hydroxytryptamine-3 serotonin receptor antagonists: A systematic review of randomized trials // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2012. – V. 82. – Is. 1. – P. 408–417. – DOI: 10.1016/j.ijrobp.2010.08.060.
127. Scarantino C.W., Ornitz R.D., Hoffman L.G., Anderson R.F. On the mechanism of radiation-induced emesis: The role of serotonin // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 1994. – V. 30. – Is. 4. – P. 825–830. – DOI: 10.1016/0360-3016(94)90356-5.

128. Fazzari J., Mersov A., Smith R., Seymour C., Mothersill C. Effect of 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor inhibitors on the radiation-induced bystander effect // *International Journal of Radiation Biology*. – 2012. – V. 88. – Is. 10. – P. 786–790. doi:10.3109/09553002.2012.714519.
129. Pinho C., Wong R., Sur R.K., Hayward J.E., Farrell T.J., Seymour C., Mothersill C. The involvement of serum serotonin levels producing radiation-induced bystander effects for an in vivo assay with fractionated high dose-rate (HDR) brachytherapy // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2012. – V. 88. – Is. 10. – P. 791–797. – DOI: 10.3109/09553002.2012.715794.
130. Rixon R.H., Baird K.M. The Therapeutic Effect of Serotonin on the Survival of X-Irradiated Rats // *Radiat. Res.* – 1968. – V. 33. – Is. 2. – P. 395–402. – DOI: 10.2307/3572490.
131. Brown C. H. Delirium in the cardiac surgical intensive care unit // *Curr. Opin. Anaesthesiol.* – 2015. – V. 27. – Is. 2. – P. 117–122. DOI: 10.1097/ACO.0000000000000061
132. Pisani M.A., Kong S.Y.J., Kasl S.V., Murphy T.E., Araujo K.L.B., Van Ness P.H. Days of delirium are associated with 1-year mortality in an older intensive care unit population // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2009. – V. 180. – Is. 11. – P. 1092–1097. – DOI: 10.1164/rccm.200904-0537OC.
133. Gottesman R.F., Grega M.A., Bailey M.M., Pham L.D., Zeger S.L., Baumgartner W.A., Selnes O.A., McKhann G.M. Delirium after coronary artery bypass graft surgery and late mortality // *Ann. Neurol.* – 2010. – V. 67. – Is. 3. – P. 338–344. doi:10.1002/ana.21899.
134. Morimoto Y., Yoshimura M., Utada K., Setoyama K., Matsumoto M., Sakabe T. Prediction of postoperative delirium after abdominal surgery in the elderly // *J. Anesth.* – 2009. – V. 23. – Is. 1. – P. 51–56. DOI: 10.1007/s00540-008-0688-1.
135. Wimmer-Greinecker G., Matheis G., Brieden M., Dietrich M., Oremek G., Westphal K., Winkelmann B.R., Moritz A. Neuropsychological changes after cardiopulmonary bypass for coronary artery bypass grafting // *Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 1998. – V. 46. – Is. 4. – P. 207–212. – DOI: 10.1055/s-2007-1010226.
137. Tan A.M.Y., Amoako D. Postoperative cognitive dysfunction after cardiac surgery // *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care and Pain*. – 2013. – V. 13. – Is. 6. – P. 218–223. – DOI: 10.1093/bjaceaccp/mkt022.
138. Xiao M.Z., Liu C.X., Zhou L.G., Yang Y., Wang Y. Postoperative delirium, neuroinflammation, and influencing factors of postoperative delirium: A review // *Medicine (Baltimore)*. – 2023. – V. 102. – Is. 8. – P. e32991. – DOI: 10.1097/MD.00000000000032991.
139. Robert C.P., Casella G. *Monte Carlo Statistical Methods*. 2nd ed. — New York: Springer-Verlag, 2004. — 683 p. — (Springer Texts in Statistics). — ISBN 0-387-21239-6. — DOI: 10.1007/978-1-4757-4145-2.

140. Mishra P., Singh U., Pandey C.M., Mishra P., Pandey G. Application of Student's t-test, analysis of variance, and covariance // *Ann. Card. Anaesth.* – 2019. – V. 22. – Is. 4. – P. 407–411. DOI: 10.4103/aca.ACA-94-19.
141. Nachar N. The Mann–Whitney U: A Test for Assessing Whether Two Independent Samples Come from the Same Distribution // *Tutor. Quant. Methods Psychol.* – 2008. – V. 4. – Is. 1. – P. 13–20. DOI: 10.20982/tqmp.04.1.p013.
