

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
"НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ БИМЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ  
ИМЕНИ В.Н. ОРЕХОВИЧА" (ИБМХ)

*на правах рукописи*

**Лохов Петр Генриевич**

**МЕТАБОЛОМ ПЛАЗМЫ КРОВИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ОЦЕНКИ  
РИСКА ВОЗНИКНОВЕНИЯ РАКА ПРОСТАТЫ, РАКА ЛЕГКОГО И  
САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-ГО ТИПА**

**Диссертация**

**на соискание ученой степени доктора биологических наук**

**Специальность 03.01.04 - биохимия**

Научный консультант  
профессор, доктор биологических наук,  
академик РАН  
Арчаков Александр Иванович

Москва – 2015

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b>	<b>6</b>
<b>1. ВВЕДЕНИЕ</b>	<b>10</b>
<b>2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	<b>18</b>
2.1 Метабомика, основные определения, история возникновения	18
2.2 Основные особенности метабомики	21
2.3 Метаболическое профилирование	22
2.4 Метаболический фингерпринтинг	26
2.5 Подходы на основе масс-спектрометрии, применяемые в метабомике	27
2.5.1 Метаболический анализ на основе ВЭЖХ-МС	27
2.5.2 Метаболический анализ на основе ГХ-МС	31
2.5.3 Метаболический анализ на основе КЭ-МС	34
2.5.4 Прямой масс-спектрометрический анализ метаболитов	35
2.6 Анализ метаболомных масс-спектрометрических данных	37
2.7 Идентификация метаболитов	45
2.7.1 Библиотеки масс-спектров для ГХ-МС	45
2.7.2 Библиотеки масс-спектров для ВЭЖХ-МС	46
2.7.3 Стандарт идентификации метаболитов в метаболомных исследованиях	48
2.8 Метаболом крови человека	51
2.9 Липидомика	53
2.10 Метаболомный анализ крови в медицинских исследованиях	61
2.11 Проблематика внедрения "омных" диагностических методов в медицину	65
2.12 Проблема лабораторной диагностики заболеваний	67
2.12.1 Проблема диагностики рака простаты	67
2.12.2 Проблема диагностики и оценки риска возникновения рака легкого	70
2.12.3 Проблема диагностики нарушенной толерантности к глюкозе	73
2.13 Заключение	74

<b>3. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	<b>77</b>
<b>3.1 Образцы плазмы крови и их пробоподготовка</b>	<b>77</b>
3.1.1 Образцы плазмы крови для метаболомного исследования рака простаты	77
3.1.2 Образцы плазмы крови для метаболомного исследования рака легкого	77
3.1.3 Образцы плазмы крови для метаболомного исследования нарушенной толерантности к глюкозе	78
3.1.4 Протокол сбора образцов плазмы крови	78
3.1.5 Пробоподготовка образцов плазмы крови	79
3.1.5.1 Протокол №1 (с депротеинизацией плазмы крови метанолом)	79
3.1.5.2 Протокол №2 (с депротеинизацией плазмы крови ультрафильтрацией)	80
3.1.5.3 Пробоподготовка образцов плазмы крови для метаболомного исследования рака простаты	80
3.1.5.4 Пробоподготовка образцов плазмы крови для метаболомного исследования рака легкого	81
3.1.5.5 Пробоподготовка образцов плазмы крови для метаболомного исследования нарушенной толерантности к глюкозе	81
<b>3.2 Масс-спектрометрический анализ метаболитов плазмы крови</b>	<b>82</b>
3.2.1 Протокол №1. Прямой масс-спектрометрический анализ на квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре	82
3.2.2 Протокол №2. Прямой масс-спектрометрический анализ на масс-спектрометре ион-циклотронного резонанса	82
3.2.3 Протокол №3. Анализ метаболитов методом ВЭЖХ-МС	83
3.2.4 Масс-спектрометрический анализ при метаболомном исследовании рака простаты	83
3.2.5 Масс-спектрометрический анализ при метаболомном исследовании рака легкого	84

3.2.6 Масс-спектрометрический анализ при метаболическом исследовании нарушенной толерантности к глюкозе	85
<b>3.3 Анализ масс-спектрометрических данных</b>	<b>86</b>
3.3.1 Детекция пиков ионов метаболитов алгоритмами Apex, Centroid и Sum Peak	86
3.3.2 Выравнивание масс-спектрометрических пиков	87
3.3.3 Коррекция масс-спектрометрических данных плазмы крови	88
3.3.4 Идентификация метаболитов по масс-спектрометрическим данным	89
3.3.5 Диагностическая модель рака простаты на основе метаболического фингерпринтинга плазмы крови	91
3.3.6 Идентификация метаболических биомаркеров рака простаты	92
3.3.7 Диагностическая модель рака легкого на основе метаболического фингерпринтинга плазмы крови	93
3.3.8 Оценка риска возникновения рака легкого на основе метаболома плазмы крови	94
3.3.9 Диагностика нарушенной толерантности к глюкозе на основе анализа метаболома плазмы крови	95
3.3.10 Масс-спектрометрические сигнатуры заболеваний и расчет диагностических показателей на их основе	96
<b>4. РЕЗУЛЬТАТЫ</b>	<b>98</b>
4.1 Выбор способа пробоподготовки образцов плазмы крови и варианта масс-спектрометрического анализа	98
4.2 Выбор алгоритма детекции масс-спектрометрических пиков ионов метаболитов	104
4.3 Выравнивание масс-спектрометрических данных	107
4.4 Контроль качества образцов плазмы крови и пробоподготовки по масс-спектрометрическим данным	108
4.5 Метаболический фингерпринтинг плазмы крови больных раком простаты	112
4.6 Метаболические биомаркеры рака простаты в плазме крови	119

4.7	Метаболомный анализ плазмы крови пациентов с раком легких	124
4.8	Метаболиты плазмы крови, вносящие вклад в оценку риска возникновения рака легкого	128
4.9	Диагностика нарушенной толерантности к глюкозе по метаболиту плазмы крови	137
4.10	Идентификация метаболитов, вносящих вклад в диагностику нарушенной толерантности к глюкозе	142
4.11	Диагностические сигнатуры плазмы крови	144
<b>5.</b>	<b>ОБСУЖДЕНИЕ</b>	<b>148</b>
5.1	Масс-спектрометрический анализ метаболитов плазмы крови	148
5.2	Выравнивание масс-спектрометрических пиков	148
5.3	Контроль качества образцов плазмы крови и пробоподготовки по масс-спектрометрическим данным	150
5.4	Методология оценки эффективности анализа метаболома плазмы крови для диагностики и оценки риска возникновения заболеваний	152
5.5	Диагностика рака простаты на основе анализа метаболома плазмы крови	152
5.6	Диагностика рака легкого на основе анализа метаболома плазмы крови	154
5.7	Диагностика нарушенной толерантности к глюкозе на основе анализа метаболома плазмы крови	159
5.8	Диагностические сигнатуры плазмы крови	164
<b>6.</b>	<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	<b>168</b>
<b>7.</b>	<b>ВЫВОДЫ</b>	<b>171</b>
	<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>	<b>173</b>
	<b>БЛАГОДАРНОСТИ</b>	<b>227</b>
	<b>ПРИЛОЖЕНИЕ</b>	<b>228</b>

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

Ad	аденокарцинома (Adenocarcinoma)
ANOVA	дисперсионный анализ (ANalysis Of VAriance)
ASCA	дисперсионный анализ с одновременным анализом компонент (ANOVA-simultaneous component analysis)
AUC	площадь под ROC-кривой (Area Under Curve)
BMI	индекс массы тела (Body Mass Index)
CEA	карциноэмбриональный антиген (carcinoembryonic antigen)
CI	доверительный интервал (Confidence Interval)
COSMOS	инициатива по координации стандартов в метаболомике (COordination of Standards in MetabOlomicS)
CV	коэффициент вариации (Coefficient of Variation)
CYFRA	фрагмент цитокератина 19
DIMS	масс-спектрометрия с прямой инъекцией анализируемого материала (Direct Infusion Mass Spectrometry)
EDTA	этилендиаминтетрауксусная кислота
EPA	Агентство по охране окружающей среды США (United States Environmental Protection Agency)
FDA	Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, USA)
HbA1c	гликированный гемоглобин
HMDB	база данных метаболитов человека (Human Metabolome Database)
HMP	Проект по метаболому человека (Human Metabolome Project)
HILIC	хроматография на полярном сорбенте (hydrophilic interaction chromatography)
HOMA-IR	индекс инсулинорезистентности (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance)

HOMA- $\beta$	индекс функциональной активности $\beta$ -клеток поджелудочной железы (Homeostasis Model Assessment of $\beta$ -cell function)
IARC	Международное агентство по изучению рака (International Agency for Research on Cancer)
ICA	метод независимых компонент (Independent Component Analysis)
InChI	международный идентификатор химического вещества (International Chemical Identifier)
IOM	Институт медицины (Institute of Medicine)
LCC	крупноклеточная карцинома (Large Cell Carcinoma)
MRM	мониторинг множественных реакций (Multiple Reaction Monitoring)
MSI	Инициатива по стандартам в метаболомике (Metabolomics Standards Initiative)
Mx	смешанная карцинома
NCI	Национальный институт рака (National Cancer Institute, USA)
NOS	карцинома с неустановленным патогистологическим типом
NSE	нейронспецифическая энлаза (Neuron-specific enolase)
OR	отношение шансов развития заболевания (Odds Ratio)
PCA	метод главных компонент (Principal Component Analysis)
ppm	миллионные доли массы
Q-TOF	гибридный квадруполь-времяпролетный масс-спектрометр
ROC	Receiver Operating Characteristic
SCLC	мелкоклеточная карцинома (Small Cell Lung Cancer)
SMDB	База данных по метаболиту сыворотки крови человека (Serum Metabolome Database)
Sq	сквамозноклеточная карцинома (Squamous cell

	carcinoma)
SVM	метод опорных векторов (Support Vector Machine)
TNM	международная классификация стадий злокачественных новообразований (аббревиатура от Tumor, Nodus и Metastasis)
WHO	Всемирная организация здравоохранения (World Health Organization)
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ВП-МС	времяпролетная масс-спектрометрия
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭЖХ-МС	высокоэффективная жидкостная хроматография, сопряженная с масс-спектрометрической детекцией веществ
ГТТ	глюкозотолерантный тест
ГХ	газовая хроматография
ГХ-МС	газовая хроматография, сопряженная с масс-спектрометрической детекцией веществ
ГХ/ГХ	двухмерная газовая хроматография
ИЦР-МС	масс-спектрометрия ион-циклотронного резонанса
КЭ	капиллярный электрофорез
КЭ-МС	капиллярный электрофорез, сопряженный с масс-спектрометрической детекцией веществ
ЛПВП	липопротеиды высокой плотности
ЛПНП	липопротеиды низкой плотности
МС	масс-спектрометрия
МС-МС	тандемная масс-спектрометрия
МГК	метод главных компонент
МНК	метод независимых компонент
МЧНК	метод частных наименьших квадратов (partial least squares, PLS)

НТГ	нарушенная толерантность к глюкозе
ПСА	простатический специфический антиген
ПГТТ	пероральный глюкозотолерантный тест
СД	сахарный диабет
ТЛМ	терапевтический лекарственный мониторинг
УЭЖХ	ультраэффективная жидкостная хроматография
ФК	фосфатидная кислота
ФХ	фосфатидилхолин
ФЭ	фосфатидилэтаноламин
ЭИИ	электроспрейный источник ионизации
ЯМР	ядерно-магнитный резонанс

## 1. ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы

Рак простаты, рак легкого и сахарный диабет 2-го типа являются социально значимыми заболеваниями (Постановление Правительства Российской Федерации № 1706-р), приносящими ущерб обществу и требующими социальной защиты населения.

Рак легкого является одной из основных причин смерти в России, от которой умирает 27% онкологических больных (Чиссов и соавт., 2013). Основными причинами высокой смертности от данного заболевания являются его бессимптомное или скрытое воспалением течение на ранних стадиях развития. Широко применяемая рентгенологическая диагностика малоэффективна для выявления ранних стадий рака легкого и поэтому существенно не влияет на статистику смертности от данного заболевания (Coleman, 1999). Лабораторная диагностика, основанная на детекции опухолевых маркеров, пригодных для обнаружения рака легкого, характеризуется низкой чувствительностью. Так, по данным Гамбургской Группы по Стандартизации Опухолевых Маркеров чувствительность тестов с использованием карциноэмбрионального антигена (CEA), фрагментов цитокератина 19 (CYFRA) и нейронспецифической энолазы (NSE) составляет всего 58%, 66%, и 59%, соответственно (Maeda et al., 1996; Stieber et al., 1999). Поэтому сегодня удастся диагностировать данное заболевание только на поздних стадиях его развития, когда лечение малоэффективно и более чем 75% пациентов уже не удастся спасти.

От рака простаты в России умирает 6,8% онкологических больных (4-е место в структуре смертности от онкологических заболеваний) (Чиссов и соавт., 2013). Высокие показатели смертности от этого заболевания обусловлены длительным бессимптомным течением болезни, что является причиной позднего обращения больных к врачу, когда прогноз заболевания становится неблагоприятным. Следует отметить, что рак простаты является основной

причиной смерти от онкологических заболеваний в развитых странах (Jemal et al., 2011). Поэтому по мере увеличения средней продолжительности жизни населения актуальность диагностики рака простаты в России будет повышаться. Однако, применяемая лабораторная диагностика данного заболевания, основанная на измерении концентрации простатического специфического антигена (ПСА) в крови пациента, малоэффективна (Lein et al., 2003). Так, ее чувствительность составляет всего 21% (Ankerst and Thompson, 2006), и она дает ложноположительные результаты при простатите и доброкачественной гиперплазии простаты (Nadler et al., 1995).

Сахарный диабет (СД) – группа метаболических заболеваний, при которых пациент имеет устойчиво повышенный уровень глюкозы в крови. В 2011 году по данным Международной диабетической федерации СД имели 366 млн. людей. В России официально зарегистрировано 3 млн. диабетиков, всего же предполагают 9 млн. болеющих диабетом, что делает его самым распространенным эндокринным заболеванием. СД 2-го типа составляет 90% от всех поставленных диагнозов диабета. Сахарному диабету 2-го типа, как правило, предшествует предиабет, которым в развитых странах болеет почти треть взрослого населения (CDC – A Diabetes Report Card 2012). Лабораторная диагностика СД 2-го типа заключается в измерении уровня глюкозы в крови и, что более важно, в выявлении нарушенной толерантности к глюкозе (НТГ), которая может указывать не только на диабет, но и предиабет, развивающийся при нормальном уровне глюкозы в крови. Своевременно выявленный предиабет является основанием для корректировки образа жизни пациента, назначения диеты, что совместно с медикаментозным лечением может предотвратить или отсрочить развитие СД 2-го типа. Однако "золотой стандарт" диагностики НТГ – пероральный глюкозотолерантный тест (ПГТТ) обладает низкой чувствительностью. Только у 56% пациентов при повторном анализе подтверждается предиабет (McDonald et al., 1965). При такой низкой эффективности данный тест не соответствует современным требованиям доказательной медицины, а его повсеместное применение является вынужденной необходимостью при отсутствии альтернативы. Более того, ПГТТ тяжело

переносится пациентами, так как длится 2 часа, в течение которых пациент должен находиться в лежачем положении. При этом для некоторых людей ПГТТ опасен, так как может вызвать гипергликемический шок (Sagel and Colwell, 1973).

Таким образом, сегодня востребованы любые позитивные изменения в области лабораторной диагностики рака легкого, рака простаты и СД 2-го типа, способные повысить эффективность их ранней диагностики. Поэтому исследования современных аналитических технологий, в особенности используемых в "омных" науках, с целью улучшения лабораторной диагностики является целесообразным.

Применяемые в метаболомике аналитические технологии позволяют одновременно регистрировать в биопробе почти всю совокупность метаболитов, открывая тем самым возможность для разработки новых лабораторных методов диагностики (Gowda et al., 2008). Метаболиты формируют молекулярный фенотип организма, так как являются субстратами, интермедиатами или продуктами биохимических реакций. Поэтому в метаболоме, как в "молекулярном зеркале", отражаются все, в том числе и патологические, процессы, проходящие в организме. В случае метаболомного анализа крови это дает исключительные возможности для создания эффективной диагностики многих заболеваний. Таким образом, применение именно метаболомной технологии для решения проблем лабораторной диагностики и оценки риска возникновения таких социально значимых заболеваний, как рак простаты, рак легкого и СД 2-го типа, является наиболее обоснованным и актуальным.

### **Степень разработанности темы**

Технологии, используемые в "омных" науках, позволяют одновременно измерять значительные количества биомолекул, например, геномика исследует тысячи последовательностей ДНК, а протеомика – большие количества белков. Данные технологии успешно использовались многие годы в научном поиске. Сегодня ученые пытаются использовать эти технологии в практических целях,

чтобы создать новые тесты для диагностики заболеваний, оценки риска их возникновения, предсказания ответа пациента на лечение. Данные тесты объединены общим названием – "омные" тесты. Создан соответствующий международный комитет ("Committee on the Review of Omics-Based Tests for Predicting Patient Outcomes in Clinical Trials", Micheel C.M., Nass S.J., Omenn G.S. et al.) по рассмотрению этих тестов, оценке их эффективности и разработке рекомендаций по их внедрению. Однако, являясь мировым трендом в создании новых диагностических методов, сегодня "омные" тесты пока не дошли до стадии практического применения. В особенности это касается рассмотренных в диссертационной работе "омных" тестов на основе метаболомики, самой молодой из "омных" наук.

### **Цель диссертационной работы**

Исследование метаболома плазмы крови в целях ранней диагностики и оценки риска возникновения заболеваний на примере рака простаты, рака легкого и СД 2-го типа.

### **Основные задачи исследования**

1. Получить масс-спектры метаболомов образцов плазмы крови пациентов с раком простаты, раком легкого, нарушенной толерантностью к глюкозе и контрольных субъектов.
2. Построить модели диагностики на основе метаболомных данных и определить параметры (точность, чувствительность и специфичность) диагностики и/или оценки риска возникновения заболевания (OR) для рака простаты, рака легкого и нарушенной толерантности к глюкозе.
3. Идентифицировать метаболиты, вносящие вклад в диагностику и/или оценку риска возникновения заболеваний, и показать их отношение к этиологии и/или развитию заболеваний.

4. Сопоставить характеристики метаболомной диагностики с результатами анализа молекулярных маркеров заболеваний, используемых в клинической практике для тех же заболеваний.
5. Показать возможность реализации выявленного диагностического потенциала прямой масс-спектрометрии метаболитов плазмы крови в лабораторной практике.

### **Научная новизна**

Впервые показана применимость "омного" анализа для диагностики рака простаты, рака легкого и нарушенной толерантности к глюкозе. Описаны ранее неизвестные метаболиты-биомаркеры рака простаты и метаболиты, являющиеся факторами риска развития рака легкого и СД 2-го типа. Продемонстрирована универсальность метаболомного анализа, основанного на масс-спектрометрическом измерении метаболитов плазмы крови, для лабораторной диагностики нескольких социально значимых заболеваний.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Метаболом плазмы крови может быть эффективно использован для диагностики и оценки риска возникновения ряда социально значимых заболеваний.

2. Биоинформационный анализ масс-спектров метаболома плазмы крови, полученных прямой инъекцией фракции метаболитов в источник ионизации масс-спектрометра, позволяет выявить мультивариационные характеристики (диагностические сигнатуры), позволяющие диагностировать или оценивать риск возникновения таких социально значимых заболеваний, как рак простаты, рак легкого и СД 2-го типа.

3. Метаболиты, входящие в диагностические сигнатуры, отражают изменения в организме пациента, имеющие непосредственное отношение к этиологии и/или развитию этих заболеваний.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Теоретическая значимость результатов работы заключается в подтверждении того, что метаболом плазмы крови является своеобразным молекулярным фенотипом всего организма, что позволяет использовать его в качестве универсального средства исследования различных заболеваний, в том числе с целью разработки их лабораторной диагностики.

Практическая значимость работы заключается в возможности внедрения метаболомной диагностики в практическую медицину. Разработанные протоколы анализа могут являться шаблоном для написания стандартных операционных процедур и лабораторных регламентов для метаболомной диагностики рака простаты, рака легкого и СД 2-го типа. Выявленные в работе метаболиты-биомаркеры заболеваний могут быть использованы в диагностике соответствующих заболеваний как самостоятельно, так и в совокупности с другими, ранее найденными биомаркерами.

На основе разработанных протоколов создана для регистрации в Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения и социально развития Российской Федерации новая медицинская технология "Оценка метаболитного состава крови человека методом масс-спектрометрии".

Разработанные методические подходы метаболомного анализа плазмы крови, биоинформационной обработки данных, а также разработанное программное обеспечение уже используются в исследованиях по поиску низкомолекулярных диагностических сигнатур и маркеров заболеваний в плазме крови.

## **Методология и методы диссертационного исследования**

Эффективность анализа метаболома плазмы крови, полученного прямой инъекцией фракции метаболитов в источник ионизации масс-спектрометра, для диагностики и оценки риска возникновения заболеваний определена в соответствии с положениями доказательной медицины в первичных поперечных биомедицинских исследованиях типа "случай-контроль" на репрезентативных выборках целевых групп в Российской Федерации. Группы "случай" формировали с учетом стандартных диагностических критериев определения случая (по анкетным данным, данным медицинского осмотра и результатам лабораторной диагностики). Полученные результаты подтверждены тестированием диагностических моделей с применением независимых выборок и расчетом основных статистических критериев достоверности диагностических тестов, принятых в биомедицинских исследованиях (т.е. чувствительность, специфичность и точность теста). Заключение о применимости масс-спектрометрии метаболома плазмы крови в медицине сделаны на основе мета-анализа, включающего результаты исследований по нескольким заболеваниям.

## **Апробация работы**

Основные положения диссертации были представлены на HUPPO 6<sup>th</sup> Annual World Congress (Seoul, 2007), в виде устного доклада на U.S.-Russia Scientific Forum (Moscow, 2011), на конференции "Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине" (Казань, 2012), в виде устного доклада на конференции ФГБУ «ИБМХ» РАМН (Москва, 2013), в виде устного доклада на XX Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2013), в виде устного доклада на FEBS Congress (Санкт-Петербург, 2013), на V Международной научно-практической конференции "Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины" (Ростов-на-Дону, 2013), на 4<sup>th</sup> International Conference on Biomarkers & Clinical Research (Philadelphia, 2013), на

XXI Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2014), на 5<sup>th</sup> International Conference on Biomarkers & Clinical Research (Oxford, 2014), в виде устного доклада на HUPO 13th Annual World Congress (Madrid, 2014).

### **Достоверность научных результатов**

Достоверность научных результатов основана на их многосторонней экспериментальной проверке в исследованиях различных заболеваний. В работе использовали 360 образцов плазмы крови, собранных в профильных медицинских учреждениях, что позволило получить статистически достоверные результаты по целевым группам пациентов. Все предложенные статистические модели диагностики заболеваний были протестированы с использованием независимых выборок и были оценены по общепризнанным критериям эффективности диагностических методов.

## 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

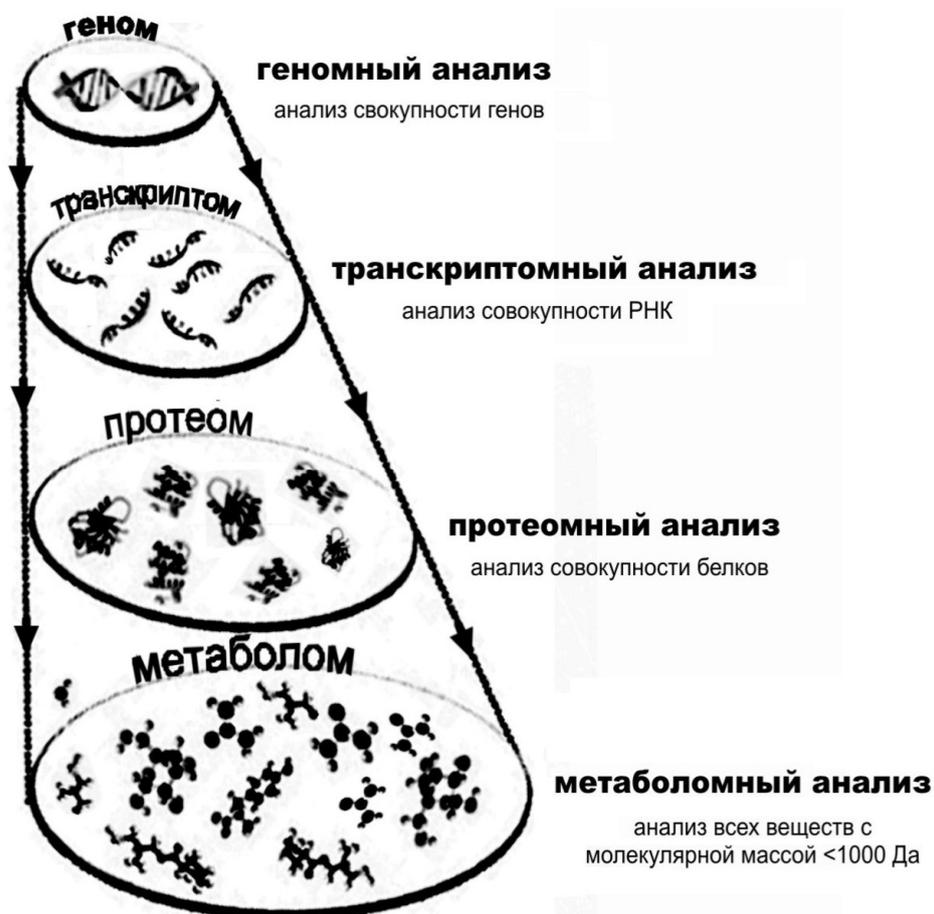
В обзоре литературы рассмотрены основные определения метаболомики, история ее возникновения, возможности в плане диагностики заболеваний, раскрыты особенности метаболомики по отношению к другим "омным" наукам. Особое внимание уделено описанию методов анализа биоматериала, применяемых в метаболомике, и интерпретации получаемых данных. Отдельная глава посвящена метаболомике плазмы крови и ее применению в медицинских целях, в том числе в виде "омных" тестов, что имеет непосредственное отношение к цели, поставленной в диссертационной работе, и объясняет выбор средств для ее достижения. Рассмотрены также проблемы диагностики и оценки риска возникновения рака простаты, рака легкого и СД 2-го типа, показывающие актуальность диссертационной работы.

### 2.1 Метаболомика, основные определения, история возникновения

Современная наука характеризуется наличием нескольких основных научных направлений, так называемых "омных" наук (Арчаков, 2000; Kandpal et al., 2009; Пирузян, 2004). Подобная ситуация является следствием развития аналитических платформ, позволяющих в рамках одного научного исследования полностью описать биологический объект на любом уровне организации – от генов до низкомолекулярных веществ (Арчаков, 2000). В зависимости от выбранного уровня, исследование будет относиться к геномике, транскриптомике, протеомике или метаболомике.

Самой первой из "омных" наук еще в 90-ых годах прошлого столетия возникла геномика, которая изучает гены и их взаимодействие друг с другом в норме и при патологии. 14 апреля 2003 г. Международный консорциум объявил о завершении работ по расшифровке генома человека. Наступила так называемая "постгеномная эра", основная задача которой стоит в выяснении того, как эта генетическая информация реализуется на других уровнях организации

биологического объекта, а именно транскриптомном, протеомном и метаболомном (Рис. 1), и, в конечном счете, проявляется в фенотипе человека и его болезнях (Арчаков, 2000; Пирузян, 2004).



**Рисунок 1.** Последовательная взаимосвязь "омов", из которых состоит живая система, отражающая поток информации, заложенной в генах, к молекулярному фенотипу организма – метаболому. Указаны варианты анализа для "омов", в том числе метаболомный анализ, при котором происходит единовременный анализ всей совокупности низкомолекулярных веществ в образце биологического объекта.

Транскриптомика, по сути являясь функциональной геномикой, изучает образование первичных транскриптов, процессы сплайсинга и определение количества каждой индивидуальной мРНК. К задачам транскриптомики относятся изучение не зависящих от геномных сигналов факторов, влияющих на

формирование структуры и динамики транскриптома (совокупность транскриптов всех генов, экспрессирующихся в какой-либо клетке на какой-либо стадии ее развития).

Протеомика – наука, изучающая белковый состав биологических объектов, а также модификации и структурно-функциональные свойства белковых молекул. Протеомный анализ направлен на одновременное изучение многих индивидуальных белков, совокупность которых составляет определенную систему, что характеризует исследуемый объект в целом (Арчаков, 2000). Предметом изучения протеомики являются синтез, модификация и деградация белков исследуемого объекта.

Метаболомика является последней из основных "омных" наук и логическим завершением в системном исследовании биологических объектов (Patti et al., 2012). Слова "метаболом" и "метабомика" впервые были введены в книге "Effect of Slow Growth on Metabolism of Escherichia coli, as Revealed by Global Metabolite Pool (metabolom) Analysis" в 1998 г. Изучая совокупность низкомолекулярных веществ, являющихся субстратами, интермедиатами и продуктами биохимических реакции, метабомика описывает молекулярный фенотип биологического объекта, в котором отражен "реализованный" геном. Имея дело с молекулярным фенотипом человека, метабомика является наиболее перспективной в плане клинического применения среди "омных" наук. Современная метабомика характеризуется применением основанных на масс-спектрометрии методов, наиболее распространенными из которых являются метаболический фингерпринтинг и метаболическое профилирование (Лохов и Арчаков, 2008).

Метаболический фингерпринтинг (fingerprinting) – это классификация биопроб на основе паттернов, формируемых количественными характеристиками входящих в них метаболитов (Лохов и Арчаков, 2008). Количественными характеристиками являются, как правило, концентрации метаболитов, выраженные в виде интенсивностей масс-спектрометрических пиков. Данный подход изначально направлен не на идентификацию метаболитов, а на

сравнительный анализ формируемых ими паттернов, которые претерпевают изменения при болезни, внешнем воздействии на организм или при генетических аномалиях (Лохов и Арчаков, 2008).

Метаболическое профилирование – это количественный анализ метаболитов, относящихся к одному химическому классу веществ или определенному биохимическому пути, который проводится с целью поиска биомаркеров заболеваний, исследования целевых групп метаболитов, диагностики или поиска мишеней для воздействия лекарств. Имея целевую направленность, метаболическое профилирование нашло широкое применение в практической медицине (Лохов и Арчаков, 2008).

Основные определения (Лохов и Арчаков, 2008):

**Метаболиты** – молекулы массой менее 1000 Да, участвующие в метаболических реакциях и необходимые для поддержания гомеостаза, роста и нормального функционирования клеток.

**Метаболом** – полный набор метаболитов биологического объекта.

**Метаболомика** – наука, занимающаяся идентификацией и количественным измерением всех метаболитов биологического объекта.

**Метаболическое профилирование** – количественный анализ метаболитов, относящихся к одному химическому классу веществ или определенному биохимическому пути. Профилирование проводится с целью поиска биомаркеров заболеваний, исследования целевых групп метаболитов, диагностики или поиска мишеней для воздействия лекарств.

**Метаболический фингерпринтинг (fingerpriting)** – классификация биопроб на основе паттернов, формируемых количественными характеристиками входящих в них метаболитов.

## 2.2 Основные особенности метаболомики

Существуют некоторые особенности метаболомики, которые отличают ее от других "омных" наук. Во-первых, это сильная изменчивость концентраций

метаболитов, исследуемых метаболомикой. Распределение метаболитов в организме существенно варьирует от его состояния и времени суток, что налагает жесткие требования к стандартизации протоколов метаболомного анализа (Лохов и Арчаков, 2008). Вторая особенность – это отсутствие видоспецифичности большинства метаболитов, что ведет к существенному влиянию на результаты исследования поступающих в организм, например с пищей, веществ (Vigneau-Callahan et al., 2001). Третья особенность – это значительные различия физико-химических свойств и физиологических концентраций метаболитов, связанные с тем, что метаболиты относятся к совершенно разным химическим классам и в организме выполняют различные функции: от строительных до регуляторных (Лохов и Арчаков, 2008). Существующие сложности привели к тому, что сегодня используют различные технологические подходы для анализа метаболомов различных биологических объектов (Vino et al., 2004). Среди существующих подходов масс-спектрометрия зарекомендовала себя, как наиболее эффективный метод измерения всего разнообразия веществ в биопробе, что делает сегодня масс-спектрометры основными приборами для анализа метаболомов различных биологических объектов, включающих тысячи метаболитов. К таким объектам относится плазма крови, которая насчитывает более 2 тыс. основных метаболитов (Beecher, 2003). Метаболиты растений, как правило, насчитывают десятки тысяч метаболитов (Weckwerth, 2003). Таким образом, можно утверждать, что современная метаболомика характеризуется применением метаболомического фингерпринтинга и метаболомического профилирования на основе масс-спектрометрии (Dettmer and Hammock, 2004; Kell and Oliver, 2004; Schnackenberg and Beger, 2006; Beckwith-Hall et al., 1998).

### **2.3 Метаболическое профилирование**

Метаболическое профилирование позволяет получить информацию о десятках, сотнях и даже тысячах (в зависимости от используемого протокола) метаболитах образца всего лишь за один анализ. Подобная эффективность

является следствием использования современных аналитических технологий, как правило, основанных на масс-спектрометрии (МС) (Dunn et al., 2011; Psychogios et al., 2011). Реже для метаболомного профилирования используют приборы на основе ядерного магнитного резонанса (ЯМР), которые позволяют проводить измерение до нескольких десятков веществ в биопробе, однако, при подобном анализе не происходит расхода биоматериала. В процессе становления и развития методической базы метаболомики, стало ясно, что наиболее распространенными методами анализа метаболического профиля биоматериала, в том числе плазмы и сыворотки крови, являются прямая масс-спектрометрия и масс-спектрометрия, сопряженная с высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ-МС) или газовой хроматографией (ГХ-МС) (Psychogios et al., 2011).

Важной особенностью метаболического профилирования является его целевой характер, что позволило уже сейчас широко его использовать в медицинской практике, в частности, при диагностике врожденных нарушений метаболизма по анализу мочи методом ГХ-МС (Kuhara et al., 2005; Kuhara, 2002). Для выявления нарушений метаболизма жирных кислот, аминокислот и синтеза органических кислот у новорожденных детей успешно применяют метод ВЭЖХ-МС. Как правило, в таких случаях используют протокол пробоподготовки биоматериала, основанный на метанольной экстракции метаболитов из высушенной на фильтровальной бумаге капли крови. При этом для достоверной идентификации метаболитов используют изотопно-меченные внутренние стандарты. Наглядный пример подобного подхода продемонстрировал Piraud и соавт., который основан на ВЭЖХ-МС и позволяет анализировать до 80 низкомолекулярных веществ, имеющих непосредственное отношение к нарушениям метаболизма (Piraud et al., 2003). Вариации подобных методов подробно описаны в следующих аналитических обзорах (Chace and Kalas, 2005; Schulze et al., 2003; Chace et al., 2002; Chace et al., 2003).

Следует отметить, что при метаболическом профилировании часто проводят количественное измерение и идентификацию липидов биологических объектов (German et al., 2003; Watkins et al., 2002). Детальный масс-

спектрометрический анализ липидов позволяет исследовать их метаболизм, изучить липид-зависимые сигнальные пути, выявить изменение липидного состава крови при заболеваниях и лекарственной терапии (Лохов и соавт., 2015). При этом для анализа неполярных липидов предпочтительно использовать ГХ-МС, применяя дериватизацию липидов силилированием и метилированием. При анализе липидов обладающих низкой летучестью, например триглицеридов, можно использовать высокотемпературную газовую хроматографию. Фосфолипиды, как правило, перед анализом подвергают гидролизу, а получившиеся жирные кислоты дериватизируют и анализируют ГХ-МС. Помимо традиционного способа введения пробы с липидами в газовый хроматограф, широкое распространение получил аналитический пиролиз, заключающийся в том, что перед внесением в газовый хроматограф происходит термическое разрушение веществ в атмосфере инертного газа. Таким образом, разрушая нелетучие вещества, получают их более летучие фрагменты. Комбинация пиролиза веществ с ГХ-МС является эффективным способом анализа сложных биологических объектов. Snyder и соавт., используя данный подход с масс-детекцией в ионной ловушке, провели типирование бактерий на основе анализа их липидных профилей (Snyder et al., 1990).

Помимо ГХ, разделение липидов перед масс-спектрометрической детекцией проводят с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Показательной для данного подхода является работа Hermansson и соавт., которые осуществили количественное измерение более чем 100 фосфолипидов с применением ВЭЖХ-МС (Hermansson et al., 2005).

Использование масс-спектрометров с высоким разрешением измерения масс позволяет анализировать липидный состав образцов без предварительного хроматографического или иного разделения липидов. Так, для анализа липидов часто применяют прямой масс-спектрометрический анализ. В частности, Han и Gross в своих работах проанализировали тканевые экстракты с применением прямой инъекции анализируемого биоматериала в электроспрейный источник ионизации (ЭИИ) (Han and Gross, 2003; Han and Gross, 2005). В режиме

регистрации положительно заряженных ионов были измерены фосфотидилэтаноламины, фосфатидилхолины, лизофосфотидилхолины и сфингомиелины. Жирные кислоты, фосфатидилглицерол, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол и фосфатидную кислоту предпочтительно измерять в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов (Han and Gross, 2005; Hsu and Turk, 1999; Duffin et al., 1991). Идентификацию липидов при масс-спектрометрическом анализе проводят общепринятыми методами (см. раздел "Идентификация метаболитов"). При использовании прямой масс-спектрометрии и ВЭЖХ-МС идентификацию липидов проводят, как правило, по точно измеренной массе (accurate mass tag) и по специфическим фрагментам развала. В случае применения жидкостной хроматографии также применяют время задержки вещества на хроматографической колонке. Фрагментацию липидов, которая позволяет получить специфичные масс-спектрометрические фрагменты, можно проводить с применением столкновительной диссоциации (фрагментации анализируемых молекул в масс-спектрометре путем столкновения их с молекулами инертного газа) (Pulfer and Murphy, 2003; Griffiths et al., 2001).

Сравнивая с метаболическим фингерпринтингом, ориентированным на наиболее полный анализ метаболитов биологического объекта, метаболическое профилирование на первый взгляд выглядит не совсем метаболомной технологией, так как применяется для исследования отдельных групп метаболитов (Лохов и Арчаков, 2008). Однако, разнообразие методик профилирования позволяет их комбинировать в рамках одного исследования и, таким образом осуществлять полноценное метаболомное исследование. При этом на выбор способа метаболического профилирования влияют физико-химические свойства целевой группы метаболитов. Под эти свойства подбирают протоколы пробоподготовки, которые позволяют обогатить пробу целевой фракцией метаболитов и существенно снизить в ней количество примесей. На выбор способа масс-спектрометрического анализа, в особенности на использование ЭИИ, также влияет наличие доступных масс-спектрометрических библиотек, необходимых для проведения идентификации профилируемых метаболитов (см.

раздел "Идентификация метаболитов"). При отсутствии подобных библиотек методом выбора следует считать ГХ-МС, позволяющую проводить идентификацию метаболитов по спектрам развала веществ, фрагментированных электронным ударом (Лохов и Арчаков, 2008).

## 2.4 Метаболический фингерпринтинг

Метаболический фингерпринтинг (fingerprinting) – это классификация биопроб на основе паттернов, формируемых количественными характеристиками входящих в них метаболитов (Лохов и Арчаков, 2008). Метаболический фингерпринтинг направлен на сравнительный анализ формируемых метаболитами паттернов, которые претерпевают изменения при возникновении и развитии заболевания, внешнем воздействии на организм или при генетических аномалиях. В случае метаболического фингерпринтинга на основе масс-спектрометрического анализа паттерн биологического образца формируется набором масс метаболитов и соответствующими им интенсивностями масс-спектрометрических пиков. Если перед масс-спектрометрическим анализом задействовано хроматографическое разделение, например ВЭЖХ, то в формировании паттерна может принимать участие также время задержки метаболита на хроматографической колонке. Следует отметить, что метаболический фингерпринтинг охватывает максимально возможное количество метаболитов анализируемого объекта, что позволяет считать его истинной и наиболее мощной метаболомной технологией. В зависимости от используемого протокола и наличия стадии разделения метаболитов перед масс-спектрометрией, метаболический фингерпринтинг реализуется в виде: (1) прямого масс-спектрометрического анализа, (2) высокоэффективной жидкостной хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС), (3) газовой хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией (ГХ-МС), (4) капиллярного электрофореза, сопряженного с масс-спектрометрией (КЭ-МС) (Лохов и Арчаков, 2008; Lokhov and Archakov, 2009).

## **2.5 Подходы на основе масс-спектрометрии, применяемые в метаболомике**

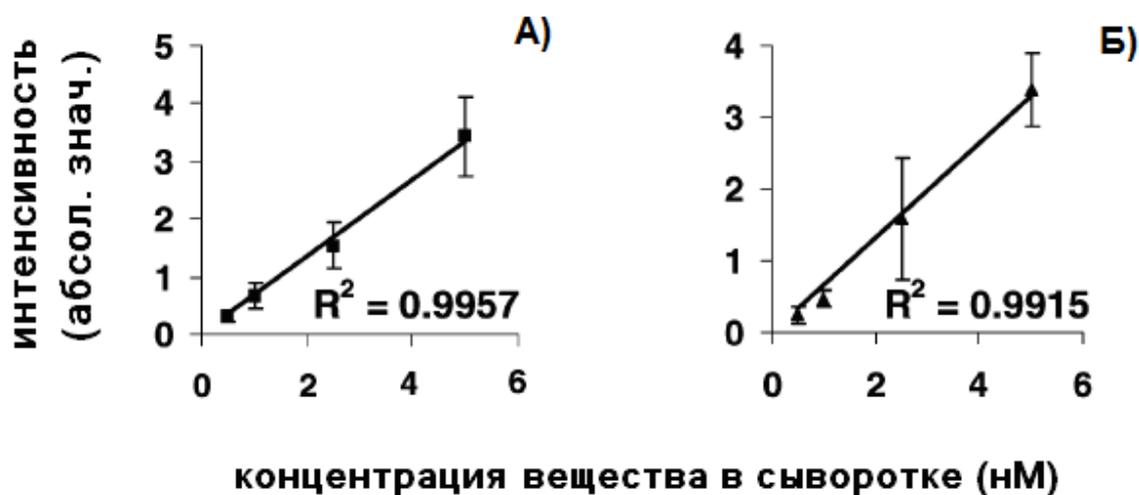
### **2.5.1 Метаболический анализ на основе ВЭЖХ-МС**

При масс-спектрометрическом анализе сложных биологических объектов часто, непосредственно перед масс-спектрометрической детекцией, используют разделение метаболитов жидкостной хроматографией. Жидкостная хроматография существенно снижает ионную супрессию, кардинально снижает вероятность интерференции масс-спектрометрических пиков, устраняет фоновый шум, на 1-2 порядка увеличивает динамический диапазон детекции метаболитов и, в некоторых случаях, позволяет количественно измерять концентрации метаболитов в пробе.

В метаболомике наиболее распространенной является обратнофазовая жидкостная хроматография, где в качестве неподвижной фазы используют углеродную цепь различной длины, прикрепленную к сферическому носителю размером, как правило, 3–5 мкм. Применение обратнофазовой хроматографии описано во многих метаболомных исследованиях, в том числе для метаболомного исследования растений (De Vos et al., 2007; Tolstikov et al., 2003). Для сложных биологических смесей есть возможность использовать различные модификации обратнофазовой ВЭЖХ, увеличивая тем самым эффективность разделения веществ. Широко распространено увеличение разрешающей способности хроматографии путем уменьшения размера частиц носителя неподвижной фазы. Так для ультраэффективной жидкостной хроматографии (УЭЖХ) используют частицы размером менее 2 мкм. При УЭЖХ мочи мыши на колонке длиной 10 см, внутренним диаметром 2,1 мм и размерами частиц 1,7 мкм удалось детектировать до 250 пиков (Wilson et al., 2005a; Wilson et al., 2005b). К недостаткам УЭЖХ можно отнести существенное увеличение давления, необходимое для поддержки скорости потока элюентов через колонки, имеющие носитель со столь маленьким диаметром. Поэтому для создания высокого давления на

ультрахроматографических колонках используют специализированные хроматографические системы.

Особое внимание следует уделить метаболомным исследованиям с применением хроматографии с нанопотоками элюентов, так называемой нано-ВЭЖХ-МС. Разделение веществ при подобной хроматографии столь эффективно, что во многих случаях полностью устраняет ионную супрессию и интерференцию веществ, что, в конечном счете, позволяет проводить количественное измерение компонентов сложных смесей. Показано, что, применяя нанохроматографию, возможно количественно измерять в сыворотке крови до 2000 метаболитов, при чувствительности детекции менее 1 нМ (Рис. 2) (Wang et al., 2003; Roy and Becker, 2007).

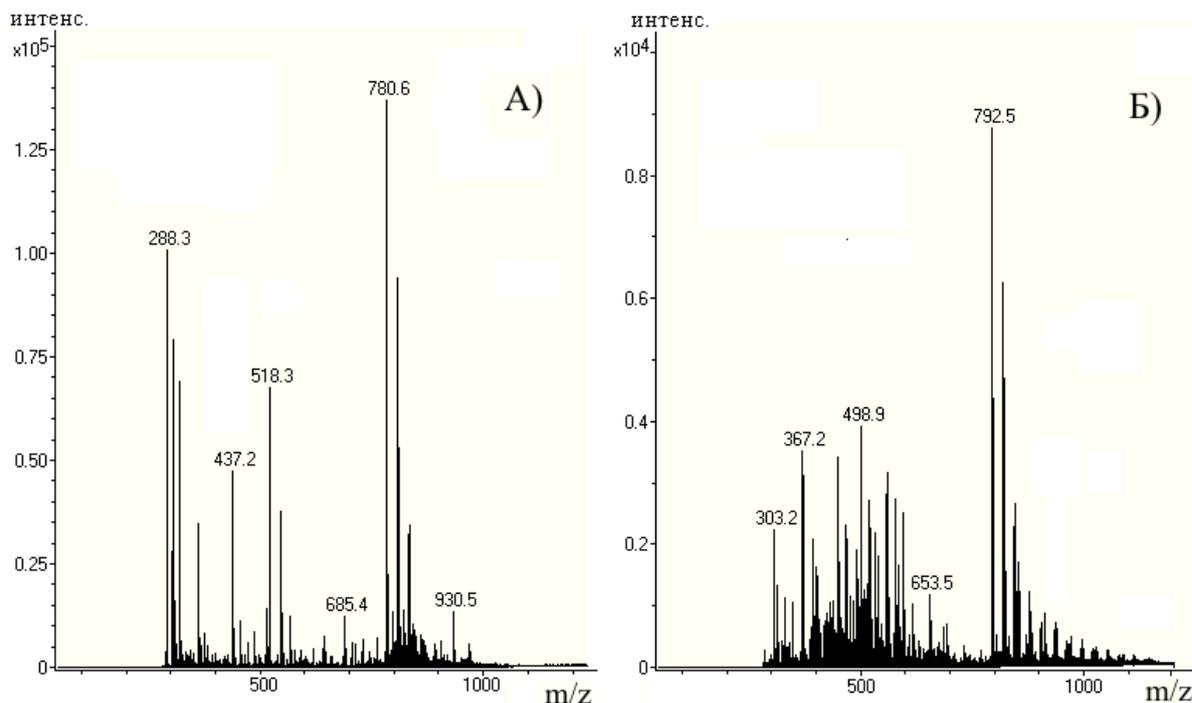


**Рисунок 2.** Калибровочные кривые для сигнала, полученного нормализацией интенсивности масс-спектрометрических пиков для двух веществ с известными концентрациями в сыворотке крови (Wang et al., 2003). График А – для витамина В12; Б – для [вал4]ангиотензина.  $R^2$  – коэффициент детерминации линейной аппроксимации данных. Вещества перед внесением в источник ионизации хроматографировали при нанопотоке элюентов. Масс-спектры

получены на времяпролетном масс-спектрометре с электроспрейным источником ионизации (New Objective, США).

Применение обратнофазовой хроматографии, как эффективного способа разделения разнообразных веществ, оправдано в подавляющем большинстве случаев. Однако обратнофазовые колонки не пригодны для разделения выражено полярных метаболитов, которые не удерживаются на таких колонках. Для подобных метаболитов целесообразно применять хроматографию ортогональную обратнофазовой хроматографии, т.е. с применением полярной неподвижной фазы (hydrophilic interaction chromatography, HILIC), эффективность которой в подобных случаях была неоднократно продемонстрирована (Tolstikov et al., 2007; Tolstikov and Fiehn, 2002). Более подробно применение, а также механизм деления веществ с применением HILIC описаны в обзоре Naidong (Naidong, 2003).

Среди методов ионизации низкомолекулярных веществ, используемых в масс-спектрометрии, в метаболомных исследованиях с применением хроматографического разделения в подавляющем большинстве случаев применяют ЭИИ. При этом, для максимально полного исследования метаболома биообразца практикуют использование ЭИИ в режиме регистрации как положительно, так и отрицательно заряженных ионов. На рисунке 3 продемонстрированы примеры масс-спектров, полученных при анализе метаболитов плазмы крови человека при детекции в обоих режимах регистрации ионов. Очевидно, что масс-спектры имеют существенные отличия, соответственно использование обоих режимов, как дополняющих друг друга, оправдано (Лохов и Арчаков, 2008). Однако с целью экономии времени при лабораторной диагностике на основе масс-спектрометрии, целесообразно использовать только один режим, если это существенно не сказывается на эффективности диагностики.



**Рисунок 3.** Масс-спектры метаболитов крови, полученные прямой инъекцией депротенизированной плазмы крови в электроспрейный источник ионизации квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра. **А** – масс-спектр, полученный в режиме детекции положительно заряженных ионов, **Б** – масс-спектр, полученный в режиме детекции отрицательно заряженных ионов (Лохов и соавт., 2009).

Типы масс-спектрометров, задействованных в системах ВЭЖХ-МС, могут быть совершенно разные. Наиболее часто встречаются времяпролетные (ВП) масс-спектрометры (Wang et al., 2003), тройные квадрупольные (Idborg-Bjorkman et al., 2003), ионные ловушки (Tolstikov and Fiehn, 2002; Wang et al., 2003; Lafaye et al., 2003; Tolstikov et al., 2007), гибридные, например квадруполь-времяпролетные, масс-спектрометры (Williams et al., 2005; Plumb et al., 2003; Lenz et al., 2004a; Lenz et al., 2004b). Почти все перечисленные типы масс-спектрометров позволяют проводить фрагментацию метаболитов с целью их идентификации. Более того, ионные ловушки позволяют многократно фрагментировать анализируемые вещества (т.е. получать фрагменты фрагментов), что увеличивает объем

получаемых данных о веществе и существенно повышает вероятность его идентификации.

Сегодня метаболический фингерпринтинг на основе систем ВЭХЖ-МС считается широко распространенным и очень эффективным подходом в научных исследованиях самых разнообразных биологических объектов, в том числе экстрактов растений (Tolstikov and Fiehn, 2002; Tolstikov et al., 2007), экстрактов грибов (Nielsen and Smedsgaard, 2003), плазмы крови (Wang et al., 2003), мочи (Idborg-Bjorkman et al., 2003; Williams et al., 2005; Lenz et al., 2004a; Lenz et al., 2004b; Lafaye et al., 2003), а также в генетических исследованиях (Plumb et al., 2003). Однако, в виду сложности технической реализации метаболический фингерпринтинг не распространен в лабораторной диагностике.

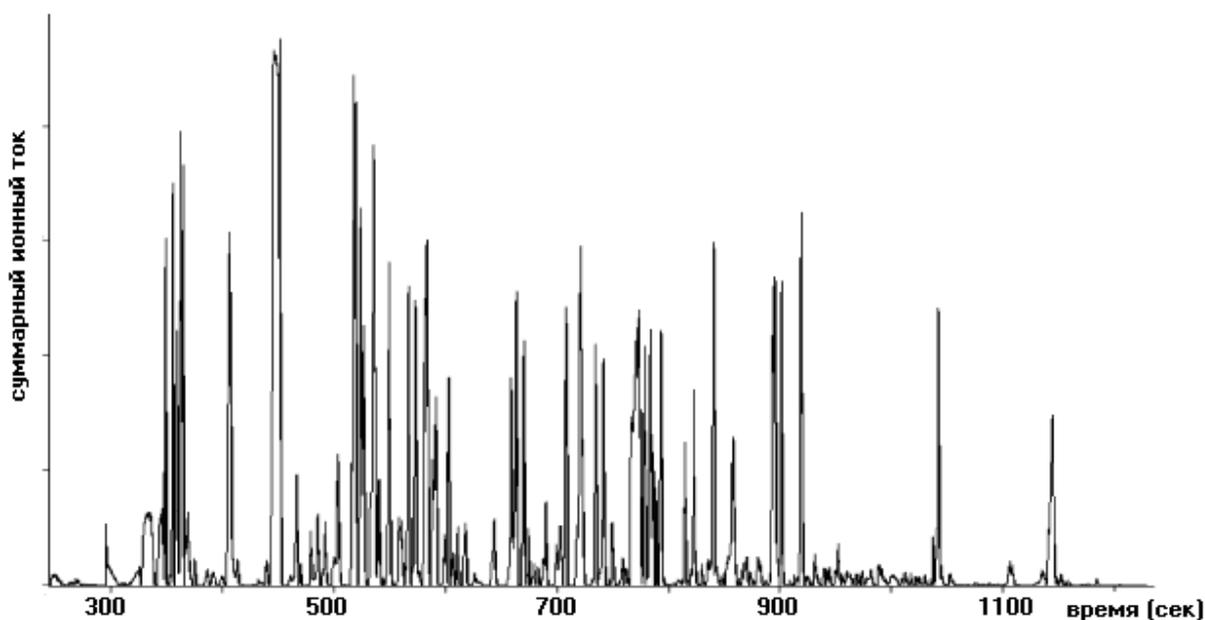
### **2.5.2 Метаболический анализ на основе ГХ-МС**

Важной особенностью метаболического анализа, основанного на применении ГХ-МС, является возможность эффективно идентифицировать метаболиты, входящие в метаболический профиль. Данное свойство исходит из применения в таких системах электронного удара для развала веществ, который, в свою очередь, применим только к поступающим из ГХ газообразным веществам. Получаемые при электронном ударе спектры фрагментации метаболитов специфичны и высокоинформативны, что в свое время стимулировало развитие соответствующих масс-спектрометрических библиотек для идентификации веществ с применением ГХ-МС. Сегодня подобные библиотеки являются наиболее полными и насчитывают записи для сотен тысяч низкомолекулярных веществ (см. раздел "Библиотеки масс-спектров для ГХ-МС").

Как упоминалось ранее, основным условием успешного ГХ-МС анализа является летучесть и термическая стабильность анализируемых веществ. Для повышения летучести и стабилизации веществ перед анализом их заряженные или полярные группы дериватизируют. Карбоксильные, тиольные и аминоксильные группы дериватизируют алкилированием, ацилированием

или силилированием. В метаболомных исследованиях для большей сохранности метаболитов и более полного анализа метаболома с помощью ГХ-МС применяют двухстадийную дериватизацию, включающую обработку метаболитов метоксамином, с последующим силилированием (Roessner et al., 2000; Jonsson et al., 2004; Colebatch et al., 2004). Пробоподготовка биологических жидкостей для ГХ-МС может включать концентрирование веществ ультрафильтрацией, испарением растворителя под вакуумом или лиофилизацией. Нецелевые вещества, доминирующие в анализируемом образце, могут удаляться в процессе пробоподготовки. Например, моча может быть обработана уреазой для удаления избытка мочевины (Fu et al., 2000), что существенно улучшает результаты анализа, т.к. в этом случае мочевина не перегружает газовую хроматографическую колонку и масс-детектор.

В метаболомных исследованиях с применением систем ГХ-МС используют разнообразные масс-спектрометры, в том числе времяпролетные (Shin et al., 2010; Winder et al., 2008) и квадрупольные (Roessner et al., 2001a; Roessner et al., 2001b). Времяпролетные масс-спектрометры, в отличие от остальных масс-спектрометров, позволяют проводить быструю детекцию метаболитов, что крайне важно при анализе метаболитов плазмы или сыворотки крови человека, когда необходимо за приемлемые сроки детектировать более тысячи метаболитов (Рис. 4) (O'Hagan et al., 2005; Jiye et al., 2005). Примечательно, что в системах ГХ-МС практически не используют ионные ловушки, так как они не адаптированы для газовой хроматографии.



**Рисунок 4.** Хроматограмма суммарного общего тока при метаболомном фингерпринтинге плазмы крови человека методом ГХ-МС. Общее количество детектируемых метаболитов 1200. Адаптировано из (O’Hagan et al., 2005).

Существуют различные модификации систем ГХ-МС, ориентированные на сокращение времени или повышение эффективности метаболомного анализа. Так называемая быстрая ГХ, сопряженная с времяпролетным масс-спектрометром, позволяет провести анализ метаболома пробы не более чем за 10 мин (Mastovská and Lehotay, 2003; Jiye et al., 2005). Подобный эффект достигается за счет высокой продуктивности времяпролетного масс-спектрометра и применения более коротких газовых колонок с меньшим диаметром, что существенно сокращает время анализа.

Для некоторых биологических объектов возникает потребность повышения эффективности разделения веществ путем сопряжения двух хроматографических колонок (так называемая двухмерная газовая хроматография – ГХ/ГХ) (Welthagen and Shellie, 2005; Dalluge et al., 2003). Как правило, это

необходимо при возникновении проблем с идентификацией метаболитов в сложных в аналитическом плане объектах. Например, газовая хроматограмма мочи человека содержит до 1,5 тысяч пиков веществ, большинство из которых не разделены. При ГХ/ГХ каждый пик с первой, обычно неполярной колонки, переносится на вторую, полярную, для дальнейшего разделения (Лохов и Арчаков, 2008).

Технически реализация двухмерной газовой хроматографии происходит за счет последовательного соединения хроматографических колонок через модулятор. Метаболиты, элюируемые с первой колонки, посредством деления потока элюента на фракции, фокусируются, нагреваются и поступают во вторую колонку. Фокусировка веществ является необходимой стадией, за счет которой происходит сужение ширины хроматографических пиков и увеличение динамического диапазона детекции метаболитов (Mondello et al., 2008; Adahchour et al., 2005). В подобных ГХ/ГХ системах предпочтительным является использование в качестве детектора времяпролетного масс-спектрометра ввиду его высокой продуктивности (Guo and Lidstrom, 2008).

### **2.5.3 Метаболический анализ на основе КЭ-МС**

В процессе становления методической базы метаболомики были исследованы различные аналитические платформы, среди которых была и комбинация капиллярного электрофореза с масс-спектрометрической детекцией веществ (КЭ-МС). Однако подобный подход уступал по аналитическим возможностям системам ВЭЖХ-МС и ГХ-МС, ввиду более низкой разрешающей способности капиллярного электрофореза по сравнению с хроматографией. В метаболомике, где полнота анализа низкомолекулярного состава пробы является одной из основных характеристик исследования, это привело к редкому применению КЭ-МС. Подробно о недостатках и возможных преимуществах метаболомного анализа с применением КЭ-МС можно ознакомиться в обзоре Monton и Soga (Monton and Soga, 2007). То же самое касается и капиллярной

электро-хроматографии (КЭХ), являющейся гибридом КЭ и ВЭЖХ, ранее считавшейся перспективной для метаболомных исследований при совместном применении с масс-спектрометрией (Klampfl, 2004). На сегодняшний день данный подход тоже не получил распространения в метаболомных исследованиях.

#### **2.5.4 Прямой масс-спектрометрический анализ метаболитов**

Прямой масс-спектрометрический анализ подразумевает отсутствие какого-либо хроматографического или иного разделения метаболитов перед масс-спектрометрическим анализом, т.е. происходит непосредственное внесение анализируемого биоматериала в источник ионизации масс-спектрометра. Подобный подход востребован, когда количество анализируемых веществ в биообразце (т.е. "глубина" анализа) не критично для научного исследования или когда прямой масс-спектрометрический анализ проводят с применением масс-спектрометров, измеряющих массы веществ с высоким разрешением. В научной литературе существует множество примеров успешного применения подобного подхода в метаболомике. Например, Smedsgaard и соавт., используя ЭИИ в режиме регистрации положительно заряженных ионов и квадрупольный масс-спектрометр, провели метаболомный фингерпринтинг экстракта грибов (Smedsgaard and Frisvad, 1997; Smedsgaard and Frisvad, 1996). В режиме регистрации положительно заряженных ионов, но уже с использованием тройного квадруполя, Castrillo и соавт. исследовали метаболиты дрожжей (Castrillo et al., 2003). Для анализа большого количества метаболитов в образце часто используют прямой масс-спектрометрический анализ с применением времяпролетного масс-спектрометра (ВП-МС), который в зависимости от конфигурации времяпролетной трубки может давать разрешение по массе до 100 тысяч. Так Allen и соавт. использовали времяпролетный масс-спектрометр для анализа изменения состава ростовой среды в результате экскреции в нее различных метаболитов культурой клеток (Allen et al., 2004; Allen et al., 2003). Применение гибридного масс-спектрометра, такого как квадруполь-времяпролетный масс-спектрометр, описано

для анализа экстрактов клеток животных и растений. В подобных случаях времяпролетный масс-спектрометр использовали именно как масс-анализатор, обеспечивающий измерение масс веществ с высоким разрешением (разрешение – это отношение высоты масс-спектрометрического пика к его ширине, измеренной на середине высоты) (Scholz et al., 2004; Vaidyanathan et al., 2002).

Особо стоит отметить применение масс-спектрометров ион-циклотронного резонанса (ИЦР-МС) в метаболомных исследованиях на основе прямой масс-спектрометрии. ИЦР-МС позволяет измерять массы метаболитов с разрешением свыше 1 млн. и точностью измерения масс  $0,1 \times 10^{-6}$  Да (Laskin and Futrell, 2004; Marshall et al., 1998), что делает подобные масс-спектрометры крайне эффективными в метаболомных исследованиях (Ohta et al., 2010; Brown et al., 2005). С применением ИЦР-МС Aharoni и соавт. изучили метаболиты плодов земляники путем прямой инъекции неочищенного экстракта в источник ионизации масс-спектрометра (Aharoni et al., 2002). В результате анализа было зарегистрировано почти 6 тыс. уникальных масс ионов метаболитов с точностью измерения масс позволяющей для половины из них установить однозначное соответствие химической формуле (независимое свойство, используемое при идентификации метаболита; см. раздел "Стандарт идентификации метаболитов в метаболомных исследованиях"). В другом исследовании Hirai и соавт. использовали ИЦР-МС для метаболомного фингерпринтинга экстракта *Arabidopsis thaliana* в исследовании реакции растения на нутритивный стресс (Hirai et al., 2004). Все эти исследования показали, что преимуществами прямой масс-спектрометрии являются высокая скорость анализа и относительно хорошая воспроизводимость результатов, которая позволяет эффективно проводить кластеризацию метаболитных фингерпринтов образцов (Лохов и Арчаков, 2008).

Помимо вариаций в типах масс-спектрометрической детекции, возможны различные опции в конфигурации ЭИИ. Так для повышения эффективности прямой масс-спектрометрии использовали ЭИИ с нанопотоком впрыскиваемой биопробы (нано-ЭИИ). Известен также вариант нано-ЭИИ, состоящий из набора

нанозлектроспрейных сопел, отличающийся более высокой продуктивностью (Scholz et al., 2004).

К основным недостаткам масс-спектрометрического анализа с прямой инъекцией метаболитов в ЭИИ можно отнести его несовместимость с анализом химических изомеров метаболитов из-за идентичности у них молекулярной массы. В данном случае применение хроматографии перед масс-спектрометрическим анализом является необходимым. В случае применения ЭИИ, также возникает проблема выраженной ионной супрессии, что влияет на точность масс-спектрометрических измерений в плане количественного измерения веществ в анализируемой биопробе. Для сложных биологических смесей всегда при прямой масс-спектрометрии возникает проблема интерференции масс-спектрометрических пиков, что существенно снижает возможность идентификации метаболитов. Однако, в плане применения метаболомного анализа в лабораторной диагностике, именно прямой масс-спектрометрический анализ, по мнению соискателя, может являться методом выбора, т.к. только он позволяет достичь воспроизводимости результатов метаболомного анализа в различных лабораториях за счет анализа биообразца "как он есть", т.е. без внесения в картину метаболома искажений различными методами разделения веществ.

## **2.6 Анализ метаболомных масс-спектрометрических данных**

Масс-спектры получаемые в "омных" исследованиях, и в особенности в метаболомике, содержат тысячи пиков относящихся к сотням, а порой и тысячам веществ, т.к. в результате одного анализа регистрируют все молекулярное разнообразие биопробы. Поэтому биоинформационная обработка масс-спектрометрических данных является важной и зачастую основной по объему частью любого метаболомного исследования, от качества которой зависит достоверность полученных в исследовании результатов. На первой стадии масс-спектрометрические данные подвергают так называемому выравниванию, а соответствующие им значения интенсивностей масс-спектрометрических пиков –

нормализации. Выравнивание необходимо для соотнесения между собой пиков одних и тех же метаболитов в разных спектрах. Потребность в данной процедуре обусловлена всегда присутствующей погрешностью в измерении масс веществ (Barrett, 2012; Goodacre et al., 2004; Beckwith-Hall et al., 1998). Нормализацию масс-спектрометрических данных проводят путем деления интенсивности (или площади) каждого масс-спектрометрического пика на сумму интенсивностей (или площадей) всех детектируемых в масс-спектре пиков. Дополнительно для улучшения качества масс-спектрометрических данных рекомендовано деление интенсивностей масс-спектрометрических пиков на интенсивность внесенного в каждую анализируемую пробу стандартного вещества в постоянной концентрации. После предварительной обработки масс-спектрометрических данных, проводят их статистический анализ (часто называется биоинформационным анализом ввиду сложности и биологической ориентации анализируемых данных), который выбирают в соответствии с дизайном научного исследования и задачами, поставленными перед исследователем.

В процессе зарождения и развития метаболомики было апробировано множество статистических методов обработки масс-спектрометрических данных. По прошествии времени некоторые из них зарекомендовали себя как наиболее эффективные и стали общепринятыми для метаболомики. В экспериментах, включающих метаболический фингерпринтинг образцов, то есть их классификацию на основе метаболомных данных, как правило, используют иерархический кластерный анализ, метод главных или независимых компонент (МГК и МНК). В англоязычной литературе – principal component analysis (PCA) и independent component analysis (ICA), соответственно (Лохов и Арчаков, 2008). В метаболомных исследованиях метод главных компонент считается наиболее распространенным и его можно реализовать при помощи большинства статистических программ (Dunn et al., 2011; Putri et al., 2013). Например, в программном пакете Matlab (Mathworks, США) метод главных компонент выполняется одной командой (Лохов и Арчаков, 2008):

$$[\text{comp}, \text{score}] = \text{princomp}(X)$$

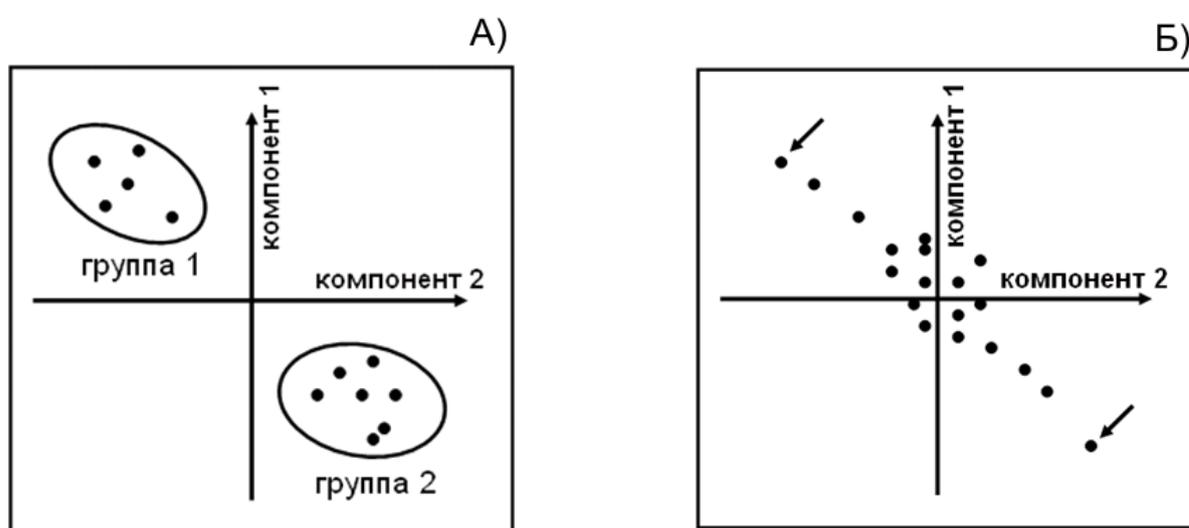
где

$X$  – анализируемая матрица интенсивностей метаболитов,

$\text{comp}$  – рассчитанная матрица главных компонент,

$\text{score}$  – матрица проекций  $X$  на главные компоненты.

Примеры визуализации данных матрицы главных компонент и матрицы проекций исходных данных на главные компоненты представлены на рисунке 5.



**Рисунок 5.** Пример результата анализа метаболомных данных методом главных компонент (Лохов и Арчаков, 2008).

**А** – Визуализация групп путем проекции исходных масс-спектрометрических данных на главные компоненты (показана проекция на первый и второй компоненты). **Б** – Визуализация потенциальных биомаркеров путем построения графика по значениям главных компонент (показан график значений первого компонента, отложенных против значений второго компонента; стрелкой указаны значения для потенциальных биомаркеров).

МНК менее требователен к выбору компонент, чем МГК. Описано применение этого метода с целью удаления вариабельности, связанной с

нестабильностью работы измерительного прибора, что привело к значительному улучшению результатов метаболомного анализа (Yao et al., 2012; Scholz et al., 2004). В подавляющем большинстве случаев только последовательное применение различных статистических методов позволяет получить результаты классификации метаболомных данных требуемого качества (Vis et al., 2007; Smilde et al., 2005).

В метаболомных исследованиях, ориентированных на поиск биомаркеров заболеваний, помимо общепринятых t-теста и теста Вилкоксона, применяют методы с обучающей выборкой. Среди таких методов наиболее популярны метод частных наименьших квадратов (МЧНК, в англоязычной литературе – partial least squares, PLS) и формальное независимое моделирование аналогии классов (soft-independent method of class analogy, SIMCA). В данных подходах обучающая выборка необходима, чтобы использовать информацию о принадлежности биопроб к больным или здоровым пациентам, что приводит к более эффективному выявлению низкомолекулярных биомаркеров (Jonsson et al., 2005; Bijlsma et al., 2006).

