

¹H-ЯМР-СПЕКТРОСКОПИЯ ПЛАЗМЫ КРОВИ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ИЗМЕНЕНИЙ В МЕТАБОЛИЗМЕ ПРИ РАЗВИТИИ САРКОМЫ М-1 У КРЫС

© 2024 г. А.Е. Егоров*, А.С. Быков*, Т.И. Пономарева**, М.В. Молчанов*,
Н.М. Панкратова***, А.Н. Панкратов***, А.Г. Аракелян*, С.Н. Корякин****, М.А. Тимченко*.,#

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
ул. Институтская, 3, Пушкино Московской области, 142290, Россия

**Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук, просп. Науки, 6, Пушкино Московской области, 142290, Россия

***Институт математических проблем биологии РАН – филиал Федерального исследовательского центра
«Институт прикладной математики им. М.В. Келдыша Российской академии наук»,
ул. проф. Виткевича, 1, Пушкино Московской области, 142290, Россия

****Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба – филиал Национального медицинского
исследовательского радиологического центра Министерства здравоохранения Российской Федерации,
ул. Королёва, 4, Обнинск, Калужская область, 249036, Россия

#E-mail: maria_timchenko@mail.ru

Поступила в редакцию 14.03.2024 г.

После доработки 18.06.2024 г.

Принята к публикации 03.07.2024 г.

Для оценки эффективности метода ЯМР-метабономики для обнаружения изменений в метаболизме при канцерогенезе с помощью ¹H-ЯМР-спектроскопии нами было проведено сравнение количественного состава метаболитов в плазме крови крыс для здоровой группы животных и группы животных, которым перевивали саркому М-1. У исследуемых групп после перевивки саркомы отбирали плазму на 12-е и на 36-е сутки для выявления метаболитов, ассоциированных с развитием опухоли. Анализ ЯМР-спектров с применением многомерных статистических методов показал, что исследуемые группы различались уже на 12-е сутки после перевивки, на 36-е сутки отличие было существенным. Количественно определяли 23 метаболита. На 12-е сутки достоверно отличались между группами только лактат и аллантоин, тогда как на 36-е сутки различались уже 9 метаболитов. Все обнаруженные метаболиты участвуют в метаболизме рака, что позволяет расценивать ¹H-ЯМР-спектроскопию как перспективный метод диагностики рака.

Ключевые слова: ЯМР-спектроскопия, метабономика, саркома М-1.

DOI: 10.31857/S0006302924040178, **EDN:** NFUWPX

Во всем мире с каждым годом наблюдается увеличение частоты случаев возникновения рака и высокий уровень смертности от него. Ежегодно в России диагностируется более 600 тысяч новых случаев рака, причем смертность от онкологических заболеваний занимает второе место по летальности после заболеваний сердечно-сосудистой системы. В первый год с момента установления диагноза умирает практически каждый третий человек. Основная проблема заключается в том, что рак диагностируется уже на поздних стадиях, когда лечение может быть неэффектив-

но. Следовательно, приоритетным направлением является внедрение широкого спектра методов для ранней диагностики рака. Обнаружение рака на ранних стадиях дает возможность проводить своевременное лечение, что увеличивает вероятность выживаемости, позволяет избежать сложной и болезненной противоопухолевой терапии, а также позволяет снизить стоимость лечения, что, в целом, улучшает качество жизни пациента.

Основными используемыми на сегодняшний день в медицине методами выявления рака на ранней стадии являются клинические и биохимические анализы крови, мочи, анализ крови на онкомаркеры, а также широкий спектр инструментальных методов: компьютерная томография, магнитно-резонансная томография, флюорогра-

Список сокращений: ЯМР – ядерный магнитный резонанс; ТСП – 3-триметилсилил-[2,2,3,3-²H₄] пропионат натрия; м.д. – миллионная доля.

фия, ультразвуковые исследования. В качестве одного из перспективных методов ранней диагностики рака, а также оценки эффективности терапии может выступать спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопия). ЯМР-анализ биологических жидкостей позволяет одновременно количественно определять до 70 метаболитов. ЯМР позволяет отслеживать изменения метаболических профилей при естественном прогрессировании заболевания или после различных стадий лечения за счет колебаний концентраций обнаруженных метаболитов. Этот метод соответствует многим критериям, которые позволяют ему быть мощным аналитическим инструментом для метаболомных исследований биологических жидкостей: минимальная пробоподготовка или ее отсутствие, экономическая эффективность, беспристрастность, быстрота (получение результата уже через 15 мин), надежность, воспроизводимость, возможность получения количественных данных, его неинвазивность. Благодаря этим особенностям можно будет уменьшить необходимость инвазивного сбора тканей.

ЯМР-спектроскопию используют для исследования состава биологических жидкостей еще с 1980-х годов. Этот метод предоставляет подробную структурную информацию об органических молекулах и позволяет идентифицировать и каталогизировать большое количество соединений. К настоящему времени накоплено огромное количество данных по метаболическому анализу с помощью ЯМР-спектроскопии биологических жидкостей при различных видах рака как для модельных животных, так и для человека. Согласно литературным данным [1–4], чувствительность и специфичность выявления развития раковых заболеваний на ранних стадиях методом ЯМР-спектроскопии достигает 90–100%, с такой же высокой специфичностью можно выявить развитие метастаз, а также провести дифференцировку различных видов рака с определением стадии рака.

Саркомы представляют собой редкие и гетерогенные опухоли мезенхимального происхождения и составляют 1% случаев рака у взрослых и 15% случаев рака у детей [5]. Большая часть сарком ($\approx 75\%$) развивается из мягких тканей, меньшая часть ($\approx 10\%$) – из костей [6].