142. Laiakis E.C., Mak T.D., Anizan S., Amundson S.A., Barker C.A., Wolden S.L., Brenner D.J., Fornace A.J. Development of a metabolomic radiation signature in urine from patients undergoing total body irradiation // *Radiat. Res.* – 2014. – V. 181. – Is. 4. – P. 350–361. DOI: 10.1667/RR13567.1.
143. Bajaj J. S., Fan S., Thacker L. R., Fagan A., Gavis E., White M. B., Heuman D. M., Fuchs M., Fiehn O. Serum and urinary metabolomics and outcomes in cirrhosis // *PLoS One.* – 2019. – V. 14. – Is. 9. – Article e0223061. doi:10.1371/journal.pone.0223061.
144. Ito Y., Uda S., Kokaji T., Hirayama A., Soga T., Suzuki Y., Kuroda S., Kubota H. Comparison of hepatic responses to glucose perturbation between healthy and obese mice based on the edge type of network structures // *Sci. Rep.* – 2023. – V. 13. – P. 4758. DOI: 10.1038/s41598-023-31547-2.
145. Davis T.J., Firzli T.R., Higgins Keppler E.A., Richardson M., Bean H.D. Addressing Missing Data in GC×GC Metabolomics: Identifying Missingness Type and Evaluating the Impact of Imputation Methods on Experimental Replication // *Analytical Chemistry.* – 2022. – V. 94. – Is. 31. – P. 10912-10920. doi:10.1021/acs.analchem.1c04093.
146. Chowdhury S., Mukherjee A., Chakraborti S. A new distribution-free control chart for joint monitoring of unknown location and scale parameters of continuous distributions // *Qual. Reliab. Eng. Int.* – 2014. – V. 30. – Is. 2. – P. 191–204. doi:10.1002/qre.1488.
147. Rutkowska A., Banasik K. The Cucconi test for location-scale alternatives in application to asymmetric hydrological variables // *Commun. Stat. Simul. Comput.* – 2016. – V. 45. – Is. 3. – P. 986–1000. – DOI: 10.1080/03610918.2014.911897.
148. Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing // *J. R. Stat. Soc. Ser. B (Methodol.).* – 1995. – V. 57. – Is. 1. – P. 289–300. doi:10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x.
149. Alka O., Shanthamoorthy P., Witting M., Kleigrew K., Kohlbacher O., Röst H. L. DIAMetAlyzer allows automated false-discovery rate-controlled analysis for data-independent acquisition in metabolomics // *Nat. Commun.* – 2022. – V. 13. – Is. 1. – Article 29006. doi:10.1038/s41467-022-29006-z.

150. Smith C.A., O'Maille G., Want E.J., Qin C., Trauger S.A., Brandon T.R., Custodio D.E., Abagyan R., Siuzdak G. METLIN: A metabolite mass spectral database // *Ther. Drug Monit.* – 2005. – V. 27. – Is. 6. – P. 747–751. – DOI: 10.1097/01.ftd.0000179845.53213.39.
151. Perez-Riverol Y., Alpi E., Wang R., Hermjakob H., Vizcaino J.A. Making proteomics data accessible and reusable: Current state of proteomics databases and repositories // *Proteomics.* – 2015. – V. 15. – Is. 5-6. – P. 930–949. DOI: 10.1002/pmic.201400302.
152. Johnson S.R., Lange B.M. Open-access metabolomics databases for natural product research: Present capabilities and future potential // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2015. – V. 3. – P. 22. DOI: 10.3389/fbioe.2015.00022.
153. Sumner L.W., Amberg A., Barrett D., Beale M.H., Beger R., Daykin C.A., Fan T.W.M., Fiehn O., Goodacre R., Griffin J.L., Hankemeier T., Hardy N., Harnly J., Higashi R., Kopka J., Lane A.N., Lindon J.C., Marriott P., Nicholls A.W., Reily M.D., Thaden J.J., Viant M.R. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis: Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI) // *Metabolomics.* – 2007. – V. 3. – Is. 3. – P. 211–221. – DOI: 10.1007/s11306-007-0082-2.
154. Li D., Liu B., Zheng H., Xiao X., Li Z., Luan E., Li W., Yang Y., Wang Y., Long Q., Song J., Zhang G. XY-Meta: A high-efficiency search engine for large-scale metabolome annotation with accurate FDR estimation // *Anal. Chem.* – 2020. – V. 92. – Is. 8. – P. 5701–5707. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b03355.