Как и в случае классификации метаболомных фингерпринтов, наиболее эффективным способом обнаружения метаболомных биомаркеров заболеваний является совместное применение различных статистических методов. Для поиска биомаркера в пробах известных групп можно применить дисперсионный анализ (ANOVA) или дисперсионный анализ с одновременным анализом компонент – ASCA (ANOVA – simultaneous component analysis) (Vis et al., 2007; Chang et al., 2006; Smilde et al., 2005).

Для оценки эффективности лабораторной диагностики с применением найденного биомаркера используют ряд критериев, наиболее общепринятыми и распространенными из которых являются "чувствительность", "специфичность" и "точность" метода диагностики (Кармазановский, 1997). Для того, чтобы понять, что кроется под этими определениями и каковы формулы их расчета, необходимо рассмотреть базовые термины, характеризующие результаты, получаемые при диагностике заболеваний.

В общем случае диагностический тест указывает на наличие или отсутствие заболевания у конкретного пациента при реальном наличии или отсутствии этого заболевания. Соответственно, существует четыре основных результата лабораторной диагностики. Достоверноположительный (ДП) результат – заболевание правильно диагностировано у пациента; ложноотрицательный (ЛО) результат – отвергается наличие заболевания у пациента при его наличии; ложноположительный (ЛП) результат – результат диагностики указывает на наличие заболевания у пациента при его отсутствии; и, наконец, достоверноотрицательный (ДО) результат диагностики, который отвергает наличие заболевания у пациента при его действительном отсутствии (Кармазановский, 1997).

Проведя диагностику заболеваний в группе пациентов можно рассчитать чувствительность, специфичность и точность диагностического метода, подставив результаты диагностики ( $n^x$  – количество пациентов с результатом диагностики X) в соответствующие формулы (Кармазановский, 1997):

$$\text{ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ} = n^{\text{ДП}} / n^{\text{ДП} + \text{ЛО}}$$

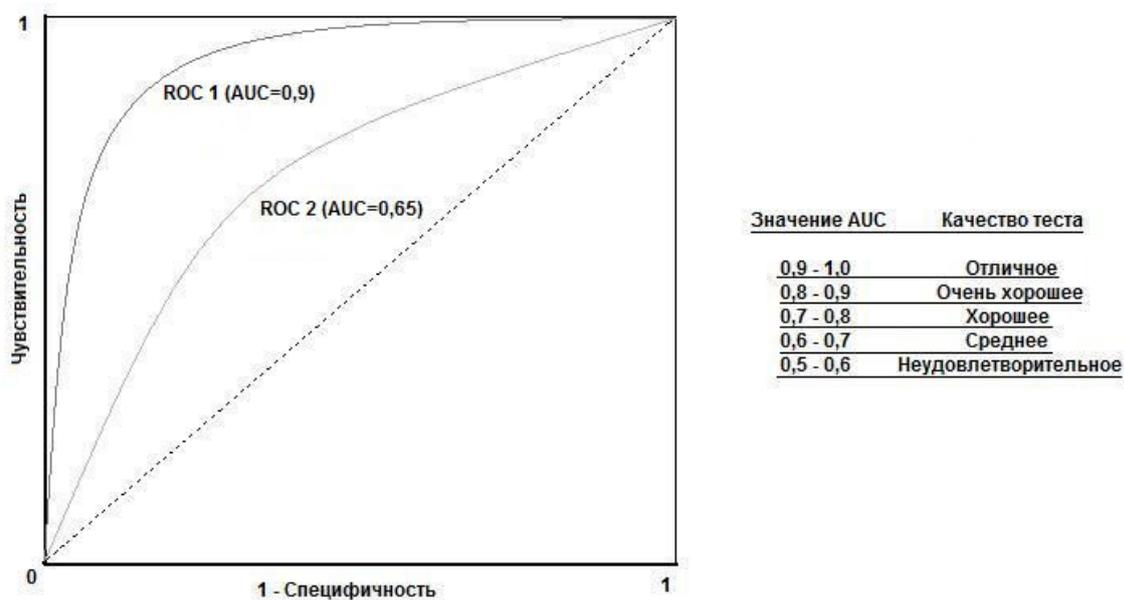
$$\text{СПЕЦИФИЧНОСТЬ} = n^{\text{ДО}} / n^{\text{ДО} + \text{ЛП}}$$

$$\text{ТОЧНОСТЬ} = n^{\text{ДП} + \text{ДО}} / n^{\text{ДП} + \text{ДО} + \text{ЛП} + \text{ЛО}}$$

Согласно представленным формулам, чувствительность метода – это способность выявлять заболевание – так как она отражает соотношение правильных заключений к общему числу поставленных диагнозов в исследуемой группе пациентов. Что касается специфичности – из формулы следует, что, чем чаще мы ставим неправильный диагноз, тем ниже будет специфичность диагностического метода, так как специфичность – это способность метода отвергать заболевание там, где его действительно нет. Точность – соотношение числа достоверноположительных и достоверноотрицательных заключений к общему числу поставленных диагнозов. Точность является объективным отражением процесса ложноотрицательной (невыявления заболевания) и

ложноположительной (гипердиагностики заболевания) диагностики, являясь, тем самым, неким интегральным показателем эффективности диагностики. Характеризуя диагностический метод указанными параметрами, можно судить об его эффективности и сравнивать его с результатами других диагностических методов (Кармазановский, 1997).

Одним из наиболее общепринятых и удобных методов оценки эффективности диагностического метода и, соответственно, используемого в нем биомаркера заболевания, является ROC-кривая (Receiver Operating Characteristic) (Linden, 2006; Søreide et al., 2011). ROC-кривая строится по значениям следующих показателей – диагностическая чувствительность, показывающая долю достоверноположительных результатов у всех лиц с исследуемой патологией, и диагностическая специфичность, показывающая долю достоверноотрицательных результатов у всех лиц не имеющих исследуемой патологии (здоровых) (Рис. 6). Для «идеального» теста кривая проходит через верхний левый угол, где доля достоверноположительных случаев составляет 100%, соответственно, чем ниже изгиб кривой, тем ниже эффективность теста. Для получения численного значения клинической значимости теста вычисляют показатель AUC (Area Under ROC–Curve). Если площадь под ROC-кривой равна 1, то данный тест работает со 100% чувствительностью (нет ложноотрицательных результатов) и 100% специфичностью (нет ложноположительных результатов) (Кармазановский, 1997).



**Рисунок 6.** Пример характеристических кривых (ROC) с хорошими (ROC 1, AUC=0,9) и средними (ROC 2, AUC=0,65) показателями специфичности и чувствительности теста. Экспертная шкала для значений AUC, по которой можно судить о качестве теста (Metz, 1978).

Для оценки риска развития заболевания от наличия определенных факторов рассчитывают коэффициент несогласия или отношение шансов (Odds Ratio, OR) (Bland and Altman, 2000; Westergren et al., 2001). Данный показатель отражает насколько больше вероятность развития заболевания у индивидуума, подвергнувшегося действию исследуемого фактора, по сравнению с индивидуумом, на которого этот фактор не действует. Таким образом, риск развития заболевания рассчитывается как отношение вероятности, что «событие» случится, к вероятности, что оно не произойдет (Рис. 7). Если отношение шансов (OR) больше единицы, то вероятность развития события (заболевания) при наличии исследуемого фактора больше, чем при его отсутствии. Если OR меньше единицы, то наоборот. Если OR равно единице, вероятность развития события не связана с исследуемым фактором. В случае метаболического профилирования биологической пробы величиной, отражающей исследуемый фактор, является

интенсивность масс-спектрометрического пика определенного метаболита (или группы). При этом пороговое значение интенсивности пика рассчитывают, исходя из наилучших значений чувствительности и специфичности теста, построенного на измерении концентрации этого метаболита, то есть соответствует точке на ROC-кривой наиболее приближенной к левому верхнему углу (Трифонова и соавт., 2014).

	<b>Больные</b>	<b>Здоровые</b>	
<b>Есть</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	$OR = \frac{a/b}{c/d} = \frac{a \cdot d}{b \cdot c}$
<b>Нет</b>	<b>c</b>	<b>d</b>	

**Рисунок 7.** Формула расчета отношения шансов (OR) развития заболевания в двух группах в зависимости от наличия или отсутствия определенного признака (фактора) в группе больных и здоровых индивидуумов (Трифонова и соавт., 2014).

Существует также множество программных продуктов, ориентированных на комплексный анализ масс-спектров метаболитов, например MathDAMP (Baran et al., 2006), MET-IDEA (Broeckling et al., 2006), TagFinder (Luedemann et al., 2008) и др. Некоторые производители масс-спектрометрического оборудования предлагают собственные программные пакеты для анализа масс-спектрометрических данных метаболомных исследований. Например, с 2007 г. фирма «Bruker Daltonics» (Германия) продает или поставляет вместе со своим масс-спектрометрическим оборудованием программу «Metabolic Profiler». Готовые программные продукты позволяют проводить сравнительный анализ метаболических профилей образцов, используя исходные (т.е. не обработанные)

масс-спектры в качестве входных данных, что существенно упрощает и ускоряет работу (Лохов и Арчаков, 2008).

Помимо сравнительного анализа метаболических профилей для предсказания развития болезни или эффективности лекарственных препаратов, большой интерес представляют еще и сведения о задействованных биохимических путях патофизиологических процессов исследуемых болезней. Такую информацию с классификацией метаболитов, например, по классам или метаболическим путям, можно получить путем проекции данных метаболомного профилирования на такие базы данных как KEGG (Denkert et al., 2008; Dunn et al., 2011). Существует и с каждым годом набирает популярность программное обеспечение, позволяющее проецировать масс-спектрометрические данные непосредственно на метаболические пути. В данном случае идентификация метаболитов по масс-спектрометрическим данным происходит автоматически внутри программного обеспечения. К таким программам относится MassTRIX (Mass TRanslator into Pathways; [www.masstrix.org](http://www.masstrix.org); German Research Center for Environmental Health) (Suhre and Schmitt-Kopplin, 2008). Следует отметить, что проецирование масс-спектрометрических данных плазмы крови на метаболические пути, как правило, не дает результатов, поэтому в данной диссертационной работе не проводилось.

## **2.7 Идентификация метаболитов**

### **2.7.1 Библиотеки масс-спектров для ГХ-МС**

Масс-спектрометрические библиотеки для ГХ-МС являются одними из самых полных библиотек, так как появились в числе самых первых и интенсивно пополняются уже в течение 25 лет. Самые крупные из подобных библиотек уже насчитывают более полумиллиона масс-спектров. Интерес к созданию библиотек для ГХ-МС объясняется высокой информативностью и воспроизводимостью масс-спектров развала веществ в результате электронного удара, который обычно

применяется только для поступающих из ГХ газообразных веществ. Наиболее крупными библиотеками масс-спектров являются библиотека Palisade (более 600 тыс. спектров), библиотека Национального Института Стандартов и Технологии США (более 200 тыс. спектров) и библиотека Wiley (~400 тыс. спектров). Существуют также специализированные библиотеки, содержащие масс-спектры метаболитов определенных биологических объектов. Например, в рамках проекта Golm Metabolome Database (GMD) была создана публичная библиотека масс-спектров метаболитов растений (Schauer et al., 2005). Эта библиотека также содержит время задержки метаболитов на хроматографической колонке (MSRI библиотека), что способствует повышению достоверности идентификации метаболитов с идентичными молекулярными массами. Примером свободно распространяемого программного обеспечения, позволяющего проводить идентификацию вещества по масс-спектру и времени задержки вещества на хроматографической колонке, является программа AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System), созданная Национальным Институтом Стандартов и Технологии США (Stein, 1999).

### **2.7.2 Библиотеки масс-спектров для ВЭЖХ-МС**

Масс-спектрометрические библиотеки для идентификации низкомолекулярных веществ с применением ВЭЖХ-МС в большинстве случаев созданы для электроспрейного источника ионизации, который позволяет получить нефрагментированные (или слабофрагментированные) положительно и отрицательно заряженные квазимолекулярные ионы. В некоторых случаях, с целью идентификации, технически возможно провести фрагментацию анализируемых веществ непосредственно в электроспрейном источнике ионизации. Однако в большинстве случаев фрагментация анализируемых веществ проходит в столкновительной ячейке масс-спектрометра при столкновении с инертным газом. К сожалению, существенным недостатком развала веществ в столкновительной ячейке является значительная вариабельность масс-спектров

фрагментов развала, которые зависят как от типа масс-спектрометра, так и от его технических особенностей и условий получения спектров (Bristow et al., 2004; Jansen et al., 2005). Как следствие, не существует универсальных масс-спектрометрических библиотек для ВЭЖХ-МС, как это можно наблюдать для ГХ-МС систем. Однако было предложено несколько вариантов решения этой проблемы. Первый вариант, это создание библиотек масс-спектров с использованием химических стандартов и калибрантов, с целью максимально стандартизировать условия получения масс-спектров (Lemire and Busch, 1996). Второй вариант, это получение усредненных масс-спектров по данным масс-спектров, полученных при разных условиях (Hopley et al., 2008; Josephs and Sanders, 2004). В последнее время получило распространение продажа масс-спектрометров с масс-спектрометрической библиотекой, полученной на идентичном приборе. Наглядным примером тому являются гибридные квадруполь-времяпролетные масс-спектрометры фирмы Agilent (США), продаваемые вместе с масс-спектрометрической библиотекой метаболитов, полученной на таком же масс-спектрометре. Таким образом, несмотря на трудности, масс-спектрометрические библиотеки для ВЭЖХ-МС продолжают пополняться и все чаще используются в метаболомных исследованиях. Среди них наиболее известными и применяемыми в метаболомике являются библиотека масс-спектров Национального Института Стандартов и Технологии США, содержащая более 5 тыс. спектров фрагментации веществ для тройных квадрупольей и ионных ловушек, библиотека масс-спектров METLIN (<http://metlin.scripps.edu/>)(Smith et al., 2005), полученных на квадруполь-времяпролетных масс-спектрометрах, библиотека Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca>) и библиотека MassBank (<http://www.massbank.jp>). Для улучшения идентификации метаболитов по масс-спектру развала рекомендуется дополнительно использовать время задержки метаболита на хроматографической колонке (Pelander et al., 2003). Подробно описание характеристик масс-спектрометрических библиотек можно прочитать в обзоре Halket и совт. (Halket et al., 2005).

### **2.7.3 Стандарт идентификации метаболитов в метаболомных исследованиях**

Инициатива по определению стандартов по метаболомике (Metabolomics Standards Initiative – MSI) была задумана в 2005 году (Fiehn et al., 2007; Castle et al., 2006). Первые усилия MSI были направлены на согласование стандартов для представления данных, которые включали четкое описание изучаемой биологической системы и детальное описание всех компонентов метаболомных исследований (Hardy and Taylor, 2007; Fiehn et al., 2006). Цель стандартизации состояла в том, чтобы накапливаемые в метаболомных исследованиях данные были доступны широкому кругу исследователей и при необходимости могли быть повторно использованы (Salek et al., 2013). Было организовано пять рабочих групп, среди которых была группа химического анализа, которая предложила минимальный перечень информации необходимый для представления результатов химического анализа, включая набор требований к данным, связанным с идентификацией метаболитов (Sumner et al., 2007; Goodacre et al., 2007; Morrison et al., 2007). Согласно данным требованиям для метаболомного анализа выделяют четыре уровня достоверности результатов идентификации низкомолекулярных веществ:

- Уровень 1 – идентифицированные вещества;
- Уровень 2 – предположительно аннотированные вещества (putatively annotated compounds);
- Уровень 3 – предположительно охарактеризованные классы вещества (putatively characterised compound classes);
- Уровень 4 – неизвестные вещества.

Идентификация уровня 1 соответствует достоверной идентификации вещества, которая требует, чтобы два или более независимых свойства идентифицируемого вещества были подтверждены путем анализа химического

стандарта вещества и сравнены с данными метаболомного анализа, полученными в той же самой лаборатории тем же самым аналитическим методом.

Идентификация уровня 2 не требует соответствия данных по стандартному веществу, полученных в той же самой лаборатории. Сравнение происходит с физико-химическими свойствами вещества, содержащимися в базе данных, и поэтому результаты идентификации классифицируют не как идентификация, а как предположительная аннотация вещества.

Идентификация уровня три указывает на то, что по физико-химическим свойствам аннотируется только химический класс вещества.

Четвертый уровень указывает на то, что соответствие идентифицируемому веществу в базе данных не найдено, тем не менее, вещество четко определяется на основе спектральных данных.

При уровнях 2 и 3 идентификация масс-спектрометрических пиков метаболитов осуществляется путем сопоставления их свойств с данными метаболитов в базе данных (например, в базе "Human Metabolome Database" (<http://www.hmdb.ca>) или базе Metlin (Scripps Center for Mass Spectrometry, США; <http://metlin.scripps.edu>)). Для идентификации по набору масс фрагментов вещества существует метрика достоверности идентификации (показатели Fit, Rfit и Purity).

Определение уровня идентификации метаболита, например как идентифицированного или аннотированного, чрезвычайно важно, так как это показывает на ценность результатов метаболомного анализа (Salek et al., 2013).

Независимыми свойствами метаболитов, наиболее часто используемыми при их идентификации с применением масс-спектрометрии, являются:

1) *Точно измеренная молекулярная масса вещества (accurate mass tag)*. Обычно данную характеристику можно использовать для идентификации вещества, если измерение молекулярной массы произведено с точностью 2 ppm или более точно.

2) *Изотопное распределение вещества (isotopic pattern)*. Изотопное распределение является специфичным для элементного состава вещества.

Соответствие изотопного распределения вещества в масс-спектре веществу с известным элементным составом позволяет повысить достоверность идентификации.

3) *Набор масс фрагментов вещества (MS-MS)*. Это свойство позволяет достоверно идентифицировать вещество и может использоваться как самостоятельно, так и дополнять другие способы идентификации. Метод заключается в том, что при воздействии на вещество в масс-спектрометре достигается его развал на фрагменты, которые специфичны, т.к. соответствуют развалу исходной структуры анализируемого вещества.

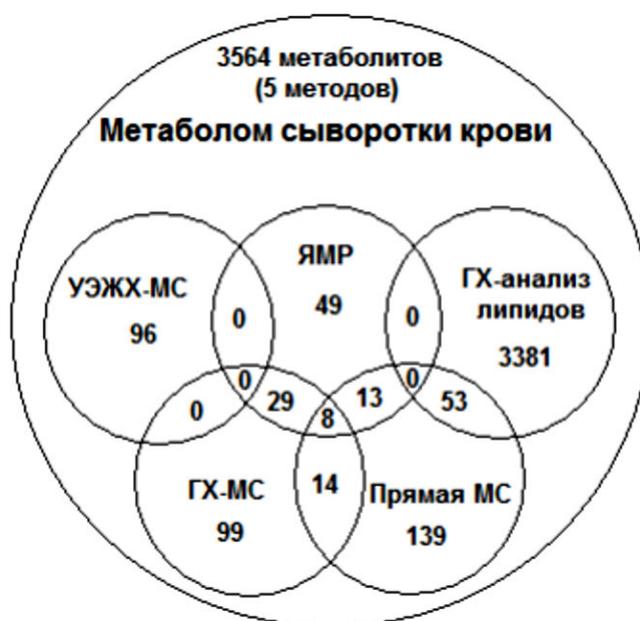
4) *Специфические массы фрагментов вещества*. Данное свойство используют при идентификации веществ, известной как мониторинг множественных реакций (multiple reaction monitoring – MRM). Отличие от предыдущего подхода в том, что среди фрагментов развала определяют по массе только определенные фрагменты (обычно один или два фрагмента), высокоспецифичных для конкретного вещества, и которые в совокупности с массой материнского иона идентифицируют вещество.

5) *Время удержания вещества на хроматографической колонке (retention time)*. Данное свойство позволяет повысить достоверность идентификации вещества, но не используется при прямой масс-спектрометрии.

## 2.8 Метаболом человека

В медицине кровь является объектом глубокого исследования уже более 75-ти лет (Dunn et al., 2015; Psychogios et al., 2011). В результате этого, сегодня в лабораторной диагностике проводят измерение концентрации более чем 20 метаболитов крови. Среди них холестерин, мочеви́на, триглицериды, билирубин, креатинин, глюкоза, мочева́я кислота и т.д. (так называемый общий биохимический анализ крови). До начала 21 века были измерены референсные значения для 100 метаболитов крови (Burtis, 2008). В начале 2000-х годов исследования отдельных метаболитов, связанных с заболеваниями, постепенно стали замещаться метаболомными исследованиями тканей и биологических жидкостей человека. С целью полной идентификации и количественного измерения всех метаболитов человеческого организма в 2004 году был инициирован международный проект – Human Metabolome Project (HMP) (<http://www.hmdb.ca>). В результате реализации этого проекта были идентифицированы и количественно определены тысячи метаболитов в различных биологических жидкостях организма, которые были размещены в публичной базе данных Human Metabolome Database (HMDB) (Wishart et al., 2009; Wishart et al., 2007). На сегодняшний день база содержит сведения почти о 8 тыс. метаболитах, представленных в организме человека в широком диапазоне концентраций (от менее чем  $10^{-9}$  М, до более чем  $10^{-6}$  М) (<http://www.hmdb.ca>). Позднее также была создана база данных метаболитов сыворотки крови (Serum Metabolome Database (SMDB), <http://www.serummetabolome.ca>), в которую внесены опубликованные экспериментальные данные о 4229 метаболитах сыворотки крови, с указанием соответствующей им концентрации и связи с заболеваниями человека (Psychogios et al., 2011). Создателями базы данных SMDB также был проведен анализ 149 образцов сыворотки крови здоровых людей и пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями различными методами метаболомного анализа: 1) ЯМР; 2) ГХ-МС; 3) УЭЖХ-МС; 4) TLC/GC-FIDMS (профилирование липидов); 5) прямой МС анализ. Всего перечисленными методами было идентифицировано 3564

метаболитов сыворотки крови. Результаты данной работы представлены на рисунке 8.



**Рисунок 8.** Распределение результатов идентификации метаболитов в 149-и образцах сыворотки крови здоровых людей и пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями пятью разными методами. Адаптировано из (Psychogios et al., 2011).

Из рисунка видно, что больше всего низкомолекулярных веществ в сыворотке крови было идентифицировано ГХ, ориентированной на анализ липидов (TLC/GC-FIDMS) – 3381, и меньше всего – ЯМР спектроскопией – 49. То есть применение целевого метода позволяет значительно увеличить количество идентифицируемых метаболитов за счет увеличения ширины динамического диапазона измерения концентраций наиболее представленного в крови класса низкомолекулярных веществ (липидов). В то же время "нецелевой" анализ на основе ЯМР и прямой МС позволяют анализировать значительно меньшее количество метаболитов. 29 метаболитов были идентифицированы и ЯМР и ГХ-

МС и всего 8 метаболитов тремя методами – ЯМР, ГХ-МС и прямой МС. При этом ни одного соединения не удалось идентифицировать всеми пятью методами, что объясняется различиями в пробоподготовке, протоколе разделения метаболитов и чувствительности приборов (Трифонова, Лохов и Арчаков, 2014).

Из данной работы также следует, что хотя применение ЯМР спектроскопии и ГХ-МС дает больше информации о гидрофильных метаболитах, ВЭЖХ-МС и прямая МС больше подходят для анализа метаболитов сыворотки крови благодаря высокой чувствительности детекции (Psychogios et al., 2011). Однако, учитывая время, затрачиваемое на анализ, можно утверждать, что прямой масс-спектрометрический анализ является наиболее высокопроизводительной технологией для исследования метаболомного профиля крови, что важно в случае анализа большого количества образцов, в особенности при ориентации исследований на создание метода лабораторной диагностики. Это связано, прежде всего с тем, что невозможно сохранить высокую воспроизводимость анализа большого количества образцов в течение довольно длительного периода при использовании ГХ и ВЭЖХ из-за хроматографического сдвига и других инструментальных погрешностей, существенно влияющих на результаты (Barrett, 2012; Lin et al., 2010; Трифонова, Лохов и Арчаков, 2014).

## **2.9 Липидомика**

Липидомика – раздел метаболомики, занимающийся количественным анализом всего разнообразия липидов (липидома) биологических объектов (Лохов и соавт., 2015). Выделение липидомики в отдельное направление не случайно, оно объясняется особой ролью липидов, как класса низкомолекулярных веществ, в организации живых систем. Липиды интегрированы практически во все процессы, протекающие в организме человека, в том числе являются источником энергии и принимают активное участие в энергетическом обмене; являются основным структурным элементом клеток (формируют мембраны), обеспечивают микроокружение мембранным белкам, необходимое для их функционирования;

выполняют транспортную функцию для гидрофобных и амфифильных веществ, являются гормонами и вторичными мессенджерами (Torkhovskaya et al., 2007; Murphy et al., 2013; Oresic et al., 2008).

Подобная интеграция липидов в структурные, энергетические, биохимические и регуляторные блоки живых систем позволяет рассматривать липидом как привлекательный объект исследования, с целью обнаружения как отдельных биомаркеров заболеваний, так и выявления паттернов в липидном составе, которые специфичны для тех или иных заболеваний. В особенности это касается исследования липидома крови, как наиболее доступного для диагностики биоматериала. Так, проведенные исследования показали, что липиды являются потенциальными биомаркерами таких заболеваний, как различные виды рака (Min et al., 2011; Dong et al., 2010; Gorke et al., 2010; Lokhov et al., 2010a; Lokhov et al., 2010b), сахарный диабет (Han et al., 2005; Han et al., 2007), атеросклероз (Thomas et al., 2011; Ekroos et al., 2010), гипертензия (Graessler et al., 2009; Kulkarni et al., 2013), ожирение (Pietilainen et al., 2007; Müller et al., 2012) и т.д. Ссылки на библиографию по классам липидов, изменение концентраций которых может служить биомаркером заболеваний, представлены в Таблице 1.

**Таблица 1.** Липиды, как потенциальные биомаркеры различных заболеваний (Лохов и соавт., 2015).

Заболевание	Липидный биомаркер	Заболевание	Липидный биомаркер
Рак простаты	Фосфатидилхолины (Min et al., 2011; Zhou et al., 2012; Patel et al., 2014) Лизофосфатидилхолины (Zhou et al., 2012) Фосфатидилэтаноламины (Zhou et al., 2012) Сфингомиелины (Zhou et al., 2012) Стероидные гормоны (Lokhov et al., 2010b)	Сахарный диабет	Фосфатидилхолины (Floegel et al., 2013; Shui et al., 2011) Лизофосфатидилхолины (Floegel et al., 2013; Ha et al., 2012; Wang-Sattler et al., 2012) Фосфатидилэтаноламины (Shui et al., 2011; Nakagawa et al., 2005) Сфингомиелины (Floegel et al., 2013) Холестерин (al-Muhtaseb et al., 1991) Своб. жирные кислоты (Shelgikar et al., 1997; Berrish et al., 1993; Xu et al., 2012) Простагландины (Gopaul et al., 1995) Триглицериды (Xu et al., 2012)
Рак груди	Лизофосфатидная кислота (Min et al., 2010; Qiu et al., 2013) Фосфатидилинозитолы (Min et al., 2010) Фосфатидилхолины (Qiu et al., 2013; Kim et al., 2009)	Эндометриоз яичников	Фосфатидилхолины (Vouk et al., 2012) Сфингомиелины (Vouk et al., 2012)
		Гепатит	Фосфатидилхолины (Chen et al., 2013)

	Лизофосфатидилхолины (Qiu et al., 2013) фосфатидилэтанолламины (Dohi et al., 2013; Cifková et al., 2014) Фосфатидилсерины (Min et al., 2010) Сфингомиелины (Qiu et al., 2013) Эстрогены (Xu et al., 2007)	Цирроз печени	Сфингомиелины (Chen et al., 2013)
Рак яичников	Лизофосфатидная кислота (Bese et al., 2010; Sedlakova et al., 2011; Pua et al., 2009; Sedlakova et al., 2008) Лизофосфатидилхолины (Okita et al., 1997; Kim et al., 2014)	Гормональные нарушения	Липидные гормоны (андрогены, эстрогены и т.д.) (Honour et al., 2009)
Рак печени	Лизофосфатидная кислота (Ikeda et al., 2013) Лизофосфатидилхолины (Chen et al., 2013; Ressom et al., 2012) Эфиры холестерина (Chen et al., 2013) Триглицериды (Chen et al., 2013)	Панкреатит	Свободные жирные кислоты (Marosvolgyi et al., 2010; Khan et al., 2012)
Рак легкого	Свободные жирные кислоты (Zuijdggest-van Leeuwen et al., 2002; Zhang et al., 2014) Фосфолипиды (Dong et al., 2010)	Хроническая почечная недостаточность	Холестерин (Cabarkapa et al., 2012; Kaysen et al., 1994) Триглицериды (Cabarkapa et al., 2012; Kaysen et al., 1994)
Рак поджелудочной железы	Свободные жирные кислоты (Zuijdggest-van Leeuwen et al., 2002; Jansen et al., 2014) Фосфатидилинозитол (Beger et al., 2006)	Бронхиальная астма	Лейкотриены (Syslova, K., et al., 2013; Liu and Yokomizo, 2014) Простагландины (Bochenek et al., 2004; Bartminski et al., 2014)
Атеросклероз	Лизофосфатидная кислота (Dohi et al., 2013; Byeon et al., 2013) Фосфатидилхолины (Byeon et al., 2013) Фосфатидилэтанолламины (Byeon et al., 2013) Сфингомиелины (Thomas et al., 2010) Холестерин (Nigg and Gutzwiller, 1995; Tchai 1993) Своб. жирные кислоты (Lafontan, 2013; Imamura et al., 2012; Shah et al., 2012) Фосфатидилсерины (Thomas et al., 2010)	Болезнь Альгеймера	Сфинголипиды (Alekseenko, 2013; Mielke and Lyketsos, 2010; Mielke et al., 2010; Han et al., 2011) Стероиды (Smith et al., 2006)
		Депрессивные состояния	Фосфатидилхолины (Demirkan et al., 2013) Сфинголипиды (Demirkan et al., 2013)

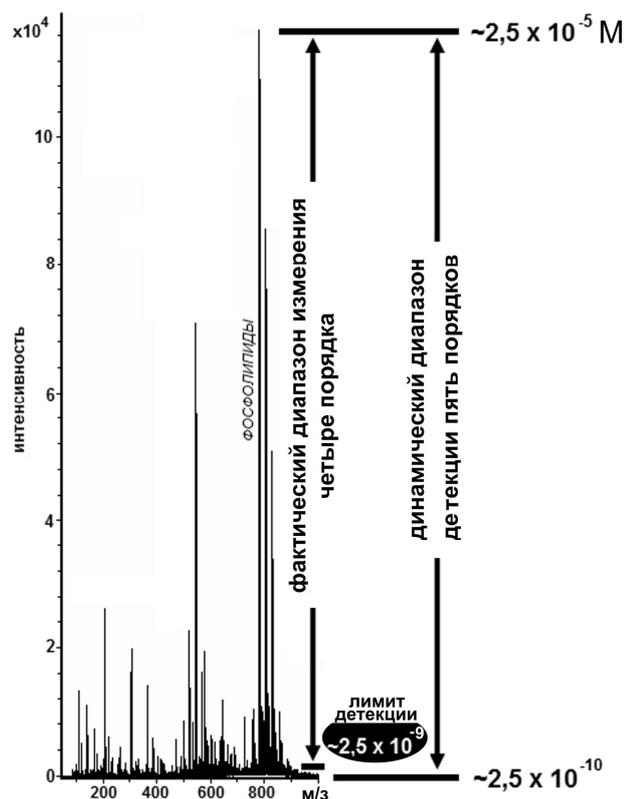
Таким образом, накопленные данные касательно диагностического потенциала липидов, показывают, что за счет анализа липидного состава крови можно повысить эффективность лабораторной диагностики заболеваний. К сожалению, отсутствие идентификации отдельных классов липидов в применяемых сейчас на практике методах диагностики, не позволяет использовать весь диагностический потенциал, заложенный в липидном составе плазме крови (Лохов и соавт., 2015). Однако, развитие метаболомных технологий, в том числе применяемых в липидомике и основанных на масс-спектрометрии, привело к появлению новых методов, позволяющих быстро и с высокой точностью исследовать молекулярный состав любого биологического образца (Bogyo and Rudd, 2013).

Наиболее распространенным аналитическим методом в липидомике, как и во всей метаболомике, является масс-спектрометрия, детальное описание применения которой для исследования метаболома уже описано в данном обзоре. Касательно же липидома, применение масс-спектрометрии позволяет провести анализ плазмы крови с детализацией всего молекулярного разнообразия входящих в нее липидов (Sung et al., 2013). Следует отметить, что в липидомных исследованиях масс-спектрометрический анализ, как правило, применяется совместно с высокоэффективной жидкостной или газовой хроматографией, что позволяет выполнить разделение липидов перед собственно масс-спектрометрическим анализом. Однако, как уже упоминалось выше, в условиях клинической диагностики, а соответственно и для научно-исследовательских работ, ориентированных на создание новых методов лабораторной диагностики, наиболее перспективным является использование прямого масс-спектрометрического анализа, который подразумевает непосредственное внесение анализируемого биоматериала в источник ионизации масс-спектрометра (Dettmer et al., 2007; Christians et al., 2011). Поэтому, далее в данной главе, будет уделено основное внимание именно этому подходу. Следует отметить, что используемый в диссертационной работе протокол анализа метаболома плазмы крови ориентированы именно на приоритетную детекцию липофильных веществ (см. "Пробоподготовка образцов плазмы крови для метаболомного исследования рака простаты", "Пробоподготовка образцов плазмы крови для метаболомного исследования рака легкого", "Пробоподготовка образцов плазмы крови для метаболомного исследования нарушенной толерантности к глюкозе" в разделе "Методы исследования"), что согласно литературным данным является оправданным, так как липофильная фракция крови обладает наиболее высоким диагностическим потенциалом. Более того, именно липиды крови являются основной фракцией низкомолекулярных веществ плазмы крови, анализируя которую возможно наиболее полно задействовать диагностический потенциал метаболома плазмы (Лохов и соавт., 2015). В свете этого закономерно наличие

множества липидов в результатах диссертационной работы, задействованных в разработке диагностики заболеваний (например, в Табл. 7 и Табл. 14).

Наиболее оптимальным способом ионизации низкомолекулярных веществ плазмы крови, включая липиды, является электроспрейный метод. Данный метод является "мягким" способом ионизации, что снижает развал липидов в ЭИИ и совместим с анализом как полярных (глицерофосфолипиды и сфинголипиды), так и неполярных (стеролы и триглицериды) липидов (Isaac, 2011; Han and Gross, 2005). Пример масс-спектра, полученного прямой инъекцией липидной фракции (протокол пробоподготовки с осаждением белков метанолом и непосредственным анализом растворенных в метаноле низкомолекулярных веществ) в источник ионизации масс-спектрометра, представлен на рисунке 9. Подобный масс-спектрометрический анализ позволяет детектировать до 15000 ионов низкомолекулярных веществ крови, большая часть которых представляет собой различные классы липидов (липидом).

Динамический диапазон детекции липидных веществ в данном случае на 1-2 порядка ниже, чем при использовании ВЭЖХ-МС и ГХ-МС систем. Это связано с самим принципом метода прямого ввода – одновременный ввод всех низкомолекулярных веществ крови без какого-либо их предварительного разделения. На масс-спектре, приведенном на рисунке 9, наиболее интенсивными пиками в масс-спектре являются пики фосфолипидов, общая концентрация которых в сыворотке крови  $\sim 2,5 \times 10^{-3}$  М. При этом наиболее интенсивный пик масс-спектра соответствует молекулярным видам фосфатидилхолина (ФХ) с концентрацией  $\sim 2,5 \times 10^{-5}$  М (Лохов и соавт., 2015).



**Рисунок 9.** Динамический диапазон и лимит детекции концентраций липофильных веществ при прямой масс-спектрометрии плазмы крови. Масс-спектр липофильной фракции низкомолекулярных веществ плазмы крови (липидом плазмы крови) получен прямой инъекцией депротеинезированной метанолом плазмы крови в электроспрейный источник ионизации квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра (MicrOTOF-Q, Bruker Daltonics). Диапазон детекции масс ионов веществ  $m/z$  50-1000. Адаптировано из (Лохов и соавт., 2013).

Динамический диапазон детекции масс веществ на масс-спектрометре (например, на MicrOTOF-Q, Bruker Daltonics) составляет не менее пяти порядков. Таким образом, предел детекции при прямой масс-спектрометрии низкомолекулярных веществ плазмы крови составляет  $\sim 2,5 \times 10^{-10}$  М (Рис. 9). Фактический диапазон измерения концентраций липидов еще меньше. Наличие «химического шума», возникающего в результате детекции сигналов от нецелевых ионов (ионы растворителя и различных примесей), является тому причиной.

Сигналы, имеющие значения интенсивности, не превышающие шум, не могут быть детектированы. Это уменьшает «рабочий» диапазон измеряемых концентраций веществ не менее чем на 1 порядок. В результате липиды только в концентрации  $>2,5 \times 10^{-9}$  М доступны для измерения прямой масс-спектрометрией, что согласуется с другими источниками данных, хотя и может варьировать в зависимости от "мощности" используемого масс-спектрометра. Так, в научном исследовании рака простаты при прямом масс-спектрометрическом анализе метаболитов плазмы крови, были идентифицированы липиды, концентрация которых была  $1 \times 10^{-9}$  М (Zhou et al., 2012), что можно считать пределом чувствительности детекции липидов данным методом.

Другим немаловажным показателем, характеризующим и во многом лимитирующим возможности прямой масс-спектрометрии при анализе липидов, является их способность к ионизации в ЭИИ масс-спектрометра. Уровень масс-спектрометрического сигнала находится в прямой зависимости от способности анализируемого вещества ионизироваться, т.е. присоединять ион (в случае измерения веществ в режиме детекции положительно заряженных ионов) или отдавать ион (в случае измерения веществ в режиме детекции отрицательно заряженных ионов). В данном случае показателен пример с масс-спектрометрическим измерением холестерина. Свободный холестерин при концентрации в крови  $5 \times 10^{-3}$  М в масс-спектре липидома плазмы крови, полученного прямой масс-спектрометрией, имеет еле заметный пик, что объясняется его слабой способностью ионизироваться (Liebisch et al., 2006). Поэтому для масс-спектрометрического изучения холестерина используют более жесткие методы ионизации или предварительно его этерифицируют, получая его более легко ионизируемые эфиры (сульфаты, ацетаты и т.д.). На рисунке 9 видно, что фосфолипиды напротив, являются хорошо ионизирующимися веществами, так как представлены в масс-спектре высокоинтенсивными пиками.

В контексте лабораторной диагностики, особо стоит отметить имеющиеся возможности при масс-спектрометрической детализации липидного состава крови до их отдельных классов и молекулярных видов. Так, фосфолипиды различаются

по составу остатков жирных кислот, которые имеют различный молекулярный вес. В результате масс-спектрометрический анализ выявляет разнообразные молекулярные виды фосфолипидов, некоторые из которых специфичны для различных заболеваний. Так концентрация в крови отдельных классов фосфолипидов четко коррелирует с развитием колоректального рака (Zhao et al., 2007). Такая же ситуация наблюдается и в случае рака почки (Sullentrop et al., 2002), а именно, уровень снижения ЛизоФХ крови пропорционален степени развития заболевания. В работе Sherubin и соавт. показана взаимосвязь между уровнем общей фракции липидов, триглицеридов, липопротеидов высокой, низкой и очень низкой плотности и раком ротовой полости (Sherubin et al., 2013). Снижение уровня в крови фосфатидилхолина ( $\text{ФХ}^{16:0/16:1}$ ), фосфатидилэтаноламина ( $\text{ФЭ}^{20:1/20:4}$ ), лизоформы фосфатидной кислоты (ЛизоФК $^{16:1}$ ) происходит при ишемической болезни сердца. Здесь и далее первая цифра надстрочного шрифта указывает на длину углеродной цепи остатков жирных кислот, входящих в фосфолипид, вторая цифра указывает на количество ненасыщенных связей в этой цепи. При этом у тех же больных установлено повышение фосфатидилглицерола ( $\text{ФГ}^{20:2/16:0}$ ) и ЛизоФК $^{18:3}$  (Yueon et al., 2012). При раке простаты был найден ряд фосфолипидных биомаркеров, таких как ЛизоФХ $^{18:1}$ , ЛизоФХ $^{20:4}$ , ФХ $^{40:7}$ , одновременное определение которых позволяет в модельной системе диагностировать рак простаты с точностью 95,9% (Zhou et al., 2012). У больных раком легкого обнаруживают в крови специфические формы лизофосфатидилхолинов, в частности ЛизоФХ $^{16:0}$ , ЛизоФХ $^{18:0}$ , ЛизоФХ $^{18:1}$  и ЛизоФХ $^{18:2}$  (Dong et al., 2010). Следует также отметить, что в случае непосредственно липидных нарушений (например, гиперлипидемии) изменение липидного состава крови может являться прямым показателем состояния больного и основным критерием оценки эффективности лечения.

Таким образом, прямой масс-спектрометрический анализ низкомолекулярной фракции плазмы, которая преимущественно состоит из липофильных веществ, потенциально позволяет детектировать биомаркеры для целого ряда заболеваний, включая такие социально значимые заболевания как

сахарный диабет, атеросклероз, болезнь Альцгеймера, онкологические заболевания и т.д. Технические характеристики прямого масс-спектрометрического анализа, такие как воспроизводимость и чувствительность, позволяют рассматривать его как перспективный и пригодный для внедрения диагностический метод, поэтому данному подходу было обосновано уделено основное внимание при дизайне методической части диссертационной работы.

Подход, реализованный в диссертационной работе на основе применения диагностических сигнатур, также имеет свои предпосылки и является одним из вариантов повышения эффективности диагностики. Так, было описано сочетанное измерение липидных и иных биомаркеров (Shan et al., 2012; Fernandis and Wenk, 2009), позволяющее в некоторых случаях существенно повысить показатели диагностики заболеваний. К примеру, сочетанное измерение в крови биомаркера СА-125 и анализ молекулярных видов фосфолипидов крови позволило достичь точности диагностики рака яичника, равной 82% (Fernandis and Wenk, 2009).

## **2.10 Метаболомный анализ крови в медицинских исследованиях**

Метаболомный анализ крови, несомненно, играет огромную роль в исследованиях по диагностике заболеваний и изучению патологий организма. За последние несколько лет значительно выросло количество метаболомных исследований с целью поиска в крови новых биомаркеров социально значимых заболеваний, включая онкологические, сердечно-сосудистые, эндокринные и нейродегенеративные заболевания (Трифенова и соавт., 2014; Lokhov et al., 2012; Kaddurah-Daouk and Krishnan 2009; Sabatine et al., 2005; Lokhov et al., 2010b; Wang et al., 2011). Метаболический анализ образцов крови женщин с ранней стадией эпителиального рака яичника, пациенток с кистой яичника и здоровых женщин позволил дифференцировать все три группы друг от друга (Odunsi et al., 2005). Метаболическое исследование образцов крови больных раком простаты выявило 6 метаболитов, позволяющих диагностировать рак с точностью существенно выше, чем тест на простатический специфический антиген (ПСА-тест) (Lokhov et al.,

2010b). Сравнительный метаболомный анализ сыворотки крови 17 пациентов с острой почечной недостаточностью и контрольной группы показал различия в уровне аминокислот, ацилкарнитинов и лизофосфатидилхолинов (Sun et al., 2012; Schiffl and Lang, 2012). Метаболомный анализ крови 36 пациентов, 18 из которых страдали ишемией, до и после физической нагрузки показал статистически достоверные отличия в уровне 6 метаболитов, относящихся к циклу лимонной кислоты (Sabatine et al., 2005; Vodi et al., 2013). Таким образом, проведенные работы показали, что найденные и идентифицированные в спектрах метаболиты позволяют эффективно дифференцировать больных пациентов от здоровых людей (Трифонова и соавт., 2014).

Кроме диагностики уже развившихся заболеваний метаболомный состав крови может служить и для оценки риска развития болезни в будущем. Метаболический анализ крови 189 пациентов, у которых в течение 12 лет развился диабет, в сравнении со здоровыми людьми, позволил выявить пять аминокислот – изолейцин, лейцин, валин, тирозин и фенилаланин – коррелирующих с развитием диабета в будущем (Wang et al., 2011; Lu et al., 2013). Принимая во внимание, что большинство биохимических процессов в организме связаны между собой, и каждый метаболомный анализ выявляет набор ассоциированных с болезнью метаболитов, становится очевидным, что для повышения точности диагностики необходимо использовать совокупность метаболитов-биомаркеров, что позволит аккумулировать их диагностический потенциал (Трифонова и соавт., 2014). Подобное наблюдение является неоспоримой предпосылкой для внедрения метаболомного анализа крови в качестве клинического лабораторного теста.

Одним из прикладных направлений метаболомики в медицине является фармакометабономика, которая ориентированна на изучение метаболических данных, связанных с ответом организма пациента на действие лекарственного вещества. Основанием для такого подхода является то, что метаболом, являясь совокупностью всех низкомолекулярных веществ организма, естественным образом отражает (Lindon et al., 2006; Assfalg et al., 2008; Jia et al., 2008; Kaddurah-Daouk et al., 2008; Schnackenberg and Beger, 2008; Gutiu, 2010):

- "реализованную" в молекулярном фенотипе генетическую информацию релевантную лекарственной терапии;
- данные об интенсивности катаболизма ксенобиотиков в организме;
- данные о клиренсе продуктов распада ксенобиотиков;
- данные о протекании биохимических процессов, включая процессы, являющиеся мишенью лекарственной терапии.

Таким образом, метаболический профиль, изучаемый фармакометабономикой, содержит всю информацию необходимую для расчета эффективной дозы лекарственного средства для конкретного больного (Gutiu et al., 2010; Nicholson et al., 2011), учитывающую не только особенности индивидуальной фармакокинетики лекарственного вещества, но и ответ организма на него (Рис. 10).



**Рисунок 10.** Факторы, влияющие на "ответ" организма на лекарственное вещество (Лохов и соавт., 2014а; Lokhov et al., 2014а).

Впервые возможность применения фармакометабономики в практической медицине описана Clayton и соавт. (Clayton et al., 2009). Исследователями было

выдвинуто предположение о возможном предсказании характера метаболизма вводимого фармакологического препарата по анализу метаболического профиля пациента еще до введения лекарства в организм (Gutiu et al., 2010). В качестве фармакологического вещества был взят парацетамол. Выбор именно этого препарата был основан на том, что парацетамол широко применяется в лечебной практике, обладает низкой токсичностью, процесс его метаболизма достаточно хорошо изучен, а продукты распада быстро выводятся с мочой.

В ходе эксперимента были отобраны 99 здоровых не курящих и не принимающих никаких лекарств взрослых добровольцев. У каждого из них был взят анализ мочи до и после приема парацетамола. В каждой пробе был измерен уровень сульфонов и глюкуронидов парацетамола и их соотношение. Анализ метаболического профиля пробы до введения в организм парацетамола позволил выявить наличие в моче некоторых обследуемых большого количества п-креозола (продукт жизнедеятельности бактерий, обитающих в кишечнике). В ходе дальнейшего исследования выяснилось, что высокий уровень п-креозола в первоначальной пробе (до введения парацетамола) четко коррелирует со снижением уровня сульфонов во второй пробе (после введения парацетамола). Соответственно, соотношение сульфонов и глюкуронидов парацетамола во второй пробе так же уменьшалось. На основании этих результатов авторы пришли к выводу о том, что п-креозол и парацетамол являются конкурентными субстратами, что и привело к изменению метаболизма введенного лекарственного препарата. Важный вывод, который сделали авторы, проанализировав полученные результаты, заключается в том, что критерием изменения метаболизма вещества, в частности парацетамола, еще до его введения в организм, может выступать соотношение различных метаболитов между собой. Таким образом, была показана возможность подбора индивидуальной дозы лекарства для каждого из исследуемых пациентов. Подобный подход позволил другой группе исследователей предложить аналогичный подбор индивидуальной дозы для других лекарственных препаратов, важную роль в метаболизме которых играет сульфирование (введение сульфогруппы  $-\text{SO}_3\text{H}$ ): миноксидил (minoxidil),

тамоксифен (tamoxifen) и т.д., что и было в дальнейшем подтверждено (Gutiu et al., 2010).

Вывод, который можно сделать на основании этих научных работ, говорит о том, что отдельные метаболиты, их совокупность или их соотношение в пробе позволяют предсказать картину изменения метаболизма вводимых фармакологических препаратов, что делает возможным использование анализа метаболического профиля биологических жидкостей пациента (кровь, моча) при выборе индивидуальной дозы лекарственного средства еще до его применения.

### **2.11 Проблематика внедрения "омных" диагностических методов в медицину**

В научных публикациях показано множество примеров применения "омных" технологий в медицинских целях, результаты которых являются многообещающими в случае их внедрения (Evolution of Translational Omics: Lessons Learned and the Path Forward. Committee on the Review of Omics-Based Tests for Predicting Patient Outcomes in Clinical Trials. National Academies Press, 2012). Практически каждое метаболомное исследование крови, направленное на диагностику заболеваний, является успешным; точность диагностики при этом достигает 90-95% (Trifonova et al., 2013). Однако, несмотря на большие перспективы применения "омных" тестов в клинике, их внедрение проходит крайне медленно. Связывают это с тем, что путь от создания прототипа "омного" диагностического метода до его реализации в виде клинического анализа (т.н. "омного" теста) осложнен отсутствием регламентированных процедур и стандартов (IOM, 2007). Отсутствие стандартизированных протоколов и общепринятых критериев оценки эффективности данных тестов привело к тому, что некоторые ученые подвергли сомнению эффективность "омных" технологий, предполагая, что использование их в клинике будет бесполезным (Burke and Psaty, 2007). Другие ученые, считающие "омные" тесты перспективными для клиники,

наоборот, стали разрабатывать стратегию их внедрения, создавая необходимые стандарты и протоколы (Massonail et al., 2010).

Во многом такую стратегию определил случай, когда научным сообществом был поставлен вопрос правомерности применения "омных" тестов на людях. Исследователи Университета Дьюка (Duke University) использовали геномный тест для предсказания чувствительности пациентов к химиотерапевтическим препаратам. Результаты их работы вызвали всеобщий интерес. Однако вскоре Кейт Баггерли и Кевин Кумбс из Anderson Cancer Center обратились с критикой к сотрудникам Университета Дьюка, так как другие исследователи не смогли воспроизвести результаты этих тестов (Baggerly, 2011; PubMed 2006; Potti et al., 2011). Кейт Баггерли и Кевин Кумбс еще больше заострили внимание на этой проблеме, описав возможные ошибки в создании "омных" тестов, которые ведут к отсутствию воспроизводимости их результатов (Baggerly and Coombes, 2009). В июле 2010 года группой из 30-и уважаемых статистиков и биоинформатиков было отправлено письмо директору Национального Института Рака (National Cancer Institute – NCI, США), в котором была освещена существующая проблема с "омными" тестами (Baron et al., 2010).

Все эти события происходили уже на фоне использования ряда "омных" тестов в клинических испытаниях. Так, между октябрём 2007 года и апрелем 2008 года были начаты три клинических испытания в Университете Дьюка, в которых пациентам с раком легких и раком молочной железы была назначена химиотерапия на основе результатов "омных" тестов. После чего было обнаружено обращение к доктору Вармус из Института Медицины (Institute of Medicine – IOM), в котором был призыв к научному сообществу обратить внимание на упущенные моменты в создании "омных" тестов. При этом было отмечено, что "омные" технологии открывают большую перспективу для клиники, но также несут и существенные риски, если соответствующие протоколы не будут созданы и утверждены должным образом для применения на людях (Goldberg, 2011).

В результате вышеописанной активности ключевых игроков в разработке "омных" тестов, при поддержке NCI, Food and Drug Administration, Centers for Disease Control and Prevention, U.S. Department of Veterans Affairs, American Society for Clinical Pathology и College of American Pathologists, ИОМ был призван определить критерии и процесс оценки эффективности создаваемых для клиники тестов. ИОМ назначил комитет по рассмотрению "омных" тестов ("Committee on the Review of Omics-Based Tests for Predicting Patient Outcomes in Clinical Trials"), в состав которого вошли 20 участников, обладающих широким диапазоном знаний и опыта, включая экспертов "омных" технологий, клинических онкологов, биоинформатиков, специалистов по клинической патологии, этике, защите пациентов и созданию диагностических тестов. Результаты своей деятельности комитет представил в книге "Evolution of Translational Omics: Lessons Learned and the Path Forward", изданной в 2012 году (National Academies Press). В результате работы комитета были разработаны критерии для подготовки "омных" тестов к клиническим испытаниям на людях (McShane et al., 2013a; McShane et al., 2013b). Критерии охватывают вопросы создания протоколов сбора образцов, их анализа, биоинформационной обработки результатов, оценки эффективности, этические моменты применения тестов на людях и т.д. Создание "омных" тестов в соответствии с данными критериями, в частности написание стандартных протоколов, отражает современное представление о пути внедрения данных тестов в клиническую практику.

## **2.12 Проблема лабораторной диагностики заболеваний**

### **2.12.1 Проблема диагностики рака простаты**

Рак простаты одно из наиболее распространенных онкологических заболеваний у мужчин, которое в развитых странах является основной причиной смерти онкологических больных (IARC, 2012). Основная причина подобного положения состоит в том, что пациенты не имеют признаков этого заболевания на

ранних стадиях его развития и, соответственно, им своевременно не проводится лечение. Отмечено, что выживаемость пациентов с раком простаты увеличивается с 33%, когда диагноз ставится на поздних стадиях заболевания, до почти до 100% при ранней диагностике (Jemal et al., 2004). Применяемая лабораторная диагностика данного заболевания, основанная на измерении концентрации простатического специфического антигена (ПСА) в крови пациента, малоэффективна (Lein et al., 2003). Так, чувствительность диагностики составляет всего 21% (Ankerst and Thompson, 2006) и дает ложноположительные результаты при простатите и доброкачественной гиперплазии простаты (Nadler et al., 1995). Таким образом, одной из основных задач медицины сегодня является ранняя диагностика рака простаты.

Сегодня для создания методов ранней диагностики онкологических заболеваний ищут новые молекулярные биомаркеры (Carini, 2007) с помощью высокотехнологичных аналитических платформ, используемых в геномике, протеомике и метаболомике. Основная часть проведенных исследований при этом относится к первым двум основным наукам (Rajcevic et al., 2009; Ahmed, 2009; He and Chiu, 2003; Seo and Ginsburg, 2005; Emilien et al., 2000), метаболомный же подход, в частности создание "омных" тестов на основе измерения совокупности низкомолекулярных веществ в биообразце, на момент начала выполнения диссертационной работы не был проработан. Перспективность исследования низкомолекулярных веществ крови для создания метода диагностики рака простаты вытекает из накопленных научных данных. Так показана связь рака простаты с концентрацией в крови метаболитов, таких как стероидные гормоны, серотонин, аминокислоты, включая аспарагиновую кислоту, орнитин и т.д. (Osl et al., 2008; Siddiqui, 2006; Dizeyi, 2004). Серотонин согласно данным Siddiqui и соавт. (2006) и Dizeyi и соавт. (2004) действует на пролиферацию клеток рака простаты и играет важную роль в прогрессии опухоли. Известны также специфические изменения в концентрации свободных аминокислот крови, которые происходят, по-видимому, из-за изменений в метаболизме белков в опухоли, а также в печени и мышцах пациента (Lai et al., 2005). Увеличение

уровня аспарагиновой кислоты в крови пациентов с раком простаты может относиться к трансформации нормальных, продуцирующих цитрат, эпителиальных клеток в злокачественные клетки (Taylor et al., 2008). Развитие рака простаты может быть также ассоциировано с производными аминокислот. Так концентрация саркозина, являющегося метилированным по аминогруппе глицином, существенно повышается в моче в процессе развития рака простаты и его метастазировании (Sreekumar et al., 2009).

Изменения концентрации различных липидов в крови онкологических пациентов также хорошо известны. Так, изменение в уровне лизофосфолипидов происходит, по-видимому, из-за их связывания с G-белок связывающим рецептором, что ведет к его активации и, как следствие, росту и быстрой пролиферации раковых клеток. Это взаимодействие приводит к уменьшению концентрации лизофосфолипидов в крови, что может использоваться в диагностических целях (Murph et al., 2007). Так же известно, что развитие рака простаты часто связано с липидными гормонами, например андрогенами (Isbarn et al., 2009; Raynaud, 2009).

Таким образом, на сегодняшний день накоплены данные, показывающие, что развитие рака простаты имеет отражение в низкомолекулярной фракции крови и дальнейшее исследование в данном направлении позволит создать для данного заболевания диагностический лабораторный тест на основе профилирования метаболитов крови.

Известны различные протоколы метаболомного анализа плазмы (или сыворотки) крови больных онкологическими заболеваниями, включая рак простаты, которые основаны на применении тандемной масс-спектрометрии, газовой хроматографии, сопряженной с масс-спектрометром, имеющим ионизацию электронным ударом, и т.д. (Gowda et al., 2008; Osl et al., 2008; Xue et al., 2008). Полученные в данных работах результаты подтвердили перспективность метаболомного подхода в разработке лабораторной диагностики заболеваний. Однако данные методы анализа слишком сложны для создания метаболомного теста для диагностики рака простаты и больше подходят для

научного поиска биомаркеров заболеваний, нежели для непосредственного применения в лабораторной диагностике. Таким образом, сегодня остается актуальным разработка метаболомного анализа крови для диагностики рака простаты, в частности на основе прямой масс-спектрометрии (Dettmer et al., 2007), как методе наиболее подходящем для внедрения метаболомики в лабораторную практику.

### **2.12.2 Проблема диагностики и оценки риска возникновения рака легкого**

В России рак легкого является причиной смерти более чем 28% онкологических больных (Чиссов и соавт., 2013). При этом смертность от рака легкого превышает смертность от рака груди, простаты, толстого кишечника и поджелудочной железы вместе взятых (Cutler, 2008; Jemal et al., 2008). Одной из основных причин подобной статистики является то, что существующая и широко применяемая для выявления рака легкого рентгенологическая диагностика не пригодна для диагностики ранних стадий заболевания и, поэтому, существенно не влияет на статистику смертности (MacRedmond et al., 2004). Рак легкого диагностируют, когда лечение уже малоэффективно и более чем 75% пациентов не удается спасти (Coleman, 1999; Higashi et al., 2000; Higashi et al., 2000; Hicks et al., 2001; Higashi et al., 2003; Guo et al., 2004; Carrola et al., 2011). Следует отметить, что при сходной ситуации смертность от рака груди и рака простаты составляет менее 22% и 15%, соответственно (Jemal et al., 2008).

Лабораторная диагностика, основанная на детекции опухолевых маркеров рака легкого, характеризуется низкой чувствительностью. Так, по данным Гамбургской Группы по Стандартизации Опухолевых Маркеров чувствительность карциноэмбрионального антигена (CEA), фрагментов цитокератина 19 (CYFRA) и нейронспецифической энолазы (NSE), составляют всего 58%, 66%, и 59%, соответственно (Maeda et al., 1996; Stieber et al., 1999). Таким образом, любые позитивные изменения в области диагностики рака легкого, способные

существенно снизить смертность больных от данного заболевания, крайне востребованы.

Перспективность изучения метаболитов раковых клеток и низкомолекулярной фракции биологических жидкостей в открытии биомаркеров онкологических заболеваний показана рядом исследований. Установлено, что ключевые метаболические пути, включая гликолиз, пентозофосфатный путь, биосинтез нуклеотидов, биосинтез белков и метаболизм липидов, отличаются у опухолевых и нормальных клеток (Kroemer et al., 2008; Griffin et al., 2004; Philp et al., 2005). По существу, все метаболические пути, необходимые для клеточного роста и пролиферации, изменены в опухолевых клетках (Hagland et al., 2007). Таким образом, накопившийся фактический материал по метаболическим изменениям при клеточной трансформации указывает, что при применении современной аналитической платформы для анализа низкомолекулярных веществ крови, возможен качественный скачок в диагностике такого социально значимого заболевания, как рак легкого. Подобной аналитической платформой, несомненно, может являться основанный на масс-спектрометрии метаболомный анализ крови.

Актуальность оценки риска возникновения рака легкого продиктована отсутствием эффективной диагностики ранних стадий данного заболевания. Сегодня наиболее распространенным подходом для профилактики рака легкого является выявление людей с высоким риском развития данного заболевания. Например, людей длительно практикующих табакокурение ("Lung Carcinoma: Tumors of the Lungs". Merck Manual Professional Edition, Online edition Retrieved 2007-08-15 [Internet]) или подверженных длительному воздействию загрязняющих воздух канцерогенных веществ (Kabir et al., 2007; Coyle et al., 2006). Воздействие табачного дыма на организм может быть оценено по нескольким биомаркерам (Benowitz, 1999). Однако, анализ некоторых биомаркеров, например нитрозоаминов, технически сложен. Другие биомаркеры, такие как никотин, имеют короткий период полувыведения из плазмы крови, и, поэтому, его детектируемый уровень в крови в значительной степени зависит от времени забора крови у пациента. Котинин – основной метаболит никотина – на

сегодняшний день является наиболее широко используемым биомаркером табачного воздействия на организм (Benowitz, 1999; Boffetta et al., 2006). В плазме крови концентрация котинина коррелирует со степенью выраженности различных биологических эффектов, оказываемых табакокурением, и шанс развития рака легкого (OR, odds ratio), рассчитанный согласно уровню котинина в сыворотке крови, может достигать 55 (Boffetta et al., 1999). Однако, время полувыведения котинина из крови ~17 ч и, соответственно, его уровень в крови сильно варьирует в зависимости от частоты и длительности курения пациентом табака. Таким образом, поиск новых биомаркеров, способных улучшить лабораторную диагностику и оценить риск развития рака легкого, остается актуальным.

Несмотря на то, что в плазме крови уже найден ряд низкомолекулярных риск-факторов рака легкого, анализ концентрационного профиля совокупности низкомолекулярных веществ плазмы крови может обеспечить дополнительные возможности по более точной оценке риска возникновения данного заболевания. Для подобного профилирования метаболомные методы являются наиболее подходящими, т.к. они позволяют проводить полный анализ низкомолекулярных веществ различных биопроб. Недавние исследования по метаболомике позволили выявить множество потенциальных биомаркеров для оценки риска возникновения и ранней диагностики различных онкологических заболеваний. Следует отметить, что большинство метаболомных исследований по онкологии, включая исследования рака легкого, были проведены с использованием магнитно-резонансной спектроскопии и масс-спектрометрии (Cheng et al., 2005; Jordan et al., 2010; Peng et al., 2009; Hori et al., 2011; Carrola et al., 2011). Было опубликовано несколько подходов по анализу плазмы крови с помощью масс-спектрометрии в тандеме с хроматографией (Peng et al., 2009; Gowda et al., 2008; Osl et al., 2008; Xue et al., 2008). В результате было идентифицировано множество метаболитов плазмы крови, некоторые из которых были ассоциированы с раком легкого (Hori et al., 2011; Carrola et al., 2011). Однако подобные подходы, применяемые для научно поиска биомаркеров заболеваний, слишком сложны для применения их в роли лабораторного теста в клинике. Пригодные же для этого метаболомные

технологии, например, на основе применения прямой масс-спектрометрии, не проработаны. Прямая масс-спектрометрия позволяет анализировать состав низкомолекулярных веществ пробы "как он есть", без искажений, вносимых методами разделения (Dettmer et al., 2007; Fuhrer and Zamboni, 2015), поэтому она является наиболее пригодным масс-спектрометрическим методом и кандидатом для создания "омного" теста для лабораторной диагностики рака легкого.

### **2.12.3 Проблема диагностики нарушенной толерантности к глюкозе**

По данным ВОЗ сахарный диабет, в структуре которого 85-90% приходится на СД 2-го типа, представляет собой серьезную медико-социальную проблему в связи с широкой его распространенностью и системными осложнениями, приводящими к ранней инвалидизации и высокой смертности пациентов (Якушева и соавт., 2008а; Якушева и соавт., 2008b). В частности, велика доля осложнений СД 2-го типа в виде сердечно-сосудистых заболеваний, которые в свою очередь являются причиной смерти 70-80% больных. Поскольку ранним проявлением СД 2-го типа является предиабет, характеризующийся нарушенной толерантностью к глюкозе (НТГ), своевременное выявление НТГ является актуальным, т.к. позволяет вовремя выявить латентную фазу развития СД и провести корректировку образа жизни пациента, назначить лечебную диету, и, совместно с медикаментозным лечением, предотвратить или отсрочить развитие СД 2-го типа. Сегодня пероральный глюкозотолерантный тест (ПГТТ) является "золотым стандартом" для выявления НТГ. Вследствие того, что на уровень глюкозы в крови влияет множество факторов, ПГТТ обладает столь низкой воспроизводимостью, что при повторном его применении только у 56% пациентов подтверждается диагноз, поставленный на его основе (McDonald et al., 1965). Более того, данный тест считается труднопереносимым пациентами, т.к. длится 2 часа, в течение которых пациент находится неподвижно в лежачем положении. Таким образом, применение в лабораторной практике ПГТТ, который практически не

претерпел изменений в течение последних 50 лет, является вынужденной необходимостью ввиду отсутствия альтернативы.

Сахарный диабет 2-го типа и НТГ, ранее классифицируемая как латентный СД, являются метаболическими нарушениями, что позволяет рассматривать метаболомный подход перспективным в создании для них лабораторной диагностики. Подтверждением тому служит установленная связь между метаболитами плазмы крови и СД 2-го типа. Так, недавно была показана возможность предсказывать развитие СД 2-го типа по уровню в крови ароматических аминокислот и аминокислот с разветвленной углеродной цепью (Wang et al., 2011). В другом исследовании метаболиты глицин, лизофосфотидилхолин и ацилкарнитин показали существенное изменение уровня у пациентов с НТГ по сравнению с контрольными индивидуумами (Wang-Sattler et al., 2012). Таким образом, сегодня возможно и актуально создание нового эффективного метода диагностики НТГ на основе метаболомного анализа крови, применение которого не лимитировано сложностями, присущими ПГТТ. Широкое применение данного метода позволит выявлять пациентов с ранними проявлениями метаболических нарушений, указывающих на развитие СД 2-го типа, и своевременно проводить соответствующие лечебные мероприятия.

### **2.13 Заключение**

Наблюдаемое в последнее десятилетие развитие масс-спектрометрической техники привело к формированию ряда методов, позволяющих эффективно изучать метаболом и его изменения при различных патологиях, генетических вариациях и внешних воздействиях. Высокая селективность и чувствительность масс-спектрометров сделали масс-спектрометрию идеальным средством для подобных исследований, и уже имеющиеся на сегодняшний день научные публикации являются неоспоримым тому подтверждением. Обращая внимание на основные преимущества метаболомики перед другими “омными” науками, можно указать на ее особую роль в отношении медицины. В метаболоме наиболее быстро

и выражено отображаются все изменения, происходящие в организме, инициируемые как внутренними, так и внешними факторами. Данное обстоятельство делает метаболомику высокоэффективным средством диагностики заболеваний, мониторинга результатов лечения и токсических воздействий на организм. Сложности же метаболомных исследований происходят от имеющегося разнообразия метаболитов, относящихся к разным классам химических веществ и, соответственно, имеющих различные физико-химические свойства. Однако исследователь уже сегодня имеет возможность подобрать протокол метаболомного анализа, который наиболее полно подходит для достижения поставленных целей. Исследования, ориентированные на быстрый анализ метаболитов, который может являться прототипом клинических анализов, целесообразно основывать на прямой масс-спектрометрии, показывающей метаболический профиль образца "как он есть", без искажений, вносимых методами разделения. Особая роль при этом отводится метаболическому фингерпринтингу, позволяющему по анализу совокупности метаболитов делать заключения самого разного характера. Другой распространенный вариант метаболомного анализа – метаболическое профилирование – больше подойдет для тех, кто ориентируется на детальное изучение отдельных групп метаболитов с возможностью их идентификации, а так же для тех, кто занят поиском биомаркеров заболеваний. Эффективное разделение метаболитов при этом, как правило, обеспечивается хроматографией, существенно снижающей наложение масс-спектрометрических пиков и обеспечивающей повышение чувствительности анализа. Следует отметить, что при этом снижается и воспроизводимость результатов, особенно в случае применения многомерной хроматографии. Применение хроматографии так же вносит дополнительное искажение в получаемые метаболические профили, что существенно усложняет стандартизацию метаболомного анализа с целью его внедрения в медицину.

Одним из главных недостатков применения метаболомных методов в медицине остается проблема количественности измерений. Эта проблема в некоторых случаях решается посредством применения изотопно-меченных

стандартов. Однако кажется маловероятным, что подобные стандарты будут в ближайшее время доступны для хоть сколько-нибудь значимого количества метаболитов. Имеющая же место “количественная” метаболомика на основе нано-ВЭЖХ-МС, ввиду сложности выполнения, может рассматриваться только как средство научного поиска без реальных перспектив внедрения в медицину. Таким образом, вопрос применения неколичественных метаболомных данных в лабораторной практике требует дополнительной проработки, чему в диссертационной работе было уделено отдельное внимание.

Рак простаты, рак легкого и сахарный диабет 2-го типа являются социально значимыми заболеваниями, приносят существенный ущерб обществу. Проблема лечения и/или предотвращения данных заболеваний исходит из отсутствия для них эффективной лабораторной диагностики. Поэтому применение современных аналитических технологий, в том числе используемых в метаболомике, с целью улучшения их лабораторной диагностики является актуальным.

### **3. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

#### **3.1 Образцы плазмы крови и их пробоподготовка**

##### **3.1.1 Образцы плазмы крови для метаболомного исследования рака простаты**

Образцы для метаболомного исследования и измерения концентрации ПСА в крови мужчин, имевших подозрение на патологию предстательной железы, получали в лаборатории ООО «Новые медицинские технологии» г. Воронеж, по направлению участковых урологов Воронежа и Воронежской области. Концентрацию общего ПСА в пробах измеряли иммуноферментным способом. Со всех пациентов брали информированное согласие на научное использование полученных образцов. Пациентов затем обследовали в Воронежском областном клиническом онкологическом диспансере (пальцевое исследование, УЗИ, пункционная биопсия), после чего выставляли диагноз или признавали пациентов здоровыми. Таким образом кровь брали до начала лечения. Для масс-спектрометрического анализа были отобраны 40 проб плазмы крови от больных светлоклеточной мелкоацинарной аденокарциномой простаты 2-ой стадии (T2NxMO) и 30 проб от здоровых пациентов. Возраст здоровых пациентов и больных раком простаты варьировал от 55 до 80 лет.

##### **3.1.2 Образцы плазмы крови для метаболомного исследования рака легкого**

Образцы крови были получены от пациентов Российского Онкологического Научного Центра им. Н.Н. Блохина (Москва, Россия). Все пациенты подписали согласие на использование образцов их крови для научных исследований. Возраст пациентов составлял 37 – 76 лет. 100 образцов плазмы были получены от мужчин с гистологически подтвержденным раком легкого I-IV стадий (24, 12, 50 и 14 пациентов, соответственно стадиям рака). Все образцы были получены от пациентов с первично диагностированным раком до

проведения медицинского лечения. В качестве контрольной группы использовали образцы плазм крови 100-а условно здоровых (без диагностированной патологии) мужчин того же возраста, что и пациенты экспериментальной группы.