155. Scheubert K., Hufsky F., Petras D., Wang M., Nothias L.F., Dührkop K., Bandeira N., Dorrestein P.C., Böcker S. Significance estimation for large scale metabolomics annotations by spectral matching // *Nat. Commun.* – 2017. – V. 8. – P. 1494. – DOI: 10.1038/s41467-017-01318-5.
156. Bauermeister A., Mannocho-Russo H., Costa-Lotufo L. V., Jarmusch A. K., Dorrestein P. C. Mass spectrometry-based metabolomics in microbiome investigations // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2022. – doi:10.1038/s41579-021-00621-9.
157. Miska J., Chandel N.S. Targeting fatty acid metabolism in glioblastoma // *J. Clin. Invest.* – 2023. – V. 133. – Is. 1. – P. e163448. DOI: 10.1172/JCI163448.
158. Parik S., Fernández-García J., Lodi F., De Vlaminck K., Derweduwe M., De Vleeschouwer S., Sciot R., Geens W., Weng L., Bosisio F.M., Bergers G., Duerinck J., De Smet F., Lambrechts D., Van Ginderachter J.A., Fendt S.M. GBM tumors are heterogeneous in their fatty acid metabolism and modulating fatty acid metabolism sensitizes cancer cells derived from recurring GBM tumors to temozolomide // *Front. Oncol.* – 2022. – V. 12. – P. 988872. DOI: 10.3389/fonc.2022.988872.

159. Santos C.R., Schulze A. Lipid metabolism in cancer // *FEBS J.* – 2012. – V. 279. – Is. 15. – P. 2610–2623. – DOI: 10.1111/j.1742-4658.2012.08644.x.
160. Mashimo T., Pichumani K., Vemireddy V., Hatanpaa K.J., Singh D.K., Sirasanagandla S., Nannepaga S., Piccirillo S.G., Kovacs Z., Foong C., Huang Z., Barnett S., Mickey B.E., DeBerardinis R.J., Tu B.P., Maher E.A., Bachoo R.M. Acetate is a bioenergetic substrate for human glioblastoma and brain metastases // *Cell.* – 2014. – V. 159. – Is. 7. – P. 1603–1614. DOI: 10.1016/j.cell.2014.11.025.
161. Comerford S.A., Huang Z., Du X., Wang Y., Cai L., Witkiewicz A.K., Walters H., Tantawy M.N., Fu A., Manning H.C., Horton J.D., Hammer R.E., McKnight S.L., Tu B.P. Acetate dependence of tumors // *Cell.* – 2014. – V. 159. – Is. 7. – P. 1591–1602. DOI: 10.1016/j.cell.2014.11.020.
162. Hunkeler M., Hagmann A., Stutfeld E., Chami M., Guri Y., Stahlberg H., Maier T. Structural basis for regulation of human acetyl-CoA carboxylase // *Nature.* – 2018. – V. 558. – Is. 7710. – P. 470–474. DOI: 10.1038/s41586-018-0201-4.
163. Sul H.S., Smith S. Fatty acid synthesis in eukaryotes // *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes.* – 2008. – P. 121–145. – DOI: 10.1016/B978-044453219-0.50008-8.
164. Wakil S.J., Stoops J.K., Joshi V.C.. Fatty acid synthesis and its regulation // *Annu Rev Biochem.* – 1983. – V. 52. – P. 537–679. – DOI: 10.1146/annurev.bi.52.070183.002541.
165. Pike L.S., Smift A.L., Croteau N.J., Ferrick D.A., Wu M. Inhibition of fatty acid oxidation by etomoxir impairs NADPH production and increases reactive oxygen species resulting in ATP depletion and cell death in human glioblastoma cells // *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* – 2011. – V. 1807. – Is. 6. – P. 726–734. DOI: 10.1016/j.bbabbio.2010.10.022.
166. Pizer E.S., Thupari J., Han W.F., Pinn M.L., Chrest F.J., Frehywot G.L., Townsend C.A., Kuhajda F.P. Malonyl-coenzyme-A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts // *Cancer Res.* – 2000. – V. 60. – Is. 2. – P. 213–218.
167. Chan B., Manley J., Lee J., Singh S. R. The emerging roles of microRNAs in cancer metabolism // *Cancer Lett.* – 2015. – V. 356. – Is. 2. – P. 301–308. doi:10.1016/j.canlet.2014.10.011.
168. Poli M., Derosas M., Lusciati S., Cavadini P., Campanella A., Verardi R., Finazzi D., Arosio P. Pantothenate kinase-2 (Pank2) silencing causes cell growth reduction, cell-specific ferroportin upregulation and iron deregulation // *Neurobiol. Dis.* – 2010. – V. 39. – Is. 2. – P. 204–210. – DOI: 10.1016/J.NBD.2010.04.009.

169. Wilfred B.R., Wang W.X., Nelson P.T. Energizing miRNA research: A review of the role of miRNAs in lipid metabolism, with a prediction that miR-103/107 regulates human metabolic pathways // *Mol. Genet. Metab.* – 2007. – V. 91. – Is. 3. – P. 209–217. – DOI: 10.1016/j.ymgme.2007.03.011.
170. Chen L. P., Zhang N. N., Ren X. Q., He J., Li Y. miR-103/miR-195/miR-15b regulate SALL4 and inhibit proliferation and migration in glioma // *Molecules.* – 2018. – V. 23. – Is. 11. – P. 2938. doi:10.3390/molecules23112938.
171. Chen L., Li Z. Y., Xu S. Y., Zhang X. J., Zhang Y., Luo K., Li W. P. Upregulation of miR-107 inhibits glioma angiogenesis and VEGF expression // *Cell. Mol. Neurobiol.* – 2016. – V. 36. – Is. 1. – P. 113–120. doi:10.1007/s10571-015-0225-3.
172. Riboni L., Campanella R., Bassi R., Villani R., Gaini S.M., Martinelli-Boneschi F., Viani P., Tettamanti G. Ceramide levels are inversely associated with malignant progression of human glial tumors // *Glia.* – 2002. – V. 39. – Is. 2. – P. 105–113. – DOI: 10.1002/glia.10087.
173. Haimovitz-Friedman A., Kan C.C., Ehleiter D., Persaud R.S., McLoughlin M., Fuks Z., Kolesnick R.N. Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis // *J. Exp. Med.* – 1994. – V. 180. – Is. 2. – P. 525–535. doi:10.1084/jem.180.2.525.
174. Kornhuber J., Tripal P., Reichel M., Mühle C., Rhein C., Muehlbacher M., Groemer T.W., Gulbins E. Functional inhibitors of acid sphingomyelinase (FIASMAS): A novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2010. – V. 25. – Is. 1. – P. 9–20. DOI: 10.1159/000315101.
175. Naser E., Kadow S., Schumacher F., Mohamed Z.H., Kappe C., Hessler G., Pollmeier B., Kleuser B., Arenz C., Becker K.A., Gulbins E., Carpinteiro A. Characterization of the small molecule ARC39, a direct and specific inhibitor of acid sphingomyelinase in vitro // *J. Lipid Res.* – 2020. – V. 61. – Is. 6. – P. 896–910. DOI: 10.1194/jlr.ra120000682.
176. Prause K., Naseri G., Schumacher F., Kappe C., Kleuser B., Arenz C. A photocaged inhibitor of acid sphingomyelinase // *Chem. Commun.* – 2020. – V. 56. – Is. 94. – P. 14885–14888. – DOI: 10.1039/d0cc06661c.
177. Clarke C.J., Cloessner E.A., Roddy P.L., Hannun Y.A.. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2) is the primary neutral sphingomyelinase isoform activated by tumour necrosis factor- α in MCF-7 cells // *Biochem J.* – 2011. – V. 435. – Is. 2. – P. 381–390. – DOI: 10.1042/BJ20101752.
178. Lin M., Liao W., Dong M., Zhu R., Xiao J., Sun T., Chen Z., Wu B., Jin J. Exosomal neutral sphingomyelinase 1 suppresses hepatocellular carcinoma via decreasing the ratio of sphingomyelin/ceramide // *FEBS J.* – 2018. – V. 285. – Is. 20. – P. 3835–3848. DOI: 10.1111/febs.14635.

179. Chen Y., Cao Y. The sphingomyelin synthase family: proteins, diseases, and inhibitors // *Biol. Chem.* – 2017. – V. 398. – Is. 12. – P. 1319–1327. **DOI:**10.1515/hsz-2017-0148.
180. Gulbins A., Schumacher F., Becker K.A., Wilker B., Soddemann M., Boldrin F., Müller C.P., Edwards M.J., Goodman M., Caldwell C.C., Kleuser B., Kornhuber J., Szabo I., Gulbins E. Antidepressants act by inducing autophagy controlled by sphingomyelin–ceramide // *Mol. Psychiatry.* – 2018. – V. 23. – Is. 12. – P. 2324–2346. doi:10.1038/s41380-018-0090-9.