### **3.1.3 Образцы плазмы крови для метаболомного исследования нарушенной толерантности к глюкозе**

В исследовании были использованы образцы крови пациентов, обратившихся в поликлинику ФГУ Эндокринологического Научного Центра Российской Академии Медицинских Наук Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации. Исследование было утверждено в этическом комитете данного учреждения. Все пациенты подписали информированное согласие на использование их образцов крови в научных исследованиях. Биохимические показатели (концентрация глюкозы, мочевой кислоты, общего холестерина, инсулина, триглицеридов, липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), липопротеидов высокой плотности (ЛПВП)) в образцах крови пациентов были измерены на биохимическом анализаторе Architect c4000 (Abbott Diagnostics, Abbott Park, USA). Гликированный гемоглобин (HbA1c) измеряли анализатором Bio-Rad D10 (Bio-Rad Laboratories, Франция). Глюкозотолерантный тест проводили путем перорального получения пациентом 75 грамм глюкозы и проверки уровня глюкозы в крови пациента через два часа. НТГ диагностировали, если уровень глюкозы в крови был между 7,8 и 11,0 ммол/л (WHO, 1999). Результаты ПГТТ использовали для формирования уравновешенных по полу групп пациентов: экспериментальной с НТГ (n = 20) и контрольной (n = 30).

### **3.1.4 Протокол сбора образцов плазмы крови**

Образцы крови в объеме 3 мл отбирали из кубитальной вены натошак в пробирки, содержащие K<sub>2</sub>EDTA (BD Vacutainer, США). Не позднее, чем через 15 мин после забора, кровь центрифугировали при комнатной температуре в течение

15 мин при 1600 g. Затем 1,2 мл полученной плазмы разделяли на аликвоты, разливая в пластиковые пробирки, и замораживали до температуры  $-80^{\circ}\text{C}$ . Для дальнейшего анализа образцы плазмы крови транспортировали в замороженном состоянии в термоконтейнерах в ФГБУ «ИБМХ» РАМН. Хранение образцов до проведения анализа осуществляли при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ . Используемые для анализа пробы были заморожены/разморожены не более одного раза. Пробы аннотировали, указав стадию заболевания, пол и возраст больного и т.д., в зависимости от исследуемого заболевания. В исследованиях, входящих в диссертационную работу, допускалось варьирование протокола сбора образцов, не влияющее на результаты метаболомного анализа. Для оценки воспроизводимости метода дополнительно были получены образцы плазмы крови от одних и тех же пациентов ( $n = 20$ ) с промежутком в 2-7 дней.

### **3.1.5 Пробоподготовка образцов плазмы крови**

#### **3.1.5.1 Протокол №1 (с депротеинизацией плазмы крови метанолом)**

Для осаждения белков 100 мкл плазмы крови смешивали со 100 мкл воды (LiChrosolv, Merck, США) и 800 мкл метанола (Fluka, Германия) и инкубировали 10 мин при  $4^{\circ}\text{C}$ . Центрифугированием при 13000 об/мин (центрифуга MiniSpin plus, Eppendorf, Германия) в течение 10 мин осаждали белок и супернатант переносили в чистые пластиковые пробирки (типа эппендорф). Растворитель упаривали при  $45^{\circ}\text{C}$  в течение 3 ч на вакуумном испарителе SpeedVac (Eppendorf). Полученный сухой осадок растворяли в 100 мкл 95% раствора ацетонитрила (Acros Organics, США) с добавлением 0,1% муравьиной кислоты (Fluka). Для лучшего растворения осадка пробы обрабатывали ультразвуком в ультразвуковой мойке Bandelin RM 40UH (Sonorex Technik, Германия) два раза по 30 сек. Далее пробы центрифугировали 10 мин при 13000 g и полученный супернатант использовали для масс-спектрометрического анализа. Данный протокол использовали для сравнительного анализа протоколов пробоподготовки.

### **3.1.5.2 Протокол №2 (с депротеинизацией плазмы крови ультрафильтрацией)**

К 100 мкл плазмы крови добавляли 100 мкл дистиллированной воды (LiChrosolv) и центрифугировали в микроконцентраторе Microcon YM-3 (Millipore, США), имеющем порог отсечения 3000 Да, при 20°C в течение 90 мин. Полученный депротеинизированный раствор метаболитов переносили в чистые пластиковые пробирки (типа эппендорф). Растворитель упаривали при 45°C в течение 3 ч на вакуумном испарителе SpeedVac (Eppendorf). Полученный сухой осадок растворяли в 100 мкл 95% раствора ацетонитрила (Acros Organics), с добавлением 0,1% муравьиной кислоты (Fluka). Для лучшего растворения осадка пробы обрабатывали ультразвуком в ультразвуковой мойке Bandelin RM 40UH (Sonorex Technik) два раза по 30 сек. Далее пробы центрифугировали 10 мин при 13000 g и полученный супернатант использовали для масс-спектрометрического анализа. Данный протокол использовали для сравнительного анализа протоколов пробоподготовки.

### **3.1.5.3 Пробоподготовка образцов плазмы крови для метаболомного исследования рака простаты**

Для осаждения белков 100 мкл плазмы крови смешивали со 100 мкл воды (LiChrosolv) и 800 мкл метанола (Fluka) и инкубировали 10 мин при 4°C. Центрифугированием при 13 тыс. об./мин (центрифуга MiniSpin plus, Eppendorf) в течение 10 мин осаждали белок и супернатант переносили в чистые пластиковые пробирки (типа эппендорф). При температуре 45°C в течение 3 ч упаривали растворитель на вакуумном испарителе (SpeedVac). Полученный сухой осадок растворяли в 100 мл 95% раствора ацетонитрила (Acros Organics), с добавлением 0,1% муравьиной кислоты (Fluka). Для лучшего растворения осадка, пробы обрабатывали ультразвуком в ультразвуковой мойке (Bandelin RM 40UH, Sonorex

Technik) два раза по 30 сек. Далее пробы центрифугировали 10 мин при 13 тыс. об./мин и полученный супернатант использовали для масс-спектрометрического анализа.

#### **3.1.5.4 Пробоподготовка образцов плазмы крови для метаболомного исследования рака легкого**

Для осаждения белков 100 мкл плазмы крови смешивали со 100 мкл воды (LiChrosolv) и 800 мкл метанола (Fluka) и инкубировали 10 мин при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Центрифугированием при 13000 об/мин (центрифуга MiniSpin plus) в течение 10 мин осаждали белок и супернатант переносили в чистые пластиковые пробирки (типа эппендорф). Растворитель упаривали при  $45^{\circ}\text{C}$  в течение 3 ч на вакуумном испарителе SpeedVac (Eppendorf). Полученный сухой осадок растворяли в 100 мл 95% раствора ацетонитрила (Acros Organics, США) с добавлением 0,1% муравьиной кислоты (Fluka). Для лучшего растворения осадка пробы обрабатывали ультразвуком в ультразвуковой мойке Bandelin RM 40UH (Sonorex Technik) пять раз по 30 сек. Далее пробы центрифугировали 10 мин при 13000 g и полученный супернатант использовали для масс-спектрометрического анализа.

#### **3.1.5.5 Пробоподготовка образцов плазмы крови для метаболомного исследования нарушенной толерантности к глюкозе**

Для депротеинизации плазмы крови аликвоты (10 мкл) смешивали с 10 мкл воды (LiChrosolv) и 80 мкл метанола (Fluka) и инкубировали при комнатной температуре. После 15 минут образцы центрифугировали при 13000 g (MiniSpin plus centrifuge) в течение 10 мин. Депротеинизированный супернатант переносили в чистые пластиковые пробирки (типа эппендорф) и разбавляли 50-ю объемами метанола, содержащего 0,1% муравьиной кислоты (Fluka). Полученный раствор использовали для масс-спектрометрического анализа.

## **3.2 Масс-спектрометрический анализ метаболитов плазмы крови**

### **3.2.1 Протокол №1. Прямой масс-спектрометрический анализ на квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре**

Масс-спектрометрический анализ проводили на гибридном квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре MicroTOF-Q (Bruker Daltonics, Германия), имеющем электроспрейный источник ионизации. Масс-спектрометр был поочередно настроен на приоритетную детекцию ионов в трех диапазонах: 1 –  $m/z$  250-1500; 2 –  $m/z$  50-1000; 3 –  $m/z$  500-3000.

Спектры снимали в режиме детекции как положительно, так и отрицательно заряженных ионов. Время снятия одного спектра: 1 мин, 5 мин, 10 мин. Перед получением спектров была проведена калибровка с использованием ES Tune Mix. Поток пробы, подаваемой в электроспрейный источник ионизации, 180 мкл/час. Для инъекции пробы в электроспрейный источник ионизации использовали стеклянный шприц (Hamilton Bonaduz, Швейцария), установленный в шприцевой инжекторный насос (KD Scientific, США). Масс-спектры получали в программе DataAnalysis (версия 3,4, Bruker Daltonics) суммированием записанных сигналов.

### **3.2.2 Протокол №2. Прямой масс-спектрометрический анализ на масс-спектрометре ион-циклотронного резонанса**

Анализ проводили на масс-спектрометре ион-циклотронного резонанса Apex Ultra (Bruker Daltonics, Германия), имеющем электроспрейный источник ионизации. Масс-спектрометр был настроен на приоритетную детекцию ионов в диапазоне  $m/z$  50-1500. Спектры снимали в режиме детекции как положительно, так и отрицательно заряженных ионов. Время снятия одного спектра 10 мин. Поток пробы, подаваемой в электроспрейный источник ионизации, 180 мкл/час. Для инъекции пробы в электроспрейный источник ионизации использовали

стеклянный шприц (Hamilton Bonaduz), установленный в шприцевой инжекторный насос (KD Scientific, США). Разность потенциалов в области ионизации 3500 В. Перед получением спектров была проведена калибровка с использованием ES Tune Mix. В процессе получения спектров проводили оптимизацию параметров масс-спектрометра (потенциалы электростатических линз, амплитуда радиочастотных полей, время пролета ионов) для получения максимального соотношения сигнал/шум. Масс-спектры получали в программе DataAnalysis (версия 3,4, Bruker Daltonics) суммированием записанных десятиминутных сигналов.

### **3.2.3 Протокол №3. Анализ метаболитов методом ВЭЖХ-МС**

Хроматографическое разделение метаболитов проводили на хроматографе фирмы Agilent серии 1200, состоящем из автосамплера Agilent G1377A  $\mu$ WP, насоса Agilent G1376A Micro и дегазатора Agilent G13796B. Хроматограф был сопряжен с масс-спектрометром MicrOTOF-Q, имеющем электроспрейный источник ионизации. Пробу метаболитов в объеме 20 мкл разделяли на колонке Zorbax SB-C18 (5 мкм, 150 x 0,5 мм), элюенты: А – 0,1% муравьиная кислота, Б – ацетонитрил, содержащий 0,1% муравьиной кислоты. Использовали следующий градиент элюции: 2 мин – 5% элюента Б, 40 мин – линейный градиент элюента Б с 5 до 80%, 5 мин – 80% элюента Б, 1 мин – смена элюирующего состава до 5% элюента Б, 10 мин – 5% элюента Б. Поток элюентов 10 мкл/мин. Масс-спектрометрическую детекцию проводили в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Масс-спектрометр был настроен на приоритетную детекцию ионов в диапазоне  $m/z$  250–1500.

### **3.2.4 Масс-спектрометрический анализ при метаболомном исследовании рака простаты**

Масс-спектрометрический анализ проводили на гибридном квадруполь-

времяпролетном масс-спектрометре MicrOTOF-Q (Bruker Daltonics), имеющем электроспрейный источник ионизации. Масс-спектрометр был настроен на приоритетную детекцию ионов в диапазоне  $m/z$  от 250 до 1500. Спектры снимали в режиме детекции как положительно, так и отрицательно заряженных ионов. Время снятия одного спектра 1 мин, поток пробы, подаваемой в электроспрейный источник ионизации, 500 мкл/час. Для инъекции пробы в электроспрейный источник ионизации использовали стеклянный шприц (Hamilton Bonaduz), установленный в шприцевой инжекторный насос (KD Scientific). Масс-спектры получали в программе DataAnalysis (версия 3,4, Bruker Daltonics) суммированием записанных минутных сигналов.

### **3.2.5 Масс-спектрометрический анализ при метаболомном исследовании рака легкого**

Масс-спектрометрический анализ проводили на гибридном квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре MicrOTOF-Q (Bruker Daltonics), имеющем электроспрейный источник ионизации. Масс-спектрометр был настроен на приоритетную детекцию ионов в диапазоне  $m/z$  от 50 до 1000 и точность измерения масс 2-3 ppm. Спектры снимали в режиме детекции положительно заряженных ионов. Время снятия одного спектра 5 мин, поток пробы, подаваемый в электроспрейный источник ионизации, 180 мкл/час. Для инъекции пробы в электроспрейный источник ионизации использовали стеклянный шприц (Hamilton Bonaduz), установленный в шприцевой инжекторный насос (KD Scientific). Масс-спектры получали в программе DataAnalysis (версия 3,4, Bruker Daltonics) суммированием записанных пятиминутных сигналов. Для детекции пиков в масс-спектрах использовали алгоритм *Sum Peak* со следующими настроечными параметрами: соотношение сигнал/шум – 1; пороговое значение для детекции пиков в относительных единицах 0,005% и 3 – в абсолютных единицах. При данных параметрах детектировали не менее 95% целевых масс-спектрометрических пиков, относящихся к ионам метаболитов, при этом

происходило включение в список масс ионов не более 5% нерелевантных (шумовых) пиков. Шумовым пиком в спектре считали пик низкой интенсивности, не имеющий изотопного распределения и не воспроизводящийся в остальных масс-спектрах.

### **3.2.6 Масс-спектрометрический анализ при метаболомном исследовании нарушенной толерантности к глюкозе**

Образцы анализировали с использованием гибридного квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра *maXis* (Bruker Daltonics), оборудованного ЭИИ. Масс-спектрометр был настроен на приоритетную детекцию ионов в диапазоне  $m/z$  50-1000. Точность измерения масс составляла 1-3 ppm. Измерение масс веществ проводили в режиме детекции положительно заряженных ионов. Растворы образцов инжесктировали в электроспрейный источник ионизации с помощью стеклянного шприца (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz), подсоединенного к шприцевому инжекторному насосу (KD Scientific). Скорость подачи раствора образца в источник ионизации составляла 180 мкл/ч. Порядок анализа образцов был рандомизирован (т.е. контрольные образцы анализировались вперемешку с экспериментальными). Изображения масс-спектров получали в программе *DataAnalysis* (версия 3,4, Bruker Daltonics) путем суммирования минутных сигналов. Молекулярные массы ионов метаболитов определяли по масс-спектрометрическим пикам, используя программу *DataAnalysis*. Все пики с интенсивностью превосходящей интенсивность шума были выбраны и далее анализировали с использованием программы *Matlab* версии R2010a (MathWorks, США).

### 3.3 Анализ масс-спектрометрических данных

#### 3.3.1 Детекция пиков ионов метаболитов алгоритмами Apex, Centroid и Sum Peak

С применением алгоритма Apex осуществляли детекцию пиков на основе расчета производных от кривой значений интенсивности масс-спектрометрических пиков. На максимуме пика первая производная равнялась нулю, а вторая была отрицательной. Количество точек, используемых для расчета производных методом Савицкого, определяли параметром "Peak width" (ширина пика). Для расчета позиции пика использовали установленный его максимум. Используя первую производную сигнала интенсивности, алгоритм Apex уточнял позицию максимума путем интерполяции между соседними точками.

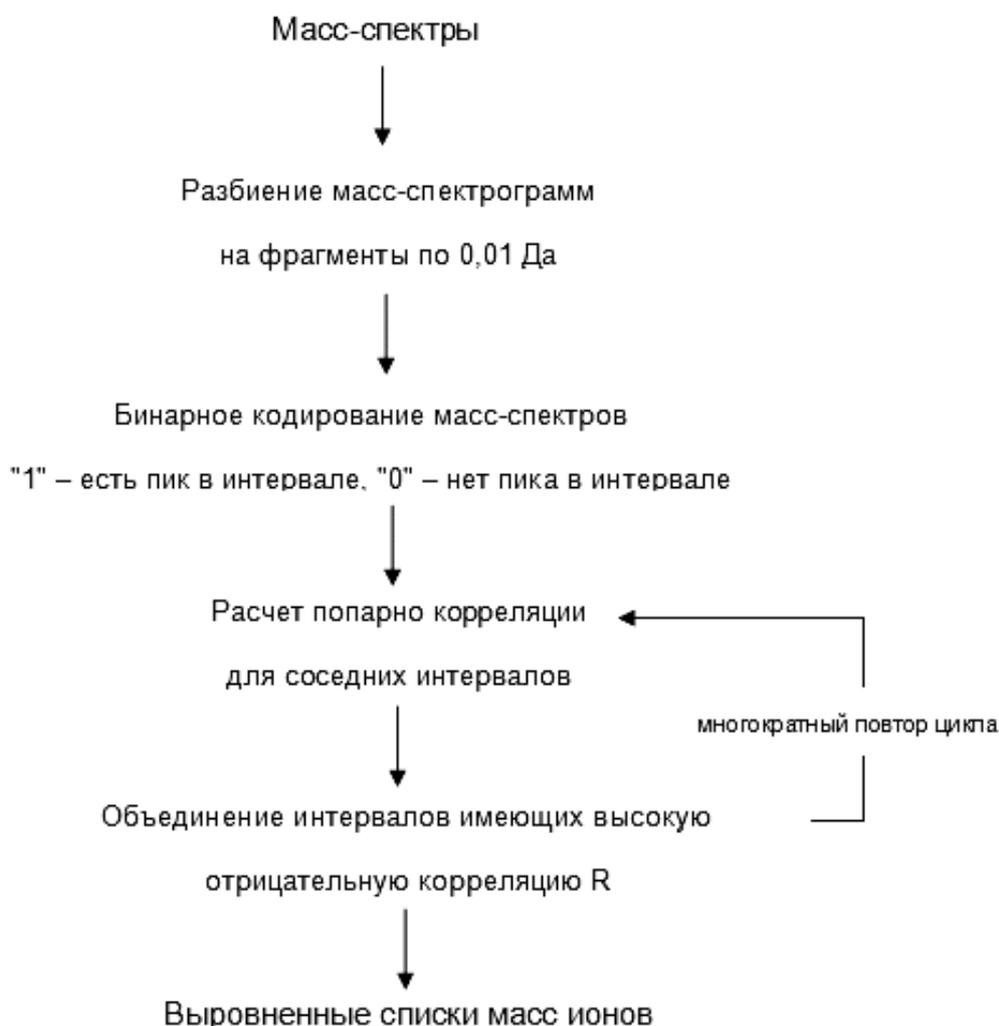
С помощью алгоритма Centroid осуществляли детекцию масс-спектрометрических пиков аналогично алгоритму Apex, отличие заключалось только в способе определения позиции пика ( $m/z$ ). Детекция пика основана на расчете производных от интенсивности кривой масс-спектра. На максимуме пика первая производная равнялась нулю, а вторая была отрицательной. Алгоритм Centroid характеризуется тем, что для него требуется, чтобы ширина пиков была неизменна на протяжении всего спектра. Количество точек, используемых для расчета производных методом Савицкого, определяли параметром "Peak width". Для расчета позиции пика алгоритм рассчитывал центроид (среднее  $m/z$  для взвешенной интенсивности), используя точки масс-спектра, интенсивность которых больше, чем *процент от высоты пика*  $\times 0,01 \times$  *высота пика* на его максимуме. Процент высоты пика определял уровень отсечения точек вокруг максимума, которые были включены для расчета центроида.

С помощью алгоритма *Sum Peak* рассчитывали, так называемый, угловой коэффициент кривой сигнала интенсивности масс-спектрометрических пиков. Угловой коэффициент ведет себя идентично первой производной, но рассчитывается значительно быстрее при детекции пиков. Если его значение

превышало некое пороговое значение, то считалось, что произошла детекция положения пика.

### 3.3.2 Выравнивание масс-спектрометрических пиков

Выравнивание масс-спектрометрических пиков – соотнесение измеренных масс одних и тех же метаболитов в разных спектрах – являлось необходимым этапом обработки масс-спектрометрических данных. Выравнивание проводили согласно алгоритму, представленному на рисунке 11. Полученные списки масс ионов метаболитов, соответствующие отдельным масс-спектрам, переводили в бинарный код. Для этого диапазон детектированных масс, соответствующий различным метаболитам плазмы крови, разбивали на фрагменты с шагом  $m/z$  0,01, где диапазону, включающему массу иона метаболита, соответствовала “1”, и ”0” соответствовал отсутствию таковой массы. Далее полученные таким образом бинарно-кодированные масс-спектры использовали как бинарные масс-спектрометрические отпечатки плазмы крови. Все отпечатки в совокупности формировали бинарную матрицу масс-спектрометрических данных. Программа, реализующая выравнивание масс-спектров, выявляла в циклическом режиме соседние отрицательно коррелирующие строки, соответствующие соседним диапазонам масс в данной матрице, объединяла их и повторяла цикл, уменьшая пороговое значение отрицательного коэффициента корреляции. Выравнивание масс-спектрометрических данных проводили, используя программный пакет Matlab R2010a (MathWorks Inc., США). Код программы, написанный на языке технического программирования программного пакета Matlab, реализующий алгоритм выравнивания масс-спектров метаболитов, представлен в Приложении.



**Рисунок 11.** Схема алгоритма выравнивания масс-спектров метаболитов, полученных с высоким разрешением. Реализация данного алгоритма была осуществлена на языке технического программирования программного пакета Matlab (MathWorks, США). Автор алгоритма к.б.н. Лохов П.Г. (Lokhov et al., 2012).

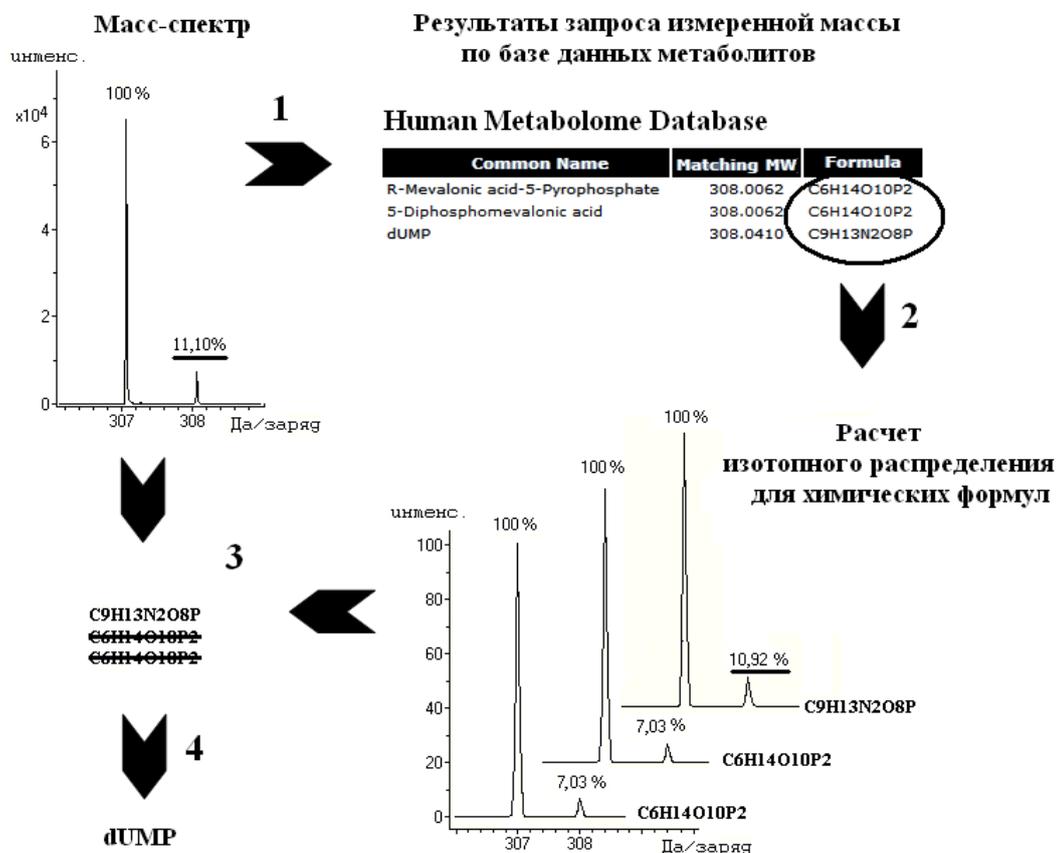
### 3.3.3 Коррекция масс-спектрометрических данных плазмы крови

Забор крови у пациентов и выделение плазмы приводят к выходу ионов калия из клеточных элементов крови в плазму (Bellevue et al., 1975; Colussi and Cipriani, 1995), где их содержание в норме в 20 раз меньше (Pietrzak and Meyerhoff,

2009). Высокая чувствительность электроспрейной масс-спектрометрии к ионному составу анализируемых проб потребовала коррекции изменений фингерпринтов, вызванных разным уровнем содержания калия в образцах плазмы крови. Для этого по точно измеренной массе и характерному изотопному распределению был идентифицирован в масс-спектрах пик калийсодержащего иона  $K_2Cl^+$  ( $m/z$  112,8966). Все масс-спектрометрические пики в масс-спектрах метаболитов плазмы крови, проявляющие хотя бы незначительную корреляцию с интенсивностью данного пика (коэффициент корреляции  $<-0,15$  или  $>0,15$ ), были исключены при формировании фингерпринтов, так как рассматривались как ионы метаболитов с полностью или частично замещенным протоном на ион калия (т.е.  $NM^+ \rightarrow KM^+$ ) или как ионы метаболитов, вышедших в плазму крови из клеточных элементов крови. Следует отметить, что неприменение подобной коррекции фингерпринтов в значительной степени ухудшало результаты последующей классификации фингерпринтов.

### **3.3.4 Идентификация метаболитов по масс-спектрометрическим данным**

Для масс-спектрометрических пиков, подлежащих идентификации, устанавливали соответствие конкретным метаболитам из базы данных "Human Metabolome Database" (<http://www.hmdb.ca>) (Wishart et al., 2007) и/или Metlin (Scripps Center for Mass Spectrometry, США; <http://metlin.scripps.edu>) (Smith et al., 2005). Для этого использовали точно измеренную массу метаболита (при необходимости использовали дополнительную калибровку масс-спектра по внутреннему стандарту) и паттерн изотопного распределения метаболита в спектре. Для установления изотопного распределения, соответствующего конкретной химической формуле, использовали программу IsotopePattern (Bruker Daltonics, Германия). Пример идентификации на основе точно измеренной массы метаболита, а также определения химической формулы и изотопного распределения, представлен на рисунке 12.



**Рисунок 12. Алгоритм идентификации метаболита по точно измеренной массе и изотопному распределению (Lokhov et al., 2010b).** Производится поиск масс-спектрометрически установленной массы метаболита (1) по базе данных метаболитов (например, "Human Metabolome Database"). По запросу база данных предоставляет названия метаболитов, имеющих соответствующий молекулярный вес, а также соответствующие им химические формулы. Используя данные химической формулы в программе IsotopePattern (Bruker Daltonics, Германия) строят соответствующие им теоретически рассчитанные масс-спектры (2), показывающие изотопное распределение (соотношение интенсивностей пиков изотопов вещества; 100% соответствует наиболее интенсивному пику). Теоретически полученные изотопные распределения сравнивают с экспериментально полученным изотопным

распределением (3) и устанавливают единственно верную химическую формулу, которая и идентифицирует метаболит (4).

### **3.3.5 Диагностическая модель рака простаты на основе метаболомного фингерпринтинга плазмы крови (Лохов и соавт., 2009)**

Используя программу DataAnalysis, с применением алгоритма Sum Peak из масс-спектров устанавливали массы ионов метаболитов. Для этого проводили детекцию пиков в масс-спектре, используя порог отсечения по соотношению сигнал/шум равный 10. Списки масс ионов метаболитов, полученных в режиме регистрации как отрицательно, так и положительно заряженных ионов, объединяли используя программный пакет Matlab v.12 (“Mathworks”, США), переводили в бинарный код, формируя бинарно представленный метаболический фингерпринт проб плазмы крови (далее просто фингерпринт). Для этого диапазон детектированных масс разбивали на фрагменты с шагом 0,01 Да, где диапазону, включающему массу иона метаболита, соответствует “1” и, соответственно, ”0” – при отсутствии таковой массы.

Метаболические фингерпринты анализировали методом главных компонент, используя функцию  $[comp, score] = princomp(X)$  программного пакета Matlab, где  $X$  – матрица, содержащая фингерпринты,  $comp$  – рассчитанная матрица главных компонент,  $score$  – матрица проекций фингерпринтов на главные компоненты. Для визуализации результатов анализа использовали функцию *plot3*, которой в качестве входных данных передавали проекции фингерпринтов на главные компоненты.

Для построения модели диагностической системы использовали метод опорных векторов (SVM – support vector machine), применяя свободно распространяемое программное обеспечение OSU Support Vector Machines Toolbox (версия 3,0, <http://sourceforge.net/projects/svm/>). Применяли нелинейный SVM классификатор с радиальным ядром (функция RbfSVC) с основными параметрами:  $\gamma = 1$ ,  $\epsilon = 0,001$ ,  $C = 1$  (значения параметров смотри в описании

программного обеспечения). Входными данными для классификации являлись координаты проекций отпечатков пальцев на выбранные три главных компонента.

Тестирование модели диагностической системы проводили способом *leave-one-out* (Martens and Dardenne, 1998), заключающимся в попеременном удалении из выборки одного экземпляра и обучении классификатора на основе оставшихся экземпляров с последующим тестированием классификатора на экземпляре, не участвовавшем в обучении. Таким образом, модель диагностической системы была протестирована на 70 отпечатках.

Для определения параметров модельной диагностической системы, таких как специфичность, чувствительность и точность, а также построения ROC-кривой и вычисления площади под ROC-кривой, использовали статистический пакет для социальных наук “Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)” (“SPSS Inc.”, США), версии 10,0.

Полученную чувствительность и специфичность модельной диагностической системы сравнивали с аналогичными характеристиками диагностики, основанной на концентрации ПСА в крови пациентов. Учитывая возраст больных раком простаты, за нормальные значения концентрации ПСА принимали величины от 0 до 5,36 нг/мл (от 0 до  $0,16 \times 10^{-9}$  М).

Доверительный интервал надежности для характеристик модельной диагностической системы рассчитывали методом, предложенным Вапником для расчета доверительных интервалов надежности для классификатора с учителем (Вапник, 1984). Расчет проводили для доверительной вероятности 0,95.

### **3.3.6 Идентификация метаболитических биомаркеров рака простаты**

Применяя программу DataAnalysis, по пикам масс-спектров устанавливали массы ионов метаболитов с точностью до тысячных дальтона. Для этого проводили детекцию пиков в спектре, используя порог отсечения по соотношению сигнал/шум равный 10.

Для 25-ти наиболее интенсивных пиков масс-спектров, полученных в режиме детекции положительно заряженных ионов, и такого же количества пиков масс-спектров, полученных в режиме детекции отрицательно заряженных ионов, *t*-тестом устанавливали достоверность отличий интенсивностей между выборками больных и здоровых пациентов. Масс-спектрометрические пики в разных масс-спектрах считали относящиеся к одному и тому же метаболиту по результатам их выравнивая (см. раздел "Выравнивание масс-спектрометрических пиков").

Для пиков метаболитов, чьи интенсивности статистически достоверно ( $p < 0,05$ ) менялись при возникновении болезни, рассчитывали средние значения и стандартные отклонения по группам, соответствующим больным пациентам и здоровым добровольцам.

Для определения параметров лабораторной диагностики, таких как специфичность и чувствительность, а также построения ROC-кривой и вычисления площади под ROC-кривой использовали статистический пакет для социальных наук ("Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)", SPSS Inc., США), версии 10,0.

Специфичность и чувствительность диагностики, полученные на основе значений интенсивностей масс-спектрометрических пиков отдельных метаболитов, сравнивали с чувствительностью и специфичностью диагностики, основанной на концентрации ПСА в крови пациентов.

### **3.3.7 Диагностическая модель рака легкого на основе метаболомного фингерпринтинга плазмы крови (Lokhov et al., 2012)**

Матрицу бинарных масс-спектрометрических данных (фингерпринтов) анализировали методом главных компонент (МГК), используя функцию *princomp* программного пакета Matlab. Анализ выявил, что первые 7 компонентов включают в себя ~80% вариативности представленной в матрице. Далее, вместо исходных фингерпринтов, имеющих размерность равную количеству детектированных масс в спектрах, были использованы их проекции на первые 7

компонентов, имеющие, соответственно, размерность *равную 7-ми*. Таким образом, было достигнуто снижение размерности данных, необходимое для последующей эффективной классификации. Следует отметить, что вариативность, заключенная в первых семи главных компонентах, носила рак-специфичный характер и разделяла проекции отпечатков по принадлежности к контрольной и экспериментальным группам, при этом использование бинарного кодирования отпечатков определяло эффективность подобного разделения.

Для построения модели диагностической системы использовали метод опорных векторов, применяя SVM классификатор с линейным ядром из программного пакета Matlab (функция *svmtrain*). Входными данными для классификации являлись координаты проекций отпечатков на первые 7 главных компонентов.

Тестирование модели диагностической системы проводили способом "*repeated random sub-sampling validation*", заключающимся в попеременном удалении из выборки (в нашем случае 10%) экземпляров и обучении классификатора на оставшихся экземплярах с последующим тестированием классификатора на экземплярах, не участвовавших в обучении. Таким образом, модель диагностической системы была протестирована 1000 раз на 200-ых отпечатках.

Доверительный интервал надежности для характеристик модельной диагностической системы рассчитывали методом, предложенным Вапником для расчета доверительных интервалов надежности для классификатора с учителем (Вапник, 1984). Расчет проводили для доверительной вероятности 0,95.

### **3.3.8 Оценка риска возникновения рака легкого на основе метаболома плазмы крови**

Расчет риска возникновения рака легкого проводили путем вычисления OR на основе данных об интенсивности масс-спектрометрических пиков метаболитов. Значение OR рассчитывали для каждой стадии заболевания. Оптимальное

пороговое значение интенсивности масс-спектрометрического пика для расчета OR определяли путем его изменения от минимального значения ("0") до максимального зарегистрированного значения. Оптимальным пороговым значением выбирали значение соответствующее максимальному OR.

### **3.3.9 Диагностика нарушенной толерантности к глюкозе на основе анализа метаболома плазмы крови (Lokhov et al., 2014)**

Ионы метаболитов, чья интенсивность масс-спектрометрических пиков связана с наличием НТГ ( $n = 51$ ), были использованы для расчета диагностического показателя теста на НТГ (среди них 35 ионов метаболитов, концентрации которых увеличивались в крови с  $AUC > 0,7$ , и 16 ионов метаболитов, концентрации которых уменьшались с  $AUC > 0,76$ ). С этой целью, интенсивность пика каждого такого метаболита рассматривали как некая диагностическая мера, дающая два результата на НТГ, положительный – равный "1", и отрицательный – равный "0". Интенсивность пика, соответствующую максимальной точности определения НТГ, брали за отсечение между положительным и отрицательным результатом. Для расчета диагностического показателя на НТГ все положительные результаты, т.е. единицы, суммировали. Полученный таким образом диагностический показатель указывал на наличие НТГ при превышении порогового значения, соответствующего максимальной точности диагностики НТГ. Для измерения воспроизводимости диагностики НТГ на основе масс-спектрометрического измерения метаболитов плазмы крови, значения диагностического показателя дополнительно были измерены для образцов плазмы крови, полученных от одних и тех же 20 индивидуумов с интервалом в 2-7 дней.

Для масс-спектрометрических пиков, вошедших в диагностический показатель, устанавливали их соответствие конкретным метаболитам из базы данных "Human Metabolome Database" (<http://www.hmdb.ca>) и/или Metlin (Scripps Center for Mass Spectrometry, США; <http://metlin.scripps.edu>). Для этого

использовали точно измеренную массу метаболита (при необходимости проводили дополнительную калибровку масс-спектра по внутреннему стандарту) и паттерн изотопного распределения метаболита в масс-спектре. Для установления изотопного распределения, соответствующего конкретному элементному составу вещества, использовали программу IsotopePattern (Bruker Daltonics, Германия).

Воспроизводимость диагностики НТГ на основе анализа метаболитов плазмы крови была дополнительно оценена с применением компьютерной симуляции, и полученные результаты были сравнены с экспериментально полученными данными. Для этого интенсивности масс-спектрометрических пиков при симуляции были изменены так, чтобы их CV варьировал от 0 до 50% (по 10 повторов для каждого значения CV). Для различных значений CV была оценена воспроизводимость диагностики НТГ. Подобная симуляция была применена и к уровню глюкозы в крови, измеренному в ПГТТ. Полученные данные были использованы для построения симуляционных кривых для того, чтобы показать зависимость воспроизводимости диагностического показателя от CV метаболитов и, соответственно, воспроизводимости результата ПГТТ от CV уровня глюкозы в крови. Результаты симуляции были сравнены с ранее опубликованной воспроизводимостью ПГТТ (McDonald et al., 1965) и воспроизводимостью диагностики НТГ на основе анализа метаболитов плазмы крови по диагностическому показателю, которая была измерена как процент подтвержденной НТГ при повторном расчете диагностического показателя у 20 пациентов.

### **3.3.10 Масс-спектрометрические сигнатуры заболеваний и расчет диагностических показателей на их основе**

Сигнатуры составляли из  $m/z$  значений масс-спектрометрических пиков, интенсивность которых: увеличивается с  $AUC > 0,7$  и уменьшается с  $AUC > 0,76$  (для диагностики НТГ); увеличивается с  $AUC > 0,8$  (для диагностики рака

легкого); увеличивается с  $AUC > 0,85$  (для диагностики рака простаты). В верхнем индексе для соответствующих  $m/z$  значений указывали пороговое значение интенсивности пика, выше которого пик указывает на наличие заболевания, ниже – на его отсутствие. При этом, пороговые значения выражали через квантиль распределения интенсивностей этих пиков, рассчитанный для масс-спектров контрольной выборки. Диагностический показатель на основе сигнатуры рассчитывали путем подсчета (суммирования) количества масс-спектрометрических пиков, превышающих пороговое значение. Оптимальное пороговое значение для диагностического показателя соответствовало максимальной точности диагностики заболевания.

## 4. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 4.1 Выбор способа пробоподготовки образцов плазмы крови и варианта масс-спектрометрического анализа

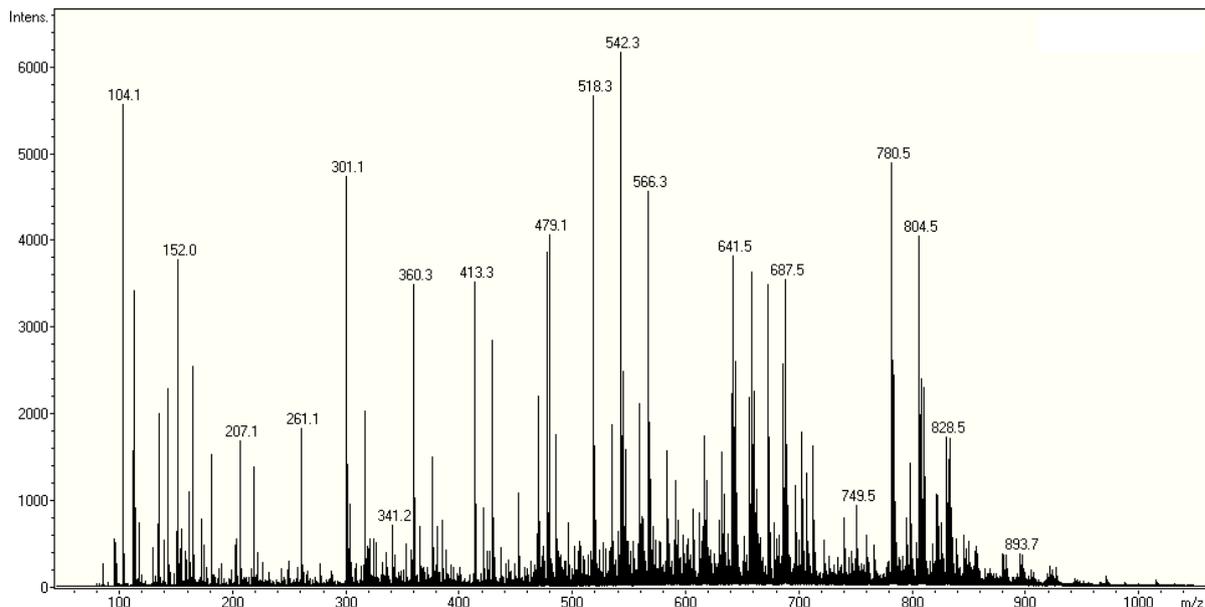
На рисунках 13-16 представлены масс-спектры, а в Таблице 2 суммированы результаты масс-спектрометрического анализа метаболитов плазмы крови при различных вариантах пробоподготовки и использованных масс-спектрометров. Согласно представленным данным, по количеству детектируемых ионов, воспроизводимости масс-спектров и времени анализа, прямой масс-спектрометрический анализ метаболитов, полученных путем депротеинизации плазмы крови метанолом, является наиболее оптимальным для создания метаболомной диагностики. Показано также преимущество применения масс-спектрометра ион-циклотронного резонанса, позволяющего определять массу метаболитов с высокой точностью ( $\sim 1$  ppm). Высокая разрешающая способность  $\sim 100000$  ед. и возможность использования различных методов фрагментации (столкновительная фрагментация CID, инфракрасная многофотонная диссоциация IRMPD) расширяют возможности при дальнейшей идентификации метаболитов, а именно, позволяют разрешить ситуации при наложении (интерференции) пиков метаболитов в масс-спектре, а также более эффективно фрагментировать ионы метаболитов с целью их идентификации. Однако, более низкая стоимость, простота в эксплуатации и распространенность квадруполь-времяпролетных масс-спектрометров, позволяющих измерять массы метаболитов со средней точностью 4 ppm и относительно высокой воспроизводимостью (86%), делает их приоритетными для рутинных измерений метаболитов плазмы крови.

**Таблица 2.** Результаты масс-спектрометрического анализа метаболитов плазмы крови: воспроизводимость результатов между повторами и количество детектированных ионов метаболитов при разных вариантах пробоподготовки и способе анализа.

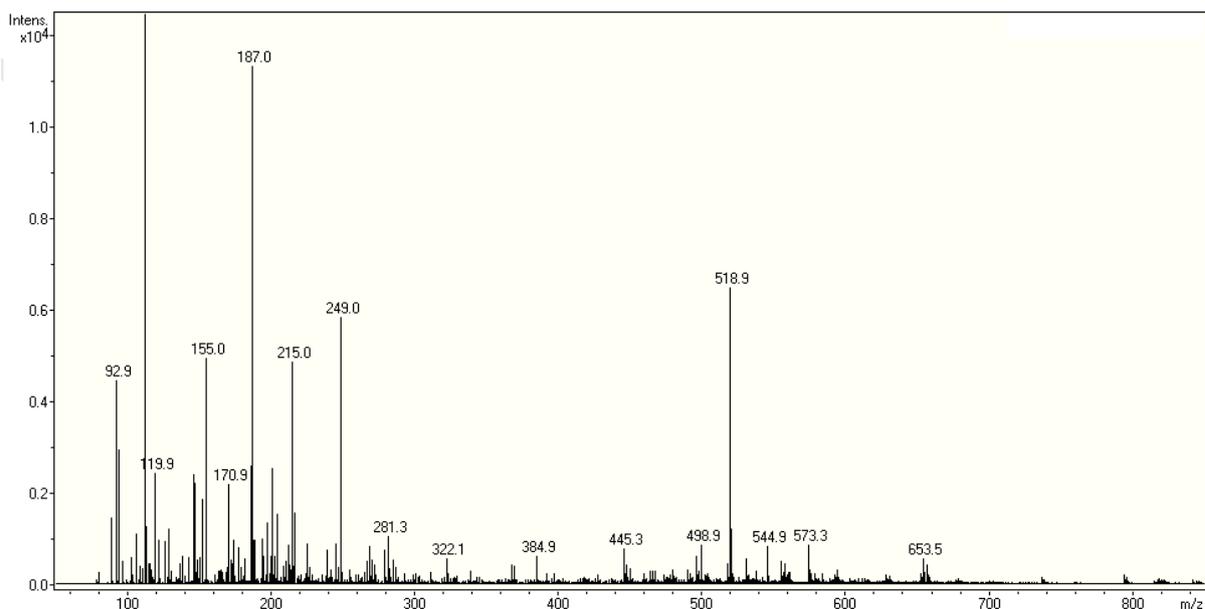
Метод анализа	Оборудование	Протокол пробоподготовки	Диапазон регистрации ионов (m/z)	Время записи масс-спектра (мин)	Число детектированных ионов метаболитов в режиме детекции		Время анализа <sup>а)</sup> (мин)	Средняя точность измерения (ppm) <sup>б)</sup>	Воспроизводимость <sup>в)</sup>	
					положительно заряженных ионов	отрицательно заряженных ионов				
Прямая масс-спектрометрия	MicroTOF-Q	осаждение метанолом	50 - 1000	1	820±192	632±215	12	4	79%	
				5	943±211	730±175	25	4	82%	
				10	1105±215	856±205	40	4	86%	
			250 - 1500	1	768±198	602±143	12	5	70%	
			ультра-фильтрация	250 - 1500	1	623±141	312±97	12	5	68%
			осаждение метанолом	500 - 3000	1	698±217	504±189	12	6	60%
	Арех Ultra	осаждение метанолом	75 - 800	10	3257±623	1720±344	30	1	85%	
ВЭЖХ-МС	Agilent 1200 - MicroTOF-Q	осаждение метанолом	250 - 1500	45	242	—	70	5	28%	
		ультра-фильтрация	250 - 1500	45	310	—	70	5	34%	

а) Указано время записи масс-спектрометрического сигнала и время необходимое для промывки масс-спектрометра и системы инъекции пробы; б) ppm – миллионные доли массы; в) процент воспроизводимых ионов в трех технических повторях.

А)

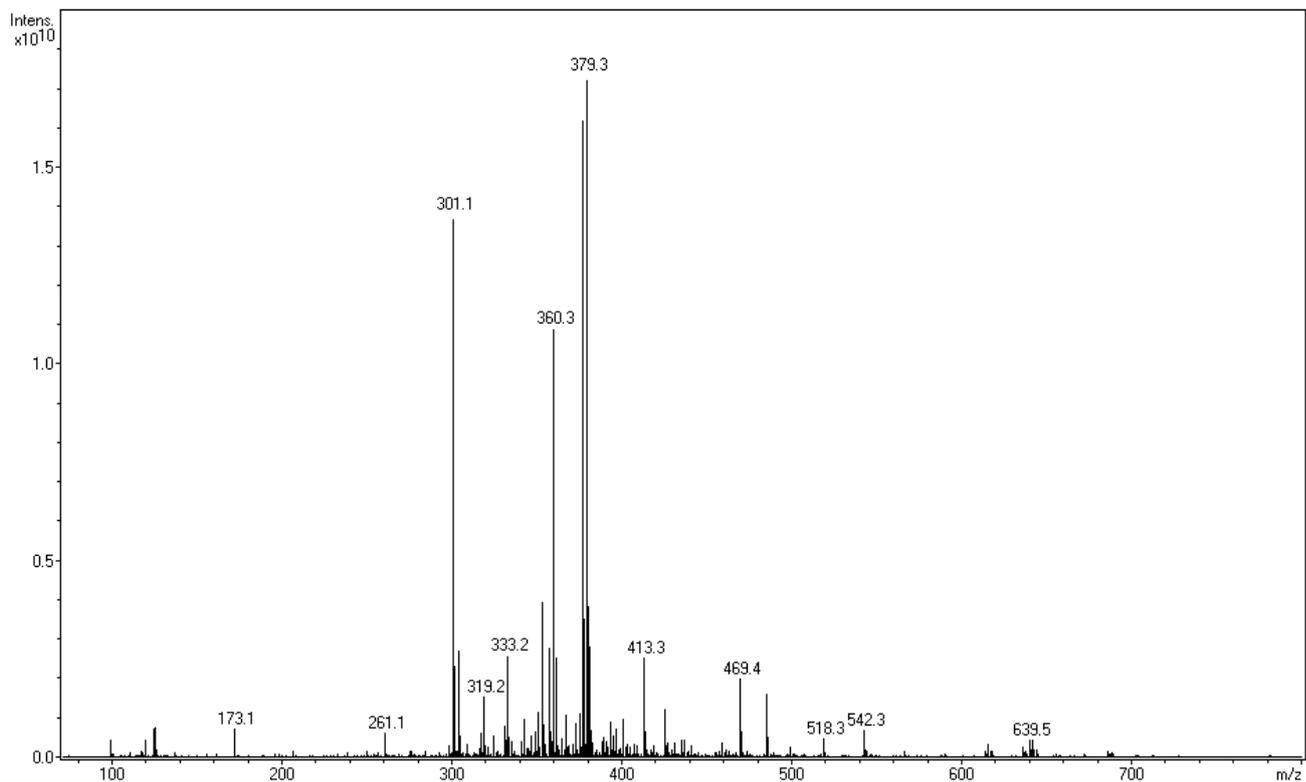


Б)

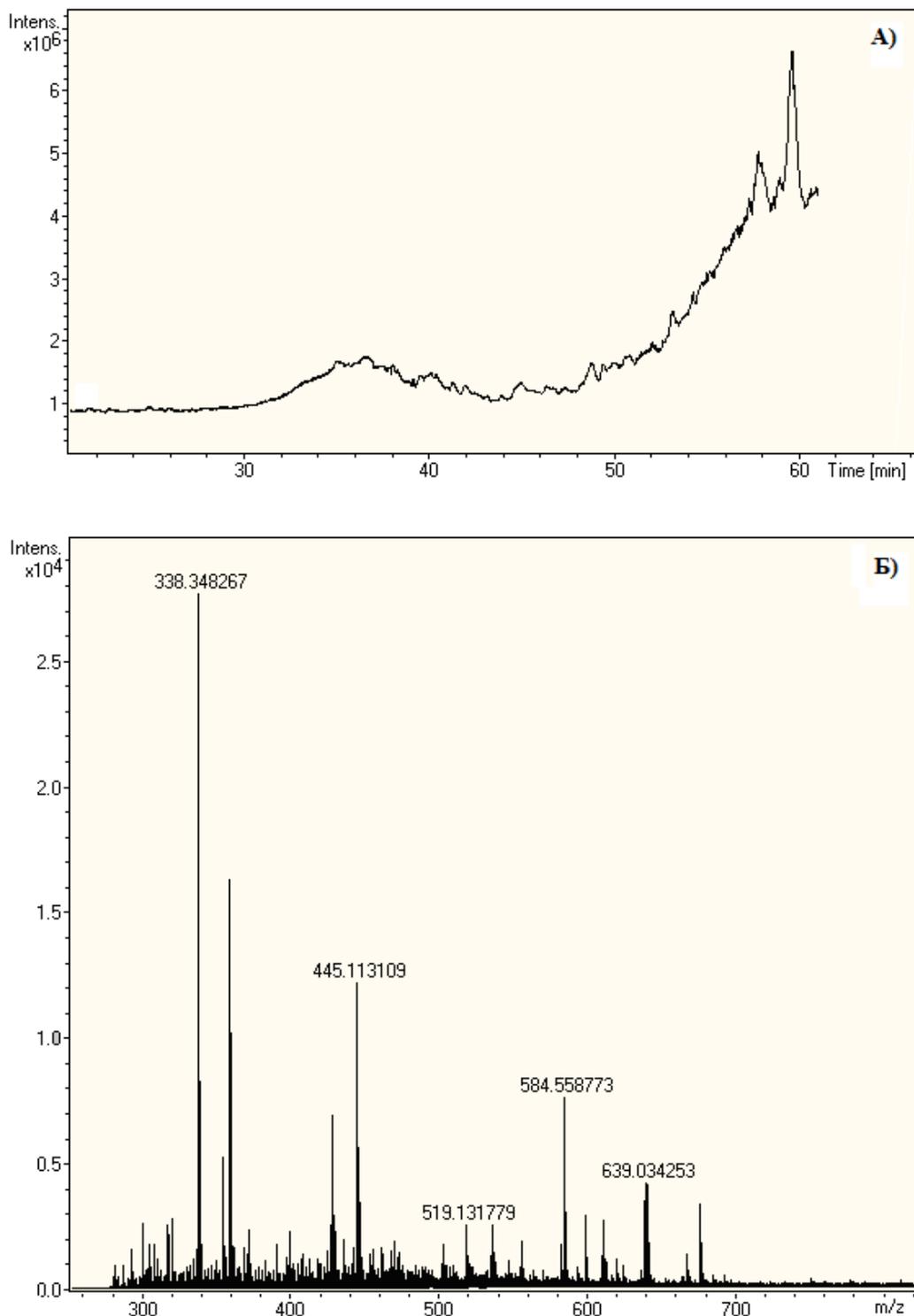


**Рисунок 13.** Пример масс-спектров метаболитов плазмы крови.

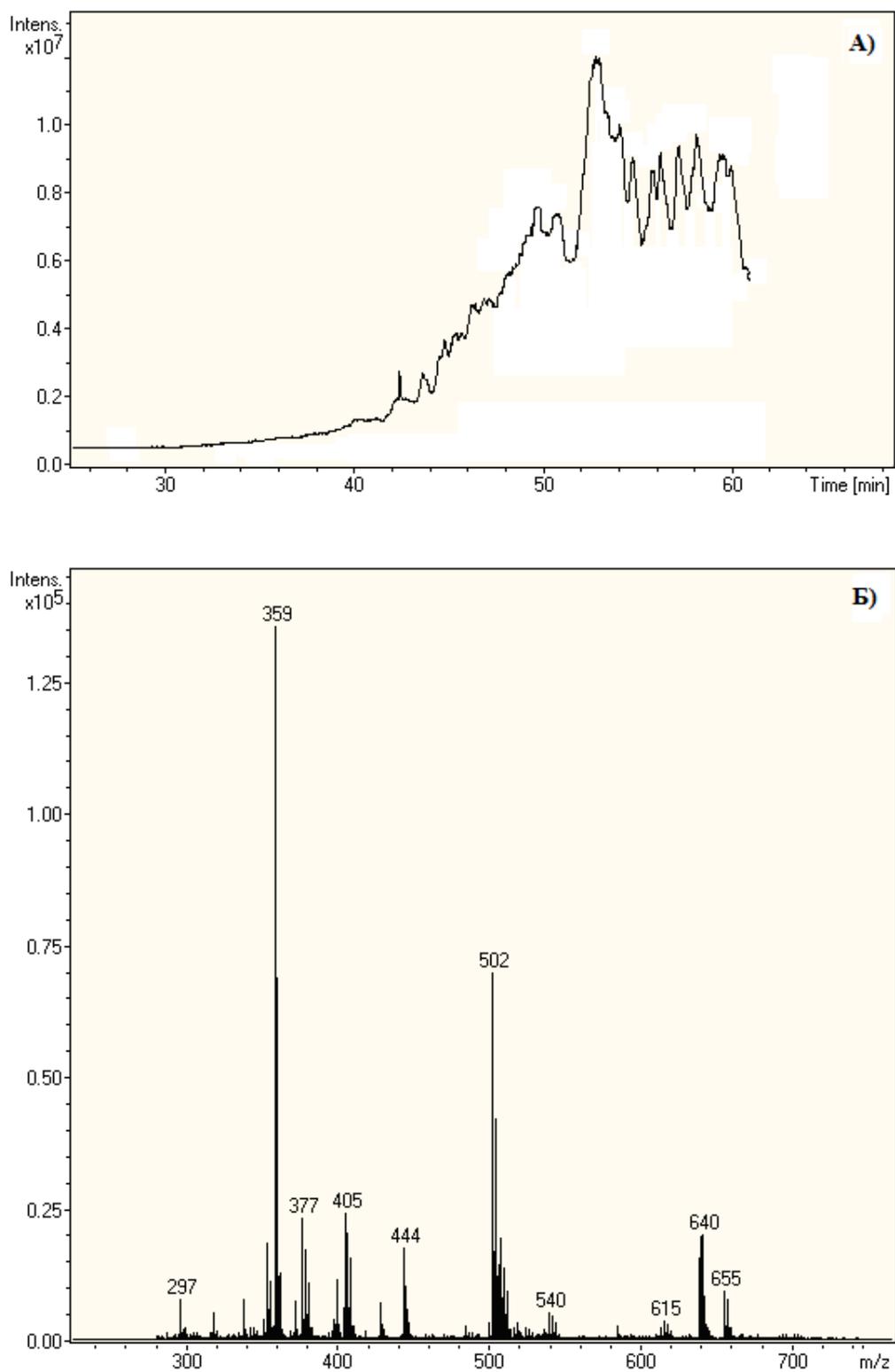
**А** – масс-спектр полученный в режиме детекции положительно заряженных ионов, **Б** – масс-спектр полученный в режиме детекции отрицательно заряженных ионов. Масс-спектры получены прямой инъекцией метаболитов в электроспрейный источник ионизации квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра MicrOTOF-Q. Диапазон детекции масс ионов метаболитов  $m/z$  50 - 1000.



**Рисунок 14.** Пример масс-спектра метаболитов плазмы крови, полученного прямой инъекцией образца метаболитов в электроспрейный источник ионизации масс-спектрометра ион-циклотронного резонанса Apex Ultra. Диапазон детекции масс ионов метаболитов  $m/z$  75 - 800. Масс-спектр получен в режиме детекции положительно заряженных ионов.



**Рисунок 15.** Пример результата анализа ультрафильтрата плазмы крови методом ВЭЖХ-МС. **А** – хроматограмма образца плазмы, записанная по полному ионному току, **Б** – масс-спектр, полученный суммированием сигнала по всей хроматограмме. Диапазон детекции масс ионов метаболитов  $m/z$  250 - 1500.



**Рисунок 16.** Пример результата анализа метаболитов плазмы крови методом ВЭЖХ-МС. Депротеинизацию плазмы крови проводили метанолом. **А** – хроматограмма образца плазмы, записанная по полному ионному току, **Б** – масс-спектр, полученный суммированием сигнала по всей хроматограмме. Диапазон детекции масс ионов метаболитов  $m/z$  250 - 1500.

Далее, используя оптимальный протокол (депротеинизацию плазмы метанолом и прямой масс-спектрометрический анализ метаболитов на гибридном квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре), были получены масс-спектры метаболитов плазмы крови больных раком простаты, раком легкого, пациентов с НТГ и условно здоровых добровольцев.

#### **4.2 Выбор алгоритма детекции масс-спектрометрических пиков ионов метаболитов**

Масс-спектр представляет собой набор пиков, указывающих на молекулярные массы анализируемых веществ. В общем случае, на массу вещества указывает максимум пика. В процессе выполнения диссертационной работы необходимо было установить по масс-спектрометрическим пикам массы ионов метаболитов в сотнях спектров, при этом каждый спектр содержал тысячи массовых пиков разной интенсивности. Детекция подобного огромного количества пиков ионов возможна только с применением заранее разработанных алгоритмов с экспериментально подобранными параметрами. Для правильного выбора алгоритма детекции масс-спектрометрических пиков были исследованы наиболее известные из них, такие как Apex, Centroid и Sum Peak.

Алгоритм Apex рекомендован для данных, полученных на масс-спектрометрах с ионной ловушкой или квадруполем. Алгоритм позволяет различать близкостоящие пики, пригоден для детекции пиков ионов с изотопным распределением и пиков, состоящих всего из нескольких точек.

Алгоритм Centroid больше подходит для спектров, полученных для белков, и спектров аналитов, не имеющих изотопного распределения. Если количество точек, используемых для расчета центроида, менее 5-ти, то необходимо применять алгоритм Apex. Более того, алгоритм Centroid дает существенные отклонения при детекции несимметричных пиков.

Алгоритм Sum Peak является относительно новым алгоритмом, который основан на расчете скользящей суммы. Отличительной особенностью данного алгоритма является быстрый расчет и возможность его применения для спектров, полученных с высоким разрешением и наличием нелинейности в детекции масс веществ (то есть пригоден для спектров, полученных на времяпролетных масс-спектрометрах). Для успешного применения данного алгоритма необходимо, чтобы спектр был снят с неизменным разрешением. Требование к постоянству ширины пика на протяжении всего спектра в данном алгоритме менее выражено, чем у алгоритмов Apex и Centroid.

Таким образом, учитывая основные характеристики алгоритмов детекции пиков, с одной стороны, и особенности используемых в работе масс-спектрометрических данных, а именно:

- масс-спектры получены на гибридном квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре;
- масс-спектры получены с высоким разрешением и содержат множество (тысячи) пиков;
- присутствуют масс-спектрометрические пики изотопных распределений;
- наличие множества (сотен) масс-спектров;
- масс-спектры низкомолекулярных веществ (т.е. не макромолекул);
- в масс-спектрах есть множество пиков с низкой интенсивностью, а также есть несимметричные пики и пики, состоящие из малого количества точек,

следует, что в данной работе наиболее пригодным алгоритмом для детекции пиков является алгоритм Sum Peak. Данный алгоритм совместим с нелинейностью масс-спектрометрических данных, полученных на времяпролетных масс-спектрометрах, совместим с наличием в спектрах изотопного распределения, позволяет детектировать низкоинтенсивные пики, состоящие из малого количества точек. Кроме того, быстрота расчета по

данному алгоритму позволит в приемлемые сроки рассчитать значительное количество масс-спектров, имеющих в диссертационной работе.

Для формирования выборки масс-спектрометрических данных параметры алгоритма Sum Peak были подобраны так, чтобы детектировать не менее 95% целевых масс-спектрометрических пиков, относящихся к ионам метаболитов, и включать в список масс ионов не более 5% нерелевантных (шумовых) пиков. Результаты подбора параметров на 10-ти выбранных случайным образом спектрах представлены в Таблице 3, из которой следует, что надлежащее качество в детекции пиков было достигнуто.

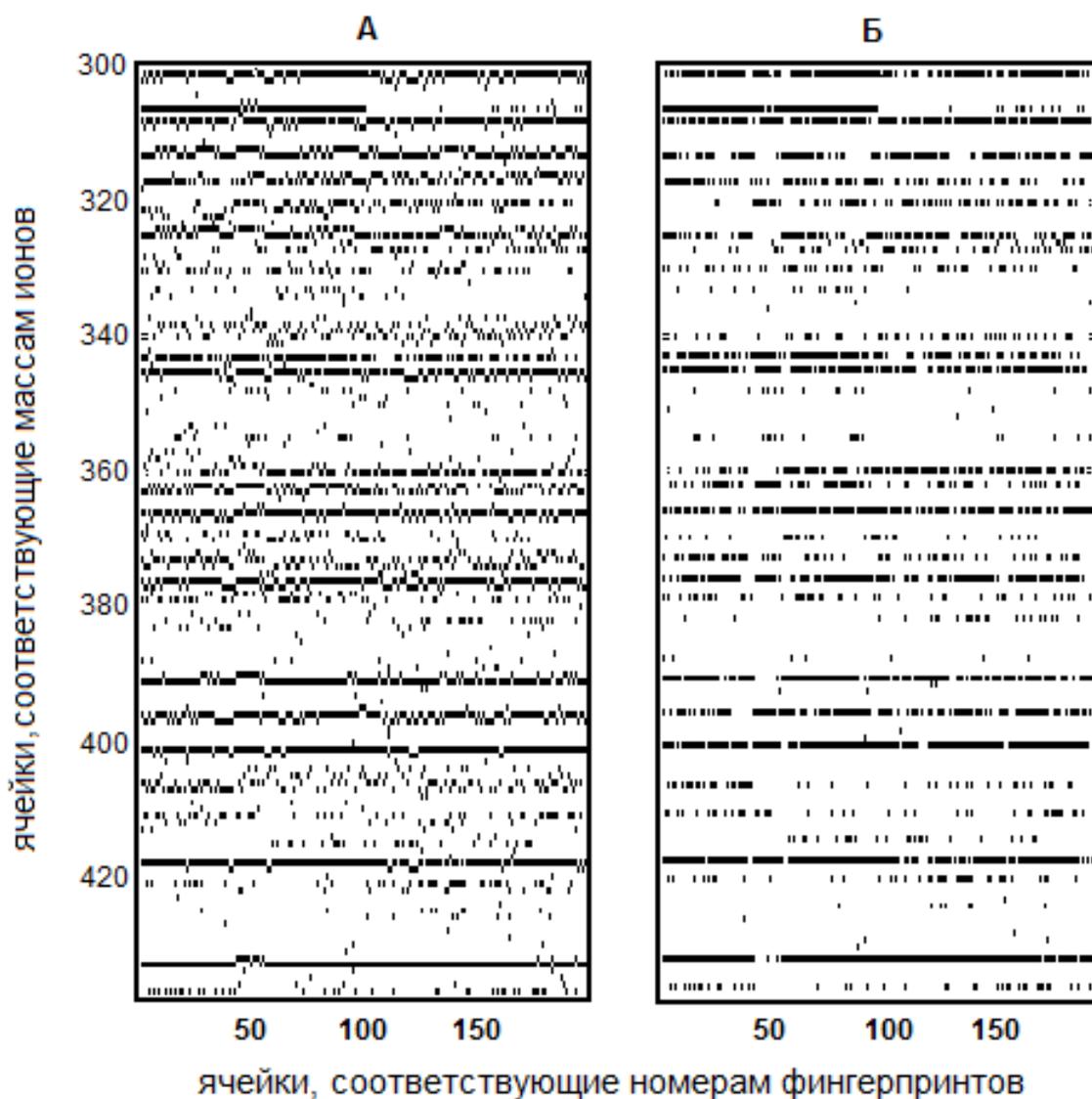
**Таблица 3.** Результат тестирования эффективности детекции пиков с применением алгоритма Sum Peak с экспериментально подобранными параметрами.

Тип детектируемых ионов	Пороговые значения для детекции пиков			Эффективность детекции пиков	
	Сигнал/шум	интенсивность		Детекция целевых пиков (%) <sup>а</sup>	Детекция шумовых пиков (%) <sup>б</sup>
		относительная	абсолютная		
положительные	1	0,005%	3	95,2 ± 2,5	4,8 ± 2,5
отрицательные	1	0,005%	2	95,0 ± 2,8	5,0 ± 2,8

а) данные рассчитаны как среднее значение ± стандартное отклонение для 10-ти масс-спектров; б) шумовым пиком в спектре считался пик низкой интенсивности, не входящий в изотопное распределение и не воспроизводящийся в остальных 9-ти масс-спектрах.

### 4.3 Выравнивание масс-спектрометрических данных

Результат действия алгоритма выравнивания масс-спектрометрических пиков представлен на рисунке 17, из которого следует, что бинарная масс-спектрометрическая матрица после обработки состояла уже из выровненных фингерпринтов, пригодных для дальнейшего статистического анализа. После выравнивания малоинформативные строки матрицы, к которым отнесли строки, содержащие  $> 80\%$  нулей, были удалены.



**Рисунок 17.** Фрагмент бинарной матрицы масс-спектрометрических данных до (А) и после (Б) выравнивания.

**А** – фрагмент матрицы фингерпринтов до выравнивания, показывающий, что пики ионов метаболитов в большинстве не выровнены друг относительно друга, что не позволяет провести статистический анализ. **Б** – тот же фрагмент матрицы после выравнивания, показывающий, что пики ионов метаболитов в большинстве своем выровнены друг относительно друга, что позволяет провести статистический анализ. Штрих черного цвета указывает на наличие пика иона метаболита в соответствующей ячейке матрицы (соответствует '1' при бинарном кодировании).

#### **4.4 Контроль качества образцов плазмы крови и пробоподготовки по масс-спектрометрическим данным**

С целью контроля качества проб плазмы крови, были выявлены пики калийсодержащих ионов в масс-спектрах, полученных в режиме регистрации как положительно, так и отрицательно заряженных ионов. Идентификацию ионов осуществляли на основе точно измеренной массы и характерного изотопного распределения. Наиболее интенсивные из выявленных калийсодержащих ионов представлены в Таблице 4, из которой видно, что ион  $K_2Cl^+$  является наиболее интенсивным.

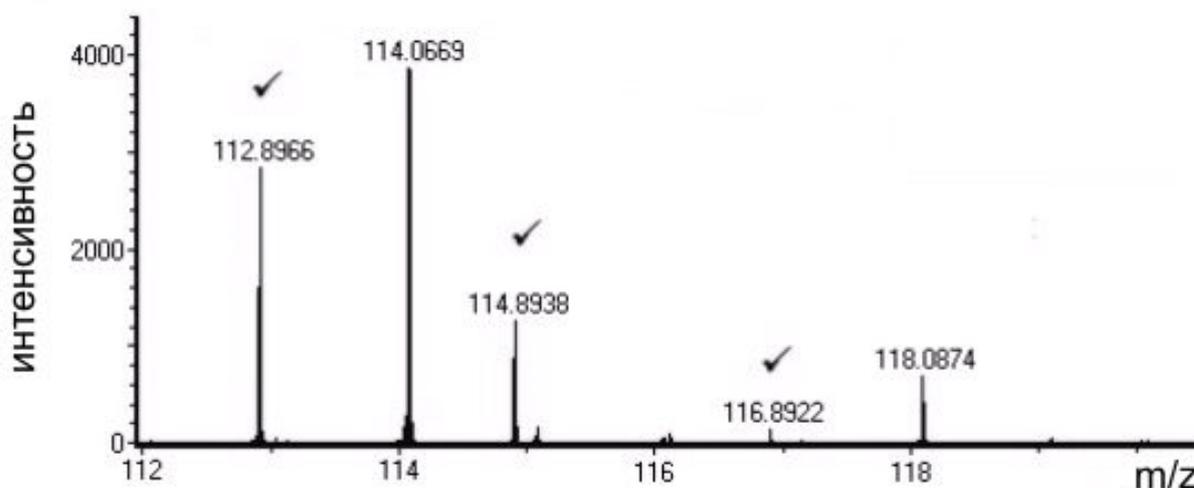
**Таблица 4.** Наиболее интенсивные калийсодержащие ионы, выявленные в масс-спектрах метаболитов плазмы крови.

Молекулярный вес (m/z)		Элементный состав	Изотопное распределение <sup>а</sup> (%)	Интенсивность пика <sup>б</sup>
измеренный	вычисленный			
<b>Положительно заряженные</b>				
96,9209	96,9218	$\text{KNaCl}^+$	100, 39, 2	1506 (51,5%)
<b>112,8966</b>	<b>112,8957</b>	<b><math>\text{K}_2\text{Cl}^+</math></b>	<b>100, 46, 5</b>	<b>2923 (100%)</b>
170,8540	170,8543	$\text{K}_2\text{NaCl}_2^+$	100, 78, 20, 2	111 (3,7%)
186,8245	186,8283	$\text{K}_3\text{Cl}_2^+$	100, 86, 26, 3	23 (0,8%)
244,7892	244,7869	$\text{K}_3\text{NaCl}_3^+$	85, 100, 45, 10	83 (2,9%)
<b>Отрицательно заряженные</b>				
108,9023	108,9007	$\text{KCl}_2^-$	100, 71, 14	351 (12,0%)
224,8207	224,8181	$\text{KNa}_2\text{Cl}_4^-$	74, 100, 52, 13	195 (6,7%)
240,7956	240,7920	$\text{K}_2\text{NaCl}_4^-$	70, 100, 56, 16, 2	48 (1,7%)

а) 100% соответствует наиболее интенсивному пику в изотопном распределении; пики с интенсивностью менее 2% не указаны в изотопном распределении. б) Наиболее интенсивный пик взят за 100%, интенсивности остальных пиков взяты по отношению к нему в процентах и указаны в скобках.