181. Zheng K., Chen Z., Feng H., Chen Y., Zhang C., Yu J., Luo Y., Zhao L., Jiang X., Shi F. Sphingomyelin synthase 2 promotes an aggressive breast cancer phenotype by disrupting the homeostasis of ceramide and sphingomyelin // *Cell Death Dis.* – 2019. – V. 10. – Is. 3. – P. 157. – DOI: 10.1038/s41419-019-1303-0.
182. Deng Y., Hu J.-C., He S.-H., Lou B., Ding T.-B., Yang J.-T., Mo M.-G., Ye D.-Y., Zhou L., Jiang X.-C., Yu K., Dong J.-B. Sphingomyelin synthase 2 facilitates M2-like macrophage polarization and tumor progression in a mouse model of triple-negative breast cancer // *Acta Pharmacologica Sinica.* – 2021. – V. 42. – Is. 1. – P. 149–159. doi:10.1038/s41401-020-0419-1.
183. Bilal F., Montfort A., Gilhodes J., Garcia V., Riond J., Carpentier S., Filleron T., Colacios C., Levade T., Daher A., Meyer N., Andrieu-Abadie N., Ségui B. Sphingomyelin synthase 1 (SMS1) downregulation is associated with sphingolipid reprogramming and a worse prognosis in melanoma // *Front. Pharmacol.* – 2019. – V. 10. – Article 443. doi:10.3389/fphar.2019.00443.
184. Hannun Y.A., Obeid L.M. Principles of bioactive lipid signalling: Lessons from sphingolipids // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2008. – V. 9. – Is. 2. – P. 139–150. doi:10.1038/nrm2329.
185. Glaros E.N., Kim W.S., Wu B.J., Suarna C., Quinn C.M., Rye K.A., Stocker R., Jessup W., Garner B. Inhibition of atherosclerosis by the serine palmitoyl transferase inhibitor myriocin is associated with reduced plasma glycosphingolipid concentration // *Biochem. Pharmacol.* – 2007. – V. 73. – Is. 9. – P. 1340–1346. doi:10.1016/j.bcp.2006.12.023.
186. Ogretmen B. Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy // *Nat. Rev. Cancer.* – 2017. – V. 18. – Is. 1. – P. 33–50. DOI: 10.1038/nrc.2017.96.
187. Lee Y.S., Choi K.M., Choi M.H., Ji S.Y., Lee S., Sin D.M., Oh K.W., Lee Y.M., Hong J.T., Yun Y.P., Yoo H.S. Serine palmitoyltransferase inhibitor myriocin induces growth inhibition of B16F10 melanoma cells through G2/M phase arrest // *Cell Prolif.* – 2011. – V. 44. – Is. 4. – P. 320–329. DOI: 10.1111/j.1365-2184.2011.00761.x.
188. Sano O., Kazetani K.I., Adachi R., Kurasawa O., Kawamoto T., Iwata H. Using a biologically annotated library to analyze the anticancer mechanism of serine palmitoyl transferase (SPT) inhibitors // *FEBS Open Bio.* – 2017. – V. 7. – Is. 4. – P. 495–503. – DOI: 10.1002/2211-5463.12196.

189. Bernhart E., Damm S., Wintersperger A., Nussold C., Brunner A. M., Plastira I., Rechberger G., Reicher H., Wadsack C., Zimmer A., Malle E., Sattler W. Interference with distinct steps of sphingolipid synthesis and signaling attenuates proliferation of U87MG glioma cells // *Biochem. Pharmacol.* – 2015. – V. 96. – Is. 2. – P. 154–164. doi:10.1016/j.bcp.2015.05.007.
190. Maurer B.J., Metelitsa L.S., Seeger R.C., Cabot M.C., Reynolds C.P. Increase of ceramide and induction of mixed apoptosis/necrosis by N-(4-hydroxyphenyl)-retinamide in neuroblastoma cell lines // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1999. – V. 91. – Is. 13. – P. 1138–1146. DOI: 10.1093/jnci/91.13.1138.
191. Wang Z., Wen L., Zhu F., Wang Y., Xie Q., Chen Z., Li Y. Overexpression of ceramide synthase 1 increases C18-ceramide and leads to lethal autophagy in human glioma // *Oncotarget.* – 2017. – V. 8. – Is. 61. – P. X–X. – DOI: 10.18632/oncotarget.21955.
192. Moro K., Nagahashi M., Gabriel E., Takabe K., Wakai T. Clinical application of ceramide in cancer treatment // *Breast Cancer.* – 2019. – V. 26. – Is. 4. – P. 407–415. DOI: 10.1007/s12282-019-00953-8.