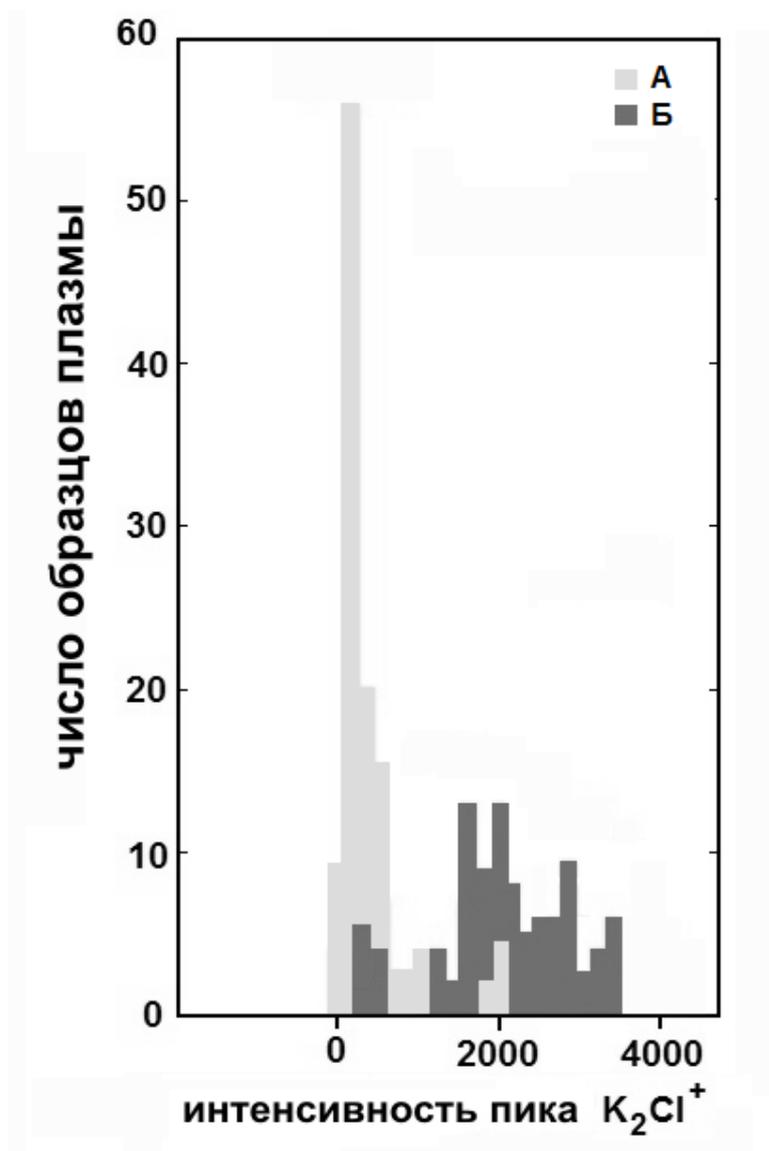
Характерный изотопный паттерн, идентифицирующий  $\text{K}_2\text{Cl}^+$  ион в масс-спектре, представлен на рисунке 18. Таким образом, измерение

интенсивности пиков данного иона является наиболее удобным для оценки уровня калия в пробах.



**Рисунок 18.** Фрагмент масс-спектра метаболитов плазмы крови, полученного в режиме детекции положительно заряженных ионов и показывающий масс-спектрометрические пики иона  $K_2Cl^+$  (отмечены '✓').

Измерение интенсивностей масс-спектрометрических пиков ионов  $K_2Cl^+$  в масс-спектрах выборки образцов плазмы, использованных при метаболомном исследовании рака легкого, выявило, что 95 образцов контрольной группы имеют низкое содержание калия, колеблющееся в узком диапазоне. При этом основная масса проб от больных раком легкого имела повышенное и меняющееся в широком диапазоне содержание калия. Результаты распределения калия по пробам представлены на рисунке 19.



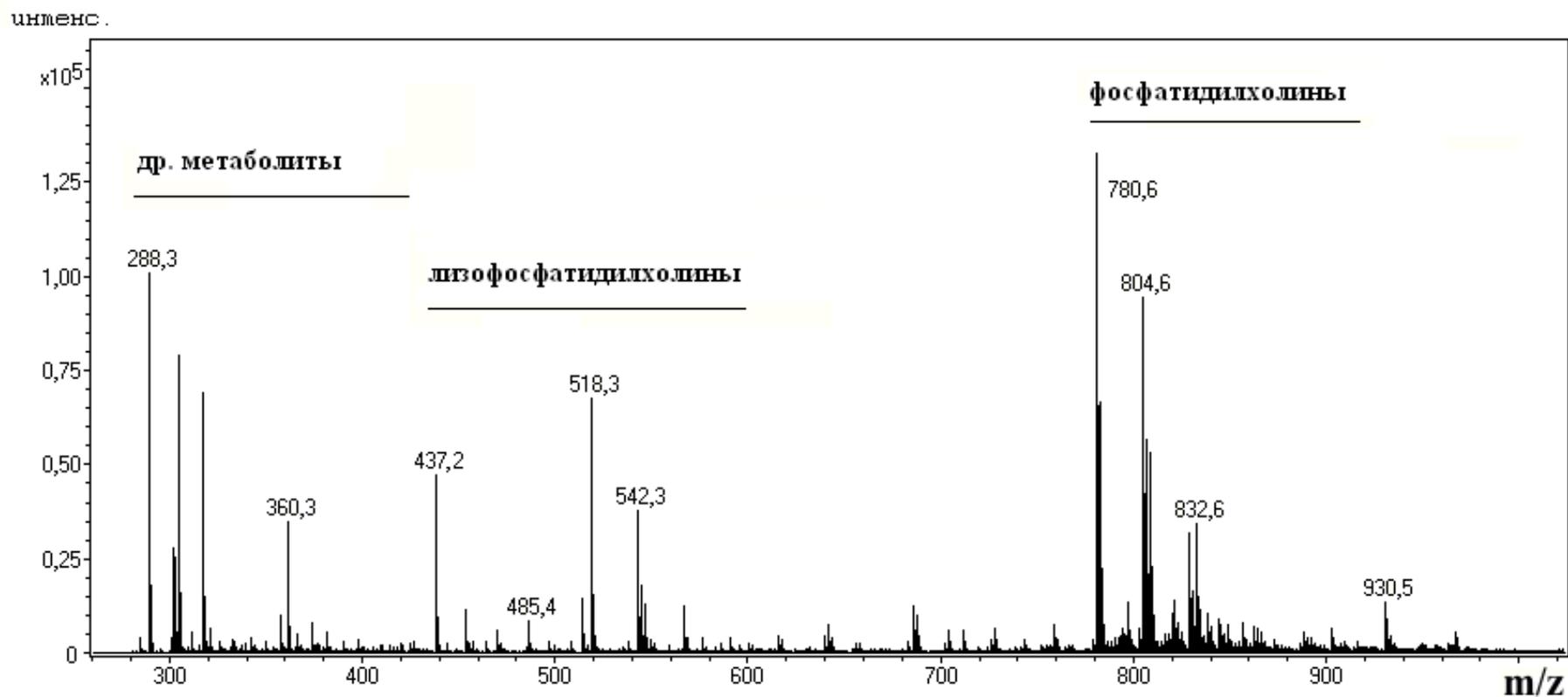
**Рисунок 19.** Распределение уровня калия в образцах плазмы крови, показанное в виде гистограммы распределения значений интенсивностей пиков иона  $K_2Cl^+$ . 'А' соответствует образцам контрольной группы, 'Б' – образцам плазмы больных раком легкого.

Таким образом, установлено, что некоторые образцы плазмы крови, задействованные в исследовании, имели существенное отклонение в концентрации калия, что является критическим при анализе масс-спектрометрических данных и может сказаться на достоверности результатов метаболомного анализа. Чтобы нивелировать влияние колебаний ионов калия в

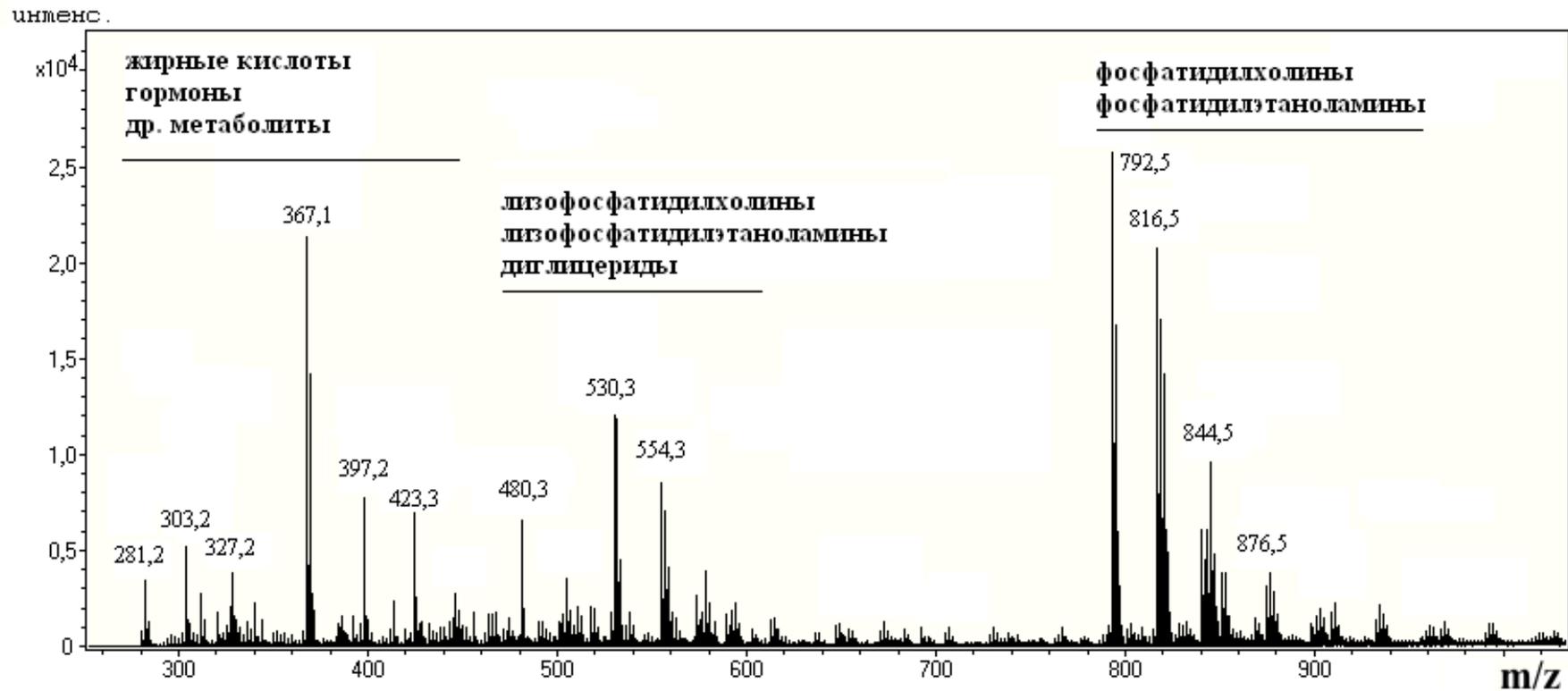
пробе, калийсодержащие ионы метаболитов были исключены из метаболических фингерпринтов плазмы крови (см. описание коррекции масс-спектрометрических данных в разделе "Методы") при подготовке данных для диагностических моделей.

#### **4.5 Метаболический фингерпринтинг плазмы крови больных раком простаты**

В результате проведенного прямого масс-спектрометрического анализа, в пробах было детектировано в среднем по 1900 ионов метаболитов (Табл. 5). Спектры, полученные в режиме детекции отрицательно и положительно заряженных ионов, существенно отличались, сохраняя общий характер распределения масс ионов (Рис. 20 и Рис. 21). В режиме детекции положительно заряженных ионов наблюдалось равномерное распределение масс ионов до  $m/z$  780 и характерное распределение интенсивных масс-спектрометрических пиков в диапазоне  $m/z$  780-900 (Рис. 20). В режиме детекции отрицательно заряженных ионов наблюдалась похожая картина, но с большей интенсивностью пиков в диапазоне до  $m/z$  600 (Рис. 21).



**Рисунок 20.** Масс-спектр метаболитов плазмы крови, полученный в режиме детекции положительно заряженных ионов на квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре с электроспрейным источником ионизации (Лохов и соавт., 2009).



**Рисунок 21.** Масс-спектр метаболитов плазмы крови, полученный в режиме детекции отрицательно заряженных ионов на квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре с электроспрейным источником ионизации (Лохов и соавт., 2009).

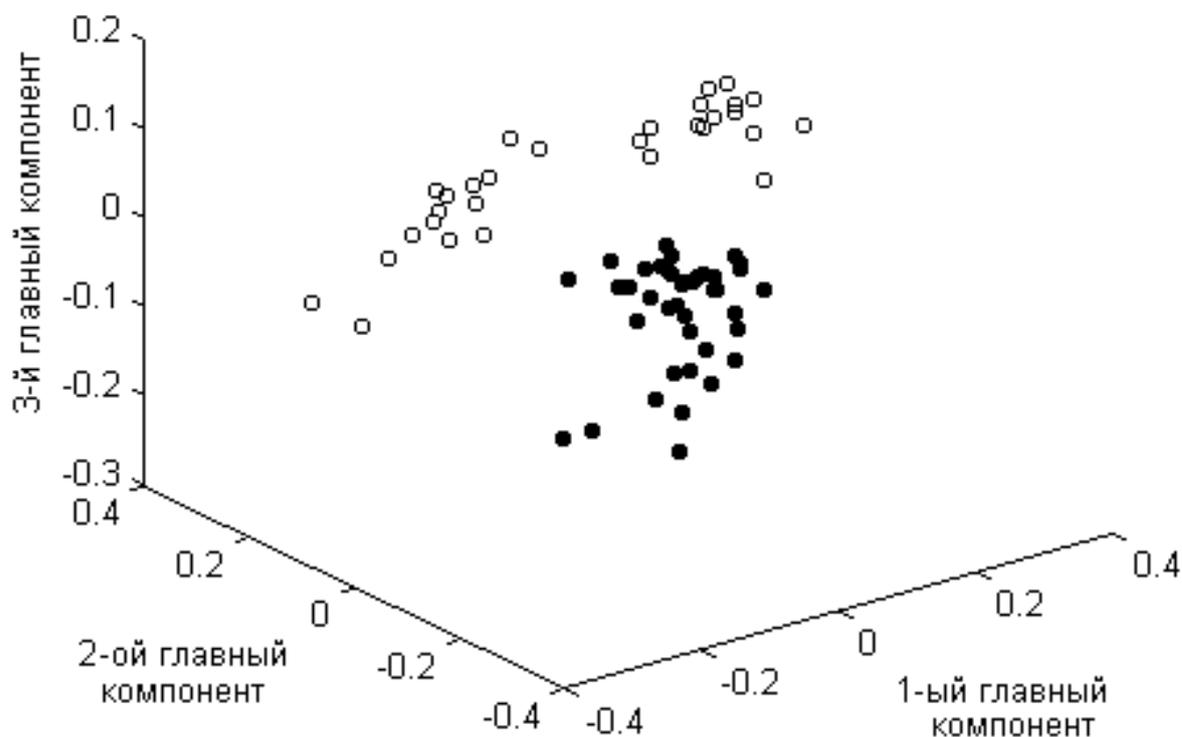
**Таблица 5.** Количество детектированных ионов в масс-спектрах, полученных при анализе метаболитов плазмы крови здоровых добровольцев и больных раком простаты (Лохов и соавт., 2009).

<i>Масс-спектры метаболитов плазмы крови здоровых добровольцев</i>	
В режиме детекции <b>положительно</b> заряженных ионов	1041 ± 152*
В режиме детекции <b>отрицательно</b> заряженных ионов	836 ± 198
Всего детектировано ионов метаболитов	1877 ± 274
<i>Масс-спектры метаболитов плазмы крови больных раком простаты</i>	
В режиме детекции <b>положительно</b> заряженных ионов	1037 ± 213
В режиме детекции <b>отрицательно</b> заряженных ионов	875 ± 194
Всего детектировано ионов метаболитов	1912 ± 264

\* - указаны средние значения ± стандартное отклонение

Математическое преобразование масс-спектров в бинарный код позволило получить отпечатки, представляющие собой мультивариационные характеристики плазмы крови, где переменными являются бинарные значения, указывающие на наличие или отсутствие определенной массы в масс-спектре. Применяя метод главных компонент, удалось выявить в отпечатках варибельность, ассоциированную с диагностируемой болезнью. Выбранные три главных компонента, охватывающие 41% всей варибельности, представленной в отпечатках, позволили эффективно разделить в трехмерном пространстве отпечатки по признаку принадлежности к пробам больных пациентов или здоровых добровольцев (Рис. 22). Любые иные комбинации главных компонент либо не

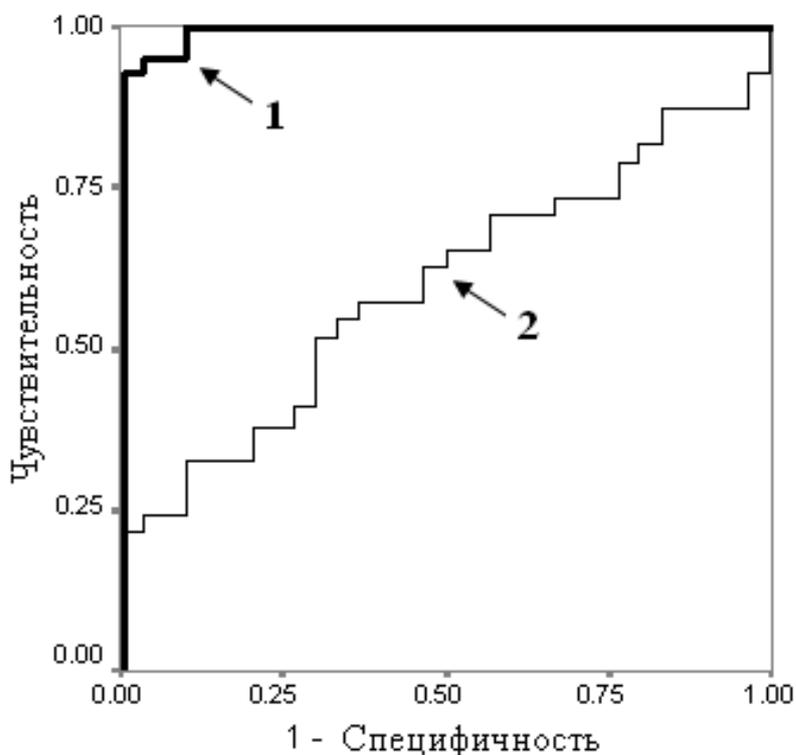
позволяли разделить пробы, либо разделение было менее эффективным (результаты не представлены).



**Рисунок 22.** Проекция метаболитических фингерпринтов на три главных компонента (Лохов и соавт., 2009). ● – проекция фингерпринтов метаболитов плазмы крови больных раком простаты; ○ – проекция фингерпринтов метаболитов плазмы крови здоровых добровольцев.

При рассмотрении проекции фингерпринтов на три выбранных главных компонента становится очевидной возможность разделения их разграничивающей плоскостью на два класса. Для построения такой плоскости использовали метод опорных векторов, который позволяет классифицировать многомерные данные, разделяя их на классы построением гиперплоскости в заданном многомерном пространстве. Формально разделение биопроб на классы является моделью диагностической системы, направленной на выявление рака простаты, эффективность которой может быть установлена

тестированием и определением таких параметров как специфичность, чувствительность и точность (Лохов и соавт., 2009).



**Рисунок 23.** ROC-кривые для модельной диагностики рака простаты на основе метабологического отпечатка (1) и концентрации общего ПСА (2) плазмы крови (Лохов и соавт., 2009). Для построения кривой использовали пробы плазмы крови 40-ка больных раком простаты и 30-ти здоровых добровольцев. Разделение метабологических отпечатков на соответствующие группы проводили методом опорных векторов, примененным к проекции отпечатков на три главных компонента.

Эффективность модели диагностической системы проверяли тестированием *leave-one-out*. Поочередно, исключая по одному тестовому отпечатку из выборки, строили разграничивающую плоскость между проекциями отпечатков на три главных компонента, соответствующих метаболитам плазмы здоровых индивидуумов и больных пациентов. После чего устанавливали, к какому классу будет отнесен тестовый отпечаток.

Результаты классификации по 70-ти фингерпринтам использовали для расчета параметров эффективности диагностики (Табл. 6) и для построения ROC-кривой (Рис. 23), площадь под которой составила 0,99. ПСА-тест для той же выборки пациентов имел площадь под ROC-кривой 0,59.

**Таблица 6.** Характеристики диагностики рака простаты 2-ой стадии на основе классификации метаболитических фингерпринтов или концентрации ПСА в крови пациентов (Лохов и соавт., 2009).

<i>Диагностика на основе метаболитического фингерпринтинга</i>	
Чувствительность	95,0 ± 2,5 %
Специфичность	96,7 ± 2,1%
Точность	95,7 ± 1,6 %
Площадь под ROC-кривой	0,994 ± 0,01
<i>Диагностика на основе концентрации ПСА</i>	
Чувствительность	35,0 %
Специфичность	83,3%
Точность	51,4 %
Площадь под ROC-кривой	0,59 ± 0,13

Доверительный интервал надежности вычисляли для доверительной вероятности 0,95.

#### 4.6 Метаболические биомаркеры рака простаты в плазме крови

Результаты идентификации метаболитов в метаболомном исследовании плазмы крови больных раком простаты представлены в Таблице 7. Согласно данным таблицы область интенсивных масс-спектрометрических пиков соответствует фракции фосфолипидов. Множественность пиков в данной области объясняется разнообразием остатков жирных кислот, входящих в фосфолипиды. Область  $m/z \sim 450-600$  соответствует в основном лизоформам фосфолипидов. Низкомолекулярная область ( $m/z < 400$ ) соответствует метаболитам различных химических классов, выполняющих различные физиологические функции.

**Таблица 7.** Результаты идентификации метаболитов в метаболомном исследовании плазмы крови больных раком простаты (Lokhov et al., 2010b).

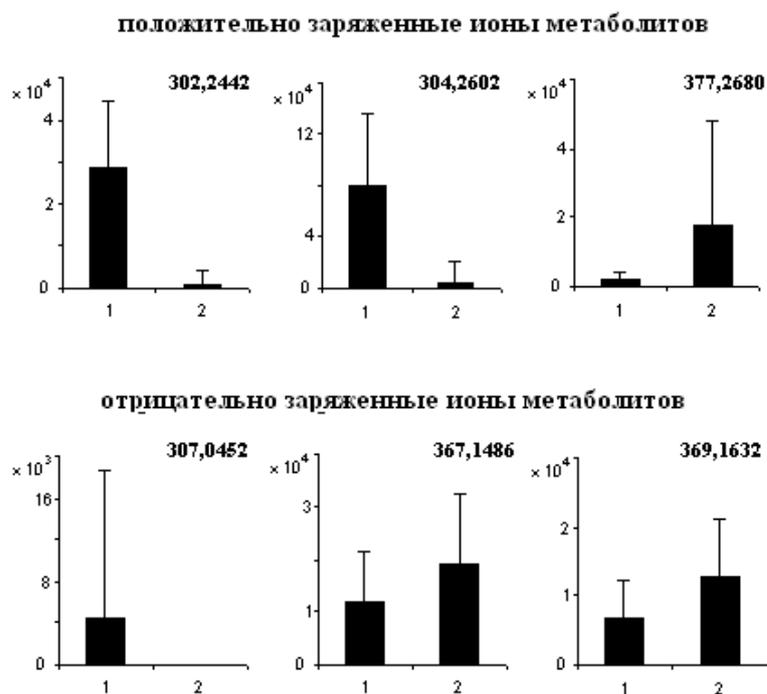
	Молекулярный вес		Элементный состав	Название метаболита	Тест Вилкоксона (p)
	Измеренный (m/z)	Соответствующий элементному составу (Да)*			
<b>Положительно заряженные ионы метаболитов</b>					
1	288,2906	288,2897	$C_{17}H_{37}NO_2$	сфингозин	0,49
2	302,2442	302,2326	$C_{16}H_{31}NO_4$	ацилкарнитин	0,00
3	304,2602	304,2635	$C_{20}H_{33}NO$	арахидоноил амин	0,00
4	360,3225	360,3261	$C_{24}H_{41}NO$	R- арахидоноил амин	0,56
5	377,2680	377,3050	$C_{24}H_{40}O_3$	изолитохолевая кислота	0,00
6	437,1928	437,2663	$C_{21}H_{41}O_7P$	1-олеоил-лизоФК	0,06
7	518,3269	518,3241	$C_{26}H_{48}NO_7P$	линоленоил-лизоФХ	0,78
8	542,3208	542,3241	$C_{28}H_{48}NO_7P$	лизоФХ	0,27
9	544,3353	544,3398	$C_{28}H_{50}NO_7P$	лизоФХ	0,42
10	780,5537	780,5538	$C_{44}H_{78}NO_8P$	ФХ	0,74
11	804,5503	804,5538	$C_{46}H_{78}NO_8P$	ФХ	0,43

12	806,5628	806,5694	$C_{46}H_{80}NO_8P$	ФХ	0,84
13	808,5793	808,5851	$C_{46}H_{82}NO_8P$	ФХ	0,62
14	828,5477	828,5538	$C_{48}H_{78}NO_8P$	ФХ	0,89
15	830,5617	830,5694	$C_{48}H_{80}NO_8P$	ФХ	0,87
16	832,5798	832,5851	$C_{48}H_{82}NO_8P$	ФХ	0,65
<b>Отрицательно заряженные ионы метаболитов</b>					
17	303,2238	303,2330	$C_{20}H_{32}O_2$	арахидоновая кислота	0,90
18	307,0452	307,0337	$C_9H_{13}N_2O_8P$	диоксиуридин монофосфат	0,04
19	367,1486	367,1585	$C_{19}H_{28}O_5S$	тестостерон сульфат	0,01
				дигидроэпиандростерон сульфат	
20	369,1632	369,1741	$C_{19}H_{30}O_5S$	андростерон сульфат	0,05
				5 $\alpha$ -дигидростерон сульфат	
21	397,1911	397,1871	$C_{16}H_{33}NO_8P$	глицерофосфохолин	0,41
22	445,3184	445,3113	$C_{28}H_{43}FO_3$	дигидроксивитамин D <sub>2</sub>	0,14
23	480,2977	480,3085	$C_{23}H_{48}NO_7P$	лизоФХ	0,53
24	530,2886	530,3241	$C_{27}H_{50}NO_7P$	лизоФЭ	0,92
25	532,2867	532,3398	$C_{27}H_{52}NO_7P$	лизоФЭ	0,88
26	557,4414	557,4201	$C_{35}H_{58}O_5$	диглицерид	0,28
27	593,4630	593,5140	$C_{37}H_{70}O_5$	диглицерид	0,06
28	792,5106	792,5902	$C_{46}H_{84}NO_7P$	ФХ	0,46
29	794,5182	794,5694	$C_{45}H_{82}NO_8P$	ФХ	0,95
30	816,5114	816,5538	$C_{47}H_{80}NO_8P$	ФЭ	0,34
31	818,5194	818,5694	$C_{47}H_{82}NO_8P$	ФЭ	0,19
32	820,5393	820,5851	$C_{47}H_{84}NO_8P$	ФЭ	0,48
33	840,4984	840,5538	$C_{49}H_{80}NO_8P$	ФЭ	0,38
34	842,5192	842,5694	$C_{49}H_{82}NO_8P$	ФЭ	0,08
35	844,5391	844,5851	$C_{49}H_{84}NO_8P$	ФЭ	0,16
36	850,4731	850,5381	$C_{50}H_{78}NO_8P$	ФХ	0,08

37	852,4776	852,5538	$C_{50}H_{80}NO_8P$	ФХ	0,09
----	----------	----------	---------------------	----	------

ФК – фосфатидная кислота; ФХ – фосфатидилхолин; ФЭ – фосфатидилэтаноламин; R: различные радикалы, например N-бутил или N-пропил  $\alpha$ -метил. \* – рассчитан для детектируемого иона  $[M+H]^+$ , в случае регистрации положительно заряженных ионов, и  $[M-H]^-$ , в случае регистрации отрицательно заряженных ионов.

Статистическим анализом были выявлены массы метаболитов, интенсивности которых в масс-спектрах достоверно изменяются при раке простаты. Все выявленные отличия относились к узкой области низкомолекулярных веществ, например:  $m/z$  302,2442, 304,2602 и 377,2680 – для положительно заряженных метаболитов,  $m/z$  307,0452, 367,1486 и 369,1631 – для отрицательно заряженных метаболитов. Для значений интенсивностей масс-спектрометрических пиков данных метаболитов были посчитаны средние значения и стандартные отклонения (Рис. 24).



**Рисунок 24.** Графики средних значений и стандартных отклонений интенсивностей ионов в масс-спектрах метаболитов крови больных раком простаты (1) и здоровых добровольцев (2). Графики промаркированы измеренными  $m/z$  значениями метаболитов (Lokhov et al., 2010b).

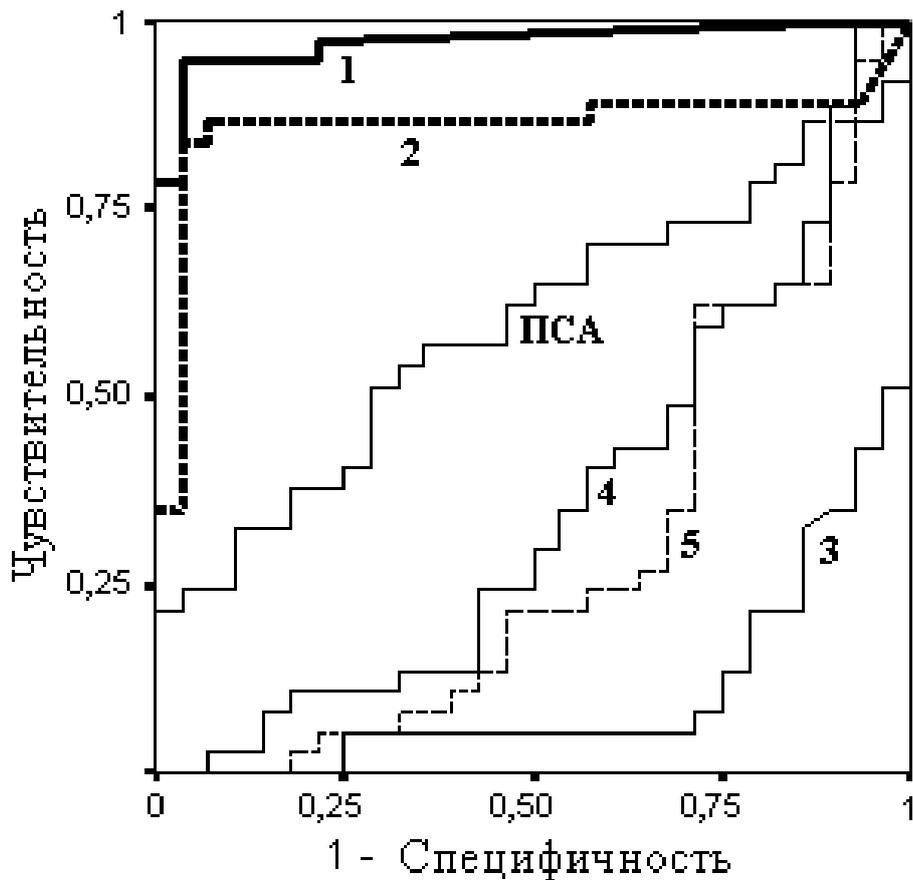
Результаты измерения диагностической силы для данных масс приведены в Таблице 8. Следует отметить, что значения  $m/z$  367,1486 и 369,1632 соответствуют по два кандидата. Данный факт связан с тем, что кандидаты имеют идентичный элементный состав и, соответственно, идентичное изотопное распределение в масс-спектре, что не позволяет их дифференцировать использованным в данной работе методом идентификации метаболитов.

**Таблица 8.** Параметры диагностики рака простаты на основе интенсивностей пиков метаболитов в масс-спектрометрическом фингерпринте плазмы крови (Lokhov et al., 2010b).

Название метаболита	$m/z$ метаболита	Пороговое значение интенсивности	Специфичность (%)	Чувствительность (%)	AUC*
Ацилкарнитин	302,2442	3283	96,4	94,6	<b>0,97</b>
Арахидоноил амин	304,2602	5750	92,9	86,5	<b>0,86</b>
Изолитохолевая кислота	377,2680	2839	21,4	21,6	<b>0,89**</b>
Дигидро-эпиандростерон сульфат	367,1486	13452	42,9	40,5	<b>0,64**</b>
5 $\alpha$ -дигидростерон сульфат	369,1632	5470	28,6	62,2	<b>0,71**</b>
концентрация ПСА	—	5,36 нг/мл	83,3	35,0	<b>0,59</b>

\* – ROC-кривые, по которым была рассчитана AUC представлены на рисунке 25;

\*\* – представлены значения 1-AUC, т.к. концентрация соответствующих метаболитов в крови уменьшается при раке простаты.



**Рисунок 25.** ROC-кривые для моделей диагностики рака простаты на основе измерения интенсивностей пиков метаболитов в масс-спектрометрическом профиле плазмы крови (Lokhov et al., 2010b). Для построения кривых использовали пробы плазмы крови 40-ка больных раком простаты и 30-ти здоровых добровольцев. 1 – кривая для ацилкарнитина; 2 – кривая для арахидоноил амина; 3 – кривая для изолитохолевой кислоты; 4 – кривая для тестостерон сульфата / дигидроэпиандростерон сульфата; 5 – кривая для андростерон сульфата / 5 $\alpha$ -дигидростерон сульфата. ROC-кривые №№3, 4 и 5 построены для метаболитов уменьшающихся в крови при раке простаты.

#### 4.7 Метаболомный анализ плазмы крови пациентов с раком легких

Характеристика группы пациентов и контрольной группы, задействованных в метаболомном исследовании рака легкого, представлены в Таблице 9.

**Таблица 9.** Характеристики контрольной группы и группы пациентов, задействованных в метаболомном исследовании рака легкого.

Характеристика	Контрольная группа	Пациенты с раком легкого
количество (мужчин/женщин)	<b>100 (89/11)</b>	<b>100 (88/12)</b>
Возраст (ср. значение/диапазон)	<b>59/37-71</b>	<b>60/44-76</b>
Курильщики / не курильщики	<b>77/23</b>	<b>93/7</b>
ВМІ (средн. значение)	<b>32,2</b>	<b>30,3</b>
OR развития рака легких для курильщиков (95% CI)	<b>4,0 (1,6–9,7)</b>	
Патогистологическая форма (Sq/SCLC/Ad/LCC/Mx/NOS)	-	<b>58/7/12/4/9/10</b>
Стадия рака (I/II/III/IV)	-	<b>24/12/50/14</b>

Стадии рака указаны в соответствии с TNM классификацией.

Классификация патогистологических форм указана в соответствии с Международной Классификацией Заболеваний для Онкологии (Fritz et al., 2000):

Sq – сквамозноклеточная карцинома;

SCLC – мелкоклеточная карцинома;

Ad – аденокарцинома;

LCC – крупноклеточная карцинома;

Mx – смешанная карцинома;

NOS – карцинома с неустановленным патогистологическим типом.

В результате проведенной пробоподготовки и прямого масс-спектрометрического анализа образцов плазмы крови было детектировано примерно полторы тысячи ионов метаболитов. Существенных различий в количестве детектируемых ионов у больных и здоровых пациентов выявлено не было ( $1580 \pm 110$  и  $1535 \pm 152$ , соответственно; средние значения  $\pm$  стандартное отклонение). В спектрах наблюдали равномерное распределением масс ионов различных метаболитов до  $m/z$  500, после чего в диапазоне с большим значением  $m/z$  наблюдали характерное распределение интенсивных масс-спектрометрических пиков, относящихся к фракции липидов (Wang et al., 2004; Wang et al., 2005; Lokhov et al., 2010a; Lokhov et al., 2010b). Таким образом, для формирования масс-спектрометрических фингерпринтов использовали область до  $m/z$  500, как наиболее информативную (т.е. не скрытую фосфолипидами).

Математическое преобразование масс-спектров в бинарный код позволило получить фингерпринты, представляющие собой мультивариационные характеристики плазмы крови, где переменными являются бинарные значения, указывающие на наличие или отсутствие определенной массы в масс-спектре. Применяя МГК, была существенно снижена размерность использованных масс-спектрометрических данных, путем замены самих фингерпринтов на их проекции в пространстве главных компонент. Причем, выбранные для этого первые семь главных компонент охватывали  $\sim 80\%$  всей вариабельности, представленной в исходных фингерпринтах. Таким образом, существенной потери заключенной в фингерпринтах информации при данном преобразовании не происходило.

К проекциям отпечатков пальцев в пространстве семи главных компонент успешно был применен классификатор с учителем (SVM). Формально разделение проб плазмы на классы является моделью диагностической системы, направленной на выявление рака легкого, эффективность которой может быть установлена тестированием и определением таких параметров как специфичность, чувствительность и точность. Эффективность модели диагностической системы проверяли тестированием *repeated random sub-sampling validation*. Поочередно, исключая 10% отпечатков пальцев из выборки, проводили классификацию оставшихся отпечатков пальцев методом SVM, строя разграничивающую гиперплоскость в семимерном пространстве между проекциями отпечатков пальцев, соответствующих образцам плазмы здоровых добровольцев и больных пациентов. После чего устанавливали, к какому классу будут отнесены проекции тестовых отпечатков пальцев. Результаты классификации по 200-м отпечаткам, соответствующим 100-а больным пациентам и 100-а здоровым людям, участвовавшим в исследовании, использовали для вычисления чувствительности, специфичности и точности модельной диагностики. Указанные характеристики представлены в Таблице 10.

**Таблица 10.** Характеристики диагностики рака легкого на основе классификации метаболических отпечатков пальцев плазмы крови пациентов и условно здоровых добровольцев (Lokhov et al., 2012).

Выборки	Параметры диагностики (%)		
	Чувствительность	Специфичность	Точность
1 стадия vs. Норма	100,0	92,4	93,9 ±0,12*
2 стадия vs. Норма	91,4	92,4	92,3 ±0,13
3 стадия vs. Норма	92,3	92,4	92,4 ±0,11

4 стадия vs. Норма	93,0	92,4	92,5 ± 0,13
1,2 стадии vs. Норма	97,1	92,4	93,6 ± 0,12
1-3 стадии vs. Норма	94,3	92,4	93,3 ± 0,10
1-4 стадии vs. Норма	94,1	92,4	93,3 ± 0,10

\* – доверительный интервал надежности, вычисленный для доверительной вероятности 0,95 и рассчитанный по Вапнику (Вапник, 1984).

Таким образом, были получены данные, указывающие на высокую точность диагностики рака легкого на основе масс-спектрометрических фингерпринтов метаболитов плазмы крови. Используемая при этом статистическая модель, основанная на редукции многомерных данных, представленных в фингерпринтах, до семи переменных с последующей их классификацией, показала возможность диагностики рака легкого на любой стадии развития, включая бессимптомно протекающие ранние стадии. Однако следует отметить, что высокая эффективность диагностики первой стадии (100% чувствительность, см. Табл. 10), определенно не связана с детекцией метаболитов в плазме крови, непосредственно выделяемых опухолью, так как малые размеры опухоли и отсутствие видовой, тканевой и клеточной специфичности большинства метаболитов делает это маловероятным. Скорее всего, факторы предопределяющие развитие опухоли, например курение, отраженные в фингерпринте, привели к наблюдаемой высокой точности диагностики. Дальнейшее исследование, включающее идентификацию метаболитов, вносящих основной вклад в диагностику, подтвердило данное предположение.

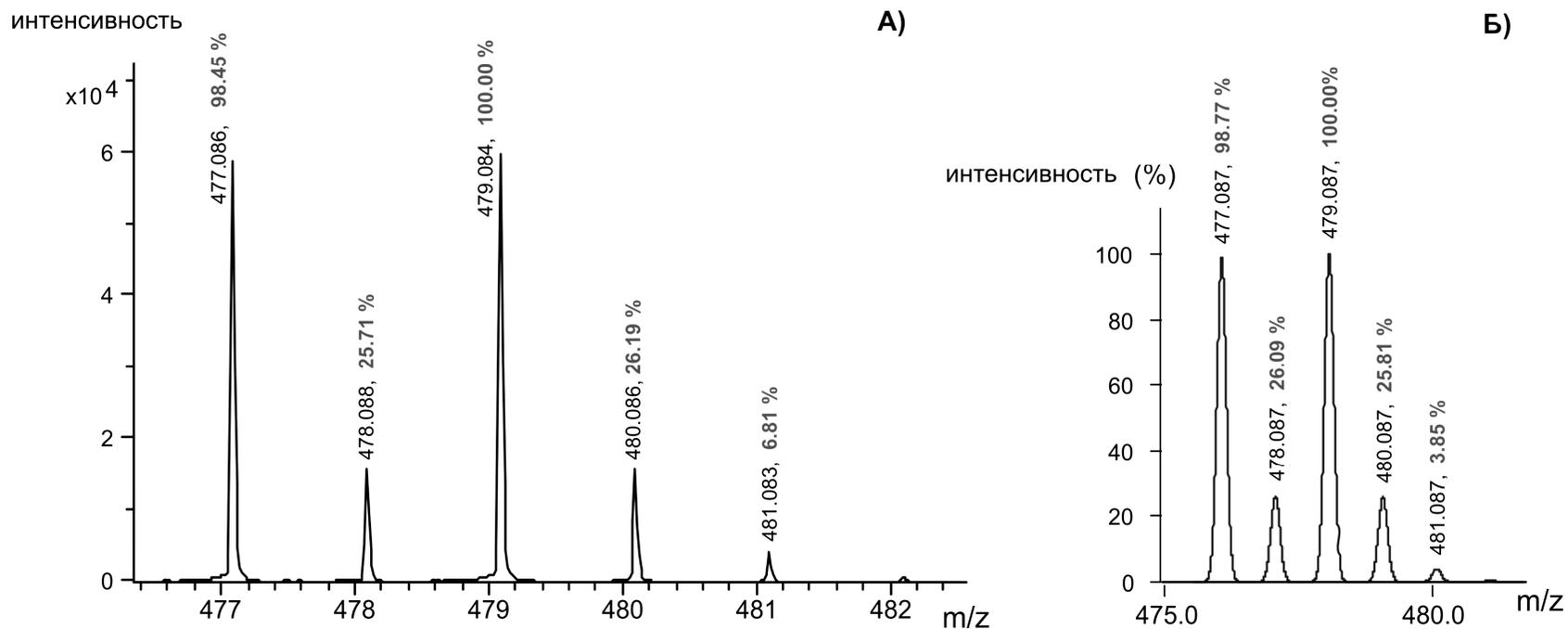
#### **4.8 Метаболиты плазмы крови, вносящие вклад в оценку риска возникновения рака легкого**

В соответствии с положениями, выносимыми на защиту, для подтверждения того, что оценка риска возникновения заболевания рака легкого основана на релевантных данному заболеванию метаболитах, была проведена идентификация ионов метаболитов статистически достоверно связанных с данным заболеванием. Для этого по масс-спектрометрическим данным была установлена точная молекулярная масса этих ионов, установлен по изотопному распределению соответствующий им элементный состав и, на основании имеющихся справочных данных, были идентифицированы метаболиты, которым соответствовали эти ионы. Следует отметить, что для идентификации метаболитов использовали ионы, имеющие четкое изотопное распределение в масс-спектре. Результаты идентификации представлены в Таблице 11. Масс-спектры идентифицированных метаболитов, демонстрирующие измеренную массу и изотопное распределение ионов метаболитов, представлены на рисунках 26-30.

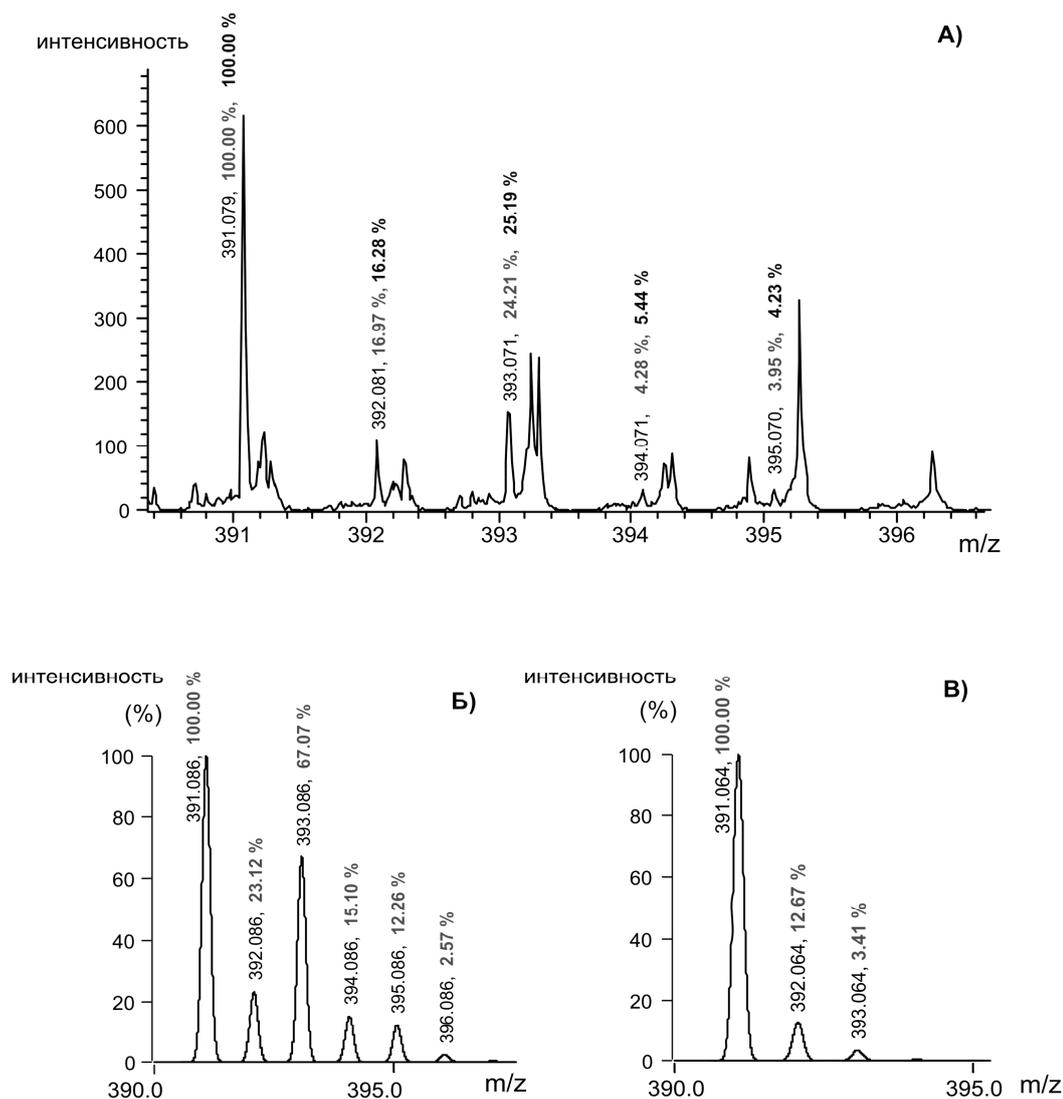
**Таблица 11.** Идентификация метаболитов плазмы крови, формирующих фингерпринт плазмы крови и имеющих AUC > 0,8 для различных стадий развития рака легкого (Lokhov et al., 2013).

Метаболит (химический идентификатор ChEBI)	Молекулярный вес		Детектируемый ион	Элементный состав	Определенный изотопный паттерн Теоретический изотопный паттерн (%)**	Значение AUC				
	Измеренный (m/z)	Справочный (Da)				Стадия рака				
						I	II	III	IV	I-IV
1. Халфенпрокс (CHEBI:39368)	477,086	477,087	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>24</sub> H <sub>23</sub> BrF <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<u>98,5-25,7-100,0-26,2-6,8</u> 98,8-26,1-100,0-25,8-3,9	<b>0,91</b>	<b>0,91</b>	<b>0,81</b>	<b>0,81</b>	<b>0,81</b>
2. Перметрин (CHEBI:34911)	391,079	391,086	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<u>100,0-23,6-66,8-14,9-12,0-3,2</u> 100,0-23,1-67,1-15,1-12,3-2,6	<b>0,81</b>	<b>0,76</b>	<b>0,79</b>	<b>0,77</b>	<b>0,77</b>
3. R-бензол: * Этилбензойная кислота (NA) Метилфенилуксусная кислота (NA) ацетонизол (NA) Диметилбензойная кислота (NA) бензенпропионат (NA)	151,081	151,075	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	<u>100,0-11,3</u> 100,0-10,0	<b>0,91</b>	<b>0,93</b>	<b>0,91</b>	<b>0,91</b>	<b>0,91</b>
4. Сульфон биотина (NA)	277,084	277,085	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S	<u>100,0-13,01-X</u> 100,0-12,8-6,3	<b>0,80</b>	<b>0,81</b>	<b>0,73</b>	<b>0,71</b>	<b>0,71</b>
5. Креатинин (CHEBI:16737)	114,068	114,066	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O	<u>100,0-5,7</u> 100,0-5,6	<b>0,81</b>	<b>0,77</b>	<b>0,73</b>	<b>0,69</b>	<b>0,72</b>
6. Не идентифицирован	248,956	-	[M+X] <sup>-</sup>	-	<u>100,0-4,4-1,0</u> X	<b>0,80</b>	<b>0,79</b>	<b>0,69</b>	<b>0,67</b>	<b>0,69</b>
7. Не идентифицирован	220,952	-	[M+X] <sup>-</sup>	-	<u>X</u> X	<b>0,93</b>	<b>0,91</b>	<b>0,80</b>	<b>0,78</b>	<b>0,80</b>

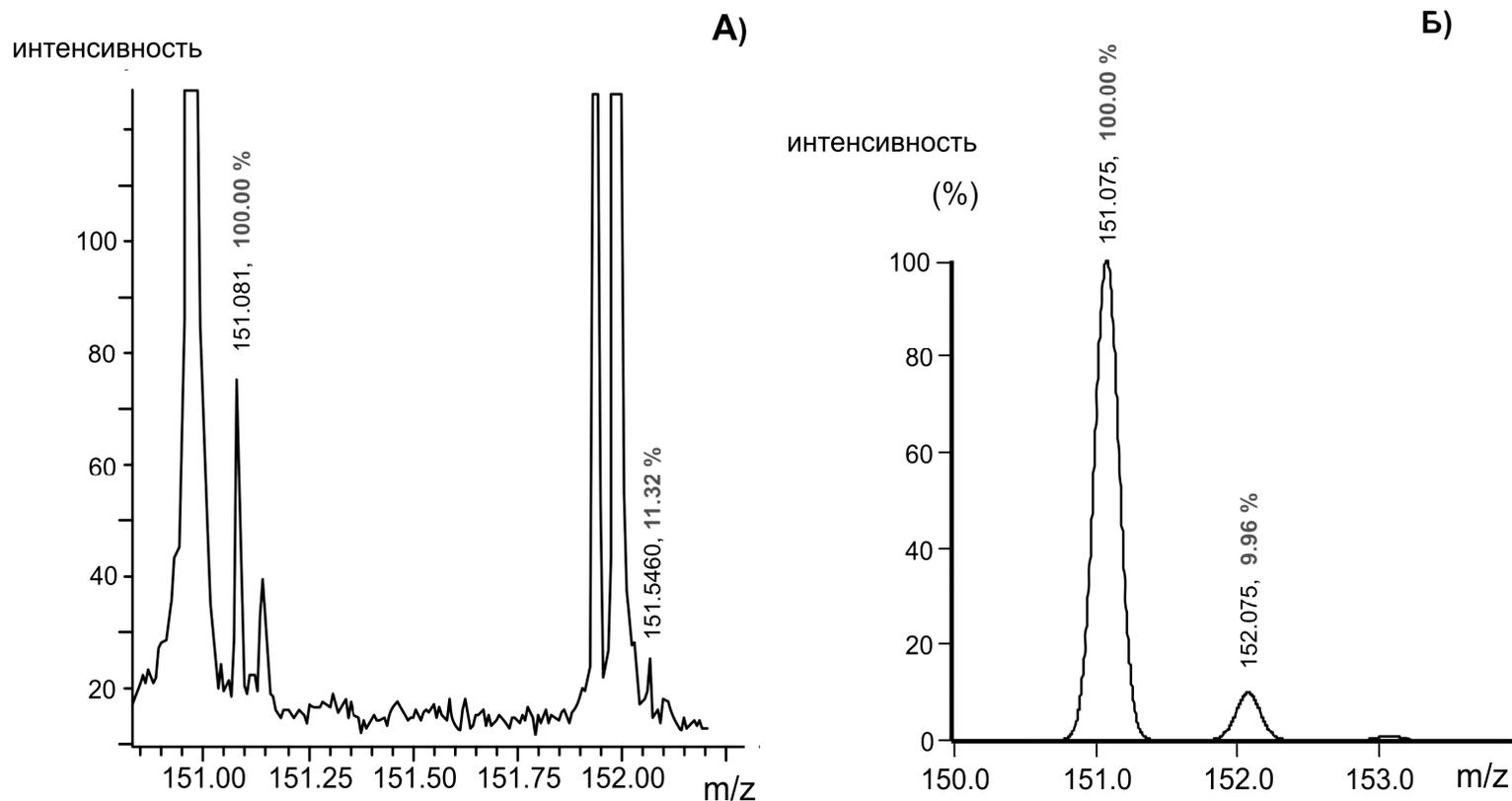
ChEBI (Chemical Entities of Biological Interest) свободно распространяемая база данных низкомолекулярных веществ, разработанная Европейским Институтом Биоинформатики (European Bioinformatics Institute – EBI). \* – Несколько метаболитов соответствуют данной химической формуле. Большинство из них имеют бензольное кольцо, соединенное с боковым радикалом, содержащим -C=O, -O-, -OH или -COOH группу. X – не измерена или неизвестна интенсивность пика. \*\* – 100% соответствует наиболее интенсивному пику в изотопном паттерне вещества. NA – нет идентификатора ChEBI.



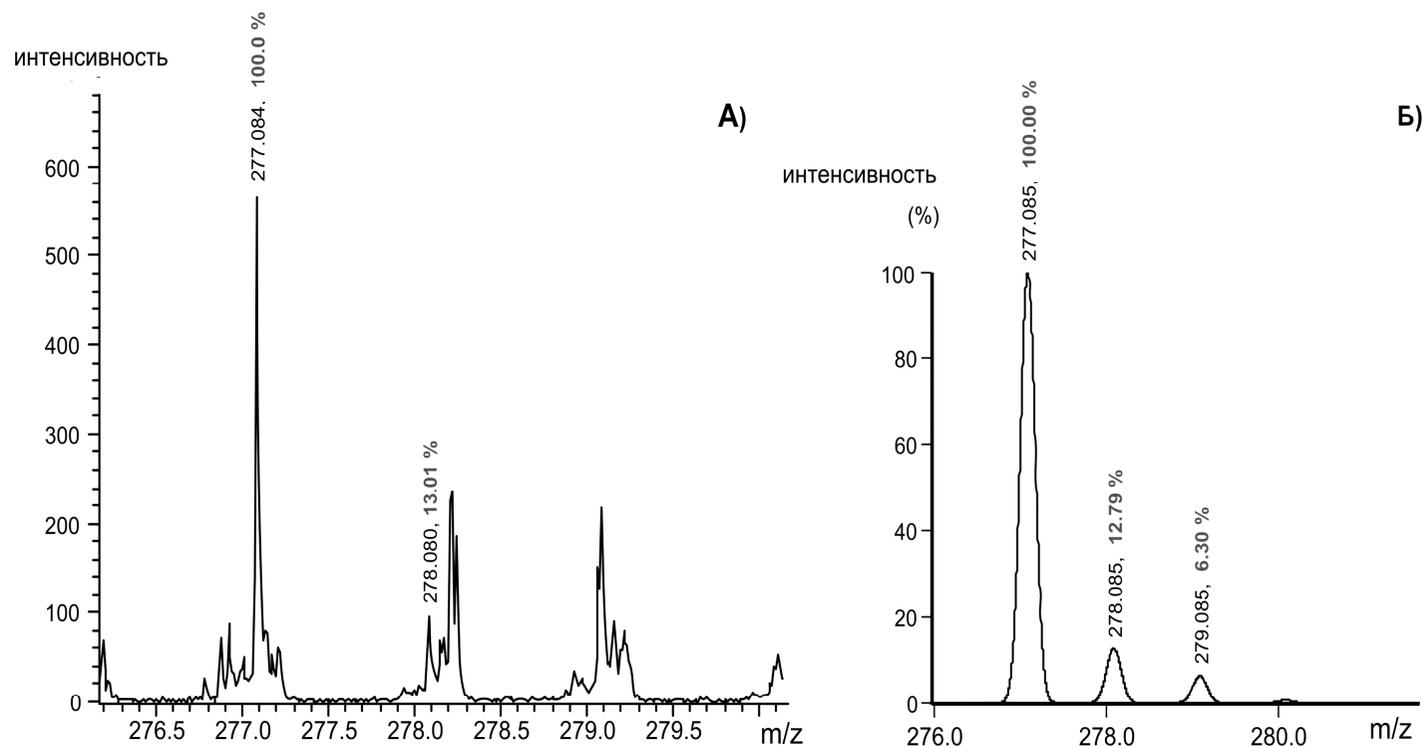
**Рисунок 26.** Измеренный (А) и теоретически рассчитанный (Б) изотопные паттерны халфенпрокса (Lokhov et al, 2013). Пики халфенпрокса обозначены соответствующей им молекулярной массой и выраженным в процентах изотопным паттерном (100% соответствует наиболее интенсивному пику в изотопном паттерне). Идентичность измеренных в эксперименте и теоретически рассчитанных молекулярных масс и изотопных паттернов идентифицируют в масс-спектре халфенпрокс.



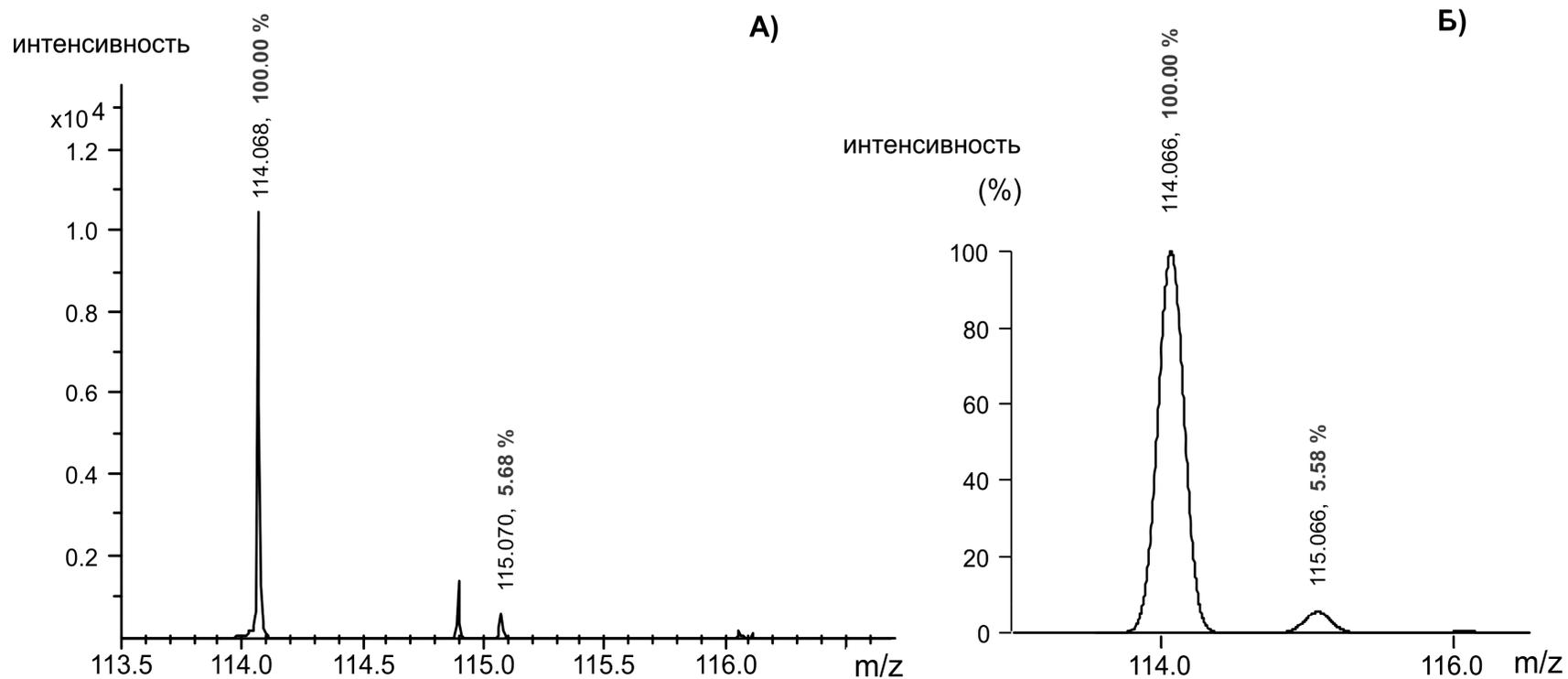
**Рисунок 27.** Измеренный и теоретически рассчитанный изотопные паттерны перметрина и интерферирующего с ним фосфатидилинозитола (Lokhov et al., 2013). Пики обозначены соответствующей им молекулярной массой и выраженным в процентах изотопным паттерном (100% соответствует наиболее интенсивному пику в изотопном паттерне). (А) Указан суммарный фактический (первые значения в процентах) и теоретически рассчитанный (вторые значения в процентах) изотопные паттерны перметрина и фосфатидилинозитола (соотношение перметрин/фосфатидилинозитол = 1,9). (Б) и (В) теоретически рассчитанные изотопные паттерны отдельно для перметрина и фосфатидилинозитола.



**Рисунок 28.** Измеренный (А) и теоретически рассчитанный (Б) изотопные паттерны R-бензола (Lokhov et al., 2013). Пики R-бензола обозначены соответствующей им молекулярной массой и выраженным в процентах изотопным паттерном (100% соответствует наиболее интенсивному пику в изотопном паттерне). Идентичность измеренных в эксперименте и теоретически рассчитанных молекулярных масс и изотопных паттернов идентифицируют в масс-спектре R- бензол.

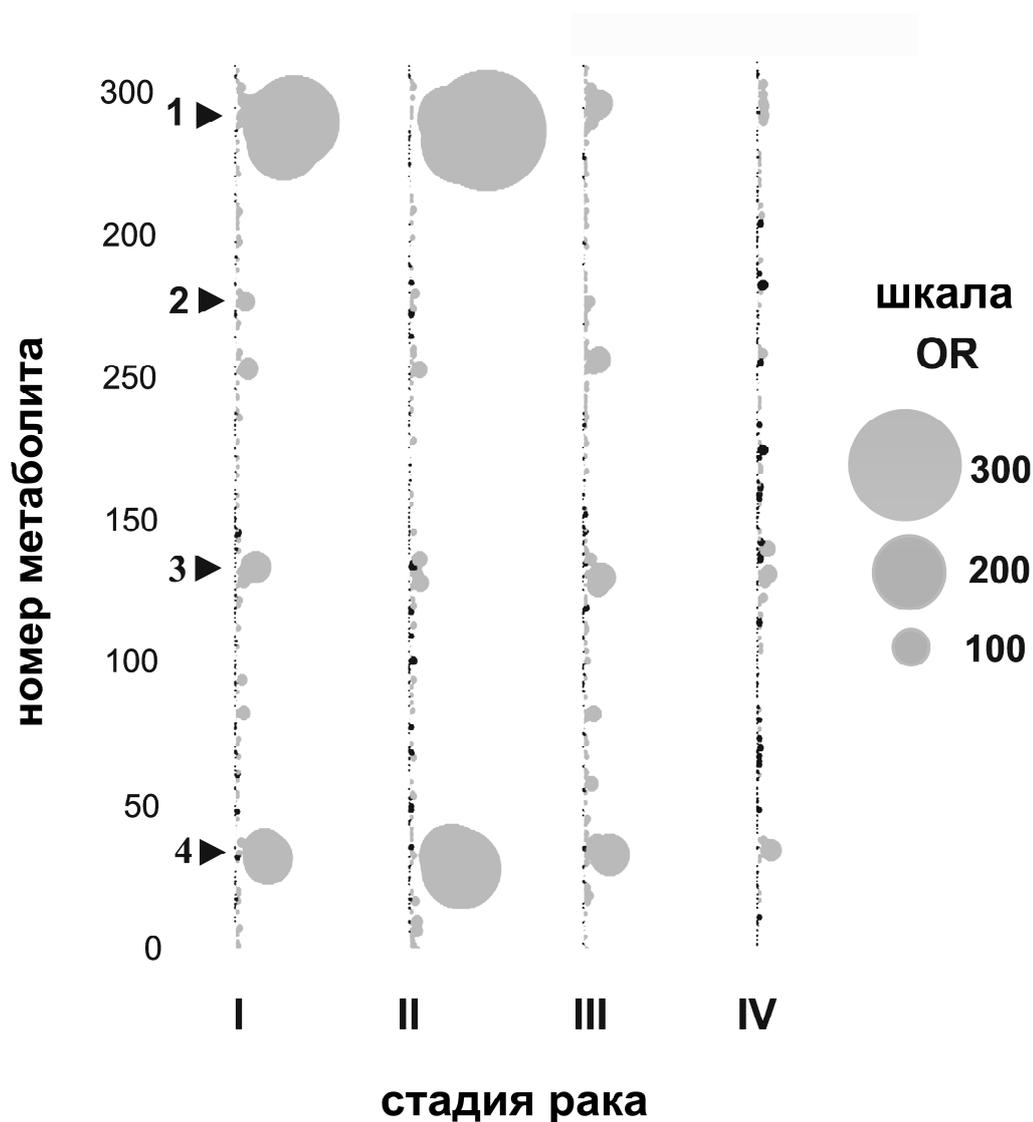


**Рисунок 29.** Измеренный (А) и теоретически рассчитанный (Б) изотопные паттерны сульфона биотина (Lokhov et al., 2013). Пики сульфона биотина обозначены соответствующей им молекулярной массой и выраженным в процентах изотопным паттерном (100% соответствует наиболее интенсивному пику в изотопном паттерне). Идентичность измеренных в эксперименте и теоретически рассчитанных молекулярных масс и изотопных паттернов идентифицируют в масс-спектре сульфон биотина.



**Рисунок 30.** Измеренный (А) и теоретически рассчитанный (Б) изотопные паттерны креатинина (Lokhov et al., 2013). Пики креатинина обозначены соответствующей им молекулярной массой и выраженным в процентах изотопным паттерном (100% соответствует наиболее интенсивному пику в изотопном паттерне). Идентичность измеренных в эксперименте и теоретически рассчитанных молекулярных масс и изотопных паттернов идентифицируют в масс-спектре креатинин.

Следует отметить, что для метаболитов, входящих в метаболический фингерпринт и ассоциированных с раком легких, не выявлено четкой корреляции их концентрации в крови со стадиями развития рака. OR величины, рассчитанные для этих метаболитов, представлены на рисунке 31. Данный факт косвенно подтверждает, что они указывают на факторы развития рака легкого (курение, диета, экологические факторы, генетическая предрасположенность и т.д.), нежели на само развитие рака в организме пациента.



**Рисунок 31.** OR рака легкого всех степеней рассчитанные для метаболитов плазмы крови. Размер круга показывает величину OR в соответствии с

представленной шкалой, рассчитанную на основе интенсивностей масс-спектрометрических пиков метаболитов плазмы крови. Серые круги показывают OR для метаболитов, увеличивающихся при раке легкого, черные – уменьшающиеся. OR величины для халфенпрокса, перметрина, сульфона биотина и R-бензола отмечены цифрами от 1 до 4, соответственно (Lokhov et al., 2013).

Среди метаболитов, концентрация которых увеличивалась при раке легкого с максимальным значением OR, в режиме детекции положительно заряженных ионов были выявлены два пестицида: халфенпрокс и перметрин (Табл. 12).

**Таблица 12.** Метаболиты плазмы крови, указывающие на риск возникновения рака легкого с большим значением OR (Lokhov et al., 2013).

Метаболит (химический идентификатор ChEBI)	OR (95% CI)			
	Стадия рака легкого			
	I	II	III	IV
1. Халфенпрокс (ChEBI:39368)	<b>219</b> (25 - 1905)	<b>288</b> (27 - 3063)	<b>65</b> (9 - 495 )	<b>27</b> (3 -167 )
2. Перметрин (ChEBI:34911)	<b>43</b> (8 - 220)	<b>12</b> (2 - 98 )	<b>12</b> (3 - 58 )	<b>4</b> (0,3 - 43)
4. Сульфон биотина (NA)	<b>80</b> (10 - 652)	<b>42</b> (5-347)	<b>32</b> (7-139)	<b>2</b> (0,7-7)
3. R-бензол (NA)	<b>124</b> (15 - 1056)	<b>192</b> (19 – 1928)	<b>100</b> (13 - 775)	<b>53</b> (6 - 507)

ChEBI (Chemical Entities of Biological Interest) база данных низкомолекулярных веществ со свободным доступом, созданная European Bioinformatics Institute (EBI). NA – идентификатора ChEBI нет.

Значение OR для массовых пиков халфенпрокса находилось в диапазоне от 27 до 288, в зависимости от стадии рака легкого. Подобные значительные величины OR были и для перметрина (Табл. 12).

Другой метаболит, указывающий на риск возникновения рака легкого с большим OR, сульфон биотина, который является окисленным биотином (Табл. 12). Сульфон биотина также был повышен у больных с ранними стадиями рака легкого и не коррелировал со степенью развития заболевания.

Метаболит R-бензол, также указывающий на риск возникновения рака легкого, был установлен по точно измеренной массе и изотопному распределению, соответствующему элементному составу  $C_9H_{10}O_2$ , которому может соответствовать бензольное кольцо с различными, присоединенными к нему одному или двумя углеродными радикалами, окисленными до карбонильной, гидроксильной или карбоксильной группы.

#### 4.9 Диагностика нарушенной толерантности к глюкозе по метаболиту плазмы крови

Статистический анализ клинических характеристик экспериментальной и контрольной групп пациентов, задействованных в метаболомной исследовании СД 2-го типа, представлен в Таблице 13 (исходные данные по пациентам представлены в Приложении).

**Таблица 13.** Клинические характеристики экспериментальной и контрольной групп пациентов (Lokhov et al., 2014b).

ХАРАКТЕРИСТИКИ	ВЕЛИЧИНЫ (среднее знач. ± станд.отклон / диапазон)		AUC	t-тест (p)
	Контрольная группа	Пациенты с НТГ		
Количество человек	30	20	-	-
Пол (м/ж)	15 / 15	10 / 10	0,51	-

<b>Возраст (лет)</b>	<b>53,3 ± 14,3 / 32-82</b>	<b>61,8 ± 12,2 / 38-85</b>		<b>0,66</b>	<b>0,03</b>
<b>ВМІ (кг/м<sup>2</sup>)</b>	<b>35,0 ± 8,2 / 24,5-53,2</b>	<b>33,9 ± 8,9 / 23,2-57,0</b>		<b>0,46</b>	<b>0,66</b>
<b>Уровень глюкозы натощак (ммол/л)</b>	<b>5,5 ± 0,4 / 4,8-6,4</b>	<b>5,6 ± 0,4 / 5-6,1</b>		<b>0,55</b>	<b>0,51</b>
<b>Уровень глюкозы в ПГТТ (ммол/л)</b>	<b>6,4 ± 1,0 / 4,1-7,8</b>	<b>9,8 ± 1,0 / 8,2-11,0</b>		<b>1,00<sup>a</sup></b>	<b>0,00</b>
<b>Инсулин (мкЕд/мл)</b>	<b>16,1 ± 20,0 / 3,3-100,8</b>	<b>14,5 ± 7,9 / 4,9 -31,7</b>		<b>0,59</b>	<b>0,74</b>
<b>НbA1c (%)</b> <b>[ммол/мол]</b>	<b>5,8 ± 0,4 / 5,1-6,4</b> <b>[40 ± 4,4 / 32-46]</b>	<b>6,1 ± 0,4 / 5,4-6,6</b> <b>[43 ± 4,4 / 36-49]</b>		<b>0,77</b>	<b>0,001</b>
<b>ЛНП (ммол/л)</b>	<b>3,4 ± 0,7 / 1,7-5,3</b>	<b>3,1 ± 1,0 / 1,6-4,7</b>		<b>0,41</b>	<b>0,16</b>
<b>ЛВП (ммол/л)</b>	<b>1,2 ± 0,4 / 0,7-1,9</b>	<b>1,1 ± 0,4 / 0,6-1,9</b>		<b>0,40</b>	<b>0,23</b>
<b>Общий холестерин (мол/л)</b>	<b>5,2 ± 0,8 / 3,9-6,6</b>	<b>5,1 ± 1,2 / 3,0-6,8</b>		<b>0,47</b>	<b>0,58</b>
<b>Мочевая кислота (мкмол/л)</b>	<b>374 ± 82 / 223-514</b>	<b>386 ± 83 / 265-581</b>		<b>0,54</b>	<b>0,61</b>
<b>Триглицериды (ммол/л)</b>	<b>1,3 ± 0,6 / 0,5-3,0</b>	<b>1,69 ± 0,9 / 0,8-3,9</b>		<b>0,62</b>	<b>0,07</b>
<b>НОМА-IR</b>	<b>4,0 ± 4,8 / 0,8-24,2</b>	<b>3,6 ± 2,1 / 1,1-8,6</b>		<b>0,59</b>	<b>0,79</b>
<b>НОМА-β</b>	<b>160 ± 202 / 31-1061</b>	<b>139 ± 76 / 55-283</b>		<b>0,58</b>	<b>0,65</b>

а) AUC для глюкозы в ПГТТ равен 1, так как результат ПГТТ был использован для формирования экспериментальной и контрольной групп.

Масс-спектрометрический анализ низкомолекулярной фракции плазмы крови позволил детектировать примерно 4000 ионов метаболитов в одной пробе. AUC был рассчитан для каждого метаболита, используя значения интенсивностей пиков соответствующих им ионов. Ионы (n =51), наиболее выражено связанные с НТГ, были использованы для расчета диагностического показателя. Среди них концентрация 35 ионов увеличивалась при НТГ (при

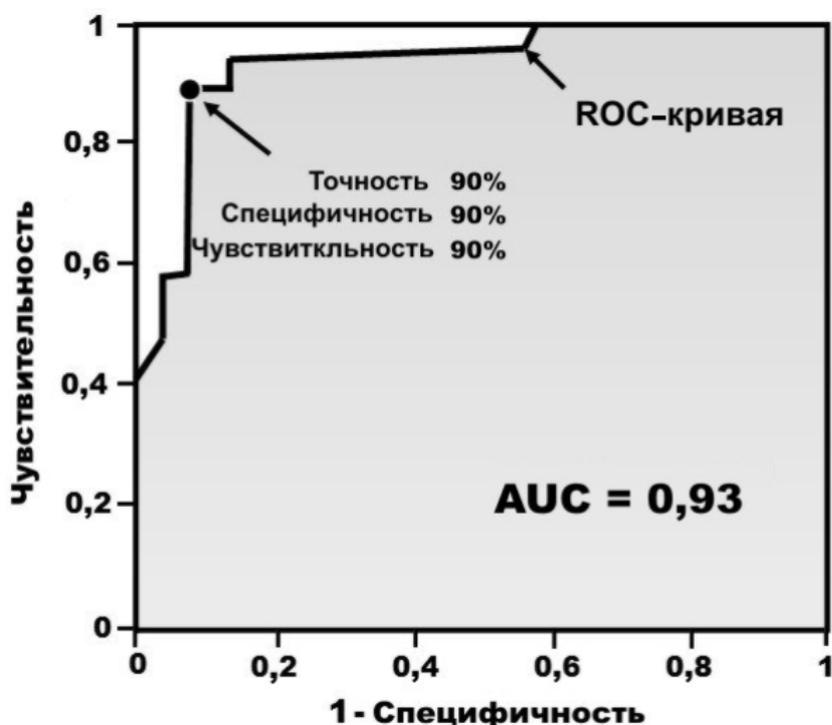
AUC > 0,7):

m/z 133,097, 135,039, 149,057, 165,089, 175,145, 177,124, 178,993, 181,084, 200,973, 204,952, 211,004, 223,094, 228,924, 239,014, 248,242, 250,045, 256,155, 256,261, 263,085, 272,943, 278,244, 280,264, 282,279, 284,295, 296,221, 297,228, 302,245, 310,874, 312,327, 324,253, 366,833, 367,119, 376,810, 434,819, 494,773,

и 16 ионов уменьшалась (при AUC > 0,76):

m/z 114,896, 116,896, 122,925, 124,923, 139,914, 152,046, 172,854, 238,839, 248,868, 249,872, 250,865, 256,981, 260,896, 298,795, 304,740, 306,827.

Величина AUC диагностики НТГ на основе данного диагностического показателя составила 0,93. Величина диагностического показателя 22 была определена, как пороговая для разделения НТГ и нормы с максимальной точностью 90%, которой соответствовали чувствительность и специфичность равные 90% (Рис. 32).

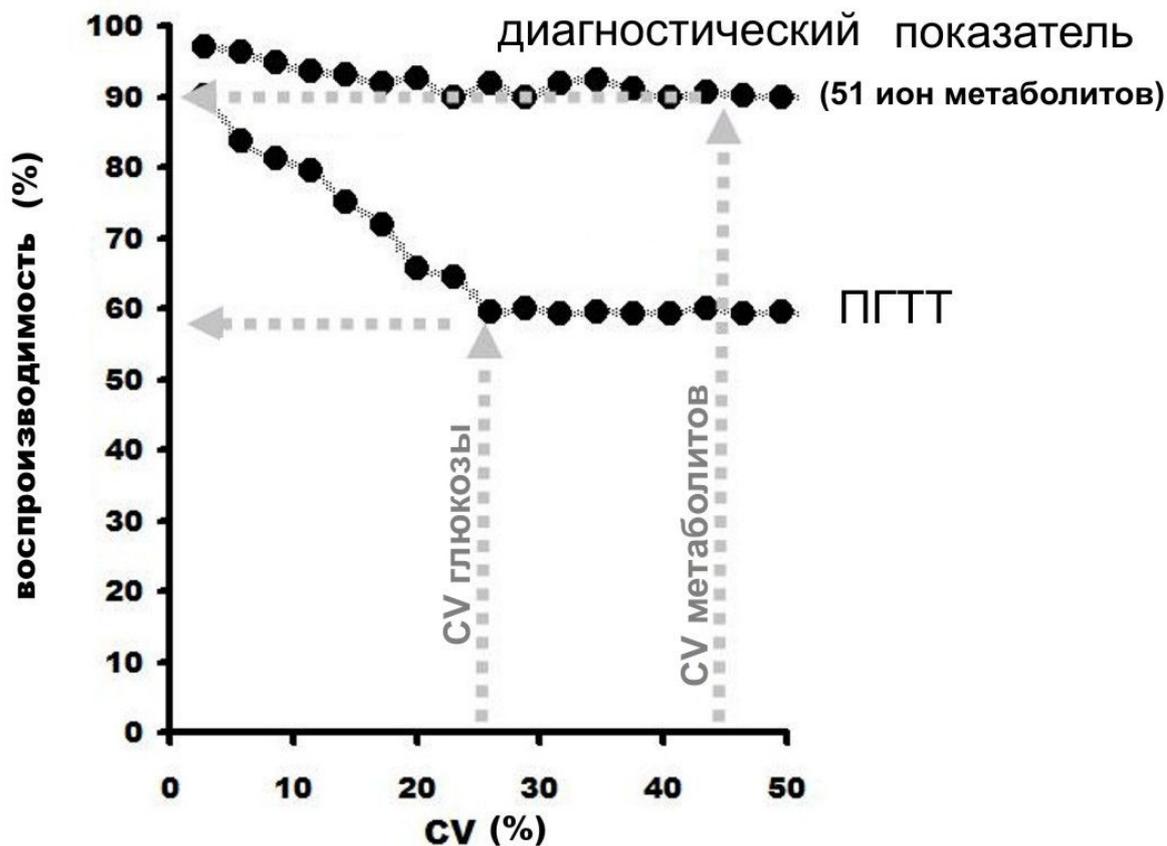


**Рисунок 32.** ROC-кривая для модели диагностики НТГ на основе прямого масс-спектрометрического анализа метаболома плазмы крови. Точка, указанная на ROC-кривой, соответствует максимальной точности диагностики.

Площадь под ROC-кривой (т.е. AUC) выделена затемнением (Lokhov et al., 2014b).

Измеренная в эксперименте на 20-ти образцах плазмы крови от 20-ти пациентов воспроизводимость значений диагностического показателя составила 85%. В тесте *leave-one-out* диагностический показатель продемонстрировал точность, чувствительность и специфичность равные 88%, 90% и 87%, соответственно.

Компьютерной симуляцией была показана зависимость воспроизводимости метаболомной диагностики НТГ от CV концентраций метаболитов крови. В качестве сравнения была показана зависимость воспроизводимости ПГТТ от CV уровня глюкозы в крови. Рисунок 33 наглядно демонстрирует, что диагностический показатель метаболомной диагностики слабо варьирует при изменении во время симуляции CV метаболитов, что приводит к высокой воспроизводимости метаболомной диагностики НТГ. Согласно полученным кривым компьютерной симуляции, фактический CV (~25%) уровня глюкозы ведет к 58% воспроизводимости ПГТТ, а фактическое значение CV метаболитов (~45%) ведет к 90% воспроизводимости диагностики на основе метаболомного диагностического показателя, что близко к воспроизводимости, измеренной в эксперименте на 20-ти пациентах и равной 85%.



**Рисунок 33.** Результат компьютерной симуляции зависимости воспроизводимости диагностики НТГ от уровня CV концентраций метаболитов и глюкозы в крови в метаболомной диагностике и ПГТТ, соответственно. Интенсивности пиков метаболитов и уровень глюкозы изменяли, чтобы симулировать различные значения CV. Воспроизводимость результатов диагностики НТГ на основе метаболитов и в ПГТТ была измерена для каждого значения CV. Показано, что диагностический показатель слабо варьирует при изменении значения CV метаболитов, что приводит к высокой воспроизводимости метаболомной диагностики НТГ. Серые пунктирные линии указывают на фактические значения CV уровня глюкозы в крови (~25%) в ПГТТ, что ведет к воспроизводимости ПГТТ равной 58%. Среднее фактическое CV уровня метаболитов в крови равное ~45% ведет к воспроизводимости равной 90% для метаболомной диагностики НТГ.

#### 4.10 Идентификация метаболитов, вносящих вклад в диагностику НТГ

Среди метаболитов, связанных с НТГ, с  $AUC > 0,7$  были идентифицированы бутандиол, амиды жирных кислот, жирные кислоты, фосфогликолевая кислота, п-крезол сульфат, орнитин и фосфотидилхолин определенного молекулярного вида (Табл. 14). Среди метаболитов с высокими значениями  $AUC$ , чьи концентрации снижаются при НТГ, были идентифицированы в основном квазимолекулярные ионы, содержащие калий  $[M+K]^+$ .

**Таблица 14.** Метаболиты плазмы крови, уровень которых увеличивается при НТГ с величиной AUC более 0,7 (Лохов и соавт., 2014b; Lokhov et al., 2014b).

Метаболит (идентификационный номер в базе*)	Молекулярный вес		Детектируемый ион	Элементный состав	Тест Вилкоксона (p)	AUC
	Измеренный (m/z)	Соответствующий элементному составу (Da)				
2,3-Бутандиол (HMDB03156)	135,0390	135,0392	$[M+2Na-H]^+$	$C_4H_{10}O_2$	0,0027	0,76
Линолеамид (Metlin ID 43435)	280,2631 / 302,2432	280,2635 / 302,2454	$[M+H]^+ / [M+Na]^+$	$C_{18}H_{33}NO$	0,0012	0,77
Олеамид (HMDB02117)	282,2778	282,2791	$[M+H]^+$	$C_{18}H_{35}NO$	0,0178	0,71
Стеарамид (HMDB34146)	284,2916	284,2948	$[M+H]^+$	$C_{18}H_{37}NO$	0,0052	0,74
Децендикислота (HMDB00603)	223,0943	223,0941	$[M+Na]^+$	$C_{10}H_{16}O_4$	0,0288	0,72
$\alpha$ - или $\beta$ -кетоктановая кислота (HMDB13211 или HMDB10721)	181,0827	181,0835	$[M+Na]^+$	$C_8H_{14}O_3$	0,0335	0,71
Октановая кислота (HMDB00392)	165,0859	165,0886	$[M+Na]^+$	$C_8H_{14}O_2$	0,0183	0,73
Яблочная кислота (HMDB00156)	178,9882	178,9927	$[M+2Na-H]^+$	$C_4H_6O_5$	0,0204	0,72
Глюкуроновая кислота (HMDB00127)	239,0164	239,0138	$[M+2Na-H]^+$	$C_6H_{10}O_7$	0,0303	0,71
Фосфогликолевая кислота (HMDB00816)	200,9532 / 156,9831	200,9535 / 156,9897	$[M+2Na-H]^+ / [M+H]^+$	$C_2H_5O_6P$	0,016	0,74
П-крезол сульфат (HMDB11635)	211,0033	211,0035	$[M+Na]^+$	$C_7H_8O_4S$	0,0050	0,76
Орнитин (HMDB00214)	133,0962	133,0972	$[M+H]^+$	$C_5H_{12}N_2O_2$	0,0227	0,72
Фосфатидилхолин <sup>(18:1/14:0)**</sup> (HMDB08097)	366,7848	366,7805	$[M+2H]^{2+}$	$C_{40}H_{78}NO_8P$	0,058	0,71

\* – ”HMDB” буквенная часть идентификационного номера записи данных метаболита из базы ”Human Metabolome Database” (<http://www.hmdb.ca>) (Wishart et al., 2007); ”Metlin ID” буквенная часть идентификационного номера записи данных метаболита из базы Metlin (Scripps Center for Mass Spectrometry, США; <http://metlin.scripps.edu>) (Smith et al., 2005). \*\* – молекулярный вид фосфолипида вырожден, т.е. возможны различные варианты остатков жирных кислот, не меняющие молекулярную массу фосфолипида.

#### 4.11 Диагностические сигнатуры плазмы крови

Сигнатуры составлены из  $m/z$  значений масс-спектрометрических пиков, интенсивность которых с определенным значением AUC связана с диагностируемым заболеванием (см. "Масс-спектрометрические сигнатуры заболеваний и расчет диагностических показателей на их основе" в разделе "Методы"). В верхнем индексе для соответствующих  $m/z$  значений указаны пороговые значения интенсивностей пиков, выше которых пики указывают на наличие заболевания, ниже – на его отсутствие. При этом, пороговые значения выражены через квантиль распределения интенсивностей этих пиков, рассчитанный для масс-спектров контрольной выборки. Диагностический показатель на основе сигнатуры рассчитывали путем подсчета (суммирования) количества масс-спектрометрических пиков, превышающих пороговое значение. Оптимальное пороговое значение для диагностического показателя соответствует максимальной точности диагностики заболевания.

Ниже представлены масс-спектрометрические сигнатуры для диагностики рака простаты, рака легкого и НТГ:

*Масс-спектрометрическая сигнатура для теста на рак простаты:*

$m/z$ <sup>квантиль</sup>: 300,22<sup>0,96</sup>; 302,24<sup>0,96</sup>; 303,24<sup>1,00</sup>; 304,26<sup>0,95</sup>; 305,26<sup>0,95</sup>; 306,26<sup>1,00</sup>;  
318,23<sup>0,93</sup>; 320,25<sup>1,00</sup>; 321,24<sup>0,88</sup>; 322,25<sup>0,93</sup>; 330,26<sup>0,88</sup>; 334,23<sup>0,96</sup>; 336,24<sup>0,88</sup>;  
357,23<sup>0,93</sup>

Точность диагностики рака простаты (аденокарциномы) 2-ой стадии по данной сигнатуре составляет 96% (специфичность 100%, чувствительность 97%, AUC 1,00). Результат теста считается положительным при значениях диагностического показателя  $>7$ .

*Масс-спектрометрическая сигнатура для теста на рак легкого:*

$m/z^{\text{квантиль}}$ : 151,075<sup>0,87</sup>; 153,024<sup>0,92</sup>; 210,935<sup>0,70</sup>; 268,891<sup>0,64</sup>; 270,888<sup>0,87</sup>; 278,088<sup>0,76</sup>;  
391,086<sup>0,80</sup>; 477,087<sup>0,81</sup>; 478,091<sup>0,86</sup>; 479,085<sup>0,74</sup>; 480,089<sup>0,63</sup>; 481,091<sup>0,73</sup>

Точность диагностики рака легкого I-IV стадий по данной сигнатуре составляет 88% (специфичность 99%, чувствительность 77%, AUC 0,93). Результат теста считается положительным при значениях диагностического показателя >7.

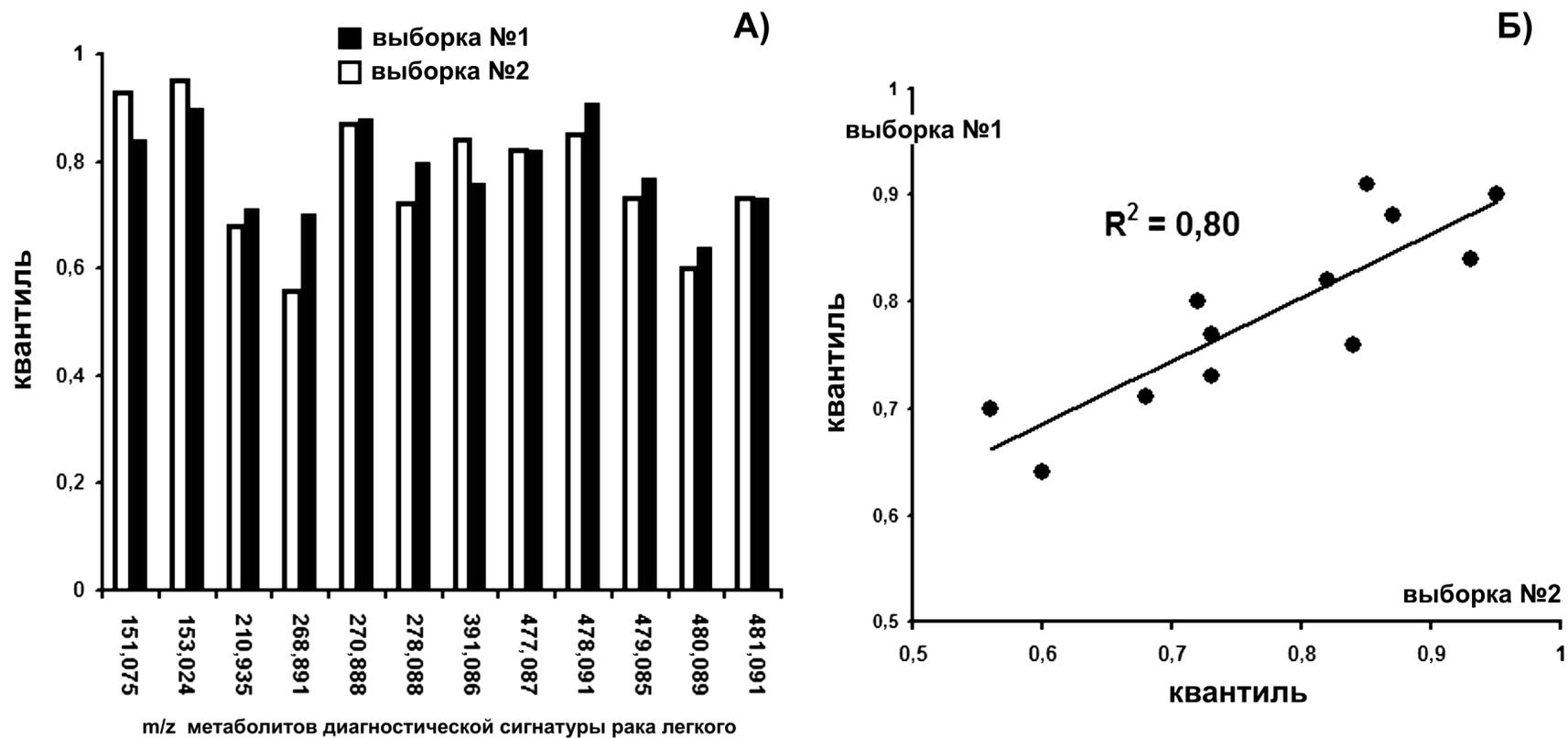
По данной сигнатуре можно также оценить риск возникновения рака легкого. Для значений диагностического показателя до 7, OR в среднем одинаковое и колеблется около 30. При значениях диагностического показателя 8 и 9, OR равно 217 и 313, соответственно. При значениях диагностического показателя 10 и более, OR согласно формуле расчета стремится к бесконечности.

*Масс-спектрометрическая сигнатура для теста на НТГ:*

$m/z^{\text{квантиль}}$ : 133,097<sup>0,57</sup>; 135,039<sup>0,68</sup>; 149,057<sup>0,72</sup>; 165,089<sup>0,71</sup>; 175,145<sup>0,71</sup>; 177,124<sup>0,89</sup>;  
178,993<sup>0,85</sup>; 181,084<sup>0,85</sup>; 200,973<sup>0,75</sup>; 204,952<sup>0,77</sup>; 211,004<sup>0,64</sup>; 223,094<sup>0,80</sup>; 228,924<sup>0,72</sup>;  
239,014<sup>0,81</sup>; 248,242<sup>0,78</sup>; 250,045<sup>0,71</sup>; 256,155<sup>0,79</sup>; 256,261<sup>0,81</sup>; 263,085<sup>0,88</sup>; 272,943<sup>0,70</sup>;  
278,244<sup>0,79</sup>; 280,264<sup>0,92</sup>; 282,279<sup>0,78</sup>; 284,295<sup>0,89</sup>; 296,221<sup>0,78</sup>; 297,228<sup>0,63</sup>; 302,245<sup>0,82</sup>;  
310,874<sup>0,80</sup>; 312,327<sup>0,66</sup>; 324,253<sup>0,61</sup>; 366,833<sup>0,77</sup>; 367,119<sup>0,90</sup>; 376,810<sup>0,75</sup>; 434,819<sup>0,82</sup>;  
494,773<sup>0,92</sup>; **114,896<sup>0,23</sup>; 116,896<sup>0,16</sup>; 122,925<sup>0,23</sup>; 124,923<sup>0,23</sup>; 139,914<sup>0,16</sup>; 152,046<sup>0,43</sup>;**  
**172,854<sup>0,19</sup>; 238,839<sup>0,29</sup>; 248,868<sup>0,16</sup>; 249,872<sup>0,09</sup>; 250,865<sup>0,33</sup>; 256,981<sup>0,19</sup>;**  
**260,896<sup>0,19</sup>; 298,795<sup>0,23</sup>; 304,740<sup>0,19</sup>; 306,827<sup>0,16</sup>**

Точность диагностики НТГ по данной сигнатуре составляет 90% (специфичность 90%, чувствительность 90%, AUC 0,93). Результат теста считается положительным при значениях диагностического показателя >22. Сигнатура работает при нормальных значениях глюкозы в крови (не более 6,1 ммоль/л) (Lokhov et al., 2014b).

Воспроизводимость пороговых значений, выраженных в квантилях, была продемонстрирована на примере диагностической сигнатуры рака легкого. Для этого, пороговые значения для метаболитов, включенных в сигнатуру, были переведены в квантили с использованием двух, не пересекающихся контрольных выборок, каждая из которых содержала по 50 масс-спектров. Полученные таким образом пороговые значения в квантилях сравнили (Рис. 34), и коэффициент детерминации  $R^2$  аппроксимации их линейной регрессии составил 0,80, что подтвердило воспроизводимость пороговых значений выраженных в квантилях у независимых выборок.



**Рисунок 34.** Воспроизводимость пороговых значений масс-спектрометрической сигнатуры рака легкого, выраженных в квантилях и рассчитанных на масс-спектрах плазмы крови двух независимых контрольных выборок. **А** – Визуальное сравнение. **Б** – Линейная экстраполяция.  $R^2$  – коэффициент детерминации линейной аппроксимации.

## **5. ОБСУЖДЕНИЕ**

### **5.1 Масс-спектрометрический анализ метаболитов плазмы крови**

С целью создания метода для ранней диагностики и/или оценки риска возникновения таких заболеваний как рак простаты, рак легкого и СД 2-го типа, на основе анализа метаболома плазмы крови, на первом этапе диссертационной работы был выбран наиболее оптимальный вариант масс-спектрометрической детекции метаболитов плазмы крови. Для этого, после обзора литературных данных, посвященных тематике диссертации, в том числе и методам метаболомного анализа, было проведено сравнение разных протоколов пробоподготовки и вариантов масс-спектрометрии. Установлено, что в рамках данного исследования наиболее подходящим методом является депротеинизация плазмы метанолом и прямой масс-спектрометрический анализ депротеинезированной плазмы на гибридном квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре. Были установлены оптимальные параметры для масс-спектрометрического измерения (время записи сигнала, выбранный диапазон и т.д.). Для детекции масс-спектрометрических пиков был выбран алгоритм Sum Peak. Данный алгоритм совместим с нелинейностью масс-спектрометрических данных, полученных на времяпролетных масс-спектрометрах, совместим с наличием в спектрах изотопного распределения, позволяет детектировать низкоинтенсивные пики, состоящие из малого количества точек, а также скорость расчета по данному алгоритму позволяет быстро рассчитать значительное количество масс-спектров, имеющих в данной работе. Для формирования выборки масс-спектрометрических данных, параметры алгоритма Sum Peak были подобраны так, чтобы детектировать не менее 95% целевых масс-спектрометрических пиков, относящихся к ионам метаболитов, и включать в список масс ионов не более 5% нерелевантных (шумовых) пиков.

### **5.2 Выравнивание масс-спектрометрических пиков**

В общем случае, в научных исследованиях типа "случай-контроль" происходит сравнение экспериментальных данных с данными контроля. При использовании масс-спектрометрии, подобное сравнение касается интенсивностей масс-спектрометрических пиков. Таким образом, необходимым этапом обработки масс-спектрометрических данных являлось выявление масс-спектрометрических пиков, относящихся к одним и тем же метаболитам, для последующего их сравнения. При анализе малого количества масс-спектров или спектров с малым количеством пиков исследователь может проделать подобное сравнение вручную. Однако, в случае насыщенных пиками масс-спектров, подобная обработка возможна только в автоматическом режиме с применением специализированных компьютерных программ.

Обзор накопившихся научных данных по выравниванию масс-спектрометрических данных выявил, что большинство разработанных алгоритмов предназначено для обработки масс-спектров белков и пептидов, которые характеризуются более низким разрешением, более низкой точностью измерения масс и наличием малого количества пиков в широком диапазоне измеренных масс. Задачей выравнивания спектров в этих случаях является приведение значений максимумов пиков одних и тех же веществ из разных спектров к общему значению  $m/z$ .

Однако, в данном исследовании мы имели дело с масс-спектрометрическими данными иного характера. Массы пиков были установлены относительно точно, количество пиков было значительным и все они располагались в относительно узком диапазоне масс. В результате возникла необходимость выравнивания масс-спектрометрических данных новым, адаптированным алгоритмом. В связи с чем, в рамках данной работы был разработан алгоритм, общая схема которого представлена на рисунке 10. Согласно данному алгоритму, полученные списки ионов метаболитов переводили в бинарный код. Для этого диапазон детектируемых масс разбивали на фрагменты с шагом 0,01 Да, где диапазону, включающему массу иона метаболита, соответствует "1", и "0" – при отсутствии таковой массы. Таким

образом, была построена бинарная матрица масс-спектрометрических данных. Алгоритм в циклическом режиме выявлял отрицательно коррелирующие строки в данной матрице, объединял их, удалял образующиеся пробелы (строки без масс ионов) и повторял цикл, уменьшая пороговое значение коэффициента корреляции, использованного для выявления коррелирующих строк. Результат действия алгоритма представлен на рисунке 16, из которого следует, что масс-спектрометрическая матрица после обработки состояла уже из выровненных масс-спектрометрических данных, пригодных для дальнейшего статистического анализа.

### **5.3 Контроль качества образцов плазмы крови и пробоподготовки по масс-спектрометрическим данным**

Метаболомика на основе масс-спектрометрии позволяет одновременно анализировать значительное количество метаболитов крови, что делает ее мощным средством исследования и диагностики патологических состояний. Однако концентрации метаболитов в крови крайне вариабельны и зависят от состояния пациента, диеты и времени суток (Vigneau-Callahan et al., 2001). Более того, протокол пробоподготовки биопроб существенно сказывается на результатах анализа метаболитов, и это особо выражено в случае метабомики плазмы крови. Данный факт связывают с тем, что в процессе получения крови от пациента и выделения из нее плазмы, метаболиты и другие низкомолекулярные ионы клеток крови контаминируют образцы плазмы. Таким образом, контроль качества образцов плазмы крови на предмет строгого соответствия протоколу пробоподготовки является в случае метабомики анализа обязательным. Для этого анализ полученных масс-спектров плазмы крови является наиболее прямым, простым и быстрым способом оценки качества проб плазмы крови.

Исследование полученных масс-спектров показало, что наиболее критичным для метабомики анализа плазмы крови является уровень калия в

образцах. Согласно опубликованным данным, уровень калия в плазме должен быть стабилен. Калий необходим для нормального функционирования мышц, нервов и поддержания нормального сердечного ритма. Поэтому уровень калия крови находится в строго узком диапазоне 3,5-5,0 мМ, а при 7 мМ у пациента проявляются симптомы метаболического шока. Поэтому организм всегда поддерживает стабильный уровень калия в крови, и только при существенном повреждении почек уровень калия может меняться.

Однако при прямом масс-спектрометрическом анализе образцов плазмы крови было установлено, что концентрация калия может существенно варьировать, внося искажения в масс-спектры, путем образования квазионов калия с измеряемыми метаболитами плазмы крови. Возможное объяснение разного уровня калия в образцах плазмы заключается в том, что уровень калия в эритроцитах 80-120 мМ (Pietrzak and Meyerhoff, 2009), что в 20 раз больше, чем в плазме. Известно, что если пробы крови некоторое время хранятся при низкой температуре, то есть не сразу используются для получения плазмы, или в процессе получения плазмы клетки крови были повреждены, то калий выходит из клеток крови и, соответственно, его уровень в пробах плазмы повышается. С другой стороны, если плазма была аккуратно получена в течение 15 мин, то клетки крови не повреждаются, и выход калия из клеток не наблюдается (Bellevue et al., 1975; Colussi and Cipriani, 1995). Таким образом, пробы плазмы, приготовленные одинаково и в строгом соответствии с протоколом пробоподготовки, должны иметь низкий и меняющийся в узком диапазоне уровень калия. В противном случае, в образцах будет наблюдаться повышенный и разного уровня калий, что мы и видели при метаболомном исследовании рака легкого. Чтобы нивелировать данный недостаток, в масс-спектре был установлен контрольный ион  $K_2Cl^+$ , по которому оценивали уровень калия в образцах, а также использовали алгоритм коррекции метаболомного фингерпринта, нивелирующий влияние калия на модели диагностики заболеваний.

#### **5.4 Методология оценки эффективности анализа метаболома плазмы крови для диагностики и оценки риска возникновения заболеваний**

Эффективность анализа метаболома плазмы крови, полученного прямой инъекцией фракции метаболитов в источник ионизации масс-спектрометра, для диагностики и оценки риска возникновения заболеваний, была определена в соответствии с положениями доказательной медицины в первичных, поперечных биомедицинских исследованиях типа "случай-контроль" на репрезентативных выборках целевых групп в Российской Федерации. Группы "случай" формировали с учетом стандартных диагностических критериев определения случая (по анкетным данным, данным медицинского осмотра и результатам лабораторной диагностики). Полученные результаты были подтверждены тестированием диагностических моделей с применением независимых выборок и расчетом основных статистических критериев достоверности диагностических тестов, принятых в биомедицинских исследованиях (т.е. чувствительность, специфичность и точность теста). Заключение о применимости прямой масс-спектрометрии метаболома плазмы крови в медицине сделаны на основе мета-анализа, включающего результаты исследований по раку простаты, раку легкого и СД 2-го типа.

#### **5.5 Диагностика рака простаты на основе анализа метаболома плазмы крови**

Высокие показатели смертности от рака простаты обусловлены длительным бессимптомным течением болезни, что является причиной несвоевременной диагностики. Более 60% больных обращаются к врачу уже при наличии метастазов в отдаленных органах. При этом группу риска составляют мужчины старше 50-55 лет (Hankey, 1999). Таким образом, исходя из актуальности диагностики ранних стадий рака простаты и проведения диагностики у граждан определенного возраста, для формирования выборки

проб плазмы крови были использованы здоровые добровольцы 55-ти и более лет, а так же больные того же возраста с раком простаты 2-ой степени.

Проведено масс-спектрометрическое метаболомное профилирование плазмы крови больных раком простаты. Предложенный для этого протокол пробоподготовки позволил наблюдать преимущественно масс-спектрометрические пики фосфолипидов и лизофосфолипидов, которые не имеют характерных для рака простаты изменений. Низкомолекулярная область содержала пики ионов метаболитов различных химических классов, некоторые из которых статистически достоверно отличаются у больных пациентов и здоровых индивидуумов. Результаты классификации (модель диагностики) по 70 фингерпринтам использовали для построения ROC-кривой (Рис. 22), площадь под которой дает представление об эффективности и клинической применимости диагностического метода. Клинически применимыми считаются диагностические системы, имеющие значения площади под ROC-кривой не менее 0,6, хорошими считаются системы со значениями более 0,8 (Metz, 1978). Предложенную нами модель диагностической системы можно отнести к “очень хорошим”, так как она имеет значение более 0,9.

Следует отметить, что диагностирование, проведенное на основе измерения концентрации ПСА в крови пациентов, показало низкую эффективность. У 26 из 40 больных раком простаты значения концентрации ПСА соответствовали возрастным нормам, а у 5 из 30 здоровых пациентов превышало возрастную норму, что определило соответствующие низкие значения чувствительности, специфичности и точности ПСА-теста (Табл. 6). Низкое же значение AUC для ПСА-теста для той же выборки пациентов, равное 0,59, согласуется с данными из других источников (0,51 и 0,54 для тестовых наборов фирмы Roche и Bayer, соответственно (Lein et al., 2003)) и указывает на то, что применение ПСА-теста для диагностики рака простаты 2-ой степени является сомнительным. Из чего можно сделать заключение о хороших перспективах применения прямого масс-спектрометрического анализа метаболома плазмы крови, как эффективного средства диагностики рака

простаты, значительно превосходящего общепринятый и повсеместно распространенный ПСА-тест.

Для подтверждения того, что метаболиты, формирующие фингерпринт плазмы крови и задействованные в диагностике, релевантны раку простаты, была проведена их идентификация. Результаты идентификации подтвердили связь этих метаболитов с раком простаты. Таким образом, в работе показана эффективность диагностической модели, основанной на прямом масс-спектрометрическом анализе метаболома плазмы крови, и ее релевантность процессам, проходящим в организме при развитии рака простаты.

### **5.6 Диагностика рака легкого на основе анализа метаболома плазмы крови**

С целью определения диагностического потенциала прямого масс-спектрометрического анализа метаболома плазмы крови для рака легкого, в исследовании использовали образцы крови, собранные от пациентов с основными типами рака легких и на всех стадиях его развития, а также от условно здоровых пациентов (Табл. 9). Математическое преобразование масс-спектров в бинарный код позволило получить фингерпринты, представляющие собой мультивариационные характеристики плазмы крови, где переменными являются бинарные значения, указывающие на наличие или отсутствие определенной массы в масс-спектре. Применяя МГК, была существенно снижена размерность использованных масс-спектрометрических данных, путем замены самих фингерпринтов на их проекции в пространстве главных компонент. Причем, выбранные для этого первые семь главных компонент охватывали ~80% всей вариации, представленной в исходных фингерпринтах.

К проекциям фингерпринтов в пространстве семи главных компонент успешно был применен классификатор с учителем (SVM). Формально разделение проб плазмы на классы является моделью диагностики, направленной на выявление рака легкого, эффективность которой может быть установлена тестированием и определением таких параметров как

специфичность, чувствительность и точность. Эффективность модели диагностики проверяли тестированием *repeated random sub-sampling validation*, по результатам которого были вычислены чувствительность, специфичность и точность диагностики (Табл. 10).

Таким образом, были получены данные, указывающие на высокую точность диагностики рака легкого на основе масс-спектрометрического анализа метаболома плазмы крови. Используемая при этом статистическая модель, основанная на редукции многомерных данных, представленных в масс-спектрометрических фингерпринтах, до семи переменных с последующей их классификацией, показала возможность диагностики рака легкого на любой стадии развития, включая бессимптомно протекающие ранние стадии.

Для подтверждения релевантности раку легкого задействованных в диагностике метаболитов, была проведена идентификация метаболитов, формирующих фингерпринт плазмы крови и вносящих основной вклад в его диагностические свойства. Выбор подобных метаболитов для идентификации был проведен по следующему критерию: область под ROC-кривой (AUC), которая отражает диагностическую силу исследуемого параметра, должна была быть больше 0,8. Метаболиты, входящие в фингерпринт и удовлетворяющие данному критерию по изменению интенсивности масс-спектрометрического пика, были идентифицированы.

Два пестицида: халфенпрокс и перметрин, изменение уровня которых в крови ассоциировано с развитием рака легкого, показали AUC больше 0,8. Токсические и канцерогенные свойства этих веществ давно установлены, поэтому их применение в Евросоюзе в значительной степени ограничено. Однако в России данные вещества все еще широко распространены в сельском хозяйстве. Перметрин распространенный инсектицид, который классифицирован IARC как слабый канцероген группы 3 (IARC, 1991). В США на основе результатов модельных экспериментов перметрин был классифицирован EPA как канцероген, способный вызвать рак легкого ("Permethrin Facts", US EPA, June 2006). Однако достоверных данных,

свидетельствующих о том, что перметрин вызывает рак у людей, до сих пор нет. Более того, недавние исследования не выявили у перметрина подобных свойств (Rusiecki et al., 2009).

Скорее всего, повышенный уровень пестицидов в плазме крови напрямую не связан с раком легкого и может быть объяснен через этиологию рака легкого только опосредованно. Например, основной причиной возникновения рака легкого считается курение табака в течение длительного периода времени. При этом установлено, что конденсат табака курительных сигарет ингибирует цитохром P450 1A2 (Shimada and Guengerich, 1991) и P450 2E1 (Van Vleet et al., 2001), катаболизирующий ксенобиотики (Kroon, 2007), среди которых есть и пестициды (Abass et al., 2007; Lang et al., 1997; Mutch et al., 2003; Mutch and Williams, 2006; Schulz-Jander and Casida, 2002; Tang et al., 2002). Ввиду того, что обработка пестицидами культивируемых пищевых растений широко распространена, большинство людей постоянно потребляют их с пищей. Таким образом, не удивительно обнаруженное в исследовании увеличение в крови двух инсектицидов при раке легкого, т.к. ингибирование их катаболизма курением, т.е. одной из общепризнанных причин рака легкого, полностью это объясняет.

R-бензол – другой идентифицированный метаболит в фингерпринте плазмы крови, который вносит существенный вклад в диагностику и расчет риска возникновения заболевания. Бензолные кольца часто встречаются в ксенобиотиках и множестве пестицидов, включая халфенпрокс и перметрин. Более того, метилфенилуксусная кислота, которая подходит под формулу R-бензола, также является метаболитом широко распространенных гербицидов (Nomeir and Abou-Donia, 1983). Таким образом, обнаруженный в плазме крови R-бензол может являться продуктом деградации гербицидов, попавших в организм. Другим возможным объяснением обнаруженному в крови R-бензолу является то, что этилбензойная кислота (как и ацетанизол), которая тоже является R-бензолом, входит в состав табачного дыма (Thelestam et al., 1980). В данном случае R-бензол может также отражать воздействие табачного дыма на

организм. Следует отметить, что высокий уровень производных бензола был зафиксирован в дыхании больных раком легкого (Peng et al., 2009), что полностью соотносится с результатами, полученными по R-бензолу в данной части диссертационного исследования.

Другой метаболит, идентифицированный в фингерпринте плазмы крови и обладающий диагностической и прогностической силой, является сульфеном биотина. Сульфен биотина – это окисленная форма хорошо известного витамина Н (биотина). Известно, что при длительном курении происходит усиление катаболизма данного витамина, которое сопровождается увеличением концентрации окисленных форм биотина в биологических жидкостях организма (Sealey et al., 2004). Также отмечено, что усиленное окисление биотина при курении ведет к его недостатку в организме (Sealey et al., 2004). Высокий уровень сульфена биотина у больных раком также согласуется с недавними метаболомными исследованиями, которые показали, что рак легкого сопровождается увеличением в крови и моче гидроксиизовалериата (Carrola et al., 2011; Hori et al., 2011). Увеличение гидроксиизовалериата в организме, в свою очередь, вызывается именно дефицитом биотина (Mock et al., 2002).

Креатинин, другой метаболит идентифицированный в фингерпринте плазмы крови, является относительно высокомолярным метаболитом плазмы крови (Tavazzi et al., 2005), уровень которого широко варьирует при различных патологических состояниях, включая рак (Yu et al., 2011). Данный факт полностью согласуется с данными диссертационного исследования, в котором показано снижение уровня креатинина в крови при раке легкого. Более того, известно, что интенсивность и длительность воздействия табачного дыма на организм обратно пропорционально связаны с уровнем креатинина в крови (Halimi et al., 2000; Knight et al., 2004). Таким образом, курение табака, являющегося причиной рака легкого, кажется наиболее приемлемым объяснением наблюдаемому изменению уровня креатинина в крови больных пациентов.

Статистический анализ показал, что диагностическая сила метаболитов не имеет положительной корреляции со степенью развития рака и наиболее выражена для ранних стадий (Табл. 10). Более того, можно предположить, что высокая чувствительность диагностики первой стадии (100%, см. Табл. 10), скорее всего не связана с детекцией метаболитов в плазме крови, непосредственно выделяемых опухолью, так как малые размеры опухоли и отсутствие тканевой и клеточной специфичности большинства метаболитов делает это невозможным. Как было упомянуто выше, факторы, предопределяющие развитие опухоли, например курение, отраженные в метаболоме крови, могли привести к наблюдаемой высокой точности ранней диагностики. Проведенная идентификация метаболитов плазмы крови, вносящих вклад в диагностику рака легкого, только подтвердила возможную связь этих метаболитов с причиной развития рака, нежели с самим раком. Снижение диагностического потенциала этих метаболитов, наблюдаемое по мере развития рака, может являться результатом метаболических нарушений нарастающих при развитии рака в результате дисфункции легких и кахексии. Если так, то метаболиты плазмы крови могут быть оправдано использованы для расчета риска возникновения рака. Чтобы оценить потенциал метаболитов в оценке риска возникновения рака легкого, для них был рассчитан показатель OR (Рис. 30; Табл. 12), который принимал значительные величины. Таким образом, метаболиты плазмы крови отражают воздействие на организм факторов, вызывающих рак легкого, и прямой масс-спектрометрический анализ низкомолекулярной фракции крови позволил выявить эти метаболиты и оценить на их основе риск возникновения рака легкого.

Следует отметить, что возможность использования одних и тех же веществ (метаболитов) и одного и того же метода анализа (прямого масс-спектрометрического анализа плазмы крови), как для диагностики, так и для оценки риска возникновения рака легкого, является не совсем обычной ситуацией для лабораторной диагностики. Данная ситуация является следствием выраженной роли внешнего воздействия на организм в

возникновении рака легкого и способности метаболома плазмы крови отражать это воздействие высокими значениями OR (до 300). На сегодняшний день максимально измеренное значение OR для рака легкого достигало лишь 55 и оценивалось по уровню котинина в крови (Boffetta, 2006). При значительно больших значениях OR, т.е. когда шанс возникновения заболевания у пациента крайне высок, можно уже говорить о диагностике заболевания с высокими значениями AUC. Практический смысл такой интеграции диагностики и оценки риска возникновения заболевания заключается в том, что если при положительных результатах диагностики наличие заболевания не будет подтверждено, то можно говорить о высоком риске заболевания у пациента. И наоборот, если рассчитанное OR крайне высоко, то необходимо обязательно проверить пациента на наличие рака легкого, т.к. вероятность того, что пациент уже болен, крайне высока.

### **5.7 Диагностика нарушенной толерантности к глюкозе на основе анализа метаболома плазмы крови**

НТГ является предиабетическим состоянием, связанным с резистентностью к инсулину и повышенным риском возникновения сердечно-сосудистых заболеваний. НТГ наблюдается как при СД, так и предшествует СД 2-го типа за много лет до его развития (Tabák et al., 2012). Чтобы предотвратить или задержать развитие диабета, людям с НТГ рекомендованы физическая активность и лечебная диета (Tuomilehto et al., 2001; Raina Elley and Kenealy, 2008). Сегодня пероральный глюкозотолерантный тест (ПГТТ) является золотым стандартом диагностики НТГ. Однако этот тест характеризуется низкой воспроизводимостью, хоть и считается пригодным для диагностики НТГ, диабета и выявления риска сердечно-сосудистых заболеваний (McDonald et al., 1965; Balion et al., 2007; Ko et al., 1998). Более того, проведение ПГТТ занимает 2 часа, и у некоторых людей может вызвать гипергликемический шок

(Sagel and Colwell, 1973). Таким образом, создание более быстрого и воспроизводимого теста на НТГ является актуальным.

В диссертационной работе были оценены возможности метаболомики плазмы крови в плане диагностики НТГ. При этом математический аппарат обработки масс-спектрометрических данных был изменен. Вместо классификации бинарных масс-спектрометрических фингерпринтов был введен диагностический показатель. Подобное изменение являлось следствием адаптации результата метаболомного анализа плазмы крови к его последующему практическому применению.

Масс-спектрометрическим анализом метаболома плазмы крови детектировали ионы метаболитов, связанные с наличием у пациентов НТГ. Метаболиты, концентрация которых в крови увеличивалась при НТГ с AUC более 0,7 или уменьшалась с AUC более 0,76, были использованы в модели диагностики НТГ для расчета многопараметрического диагностического показателя.

AUC для диагностики НТГ на основе совокупности метаболитов плазмы крови составила 0,93, что указывает на пригодность прямого масс-спектрометрического анализа метаболома плазмы крови для диагностики НТГ (Рис. 31). Точность, чувствительность и специфичность были равны 90%. Точность диагностики не достигла максимально возможного значения, так как контрольная и экспериментальная группы формировались на основе ПГТТ, который, в свою очередь, также имеет погрешность.

Следует напомнить, что основным недостатком применяемого в клинике ПГТТ для выявления НТГ, является его низкая воспроизводимость (Mcdonald et al., 1965; Ko et al., 1998). Уровень глюкозы в крови колеблется в широких пределах и имеет коэффициент вариации (CV – coefficient of variation; процентное соотношение стандартного отклонения величины к ее среднему значению) в 2-х часовом ПГТТ примерно 25% (Mcdonald et al., 1965), что и приводит к очень низкой воспроизводимости результатов. Такой высокий CV

неприемлем для биоаналитических тестов, где только значения до 15% рассматриваются как допустимые ("U.S. FDA", 2001).

Уровень метаболитов в крови также имеет высокий CV (медиана CV 46%) (Crews et al., 2009). Как следствие, метаболические тесты, основанные на масс-спектрометрии, характеризуются низкой воспроизводимостью, что мешает их внедрению в клиническую практику (Strathmann and Hoofnagle, 2011). Применение диагностики, основанной на использовании совокупности связанных с НТГ метаболитов, устраняет этот недостаток. Расчет многопараметрического диагностического показателя привел к усреднению ошибки, заложенной в измерении отдельных метаболитов. При расчете диагностического показателя, ошибки измерения, приведшие к завышенным показателям концентраций метаболитов, компенсируются идентичными ошибками, выраженными в занижении концентрации метаболитов. В идеале, если уровни метаболитов в крови не зависят друг от друга, и количество используемых в диагностике метаболитов достаточно велико, то CV диагностического показателя должно стремиться к нулю. В результате CV диагностического показателя на НТГ существенно ниже показателей CV отдельных метаболитов. Для демонстрации данных свойств метаболомной диагностики были проведены эксперименты с компьютерной симуляцией, в которых CV метаболитов был постепенно изменен и показана зависимость воспроизводимости результатов диагностики НТГ от различных значений CV (Рис. 33). В качестве сравнения была также показана зависимость воспроизводимости ПГТТ от CV уровня глюкозы в крови. Как и предполагалось, диагностический показатель слабо варьировал при изменении значения CV метаболитов, что привело к высокой воспроизводимости метаболомной диагностики НТГ.

Для подтверждения релевантности используемых для диагностики НТГ ионов метаболитов развитию СД 2-го типа, была проведена идентификация ионов метаболитов, задействованных в расчете многопараметрического

диагностического показателя. Результаты идентификации метаболитов, уровень которых в крови увеличивался при НТГ с  $AUC > 0,7$ , представлен в Таблице 14.

Следует отметить, что метаболическая картина плазмы крови при развитии диабета хорошо описана в предыдущих исследованиях. Поэтому, чтобы подтвердить что метаболиты, используемые для диагностики НТГ, релевантны развитию СД, была проведена их идентификация. Было установлено, что амиды жирных кислот, также известные как эндоканабиониды, к которым относятся выявленные в исследовании линолеамид, олеамид и стеарамид, играют важную роль при развитии СД 2-го типа (Табл. 14). Активация эндоканабионидной системы приводит к увеличению потребления пищи (Engeli et al., 2005) и ухудшению кардиоваскулярного профиля (увеличение веса, индекса массы тела, объема талии, увеличение в крови уровня инсулина и адипонектина) (Sipe et al., 2005). Повышенный уровень жирных кислот, который зарегистрирован у пациентов с НТГ, также подтверждается ранее полученными данными. Так метаболический синдром, выявляемый у предиабетиков, характеризуется повышенным уровнем липидов (Fonseca, 2005), в том числе и жирных кислот (Suhre et al., 2010).

Увеличение фосфатидилхолина также может являться проявлением метаболического синдрома, связанного с НТГ и характеризующегося липидными нарушениями.

Децендикислота относится к дикарбоновым кислотам, увеличение экскреции которых с мочой обнаружено у диабетиков, и которые рассматривают как маркеры окислительного воздействия на жирные кислоты (Inouye et al., 2000). Увеличенный уровень в крови децендикислоты в нашем исследовании может указывать на усиление подобного окисления при НТГ.

$\alpha$ -Кетооктановая кислота – кетокислота с разветвленным углеродным радикалом, является интермедиатом в катаболизме лейцина. Недавно было установлено, что лейцин и другие аминокислоты с разветвленной углеродной цепью являются биомаркерами риска развития диабета (Wang et al., 2011). Другая кетокислота –  $\beta$ -кетооктановая кислота, образуется из малонил-

коэнзима. Высокий уровень  $\beta$ -кетоктановой кислоты был установлен у пациентов с избыточным весом и диабетом (Bandyopadhyay et al., 2006). Одна из этих двух, а возможно и обе кетоктановые кислоты вносят вклад в диагностику НТГ. Точно сказать невозможно, так как использованный в диссертационной работе метод идентификации метаболитов не позволяет различить  $\alpha$ - и  $\beta$ -кетокислоты.

п-крезол сульфат – метаболит микробов, является вторичным метаболитом п-крезола. Известно, что диабетики имеют высокую концентрацию как свободного, так и общего п-крезола в своей крови (Meijers et al., 2008).

Орнитин – аминокислота, произведенная в цикле мочевиной кислоты. Уровень орнитина в плазме крови диабетиков повышен в результате снижения активности аргиназы (Kashyap et al., 2008).

Фосфогликолевая кислота является субстратом для триозофосфат изомеразы. В литературе нет данных о повышении ее уровня в связи с наличием НТГ у пациента.

Бутандиол продуцируют различные микроорганизмы в процессе известном как бутандиоловое брожение (Geckil et al., 2004). В этом процессе бутандиол является одним из продуктов анаэробного брожения глюкозы. Связь этого метаболита с НТГ отражает известную роль кишечной флоры в развитии СД 2-го типа (Qin et al., 2012).

Среди идентифицированных метаболитов, характеризующихся низким уровнем при НТГ, только изменение уровня ионов калия было достоверно. Известно, что уровень калия понижен при диабетическом кетоацидозе. В организме происходит интенсивное выведение положительно заряженных ионов калия через почки, вместе с отрицательно заряженными кетонами, повышение уровня которых зарегистрировано при НТГ. Таким образом, зарегистрированное снижение ионов калия также связано с развитием диабета.

Хотя уровень многих других метаболитов также снижался при НТГ, идентификация этих метаболитов не была успешна. Используемая

электроспрейная ионизация характеризуется тем, что анализируемые вещества в источнике ионизации образуют квазийоны с  $H^+$ ,  $K^+$  и  $Na^+$ . В данном исследовании в анализируемых образцах концентрации  $H^+$  и  $Na^+$  были постоянны. Уровень  $K^+$  напротив, менялся и, как следствие, менял уровень образующихся калийсодержащих квазийонов, также как и сам калий демонстрирующих высокие значения AUC для образцов крови пациентов с НТГ. К примеру, уровень муравьиной кислоты во всех пробах был идентичен, хотя  $[муравьиная\ кислота+K]^+$  имела AUC 0,81. Таким образом, для идентификации метаболитов, снижающихся в крови при НТГ, необходимо дополнительное исследование с использованием другого не электроспрейного источника ионизации.

Таким образом, прямой масс-спектрометрический анализ метаболома плазмы крови позволяет диагностировать НТГ на основе метаболической картины крови, отражающей развитие СД 2-го типа у пациента. Дальнейшие исследования на более крупных выборках помогут более полно охарактеризовать эффективность такой диагностики, однако уже сейчас данный тест можно рассматривать как более воспроизводимую, быструю и щадящую пациента альтернативу используемому в клинике ПГТТ.

## **5.8 Диагностические сигнатуры плазмы крови**

Проведенные метаболомные исследования подтвердили возможность использования прямого масс-спектрометрического анализа метаболома плазмы крови в диагностике и оценке риска возникновения заболеваний. Показаны его преимущества по отношению к существующей лабораторной диагностике. Однако, непосредственное применение результатов этих исследований в клинике проблематично. Связано это с тем, что "омные" технологии, включая метаболомику, не измеряют абсолютные значения концентраций веществ. Например, масс-спектрометрический анализ дает информацию о концентрации метаболита через интенсивность соответствующего ему пика в масс-спектре.

При этом уровень интенсивности пика зависит от используемого протокола пробоподготовки образца, типа масс-спектрометра, его технических характеристик, настройки линз, детектора и т.д. Таким образом, масс-спектрометрические фингерпринты, успешно используемые в исследованиях типа "случай-контроль", не применимы в лабораторной диагностике, так как носят относительный характер и в абсолютные концентрационные единицы измерения не переводятся (обычно это делают с помощью калибровочных кривых). Другая проблема заключается в том, что метаболом является многопараметрической, т.е. включающей множество параметров, характеристик, требующей его преобразования в один параметр – диагностический показатель. Используемый для этого математический аппарат, как правило, подразумевает многостадийную обработку данных, включающую снижение размерности масс-спектрометрических данных и их классификацию (собственно диагностику) с применением различного рода классификаторов. При этом разнообразные алгоритмы, используемые в метаболомных исследованиях типа "случай-контроль", также не пригодны для применения в лабораторной диагностике. Таким образом, в медицинской практике может быть использован только тот метаболомный анализ плазмы крови, который соответствует критериям лабораторной диагностики по используемой методике, ее воспроизводимости и способу обработки результатов.

Используемый в диссертационной работе метаболомный анализ, на основе прямого масс-спектрометрического анализа низкомолекулярной фракции плазмы крови, является наиболее приемлемым вариантом для лабораторной диагностики. Отсутствие промежуточных стадий разделения метаболитов, вносящих искажения в результаты анализа, позволяет получить масс-спектрометрический профиль низкомолекулярных веществ максимально приближенный к реальному метаболому крови, что обеспечивает воспроизводимость результатов метаболомного анализа в различных диагностических лабораториях.

Математический аппарат, по мнению соискателя, для лабораторной диагностики должен основываться на сигнатурах (наборах значений переменных, формирующих специфическую картину), записанных с применением квантилей, т.е. значений, которые заданная переменная величина не превышает с фиксированной вероятностью. Если интенсивность масс-спектрометрического пика метаболита обладает диагностической силой, то для интенсивности этого пика можно определить оптимальное пороговое значение, выше которого интенсивность пика будет указывать на наличие заболевания, ниже – на его отсутствие. Данное пороговое значение можно выразить через квантиль распределения интенсивности этого пика, рассчитанный с использованием масс-спектров контрольной выборки. Таким образом, сигнатура, включающая  $m/z$  масс-спектрометрических пиков, связанных с заболеванием, и их пороговые значения, выраженные в квантилях, не использует абсолютные значения интенсивности масс-спектрометрических пиков и не зависит от условий получения масс-спектров (т.е. сигнатура записана через параметры распределения входящих в нее переменных и поэтому в какой-то степени аппаратно-независима).

Перевод сигнатуры в диагноз осуществляется путем расчета диагностического показателя по принципу суммирования количества ионов метаболитов в сигнатуре, интенсивность масс-спектрометрических пиков которых превысила указанное в квантилях пороговое значение (см. описание расчета диагностического показателя для НТГ). Подобный расчет прост и не требует дополнительного математического преобразования, поэтому, оптимален для лабораторной диагностики.

Воспроизводимость пороговых значений, выраженных в квантилях, была продемонстрирована на примере диагностической сигнатуры рака легкого. Для этого, пороговые значения для метаболитов, включенных в сигнатуру, были переведены в квантили с использованием двух, не пересекающихся контрольных выборок, каждая из которых содержала по 50 масс-спектров. Полученные таким образом пороговые значения в квантилях

сравнили (Рис. 34), и коэффициент детерминации  $R^2$  аппроксимации их линейной регрессии составил 0,80, что подтвердило воспроизводимость пороговых значений выраженных в квантилях у независимых выборок.

Таким образом, независимая выборка позволяет перевести пороговые значения сигнатуры в пороговые значения интенсивностей масс-спектрометрических пиков, что дает возможность использования сигнатуры с разными масс-спектрометрами.

## 6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа посвящена решению актуальной проблемы ранней диагностики социально значимых заболеваний. Для решения данной проблемы в работе было исследовано новое направление – применение метаболомики для повышения эффективности лабораторной диагностики и оценки риска возникновения заболеваний.

На начальном этапе работы был выбран оптимальный протокол метаболомного анализа, основанный на прямой инъекции фракции метаболитов плазмы крови в источник ионизации квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра. Были определены оптимальные параметры масс-спектрометрического анализа и выявлены критические точки обработки масс-спектрометрических данных, требующие дополнительной проработки. Так был создан и описан новый способ анализа масс-спектрометрических данных, позволяющий контролировать ионный состав анализируемых образцов. Дополнительно создан и программно реализован алгоритм выравнивания масс-спектрометрических данных метаболитов плазмы крови, полученных на масс-спектрометрах с высоким разрешением.

Далее, эффективность анализа метаболома плазмы крови, полученного прямой инъекцией фракции метаболитов в источник ионизации масс-спектрометра, для диагностики и оценки риска возникновения заболеваний, была определена в соответствии с положениями доказательной медицины в первичных, поперечных биомедицинских исследованиях типа "случай-контроль" на репрезентативных выборках целевых групп в Российской Федерации. Группы "случай" формировали с учетом стандартных диагностических критериев определения случая (по анкетным данным, данным медицинского осмотра и результатам лабораторной диагностики). Полученные результаты были подтверждены тестированием диагностических моделей с применением независимых выборок и расчетом основных статистических

критериев достоверности диагностических тестов, принятых в биомедицинских исследованиях (т.е. чувствительность, специфичность и точность теста).

Для внедрения результатов диссертационной работы была предложена унифицированная и аппаратно-независимая форма записи метаболомных диагностических сигнатур плазмы крови, которая позволяет реализовать в лабораторной практике выявленный в исследованиях типа "случай-контроль" диагностический потенциал метаболома плазмы крови. Дополнительно были разработаны в соответствии с действующими на территории Российской Федерации ГОСТами протоколы метаболомного анализа плазмы крови. Данные протоколы необходимы для воспроизведения метаболомного анализа крови без существенной потери в параметрах диагностики заболеваний, продемонстрированных в диссертационной работе.

Выносимое на защиту положение о релевантности метаболитов, входящих в диагностические сигнатуры, этиологии и/или развитию исследованных в работе заболеваний, было подтверждено идентификацией этих метаболитов (т.е. "расшифровкой" сигнатур).

Заключение о применимости прямой масс-спектрометрии метаболома плазмы крови в медицине сделаны на основе мета-анализа, включающего результаты исследований сразу по нескольким заболеваниям.

### **Рекомендации и перспективы применения результатов диссертационной работы**

Результаты диссертационной работы рекомендуется использовать для внедрения метаболомной диагностики в медицинскую практику. Разработанные протоколы масс-спектрометрического анализа и обработки полученных результатов являются основой для написания стандартных операционных процедур и лабораторных регламентов для метаболомной диагностики рака простаты, рака легкого и НТГ, а также других заболеваний,

для которых будет впоследствии найдена и записана в унифицированной форме масс-спектрометрическая сигнатура.

Следует обратить особое внимание на особенности внедрения "омных" тестов в медицинскую практику (см. раздел "Проблематика внедрения "омных" тестов в медицину"), где основной проблемой является воспроизводимость результатов. Измеряемые при создании "омных" тестов параметры диагностики, часто не воспроизводятся при попытке их внедрения. Во многом это связано с многостадийностью и сложностью реализации любого "омного" теста, а также заложенной во все "омные" тесты многопараметричностью. Согласно данным комитета по рассмотрению "омных" тестов (Committee on the Review of Omics-Based Tests for Predicting Patient Outcomes in Clinical Trials), в состав которого входят эксперты "омных" технологий, проблема воспроизводимости характеристик "омного" теста должна решаться путем стандартизации всех этапов реализации теста через написанные в установленной форме протоколы. В связи с этим, в приложении к диссертационной работе представлены следующие, оформленные в соответствии с требованиями, действующими на территории Российской Федерации, документы:

- "Протокол получения образцов плазмы крови для масс-спектрометрического анализа метаболитов крови";
- "Протокол масс-спектрометрического анализа метаболитов плазмы крови";
- "Протокол обработки масс-спектров метаболитов плазмы крови";
- "Описание программного обеспечения";
- "Руководство пользователя программным обеспечением";
- "Код программы, реализующий алгоритм выравнивания масс-спектров метаболитов".

Вышеуказанные документы позволяют получить образцы крови, провести их пробоподготовку, масс-спектрометрический анализ и обработку масс-спектрометрических данных с целью анализа метаболитов плазмы крови в медицинских целях. При написании указанных документов учтены критические моменты метаболомного анализа плазмы крови, выявленные в процессе выполнения диссертационной работы. Стандартизация метаболомного анализа плазмы крови в соответствии с указанными документами позволяет ожидать, что измеренные в ходе выполнения диссертационной работы параметры диагностики (чувствительность, специфичность и точность) рака простаты, рака легкого и НТГ существенно не изменятся в процессе внедрения разработанной метаболомной диагностики в практическую медицину.

## **7. ВЫВОДЫ**

1. Метаболом плазмы крови может быть эффективно использован для диагностики и оценки риска возникновения ряда социально значимых заболеваний.
2. Масс-спектр метаболома плазмы крови, полученный прямой инъекцией фракции метаболитов в источник ионизации масс-спектрометра, является мультивариационной характеристикой, позволяющей достоверно диагностировать или оценивать риск возникновения таких социально значимых заболеваний, как рак простаты, рак легкого и сахарный диабет 2-го типа.
3. Метаболиты, вносящие вклад в диагностику или оценку риска возникновения заболеваний, отражают изменения в организме пациента, имеющие непосредственное отношение к этиологии и/или развитию этих заболеваний.
4. Масс-спектр метаболома плазмы крови, полученный прямой инъекцией раствора метаболитов в источник ионизации масс-спектрометра, содержит

масс-спектрометрическую сигнатуру рака простаты (аденокарциномы) 2-ой стадии. Чувствительность (97%), специфичность (100%) и точность (96%) диагностики на ее основе существенно превышают характеристики иммуноферментного ПСА-теста (35%, 83% и 52%, соответственно) для той же выборки пациентов.

5. Масс-спектр метаболома плазмы крови, полученный прямой инъекцией раствора метаболитов в источник ионизации масс-спектрометра, содержит масс-спектрометрическую сигнатуру рака легкого. Чувствительность, специфичность и точность диагностики на ее основе составляют 77%, 99%, 88%, соответственно. Точность диагностики с применением данной сигнатуры выше на ранних стадиях и уменьшается по мере развития заболевания. Точность диагностики с применением сигнатуры значительно выше, по сравнению с применяемыми в медицине онкомаркерами данного заболевания.
6. Масс-спектр метаболома плазмы крови, полученный прямой инъекцией раствора метаболитов в источник ионизации масс-спектрометра, содержит масс-спектрометрическую сигнатуру, указывающую на риск возникновения рака легкого. Превышение пороговых значений концентраций в крови веществами, входящими в сигнатуру, указывает на увеличение шанса возникновения рака легкого (OR) в десятки и сотни раз, что делает ее эффективным средством оценки риска возникновения заболевания.
7. Масс-спектр метаболома плазмы крови, полученный прямой инъекцией раствора метаболитов в источник ионизации масс-спектрометра, содержит масс-спектрометрическую сигнатуру НТГ. Точность диагностики равная 90% (специфичность 90%, чувствительность 90%, воспроизводимость 85%) позволяет рассматривать прямую масс-спектрометрию метаболома плазмы крови в качестве эффективной альтернативы используемому сейчас ПГТТ для диагностики НТГ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Арчаков, А.И. Биоинформатика, геномика и протеомика — науки о жизни XXI столетия / А.И. Арчаков // Вопросы медицинской химии. — 2000. — Т. 46. — № 1. — С. 4-7.
- Вапник, В.Н. Алгоритмы и программы восстановления зависимостей / ред. В.Н. Вапник — М.: Наука, Главная редакция физико-математической литературы, 1984. — 816 с.
- Злокачественные новообразования в России в 2011 году (заболеваемость и смертность) / ред. В.И. Чиссов, В.В. Старинский, Г.В. Петрова — М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2013. — 289 с.
- Каприн, А.Д. Экономическая эффективность скрининга рака предстательной железы / А.Д. Каприн, Н.Б. Найговзина, С.А. Иванов, В.А. Башмаков // Вопросы онкологии. — 2006. — Т. 52. — № 6. — С. 680-685.
- Кармазановский, Г.Г. Оценка диагностической значимости метода ("чувствительность", "специфичность", "общая точность") / Г.Г. Кармазановский // Анналы хирургической гепатологии. — 1997. — Т. 2. — С. 178-181.
- Концепции Федеральной целевой программы "Предупреждение и борьба с социально-значимыми заболеваниями (2007-2011 годы)" (утв. распоряжением Правительства РФ от 11.12.2006 № 1706-р.
- Лохов, П.Г. Масс-спектрометрические методы в метаболомике / П.Г. Лохов, А.И. Арчаков // Биомедицинская химия. — 2008. — № 54. — С. 497-511.
- Лохов, П.Г. Метаболический фингерпринтинг плазмы крови больных раком предстательной железы / П.Г. Лохов, М.И. Даштиев, Л.В. Бондарцов, А.В. Лисица, С.А. Мошковский, А.И. Арчаков // Биомедицинская химия. — 2009. — № 55. — С. 247-254.
- Лохов, П.Г. Масс-спектрометрический анализ низкомолекулярной фракции крови как способ унификации терапевтического лекарственного мониторинга / П.Г. Лохов, Д.Л. Маслов, О.П. Трифонова, Е.Е.