193. Turner N., Lim X.Y., Toop H.D., Osborne B., Brandon A.E., Taylor E.N., Fiveash C.E., Govindaraju H., Teo J.D., McEwen H.P., Couttas T.A., Butler S.M., Das A., Kowalski G.M., Bruce C.R., Hoehn K.L., Fath T., Schmitz-Peiffer C., Cooney G.J., Montgomery M.K., Morris J.C., Don A.S. A selective inhibitor of ceramide synthase 1 reveals a novel role in fat metabolism // *Nat. Commun.* – 2018. – V. 9. – Is. 1. – P. 3165. – DOI: 10.1038/s41467-018-05613-7.
194. Schiffmann S., Hartmann D., Fuchs S., Birod K., Ferreirs N., Schreiber Y., Zivkovic A., Geisslinger G., Grösch S., Stark H. Inhibitors of specific ceramide synthases // *Biochimie.* – 2012. – V. 94. – Is. 2. – P. 558–565. – DOI: 10.1016/j.biochi.2011.09.007.
195. Kravka J.M., Li L., Szulc Z.M., Bielawski J., Ogretmen B., Hannun Y.A., Obeid L.M., Bielawska A. Involvement of dihydroceramide desaturase in cell cycle progression in human neuroblastoma cells // *J. Biol. Chem.* – 2007. – V. 282. – Is. 23. – P. 16718–16728. DOI: 10.1074/jbc.M700647200.196. Signorelli P. и др. Dihydroceramide intracellular increase in response to resveratrol treatment mediates autophagy in gastric cancer cells // *Cancer Lett.* 2009. T. 282, № 2.
197. Hernández-Tiedra S., Fabriàs G., Dávila D., Salanueva Í.J., Casas J., Montes L.R., Antón Z., García-Taboada E., Salazar-Roa M., Lorente M., Nylandsted J., Armstrong J., López-Valero I., McKee C.S., Serrano-Puebla A., García-López R., González-Martínez J., Abad J.L., Hanada K., Boya P., Goñi F., Guzmán M., Lovat P., Jäättelä M., Alonso A., Velasco G. Dihydroceramide accumulation mediates cytotoxic autophagy of cancer cells via autolysosome destabilization // *Autophagy.* – 2016. – V. 12. – Is. 11. – P. 2213–2229. doi:10.1080/15548627.2016.1213927.

198. Kitatani K., Idkowiak-Baldys J., Hannun Y.A. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling // *Cell Signal.* – 2008. – V. 20. – Is. 6. – P. 1010–1018. DOI: 10.1016/j.cellsig.2007.12.006.
199. Madigan J.P., Robey R.W., Poprawski J.E., Huang H., Clarke C.J., Gottesman M.M., Cabot M.C., Rosenberg D.W. A role for ceramide glycosylation in resistance to oxaliplatin in colorectal cancer // *Exp. Cell Res.* – 2020. – V. 388. – Is. 2. – P. 111860. DOI: 10.1016/j.yexcr.2020.111860.
200. Lai M., La Rocca V., Amato R., Freer G., Costa M., Spezia P.G., Quaranta P., Lombardo G., Piomelli D., Pistello M. Ablation of acid ceramidase impairs autophagy and mitochondria activity in melanoma cells // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – V. 22. – Is. 6. – P. 3247. DOI: 10.3390/ijms22063247.
201. Zhang S., Huang P., Dai H., Li Q., Hu L., Peng J., Jiang S., Xu Y., Wu Z., Nie H., Zhang Z., Yin W., Zhang X., Lu J. TIMELESS regulates sphingolipid metabolism and tumor cell growth through Sp1/ACER2/S1P axis in ER-positive breast cancer // *Cell Death Dis.* – 2020. – V. 11. – Is. 10. – P. 892. – DOI: 10.1038/s41419-020-03106-4.
202. Steiner R., Saied E.M., Othman A., Arenz C., Maccarone A.T., Poad B.L.J., Blanksby S.J., Von Eckardstein A., Hornemann T. Elucidating the chemical structure of native 1-deoxysphingosine // *J. Lipid Res.* – 2016. – V. 57. – Is. 7. – P. 1194–1203. – DOI: 10.1194/jlr.M067033.
203. Schönberger K., Mitterer M., Glaser K., Stecher M., Hobitz S., Schain-Zota D., Schuldes K., Lämmermann T., Rambold A.S., Cabezas-Wallscheid N., Buescher J.M. LC-MS-Based Targeted Metabolomics for FACS-Purified Rare Cells // *Anal. Chem.* – 2023. – V. 95. – Is. 9. – P. 4325–4334. – DOI: 10.1021/acs.analchem.2c04396.