- Балашова, А.И. Арчаков // Биомедицинская химия. — 2014а. — Т. 60. — № 2. — С. 201-216.
- Лохов, П.Г. Диагностика нарушенной толерантности к глюкозе прямым масс-спектрометрическим анализом метаболитов плазмы крови / П.Г. Лохов, О.П. Трифонова, Д.Л. Маслов, Е.Е. Балашова, А.И. Арчаков, Е.А. Шестакова, М.В. Шестакова, И.И. Дедов // Проблемы эндокринологии. — 2014б. — № 3. — С. 4-9.
- Лохов, П.Г. Масс-спектрометрический анализ липидома плазмы крови, как способ диагностики заболеваний, оценки эффективности и оптимизации лекарственной терапии / П.Г. Лохов, Д.Л. Маслов, Е.Е. Балашова, О.П. Трифонова, Н.В. Медведева, Т.И. Торховская, О.М. Ипатова, А.И. Арчаков, П.П. Малышев, В.В. Кухарчук, Е.А. Шестакова, М.В. Шестакова, И.И. Дедов // Биомедицинская химия. — 2015. — Т. 61. — № 1. — С. 7-18.
- Пирузян, Л.А. Метаболический паспорт человека — основа новой стратегии в фармакологии / Л.А. Пирузян // Вестник Российской Академии Наук. — 2004. — Т. 74. — № 7. — С. 610-618.
- Трифонова, О.П. Метаболомное профилирование крови / О.П. Трифонова, П.Г. Лохов, А.И. Арчаков // Биомедицинская химия. — 2014. — Т. 60. — № 3. — С. 281-294.
- Якушева, М.Ю. Выявление генетической предрасположенности к возникновению сахарного диабета 1 типа / М.Ю. Якушева, Н.Ю. Трельская, П.А. Сарапульцев // Вестник Уральской медицинской академической науки. — 2008а. — № 2. — С. 178-181.
- Якушева, М.Ю. Скрининговая методика дифференциальной диагностики вариантов диабетической кардиомиопатии / М.Ю. Якушева, А.П. Сарапульцев, П.А. Сарапульцев, А.Н. Дмитриев // Успехи современного естествознания. — 2008б. — № 12 — С. 57-58.
- Abass, K. Characterization of diuron N-demethylation by mammalian hepatic microsomes and cDNA-expressed human cytochrome P450 enzymes / K.

- Abass, P. Reponen, M. Turpeinen, J. Jalonen, O. Pelkonen // Drug Metabolism and Disposition. — 2007. — Vol. 35. — P. 1634-1641.
- Adahchour, M. Comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to a rapid-scanning quadrupole mass spectrometer: principles and applications / M. Adahchour, M. Brandt, H.U. Baier, R.J. Vreuls, A.M. Batenburg, U.A. Brinkman // Journal of Chromatography A. — 2005. — Vol. 1067. — P. 245-254.
- Aharoni, A. Nontargeted metabolome analysis by use of Fourier transform ion cyclotron mass spectrometry / A. Aharoni, C.H. Ric de Vos, H.A. Verhoeven, C.A. Maliepaard, G. Kruppa, R. Bino, D.B. Goodenowe // Omics. — 2002. — Vol. 6. — P. 217-234.
- Ahmed, F.E. Sample preparation and fractionation for proteome analysis and cancer biomarker discovery by mass spectrometry / F.E. Ahmed // Journal of Separation Science. — 2009. — Vol. 32. — P. 771-798.
- Alekseenko, A.V. [The potential role for sphingolipids in neuropathogenesis of Alzheimer's disease] / A.V. Alekseenko // Biomeditsinskaja Khimiia. — 2013. — Vol. 59. — № 1. — P. 25-50.
- Allen, J. High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting / J. Allen, H.M. Davey, D. Broadhurst, J.K. Heald, J.J. Rowland, S.G. Oliver, D.B. Kell // Nature Biotechnology. — 2003. — Vol. 21. — P. 692-696.
- Allen, J. Discrimination of modes of action of antifungal substances by use of metabolic footprinting / J. Allen, H.M. Davey, D. Broadhurst, J.J. Rowland, S.G. Oliver, D.B. Kell // Applied and Environmental Microbiology. — 2004. — Vol. 70. — P. 6157-6165.
- An, J. Hepatic expression of malonyl-CoA decarboxylase reverses muscle, liver and whole-animal insulin resistance / J. An, D.M. Muoio, M. Shiota, Y. Fujimoto, G.W. Cline, G.I. Shulman, T.R. Koves, R. Stevens, D. Millington, C.B. Newgard // Nature Medicine. — 2004. — Vol. 10. — № 3. — P. 268-274.

- Anderson, N.L. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects / N.L. Anderson, N.G. Anderson // *Molecular & Cellular Proteomics*. — 2002. — Vol. 1. — P. 845-867.
- Ankerst, D.P. Sensitivity and specificity of prostate-specific antigen for prostate cancer detection with high rates of biopsy verification / D.P. Ankerst, I.M. Thompson // *Archivio italiano di urologia, andrologia: organo ufficiale [di] Società italiana di ecografia urologica e nefrologica / Associazione ricerche in urologia*. — 2006. — Vol. 78. — P. 125-129.
- Atherton, H. J. Metabolomics of the interaction between PPAR-alpha and age in the PPAR-alpha-null mouse / H.J. Atherton, M.K. Gulston, N.J. Bailey, K.K. Cheng, W. Zhang, K. Clarke, J.L. Griffin // *Molecular Systems Biology*. — 2009. — Vol. 5. — P. 259-268.
- Baggerly, K.A. Deriving chemosensitivity from cell lines: Forensic bioinformatics and reproducible research in high-throughput biology / K.A. Baggerly, K.R. Coombes // *Annals of Applied Statistics*. — 2009. — Vol. 3. — № 4. — P. 1309-1334.
- Baggerly, K.A. Forensics bioinformatics. Presented at the workshop of the IOM Committee on the review of omics-based tests for predicting patient outcomes in clinical trials. — Washington, DC. — 2011. — March 30-31.
- Baidoo, E.E. Capillary electrophoresis-fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for the identification of cationic metabolites via a pH-mediated stacking-transient isotachopheretic method / E.E. Baidoo, P.I. Benke, C. Neusüss, M. Pelzing, G. Kruppa, J.A. Leary, J.D. Keasling // *Analytical Chemistry*. — 2008. — Vol. 80. — № 9. — P. 3112-3122.
- Balion, C.M. Reproducibility of Impaired Glucose Tolerance (IGT) and Impaired Fasting Glucose (IFG) classification: a systematic review / C.M. Balion, P.S. Raina, H.C. Gerstein, P.L. Santaguida, K.M. Morrison, L. Booker, D.L. Hunt // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine CCLM FESCC*. — 2007. — Vol. 45. — P. 1180–1185.

- Bandyopadhyay, G.K. Increased malonyl-CoA levels in muscle from obese and type 2 diabetic subjects lead to decreased fatty acid oxidation and increased lipogenesis; thiazolidinedione treatment reverses these defects / G.K. Bandyopadhyay, J.G. Yu, J. Ofrecio, J.M. Olefsky // *Diabetes*. — 2006. — Vol. 55. — P. 2277-2285.
- Baran, R. MathDAMP: a package for differential analysis of metabolite profiles / R. Baran, H. Kochi, N. Saito, M. Suematsu, T. Soga, T. Nishioka, M. Robert, M. Tomita // *BMC Bioinformatics*. — 2006. — Vol. 7. — P. 530-538.
- Baron, A.E. Letter to Harold Varmus: Concerns about prediction models used in Duke clinical trials / A.E. Barón, K. Bandeen-Roche, D.A. Berry, J. Bryan, V.J. Carey, K. Chaloner, M. Delorenzi, B. Efron, D. Ghosh, J.D. Goldberg, S.N. Goodman, F.E Harrell Jr., S.G. Hilsenbeck, W. Huber, R.A. Irizarry, C. Kendzioriski, M.R. Kosorok, T.A. Louis, J.S. Marron, M. Newton, G. Parmigiani, M. Ochs, J. Quackenbush, G.L. Rosner, I. Ruczinski, Y. Shyr, S. Skates, T.P. Speed, J.D. Storey, Z. Szallasi, R. Tibshirani, S. Zeger, J. Hopkins // Bethesda, MD, 2010, July 19. Available online at <http://www.cancerletter.com/categories/documents> (accessed January 18, 2012).
- Barrett, D. Advances in metabolic profiling / D. Barrett // *Bioanalysis*. —2012. — Vol. 4. — № 6. — P. 643-644.
- Bartminski, G. Novel biomarkers for asthma stratification and personalized therapy / G. Bartminski, M. Crossley, V. Turcanu // *Expert Review of Molecular Diagnostics*. —2014. — Vol. 5. — P. 1-16.
- Båvenholm, P.N. Insulin resistance in type 2 diabetes: association with truncal obesity, impaired fitness, and atypical malonyl coenzyme A regulation / P.N. Båvenholm, J. Kuhl, J. Pigon, A.K. Saha, N.B Ruderman, S. Efendic // *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. — 2003. — Vol. 88. — P. 82-87.
- Beckwith-Hall, B. M. Nuclear magnetic resonance spectroscopic and principal components analysis investigations into biochemical effects of three model

- hepatotoxins / B.M. Beckwith-Hall, J.K. Nicholson, A.W. Nicholls, P.J. Foxall, J.C. Lindon, S.C. Connor, M. Abdi, J. Connelly, E. Holmes // *Chemical Research in Toxicology*. — 1998. — Vol. 11. — № 4. — P. 260-272.
- Beecher, C.W.W. Metabolic profiling: Its role in biomarker discovery and gene function analysis / C.W.W. Beecher; G.George and RG.Harrigan eds. — New York: Springer, 2003. — 335 p.
- Beger, R.D. Metabonomic models of human pancreatic cancer using 1D proton NMR spectra of lipids in plasma / D.R. Beger, L.K. Schnackenberg, R.D. Holland, D. Li, Y. Dragan // *Metabolomics*. — 2006. — Vol. 2. — № 3. — P. 125-134.
- Begley, P. Development and performance of a gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry analysis for large-scale nontargeted metabolomic studies of human serum / P. Begley, S. Francis-McIntyre, W.B. Dunn, D.I. Broadhurst, A. Halsall, A. Tseng, J. Knowles, HUSERMET Consortium, R. Goodacre, D.B. Kell // *Analytical Chemistry*. — 2009. — Vol. 81. — № 16. — P. 7038-7046.
- Bellevue, R. Pseudohyperkalemia and extreme leukocytosis / R. Bellevue, H. Dosik, G. Spergel, B.D. Gussoff // *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. — 1975. — Vol. 85. — № 4. — P. 660-664.
- Belov, M.E. Zeptomole-sensitivity electrospray ionization--Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry of proteins / M.E. Belov, M.V. Gorshkov, H.R. Udseth, G.A. Anderson, R.D. Smith // *Analytical Chemistry*. — 2000. — Vol. 72. — № 10. — P. 2271-2279.
- Benowitz, N.L. Biomarkers of environmental tobacco smoke exposure / N.L. Benowitz // *Environmental Health Perspectives*. — 1999. — Vol. 107. — Suppl. 2. — P. 349-355.
- Berrish, T.S. The role of plasma non-esterified fatty acids during exercise in type 2 diabetes mellitus / T.S. Berrish, C. Elliott, B.G. Cooper, J.W. Reed, H.

- Orskov, K.G. Alberti, M. Walker // *Diabetic Medicine* (a journal of the British Diabetic Association). — 1993. — Vol. 10. — № 2. — P. 152-158.
- Bese, T. Comparison of total plasma lysophosphatidic acid and serum CA-125 as a tumor marker in the diagnosis and follow-up of patients with epithelial ovarian cancer / T. Bese, M. Barbaros, E. Baykara, O. Guralp, S. Cengiz, F. Demirkiran, C. Sanioglu, M. Arvas // *Journal of Gynecologic Oncology*. — 2010. — Vol. 21. — № 4. — P. 248-254.
- Bijlsma, S. Large-scale human metabolomics studies: a strategy for data (pre-) processing and validation / S. Bijlsma, I. Bobeldijk, E.R. Verheij, R. Ramaker, S. Kochhar, I.A. Macdonald, B. van Ommen, A.K. Smilde // *Analytical Chemistry*. — 2006. — Vol. 78. — № 2. — P. 567-574.
- Bino, R.J. Potential of metabolomics as a functional genomics tool / R.J. Bino, R.D. Hall, O. Fiehn, J. Kopka, K. Saito, J. Draper, B.J. Nikolau, P. Mendes, U. Roessner-Tunali, M.H. Beale, R.N. Trethewey, B.M. Lange, E.S. Wurtele, L.W. Sumner // *Trends in Plant Science*. — 2004. — Vol. 9. — P. 418-425.
- Bland, J.M. Statistics notes. The odds ratio / J.M. Bland, D.G. Altman // *BMJ* (Clinical research ed.). — 2000. — Vol. 320. — № 7247. — P. 1468.
- Bochenek, G. Plasma 9alpha,11beta-PGF2, a PGD2 metabolite, as a sensitive marker of mast cell activation by allergen in bronchial asthma / G. Bochenek, E. Nizankowska, A. Gielicz, M. Swierczyńska, A. Szczeklik // *Thorax*. — 2004. — Vol. 59. — № 6. — P. 459-464.
- Bodi, V. Metabolomics in the diagnosis of acute myocardial ischemia / V. Bodi, V.G. Marrachelli, O. Husser, F.J. Chorro, J.R. Viña, D. Monleon // *Journal of Cardiovascular Translational Research*. — 2013. — Vol. 6. — № 5. — P. 808-815.
- Boffetta, P. Serum cotinine level as predictor of lung cancer risk / P. Boffetta, S. Clark, M. Shen, R. Gislefoss, R. Peto, A. Andersen // *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. — 2006. — Vol. 15. — P. 1184-1188.

- Bogyo, M. New technologies and their impact on 'omics' research / M. Bogyo, P.M. Rudd // *Current Opinion in Chemical Biology*. — 2013. — Vol. 17. — № 1. — P. 1-3.
- Brindle, J.T. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using <sup>1</sup>H-NMR-based metabonomics / J.T. Brindle, H. Antti, E. Holmes, G. Tranter, J.K. Nicholson, H.W. Bethell, S. Clarke, P.M. Schofield, E. McKilligin, D.E. Mosedale, D.J. Grainger // *Nature Medicine*. — 2002. — Vol. 8. — № 12. — P. 1439-1444.
- Bristow, A.W. Reproducible product-ion tandem mass spectra on various liquid chromatography/mass spectrometry instruments for the development of spectral libraries / A.W. Bristow, K.S. Webb, A.T. Lubben, J. Halket // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. — 2004. — Vol. 18. — P. 1447–1454.
- Broeckling, C.D. MET-IDEA: data extraction tool for mass spectrometry-based metabolomics / C.D. Broeckling, I.R. Reddy, A.L. Duran, X. Zhao, L.W. Sumner // *Analytical Chemistry*. — 2006. — Vol. 78. — № 13. — P. 4334-4341.
- Brown, S.C. Metabolomics applications of FT-ICR mass spectrometry / S.C. Brown, G. Kruppa, J.L. Dasseux // *Mass Spectrometry Reviews*. — 2005. — Vol. 24. — P. 223–231.
- Burke, W. Personalized medicine in the era of genomics / W. Burke, B.M. Psaty // *Journal of the American Medical Association*. — 2007. — Vol. 298. — № 14. — P. 1682-1684.
- Burtis, C.A. Tietz fundamentals of clinical chemistry / C.A. Burtis and D.E. Brunts eds. — St. Louis, Mo.: Saunders Elsevier, 2008. — 976 p.
- Byeon, S.K. Discovery of candidate phospholipid biomarkers in human lipoproteins with coronary artery disease by flow field-flow fractionation and nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry / S.K. Byeon, J.Y. Lee, S. Lim, D. Choi, M.H. Moon // *Journal of Chromatography A*. — 2012. — Vol. 1270. — P. 246-253.

- Cabarkapa, V. Evaluation of lipid parameters and bioindices in patients with different stages of chronic renal failure / V. Cabarkapa, M. Djerić, Z. Stosić, V. Sakac, L.C. Zagorka, B. Vucković // *Vojnosanitetski Pregled. Military-medical and pharmaceutical review.* — 2012. — Vol. 69. — № 11. — P. 961-966.
- Carini, C. Biomarkers: a valuable tool in clinical research and medical practice / C. Carini // *IDrugs: the investigational drugs journal.* — 2007. — Vol. 10. — P. 395-398.
- Carrola, J. Metabolic signatures of lung cancer in biofluids: NMR-based metabonomics of urine / J. Carrola, C.M. Rocha, A.S. Barros, A.M. Gil, B.J. Goodfellow, I.M. Carreira, J. Bernardo, A. Gomes, V. Sousa, L. Carvalho, I.F. Duarte // *Journal of Proteome Research.* — 2011. — Vol. 10. — № 1. — P. 221-230.
- Carter, A.L. Relationship of carnitine and acylcarnitines in ejaculated sperm to blood plasma testosterone of dairy bulls / A.L. Carter, S.M. Hutson, F.W. Stratman, R.V.Jr. Haning // *Biology of Reproduction.* — 1980. — Vol. 23. — P. 820-825.
- Castle, A.L. Metabolomics standards workshop and the development of international standards for reporting metabolomics experimental results. [Consensus Development Conference, NIH] / A.L. Castle, O. Fiehn, R. Kaddurah-Daouk, J.C. Lindon // *Briefings in Bioinformatics.* — 2006. — Vol. 7. — № 2. — P. 159-165.
- Castrillo, J.I. An optimized protocol for metabolome analysis in yeast using direct infusion electrospray mass spectrometry / J.I. Castrillo, A. Hayes, S. Mohammed, S.J. Gaskell, S.G. Oliver // *Phytochemistry.* — 2003. — Vol. 62. — P. 929-937.
- Chace, D.H. The application of tandem mass spectrometry to neonatal screening for inherited disorders of intermediary metabolism / D.H. Chace, T.A. Kalas, E.W. Naylor // *Annual Review of Genomics and Human Genetics.* — 2002. — Vol. 3. — P. 17-45.

- Chace, D.H. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns / D.H. Chace, T.A. Kalas, E.W. Naylor // *Clinical Chemistry*. — 2003. — Vol. 49. — P. 1797–1817.
- Chace, D.H. A biochemical perspective on the use of tandem mass spectrometry for newborn screening and clinical testing / D.H. Chace, T.A. Kalas // *Clinical Biochemistry*. — 2005. — Vol. 38. — P. 296–309.
- Chang, W.T. Effects of growth conditions and processing on *Rehmannia glutinosa* using fingerprint strategy / W.T. Chang, U. Thissen, K.A. Ehlert, M.M. Koek, R.H. Jellema, T. Hankemeier, J. van der Greef, M. Wang // *Planta Medica*. — 2006. — Vol. 72. — P. 458–467.
- Chen, S. Serum lipid profiling of patients with chronic hepatitis B, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma by ultra fast LC/IT-TOF MS / S. Chen, P. Yin, X. Zhao, W. Xing, C. Hu, L. Zhou, G. Xu // *Electrophoresis*. — 2013. — Vol. 34. — № 19. — P. 2848-2856.
- Cheng, L.L. Metabolic characterization of human prostate cancer with tissue magnetic resonance spectroscopy / L.L. Cheng, M.A. Burns, J.L. Taylor, W. He, E.F. Halpern, W.S. McDougal, C.L. Wu // *Cancer Research*. — 2005. — Vol. 65. — № 8. — P. 3030-3034.
- Cho, S.H. Evaluation of urinary nucleosides in breast cancer patients before and after tumor removal / S.H. Cho, M.H. Choi, W.Y. Lee, B.C.Chung // *Clinical Biochemistry*. — 2009. — Vol. 42. — P. 540-543.
- Christians, U. How unbiased is non-targeted metabolomics and is targeted pathway screening the solution? / U. Christians, J. Klawitter, A. Hornberger, J. Klawitter // *Current Pharmaceutical Biotechnology*. — 2011. — Vol. 12. — № 7. — P. 1053-1066.
- Cífková, E. Determination of lipidomic differences between human breast cancer and surrounding normal tissues using HILIC-HPLC/ESI-MS and multivariate data analysis / E. Cífková, M. Holčapek, M. Lísa, D. Vrána, J. Gatěk, B. Melichar // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2015. — Vol. 407. — № 3. — P. 991-1002.

- Clayton, T.A. Pharmacometabonomic identification of a significant host-microbiome metabolic interaction affecting human drug metabolism / T.A. Clayton, D. Baker, J.C. Lindon, J.R. Everett, J.K. Nicholson // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2009. — Vol. 106. — № 34. — P. 14728-14733.
- Colebatch, G. Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* / G. Colebatch, G. Desbrosses, T. Ott, L. Krusell, O. Montanari, S. Kloska, J. Kopka, M.K. Udvardi // *The Plant journal: for cell and molecular biology*. — 2004. — Vol. 39. — P. 487–512.
- Coleman, R.E. PET in lung cancer / R.E Coleman // *The Journal of Nuclear Medicine*. — 1999. — Vol. 40. — № 5. — P. 814-820.
- Colussi, G. Pseudohyperkalemia in extreme leukocytosis / G. Colussi, D. Cipriani // *The American Journal of Nephrology*. — 1995. — Vol. 15. — № 5. — P. 450-452.
- Coyle, Y.M. An ecological study of the association of metal air pollutants with lung cancer incidence in Texas / Y.M. Coyle, A.T. Minahjuddin, L.S. Hynan, J.D. Minna // *Journal of Thoracic Oncology*. — 2006. — Vol. 1. — P. 654-661.
- Crews, B. Variability analysis of human plasma and cerebral spinal fluid reveals statistical significance of changes in mass spectrometry-based metabolomics data / B. Crews, W.R. Wikoff, G.J. Patti, H.-K. Woo, E. Kalisiak, J. Heideker, G. Siuzdak // *Analytical Chemistry*. — 2009. — Vol. 81. — P. 8538–8544.
- Cutler, D.M. Are we finally winning the war on cancer? / D.M. Cutler // *The Journal of Economic Perspectives*. — 2008. — Vol. 22. — № 4. — P. 3-26.
- Dalluge, J. Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a powerful and versatile analytical tool/ J. Dalluge, J. Beens, U.A.T. Brinkman // *Journal of Chromatography A*. — 2003. — Vol. 1000. — P. 69-108.
- De Luis, D.A. C358A missense polymorphism of the endocannabinoid degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) and insulin resistance in patients

- with diabetes mellitus type 2 / D.A. De Luis, M. G. Sagrado, R. Aller, O. Izaola, R. Conde, E. Romero // *Diabetes Research and Clinical Practice*. — 2010. — Vol. 88. — P. 76–80.
- Demirkan, A. Plasma phosphatidylcholine and sphingomyelin concentrations are associated with depression and anxiety symptoms in a Dutch family-based lipidomics study / A. Demirkan, A. Isaacs, P. Ugocsai, G. Liebisch, M. Struchalin, I. Rudan, J.F. Wilson, P.P. Pramstaller, U. Gyllensten, H. Campbell, G. Schmitz, B.A. Oostra, C.M. van Duijn // *Journal of Psychiatric Research*. — 2013 — Vol. 47. — № 3. — P. 357-362.
- Denkert, C. Metabolite profiling of human colon carcinoma--deregulation of TCA cycle and amino acid turnover / C. Denkert, J. Budczies, W. Weichert, G. Wohlgemuth, M. Scholz, T. Kind, S. Niesporek, A. Noske, A. Buckendahl, M. Dietel, O. Fiehn // *Molecular Cancer*. — 2008. — Vol. 7. — P. 7-72.
- Dettmer, K. Metabolomics—a new exciting field within the “omics” sciences / K. Dettmer, B.D. Hammock // *Environmental Health Perspectives*. — 2004. — Vol. 112. — P. 396–397.
- Dettmer, K. Mass spectrometry-based metabolomics / K. Dettmer, P.A. Aronov, B. D. Hammock // *Mass Spectrometry Reviews*. — 2007. — Vol. 26. — № 1. — P. 51–78.
- De Vos, R.C. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry / R.C. De Vos, S. Moco, A. Lommen, J.J. Keurentjes, R.J. Bino, R.D. Hall // *Nature Protocols*. — 2007. — Vol. 2. — P. 778–791.
- Diamandis, E.P. Mass spectrometry as a diagnostic and a cancer biomarker discovery tool: opportunities and potential limitations / E.P. Diamandis // *Molecular & Cellular Proteomics*. — 2004. — Vol. 3. — P. 367-378.
- Dizeyi, N. Expression of serotonin receptors and role of serotonin in human prostate cancer tissue and cell lines / N. Dizeyi, A. Bjartell, E. Nilsson, J. Hansson, V. Gadaleanu, N. Cross, P.A. Abrahamsson // *Prostate*. — 2004. — Vol. 59. — P. 328-336.

- Dohi, T. Increased lysophosphatidic acid levels in culprit coronary arteries of patients with acute coronary syndrome / T. Dohi, K. Miyauchi, R. Ohkawa, K. Nakamura, M. Kurano, T. Kishimoto, N. Yanagisawa, M. Ogita, T. Miyazaki, A. Nishino, K. Yaginuma, H. Tamura, T. Kojima, K. Yokoyama, T. Kurata, K. Shimada, H. Daida, Y. Yatomi // *Atherosclerosis*. — 2013. — Vol. 229. — № 1. — P. 192-197.
- Dong, J. Lysophosphatidylcholine profiling of plasma: discrimination of isomers and discovery of lung cancer biomarkers / J. Dong, X. Cai, L. Zhao, X. Xue, L. Zou, X. Zhang, X. Liang // *Metabolomics*. — 2010. — Vol. 6. — P. 478-488.
- Drouin, P. Diagnosis and classification of diabetes mellitus / P. Drouin, J.F. Blicke, B. Charbonnel, E. Eschwege, P.J. Guillausseau, P.F. Plouin, J.M. Daninos, N. Balarac, and J.P. Sauvanet; D. Porte, R.S. Sherwin, A. Baron eds // *Diabetes Care*. — 2009. — Vol. 32. — Suppl. 1. — S. 62–67.
- Duffin, K.L. Electrospray and tandem mass spectrometric characterization of acylglycerol mixtures that are dissolved in nonpolar solvents / K.L. Duffin, J.D. Henion, J.J. Shieh // *Analytical Chemistry*. — 1991. — Vol. 63. — P.1781–1788.
- Dunn, B.K. Molecular markers for early detection. / B.K. Dunn, P.D. Wagner, D. Anderson, P. Greenwald // *Seminars in Oncology*. — 2010. — Vol. 37. — № 3. — P. 224-242.
- Dunn, W.B. Measuring the metabolome: current analytical technologies / W.B. Dunn, N.J. Bailey, H.E. Johnson // *Analyst*. — 2005. — Vol. 130. — № 5. — P. 606-625.
- Dunn, W.B. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy / W.B. Dunn, D.I. Broadhurst, H.J. Atherton, R. Goodacre, J.L. Griffin // *Chemical Society Reviews*. — 2011. — Vol. 40. — № 1. — P. 387-426.
- Dunn, W.B. Molecular phenotyping of a UK population: defining the human serum metabolome / W.B. Dunn, W. Lin, D. Broadhurst, P. Begley, M. Brown, E. Zelena, A.A. Vaughan, A. Halsall, N. Harding, J.D. Knowles, S. Francis-

- McIntyre, A. Tseng, D.I. Ellis, S. O'Hagan, G. Aarons, B. Benjamin, S. Chew-Graham, C. Moseley, P. Potter, C.L. Winder, C. Potts, P. Thornton, C. McWhirter, M. Zubair, M. Pan, A. Burns, J.K. Cruickshank, G.C. Jayson, N. Purandare, F.C. Wu, J.D. Finn, J.N. Haselden, A.W. Nicholls, I.D. Wilson, R. Goodacre, D.B. Kell // *Metabolomics*. — 2015. — Vol. 11. — № 1. — P. 9-26.
- Ekroos, K. Lipidomics: a tool for studies of atherosclerosis. / K. Ekroos, M. Jänis, K. Tarasov, R. Hurme, R. Laaksonen // *Current Atherosclerosis Reports*. — 2010. — Vol. 12. — № 4. — P. 273-281.
- Ellis, D.I. Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool / D.I. Ellis, W.B. Dunn, J.L. Griffin, J.W. Allwood, R. Goodacre // *Pharmacogenomics*. — 2007. — Vol. 8. — № 9. — P. 1243–1266.
- Emilien, G. Impact of genomics on drug discovery and clinical medicine / G. Emilien, M. Ponchon, C. Caldas, O. Isacson, J.M. Maloteaux // *QJM: monthly journal of the Association of Physicians* — 2000. — Vol. 93. — P. 391-423.
- Engeli, S. Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity / S. Engeli, J. Böhnke, M. Feldpausch, K. Gorzelniak, J. Janke, S. Bátkai, P. Pacher, J. Harvey-White, F.C. Luft, A.M. Sharma, J. Jordan // *Diabetes*. — 2005. — Vol. 54. — 2838–2843.
- Evolution of translational omics: lessons learned and the path forward. Committee on the review of omics-based tests for predicting patient outcomes in clinical trials. — National Academies Press. — 2012. — August 27.
- Fernandis, A.Z. Lipid-based biomarkers for cancer / A.Z. Fernandis, M.R. Wenk // *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. — 2009. — Vol. 877. — № 26. — P. 2830–2835.
- Fiehn, O. Establishing reporting standards for metabolomic and metabonomic studies: a call for participation / O. Fiehn, B. Kristal, B. van Ommen, L.W. Sumner, S.A. Sansone, C. Taylor, N. Hardy, R. Kaddurah-Daouk // *OMICS: a journal of integrative biology*. — 2006. — Vol. 10. — № 2. — P. 158–163.

- Fiehn, O. The metabolomics standards initiative (MSI) / O. Fiehn, D. Robertson, J. Griffin, M. van der Werf, B. Nikolau, N. Morrison, L.W. Sumner, R. Goodacre, N.W. Hardy, C. Taylor, J. Fostel, B. Kristal, R. Kaddurah-Daouk, P. Mendes, B. van Ommen, J.C. Lindon, S.-A. Sansone // *Metabolomics: Official journal of Metabolomic Society*. — 2007. — Vol. 3. — № 3. — P. 175–178.
- Floegel, A. Identification of serum metabolites associated with risk of type 2 diabetes using a targeted metabolomic approach / A. Floegel, N. Stefan, Z. Yu, K. Mühlenbruch, D. Drogan, H.G. Joost, A. Fritsche, H.U. Häring, M. Hrabě de Angelis, A. Peters, M. Roden, C. Prehn, R. Wang-Sattler, T. Illig, M.B. Schulze, J. Adamski, H. Boeing, T. Pischon // *Diabetes*. — 2013. — Vol. 62. — № 2. — P. 639–648.
- Fonseca, V.A. The metabolic syndrome, hyperlipidemia, and insulin resistance / V.A. Fonseca // *Clinical Cornerstone*. — 2005. — Vol. 7. — № 2-3. — P. 61–72.
- Fritz, A. International classification of diseases for oncology (ICD-O) / A. Jack, D.M. Parkin, C. Percy, S. Shanmugarathan, L. Sobin, S. Whelan eds. — 3-rd edition. — Geneva: WHO, 2000. — 247 p.
- Fu, X. Simplified screening for organic acidemia using GC/MS and dried urine filter paper: a study on neonatal mass screening. / X. Fu, M. Iga, M. Kimura, S. Yamaguchi // *Early Human Development*. — 2000. — Vol. 58. — P. 41–55.
- Fu, Q. Multiplex assays for biomarker research and clinical application: translational science coming of age / Q. Fu, F.S. Schoenhoff, W.J. Savage, P. Zhang, J.E. Van Eyk // *Proteomics. Clinical Applications*. — 2010. — Vol. 4. — № 3. — P. 271-284.
- Fuhrer, T. High-throughput discovery metabolomics / T. Fuhrer, N. Zamboni // *Current Opinion in Biotechnology*. — 2015. — Vol. 31. — P. 73-78.
- Gallus, S. European studies on long-term exposure to ambient particulate matter and lung cancer / S. Gallus, E. Negri, P. Boffetta, J.K. McLaughlin, C. Bosetti, C. La Vecchia // *European Journal of Cancer Prevention*. — 2008. — Vol. 17. — P. 191-194.

- Geckil, H. Enhanced production of acetoin and butanediol in recombinant *Enterobacter aerogenes* carrying *Vitreoscilla* hemoglobin gene / H. Geckil, Z. Barak, D.M. Chipman, S.O. Erenler, D.A. Webster, B.C. Stark // *Bioprocess and Biosystems Engineering*. — 2004. — Vol. 26. — P. 325–330.
- German, J.B. Genomics and metabolomics as markers for the interaction of diet and health: lessons from lipids / J.B. German, M.A. Roberts, S.M. Watkins // *Journal of Nutrition*. — 2003. — Vol. 133. — P. 2078–2083.
- Goldberg, P. A year at NCI: Harold Varmus reflects on provocative questions, Duke scandal, financial disaster and grant review / P. Goldberg // *The Cancer Letter*. — 2011. — Vol. 37. — № 29. — P. 1-7.
- Goodacre, R. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data / R. Goodacre, S. Vaidyanathan, W.B. Dunn, G.G. Harrigan, D.B. Kell // *Trends in Biotechnology*. — 2004. — Vol. 22. — № 5. — P. 245-252.
- Goodacre, R. Proposed minimum reporting standards for data analysis in metabolomics / R. Goodacre, D. Broadhurst, A.K. Smilde, B.S. Kristal, J.D. Baker, R. Beger, C. Bessant, S. Connor, G. Capuani, A. Craig, T. Ebbels, D.B. Kell, C. Manetti, J. Newton, G. Paternostro, R. Somorjai, M. Sjöström, J. Trygg, F. Wulfert // *Metabolomics: Official journal of the Metabolomic Society*. — 2007. — Vol. 3. — № 3. — P. 231-241.
- Gopaul, N.K. Plasma 8-epi-PGF2 alpha levels are elevated in individuals with non-insulin dependent diabetes mellitus / N.K. Gopaul, E.E. Anggård, A.I. Mallet, D.J. Betteridge, S.P. Wolff, J. Nourooz-Zadeh // *FEBS Letters*. — 1995. — Vol. 368. — № 2. — P. 225-229.
- Görke, R. Determining and interpreting correlations in lipidomic networks found in glioblastoma cells / R. Görke, A. Meyer-Bäse, D. Wagner, H. He, M.R. Emmett, C.A. Conrad // *BMC (BioMedCentral) Systems Biology*. — 2010. — Vol. 4. — P. 126–140.
- Gowda, G.A. Metabolomics-based methods for early disease diagnostics / G.A. Gowda, S. Zhang, H. Gu, V. Asiago, N. Shanaiah, D Raftery // *Expert*

- Review of Molecular Diagnostics. — 2008. — Vol. 8. — № 5. — P. 617–633.
- Graessler, J. Top-down lipidomics reveals ether lipid deficiency in blood plasma of hypertensive patients / J. Graessler, D. Schwudke, P.E.H. Schwarz, R. Herzog, S.R. Bornstein // PLoS One. — 2009. — Vol. 4. — № 7. — e6261.
- Griffin, J.L. Metabolic profiles of cancer cells / J.L. Griffin, J.P. Shockcor // Nature Reviews Cancer. — 2004. — Vol. 4. — P. 551-561.
- Griffiths, W.J. Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry / W.J. Griffiths, A.P. Jonsson, S. Liu, D.K. Rai, Y. Wang // Biochemical Journal. — 2001. — Vol. 355. — P. 545–561.
- Guo, J. In vitro proton magnetic resonance spectroscopic lactate and choline measurements, <sup>18</sup>F-FDG uptake, and prognosis in patients with lung adenocarcinoma / J. Guo, K. Higashi, H. Yokota, Y. Nagao, Y. Ueda, Y. Kodama, M. Oguchi, S. Taki, H. Tonami, I. Yamamoto // The Journal of Nuclear Medicine. — 2004. — Vol. 45. — № 8. — P. 1334-1339.
- Guo, X. Metabolite profiling analysis of *Methylobacterium extorquens* AM1 by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry / X. Guo, M.E. Lidstrom // Biotechnology and Bioengineering. — 2008. — Vol. 99. — P. 929–940.
- Gutiu, I.A. Pharmacometabolomics, pharmacogenomics and personalized medicina / I. A. Gutiu, A. Andries, F. Radulescu, A-M. Georgescu, D. Cioaca // Romanian Journal of Internal Medicine. — 2010. — Vol. 48. — № 2. — P. 187-191.
- Ha, C.Y. The association of specific metabolites of lipid metabolism with markers of oxidative stress, inflammation and arterial stiffness in men with newly diagnosed type 2 diabetes / C.Y. Ha, J.Y. Kim, J.K. Paik, O.Y. Kim, Y.H. Paik, E.J. Lee, J.H. Lee // Clinical Endocrinology (Oxf). — 2012. — Vol. 76. — № 5. — P. 674-682.
- Hagland, H. Targeting mitochondria in the treatment of human cancer: a coordinated attack against cancer cell energy metabolism and signalling / H. Hagland, J.

- Nikolaisen, L.I. Hodneland, B.T. Gjertsen, Ø. Bruserud, K.J. Tronstad // Expert Opinion on Therapeutic Targets. — 2007. — Vol. 11. — P. 1055-1069.
- Halimi, J.M. Effects of current smoking and smoking discontinuation on renal function and proteinuria in the general population. J.M. Halimi, B. Giraudeau, S. Vol, E. Cacès, H. Nivet, Y. Lebranchu, J. Tichet // Kidney International. — 2000. — Vol. 58. — P. 1285-1292.
- Halket, J.M. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS / J.M. Halket, D. Waterman, A.M. Przyborowska, R.K. Patel, P.D. Fraser, P.M. Bramley // Journal of Experimental Botany. — 2005. — Vol. 56. — P. 219–243.
- Han, X. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics / X. Han, R.W. Gross // Journal of Lipid Research. — 2003. — Vol. 44. — P. 1071–1079.
- Han, X. Shotgun lipidomics: electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples / X. Han, R.W. Gross // Mass Spectrometry Reviews. — 2005. — Vol. 24. — P. 367–412.
- Han, X. Shotgun lipidomics identifies cardiolipin depletion in diabetic myocardium linking altered substrate utilization with mitochondrial dysfunction / X. Han, J. Yang, H. Cheng, K. Yang, D.R. Abendschein, R.W. Gross // Biochemistry. — 2005. — Vol. 44. — № 50 — P. 16684–16694.
- Han, X. Alterations in myocardial cardiolipin content and composition occur at the very earliest stages of diabetes: a shotgun lipidomics study / X. Han, J. Yang, K. Yang, Z. Zhao, D.R. Abendschein, R.W. Gross // Biochemistry. — 2007. — Vol. 46. — № 21. — P. 6417-6428.
- Han, X. Metabolomics in early Alzheimer's disease: identification of altered plasma sphingolipidome using shotgun lipidomics / X. Han, S. Rozen, S.H. Boyle, C.

- Hellegers, H. Cheng, J.R. Burke, K.A. Welsh-Bohmer, P.M. Doraiswamy, R. Kaddurah-Daouk // *PLoS One*. — 2011. — Vol. 6. — № 7. — e21643.
- Hankey, B.F. Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer - part I: Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates / B.F. Hankey, E.J. Feuer, L.X. Clegg, R.B. Hayes, J.M. Legler, P.C. Prorok, L.A. Ries, R.M. Merrill, R.S. Kaplan // *The Journal of the National Cancer Institute*. — 1999. — Vol. 91. — P. 1017-1024.
- Hardy, N. A roadmap for the establishment of standard data exchange structures for metabolomics / N. Hardy, C. Taylor // *Metabolomics: Official journal of the Metabolomic Society*. — 2007. — Vol. 3. — № 3. — P. 243-248.
- He, Q.Y. Proteomics in biomarker discovery and drug development / Q.Y. He, J.F. Chiu // *Journal of Cellular Biochemistry*. — 2003. — Vol. 89. — P. 868-886.
- Hermansson, M. Automated quantitative analysis of complex lipidomes by liquid chromatography/mass spectrometry / M. Hermansson, A. Uphoff, R. Kakela, P. Somerharju // *Analytical Chemistry*. — 2005. — Vol. 77. — P. 2166–2175.
- Herschman, J.D. Effect of ejaculation on serum total and free prostate-specific antigen concentrations / J.D. Herschman, D.S. Smith, W.J. Catalona // *Urology*. — 1997. — Vol. 50. — P. 239-243.
- Hicks, R.J. (18)F-FDG PET provides high-impact and powerful prognostic stratification in staging newly diagnosed non-small cell lung cancer / R.J. Hicks, V. Kalff, M.P. MacManus, R.E. Ware, A. Hogg, A.F. McKenzie, J.P. Matthews, D.L. Ball // *The Journal of Nuclear Medicine*. — 2001. — Vol. 42. — № 11. — P. 1596-1604.
- Higashi, K. FDG PET in the evaluation of the aggressiveness of pulmonary adenocarcinoma: correlation with histopathological features / R. Higashi, Y. Ueda, K. Ayabe, A. Sakurai, H. Seki, Y. Nambu, M. Oguchi, H. Shikata, S. Taki, H. Tonami, S. Katsuda, I. Yamamoto // *Nuclear Medicine Communications*. — 2000. — Vol. 21. — № 8. — P. 707-714.

- Higashi, K. FDG PET measurement of the proliferative potential of non-small cell lung cancer / K. Higashi, Y. Ueda, M. Yagishita, Y. Arisaka, A. Sakurai, M. Oguchi, H. Seki, Y. Nambu, H. Tonami, I. Yamamoto // *The Journal of Nuclear Medicine*. — 2000. — Vol. 41. — № 1. — P. 85-92.
- Higashi, K. Value of whole-body FDG PET in management of lung cancer / K. Higashi, I. Matsunari, Y. Ueda, R. Ikeda, J. Guo, M. Oguchi, H. Tonami, I. Yamamoto // *Annals of Nuclear Medicine*. — 2003. — Vol. 17. — № 1. — P. 1-14.
- Hirai, M.Y. Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana* / M.Y. Hirai, M.Yano, D.B. Goodenowe, S. Kanaya, T. Kimura, M. Awazuhara, M. Arita, T. Fujiwara, K. Saito // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2004. — Vol. 101. — P. 10205–10210.
- Honour, J.W. Diagnosis of diseases of steroid hormone production, metabolism and action / J.W. Honour // *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*. — 2009. — Vol. 1. — № 5. — P. 209-226.
- Hopley, C. Towards a universal product ion mass spectral library - reproducibility of product ion spectra across eleven different mass spectrometers / C. Hopley, T. Bristow, A. Lubben, A. Simpson, E. Bull, K. Klagkou, J. Herniman, J. Langley // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. — 2008. — Vol. 22. — № 12. — P. 1779-1786.
- Hori, S. A metabolomic approach to lung cancer / S. Hori, S. Nishiumi, K. Kobayashi, M. Shinohara, Y. Hatakeyama, Y. Kotani, N. Hatano, Y. Maniwa, W. Nishio, T. Bamba, E. Fukusaki, T. Azuma, T. Takenawa, Y. Nishimura, M. Yoshida // *Lung Cancer*. — 2011. — Vol. 74. — P. 284-292.
- Hsu, F.F. Structural characterization of triacylglycerols as lithiated adducts by electrospray ionization mass spectrometry using low-energy collisionally activated dissociation on a triple stage quadrupole instrument / F.F. Hsu, J.J. Turk // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. — 1999. — Vol. 10. — P. 587–599.

- Hsu, W.Y. Analysis of urinary nucleosides as potential tumor markers in human colorectal cancer by high performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry / W.Y. Hsu, W.T. Chen, W.D. Lin, F.J. Tsai, Y. Tsai, C.T. Lin, W.Y. Lo, L.B. Jeng, C.C. Lai // *Clinica Chimica Acta*. — 2009. — Vol. 402.— P. 31-37.
- IARC Globocan 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012 / J. Ferlay, I. Soerjomataram, M. Ervik, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, F. Bray eds. — GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet].
- Idborg-Bjorkman, H. Screening of biomarkers in rat urine using LC/electrospray ionization-MS and two-way data analysis // H. Idborg-Bjorkman, P.O. Edlund, O.M. Kvalheim, I. Schuppe-Koistinen, S.P. Jacobsson // *Analytical Chemistry*. — 2003. — Vol. 75. — P. 4784–4792.
- Ikeda, H. Plasma lysophosphatidic acid levels and hepatocellular carcinoma / H. Ikeda, K. Enoku, R. Ohkawa, K. Koike, Y. Yatomi // *Hepatology*. — 2003. — Vol. 57. — №1. — P. 417–418.
- Imamoto, T. Pretreatment serum testosterone level as a predictive factor of pathological stage in localized prostate cancer patients treated with radical prostatectomy / T. Imamoto, H. Suzuki, S. Fukasawa, M. Shimbo, M. Inahara, A. Komiya, T. Ueda, T. Shiraishi, T. Ichikawa // *European Urology*. — 2005. — Vol. 47. — P. 308–312.
- Imamura, F. Novel circulating fatty acid patterns and risk of cardiovascular disease: the cardiovascular health study / F. Imamura, R.N. Lemaitre, I.B. King, X. Song, A.H. Lichtenstein, N.R. Matthan, D.M. Herrington, D.S. Siscovick, D. Mozaffarian // *The American Journal of Clinical Nutrition*. — 2012. — Vol. 96. — № 6. — P. 1252-1261.
- Inouye, M. Dicarboxylic acids as markers of fatty acid peroxidation in diabetes / M. Inouye, T. Mio, K. Sumino // *Atherosclerosis*. — 2000. — Vol. 148. — P. 197–202.

- IOM (Institute of Medicine). Cancer biomarkers: The promises and challenges of improving detection and treatment. — Washington, DC. — The National Academies Press. — 2007.
- Isaac, G. Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS)-based shotgun lipidomics / G. Isaac // *Methods in Molecular Biology*. — 2011. — Vol. 708. — P. 259-275.
- Isbarn, H. Testosterone and prostate cancer: revisiting old paradigms / H. Isbarn, J.H. Pinthus, L.S. Marks, F. Montorsi, A. Morales, A. Morgentaler, C. Schulman // *European Urology*. — 2009. — Vol. 56. — P. 48-56.
- Janssen, L.J. Isoprostanes and lung vascular pathology / L.J. Janssen // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. — 2008. — Vol. 39. — P. 383-389.
- Jansen, R. LC-MS/MS systematic toxicological analysis: comparison of MS/MS spectra obtained with different instruments and settings / R. Jansen, G. Lachatre, P. Marquet // *Clinical Biochemistry*. — 2005. — Vol. 38. — P. 362–372.
- Jansen, R.J. Fatty acids found in dairy, protein and unsaturated fatty acids are associated with risk of pancreatic cancer in a case-control study / R.J. Jansen, D.P. Robinson, R.D. Frank, K.E. Anderson, W.R. Bamlet, A.L. Oberg, K.G. Rabe, J.E. Olson, R. Sinha, G.M. Petersen, R.Z. Stolzenberg-Solomon // *International Journal of Cancer*. — 2014. — Vol. 134. — № 8. — P. 1935-1946.
- Jemal, A. Cancer statistics / A. Jemal, R.C. Tiwari, T. Murray, A. Ghafoor, A. Samuels, E. Ward, E.J. Feuer, M.J. Thun // *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. — 2004. — Vol. 54. — P. 8-29.
- Jemal, A. Cancer statistics, 2008 / A. Jemal, R. Siegel, E. Ward, Y. Hao, J. Xu, T. Murray, M.J. Thun // *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. — 2008. — Vol. 58. — № 2. — P. 71-96.
- Jemal, A. Cancer statistics, 2010 / A. Jemal, R. Siegel, J. Xu, E. Ward // *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. — 2010. — Vol. 60. — № 5. — P. 277-300.

- Jemal, A. Global cancer statistics / A. Jemal, F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman // *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. — 2011. — Vol. 61. — № 2. — P. 69-90.
- Jiye, A. Extraction and GC/MS analysis of the human blood plasma metabolome / A. Jiye, J. Trygg, J. Gullberg, A.I. Johansson, P. Jonsson, H. Antti, S.L. Marklund, T. Moritz // *Analytical Chemistry*. — 2005. — Vol. 77. — P. 8086–8094.
- Jonsson, P. A strategy for identifying differences in large series of metabolomic samples analyzed by GC/MS / P. Jonsson, J. Gullberg, A. Nordstrom, M. Kusano, M. Kowalczyk, M. Sjostrom, T. Moritz // *Analytical Chemistry*. — 2004. — Vol. 76. — P. 1738–1745.
- Jonsson, P. Extraction, interpretation and validation of information for comparing samples in metabolic LC/MS data sets / P. Jonsson, S.J. Bruce, T. Moritz, J. Trygg, M. Sjostrom, R. Plumb, J. Granger, E. Maibaum, J.K. Nicholson, E. Holmes, H. Antti // *Analyst*. — 2005. — Vol. 130. — № 5. — P. 701-707.
- Jordan, K.W. NMR-based metabolomics approach to target biomarkers for human prostate cancer / K.W. Jordan, L.L. Cheng // *Expert Review of Proteomics*. — 2007. — Vol. 4. — P. 389-400.
- Jordan, K.W. Comparison of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung by metabolomic analysis of tissue-serum pairs / K.W. Jordan, C.B. Adkins, L. Su, E.F. Halpern, E.J. Mark, D.C. Christiani, L.L. Cheng // *Lung Cancer*. — 2010. — Vol. 68. — № 1. — P. 44-50.
- Josephs, J.L. Creation and comparison of MS/MS spectral libraries using quadrupole ion trap and triple-quadrupole mass spectrometers / J.L. Josephs, M. Sanders // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. — 2004. — Vol. 18. — P. 743–759.
- Kabir, Z. Lung cancer and urban air-pollution in Dublin: a temporal association? / Z. Kabir, K. Bennett, L. Clancy // *Irish medical journal*. — 2007. — Vol. 100. — P. 367-369.

- Kaddurah-Daouk, R. Metabolomics: a global biochemical approach to drug response and disease / R. Kaddurah-Daouk, B.S. Kristal, R.M. Weinshilboum // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. — 2008. — Vol. 48. — P. 653-683.
- Kaddurah-Daouk, R. Metabolomics: a global biochemical approach to the study of central nervous system diseases / R. Kaddurah-Daouk, K.R. Krishnan // *Neuropsychopharmacology*. — 2009. — Vol. 34. — № 1. — P. 173-186.
- Kandpal, R. The era of 'omics unlimited / R. Kandpal, B. Saviola, J. Felton // *Biotechniques*. — 2009. — Vol.46. — № 5. — P. 351-355.
- Kashyap, S.R. Insulin reduces plasma arginase activity in type 2 diabetic patients / S.R. Kashyap, A. Lara, R. Zhang, Y. M. Park, R.A. DeFronzo // *Diabetes Care*. — 2008. — Vol. 31. — № 1. — P. 134–139.
- Kaysen, G.A. Hyperlipidemia of chronic renal failure / G.A. Kaysen // *Blood Purification*. — 1994. — Vol. 12. — № 1. — P. 60-67.
- Kell, D.B. Here is the evidence, now what is the hypothesis? The complementary roles of inductive and hypothesis-driven science in the post-genomic era / D.B. Kell, S.G. Oliver // *Bioessays*. — 2004. — Vol. 26. — № 1. — P. 99-105.
- Khan, J. Serum lipid and fatty acid profiles are highly changed in patients with alcohol induced acute pancreatitis / J. Khan, T. Solakivi, H. Seppänen, R. Lappalainen-Lehto, S. Järvinen, J. Ronkainen, J. Sand, I. Nordback // *Pancreatology: official journal of the International Association of Pancreatology*. — 2012. — Vol. 12. — № 1. — P. 44-48.
- Kim, H. Quantitative analysis of phosphatidylcholines and phosphatidylethanolamines in urine of patients with breast cancer by nanoflow liquid chromatography/tandem mass spectrometry / H. Kim, H.K. Min, G. Kong, M.H. Moon // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2009. — Vol. 393. — № 6-7. — P. 1649-1656.
- Kim, S.C. Differential levels of L-homocysteic acid and lysophosphatidylcholine (16:0) in sera of patients with ovarian cancer / S.C. Kim, M.K. Kim, Y.H.

- Kim, S.A. Ahn, K.H. Kim, K. Kim, W.K. Kim, J.H. Lee, J.Y. Cho, B.C. Yoo // *Oncology Letters*. — 2014. — Vol. 8. — № 2. — P. 566-574.
- Kirschenlohr, H.L. Proton NMR analysis of plasma is a weak predictor of coronary artery disease / H.L. Kirschenlohr, J.L. Griffin, S.C. Clarke, R. Rhydwen, A.A. Grace, P.M. Schofield, K.M. Brindle, J.C. Metcalfe // *Nature Medicine*. — 2006. — Vol. 12. — № 6. — P. 705-710.
- Klampf, C.W. Review coupling of capillary electrochromatography to mass spectrometry / C.W. Klampf // *Journal of Chromatography A*. — 2004. — Vol. 1044. — P. 131–144.
- Knight, E.L. Factors influencing serum cystatin C levels other than renal function and the impact on renal function measurement / E.L. Knight, J.C. Verhave, D. Spiegelman, H.L. Hillege, D. de Zeeuw, G.C. Curhan, P.E. de Jong // *Kidney International*. — 2004. — Vol. 65. — P. 1416-1421.
- Ko, G.T. The reproducibility and usefulness of the oral glucose tolerance test in screening for diabetes and other cardiovascular risk factors / G.T. Ko, J.C. Chan, J. Woo, E. Lau, V. T. Yeung, C.C. Chow, C.S. Cockram // *Annals of Clinical Biochemistry*. — 1998. — Vol. 35. — Pt. 1. — P. 62–67.
- Koulman, A. High-throughput direct-infusion ion trap mass spectrometry: a new method for metabolomics / A. Koulman, B. A. Tapper, K. Fraser, M. Cao, G. A. Lane, S. Rasmussen // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. — 2007. — Vol. 21. — P. 421–428.
- Kroemer, G. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel / G. Kroemer, J. Pouyssegur // *Cancer Cell*. — 2008. — Vol. 13. — P. 472-482.
- Kroon, L.A. Drug interactions with smoking / L.A. Kroon // *American Journal of Health-System Pharmacy*. — 2007. — Vol. 64. — P. 1917-1921.
- Kuhara, T. Gas chromatographic-mass spectrometric urinary metabolome analysis to study mutations of inborn errors of metabolism / T. Kuhara // *Mass Spectrometry Reviews*. — 2005. — Vol. 24. — P. 814–827.
- Kuhara, T. Diagnosis and monitoring of inborn errors of metabolism using urease-pretreatment of urine, isotope dilution, and gas chromatography-mass

- spectrometry / T. Kuhara // *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. — 2002. — Vol. 781. — № 1-2. — P. 497–517.
- Kulkarni, H. Plasma lipidomic profile signature of hypertension in Mexican American families: specific role of diacylglycerols / H. Kulkarni, P.J. Meikle, M. Mamtani, J.M. Weir, C.K. Barlow, J.B. Jowett, C. Bellis, T.D. Dyer, M.P. Johnson, D.L. Rainwater, L. Almasy, M.C. Mahaney, A.G. Comuzzie, J. Blangero, J.E. Curran // *Hypertension*. — 2013. — Vol. 62. — № 3. — P. 621–626.
- Lafaye, A. Metabolite profiling in rat urine by liquid chromatography/electrospray ion trap mass spectrometry. Application to the study of heavy metal toxicity / A. Lafaye, C. Junot, B. Ramounet-Le Gall, P. Fritsch, J.C. Tabet, E. Ezan // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. — 2003. — Vol. 17. — P. 2541–2549.
- Lafontan, M. [Fat mass expansion, fatty acids and adipokines: metabolic markers and risk factors for cardiovascular pathologies] / M. Lafontan // *Annales Pharmaceutiques Françaises*. — 2013. — Vol. 71. — № 1. — P. 13-26.
- Lai, H.S. Plasma free amino acid profile in cancer patients / H.S. Lai, J.C. Lee, P.H. Lee, S.T. Wang, W.J. Chen // *Seminars in Cancer Biology*. — 2005. — Vol. 15. — 267-276.
- Lang, D.H. Identification of enzymes involved in the metabolism of atrazine, terbuthylazine, ametryne, and terbutryne in human liver microsomes / D.H. Lang, A.E. Rettie, R.H. Bocker // *Chemical Research in Toxicology*. — 1997. — Vol. 10. — P. 1037-1044.
- Laskin, J. Activation of large ions in FT-ICR mass spectrometry / J. Laskin, J.H. Futrell // *Mass Spectrometry Reviews*. — 2005. — Vol. 24. — № 2. — P. 135-167.
- Lein, M. A multicenter clinical trial on the use of complexed prostate specific antigen in low prostate specific antigen concentrations / M. Lein, M. Kwiatkowski, A. Semjonow, H.J. Luboldt, P. Hammerer, C. Stephan, V. Klevecka, K.

- Taymoorian, D. Schnorr, F. Recker, S.A. Loening, K. Jung // *The Journal of Urology*. — 2003. — Vol. 170. — P. 1175-1179.
- Lemire, S.W. Calibration point for liquid secondary ion mass spectrometry tandem mass spectra measured with an EBqQ hybrid mass spectrometer / S.W. Lemire, K.L. Busch // *Journal of Mass Spectrometry*. — 1996. — Vol. 31. — P. 280–288.
- Lenz, E.M. Metabolite profiling in rat urine by liquid chromatography/electrospray ion trap mass spectrometry. Application to the study of heavy metal toxicity / J. Bright, R. Knight, I.D. Wilson, H. Major // *Analyst*. — 2004. — Vol. 129. — P. 535–541.
- Lenz, E.M. Cyclosporin A-induced changes in endogenous metabolites in rat urine: a metabonomic investigation using high field <sup>1</sup>H NMR spectroscopy, HPLC-TOF/MS and chemometrics / E.M. Lenz, J. Bright, R. Knight, I.D. Wilson, H. Major // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. — 2004. Vol. 35. — P. 599–608.
- Liebisch, G. High throughput quantification of cholesterol and cholesteryl ester by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). G. Liebisch, M. Binder, R. Schifferer, T. Langmann, B. Schulz, G. Schmitz // *Biochimica et Biophysica Acta*. — 2006. — Vol. 1761. — № 1. — P. 121-128.
- Lin, L. Direct infusion mass spectrometry or liquid chromatography mass spectrometry for human metabonomics? A serum metabonomic study of kidney cancer / L. Lin, Q. Yu, X. Yan, W. Hang, J. Zheng, J. Xing, B. Huang // *The Analyst*. — 2010. — Vol. 135. — P. 2970–2978.
- Linden, A. Measuring diagnostic and predictive accuracy in disease management: an introduction to receiver operating characteristic (ROC) analysis / A. Linden // *Journal of Evaluation in Clinical Practice*. — 2006. — Vol. 12. — № 2. — P. 132-139.

- Lindon, J.C. Metabonomics techniques and applications to pharmaceutical research & development / J.C. Lindon, E. Holmes, J.K. Nicholson // *Pharmaceutical Research*. — 2006. — Vol. 23. — № 6. — P. 1075-1088.
- Liu, M. The role of leukotrienes in allergic diseases / M. Liu, T. Yokomizo // *Allergology International*. — 2015. — Vol. 64. — № 1. — P. 17-26.
- Lokhov, P.G. Mass spectrometry methods in metabolomics / P.G. Lokhov, A.I. Archakov // *Biomeditsinskaya Khimiya (Moscow)*. — 2008. — Vol. 54. — № 5. — P. 497-511.
- Lokhov, P.G. Mass spectrometry methods in metabolomics / P.G. Lokhov, A.I. Archakov // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B*. — 2009a. — Vol. 3. — № 1. — P. 1-9.
- Lokhov, P.G. Metabolic fingerprinting of blood plasma for patients with prostate cancer / P.G. Lokhov, M.I. Dashtiev, L.V. Bondartsov, A.V. Lisitsa, S.A. Moshkovskii, A.I. Archakov // *Biomeditsinskaya Khimiya (Moscow)*. — 2009b. — Vol. 55. — № 3. — P. 247-254.
- Lokhov, P.G. Metabolic fingerprinting of blood plasma from patients with prostate cancer. / P.G. Lokhov, M.I. Dashtiev, L.V. Bondartsov, A.V. Lisitsa, S.A. Moshkovskii, A.I. Archakov // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B*. — 2010a. — Vol. 4. — № 1. P. 37-41.
- Lokhov, P.G. Metabolite profiling of blood plasma of patients with prostate cancer / P.G. Lokhov, M.I. Dashtiev, S.I. Moshkovskii, A.I. Archakov // *Metabolomics*. — 2010b. — Vol. 6. — № 1. — P. 156-163.
- Lokhov, P.G. Diagnosis of lung cancer based on direct-infusion electrospray mass spectrometry of blood plasma metabolites / P.G. Lokhov, O.N. Kharibin, A.I. Archakov // *International Journal of Mass Spectrometry*. — 2012. — Vol. 309. — P. 200-205.
- Lokhov, P.G. Blood plasma metabolites and the risk of developing lung cancer in Russia / P.G. Lokhov, O.P. Trifonova, D.L. Maslov, A.I. Archakov // *European Journal of Cancer Prevention : the Official Journal of the European*

- Cancer Prevention Organisation (ECP). — 2013. — Vol. 22. — № 4. — P. 335–341.
- Lokhov, P.G. Mass spectrometry analysis of blood low-molecular fraction as a method for unification of therapeutic drug monitoring / P.G. Lokhov, D.L. Maslov, O.P. Trifonova, E.E. Balashova, A.I. Archakov // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B*. — 2014a. — Vol. 8. — № 1. — P. 1-10.
- Lokhov, P.G. Diagnosing impaired glucose tolerance using direct infusion mass spectrometry of blood plasma metabolites / P.G. Lokhov, O.P. Trifonova, D.L. Maslov, E.E. Balashova, A.I. Archakov, E.A. Shestakova, M.V. Shestakova, I.I. Dedov // *PLoS One*. — 2014b. — Vol. 9. — № 9. — e105343.
- Lu, W. Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics / W. Lu, B.D. Bennett, J.D. Rabinowitz // *Journal Of Chromatography B: Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences*. — 2008. — Vol. 871. — P. 236–242.
- Lu, J. Metabolomics in human type 2 diabetes research / J. Lu, G. Xie, W. Jia, W. Jia // *Frontiers of Medicine*. — 2013. — Vol. 7. — № 1. — P. 4-13.
- Luedemann, A. TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography--mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments / A. Luedemann, K. Strassburg, A. Erban, J. Kopka // *Bioinformatics*. — 2008. — Vol. 24. — № 5. — P. 732-737.
- Lung carcinoma: tumors of the lungs — Merck Manual Professional Edition, Online edition. Retrieved 2007-08-15.
- Macconail, L.E. Clinical implications of the cancer genome / L.E. Macconail, L.A. Garraway // *Journal of Clinical Oncology*. — 2010. — Vol. 28. — № 35. — P. 5219-5228.
- MacRedmond, R. Screening for lung cancer using low dose CT scanning / R. MacRedmond, P.M. Logan, M. Lee, D. Kenny, C. Foley, R.W. Costello // *Thorax*. — 2004. — Vol. 59. — № 3. — P. 237-241.

- Maeda, Y. Clinical usefulness of serum cytokeratin 19 fragment as a tumor marker for lung cancer / Y. Maeda, Y. Segawa, N. Takigawa, I. Takata, N. Fujimoto // *Internal Medicine (Tokyo, Japan)*. —1996. — Vol. 35— № 10. — P. 764-771.
- Malaguarnera, M. Decrease of serum carnitine levels in patients with or without gastrointestinal cancer cachexia / M. Malaguarnera, C. Risino, M.P. Gargante, G. Oreste, G. Barone, A.V. Tomasello, M. Costanzo, M.A. Cannizzaro // *World Journal of Gastroenterology*. — 2006. — Vol. 12. — P. 4541-4545.
- Marosvolgyi, T. Fatty acid composition of plasma lipid classes in chronic alcoholic pancreatitis / T. Marosvolgyi, G. Horvath, A. Dittrich, J. Cseh, Z. Lelovics, E. Szabo, T. Decsi, M. Figler // *Pancreatology: official journal of the International Association of Pancreatology (IAP)*. —2010. — Vol. 10— № 5. — P. 580-585.
- Marquis, N.R. Effects of testosterone on the distribution of carnitine, acetylcarnitine, and carnitine acetyltransferase in tissues of the reproductive system of the male rat / N.R. Marquis, I.B. Fritz // *Journal of Biological Chemistry*. — 1965. — Vol. 240. — P. 2197-2200.
- Marshall, A.G. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer / A.G. Marshall, C.L. Hendrickson, G.S. Jackson // *Mass Spectrometry Reviews*. — 1998. — Vol. 17. — P. 1–35.
- Martens, H.A. Validation and verification of regression in small data sets / H.A. Martens, P. Dardenne // *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. — 1998. — Vol. 44. — P. 99-121.
- Mastovská, K. Practical approaches to fast gas chromatography-mass spectrometry / K. Mastovská, S.J. Lehotay // *Journal of chromatography A*. — 2003. — Vol. 1000 — № 1-2. — P. 153-180.
- Mcdonald, G.W. Reproducibility of the oral glucose tolerance test / G.W. Mcdonald, G.F. Fisher, C. Burnham // *Diabetes*. — 1965. — Vol. 14. — P. 473–480.

- McShane, L.M. Practical approaches to fast gas chromatography-mass spectrometry / L.M. McShane, M.M. Cavenagh, T.G. Lively, D.A. Eberhard, W.L. Bigbee, P.M. Williams, J.P. Mesirov, M.Y. Polley, K.Y. Kim, J.V. Tricoli, J.M. Taylor, D.J. Shuman, R.M. Simon, J.H. Doroshov, B.A. Conley // *Nature*. — 2013a. — Vol. 502. — № 7471. — P. 317-320.
- McShane, L.M. Practical approaches to fast gas chromatography-mass spectrometry / L.M. McShane, M.M. Cavenagh, T.G. Lively, D.A. Eberhard, W.L. Bigbee, P.M. Williams, J.P. Mesirov, M.Y. Polley, K.Y. Kim, J.V. Tricoli, J.M. Taylor, D.J. Shuman, R.M. Simon, J.H. Doroshov, B.A. Conley // *BMC Medicine*. — 2013b. — Vol. 11— P. 220-241.
- Meijers, B.K.I. Free p-cresol is associated with cardiovascular disease in hemodialysis patients / B.K.I. Meijers, B. Bammens, B. De Moor, K. Verbeke, Y. Vanrenterghem, P. Evenepoel // *Kidney International*. — 2008. — Vol. 73. — № 10. — P. 1174–1180.
- Metz, C.E. Basic principles of ROC analysis / C.E. Metz // *Seminars in Nuclear Medicine*. — 1978. — Vol. 8. — P. 283–298.
- Mielke, M.M. Alterations of the sphingolipid pathway in Alzheimer's disease: new biomarkers and treatment targets? / M.M. Mielke, C.G. Lyketsos // *Neuromolecular Medicine*. — 2010. — Vol. 12. — № 4. — P. 331–340.
- Mielke, M.M. Plasma ceramides are altered in mild cognitive impairment and predict cognitive decline and hippocampal volume loss / M.M. Mielke, N.J. Haughey, V.V. Ratnam Bandaru, S. Schech, R. Carrick, M.C. Carlson, S. Mori, M.I. Miller, C. Ceritoglu, T. Brown, M. Albert, C.G. Lyketsos // *Alzheimer's and Dementia: the journal of the Alzheimer's Association*. — 2010. — Vol. 6. — № 5. — P. 378–385.
- Min, H.K. Quantitative analysis of urinary phospholipids found in patients with breast cancer by nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry: II. Negative ion mode analysis of four phospholipid classes / H.K. Min, G. Kong, M.H. Moon // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2010. — Vol. 396. — №3. — P. 1273–1280.

- Min, H.K. Shotgun lipidomics for candidate biomarkers of urinary phospholipids in prostate cancer / H.K. Min, S. Lim, B.C. Chung, M.H. Moon // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2011. — Vol. 399. — № 2. — P. 823–830.
- Mock, D.M. Indicators of marginal biotin deficiency and repletion in humans: validation of 3-hydroxyisovaleric acid excretion and a leucine challenge / D.M. Mock, C.L. Henrich, N. Carnell, N.I. Mock // *The American Journal of Clinical Nutrition*. — 2002. — Vol. 76. — P. 1061-1068.
- Mondello, L. Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry: a review / L. Mondello, P.Q. Tranchida, P. Dugo, G. Dugo // *Mass Spectrometry Reviews*. — 2008. — Vol. 27 — № 2. — P. 101-124.
- Monton, M.R. Metabolome analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry / M.R. Monton, T. Soga // *Journal of Chromatography A*. — 2007. — Vol. 1168 — № 1-2. — P. 237-246. — discussion 236.
- Morgentaler, A. Occult prostate cancer in men with low serum testosterone levels / A. Morgentaler, C.O. Bruning 3rd, W.C. DeWolf // *The Journal of the American Medical Association (JAMA)*. — 1996. — Vol. 276. — P. 1904–1906.
- Morgentaler, A. Prevalence of prostate cancer among hypogonadal men with prostate-specific antigen levels of 4.0 ng/mL or less / A. Morgentaler, E.L. Rhoden // *Urology*. — 2006. — Vol. 68. — P. 1263–1267.
- Morrison, N. Standard reporting requirements for biological samples in metabolomics experiments: environmental context / N. Morrison, D. Bearden, J.G. Bundy, T. Collette, F. Currie, M.P. Davey, N.S. Haigh, D. Hancock, O.A.H. Jones, S. Rochfort, S.-A. Sansone, D. Štys, Q. Teng, D. Field, M.R. Viant // *Metabolomics: Official journal of the Metabolomic Society*. — 2007. — Vol. 3. — № 3. — P. 203-210.
- al-Muhtaseb, N. Lipoprotein lipids and apolipoproteins (AI, AII, B, CII, CIII) in type 1 and type 2 diabetes mellitus in young Kuwaiti women / N. al-Muhtaseb, A.R. al-Yusef, J.S. Bajaj // *Diabetic Medicine*. — 1991. — Vol. 8. — № 8. — P. 732-737.

- Müller, M.J. Beyond the body mass index: tracking body composition in the pathogenesis of obesity and the metabolic syndrome / M.J. Müller, M. Lagerpusch, J. Enderle, B. Schautz, M. Heller, A. Bosy-Westphal // *Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. — 2012. — Vol. 13. — № 2. — P. 6-13.
- Murph, M. Liquid chromatography mass spectrometry for quantifying plasma lysophospholipids: potential biomarkers for cancer diagnosis / M. Murph, T. Tanaka, J. Pang, E. Felix, S. Liu, R. Trost, A.K. Godwin, R. Newman, G. Mills // *Methods in Enzymology*. — 2007. — Vol. 433. — P. 1-25.
- Murphy, S.A. Lipidomics applications in health, disease and nutrition research / S.A. Murphy, A. Nicolaou // *Molecular Nutrition and Food Research*. — 2013. — Vol. 57. — № 8. — P. 1336-1346.
- Mutch, E. Do multiple cytochrome P450 isoforms contribute to parathion metabolism in man? / E. Mutch, A.K. Daly, J.B. Leathart, P.G. Blain, F.M. Williams // *Archives of Toxicology*. — 2003. — Vol. 77. — P. 313-320.
- Mutch, E. Diazinon, chlorpyrifos and parathion are metabolised by multiple cytochromes P450 in human liver / E. Mutch, F.M. Williams // *Toxicology*. — 2006. — Vol. 224. — P. 22-32.
- Nadler, R.B. Effect of inflammation and benign prostatic hyperplasia on elevated serum prostate specific antigen levels / R.B. Nadler, P.A. Humphrey, D.S. Smith, W.J. Catalona, T.L. Ratliff // *Journal of Urology*. — 1995. — Vol. 154. — P. 407-413.
- Naidong, W.J. Bioanalytical liquid chromatography tandem mass spectrometry methods on underivatized silica columns with aqueous/organic mobile phases / W.J. Naidong // *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. — 2003. — Vol. 796. — P. 209–224.
- Nakagawa, K. Ion-trap tandem mass spectrometric analysis of Amadori-glycated phosphatidylethanolamine in human plasma with or without diabetes / K. Nakagawa, J.H. Oak, O. Higuchi, T. Tsuzuki, S. Oikawa, H. Otani, M. Mune,

- H. Cai, T. Miyazawa // *Journal of Lipid Research*. — 2005. — Vol. 46. — № 11. — P. 2514-2524.
- Navarro, J. Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumour growth in vivo / J. Navarro, E. Obrador, J. Carretero, I. Petschen, J. Aviñó, P. Perez, J.M. Estrela // *Free Radical Biology and Medicine*. — 1999. — Vol. 26. — P. 410-418.
- Nicholson, J.K. Systems biology: Metabonomics / J.K. Nicholson, J.C. Lindon // *Nature*. — 2008. — Vol. 455. — № 7216. — P. 1054-1056.
- Nicholson, J.K. Pharmacometabonomics as an effector for personalized medicine / J.K. Nicholson, I.D. Wilson, J.C. Lindon // *Pharmacogenomics*. — 2011. — Vol. 12. — № 1. — P. 103-111.
- Nielsen, K.F. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography–UV–mass spectrometry methodology / K.F. Nielsen, J. Smedsgaard // *Journal of Chromatography A*. — 2003. — Vol. 1002. — P. 111–136.
- Nigg, C. [Cholesterol: blood level and control by Swiss physicians] / C. Nigg, F. Gutzwiller // *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*. — 1995. — Vol. 125. — № 8. — P. 355-360.
- Nomeir, A.A. High-performance liquid chromatographic analysis on radial compression column of the neurotoxic tri-*o*-cresyl phosphate and metabolites / A.A. Nomeir, M.B. Abou-Donia // *Analytical Biochemistry*. — 1983. — Vol. 135. — P. 296-303.
- Occupational exposures in insecticide application and some pesticides / IARC monographs on the evaluation of Carcinogenic risk to humans, vol. 53. — Lyon, France, 1991. — 612p.
- Odunsi, K. Detection of epithelial ovarian cancer using <sup>1</sup>H-NMR-based metabonomics / K. Odunsi, R.M. Wollman, C.B. Ambrosone, A. Hutson, S.E. McCann, J. Tammela, J.P. Geisler, G. Miller, T. Sellers, W. Cliby, F. Qian, B. Keitz, M. Intengan, S. Lele, J.L. Alderfer // *International Journal of*

- Cancer. *Journal international du cancer*. — 2005. — Vol. 113. — № 5. — P. 782-788.
- O'Hagan, S. Closed-loop, multiobjective optimization of analytical instrumentation: gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry of the metabolomes of human serum and of yeast fermentations / S. O'Hagan, W.B. Dunn, M. Brown, J.D. Knowles, D.B. Kell // *Analytical Chemistry*. — 2005. — Vol. 77. — P. 290–303.
- Ohshima, A. Effect of a synthetic androgen on biliary lipid secretion in the female hamster / A. Ohshima, B.I. Cohen, N. Ayyad, E.H. Mosbach // *Lipids*. — 1996. — Vol. 31. — P. 879-886.
- Ohta, D. Application of Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry to metabolic profiling and metabolite identification / D. Ohta, S. Kanaya, H. Suzuki // *Current Opinion in Biotechnology*. — 2010. — Vol. 21. — № 1. — P. 35-44.
- Okita, M. Elevated levels and altered fatty acid composition of plasma lysophosphatidylcholine(lysoPC) in ovarian cancer patients / M. Okita, D.C. Gaudette, G.B. Mills, B.J. Holub // *International Journal of Cancer. Journal international du cancer*. — 1997. — Vol. 71. — № 1. — P. 31-34.
- Oresic, M. Lipidomics: a new window to biomedical frontiers / M. Oresic, V.A. Hanninen, A. Vidal-Puig // *Trends in Biotechnology*. — 2008. — Vol. 26. — № 12. — P. 647-652.
- Osl, M. A new rule-based algorithm for identifying metabolic markers in prostate cancer using tandem mass spectrometry / M. Osl, S. Dreiseitl, B. Pfeifer, K. Weinberger, H. Klocker, G. Bartsch, G. Schafer, B. Tilg, A. Graber, C. Baumgartner // *Bioinformatics*. — 2008. — Vol. 24. — P. 2908-2914.
- Patel, N. A novel three serum phospholipid panel differentiates normal individuals from those with prostate cancer / N. Patel, R. Vogel, K. Chandra-Kuntal, W. Glasgow, U. Kelavkar // *PLoS One*. — 2014. — Vol. 9. — № 3. — e88841.

- Patti, G.J. Metabolomics: the apogee of the omic trilogy / G.J Patti, O. Yanes, G. Siuzdak // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. — 2012. — Vol. 13 — № 4. — P. 263–269.
- Pelander, A. Toxicological screening with formula-based metabolite identification by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry / A. Pelander, I. Ojanpera, S. Laks, I. Rasanen, E. Vuori // *Analytical Chemistry*. — 2003. — Vol. 75. — P. 5710–5718.
- Peng, G. Diagnosing lung cancer in exhaled breath using gold nanoparticles / G. Peng, U. Tisch, O. Adams, M. Hakim, N. Shehada, Y.Y. Broza, S. Billan, R. Abdah-Bortnyak, A. Kuten, H. Haick // *Nature Nanotechnology*. — 2009. — Vol. 4. — № 10. — P. 669-673.
- Philp, A. Lactate – a signal coordinating cell and systemic function / A. Philp, A.L. Macdonald, P.W. Watt // *Journal of Experimental Biology*. — 2005. — Vol. 208. — P. 4561-4575.
- Pietilainen, K.H. Acquired obesity is associated with changes in the serum lipidomic profile independent of genetic effects--a monozygotic twin study / K.H. Pietiläinen, M. Sysi-Aho, A. Rissanen, T. Seppänen-Laakso, H. Yki-Järvinen, J. Kaprio, M. Oresic // *PLoS One*. — 2007. — Vol. 2. — № 2. — e218.
- Pietrzak, M. Determination of potassium in red blood cells using unmeasured volumes of whole blood and combined sodium/potassium-selective membrane electrode measurements / M. Pietrzak, M.E. Meyerhoff // *Analytical Chemistry*. — 2009. — Vol. 81. — № 14. — P. 5961-5965.
- Piraud, M. ESI-MS/MS analysis of underivatized amino acids: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism. Fragmentation study of 79 molecules of biological interest in positive and negative ionisation mode / M. Piraud, C. Vianey-Saban, K. Petritis, C. Elfakir, J.P. Steghens, A. Morla, D. Bouchu // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. — 2003. — Vol. 17. — P. 1297–1311.
- Plumb, R. Metabonomic analysis of mouse urine by liquid-chromatography-time of flight mass spectrometry (LC-TOFMS): detection of strain, diurnal and

- gender differences / R. Plumb, J. Granger, C. Stumpf, I.D. Wilson, J.A. Evans, E.M. Lenz // *Analyst*. — 2003. — Vol. 128. — P. 819–823.
- Plumb, R.S. Use of liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and multivariate statistical analysis shows promise for the detection of drug metabolites in biological fluids / R.S. Plumb, C.L. Stumpf, J.H. Granger, J. Castro-Perez, J.N. Haselden, G.J. Dear // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. — 2003. — Vol. 17. — P. 2632–2638.
- Psychogios, N. The human serum metabolome / N. Psychogios, D.D. Hau, J. Peng, A.C. Guo, R. Mandal, S. Bouatra, I. Sinelnikov, R. Krishnamurthy, R. Eisner, B. Gautam, N. Young, J. Xia, C. Knox, E. Dong, P. Huang, Z. Hollander, T.L. Pedersen, S.R. Smith, F. Bamforth, R. Greiner, B. McManus, J.W. Newman, T. Goodfriend, D.S. Wishart // *PLoS One*. — 2011. — Vol. 6. — № 2. — e16957.
- Pua, T.L. Roles of LPA in ovarian cancer development and progression / T.L. Pua, F.Q. Wang, D.A. Fishman // *Future Oncology*. — 2009. — Vol. 5. — № 10. — P. 1659-1673.
- PubMed 2006. PubMed entry for genomic signatures to guide the use of chemotherapeutics by Potti et al. — *Nature Medicine*. — <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17057710>. — accessed October 18, 2011.
- Potti, A. Retraction: Genomic signatures to guide the use of chemotherapeutics / A. Potti, H.K. Dressman, A. Bild, R.F. Riedel, G. Chan, R. Sayer, J. Cragun, H. Cottrill, M.J. Kelley, R. Petersen, D. Harpole, J. Marks, A. Berchuck, G.S. Ginsburg, P. Febbo, J. Lancaster, J.R. Nevins // *Nature Medicine*. — 2011. — Vol. 17. — № 1. — P. 135.
- Pulfer, M. Electrospray mass spectrometry of phospholipids / M. Pulfer, R.C. Murphy // *Mass Spectrometry Reviews*. — 2003. — Vol. 22. — P. 332–364.
- Putri, S.P. Current metabolomics: technological advances / S.P. Putri, S. Yamamoto, H. Tsugawa, E. Fukusaki // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. — 2013. — Vol. 116. — № 1. — P. 9-16.

- Qin, J. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes / J. Qin, Y. Li, Z. Cai, S. Li, J. Zhu, F. Zhang, S. Liang, W. Zhang, Y. Guan, D. Shen, Y. Peng, D. Zhang, Z. Jie, W. Wu, Y. Qin, W. Xue, J. Li, L. Han, D. Lu, P. Wu, Y. Dai, X. Sun, Z. Li, A. Tang, S. Zhong, X. Li, W. Chen, R. Xu, M. Wang, Q. Feng, M. Gong, J. Yu, Y. Zhang, M. Zhang, T. Hansen, G. Sanchez, J. Raes, G. Falony, S. Okuda, M. Almeida, E. LeChatelier, P. Renault, N. Pons, J.-M. Batto, Z. Zhang, H. Chen, R. Yang, W. Zheng, S. Li, H. Yang, J. Wang, S.D. Ehrlich, R. Nielsen, O. Pedersen, K. Kristiansen, J. Wang // *Nature*. — 2012. — Vol. 490. — P. 55–60.
- Qiu, Y. Mass spectrometry-based quantitative metabolomics revealed a distinct lipid profile in breast cancer patients / Y. Qiu, B. Zhou, M. Su, S. Baxter, X. Zheng, X. Zhao, Y. Yen, W. Jia // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2013. — Vol. 14. — № 4. — P. 8047-8061.
- Raina Elley, C. Lifestyle interventions reduced the long-term risk of diabetes in adults with impaired glucose tolerance / C. Raina Elley, T. Kenealy // *Evidence-Based Medicine*. — 2008. — Vol. 13. — № 6. — P. 173.
- Rajcevic, U. Proteomics strategies for target identification and biomarker discovery in cancer / U. Rajcevic, S.P. Niclou, C.R. Jimenez // *Frontiers in Bioscience (Landmark edition)*. — 2009. Vol. 14. — P. 3292-3303.
- Raynaud, J.P. Testosterone deficiency syndrome: treatment and cancer risk / J.P. Raynaud // *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. — 2009. — Vol. 114. — P. 96-105.
- Ressom, H.W. Utilization of metabolomics to identify serum biomarkers for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis / H.W. Resson, J.F. Xiao, L. Tuli, R.S. Varghese, B. Zhou, T.H. Tsai, M.R. Ranjbar, Y. Zhao, J. Wang, C. Di Poto, A.K. Cheema, M.G. Tadesse, R. Goldman, K. Shetty // *Analytica Chimica Acta*. — 2012. — Vol. 743. — P. 90-100.
- Rhoden, E.L. The ratio of serum testosterone-to-prostate specific antigen predicts prostate cancer in hypogonadal men / E.L. Rhoden, C.E. Riedner, A. Morgentaler // *Journal of Urology*. — 2008. — Vol. 179. — P. 1741–1744.

- Richards, S.E. Intra- and inter-omic fusion of metabolic profiling data in a systems biology framework / S.E. Richards, M.E. Dumas, J.M. Fonville, T.M.D. Ebbels, E. Holmes, J.K. Nicholson // *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. — 2010. — Vol. 104. — № 1. — P. 121-131.
- Roessner, U. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography–mass spectrometry / U. Roessner, C. Wagner, J. Kopka, R.N. Trethewey, L. Willmitzer // *The Plant Journal*. — 2000. — Vol. 23. — P. 131–142.
- Roessner, U. Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems / U. Roessner, A. Luedemann, D. Brust, O. Fiehn, T. Linke, L. Willmitzer, A. Fernie // *The Plant Cell*. — 2001a. — Vol. 13. — P. 11–29.
- Roessner, U. High-resolution metabolic phenotyping of genetically and environmentally diverse potato tuber systems. Identification of phenocopies / U. Roessner, L. Willmitzer, A.R. Fernie // *Plant Physiology*. — 2001b. — Vol. 127. — P. 749–764.
- Roy, S.M. Quantification of proteins and metabolites by mass spectrometry without isotopic labeling / S.M. Roy, C.H. Becker // *Methods in Molecular Biology*. — 2007. — Vol. 359. — P. 87–105.
- Ruano-Ravina, A. Dose-response relationship between tobacco and lung cancer: new findings / A. Ruano-Ravina, A. Figueiras, A. Montes-Martinez, J.M. Barros-Dios // *European Journal of Cancer Prevention*. — 2003. — Vol. 12. — P. 257-263.
- Rusiecki, J.A. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to permethrin in the agricultural health study / J.A. Rusiecki, R. Patel, S. Koutros, L. Beane-Freeman, O. Landgren, M.R. Bonner, J. Coble, J. Lubin, A. Blair, J.A. Hoppin, M.C. Alavanja // *Environmental Health Perspectives*. — 2009. — Vol. 117. — P. 581-586.
- Sabatine, M.S. Metabolomic identification of novel biomarkers of myocardial ischemia / M.S. Sabatine, E. Liu, D.A. Morrow, E. Heller, R. McCarroll, R.

- Wiegand, G.F. Berriz, F.P. Roth, R.E. Gerszten // *Circulation*. — 2005. — Vol. 112. — № 25. — P. 3868-3875.
- Sachan, D.S. The serum carnitine status of cancer patients / D.S. Sachan, W.L. Dodson // *Journal of the American College of Nutrition*. — 1987. — Vol. 6. — P. 145-150.
- Sagel, J. Shock during oral glucose tolerance testing / J. Sagel, J.A. Colwell // *Journal of the American Medical Association*. — 1973. — Vol. 226. — № 6. — P. 667-668.
- Salek, R.M. The role of reporting standards for metabolite annotation and identification in metabolomic studies / R.M. Salek, C. Steinbeck, M.R. Viant, R. Goodacre, W.B. Dunn // *GigaScience*. — 2013. — Vol. 2. — P. 13-15.
- Schatzl, G. High-grade prostate cancer is associated with low serum testosterone levels / G. Schatzl, S. Madersbacher, T. Thurridl, J. Waldmüller, G. Kramer, A. Haitel, M. Marberger // *Prostate*. — 2001. — Vol. 47. — P. 52-58.
- Schauer, N. GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples / N. Schauer, D. Steinhauser, S. Strelkov, D. Schomburg, G. Allison, T. Moritz, K. Lundgren, U. Roessner-Tunali, M.G. Forbes, L. Willmitzer, A.R. Fernie, J. Kopka // *FEBS Letters*. — 2005. — Vol. 579. — № 6. — P. 1332-1337.
- Schiffl, H. Update on biomarkers of acute kidney injury: moving closer to clinical impact? / H. Schiffl, S.M. Lang // *Molecular Diagnosis and Therapy*. — 2012. — Vol. 16. — № 4. — P. 199-207.
- Schnackenberg, L.K. Monitoring the health to disease continuum with global metabolic profiling and systems biology / L.K. Schnackenberg, R.D. Beger // *Pharmacogenomics*. — 2006. — Vol. 7. — № 7. — P. 1077-1086.
- Schnackenberg, L.K. Global metabolic profiling and its role in systems biology to advance personalized medicine in the 21st century / L.K. Schnackenberg // *Expert Review of Molecular Diagnostics*. — 2007. — Vol. 7. — № 3. — P. 247-259.

- Schnackenberg, L.K. The role of metabolic biomarkers in drug toxicity studies / L.K. Schnackenberg, R.D. Beger // *Toxicology Mechanisms and Methods*. — 2008. — Vol. 18. — № 4. — P. 301-311.
- Scholz, M. Metabolite fingerprinting: detecting biological features by independent component analysis / M. Scholz, S. Gatzek, A. Sterling, O. Fiehn, J. Selbig // *Bioinformatics*. — 2004. — Vol. 20. — P. 2447-2454.
- Schulze, A. Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications / A. Schulze, M. Lindner, D. Kohlmüller, K. Olgemöller, E. Mayatepek, G.F. Hoffmann // *Pediatrics*. — 2003. — Vol. 111. — P. 1399–1406.
- Schulz-Jander, D.A. Imidacloprid insecticide metabolism: human cytochrome P450 isozymes differ in selectivity for imidazolidine oxidation versus nitroimine reduction / D.A. Schulz-Jander, J.E. Casida // *Toxicology Letters*. — 2002. — Vol. 132. — P. 65-70.
- Sealey, W.M. Smoking accelerates biotin catabolism in women / W.M. Sealey, A.M. Teague, S.L. Stratton, D.M. Mock // *The American Journal of Clinical Nutrition*. — 2004. — Vol. 80. — P. 932-935.
- Sedlakova, I. Lysophosphatidic acid: an ovarian cancer marker / I. Sedláková, J. Vávrová, J. Tošner, L. Hanousek // *European Journal of Gynaecological Oncology*. — 2008. — Vol. 29. — № 5. — P. 511-514.
- Sedlakova, I. Lysophosphatidic acid (LPA)-a perspective marker in ovarian cancer / I. Sedláková, J. Vávrová, J. Tošner, L. Hanousek // *Tumour Biology: the journal of the International Society of Oncodevelopmental Biology and Medicine*. — 2011. — Vol. 32. — № 2. — P. 311-316.
- Seemann, M.D. An evaluation of the tumour markers, carcinoembryonic antigen (CEA), cytokeratin marker (CYFRA 21-1) and neuron-specific enolase (NSE) in the differentiation of malignant from benign solitary pulmonary lesions / M.D. Seemann, T. Beinert, H. Fürst, U. Fink // *Lung Cancer*. — 1999. — Vol. 26. — P. 149–155.

- Seo, D. Genomic medicine: bringing biomarkers to clinical medicine / D. Seo, G.S. Ginsburg // *Current Opinion in Chemical Biology*. — 2005. — Vol. 9. — P. 381-386.
- Shah, S.H. Baseline metabolomic profiles predict cardiovascular events in patients at risk for coronary artery disease / S.H. Shah, J.L. Sun, R.D. Stevens, J.R. Bain, M.J. Muehlbauer, K.S. Pieper, C. Haynes, E.R. Hauser, W.E. Kraus, C.B. Granger, C.B. Newgard, R.M. Califf, L.K. Newby // *American Heart Journal*. — 2012. — Vol. 163. — № 5. — P. 844-850.
- Shan, L. Measurement of phospholipids may improve diagnostic accuracy in ovarian cancer / L. Shan, Y.A. Chen, L. Davis, G. Han, W. Zhu, A.D. Molina, H. Arango, J.P. LaPolla, M.S. Hoffman, T. Sellers, T. Kirby, S.V. Nicosia, R. Sutphen // *PLoS One*. — 2012. — Vol. 7. — № 10. — e46846.
- Shelgikar, K.M. Circulating lipids and cardiovascular risk in newly diagnosed non-insulin-dependent diabetic subjects in India / K.M. Shelgikar, S.S. Naik, M. Khopkar, D.S. Bhat, K.N. Raut, C.V. Joglekar, M.E. Gerard, C.S. Yajnik // *Diabetic Medicine (a journal of the British Diabetic Association)*. — 1997. — Vol. 14. — № 9. — P. 757-761.
- Sherubin, E.J. Estimation of plasma lipids and its significance on histopathological grades in oral cancer: Prognostic significance an original research / E.J. Sherubin, K.S. Kannan, D.N. Kumar, I. Joseph // *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology: JOMFP*. — 2013. — Vol. 17. — № 1. — P. 4-9.
- Shimada, T. Activation of amino-alpha-carboline, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and a copper phthalocyanine cellulose extract of cigarette smoke condensate by cytochrome P-450 enzymes in rat and human liver microsomes / T. Shimada, F.P. Guengerich // *Cancer Research*. — 1991. — Vol. 51. — P. 5284-5291.
- Shin, M.H. Evaluation of sampling and extraction methodologies for the global metabolic profiling of *Saccharophagus degradans* / M.H. Shin, Y. Lee do, K.H. Liu, O. Fiehn, K.H. Kim // *Analytical Chemistry*. — 2010. — Vol. 82. — № 15. — P. 6660-6666.

- Shui, G. Comparative plasma lipidome between human and cynomolgus monkey: are plasma polar lipids good biomarkers for diabetic monkeys? / G. Shui, J.W. Stebbins, B.D. Lam, W.F. Cheong, S.M. Lam, F. Gregoire, J. Kusonoki, M.R. Wenk // *PLoS One*. — 2011. — Vol. 6. — № 5. — e19731.
- Siddiqui, E.J. The role of serotonin (5-hydroxytryptamine1A and 1B) receptors in prostate cancer cell proliferation / E.J. Siddiqui, M. Shabbir, D.P. Mikhailidis, C.S. Thompson, F.H. Mumtaz // *Journal of Urology*. — 2006. — Vol. 176. — P. 1648-1653.
- Sipe, J.C. Overweight and obesity associated with a missense polymorphism in fatty acid amide hydrolase (FAAH) / J.C. Sipe, J. Waalen, A. Gerber, E. Beutler // *International Journal of Obesity*. — 2005. — Vol. 29. — P. 755–759.
- Smedsgaard, J. Using direct electrospray mass spectrometry in taxonomy and secondary metabolite profiling of crude fungal extracts / J. Smedsgaard, J.C. Frisvad // *Journal of Microbiological Methods*. — 1996. — Vol. 25. — P. 5–17.
- Smedsgaard, J. Terverticillate penicillia studied by direct electrospray mass spectrometric profiling of crude extracts. I. Chemosystematics / J. Smedsgaard, J.C. Frisvad // *Biochemical Systematics and Ecology*. — 1997. — Vol. 25. — P. 51–64.
- Smilde, A.K. ANOVA-simultaneous component analysis (ASCA): a new tool for analyzing designed metabolomics data / A.K. Smilde, J.J. Jansen, H.C. Hoefsloot, R.J. Lamers, J. van der Greef, M.E. Timmerman // *Bioinformatics*. — 2005. — Vol. 21. — № 13. — P. 3043-3048.
- Smith, C.A. METLIN: a metabolite mass spectral database / C.A. Smith, G. O'Maille, E.J. Want, C. Qin, S.A. Trauger, T.R. Brandon, D.E. Custodio, R. Abagyan, G. Siuzdak // *Therapeutic Drug Monitoring*. — 2005. — Vol. 27. — P. 747-751.
- Smith, C.D. 3alpha,5alpha-THP: a potential plasma neurosteroid biomarker in Alzheimer's disease and perhaps non-Alzheimer's dementia / C.D. Smith,

- D.R. Wekstein, W.R. Markesbery, C.A. Frye // *Psychopharmacology (Berl)*. — 2006. — Vol. 186. — № 3. — P. 481-485.
- Smith, R.D. An accurate mass tag strategy for quantitative and high-throughput proteome measurements / R.D. Smith, G.A. Anderson, M.S. Lipton, L. Pasatolic, Y. Shen, T.P. Conrads, T.D. Veenstra, H.R. Udseth // *Proteomics*. — 2002. — Vol. 2. — P. 513-523.
- Snyder, A.P. Characterization of underivatized lipid biomarkers from microorganisms with pyrolysis short-column gas chromatography/ion trap mass spectrometry / A.P. Snyder, W.H. McClennen, J.P. Dworzanski, H.L. Meuzelaar // *Analytical Chemistry*. — 1990. — Vol. 62. — P. 2565–2573.
- Søreide, K. Diagnostic accuracy and receiver-operating characteristics curve analysis in surgical research and decision making / K. Søreide, H. Kørner, J.A. Søreide // *Annals of Surgery*. — 2011. — Vol. 253. — № 1. — P. 27-34.
- Sreekumar, A. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression / A. Sreekumar, L.M. Poisson, T.M. Rajendiran, A.P. Khan, Q. Cao, J. Yu, B. Laxman, R. Mehra, R.J. Lonigro, Y. Li, M.K. Nyati, A. Ahsan, S. Kalyana-Sundaram, B. Han, X. Cao, J. Byun, G.S. Omenn, D. Ghosh, S. Pennathur, D.C. Alexander, A. Berger, J.R. Shuster, J.T. Wei, S. Varambally, C. Beecher, A.M. Chinnaiyan // *Nature*. — 2009. — Vol. 457. — P. 910-914.
- Stein, S.E. An integrated method for spectrum extraction and compound identification from GC/MS data / S.E. Stein // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. — 1999. — Vol. 10. — P. 770–781.
- Steuber, T. Circulating biomarkers for prostate cancer / T. Steuber, P. Helo, H. Lilja // *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. — 2008. — Vol. 11. — № 2. — P. 112-120.
- Stoll, N. Isotope pattern evaluation for the reduction of elemental compositions assigned to high-resolution mass spectral data from electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry / N. Stoll, E.

- Schmidt, K. Thurow // Journal of the American Society for Mass Spectrometry. — 2006. — Vol. 17. — P. 1692-1699.
- Stieber, P. Pro-gastrin-releasing peptide (ProGRP)--a useful marker in small cell lung carcinomas / P. Stieber, H. Dienemann, A. Schalthorn, U.M. Schmitt, J. Reinmiedl, K. Hofmann, K. Yamaguchi // Anticancer Research. — 1999. — Vol. 19. — № 4A. — P. 2673-2678.
- Strathmann, F.G. Current and future applications of mass spectrometry to the clinical laboratory // F.G. Strathmann, A.N. Hoofnagle // American Journal of Clinical Pathology. — 2011. — Vol. 136. — P. 609–616.
- Suhre, K. Metabolic footprint of diabetes: a multiplatform metabolomics study in an epidemiological setting / K. Suhre, C. Meisinger, A. Doring, E. Altmaier, P. Belcredi, C. Gieger, D. Chang, M.V. Milburn, W.E. Gall, K.M. Weinberger, H.-W. Mewes, M. Hrabe, de Angelis, H.-E. Wichmann, F. Kronenberg, J. Adamski, T. Illig // PLoS One. — 2010. — Vol. 5. — № 11. — e13953.
- Suhre, K. MassTRIX: Mass TRANslator Into Pathways / K. Suhre, P. Schmitt-Kopplin // Nucleic Acids Research. — 2008. — Vol. 36. — W481-W484.
- Sullentrop, F. <sup>31</sup>P NMR spectroscopy of blood plasma: determination and quantification of phospholipid classes in patients with renal cell carcinoma / F. Sullentrop, D. Moka, S. Neubauer, G. Haupt, U. Engelmann, J. Hahn, H. Schicha // NMR in Biomedicine. — 2002. — Vol. 15. — № 1. — P. 60-68.
- Sumner, L. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis / L.W. Sumner, A. Amberg, D. Barrett, M.H. Beale, R. Beger, C.A. Daykin, T.W.-M. Fan, O. Fiehn, R. Goodacre, J.L. Griffin, T. Hankemeier, N. Hardy, J. Harnly, R. Higashi, J. Kopka, A.N. Lane, J.C. Lindon, P. Marriott, A.W. Nicholls, M.D. Reily, J.J. Thaden, M.R. Viant // Metabolomics: Official journal of the Metabolomic Society. — 2007. — Vol. 3. — № 3. — P. 211-221.
- Sun, J. Serum metabolomic profiles from patients with acute kidney injury: A pilot study / J. Sun, M. Shannon, Y. Ando, L.K. Schnackenberg, N.A. Khan, D. Portilla, R.D. Beger // Journal Of Chromatography B: Analytical

- Technologies In The Biomedical And Life Sciences. — 2012. — Vol. 893-894. — P. 107-113.
- Sung, J. Molecular signatures from omics data: from chaos to consensus / J. Sung, Y. Wang, S. Chandrasekaran, D.M. Witten, N.D. Price // *Biotechnology Journal*. — 2012. — Vol. 7. — № 8. — P. 946-957.
- Syslova, K. Immunomagnetic molecular probe with UHPLC-MS/MS: a promising way for reliable bronchial asthma diagnostics based on quantification of cysteinyl leukotrienes / K. Syslová, A. Böhmová, E. Demirbağ, K. Šimková, M. Kuzma, D. Pelclová, V. Sedlák, P. Čáp, P. Martásek, P. Kačer // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. — 2013. — Vol. 81-82. — P. 108-117.
- Tabák, A.G. Prediabetes: a high-risk state for diabetes development / A.G. Tabák, C. Herder, W. Rathmann, E.J. Brunner, and M. Kivimäki // *Lancet*. — 2012. — Vol. 379. — P. 2279–2290.
- Tang, J. In vitro metabolism of carbaryl by human cytochrome P450 and its inhibition by chlorpyrifos / J.Tang, Y. Cao, R.L. Rose, E. Hodgson // *Chemico-Biological Interactions*. — 2002. — Vol. 141. — P. 229-241.
- Tavazzi, B. Simultaneous high performance liquid chromatographic separation of purines, pyrimidines, N-acetylated amino acids, and dicarboxylic acids for the chemical diagnosis of inborn errors of metabolism / B. Tavazzi, G. Lazzarino, P. Leone, A.M. Amorini, F. Bellia, C.G. Janson, V. Di Pietro, L. Ceccarelli, S. Donzelli, J.S. Francis, B. Giardina // *Clinical Biochemistry*. — 2005. — Vol. 38. — P. 997-1008.
- Taylor, B.S. Humoral response profiling reveals pathways to prostate cancer progression / B.S. Taylor, M. Pal, J. Yu, B. Laxman, S. Kalyana-Sundaram, R. Zhao, A. Menon, J.T. Wei, A.I. Nesvizhskii, D. Ghosh, G.S. Omenn, D.M. Lubman, A.M. Chinnaiyan, A. Sreekumar // *Molecular and Cellular Proteomics*. — 2008. — Vol. 7. — P. 600-611.

- Tchai, B.S. Changes of plasma lipids and biochemical markers for coronary artery disease in Korea / B.S. Tchai // *Annals of the New York Academy of Sciences*. — 1993. — Vol. 676. — P. 279-288.
- Thelestam, M. Effect of tobacco smoke compounds on the plasma membrane of cultured human lung fibroblasts / M. Thelestam, M. Curvall, C.R. Enzell // *Toxicology*. — 1980. — Vol. 15. — P. 203-217.
- Thomas, A. High-throughput phospholipidic fingerprinting by online desorption of dried spots and quadrupole-linear ion trap mass spectrometry: evaluation of atherosclerosis biomarkers in mouse plasma / A. Thomas, J. Déglon, S. Lenglet, F. Mach, P. Mangin, J.L. Wolfender, S. Steffens, C. Staub // *Analytical Chemistry*. — 2010. — Vol. 82. — № 15. — P. 6687-6694.
- Thomas, A. Mass spectrometry for the evaluation of cardiovascular diseases based on proteomics and lipidomics / A. Thomas, S. Lenglet, P. Chaurand, J. Déglon, P. Mangin, F. Mach, S. Steffens, J.L. Wolfender, C. Staub // *Thrombosis and Haemostasis*. — 2011. — Vol. 106. — № 1. — P. 20-33.
- Tobacco and cancer // *European Journal of Cancer Prevention*. — 1992. — Vol. 1. — P. 211-213.
- Tolstikov, V.V. Analysis of highly polar compounds of plant origin: combination of hydrophilic interaction chromatography and electrospray ion trap mass spectrometry / V.V. Tolstikov, O. Fiehn // *Analytical Biochemistry*. — 2002. — Vol. 301. — P. 298–307.
- Tolstikov, V.V. Monolithic silica-based capillary reversed-phase liquid chromatography/electrospray mass spectrometry for plant metabolomics / V.V. Tolstikov, A. Lommen, K. Nakanishi, N. Tanaka, O. Fiehn // *Analytical Chemistry*. — 2003. — Vol. 75. — P. 6737–6740.
- Tolstikov, V.V. Application of liquid chromatography-mass spectrometry analysis in metabolomics: reversed-phase monolithic capillary chromatography and hydrophilic chromatography coupled to electrospray ionization-mass spectrometry / V.V. Tolstikov, O. Fiehn, N. Tanaka // *Methods in Molecular Biology*. — 2007. — Vol. 358. — P. 141–155.

- Torkhovskaya, T.I. Lipidomics: new approaches to the studies of cell signaling and prospects of use in medicine / T.I. Torkhovskaya, E.M. Khalilov, A.A. Korotaeva // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. — 2007. — Vol. 144. — № 3. — P. 408-412.
- Trifonova, O.P. Metabolomic profiling of blood plasma / O.P. Trifonova, P.G. Lokhov, A.I. Archakov // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B*. — 2013. — Vol. 7. — № 3. — P. 179-186.
- Trifonova, O.P. Postgenomics diagnostics: metabolomics approaches to human blood profiling / O.P. Trifonova, P.G. Lokhov, A.I. Archakov // *OMICS: A Journal of Integrative Biology*. — 2013. — Vol. 17. — № 11. — P. 550-559.
- Tuomilehto, J. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance / J. Tuomilehto, J. Lindstrom, J.G. Eriksson, T.T. Valle, H. Hamalainen, P. Ilanne-Parikka, S. Keinanen-Kiukaanniemi, M. Laakso, A. Louheranta, M. Rastas, V. Salminen, M. Uusitupa // *The New England Journal of Medicine*. — 2001. — Vol. 344. — № 18. — P. 1343–1350.
- U.S. Department of Health and Human Services, FDA, CDER, CVM. 2001. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation.
- Vaidyanathan, S. Flow-injection electrospray ionization mass spectrometry of crude cell extracts for high-throughput bacterial identification / S. Vaidyanathan, D.B. Kell, R. Goodacre // *The Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. — 2002. — Vol. 13. — № 2. — P. 118-128.
- Van Vleet, T.R. Inhibition of human cytochrome P450 2E1 by nicotine, cotinine, and aqueous cigarette tar extract in vitro / T.R. Van Vleet, D.W. Bombick, R.A. Coulombe Jr. // *The Journal of Toxicological Sciences*. — 2001. — Vol. 64. — P. 185-191.
- Vigneau-Callahan, K.E. Characterization of diet-dependent metabolic serotypes: analytical and biological variability issues in rats / K.E. Vigneau-Callahan,

- A.I. Shestopalov, P.E. Milbury, W.R. Matson, B.S. Kristal // *Journal of Nutrition*. — 2001. — Vol. 131. — P. 924–932.
- Vinci, E. Serum carnitine levels in patients with tumoral cachexia / E. Vinci, E. Rampello, L. Zanolli, G. Oreste, G. Pistone, M. Malaguarnera // *European Journal of Internal Medicine*. — 2005. — Vol. 16. — P. 419-423.
- Vis, D.J. Statistical validation of megavariate effects in ASCA / D.J. Vis, J.A. Westerhuis, A.K. Smilde, J. van der Greef // *BMC Bioinformatics*. — 2007. — Vol. 8. — P. 322-329.
- Vouk, K. Discovery of phosphatidylcholines and sphingomyelins as biomarkers for ovarian endometriosis / K. Vouk, N. Hevir, M. Ribić-Pucelj, G. Haarpaintner, H. Scherb, J. Osredkar, G. Möller, C. Prehn, T.L. Rižner, J. Adamski // *Human Reproduction (Oxford, England)* . — 2012. — Vol. 27. — № 10. — P. 2955-2965.
- Wang, C. Structural identification of human blood phospholipids using liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry / C. Wang, S. Xie, J. Yang, Q. Yang, G. Xu // *Analytica Chimica Acta*. — 2004. — Vol. 525. — P. 1-10.
- Wang, C. Identification of phospholipid structures in human blood by direct-injection quadrupole-linear ion-trap mass spectrometry / C. Wang, J. Yang, P. Gao, X. Lu, G. Xu // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. — 2005. — Vol. 19. — № 17. — P. 2443-2453.
- Wang, T.J. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes / T.J. Wang, M.G. Larson, R.S. Vasan, S. Cheng, E.P. Rhee, E. McCabe, G.D. Lewis, C.S. Fox, P.F. Jacques, C. Fernandez, C.J. O'Donnell, S.A. Carr, V.K. Mootha, J.C. Florez, A. Souza, O. Melander, C.B. Clish, R.E. Gerszten // *Nature Medicine*. — 2011. — Vol. 17. — № 4. — P. 448–453.
- Wang, W. Quantification of proteins and metabolites by mass spectrometry without isotopic labeling or spiked standards / W. Wang, H. Zhou, H. Lin, S. Roy, T.A. Shaler, L.R. Hill, S. Norton, P. Kumar, M. Anderle, C.H. Becker // *Analytical Chemistry*. — 2003. — Vol. 75. — P. 4818-4826.

- Wang, X. Ultra-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry as a sensitive and powerful technology for metabolomic studies / X. Wang, H. Sun, A. Zhang, P. Wang, Y. Han // *Journal of Separation Science*. — 2011. — Vol. 34. — № 24. — P. 3451-3459.
- Wang, Y. Novel, fully automatic hydrophilic interaction/reversed-phase column-switching high-performance liquid chromatographic system for the complementary analysis of polar and apolar compounds in complex samples / Y. Wang, R. Lehmann, X. Lu, X. Zhao, G. Xu // *Journal of Chromatography A*. — 2008. — Vol. 1204. — № 1. — P. 28-34.
- Wang-Sattler, R. Novel biomarkers for pre-diabetes identified by metabolomics / R. Wang-Sattler, Y. Zhonghao, C. Herder, A.C. Messias, A. Floegel, Y. He, K. Heim, M. Campillos, C. Holzapfel, B. Thorand, H. Grallert, T. Xu, E. Bader, C. Huth, K. Mittelstrass, A. Döring, C. Meisinger, C. Gieger, C. Prehn, W. Roemisch-Margl, M. Carstensen, L. Xie, H. Yamanaka-Okumura, G. Xing, U. Ceglarek, J. Thiery, G. Giani, H. Lickert, X. Lin, Y. Li, H. Boeing, H.G. Joost, M.H. de Angelis, W. Rathmann, K. Suhre, H. Prokisch, A. Peters, T. Meitinger, M. Roden, H.E. Wichmann, T. Pischon, J. Adamski, T. Illig // *Molecular Systems Biology*. — 2012. — Vol. 8. — P. 615-625.
- Watkins, S.M. Lipid metabolome-wide effects of the PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone / S.M. Watkins, P.R. Reifsnnyder, H.J. Pan, J.B. German, E.H. Leiter // *Journal of Lipid Research*. — 2002. — Vol. 43. — P. 1809–1817.
- Watson, N.E. Classification of high-speed gas chromatography–mass spectrometry data by principal component analysis coupled with piecewise alignment and feature selection / N.E. Watson, M.M. Vanwingerden, K.M. Pierce, B.W. Wright, R.E. Synovec // *Journal of Chromatography A*. — 2006. — Vol. 1129. — P. 111–118.
- Weckwerth, W. Metabolomics in systems biology / W. Weckwerth // *Annual Review of Plant Biology*. — 2003. — Vol. 54. — P. 669–689.
- Welthagen, W. Comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry (GC x GC-TOF) for high resolution metabolomics:

- biomarker discovery on spleen tissue extracts of obese NZO compared to lean C57BL/6 mice / W. Welthagen, R.A. Shellie J. Spranger, M. Ristow, R. Zimmermann, O. Fiehn // *Metabolomics*. — 2005. — Vol. 1. — P. 65–73.
- Westergren, A. Eating difficulties, need for assisted eating, nutritional status and pressure ulcers in patients admitted for stroke rehabilitation / A. Westergren, S. Karlsson, P. Andersson, O. Ohlsson, I.R. Hallberg // *Journal of Clinical Nursing*. — 2001. — Vol. 10. — № 2. — P. 257-269.
- Who, World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO Consultation // *Diabetic Medicine. Journal of the British Diabetic Association*. — 1999. — Vol. 15.
- Williams, R.E. D-Serine-induced nephrotoxicity: a HPLC-TOF/MS-based metabolomics approach / R.E. Williams, H. Major, E.A. Lock, E.M. Lenz, I.D. Wilson // *Toxicology*. — 2005. — Vol. 207. — P. 179–190.
- Wilson, I.D. High resolution "ultra performance" liquid chromatography coupled to oa-TOF mass spectrometry as a tool for differential metabolic pathway profiling in functional genomic studies / I.D. Wilson, J.K. Nicholson, J. Castro-Perez, J.H. Granger, K.A. Johnson, B.W. Smith, R.S. Plumb // *Journal of Proteome Research*. — 2005a. — Vol. 4. — № 2. — P. 591-598.
- Wilson, I.D. HPLC-MS-based methods for the study of metabolomics / I.D. Wilson, R. Plumb, J. Granger, H. Major, R. Williams, E.M. Lenz // *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. — 2005b. — Vol. 817. — P. 67–76.
- Winder, C.L. Global metabolic profiling of Escherichia coli cultures: an evaluation of methods for quenching and extraction of intracellular metabolites / C.L. Winder, W.B. Dunn, S. Schuler, D. Broadhurst, R. Jarvis, G.M. Stephens, R. Goodacre // *Analytical Chemistry*. — 2008. — Vol. 80. — P. 2939-2948.
- Wishart, D.S. HMDB: the Human Metabolome Database / D.S. Wishart, D. Tzur, C. Knox, R. Eisner, A.C. Guo, N. Young, D. Cheng, K. Jewell, D. Arndt, S. Sawhney, C. Fung, L. Nikolai, M. Lewis, M.A. Coutouly, I. Forsythe, P. Tang, S. Shrivastava, K. Jeroncic, P. Stothard, G. Amegbey, D. Block, D.D.

- Hau, J. Wagner, J. Miniaci, M. Clements, M. Gebremedhin, N. Guo, Y. Zhang, G.E. Duggan, G.D. Macinnis, A.M. Weljie, R. Dowlatabadi, F. Bamforth, D. Clive, R. Greiner, L. Li, T. Marrie, B.D. Sykes, H.J. Vogel, L. Querengesser // *Nucleic Acids Research: Oxford Journals*. — 2007. — Vol. 35 (Database issue). — P. D521-D526.
- Wishart, D.S. HMDB: a knowledgebase for the human metabolome / D.S. Wishart, C. Knox, A.C. Guo, R. Eisner, N. Young, B. Gautam, D.D. Hau, N. Psychogios, E. Dong, S. Bouatra, R. Mandal, I. Sinelnikov, J. Xia, L. Jia, J.A. Cruz, E. Lim, C.A. Sobsey, S. Shrivastava, P. Huang, P. Liu, L. Fang, J. Peng, R. Fradette, D. Cheng, D. Tzur, M. Clements, A. Lewis, A. De Souza, A. Zuniga, M. Dawe, Y. Xiong, D. Clive, R. Greiner, A. Nazyrova, R. Shaykhutdinov, L. Li, H.J. Vogel, I. Forsythe // *Nucleic Acids Research: Oxford Journals*. — 2009. — Vol. 37 (Database issue). — P. D603-D610.
- Xu, W. [Plasma fatty acid metabolic profiles for traditional Chinese medicine syndrome differentiation in diabetic patients using uncorrelated linear discriminant analysis] / W. Xu, L. Zhang, Y. Huang, Q. Yang, H. Xiao, D. Zhang // *Se Pu = Chinese journal of chromatography (Zhongguo hua xue hui)*. — 2012. — Vol. 30. — № 9. — P. 864-869.
- Xu, W. Discrimination of type 2 diabetes mellitus corresponding to different traditional Chinese medicine syndromes based on plasma fatty acid profiles and chemometric methods / W. Xu, L. Zhang, Y. Huang, Q. Yang, H. Xiao, D. Zhang // *Journal of Ethnopharmacology*. — 2012. — Vol. 143. — № 2. — P. 463-468.
- Xu, X. Quantitative measurement of endogenous estrogens and estrogen metabolites in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry / X. Xu, J.M. Roman, H.J. Issaq, L.K. Keefer, T.D. Veenstra, R.G. Ziegler // *Analytical Chemistry*. — 2007. — Vol. 79. — № 20. — P. 7813-7821.
- Xue, R. A serum metabolomic investigation on hepatocellular carcinoma patients by chemical derivatization followed by gas chromatography/mass spectrometry / R. Xue, Z. Lin, C. Deng, L. Dong, T. Liu, J. Wang, X. Shen // *Rapid*

- Communications in Mass Spectrometry. — 2008. — Vol. 22. — № 19. — P. 3061-3068.
- Yano, M. The clinical potential of pretreatment serum testosterone level to improve the efficiency of prostate cancer screening / M. Yano, T. Imamoto, H. Suzuki, S. Fukasawa, S. Kojima, A. Komiya, Y. Naya, T. Ichikawa // *European Urology*. — 2007. — Vol. 51. — P. 375–380.
- Yao, F. Independent Principal Component Analysis for biologically meaningful dimension reduction of large biological data sets / F. Yao, J. Coquery, K.A. Lê Cao // *BMC Bioinformatics*. — 2012. — Vol. 13. — P. 24–38.
- Yu, L. Metabolomic phenotype of gastric cancer and precancerous stages based on gas chromatography time-of-flight mass spectrometry / L. Yu, J. Aa, J. Xu, M. Sun, S. Qian, L. Cheng, S. Yang, R. Shi // *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. — 2011. — Vol. 26. — №8. — P. 1290-1297.
- Zhang, Y. Serum unsaturated free Fatty acids: potential biomarkers for early detection and disease progression monitoring of non-small cell lung cancer / Y. Zhang, C. He, L. Qiu, Y. Wang, L. Zhang, X. Qin, Y. Liu, D. Zhang, Z. Li // *Journal of Cancer*. — 2014. — Vol. 5. — №8. — P. 706-714.
- Zhao, Z. Plasma lysophosphatidylcholine levels: potential biomarkers for colorectal cancer / Z. Zhao, Y. Xiao, P. Elson, H. Tan, S.J. Plummer, M. Berk, P.P. Aung, I.C. Lavery, J.P. Achkar, L. Li, G. Casey, Y. Xu // *Journal of Clinical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. — 2007. — Vol. 25. — №19. — P. 2696-2701.
- Zheng, Y.F. Urinary nucleosides as biological markers for patients with colorectal cancer / Y.F. Zheng, J. Yang, X.J. Zhao, B. Feng, H.W. Kong, Y.J. Chen, S. Lv, M.H. Zheng, G.W. Xu // *World Journal of Gastroenterology*. — 2005. — Vol. 11. — P. 3871-3876.
- Zhou, X. Identification of plasma lipid biomarkers for prostate cancer by lipidomics and bioinformatics / X. Zhou, J. Mao, J. Ai, Y. Deng, M.R. Roth, C. Pound, J. Henegar, R. Welti, S.A. Bigler // *PLoS One*. — 2012. — Vol. 7. — №11. — e48889.

Zuijdgeest-van Leeuwen, S.D. Fatty acid composition of plasma lipids in patients with pancreatic, lung and oesophageal cancer in comparison with healthy subjects / S.D. Zuijdgeest-van Leeuwen, M.S. van der Heijden, T. Rietveld, J.W. van den Berg, H.W. Tilanus, J.A. Burgers, J.H. Wilson, P.C. Dagnelie // *Clinical Nutrition* (Edinburgh, Scotland). — 2002. — Vol. 21. — №3. — P. 225-230.

## **БЛАГОДАРНОСТИ**

Автор выражает искреннюю благодарность научному консультанту академику Арчакову Александр Ивановичу, к.б.н. Балашовой Елене Евгеньевне и всем сотрудникам лаборатории Масс-спектрометрической метаболомной диагностики за помощь и поддержку при выполнении и написании диссертационной работы.

# ПРИЛОЖЕНИЕ

к диссертации

«Метаболома плазмы крови для диагностики и оценки риска возникновения рака простаты, рака легкого и сахарного диабета 2-го типа»

Содержание приложения:

1. Клинические характеристики пациентов экспериментальной и контрольной групп, задействованных в метаболомном исследовании СД 2-го типа. 229
2. Протокол получения образцов плазмы крови для масс-спектрометрического анализа метаболитов крови. 234
3. Протокол масс-спектрометрического анализа метаболитов плазмы крови. 255
4. Протокол обработки масс-спектров метаболитов плазмы крови. 268
5. Описание программного обеспечения. 280
6. Руководство пользователя программным обеспечением. 296
7. Код программы, реализующий алгоритм выравнивания масс-спектров метаболитов. 305

Клинические характеристики пациентов экспериментальной и контрольной групп, задействованных в метаболомном исследовании СД 2-го типа (Lokhov et al., 2014).

Номер образца	Название файла с масс-спектром *	Возраст (лет)	HbA1c (%)	ВМІ (кг/м <sup>2</sup> )	Общий холестерин (мол/л)	ЛПНП (ммол/л)	ЛПВП ( ммол/л)	Триглицериды (ммол/л)	Мочевая кислота (мкмол/л)	Уровень глюкозы натощак (ммол/л)	Инсулин (мкЕд/мл)	Уровень глюкозы в ПГТТ (ммол/л)	Пол (м/ж)	Диагноз
1	Sample 1.xml	66	6,3	26,91	6,7	4,7	1,2	1,7	359,5	5,5	5,5	10,5	М	НТГ
2	Sample 2.xml	69	5,4	32	5,03	3,41	1,54	1,23	351,8	5	6,1	8,2	Ж	НТГ
3	Sample 3.xml	46	6,6	34,72	6	3,4	1	3,4	317,4	5,8	25,8	11	М	НТГ
4	Sample 4.xml	66	5,6	36,16	4,3	2,1	1,3	2,1	581,7	5,4	25,1	10,3	М	НТГ
5	Sample 5.xml	55	6,2	33	6,8	4,3	1,9	0,9	291,2	5,2	4,9	9,8	Ж	НТГ
6	Sample 6.xml	74	6,2	27,7	3,6	1,7	1,5	0,8	369,8	5,5	9,1	8,9	М	НТГ

7	Sample 7.xml	73	5,7	27,95	5,3	3,2	1,4	1,5	345,3	5,9	13,6	9,2	Ж	HTГ
8	Sample 8.xml	85	6,3	23,15	3,5	2,1	1,04	0,9	283,9	6,1	11,2	8,2	М	HTГ
9	Sample 9.xml	56	6,2	24,5	3	1,9	0,67	0,9	381,3	5,4	5,8	9,8	М	HTГ
10	Sample 10.xml	71	6,3	24,39	4,1	2,6	1,18	0,8	318	5,5	7,2	10,2	Ж	HTГ
11	Sample 11.xml	55	6,4	57,01	4,5	3,1	0,8	1,3	473	5,02	21,56	8,9	М	HTГ
12	Sample 12.xml	67	6,1	25,8	6,2	4	0,9	2,9	400	6,1	20,5	11	Ж	HTГ
13	Sample 13.xml	38	6,4	35,89	6,7	1,6	0,55	3,9	477,8	5,8	12,4	9,2	М	HTГ
14	Sample 14.xml	60	5,6	36,8	4	2,4	0,73	1,9	452,8	5,8	22,2	10,9	Ж	HTГ
15	Sample 15.xml	81	6	38,9	4,5	2,8	1,36	0,8	265,6	5,6	5,8	11	Ж	HTГ
16	Sample 16.xml	53	6,6	42,18	6	4,3	1,14	1,3	297,9	5,5	15,6	9,8	Ж	HTГ
17	Sample 17.xml	45	6,2	50,17	6,13	4,48	0,85	1,78	402	6,1	31,7	8,4	Ж	HTГ
18	Sample 18.xml	66	6,5	31,15	3,8	2,1	0,77	2,1	463	5,2	14,3	11	М	HTГ
19	Sample 19.xml	54	6,5	41,3	4,88	3,35	0,96	1,26	478,1	5,39	19,2	9,8	Ж	HTГ

20	Sample 20.xml	55	5,7	28,4	6	4,3	0,6	2,4	421,2	6	13,5	9	М	НТГ
21	Sample 21.xml	61	5,5	30,61	4,4	2,8	1,4	0,5	282,8	5,9	8,1	5,1	М	норма
22	Sample 22.xml	48	5,4	35,51	4,6	2,7	0,8	1,5	456	5,1	3,7	6,4	М	норма
23	Sample 23.xml	34	5,5	27,45	4,04	2,22	1,49	0,72	346,4	5,8	7,5	7,4	М	норма
24	Sample 24.xml	56	6,1	24,97	3,9	1,7	1,9	0,7	270,1	5,6	3,3	5,5	Ж	норма
25	Sample 25.xml	63	6,4	25,31	5,3	3,1	0,9	2,7	339,7	5	13,2	6,5	М	норма
26	Sample 26.xml	43	5,7	46,54	5,4	3,6	1,4	1	317,4	4,8	4,8	7,2	Ж	норма
27	Sample 27.xml	56	5,1	49,32	4,7	3,3	0,74	1,7	514,3	5,4	21	7,8	М	норма
28	Sample 28.xml	82	6,3	34,18	5,2	3,4	1,16	1,4	291,4	5,6	20,1	7,8	Ж	норма
29	Sample 29.xml	42	6,3	48,1	6,6	5,3	0,73	1,4	455	5,6	17,1	6,8	М	норма
30	Sample 30.xml	33	5,4	38,06	5,9	4,1	1,21	1,4	309	5,8	17,3	5,2	Ж	норма
31	Sample 31.xml	75	6	33,91	4,5	3	0,84	1,5	446,4	5,4	12,9	6,8	Ж	норма
32	Sample 32.xml	43	5,5	53,2	4,7	2,7	1,23	1,6	425,5	5,1	20,2	7,1	Ж	норма

33	Sample 33.xml	37	6	30,1	4,8	3	1,27	1,1	309	6,1	7,8	6,5	Ж	норма
34	Sample 34.xml	60	6,1	41,6	4,7	3,03	0,85	1,28	379	5,8	18,5	6,5	М	норма
35	Sample 35.xml	65	6	37,46	5,8	4,1	0,98	1,6	491	5,5	15,5	5,4	Ж	норма
36	Sample 36.xml	36	5,8	45,5	5,06	3,56	0,69	1,8	459,2	5,3	29,9	5,8	М	норма
37	Sample 37.xml	32	5,1	41,55	4,4	3	0,91	1,1	375,4	5,4	100,8	6,8	М	норма
38	Sample 38.xml	62	5,8	34,8	5,9	4	1,4	1,2	498,6	5,5	15,2	6,1	Ж	норма
39	Sample 39.xml	35	5,5	40	5,6	3,8	1	1,7	443,8	5,7	62,5	7,7	Ж	норма
40	Sample 40.xml	50	6	41,43	6,4	4,2	0,8	3	439,2	6,1	15	7,3	М	Норма
41	Sample 41.xml	53	5,8	35	5,2	3,4	1,2	1,3	374	6,4	16,1	6,4	Ж	Норма
42	Sample 42.xml	43	5,9	25,94	5,2	3,4	1,4	0,9	223,3	5,7	7,2	5,7	Ж	норма
43	Sample 43.xml	39	5,3	25,55	5,9	3,8	1,8	0,6	261	5,1	4,2	5,8	Ж	норма
44	Sample 44.xml	55	5,7	26,36	5,9	4,3	1,3	0,7	329,8	5,2	3,6	5,9	Ж	норма
45	Sample 45.xml	70	6,3	29,74	5,7	4	1	1,5	353	5,7	7,2	7,3	М	норма

46	Sample 46.xml	58	5,8	31,6	6,2	4,2	1,6	0,9	235,7	5	4,3	7,5	Ж	норма
47	Sample 47.xml	66	5,6	38,72	3,9	3,41	1,13	1,3	459,8	5,6	11,4	4,8	М	норма
48	Sample 48.xml	59	5,8	26,89	5,92	3,88	1,69	0,6	422	5,4	4,5	4,1	М	норма
49	Sample 49.xml	67	5,9	26,02	4,1	2,4	1,1	1,4	376,5	5,5	5,7	7,7	М	норма
50	Sample 50.xml	75	5,3	24,55	6,3	3,9	1,9	1,2	345,7	5,6	3,4	5,7	М	норма

\* - файлы масс-спектров доступны по URL:

<http://journals.plos.org/plosone/article/asset?unique&id=info:doi/10.1371/journal.pone.0105343.s002>

# **ПРОТОКОЛ**

**ПОЛУЧЕНИЯ ОБРАЗЦОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ДЛЯ МАСС-  
СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА МЕТАБОЛИТОВ КРОВИ**

протокол составлен к.б.н. Лоховым П. Г.

Москва

### Сведения о протоколе

Протокол разработан в рамках реализации Государственного контракта "*Разработка методов профилирования плазмы крови и анализа транскриптов 18-й хромосомы в клетках линии HEPG2*" и предназначен для получения образцов крови для масс-спектрометрического анализа метаболитов плазмы крови в медицинских целях.

## Содержание

1. Область применения
2. Нормативные ссылки
3. Термины и определения
4. Система менеджмента качества
5. Рабочие инструкции (стандартные операционные процедуры)
  - 5.1 Прием, регистрация и медицинское обследование пациента
  - 5.2 Венепункция, забор крови и получение плазмы крови
  - 5.3 Оказание медицинской помощи пациенту в случае реакции и осложнений
  - 5.4 Маркировка (этикетирование) образцов плазмы крови
  - 5.5 Хранение образцов плазмы крови
  - 5.6 Выдача и транспортирование образцов плазмы крови
6. Оборудование
  - 6.1 Кресло для пациентов
  - 6.2 Центрифуга
  - 6.3 Холодильное и морозильное оборудование
  - 6.4 Мобильное холодильное оборудование для транспортирования плазмы крови
  - 6.5 Маркировочное оборудование
7. Удаление отходов

## **1 Область применения**

Настоящий протокол устанавливает требования к обеспечению качества при получении, хранении и транспортировке образцов плазмы крови для масс-спектрометрического анализа метаболитов плазмы крови в медицинских целях.

Настоящий протокол предназначен для применения медицинскими организациями и учреждениями федеральных, территориальных и муниципальных органов управления здравоохранением, систем обязательного и добровольного медицинского страхования, другими медицинскими организациями различных организационно-правовых форм деятельности, направленной на оказание медицинской помощи.

## **2 Нормативные ссылки**

В настоящем стандарте использованы требования следующих стандартов:

ГОСТ 15.201—2000 Система разработки и постановки продукции на производство. Продукция производственно-технического назначения. Порядок разработки и постановки продукции на производство.

ГОСТ Р ИСО 9000—2008 Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь.

ГОСТ Р 52938—2008 Компоненты крови. Контейнеры с консервированной кровью или ее компонентами. Маркировка.

ГОСТ 17768-90 Средства лекарственные. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение.

## **3 Термины и определения**

В настоящем протоколе применены термины по ГОСТ Р ИСО 9000, а также следующие термины с соответствующими определениями:

**3.1 Гемотрансмиссивные инфекции:** Инфекции, связанные с заражением через кровь и ее продукты.

**3.2 Документ:** Информация, представленная на соответствующем носителе.

**3.3 Идентификационный номер пробы:** Уникальный номер, присваиваемый каждой пробе для ее маркировки.

**3.4 Запись:** Документ, содержащий достигнутые результаты или свидетельства осуществленной деятельности.

**3.5 Качество:** Степень соответствия совокупности присущих характеристик установленным требованиям.

**3.6 Контейнер:** пластиковая емкость для сбора крови и/или ее компонентов, разрешенная к применению в установленном порядке в учреждениях медицинского назначения.

**3.7 Контроль:** Процедура оценивания соответствия путем наблюдения и суждений, сопровождаемых соответствующими измерениями, испытаниями или калибровкой.

**3.8 Критические контрольные точки:** Шаги, этапы процесса, процедуры, которые, если их не контролировать, могут привести к низкому качеству результатов.

**3.9 Менеджмент:** Скоординированная деятельность по руководству и управлению организацией.

**3.10 Менеджмент качества:** Скоординированная деятельность по руководству и управлению организацией применительно к качеству.

**3.11 Несоответствие:** Невыполнение требования.

**3.12 Обеспечение качества:** Часть менеджмента качества, направленная на создание уверенности, что требования к качеству будут выполнены.

**3.13 Операционные процедуры:** Документально оформленные инструкции по выполнению рабочих процедур.

**3.14 Политика в области качества:** Общие намерения и направление деятельности организации в области качества, официально сформулированные высшим руководством.

**3.15 Проверка:** Систематический, независимый и документированный процесс получения свидетельств аудита (проверки) и объективного их оценивания для установления степени выполнения согласованных критериев аудита (проверки).

**3.16 Производственная среда:** Совокупность условий, в которых выполняется работа.

**3.17 Протокол:** Данный документ, описывающий получение образцов крови для масс-спектрометрического анализа метаболитов плазмы крови.

**3.18 Процедура:** Установленный способ осуществления деятельности или процесса.

**3.19 Процесс:** Совокупность взаимосвязанных и взаимодействующих видов деятельности, преобразующая входы в выходы.

**3.20 Руководство:** Лицо или группа работников, осуществляющих руководство и управление организацией на высшем уровне.

**3.21 Руководство по качеству:** Документ, определяющий систему менеджмента качества организации.

**3.22 Система:** Совокупность взаимосвязанных и взаимодействующих элементов.

**3.23 Система менеджмента качества:** Система менеджмента для руководства и управления организацией применительно к качеству.

#### **4 Система менеджмента качества**

Руководство организации (директор/главный врач) несет ответственность за качество образцов плазмы крови, получаемых в соответствии с протоколом.

Директор (главный врач) организации несет основную ответственность за безопасность заготовки образцов плазмы крови.

Руководство организует систему менеджмента качества, охватывающую все аспекты реализации протокола от получения образцов крови, заготовки плазмы крови, хранения и транспортировки плазмы крови до их использования.

Директор (главный врач) предоставляет необходимые ресурсы для достижения требуемого качества и безопасности выпускаемой продукции (образцов плазмы крови).

Директор (главный врач) для достижения качества и требований безопасности образцов крови может распределять ответственность и полномочия по качеству.

Директор (главный врач) назначает представителя по качеству (заместителя или сотрудника любого подразделения), который несет ответственность за систему менеджмента качества, отчетность и координацию работ в рамках системы.

## **5 Рабочие инструкции (стандартные операционные процедуры)**

Все производственные процедуры осуществляются в соответствии со следующими рабочими инструкциями:

- прием, регистрация и медицинское обследование пациента;
- венепункция, забор крови и получение плазмы крови;
- оказание медицинской помощи пациенту в случае реакции и осложнений;
- маркировка (этикетирование) образцов плазмы крови;
- хранение образцов плазмы крови;
- выдача и транспортирование образцов плазмы крови.

## **5.1 Прием, регистрация и медицинское обследование пациента**

На этой стадии врач лечебно-профилактического учреждения системы здравоохранения РФ, а так же других ведомств и организаций, осуществляющих медицинскую деятельность в установленном порядке, принимает пациента, заполняет регистрационную карту пациента (присваивает уникальный код карте, вносит в нее фамилию, имя, отчество, пол, дату рождения, адрес проживания и контактные телефоны пациента, вносит дополнительные заметки о пациенте и указывает дату создания регистрационной карты).

Врач устанавливает наличие показаний и противопоказаний к забору крови у пациента. При наличии относительных противопоказаний забор крови может быть перенесен до их устранения.

### **АБСОЛЮТНЫЕ ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ**

Противопоказаний нет

### **ОТНОСИТЕЛЬНЫЕ ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ**

1. Тяжёлая сопутствующая патология.
2. Кожные инфекционные заболевания в стадии обострения.
3. Острые воспалительные процессы.
4. Патология свёртывающей системы крови.
5. Беременность.

При отсутствии противопоказаний врач выдает направление на проведение пациенту следующих анализов и диагностических исследований:

- 1) Кровь на ВИЧ (ВИЧ-1, ВИЧ-2).
- 2) Реакция Вассермана.
- 3) Австралийский антиген.
- 4) Антитела к вирусу гепатита С (НСV).
- 5) Анализ крови общий.
- 6) Биохимический анализ крови (общий белок, билирубин, мочеви́на, глюкоза крови, АЛТ, АСТ, гематокрит).
- 7) Коагулограмма (время свертывания крови, протромбиновый индекс).
- 8) Ro органов грудной клетки.

При предъявлении пациентом готовых результатов анализов и инструментальных методов исследования, врач проверяет их комплектность. Срок, прошедший с момента получения результатов анализов №№ 1-7, не должен превышать 1 месяц, для ЭКГ — 3-х месяцев и для Ro органов грудной клетки — 6-ти месяцев. В случае отсутствия результатов тех или иных анализов, врач делает временный отвод от забора крови до получения полного комплекта результатов анализов. Анализы и диагностические исследования выполняют организации, имеющие на то право, в соответствии с установленным порядком.

Положительные результаты по анализам №№ 1-4, являются основанием для отвода от забора крови.

Общий анализ крови и биохимический анализ крови должны быть в норме или выявленные отклонения должны соответствовать диагнозам пациента, не являющимся противопоказанием для забора крови.

Отклонения от нормы в коагулограмме является основанием для отвода от забора крови до устранения причины, вызвавшей отклонения. После проведения лечения необходимо повторное получение коагулограммы.

Выявление отклонений при Ro органов грудной клетки является основанием для отвода от забора крови до установления причины выявленных отклонений.

На основании просмотра результатов анализов врач дает отвод или разрешает забор крови, заполняет и вручает пациенту направление на забор крови, согласно формуляру:

учреждение _____	код фирмы по ОКУД _____
	код учреждения по ОКПО _____
<b>НАПРАВЛЕНИЕ № _____</b>	
на забор венозной крови	
для масс-спектрометрического анализа метаболитов крови	
" _____ " _____ " 201__ " г.	
Отделение _____	Номер карты больного _____
Ф.И.О. больного _____	Пол _____, Возраст _____
Дата забора крови _____	
Клинические данные _____	
Клинический диагноз _____	
Общий анализ крови от _____.201_ г. _____	
Биохимический анализ крови от _____.201_ г.: _____	
Коагулограмма от _____.201_ г.: _____	
ВИЧ от _____.201_ г. отр полож	
RW от _____.201_ г. отр полож	
HCV от _____.201_ г. отр полож	
HBsAg от _____.201_ г. отр полож	
Ro органов грудной клетки: _____	
ЭКГ: _____	
Собранную кровь направить в _____	
по адресу _____	
контактный тел. _____	
Фамилия врача _____	Подпись _____
Срок действия направления 1 месяц	

Срок действия направления 1 месяц.

## 5.2 Венепункция, забор крови и получение плазмы крови

До начала венепункции провести проверку материалов и оборудования. Контейнеры (тип контейнера, срок годности, отсутствие загрязнения и повреждения) и растворы, используемые для сбора крови, выделения плазмы крови и ее хранения, должны быть проверены на пригодность к работе. До венепункции следует проверить: карту пациента, блок технологических этикеток, провести идентификацию донора. На контейнерах для крови, на контейнерах для образцов плазмы крови и карточке донора должны быть наклеены идентично пронумерованные технологические этикетки.

Кровь собирается в стерильные закрытые системы с антикоагулянтом К<sub>2</sub>ЭДТА.

Дезинфицирующий агент и место венепункции должны быть выбраны и подготовлены так, чтобы уменьшить риск бактериальной и вирусной контаминации.

### Общие положения венепункции:

Венепункцию кубитальной вены проводят в стационарных условиях, в процедурной или небоксированной операционной лечебно-профилактических учреждений системы здравоохранения РФ, а так же других ведомств и организаций, имеющих право на проведение оперативного пособия 1-ой категории сложности. Дополнительных разрешений для проведения венепункции не требуется.

Венепункция проводится медсестрой, имеющей опыт в проведении данной манипуляции.

Забор крови должен осуществляться утром, до приема пищи.

Кровь собирают в объеме не менее 2 мл в специализированный контейнер с антикоагулянтом К<sub>2</sub>ЭДТА. Крышка контейнера должна обеспечивать стерильность содержимого контейнера.

Полученную кровь, не позднее 15 мин после забора, центрифугируют при комнатной температуре в течение 15 мин при 3000 об/мин (1600 g).

Кровь, собранная с нарушением установленных требований (более одного прокола вены, неполная доза крови и т.п.), не должна использоваться в дальнейшем и подлежит утилизации.

Полученную плазму крови переносят в специализированный пластиковый контейнер. Медсестра плотно закрывает контейнер с образцом плазмы крови, сверяет фамилию, имя, отчество пациента по регистрационной карте и маркирует контейнер.

### **5.3 Оказание медицинской помощи пациенту в случае реакции и осложнений**

Возможные осложнения при реализации протокола состоят из (1) осложнений возникших во время забора крови и (2) осложнений возникших после забора крови.

#### 5.3.1 Обморок пациента

Причиной обморока может являться напряженное ожидание пациентом пункции вены с увеличением артериального давления и пульса, после которого наступает резкое снижение пульса и артериального давления. Так же причиной обморока может являться реакция на укол иглой и наблюдение мнительным пациентом за манипуляциями врача при заборе крови.

Чтобы предотвратить обморок:

- необходимо постоянно контактировать с пациентом, участвовать в разговоре, отвлекая внимание;
- при предобморочном состоянии предложить пациенту лечь или присев склонить голову между коленями и обхватить колени руками;

- избегать ожидания пациентом забора крови в операционной без присмотра врача или операционной медсестры;
- рекомендовать пациенту не наблюдать за проведением медицинских манипуляций.

В случае обморока пациента кладут на спину, приподнимают ноги в течение 5-10 минут, обеспечивают свободное дыхание свежим воздухом. Необходимо следить за наличием жизненных функций для готовности продолжить оказание помощи или провести простейшую реанимацию, если данный случай окажется более сложным, чем простой обморок. При обмороке не травмировать пациента вдыханием аммиака, ударами по щекам, или окутанием в холодную воду.

### 5.3.2 Кровотечение в месте забора крови

Кровотечение в месте забора крови является результатом повреждения кровеносного сосуда. Для остановки кровотечения необходимо плотно прижать тампон с перекисью водорода к месту кровотечения.

### 5.3.3 Воспаление (нагноение) в месте укола иглой

Воспаление (нагноение) - результат плохой дезинфекции в месте укола, где наблюдается покраснение и уплотнение кожи с последующим набуханием гнойника. Пациента необходимо немедленно показать врачу терапевту или хирургу.

## **5.4 Маркировка (этикирование) образцов плазмы крови**

Маркировку образцов плазмы осуществляет специально назначенный сотрудник, который контролирует соответствие образца плазмы данным этикетки, выписывает этикетку и наклеивает ее на пластиковый контейнер с образцом плазмы крови.