204. Bi H., Krausz K. W., Manna S. K., Li F., Johnson C. H., Gonzalez F. J. Optimization of harvesting, extraction, and analytical protocols for UPLC-ESI-MS-based metabolomic analysis of adherent mammalian cancer cells // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2013. – V. 405. – Is. 15. – P. 5279–5289. doi:10.1007/s00216-013-6927-9.
205. Wahrheit J., Niklas J., Heinzle E. Evaluation of sampling and quenching procedures for the analysis of intracellular metabolites in CHO suspension cells // *BMC Proc.* – 2011. – V. 5. – Suppl. 8. – P. P82. – DOI: 10.1186/1753-6561-5-S8-P82.
206. Dettmer K., Nürnberger N., Kaspar H., Gruber M.A., Almstetter M.F., Oefner P.J. Metabolite extraction from adherently growing mammalian cells for metabolomics studies: Optimization of harvesting and extraction protocols // *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* – 2011. – V. 399. – Is. 3. – P. 1127–1139. doi:10.1007/s00216-010-4425-x.

207. Haynes C.A., Allegood J.C., Sims K., Wang E.W., Sullards M.C., Merrill A.H. Quantitation of fatty acyl-coenzyme As in mammalian cells by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry // *J. Lipid Res.* – 2008. – V. 49. – Is. 5. – P. 1113–1125. doi:10.1194/jlr.D800001-JLR200.
208. Ruiz-Aracama A., Peijnenburg A., Kleinjans J., Jennen D., van Delft J., Hellfrisch C., Lommen A. An untargeted multi-technique metabolomics approach to studying intracellular metabolites of HepG2 cells exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin // *BMC Genomics.* – 2011. – V. 12. – Is. 1. – P. 251. – DOI: 10.1186/1471-2164-12-251.
209. Kořínek M., Šístek V., Mládková J., Mikeš P., Jiráček J., Selicharová I. Quantification of homocysteine-related metabolites and the role of betaine-homocysteine S-methyltransferase in HepG2 cells // *Biomed. Chromatogr.* – 2013. – V. 27. – Is. 1. – P. 111–121. DOI: 10.1002/bmc.2755.
210. Butler M., Spearman M. Cell counting and viability measurements // *Methods Mol. Biol.* – 2007. – V. 407. – P. 83–102. doi:10.1007/978-1-59745-399-8_8.
211. Wu Y., Li L. Sample normalization methods in quantitative metabolomics // *J. Chromatogr. A.* – 2016. – V. 1430. – P. 80–95. – DOI: 10.1016/J.CHROMA.2015.12.007.
212. Oliva C., Arias A., Ruiz M., Pujol A., Garrabou G., Canto-Santos J., Urreizti R., Castilla-Vallmanya L., Rodriguez-Gonzalez H., Jou C., Casado M., Ormazabal A., Artuch R. Fibroblast phenylalanine concentration as a surrogate biomarker of cellular number // *J. Chromatogr. B.* – 2023. – V. 1226. – P. 123787. DOI: 10.1016/j.jchromb.2023.123787.
213. Muschet C., Möller G., Prehn C., de Angelis M.H., Adamski J., Tokarz J. Removing the bottlenecks of cell culture metabolomics: fast normalization procedure, correlation of metabolites to cell number, and impact of the cell harvesting method // *Metabolomics.* – 2016. – V. 12. – Is. 10. – P. 151. DOI: 10.1007/s11306-016-1104-8.
214. Silva L.P., Lorenzi P.L., Purwaha P., Yong V., Hawke D.H., Weinstein J.N. Measurement of DNA concentration as a normalization strategy for metabolomic data from adherent cell lines // *Anal. Chem.* – 2013. – V. 85. – Is. 20. – P. 9536–9542. – DOI: 10.1021/ac401559v.
215. Cao B., Aa J., Wang G., Wu X., Liu L., Li M., Shi J., Wang X., Zhao C., Zheng T., Guo S., Duan J. GC-TOFMS analysis of metabolites in adherent MDCK cells and a novel strategy for identifying intracellular metabolic markers for use as cell amount indicators in data normalization // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2011. – V. 400. – Is. 9. – P. 2983–2993. doi:10.1007/s00216-011-4981-8.
216. McBirney S.E., Trinh K., Wong-Beringer A., Armani A.M. Using wavelength-normalized optical spectroscopy to improve the accuracy of bacteria growth rate quantification // *Proc. SPIE.* – 2017. – V. 10068. – P. 133–138. DOI: 10.1117/12.2248537.