Для маркировки образцов применяют технологическую (промежуточную) маркировку.

Технологическая маркировка должна обеспечивать однозначную визуальную идентификацию каждого образца плазмы крови и должна содержать уникальный номер пациента.

Маркировку осуществляют с помощью этикеток, наклеиваемых поверх этикетки изготовителя полимерных контейнеров, при этом информация об изготовителе, номере серии и сроке годности контейнера не должна быть заклеена.

Размер технологической этикетки должен быть не более 20 x 30 мм.

Этикетки должны быть черно-белые. Не допускается использование цветных технологических этикеток.

Технологическую маркировку наносят на этикетку контейнера с образцом до его заполнения.

Требования к маркировке образца плазмы крови соответствуют установленным в нормативных документах организации здравоохранения (структурного подразделения), осуществляющей заготовку, переработку, хранение и обеспечение безопасности крови и ее компонентов с учетом требований настоящего протокола.

#### ИНФОРМАЦИЯ, ПРИВОДИМАЯ НА ЭТИКЕТКЕ

Наименование поля этикетки	Форма представления	Необходимость приведения информации
1. Наименование организации, изготовившей образец плазмы крови	Текст	Обязательно

2. Уникальный номер пациента	Число	Обязательно
3. Идентификационный штриховой код	Штриховой код	Обязательно в случае применения средств автоматической идентификации
4. Дата забора крови	Дата	Обязательно
5. Дата окончания срока хранения	Дата	Обязательно
6. Наименование антикоагулянта	Текст	Обязательно
7. Объем плазмы крови	Текст	Обязательно
8. Температура хранения	Текст	Обязательно
9. Фамилия, имя, отчество больного, наименование медицинской организации и отделения	Текст	Обязательно для компонентов, приготовленных или подобранных для конкретного больного
10. Краткая инструкция по применению образца	Текст	Обязательно
11. Информационный штриховой код	Двухмерный штриховой код	Необязательно
12. Информация о возможном содержании гемотрансмиссивных инфекций	Текст	Обязательно

Информация на этикетку должна быть нанесена черным цветом на белом фоне. Информация, на которую должно быть обращено особое внимание (Ф.И.О. больного), должна быть нанесена путем инверсии (белые буквы и цифры на черном фоне). Наиболее важные характеристики (количество и дата окончания срока хранения) должны быть нанесены более крупным шрифтом, чем остальные надписи.

Размещение полей на этикетке, а также нанесение разделительных линий должно соответствовать приведенному ниже рисунку.

#### РАЗМЕЩЕНИЕ ПОЛЕЙ НА ЭТИКЕТКЕ

<p>402312 Идентификационный штриховой код</p> <p>Произведен 22.09.11 в ГУ ХХХ РАМН</p>	<p>Код донора: 1903</p>
<p>Плазма свежезамороженная</p> <p>Объем 1 мл</p> <p>Антикоагулянт ЭДТА Хранить при <math>t -80^{\circ}\text{C}</math> Годен до 22.09.31</p>	<p>Краткая инструкция по применению</p> <p>Дата забора 22.09.11</p> <p>больной Иванов А.С.</p>
<p>Может передать инфекционные агенты</p>	<div data-bbox="938 1469 1155 1570" style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> <p>Двумерный код</p> </div> <p>ГОСТ Р хххх./хх</p>

### 5.5 Хранение образцов плазмы крови

Пробирки с образцами плазмы крови хранят в специально отведенной морозильной камере в вертикальном положении при температуре  $-80\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Разрешается временно, до 3 мес, хранить образцы в морозильной камере при температуре  $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ , соблюдая соответствующие гигиенические условия хранения. Температурный режим хранения образцов один раз в неделю фиксируют в специальном журнале.

Предельный срок хранения образцов 20 лет.

Пробирки в процессе хранения подвергают визуальному контролю не реже, чем один раз в месяц.

Данные об образце крови от каждого пациента заносят в специальный журнал, пронумерованный, прошнурованный, скрепленный печатью и заверенный руководителем учреждения. В регистрационной записи указывают организацию и Ф.И.О. врача, выдавшего направление на забор крови, организацию и Ф.И.О. медсестры проводившей забор крови и получение плазмы крови, номер направления на забор крови, дату и время поступления образца плазмы крови. Направление прилагают и хранят вместе с журналом.

Журнал учета образцов хранят в лаборатории в течение всего времени хранения образцов плазмы и 3 года после их выдачи.

## **5.6 Выдача и транспортировка образцов плазмы крови**

Перед выдачей образцов плазмы крови ответственный сотрудник лаборатории подвергает пробирки с образцами макрооценке, а также проводит строгий контроль на соответствие данных этикетки (ф.и.о., номер регистрационной карты пациента) выдаваемых пробирок с данными образцов, предназначенных для выдачи, проверяет срок хранения пробирок.

Выдаваемые пробирки с образцами плазмы крови регистрирует заведующий лабораторией в специальном журнале, пронумерованном, прошнурованном, скрепленном печатью и заверенном руководителем учреждения.

Выдача пробирок с образцами плазмы разрешается только медицинскому персоналу лечебно-профилактических учреждений системы

здравоохранения РФ и другим организациям, имеющим утвержденное должным образом право на их применение. Транспортировка образцов осуществляется в специализированных транспортных контейнерах в замороженном состоянии и с соблюдением санитарно-гигиенических требований и ГОСТ 17768-90.

## **6. Оборудование**

К оборудованию, связанному с критическими точками, предъявляются специальные требования. К данному типу оборудования относятся:

- кресла для пациентов;
- центрифуги;
- холодильное и морозильное оборудование, в том числе быстрозамораживатели плазмы;
- мобильное холодильное оборудование для транспортирования образцов плазмы крови;
- оборудование для стерилизации материалов;
- компьютерное, штрихкодированное, периферийное и маркировочное оборудование.

### **6.1 Кресла для пациентов**

Кресла должны обеспечивать комфортные условия для пациентов и в экстренных ситуациях легко изменять положение, обеспечивая переход тела донора в положение Тренделенбурга.

### **6.2 Центрифуга**

Центрифуга должна быть зарегистрирована в реестре оборудования медицинского назначения, разрешенного к применению на территории Российской Федерации.

Центрифуга должны обеспечивать:

- набор режимов центрифугирования, установленный требованиями операционной процедуры данного документа;
- безопасность (отключение при разбалансировке; максимальный дисбаланс грузов, при котором не происходит разбалансировки; минимальная вибрация).

### **6.3 Холодильное и морозильное оборудование**

Холодильное и морозильное оборудование должно быть зарегистрировано в реестре оборудования медицинского назначения, разрешенного к применению на территории Российской Федерации.

На всем холодильном и морозильном оборудовании должна быть установлена система сигнализации, извещающая о недопустимом изменении температуры, неисправности или аварийном отключении.

Морозильное и холодильное оборудование должно обеспечивать:

- установленную температуру замораживания плазмы крови;
- скорость замораживания плазмы, обеспечивающую достижение температуры минус 80°C в сердцевине контейнера объемом 2 мл за 30 мин;
- защиту от несанкционированного доступа;
- компьютерный интерфейс.

### **6.4 Мобильное холодильное оборудование для транспортирования плазмы крови**

Специализированное мобильное холодильное оборудование для транспортирования плазмы крови должно обеспечивать:

- поддержание стабильной температуры внутри контейнеров в течение всего периода транспортирования;
- мониторинг температуры внутри контейнера;
- защиту от несанкционированного доступа;
- удобство складирования нескольких контейнеров при транспортировании;
- прочность и жесткость конструкции для предотвращения физического повреждения термоконтейнера, в том числе от вибрации и удара;
- наличие терморегистратора внутри контейнера;
- соответствие требованиям биобезопасности перевозимых продуктов.

## **6.5 Маркировочное оборудование**

Маркировочное оборудование должно обеспечивать:

- печать этикеток высокой стойкости;
- сохранность маркировки в условиях переработки компонента крови (центрифугирование, замораживание до температуры минус 80°C, высокая влажность, спиртосодержащие и иные растворы).
- термотрансферный режим (предпочтителен) печати этикеток на клеевой основе, соответствующей санитарно-гигиеническим требованиям.

## **7. Удаление отходов**

Использованные иглы, а также отработанные ватно-марлевые тампоны погружают в эмалированные или полиэтиленовые баки (тазы) с крышкой с 3%

раствором хлорамина Б на один час. После дезинфицирующей обработки отходы утилизируют в соответствии с санитарными правилами и нормами СанПиН 2.1.7.728-99 "Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений".

Использованный одноразовый инструментарий после дезинфекции закладывают в биксы, дно которых выложено бумагой для предупреждения их склеивания. Утилизацию проводят в паровом стерилизаторе (автоклаве) при температуре 132°C в течение 60 мин. Дальнейшую утилизацию проводят совместно с бытовым мусором.

## **ПРОТОКОЛ**

### **МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА МЕТАБОЛИТОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ**

протокол составлен к.б.н. Лоховым П.Г.

Москва

### Сведения о протоколе

Протокол разработан в рамках Государственного контракта *"Разработка методов профилирования плазмы крови и анализа транскриптов 18-й хромосомы в клетках линии HEPG2"* и предназначен для масс-спектрометрического анализа метаболитов плазмы крови в медицинских целях.

## Содержание

1. Область применения
2. Нормативные ссылки
3. Термины и определения
4. Система менеджмента качества
5. Требования к персоналу
6. Рабочие инструкции (стандартные операционные процедуры)
  - 6.1 Прием и регистрация образцов плазмы крови
  - 6.2 Удаление белковой фракции плазмы крови
    - 6.2.1 Материально-техническое обеспечение операционной процедуры
      - 6.2.1.1 Расходные материалы
      - 6.2.1.2 Инструментарий
      - 6.2.1.3 Оборудование
    - 6.2.2 Описание операционной процедуры
  - 6.3 Масс-спектрометрический анализ метаболитов плазмы крови
    - 6.3.1 Материально-техническое обеспечение операционной процедуры
      - 6.3.1.1 Расходные материалы
      - 6.3.1.2 Инструментарий
      - 6.3.1.3 Оборудование и программное обеспечение
    - 6.3.2 Описание операционной процедуры
    - 6.3.3 Контроль качества
7. Удаление отходов

## **1 Область применения**

Настоящий протокол устанавливает требования к обеспечению качества при получении масс-спектров метаболитов плазмы крови для диагностических целей в медицине.

Протокол предназначен для применения лабораториями медицинских организаций и учреждениями федеральных, территориальных и муниципальных органов управления здравоохранением, систем обязательного и добровольного медицинского страхования, другими медицинскими организациями различных организационно-правовых форм деятельности, направленной на оказание медицинской помощи и имеющих аккредитацию в установленном порядке.

## **2 Нормативные ссылки**

В настоящем стандарте использованы требования следующих стандартов:

ГОСТ 15.201—2000 Система разработки и постановки продукции на производство. Продукция производственно-технического назначения. Порядок разработки и постановки продукции на производство.

ГОСТ Р ИСО 9000—2008 Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь.

А так же ГОСТ 25336-82, ГОСТ 29227, ГОСТ 26678 и СанПиН 2.1.7.728-99.

## **3 Термины и определения**

В настоящем протоколе применены термины по ГОСТ Р ИСО 9000, а также следующие термины с соответствующими определениями:

- 3.1 **Документ:** Информация, представленная на соответствующем носителе.
- 3.2 **Запись:** Документ, содержащий достигнутые результаты или свидетельства осуществленной деятельности.
- 3.3 **Идентификационный номер пробы:** Уникальный номер, присваиваемый каждой пробе для ее маркировки.
- 3.4 **Качество:** Степень соответствия совокупности присущих характеристик установленным требованиям.
- 3.5 **Контроль:** Процедура оценивания соответствия путем наблюдения и суждений, сопровождаемых соответствующими измерениями, испытаниями или калибровкой.
- 3.6 **Операционные процедуры:** Документально оформленные инструкции по выполнению рабочих процедур.
- 3.7 **Проверка:** Систематический, независимый и документированный процесс получения свидетельств аудита (проверки) и объективного их оценивания для установления степени выполнения согласованных критериев аудита (проверки).
- 3.8 **Протокол:** Данный документ, регламентирующий процесс масс-спектрометрического анализа метаболитов плазмы крови.
- 3.9 **Процедура:** Установленный способ осуществления деятельности или процесса.
- 3.10 **Процесс:** Совокупность взаимосвязанных и взаимодействующих видов деятельности, преобразующая входы в выходы.
- 3.11 **Руководство:** Лицо или группа работников, осуществляющих руководство и управление организацией на высшем уровне.
- 3.12 **Руководство по качеству:** Документ, определяющий систему менеджмента качества организации.
- 3.13 **Система:** Совокупность взаимосвязанных и взаимодействующих элементов.
- 3.14 **Система менеджмента качества:** Система менеджмента для руководства и управления организацией применительно к качеству.

3.15 **Сертификат**: Разрешительный документ на работу с оборудованием и/или программным обеспечением, выдаваемый производителем на основе прохождения обучения на специализированных курсах.

3.16 **ppm**: Миллионная доля массы.

3.17 **m/z**: Отношение массы детектируемого иона к его заряду.

#### **4 Система менеджмента качества**

Руководство организации (директор/главный врач) несет ответственность за качество масс-спектров, получаемых в соответствии с протоколом.

Руководство организует систему менеджмента качества, охватывающую все аспекты реализации протокола от получения образцов крови и их хранения до обработки и масс-спектрометрического анализа.

Директор (главный врач) предоставляет необходимые ресурсы для достижения требуемого качества масс-спектров образцов плазмы крови.

Директор (главный врач) для достижения качества продукции (масс-спектрограмм) может распределять ответственность и полномочия по качеству.

Директор (главный врач) назначает представителя по качеству (заместителя или заведующего лабораторией), который несет ответственность за систему менеджмента качества, отчетность и координацию работ в рамках системы.

#### **5 Требования к персоналу**

Минимальное количество персонала, требуемое для реализации протокола, 2 человека: 1 лаборант и 1 оператор масс-спектрометра.

5.1 Лаборант должен иметь среднее профильное образование.

5.2 Оператор должен иметь высшее профильное образование и сертификат фирмы Bruker Daltonics на управление и обслуживание гибридного квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра MicroTOF-Q.

5.3 Оператор должен обладать практическими навыками работы с графическим пользовательским интерфейсом операционной системы Windows 2000.

5.4 Оператор должен обладать практическими навыками работы с графическим пользовательским интерфейсом программ Microtof control и DataAnalysis.

5.5 Оператор должен обладать практическими навыками работы с гибридным квадруполь-времяпролетным масс-спектрометром.

5.6 Оператор должен обладать знаниями по масс-спектрометрии и практическими навыками по обработке масс-спектров.

5.7 Оператор и лаборант должны быть аттестованы на II квалификационную группу по электробезопасности.

## **6 Рабочие инструкции (стандартные операционные процедуры)**

Все производственные процедуры осуществляются в соответствии со следующими рабочими инструкциями:

- прием и регистрация образцов плазмы крови;
- удаление белковой фракции плазмы крови;
- масс-спектрометрический анализ метаболитов плазмы крови.

### **6.1 Прием и регистрация образцов плазмы крови**

Данные о каждом образце плазмы крови, поступившем в учреждение, заносят в специальный журнал, пронумерованный, прошнурованный,

скрепленный печатью и заверенный руководителем учреждения. В регистрационной записи указывают организацию, приславшую образцы, Ф.И.О. медсестры, проводившей забор крови и получение плазмы крови, дату и время поступления образца плазмы крови. Журнал учета образцов хранят в лаборатории в течение всего времени хранения образцов плазмы и 3 года после их выдачи.

Поступившие в учреждение пробирки с образцами плазмы крови хранят в специально отведенной морозильной камере в вертикальном положении при температуре  $-80\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Разрешается временно, до 3 мес, хранить образцы в морозильной камере при  $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ , соблюдая соответствующие гигиенические условия хранения. Температурный режим хранения образцов один раз в неделю фиксируют в специальном журнале. Предельный срок хранения образцов 20 лет. Пробирки в процессе хранения подвергают визуальному контролю не реже, чем один раз в месяц.

Перед началом обработки и масс-спектрометрического анализа образцов плазмы крови, ответственный сотрудник лаборатории (лаборант) подвергает пробирки с образцами макрооценке, а также проводит строгий контроль на соответствие данных этикетки пробирок (Ф.И.О., номер регистрационной карты пациента) образцам, предназначенным для масс-спектрометрического анализа.

## **6.2 Удаление белковой фракции плазмы крови**

### **6.2.1 Материально-техническое обеспечение операционной процедуры**

#### **6.2.1.1 Расходные материалы**

6.2.1.1.1 Пробирки полимерные центрифужные однократного применения для хранения и транспортирования микропроб крови и других биожидкостей вместимостью 1,5 куб. см. (рег. удост. МЗ РФ № 29/07091199/0455-00, ОАО "Фирма Медполимер", Россия).

6.2.1.1.2 Наконечники для дозаторов универсальные, стерильные на 200 и 1000 мкл.

6.2.1.1.3 Пробирки П1-14-120 цилиндрические с развернутым краем, диаметр 14 мм, высота 120 мм, ГОСТ 25336-82.

6.2.1.1.4 Дистиллированная вода, качество HPLC Grade ("LiChrosolv", "Merck", США).

6.2.1.1.5 Метанол, качество HPLC Grade ("Fluka", Германия).

6.2.1.1.6 Ацетонитрил, качество HPLC Grade ("Acros Organics", США).

6.2.1.1.7 Муравьиная кислота ("Fluka", Германия).

### **6.2.1.2 Инструментарий**

6.2.1.2.1 Цилиндры стеклянные мерные лабораторные на 25 куб. см (ГОСТ 1770).

6.2.1.2.2 Пипетки мерные 2-го класса точности на 5 и 10 куб. см (ГОСТ 29227).

6.2.1.2.3 Штативы лабораторные металлические для пробирок ШЛМ-"МОКА" на 6 и 12 гнезд (рег. удост. МЗ РФ № 29/07010202/4143-02, ООО "Мока", Россия).

6.2.1.2.4 Пипет-дозатор переменного объема 200-1000 куб. мм.

### **6.2.1.3 Оборудование**

6.2.1.3.1 Холодильник бытовой электрический (ГОСТ 26678).

6.2.1.3.2 Камера морозильная, обеспечивающая температуру  $-20^{\circ}\text{C}$  (ГОСТ 26678).

6.2.1.3.3 Шейкер с орбитальным вращением платформы ЛАБ-ПУ-04 (ЗАО “Лабораторное Оборудование и Приборы”, Россия), для создания вращательного движения жидкости в пробирках и лабораторной посуде.

6.2.1.3.4 Ультразвуковая мойка Bandelin RM 40UH (“Sonorex Technik”, Германия).

## **6.2.2 Описание операционной процедуры**

6.2.2.1 Используя дозатор, к 100 мкл плазмы крови добавить 100 мкл дистиллированной воды и 800 мкл метанола. Инкубировать 10 мин при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

6.2.2.2 Центрифугированием при 13000 об/мин в течение 10 мин осадить белок и, используя дозатор с одноразовыми наконечниками, перенести супернатант в чистые пластиковые пробирки (типа эппендорф).

6.2.2.3 Растворитель упарить при  $45^{\circ}\text{C}$  в течение 3 ч на вакуумном испарителе.

6.2.2.4 Полученный сухой осадок растворить в 100 мкл 95% раствора ацетонитрила, с добавлением 0,1% муравьиной кислоты.

6.2.2.5 Для лучшего растворения осадка пробы обработать ультразвуком в ультразвуковой мойке два раза по 30 сек.

6.2.2.6 Пробы центрифугировать 10 мин при 13000 g и полученный супернатант использовать для масс-спектрометрического анализа.

## **6.3 Масс-спектрометрический анализ метаболитов плазмы крови**

### **6.3.1 Материально-техническое обеспечение операционной процедуры**

#### **6.3.1.1 Расходные материалы**

6.3.1.1.1 Раствор ES Tune Mix (Agilent, США) для калибровки масс-спектрометра с электроспреемным источником ионизации.

6.3.1.1.2 Дистиллированная вода (“LiChrosolv”, “Merck”, США)

6.3.1.1.3 Ацетонитрил, качество HPLC Grade (“Acros Organics”, США).

### **6.3.1.2 Инструментарий**

6.3.1.2.1 Калиброванный стеклянный шприц (“Hamilton Bonaduz”, Швейцария) на 500 мкл.

### **6.3.1.3 Оборудование и программное обеспечение**

6.3.1.3.1 Гибридный квадруполь-времяпролетный масс-спектрометр MicrOTOF-Q (“Bruker Daltonics”, Германия).

6.3.1.3.2 Электроспрейный источник ионизации (“Bruker Daltonics”, Германия), совместимый с гибридным квадруполь-времяпролетным масс-спектрометром MicrOTOF-Q.

6.3.1.3.3 Шприцевой инжекторный насос (“KD Scientific”, США).

6.3.1.3.4 Программное обеспечение (интерфейс управления масс-спектрометром) Microtofq control (“Bruker Daltonics”)

6.3.1.3.5 Программа DataAnalysis (версия 3.4, “Bruker Daltonics”)

### **6.3.2 Описание операционной процедуры**

6.3.2.1 Подготовить масс-спектрометр к снятию спектров согласно инструкции производителя.

6.3.2.1 Используя интерфейс управления масс-спектрометром, загрузить метод получения масс-спектров в диапазоне масс  $m/z$  50-1000.

6.3.2.2 Провести калибровку масс-спектрометра в режиме детекции как положительно, так и отрицательно заряженных ионов, согласно инструкции

производителя и используя раствор ES Tune Mix. Добиться точности измерения масс не менее 4 ppm для всего диапазона измеряемых масс.

6.3.2.3 Используя шприц и шприцевой насос, произвести инъекцию раствора метаболитов плазмы крови в электроспрейный источник ионизации масс-спектрометра. Скорость инъекции, выставленная на шприцевом насосе, должна составлять 180 мкл/час.

6.3.2.4 Во время инъекции раствора метаболитов произвести запись масс-спектра в режиме детекции положительно заряженных ионов (5 мин) и режиме отрицательно заряженных ионов (5 мин).

6.3.2.5 Получить масс-спектры в программе DataAnalysis (версия 3.4, “Bruker Daltonics”) суммированием записанных сигналов (отдельно для положительно и отрицательно заряженных ионов).

6.3.2.6 Промыть шприц поочередно ацетонитрилом и дистиллированной водой.

6.3.2.7 Используя шприцевой насос, шприцом с 50% раствором ацетонитрила промыть систему впрыска масс-спектрометра до детекции исходного сигнала, соответствующего чистому растворителю.

### **6.3.3 Контроль качества**

Качество масс-спектрометрического анализа оценивает оператор масс-спектрометра в регламентированном производителем масс-спектрометра порядке, по следующим параметрам:

6.3.3.1 Точность измерения масс метаболитов должна быть не менее 4 ppm.

6.3.3.2 Диапазон эффективной детекции масс метаболитов должен составлять  $m/z$  50-1000.

6.3.3.3 Погрешность воспроизведения интенсивностей масс-спектрометрических пиков должна составлять:

- при повторном измерении в течение одного дня не более 10% от интенсивности пиков;

- при повторном измерении в разные дни не более 15% от интенсивности пиков.

## **7. Удаление отходов**

Использованные пластиковые контейнеры, пузырьки, штативы погружают в эмалированные или полиэтиленовые баки (тазы) с крышкой с 3% раствором хлорамина Б на один час. После дезинфицирующей обработки отходы утилизируют в соответствии с санитарными правилами и нормами СанПиН 2.1.7.728-99 "Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений".

Использованный одноразовый инструментарий, контактировавший с образцами плазмы крови, после дезинфекции закладывают в биксы, дно которых выложено бумагой для предупреждения их склеивания. Утилизацию проводят в паровом стерилизаторе (автоклаве) при 132°C в течение 60 мин. Дальнейшую утилизацию проводят совместно с бытовым мусором.

## **ПРОТОКОЛ**

**ОБРАБОТКИ МАСС-СПЕКТРОВ МЕТАБОЛИТОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ**

протокол составлен к.б.н. Лоховым П. Г.

Москва

### Сведения о протоколе

Протокол разработан в рамках Государственного контракта "*Разработка методов профилирования плазмы крови и анализа транскриптов 18-й хромосомы в клетках линии HEPG2*" и предназначен для обработки масс-спектров метаболитов плазмы крови (детекция пиков, нормализация, определение точности измерения масс), полученных в целях медицинской диагностики.

## Содержание

1. Область применения
2. Нормативные ссылки
3. Термины и определения
4. Система менеджмента качества
5. Требования к персоналу
6. Используемое оборудование и программное обеспечение
7. Рабочие инструкции (стандартные операционные процедуры)
  - 7.1 Детекция пиков
  - 7.2 Нормализация интенсивностей пиков
  - 7.3 Определение точности измерения масс
  - 7.4 Выходные данные

## **1. Область применения**

Настоящий протокол устанавливает требования к обеспечению качества и описывает стандартные операционные процедуры при обработке масс-спектров метаболитов плазмы крови, полученных для диагностических целей в медицине.

Протокол предназначен для применения лабораториями медицинских организаций и учреждениями федеральных, территориальных и муниципальных органов управления здравоохранением, систем обязательного и добровольного медицинского страхования, другими медицинскими организациями различных организационно-правовых форм деятельности, направленной на оказание медицинской помощи и имеющих аккредитацию в установленном порядке.

## **2. Нормативные ссылки**

В настоящем протоколе использованы требования следующих стандартов:

ГОСТ 15.201—2000 Система разработки и постановки продукции на производство. Продукция производственно-технического назначения. Порядок разработки и постановки продукции на производство.

ГОСТ Р ИСО 9000—2008 Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь.

## **3. Термины и определения**

В настоящем протоколе применены термины по ГОСТ Р ИСО 9000, а также следующие термины с соответствующими определениями:

**3.1 Документ:** Информация, представленная на соответствующем носителе.

- 3.2 **Запись:** Документ, содержащий достигнутые результаты или свидетельства осуществленной деятельности.
- 3.3 **Идентификационный номер:** Уникальный номер, присваиваемый каждому масс-спектру и/или результатам его обработки.
- 3.4 **Качество:** Степень соответствия совокупности присущих характеристик установленным требованиям.
- 3.5 **Контроль:** Процедура оценивания соответствия путем наблюдения и суждений, сопровождаемых соответствующими измерениями, испытаниями или калибровкой.
- 3.6 **Операционные процедуры:** Документально оформленные инструкции по выполнению рабочих процедур.
- 3.7 **Проверка:** Систематический, независимый и документированный процесс получения свидетельств аудита (проверки) и объективного их оценивания для установления степени выполнения согласованных критериев аудита (проверки).
- 3.8 **Протокол:** Данный документ, регламентирующий процесс обработки масс-спектров метаболитов плазмы крови.
- 3.9 **Процедура:** Установленный способ осуществления деятельности или процесса.
- 3.10 **Процесс:** Совокупность взаимосвязанных и взаимодействующих видов деятельности, преобразующая входы в выходы.
- 3.11 **Руководство:** Лицо или группа работников, осуществляющих руководство и управление организацией на высшем уровне.
- 3.12 **Руководство по качеству:** Документ, определяющий систему менеджмента качества организации.
- 3.13 **Система:** Совокупность взаимосвязанных и взаимодействующих элементов.
- 3.14 **Система менеджмента качества:** Система менеджмента для руководства и управления организацией применительно к качеству.

3.15 **Сертификат**: Разрешительный документ на работу с оборудованием и/или программным обеспечением, выдаваемый производителем на основе прохождения обучения на специализированных курсах.

3.16 **ppm**: Миллионная доля массы.

3.17 **m/z**: Отношение массы детектируемого иона к его заряду.

#### **4. Система менеджмента качества**

Руководство организует систему менеджмента качества, охватывающую все аспекты реализации протокола.

Руководство организации для достижения качества масс-спектров может распределять в системе ответственность и полномочия.

Руководитель организации назначает представителя по качеству (заместителя или заведующего лабораторией), который несет ответственность за систему менеджмента качества, отчетность и координацию работ в рамках системы.

Руководство организации несет ответственность за качество результатов обработки масс-спектров, получаемых в соответствии с протоколом.

Директор (главный врач) предоставляет необходимые ресурсы для достижения требуемого качества обработки масс-спектров.

#### **5. Требования к персоналу**

Минимальное количество персонала, требуемого для осуществления протокола, составляет 1 конечный пользователь программного обеспечения – оператор.

Оператор должен иметь высшее профильное образование и сертификаты компании-производителя (или уполномоченного официального

представителя) операционной системы и программы DataAnalysis (“Bruker Daltonics”).

Оператор должен обладать практическими навыками работы с графическим пользовательским интерфейсом операционной системы.

Оператор должен обладать практическими навыками работы с графическим пользовательским интерфейсом программы DataAnalysis (“Bruker Daltonics”).

Оператор должен обладать знаниями по масс-спектрометрии и практическими навыками по биоинформационной обработке масс-спектров.

Оператор должен быть аттестован на II квалификационную группу по электробезопасности (для работы с конторским оборудованием).

## **6. Используемое программное обеспечение**

- Операционная система Windows XP ("Microsoft", США) или любая более поздняя версия Windows.
- Программа DataAnalysis (“Bruker Daltonics”) версии 3.4 или любая более поздняя версия программы.

## **7. Рабочие инструкции (стандартные операционные процедуры)**

Все производственные процедуры осуществляют в соответствии с рабочими инструкциями для следующих этапов:

- детекция пиков;
- нормализация интенсивностей пиков;
- определение точности измерения масс.

### **7.1 Детекция масс-спектрометрических пиков**

#### **7.1.1 Последовательность действий**

Оператор открывает в программе DataAnalysis файл с масс-спектрометрическими данными образца, предназначенного для обработки, и осуществляет следующие действия:

- 1) суммирует 5-ти минутные сигналы для формирования масс-спектров;
- 2) устанавливает параметры для детекции масс-спектрометрических пиков алгоритмом Sum Peak;
- 3) применяет алгоритм Sum Peak для детекции пиков.

Алгоритм Sum Peak совместим с нелинейностью в масс-спектрометрических данных, полученных на времяпролетных масс-спектрометрах, совместим с наличием в спектрах изотопного распределения, позволяет детектировать низко интенсивные пики, состоящие из малого количества точек.

#### 7.1.2 Параметры детекции масс-спектрометрических пиков

7.1.2.1 Параметры детекции пиков для положительно заряженных ионов:

Соотношение сигнал/шум: 1

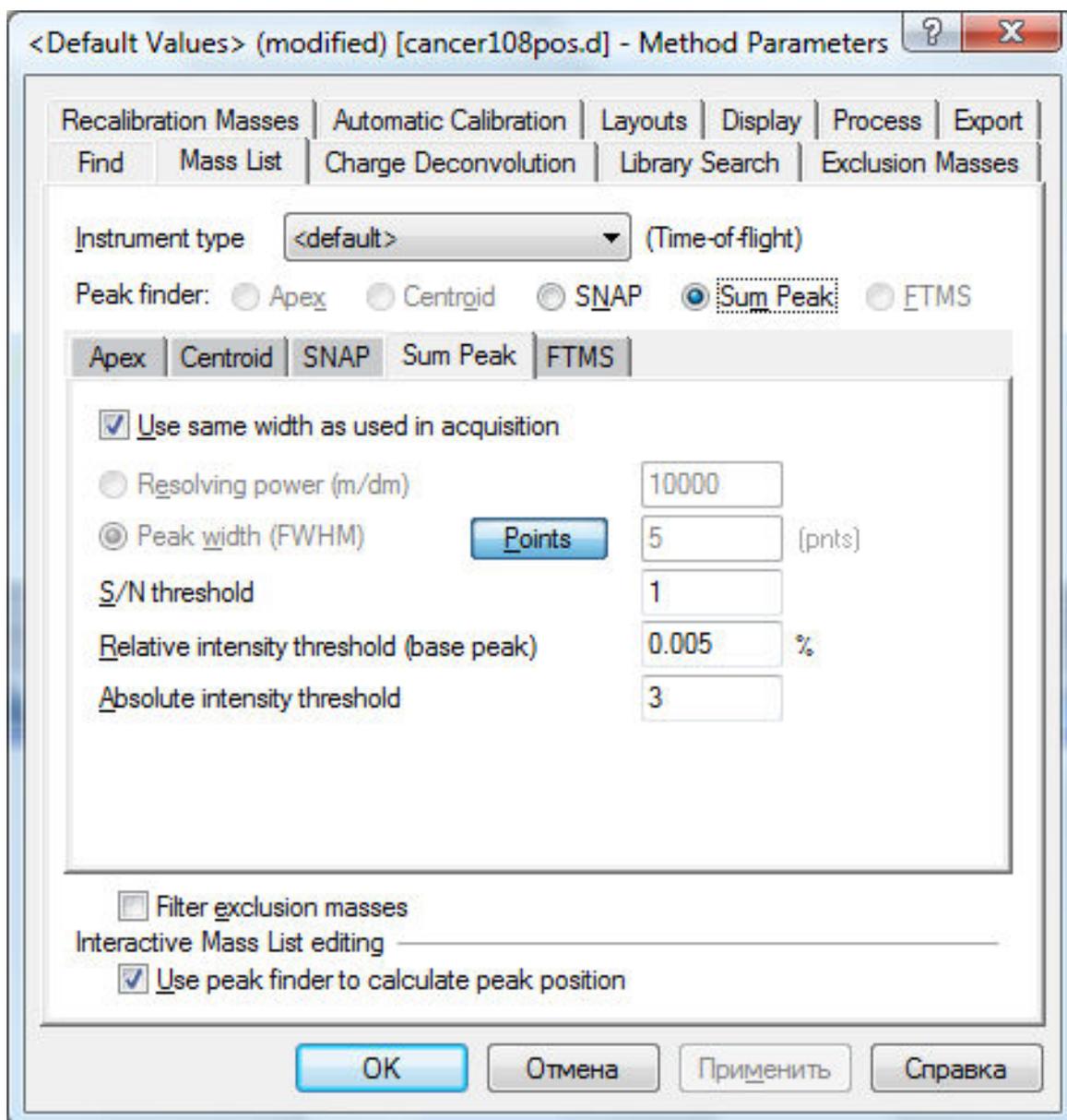
Пороговое значение: относительное – 0,005%;  
абсолютное – 3.

#### 7.1.3.2 Параметры детекции пиков для отрицательно заряженных ионов:

Соотношение сигнал/шум: 1

Пороговое значение: относительное – 0,005%;  
абсолютное – 2.

Параметры детекции устанавливаются в диалоговом окне "Parameters", находящимся в пункте "MassList" главного меню. Пример установки параметров для детекции положительно заряженных ионов представлен ниже:



### 7.1.3 Контроль эффективности детекции пиков.

Оператор контролирует эффективность детекции пиков путем тестирования.

Оператор визуально определяет эффективность детекции пиков путем подсчета процента детекции целевых пиков.

Эффективность детекции рассчитывается как среднее значение для 10-ти масс-спектров.

Нецелевым пиком в спектре считается масс-спектрометрический пик низкой интенсивности, не имеющий изотопного распределения и не воспроизводящийся в остальных 9-ти спектрах.

Детекция целевых пиков должна быть не менее 95%.

## **7.2 Нормализация интенсивностей масс-спектрометрических пиков**

7.2.1 Нормализация интенсивностей масс-спектрометрических пиков является опционной и не применяется в случае обработки масс-спектров, полученных прямой инъекцией пробы в источник ионизации.

7.2.2 В случае необходимости нормализации интенсивностей масс-спектрометрических пиков, нормализацию проводят путем деления интенсивности каждого пика масс-спектрограммы на сумму интенсивностей всех пиков масс-спектра.

7.2.3 Для нормализации используют любое программное обеспечение, позволяющее проводить математические операции со скалярными и векторными данными.

## **7.3 Определение точности измерения масс**

7.3.1 Определение точности измерения масс по внешнему стандарту.

В случае невозможности определения точности измерения масс веществ по внутреннему стандарту, оператор определяет точность измерения масс по внешнему стандарту.

Определение точности измерения масс по внешнему стандарту проводится по масс-спектру калибровочной смеси ES Tune Mix ("Agilent",

США), который был получен в идентичных условиях и в тоже время, что и оцениваемые масс-спектры.

Точность измерения определяется в ppm и рассчитывается для каждого участка масс-спектра по соответствующим им компонентам калибровочной смеси.

Точность измерения масс рассчитывается по формуле:

$$T = \text{abs} \left( \frac{M1-M2}{M1} \right) \times 1000000$$

где

T – точность измерения масс;

abs – вычисление абсолютного значения;

M1 – измеренная масса стандартного вещества из калибровочной смеси;

M2 – справочное значение массы стандартного вещества из калибровочной смеси.

### 7.3.2 Определение точности измерения масс по внутренней калибровке.

Для определения точности измерения масс по внутренней калибровке оператор использует снятые спектры образцов с добавленным калибрантом ES Tune Mix ("Agilent", США).

Точность измерения определяется в ppm и рассчитывается для каждого участка масс-спектра по соответствующим им компонентам калибровочной смеси.

Точность измерения масс рассчитывается по той же формуле, что и в случае определения точности измерения масс по внешнему стандарту (см. 7.3.1).

## 7.4 Выходные данные

Оператор генерирует в программе списки масс ионов и сохраняет их на жесткий диск с идентификационным номером, указывающим на соответствующий ему масс-спектр. Файлы, содержащие списки масс ионов являются текстовыми файлами и имеют следующий формат:

- первая строка через табуляцию содержит следующие символы:

#	m/z	I
---	-----	---

- последующие строки содержат:

первая колонка - последовательная нумерация масс ионов веществ;

вторая колонка - после одной табуляции, значения масс ионов метаболитов с точностью до 4-го знака после запятой;

третья колонка - после одной табуляции, значения интенсивностей соответствующих масс-спектрометрических пиков.

Пример списка масс ионов веществ (масс-листа), являющихся входными данными:

#	m/z	I
1	78,9152	32
2	79,9542	82
3	80,9134	86
4	80,9613	36
5	81,9503	8
6	83,0471	9

.....

...

## **ОПИСАНИЕ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ**

составлено к.б.н. Лоховым П. Г.  
в соответствии с ГОСТ 19.402-78

Москва

### **Аннотация**

Документ содержит описание программного обеспечения (программа "barcoder"), созданного в рамках реализации Государственного контракта *"Разработка методов профилирования плазмы крови и анализа транскриптов 18-й хромосомы в клетках линии HEPG2"* и составлен в соответствии с ГОСТ 19.402-78. Программное обеспечение предназначено для проведения статистического анализа масс-спектрометрических данных низкомолекулярных веществ, полученных в исследованиях типа "случай vs. контроль". Описание содержит общие сведения о программном обеспечении, его функциональном назначении, структуре, требования к техническим средствам, форматам входных и выходных данных.

## Содержание

1. Общие сведения
  - 1.1. Обозначение и наименование программы
  - 1.2. Программное обеспечение, необходимое для функционирования программы
  - 1.3. Языки программирования, на которых написана программа
2. Функциональное назначение
3. Описание логической структуры
  - 3.1. Алгоритм программы
  - 3.2. Используемые методы
  - 3.3. Структура программы с описанием функций составных частей и связи между ними
  - 3.4. Связи программы с другими программами
4. Используемые технические средства
5. Вызов и загрузка
  - 5.1. Способ вызова программы с соответствующего носителя данных
  - 5.2. Входные точки в программу
6. Входные данные
  - 6.1. Характер, организация и предварительная подготовка входных данных
  - 6.2. Формат, описание и способ кодирования входных данных
7. Выходные данные
  - 7.1. Характер и организация выходных данных
  - 7.2. Формат, описание и способ кодирования выходных данных.

## **1. Общие сведения**

Программа "barcoder" предназначена для анализа масс-спектрометрических данных, полученных для низкомолекулярных веществ в исследованиях типа "случай vs. контроль".

Основная задача, которую решает программа, – формирование масс-спектрометрических штрих-кодов образцов и их классификация.

Программа может применяться в организациях, проводящих научные исследования с применением масс-спектрометрической техники.

### **1.1. Обозначение и наименование программы**

Наименование программы – "barcoder", обозначение ВС-01.

### **1.2. Программное обеспечение, необходимое для функционирования программы**

- Операционная система Windows XP (Microsoft, USA) или любая более поздняя версия Windows.
- Программный пакет Matlab R13 (MathWorks, USA) или любая более поздняя версия.
- OSU Support Vector Machines Toolbox (v. 3.0, <http://sourceforge.net/projects/svm/>) - свободно распространяемый программный код для реализации метода опорных векторов в среде программного пакета Matlab.

### **1.3. Языки программирования, на которых написана программа**

Программное обеспечение реализовано на языке программирования программного пакета Matlab.

## 2. Функциональное назначение

### Назначение программы:

- (1) статистический анализ масс-спектрометрических данных в экспериментах "случай vs. контроль", ориентированный на выявление масс-спектрометрических пиков веществ, статистически отличающихся в контрольных и экспериментальных масс-спектрах;
- (2) классификация масс-спектров;
- (3) тестирование результатов классификации масс-спектров.

### Программа решает следующие задачи:

- (1) Производит выравнивание масс-спектрометрических данных.
- (2) Осуществляет статистический анализ выровненных данных, а именно:
  - рассчитывает тест Вилкоксона;
  - рассчитывает площади под ROC-кривой.
- (3) Реализует снижение размерности данных Методом Главных Компонент.
- (4) Проводит классификацию масс-спектров методом опорных векторов.

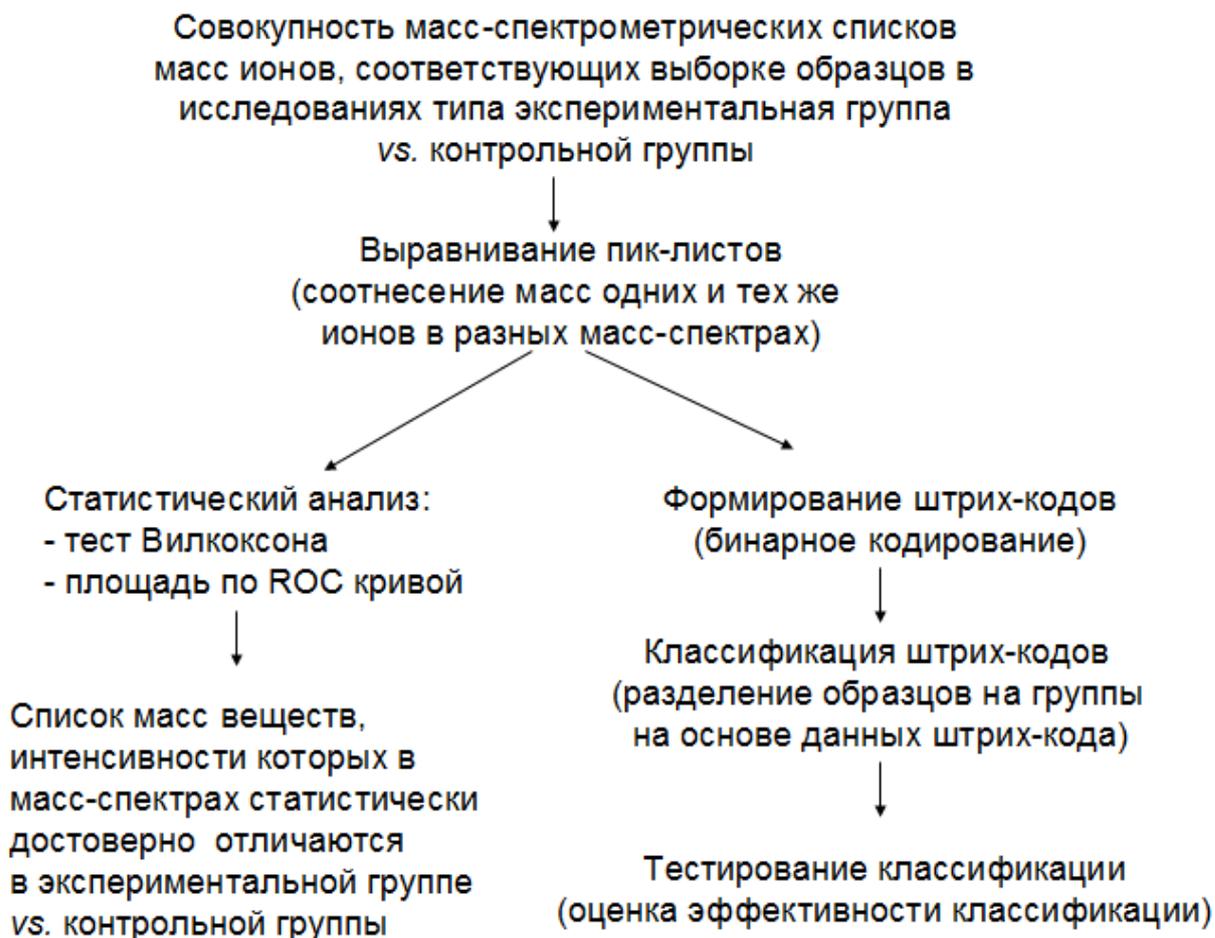
### Ограничение на применение программы:

- (1) Выравнивание масс-спектрометрических данных предназначено для масс-спектров низкомолекулярных веществ, полученных с высоким разрешением (не менее 4 ppm).
- (2) Выравнивание масс-спектрометрических данных возможно при наличии не менее 20 масс-спектров.

(3) Достоверность данных статистического анализа зависит от размера выборки масс-спектров задействованных в анализе. Использование менее 20 масс-спектров не рекомендуется.

### 3. Описание логической структуры

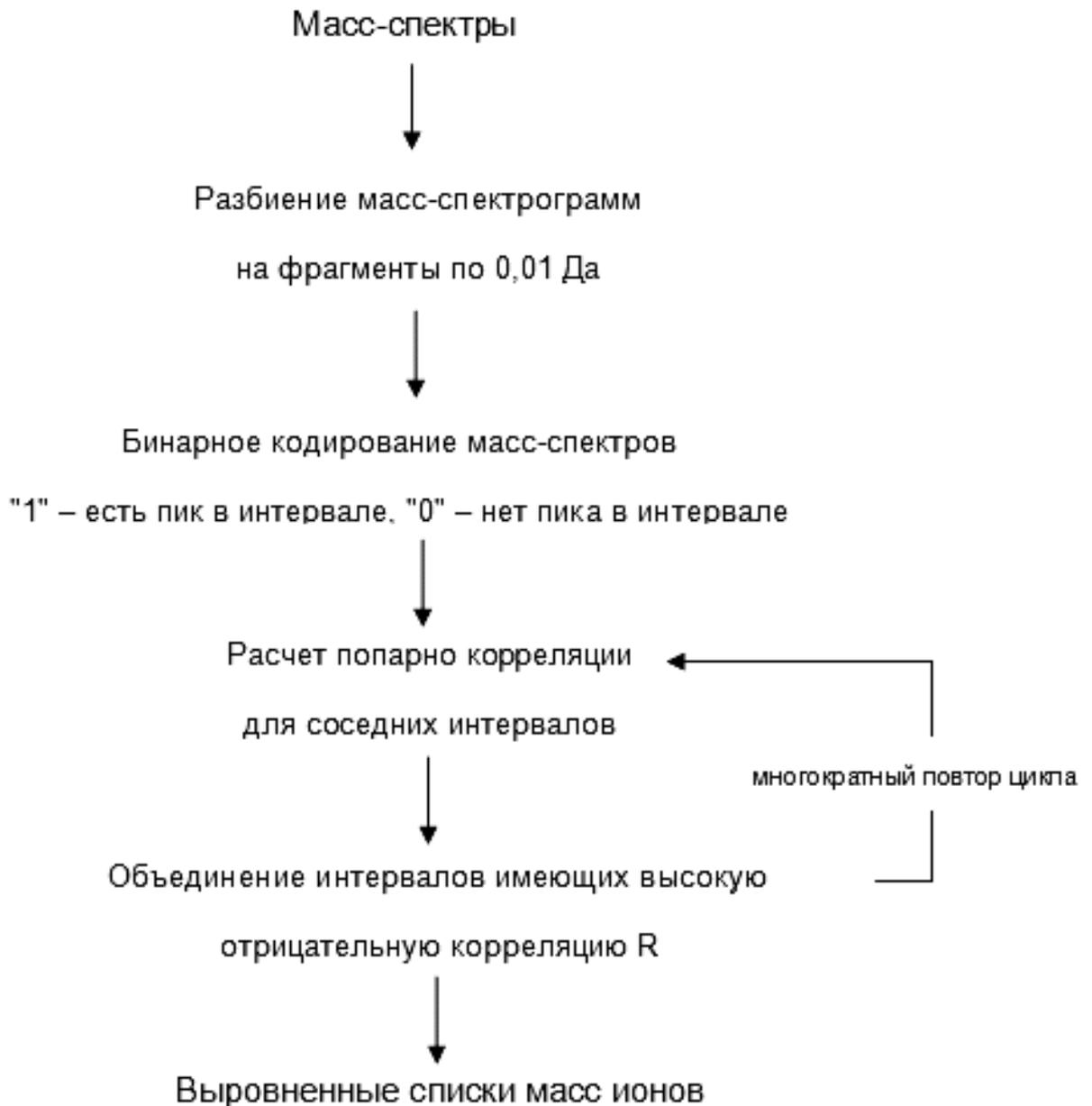
#### 3.1. Алгоритм программы



#### 3.2. Используемые методы

##### Выравнивание масс спектрометрических данных

В программе реализуется оригинальный метод (автор к.б.н. Лохов П. Г.) выравнивания масс-спектрометрических данных, общая схема которого представлена на нижеследующей диаграмме:



Согласно данному алгоритму, полученные списки масс ионов веществ переводят в бинарный код (штрих-код). Для этого диапазон детектированных масс разбивают на фрагменты с шагом 0,01 Да, где диапазону, включающему массу иона, соответствует "1", и "0" - при отсутствии таковой массы. Таким образом строится бинарная матрица масс-спектрометрических данных. Алгоритм в циклическом режиме выявляет коррелирующие строки в данной матрице, объединяет их, удаляет образующиеся пробелы (строки без масс

ионов), и повторяет цикл, уменьшая пороговое значение коэффициента корреляции, использованного для выявления коррелирующих строк. Масс-спектрометрическая матрица после обработки состоит уже из выровненных масс-спектрометрических данных, пригодных для дальнейшего статистического анализа.

#### Метод главных компонент

Матрица бинарных масс-спектрометрических данных (штрих-кодов) анализируется методом главных компонент (МГК). Для этого применяется функция *princomp* программного пакета Matlab. Среди возвращаемых функцией параметров есть значение вариативности, покрываемое каждым главным компонентом. Далее происходит выбор нескольких первых компонентов, покрывающих не менее 40% вариативности представленной в исходных штрих-кодах анализируемой выборки. Далее, вместо исходных штрих-кодов, имеющих размерность равную количеству детектированных масс в спектрах, используются их проекции на выбранные главные компоненты. Таким образом достигается снижение размерности данных, необходимое для последующей эффективной классификации штрих-кодов.

#### Метод опорных векторов

Для классификации штрих-кодов программа использует метод опорных векторов. Применяется SVM (support vector machine) классификатор с радиальным ядром (функция *RbfSVC* пакета OSU Support Vector Machines Toolbox v. 3,0) и основными параметрами:  $\gamma = 1$ ,  $\varepsilon = 0,001$ ,  $C = 1$  (описание параметров смотри в инструкции к OSU Support Vector Machines Toolbox). Входными данными для классификации являлись координаты проекций штрих-кодов на главные компоненты. Результат классификации возвращает функция *SVMTest*.

Тестирование классификации проводится методом "*repeated random sub-sampling validation*", заключающемся в попеременном удалении из выборки

нескольких случайно выбранных штрих-кодов и обучении классификатора на оставшихся штрих-кодах с последующим тестированием классификатора на штрих-кодах, не участвовавших в обучении. Таким образом, классификация тестируется в итеративном порядке не менее 1000 раз, на основании чего рассчитываются характеристики описывающие эффективность классификации. Доверительный интервал надежности для полученных характеристик рассчитывается методом, предложенным Вапником для расчета доверительных интервалов надежности для классификатора с учителем (Вапник, В.Н., *Алгоритмы и программы восстановления зависимостей*. 1984, Наука, Главная редакция физико-математической литературы.: Москва.). Расчет проводится для доверительной вероятности 0,95.

### **3.3. Структура программы с описанием функций составных частей и связи между ними**

Программа состоит из следующих блоков:

(1) Блок выравнивания масс-спектрометрических данных. Функциями блока являются:

- считывание из predetermined директории текстовых файлов, содержащих списки масс ионов веществ (масс-листы);
- объединение интенсивностей масс-спектрометрических пиков из считанных масс-листов в единую матрицу;
- формирование новой матрицы с интенсивностями масс-спектрометрических пиков, выровненными по молекулярной массе.

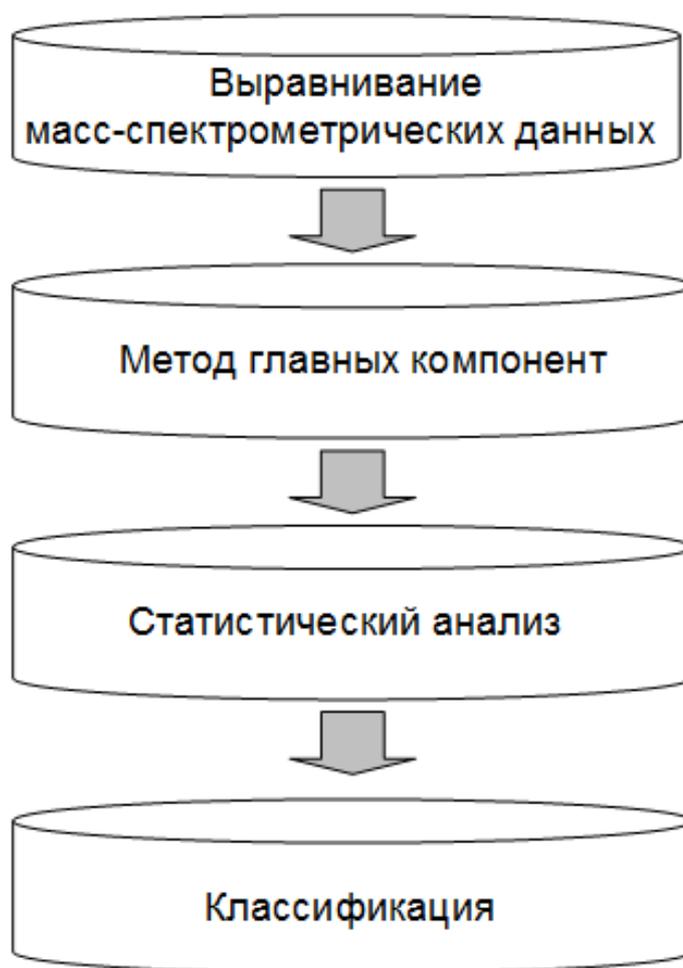
(2) Блок, реализующий метод главных компонент. Функцией блока является снижение размерности масс-спектрометрических данных.

(3) Блок статистического анализа. Функцией блока является расчет значений теста Вилкоксона и площади под ROC-кривой для интенсивностей масс-спектрометрических пиков.

(4) Блок классификации масс-спектрометрических данных. Функциями блока являются:

- классификация масс-спектрометрических данных методом опорных векторов;
- тестирование результатов классификации способом "*repeated random sub-sampling validation*", заключающемся в попеременном удалении из выборки данных случайно выбранных масс-спектров и обучении классификатора на оставшихся масс-спектрометрических данных с последующим тестированием классификатора на масс-спектрометрических данных, не участвовавших в обучении.

Связь между блоками осуществляется последовательно (т.е. выходные данные одного блока являются входными для другого) в соответствии со следующей блок-схемой:



### **3.4. Связи программы с другими программами**

При выполнении программы происходит интерпретация программного кода интерпретатором программного пакета Matlab.

В качестве входных данных используются списки масс ионов веществ (масс-листы) сгенерированные по масс-спектрам в программе DataAnalysis (версия 3.4, “Bruker Daltonics”).

### **4. Используемые технические средства**

Электронная вычислительная машина: IBM-совместимый персональный компьютер, тактовая частота процессора не менее 2 ГГц, оперативная память 2 или более гигабайт.

## **5. Вызов и загрузка**

### **5.1. Способ вызова программы с соответствующего носителя данных**

В командную строку операционной системы Windows ввести строку

```
start matlab -automation -r "barcode".
```

### **5.2. Входные точки в программу**

Точками входа являются первые строки блоков программы.

## **6. Входные данные**

### **6.1. Характер, организация и предварительная подготовка входных данных**

Входными данными являются:

- адрес директории с файлами, содержащими списки масс ионов веществ (масс-листы) для контрольной группы измерений;
- адрес директории с файлами, содержащими списки масс ионов веществ (масс-листы) для экспериментальной группы измерений;
- файлы, содержащие списки масс ионов веществ (масс-листы) для контрольной группы измерений;
- файлы, содержащие списки масс ионов веществ (масс-листы) для экспериментальной группы измерений.

Файлы, содержащие списки масс ионов веществ генерируются в программе DataAnalysis (версия 3.4, “Bruker Daltonics”).

### **6.2. Формат, описание и способ кодирования входных данных**

Адрес директорий, содержащих масс-листы, задается в явном виде и передается функции, считывающей название файлов в указанной директории. Формат указания директорий:

{кавычки} {логический диск}:\{адрес директории} {кавычки}

Пример указания адреса директории:

'D:\Спектры\Эксперимент\';

Файлы, содержащие списки масс ионов веществ генерируются в программе DataAnalysis (версия 3.4, “Bruker Daltonics”), являются текстовыми файлами и имеют следующий формат:

- первая строка через табуляцию содержит следующие символы:

#	m/z	I
---	-----	---

- последующие строки содержат:

первая колонка - последовательную нумерацию масс ионов веществ;

вторая колонка - после одной табуляции, значения масс ионов метаболитов с точностью до 4-го знака после запятой;

третья колонка - после одной табуляции, значения интенсивностей соответствующих масс-спектрометрических пиков.

Пример списка масс ионов веществ (масс-листа), являющегося входными данными:

#	m/z	I
1	78,9152	32
2	79,9542	82
3	80,9134	86

4	80,9613	36
5	81,9503	8
6	83,0471	9
7	85,0606	7
.....		
...		

## **7. Выходные данные**

### **7.1. Характер и организация выходных данных**

Программа возвращает:

- выровненные масс-спектрометрические данные;
- масс-спектрометрические штрих-коды;
- результаты теста Вилкоксона, рассчитанные для интенсивностей ионов веществ, входящих в штрих-коды проб экспериментальной группы, по отношению к интенсивностям ионов веществ, входящих в штрих-коды проб контрольной группы;
- площади под ROC-кривой (AUC), рассчитанные для интенсивностей ионов веществ, входящих в штрих-коды проб экспериментальной группы, по отношению к интенсивностям ионов веществ, входящих в штрих-коды проб контрольной группы;
- результаты классификации штрих-кодов, проведенной методом опорных векторов.

### **7.2. Формат, описание и способ кодирования выходных данных**

Выходные данные программы сохраняются в корневую директорию программы в виде единого файла с форматом принятым Matlab для сохранения текущих переменных рабочей области, с названием файла

соответствующем времени его генерации и расширением "\*.m". В сохраненный файл входят:

- матрица выровненных масс-спектрометрических данных;
- матрица штрих-кодов;
- вектор с данными с интервалами масс масс-спектрограмм, которым соответствуют данные матриц выровненных масс-спектрометрических данных и штрих-кодов;
- матрица с результатами статистического анализа штрих-кодов;
- результаты классификации штрих-кодов.

Ряды матриц соответствуют массам интервалов масс-спектрограмм, использованных для формирования штрих-кода; колонки матриц соответствуют образцам выборки.

Ячейки матрицы выровненных масс-спектрометрических данных содержат значения интенсивностей пиков масс-спектров.

Ячейки матрицы штрих-кодов содержат бинарные значения.

Колонки матрицы с результатами статистического анализа соответствуют массам интервалов масс масс-спектрограмм, колонка №1 соответствует порядковому номеру массы, колонка №2 содержит значение интервала массы (наименьшее значение интервала), колонка №3 содержит среднее значение интенсивностей масс-спектрометрических пиков в соответствующем интервале, колонка №4 содержит значение теста Вилкоксона, колонка №5 содержит значение под ROC-кривой. Ниже представлен фрагмент данной матрицы:

1	75,06	14	0,64	0,49
2	76,07	36	0,83	0,48
3	80,94	406	0,00	0,14

4	81,04	15	0,64	0,49
5	82,94	317	0,00	0,16
6	83,01	234	0,00	0,19
7	84,07	45	0,56	0,48
8	84,9	60	0,10	0,52
9	85,02	91	0,00	0,41
10	85,07	41	0,27	0,48

Результат классификации штрих-кодов, возвращаемый функцией SVMTest, содержится в векторе PreLabels, возвращаемом этой функцией.

Результаты тестирования классификации штрих-кодов методом *"repeated random sub-sampling validation"* содержатся в матрице AllPreLabels, которая содержит значения векторов PreLabels для каждой итерации тестирования.

**РУКОВОДСТВО ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ ПРОГРАММНЫМ  
ОБЕСПЕЧЕНИЕМ**

руководство составлено к.б.н. Лоховым П. Г.  
в соответствии с ГОСТ 19.505-79

Москва

### **Аннотация**

Документ содержит руководство пользователя программного обеспечения (программа "barcoder"), созданного в рамках реализации Государственного контракта *"Разработка методов профилирования плазмы крови и анализа транскриптов 18-й хромосомы в клетках линии HEPG2"* и составленного в соответствии с ГОСТ 19.505-79. Программное обеспечение предназначено для проведения статистического анализа масс-спектрометрических данных, полученных в исследованиях типа "случай vs. контроль". Руководство пользователя содержит сведения об условиях, необходимых для выполнения программы, и инструкции пользователю для выполнения программы.

## Содержание

1. Назначение программы
2. Условия, необходимые для выполнения программы
  - 2.1. Климатические условия эксплуатации
  - 2.2. Минимальный состав технических средств
  - 2.3. Минимальный состав программных средств
  - 2.4. Требования к персоналу (пользователю)
3. Выполнение программы
  - 3.1. Загрузка и запуск программы
  - 3.2. Выполнение программы
  - 3.3. Завершение выполнения программы
4. Сообщения оператору
  - 4.1. Тексты сообщений, выдаваемых в ходе выполнения программы
  - 4.2. Действия оператора

## 1. Назначение программы

Программа "barcoder" предназначена для анализа масс-спектрометрических данных, полученных для низкомолекулярных веществ в исследованиях типа "случай vs. контроль". Основная задача, которую решает программа, – формирование масс-спектрометрических штрих-кодов образцов и их классификация.

### Функциональное назначение программы:

- (1) статистический анализ масс-спектрометрических данных в экспериментах "случай vs. контроль", ориентированный на выявление масс-спектрометрических пиков веществ, статистически отличающихся в контрольных и экспериментальных масс-спектрах;
- (2) классификация масс-спектров;
- (3) тестирование классификации масс-спектров.

Программа решает следующие задачи:

- (1) Производит выравнивание масс-спектрометрических данных.
- (2) Осуществляет статистический анализ выровненных данных, а именно:
  - рассчитывает тест Вилкоксона;
  - рассчитывает площади под ROC-кривой.
- (3) Реализует снижение размерности данных Методом Главных Компонент.
- (4) Проводит классификацию масс-спектров методом опорных векторов.

### Эксплуатационное назначение программы

Программа может применяться в организациях, проводящих научные исследования с применением масс-спектрометрической техники.

## **2. Условия, необходимые для выполнения программы**

### 2.1. Климатические условия эксплуатации

Климатические условия эксплуатации, при которых должны обеспечиваться заданные характеристики, должны удовлетворять требованиям, предъявляемым к техническим средствам в части условий их эксплуатации.

### 2.2. Минимальный состав технических средств

IBM-совместимый персональный компьютер, тактовая частота процессора не менее 2 ГГц, оперативная память 2 или более гигабайт, жесткий диск 40 гигабайт.

### 2.3. Минимальный состав программных средств

- Операционная система Windows XP (Microsoft, USA) или любая более поздняя версия Windows.
- Программный пакет Matlab R13 (MathWorks, USA) или любая более поздняя версия.
- OSU Support Vector Machines Toolbox (v. 3.0, <http://sourceforge.net/projects/svm/>) – свободно распространяемый программный код для реализации метода опорных векторов в среде программного пакета Matlab.

### 2.4. Требования к персоналу (пользователю)

Минимальное количество персонала, требуемого для работы программы, составляет 1 конечный пользователь программы – оператор.

Пользователь программы (оператор) должен иметь высшее профильное образование и сертификаты компании-производителя (или уполномоченного официального представителя) операционной системы и программного пакета Matlab.

Пользователь программы (оператор) должен обладать практическими навыками работы с графическим пользовательским интерфейсом операционной системы.

Пользователь программы (оператор) должен обладать практическими навыками работы с графическим пользовательским интерфейсом и языком программирования программы Matlab.

Пользователь программы (оператор) должен обладать знаниями по масс-спектрометрии и практическими навыками по биоинформационной обработке масс-спектров.

Пользователь должен быть аттестован на II квалификационную группу по электробезопасности (для работы с конторским оборудованием).

### **3. Выполнение программы**

#### **3.1. Загрузка и запуск программы**

Перед загрузкой и запуском программы оператор создает на жестком диске две директории и помещает в одну директорию - текстовые файлы, содержащие списки масс ионов веществ для контрольной группы измерений, в другую директорию – текстовые файлы, содержащие списки масс ионов веществ для экспериментальной группы измерений.

Файлы, содержащие списки масс ионов веществ должны быть текстовыми файлами, сгенерированными в программе DataAnalysis (версия 3.4, “Bruker Daltonics”) и иметь следующий формат:

- первая строка через табуляцию содержать следующие символы:

#	m/z	I
---	-----	---

- последующие строки содержат:

первая колонка – последовательную нумерацию масс ионов веществ;

вторая колонка – после одной табуляции, значения масс ионов метаболитов с точностью до 4-го знака после запятой;

третья колонка – после одной табуляции, значения интенсивностей соответствующих масс-спектрометрических пиков.

Пример списка масс ионов веществ (масс-листа), являющегося входными данными:

#	m/z	I
1	78,9152	32
2	79,9542	82
3	80,9134	86
4	80,9613	36
5	81,9503	8
6	83,0471	9
7	85,0606	7

.....

...

Оператор должен указать адреса директорий, содержащих масс-листы, в явном виде в качестве переменной для функции, считывающей название файлов. Формат указания директорий:

{кавычки} {логический диск}:\{адрес директории} {кавычки}

Пример указания адреса директории:

'D:\Спектры\Эксперимент\';

Для запуска программы в командную строку операционной системы Windows необходимо ввести команду:

start matlab -automation -r "barcode".

### 3.2. Выполнение программы

При запуске программы начинается ее выполнение.

### **3.3. Завершение выполнения программы**

Программа завершается самостоятельно после выполнения работы. Завершение работы программы Matlab обеспечивается стандартными средствами операционной системы или вводом команды 'quit' в интерфейс программы.

## **4. Сообщения оператору**

### **4.1. Тексты сообщений, выдаваемых в ходе выполнения программы**

В процессе выполнения программы в окно интерфейса программы Matlab выдаются сообщения о ходе выполнения расчетов блоками программы. Сообщения выдаются черным шрифтом и не требуют от оператора никаких действий. В случае возникновения ошибки при выполнении кода программы, в окно интерфейса выдаются сообщения о типе ошибки, ее номер и номер строки программного кода, вызвавшей ошибку.

### **4.2. Действия оператора**

После завершения программы оператор получает файл с выходными данными. Выходные данные программы сохраняются в корневую директорию программы в виде единого файла с форматом, принятым Matlab для сохранения текущих переменных рабочей области, с названием файла соответствующем времени его генерации и расширением "\*.m". В сохраненный файл входят:

- матрица выровненных масс-спектрометрических данных;
- матрица штрих-кодов;
- вектор с интервалами масс-спектра, которым соответствуют данные матрицы с выровненными масс-спектрометрическими данными и матрицы с штрих-кодами;
- матрица с результатами статистического анализа штрих-кодов;
- результаты классификации штрих-кодов.

Формат выходных данных указан в описании программы "barcoder".

В случае нерегламентированного прекращения работы программы и появления сообщения об ошибке выполнения программного кода (сообщение выдается красным цветом), оператору необходимо прочитать данное сообщение и устранить указанную в нем ошибку, после чего перезапустить программу. Описания кодов ошибки имеются в руководстве по эксплуатации программы Matlab.

## Код программы,

написанный на языке технического программирования программного пакета Matlab, реализующий алгоритм выравнивания масс-спектров метаболитов.

Автор алгоритма – к.б.н. Лохов П.Г.

Автор кода программы – к.б.н. Лохов П.Г.

```
% intensities.m - матрица масс-спектров, которую требуется выровнять
data=importdata('intensities.m'); % импорт данных

edges=data.edges; % "edges" содержит значения m/z для масс-
% спектрометрических пиков
intensities= data.final; % "intensities" содержит значения
% интенсивностей для масс-спектрометрических
% пиков

binary_matrix=zeros(size(intensities,1), size(intensities,2));
for i=1:size(intensities,1)

    for ii=1:size(intensities,2)
        if intensities(i,ii)~=0
            binary_matrix(i,ii)=1;
        end
    end
end

for tresh=-0.7:0.02:-0.01
    iteration=iteration+1;
    corr_coeff=corr(binary_matrix');
```

```

for i=2:size(corr_coeff,1)

    if corr_coeff(i,i-1)<tresh
        accum_corr_coeff(iteration,i-1)=corr_coeff(i,i-1);

        if sum(binary_matrix(i,:))> sum(binary_matrix(i-1,:))

            for ii=1:size(binary_matrix,2)
                if (binary_matrix(i,ii)==0) & (binary_matrix(i-
1,ii)==1)

                    binary_matrix(i,ii)=binary_matrix(i-1,ii);
                    intensities(i,ii)=intensities(i-1,ii);

                    binary_matrix(i-1,ii)=0; intensities(i-1,ii)=0;

                end
            end
        else
            for ii=1:size(binary_matrix,2)
                if (binary_matrix(i,ii)==1) & (binary_matrix(i-
1,ii)==0)

                    binary_matrix(i-1,ii)=binary_matrix(i,ii);
                    intensities(i-1,ii)=intensities(i,ii);

                    binary_matrix(i,ii)=0; intensities(i,ii)=0;

                end
            end
        end
    end

end

binary_matrix_cut=zeros(size(intensities,1), size(intensities,2));
intensities_cut=zeros(size(intensities,1), size(intensities,2));
edges_cut=0;

```

```
ii=0;
for i=1:size(binary_matrix,1)
if sum(binary_matrix(i,:))>0
ii=ii+1;
binary_matrix_cut(ii,:)= binary_matrix(i,:);
intensities_cut(ii,:)= intensities(i,:);
edges_cut(ii)=edges(i);
end
end

binary_matrix=binary_matrix_cut(1:ii,:);
intensities=intensities_cut(1:ii,:);
edges=edges_cut;
end
```