217. Watanabe, M., Maekawa, M., Miyoshi, K., Sato, T., Sato, Y., Kumondai, M., Fukasawa M., Mano, N. Global and targeted metabolomics for revealing metabolomic alteration in Niemann–Pick disease type C model cells // *Metabolites*. – 2024. – V. 14. – Is. 10. – P. 515. DOI: 10.3390/metabo14100515.
218. Kontiza A., von Gerichten J., Spick M., Fraser E., Costa C., Saunders K.D.G., Whetton A.D., Newman C.F., Bailey M.J. Single-cell lipidomics: protocol development for reliable cellular profiling using capillary sampling // *Analyst*. – 2025. – V. 150. – Is. 7. – P. 1261–1270. DOI: 10.1039/D5AN00037H.
219. Petrova B., Guler A.T. Recent developments in single-cell metabolomics by mass spectrometry—A perspective // *J. Proteome Res.* – 2025. – V. 24. – Is. 4. – P. 1493–1518. DOI: 10.1021/acs.jproteome.4c00646.
220. Yao M., Vaithyanathan M., Allbritton N.L. Analytical techniques for single-cell biochemical assays of lipids // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* – 2023. – V. 25. – Is. 1. – P. 281–309. – DOI: 10.1146/annurev-bioeng-110220-034007.
221. Wu J.R., Hsu J.H., Dai Z.K., Wu B.N., Chen I.J., Liou S.F., Yeh J.L. Activation of endothelial NO synthase by a xanthine derivative ameliorates hypoxia-induced apoptosis in endothelial progenitor cells // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2016. – V. 68. – Is. 6. – P. 772–779. – DOI: 10.1111/jphp.12555.
222. Pedley A.M., Benkovic S.J. A new view into the regulation of purine metabolism: The purinosome // *Trends Biochem. Sci.* – 2017. – V. 42. – Is. 2. – P. 141–154. DOI: 10.1016/j.tibs.2016.09.009.
223. Mullen A.R., Wheaton W.W., Jin E.S., Chen P.H., Sullivan L.B., Cheng T., Yang Y., Linehan W.M., Chandel N.S., DeBerardinis R.J. Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria // *Nature*. – 2012. – V. 481. – Is. 7381. – P. 385– 388. DOI: 10.1038/nature10642.
224. Senkal C.E., Salama M.F., Snider A.J., Allopenna J.J., Rana N.A., Koller A., Hannun Y.A., Obeid L.M. Ceramide Is Metabolized to Acylceramide and Stored in Lipid Droplets // *Cell Metab.* – 2017. – V. 25. – Is. 3. – P. 686– 697. – DOI: 10.1016/j.cmet.2017.02.010.
225. El Bawab S., Roddy P., Qian T., Bielawska A., Lemasters J.J., Hannun Y.A. Molecular cloning and characterization of a human mitochondrial ceramidase // *Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – V. 275. – Is. 28. – P. 21508–21513. doi:10.1074/jbc.M002522200.
226. Le Pogam P., Le Page Y., Habauzit D., Doué M., Zhadobov M., Sauleau R., Le Dréan Y., Rondeau D. Untargeted metabolomics unveil alterations of biomembranes permeability in human HaCaT keratinocytes upon 60 GHz millimeter-wave exposure // *Sci. Rep.* – 2019. – V. 9. – P. 9343. DOI: 10.1038/s41598-019-45662-6.

227. Ramundo-Orlando A. Effects of millimeter waves radiation on cell membrane – A brief review // *J. Infrared Millim. Terahertz Waves.* – 2010. – V. 31. – Is. 12. – P. 1400–1411. – DOI: 10.1007/s10762-010-9731-z.
228. Zhadobov M., Sauleau R., Vié V., Himdi M., Le Coq L., Thouroude D. Interactions Between 60-GHz Millimeter Waves and Artificial Biological Membranes: Dependence on Radiation Parameters // *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.* – 2006. – V. 54. – Is. 6. – P. 2534–2542. – DOI: 10.1109/TMTT.2006.875811.
229. Pang Z., Chong J., Zhou G., de Lima Morais D.A., Chang L., Barrette M., Gauthier C., Jacques P.-É., Li S., Xia J. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights // *Nucleic Acids Res.* – 2021. – V. 49. – Is. W1. – P. W388–W396. DOI: 10.1093/nar/gkab382.
230. Bardou P., Mariette J., Escudié F., Djemiel C., Klopp C. jvenn: an interactive Venn diagram viewer // *BMC Bioinformatics.* – 2014. – V. 15. – Is. 1. – P. 293. doi:10.1186/1471-2105-15-293.