Для сарком, как и для других опухолей, характерна аномальная метаболическая активность, но имеющиеся данные о метаболоме сарком мягких тканей и костей относительно скудны. Предыдущие исследования по метаболомике саркомы в основном проводились на клеточных линиях [7, 8] из-за гораздо большей простоты замораживания их метаболомного статуса; метаболом быстро реагирует на изменения в кислороде, кровоснаб-

жении и т. д. Кроме того, с помощью масс-спектрометрического анализа была проведена оценка метаболитов в тканях при сарcomaх высокой степени злокачественности, включая лейомиосаркому высокой степени злокачественности, миксофибросаркому, недифференцированную плеоморфную саркому и остеосаркому [9]. Метод ЯМР-спектроскопии (^{31}P - ^1H - ^2H -ЯМР-спектроскопии) *in vivo* был применен для оценки концентрации фосфатных метаболитов в тканях при радиационно-индуцированной фибросаркоме [10].

Метаболомный анализ биологических жидкостей при некоторых видах саркомы применялся только в отдельных исследованиях. В работе [11] с помощью метода газовой хроматографии и масс-спектрометрии было проведено профилирование низкомолекулярных метаболитов в сыворотке и моче пациентов с остеосаркомой для установления изменений, связанных с канцерогенезом. Метод ^1H -ЯМР-спектроскопии был использован только в работе [12] для определения дифференциального метаболического профиля в сыворотке крови пациентов с хондронидными опухолями (энхондромы и хондросаркомы).

Дальнейшая характеристика метаболического профиля при различных видах саркомы позволит усовершенствовать диагностику и определить новые терапевтические цели, что улучшит выживаемость и качество жизни пациентов.

В данной работе с помощью ^1H -ЯМР-спектроскопии был проведен анализ изменений в составе метаболитов и их концентрации при росте опухоли в плазме крови крыс с перевивной поверхностной солидной соединительнотканной саркомой М-1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Исследования выполнены на самцах беспородных белых крыс массой тела 150–170 г. В работе использовали две группы крыс (по 5 крыс в каждой группе), представлявших собой контрольную группу и группу с привитой на заднюю лапку саркомой М-1 [13]. Животных содержали в стандартных условиях вивария Комплекса протонной терапии МРНЦ им. А.Ф. Цыба согласно всем нормативным актам, принятым для подобных учреждений.

Отбор образцов крови. Первый отбор крови проходил через 12 суток после перевивки опухоли, второй – на стадии некроза за несколько дней до терминальной стадии (36 суток после перевивки опухоли). Кровь забирали путем ампутации кончика хвоста. Кровь отбирали в вакуумные литий-гепариновые пробирки, центрифугировали (2200 g, 10 мин) и отбирали плазму, после чего помещали в морозильную камеру и хранили при -20°C до анализа.

Подготовка образца для ЯМР-спектроскопии. Образцы плазмы крыс (в среднем по 100 мкл каждый) размораживали, добавляли 500 мкл дистиллированной воды и 30 мкл 4 мМ стандарта ТСП – 3-триметилсилил-[2,2,3,3- $^2\text{H}_4$] пропионата натрия (Sigma-Aldrich, США) в 1 М фосфатном буфере (pH 7.2) на тяжелой воде, интенсивно перемешивали и центрифугировали при 10000 об/мин 5 мин. Образец (600 мкл) помещали в ЯМР-ампулу диаметром 5 мм.

Регистрация и предварительная обработка 1D-ЯМР-спектров. Протонные 1D-спектры регистрировали в Центре коллективного пользования ИТЭБ РАН на ЯМР-спектрометре AVANCE III 600 фирмы Bruker (Германия) с рабочей частотой по протонам 598.95 МГц. Спектры регистрировали с использованием стандартных импульсных последовательностей из библиотеки импульсных последовательностей фирмы Bruker. Все измерения проводили при 298 К (25°C). Для подавления сигнала от протонов воды использовался метод предварительного насыщения с применением 1D-импульсной последовательности CPMG. Число накоплений составляло 64 скана, спектральная ширина – 24 м.д. При снятии ЯМР-спектров интервал между сканами составлял 10 с, этого было достаточно для релаксации протонов всех наблюдаемых метаболитов. Отнесение химических сдвигов проводили по сигналу глюкозы, расположенному в интервале 5.15–5.30 м.д., в качестве внутреннего образца сравнения выступал ТСП. Для подтверждения наших результатов использовали спектральную базу данных программного обеспечения AMIX (версия 3.9.7) фирмы Bruker. Обработку спектров и вычисление интегралов проводили в программе TOPSPIN (версия 2.1) фирмы Bruker.

Нецелевой анализ данных ЯМР-спектроскопии. Нецелевой анализ полученного набора спектральных данных ЯМР проводили с использованием языка программирования R (версия 4.3.0) в среде RStudio (версия 2023.06.0+421) и библиотеки metabom8 [14] с открытым исходным кодом, доступной на ресурсе GitHub (github.com/tkimhofer/metabom8, версия 1.0.0). Калибровка спектров была выполнена по дублету глюкозы, расположенному в интервале 5.15–5.30 м.д. Так же были выполнены коррекция базовой линии, нормализация PQN [15], удалены высокопольные и низкопольные области спектра, содержащие шумы и сигнал от ТСП, кроме того, была удалена область 4.50–5.00 м.д., содержащая остаточные сигналы протонов воды. Анализ главных компонент (PCA) и дискриминантный анализ (O-PLS-DA) использовался для оценки межгрупповых различий и вклада в это отдельных метаболитов. Перед применением этих методов выполняли шкалирование данных методами Парето и UV.

Указанные многомерные методы анализа данных выполнялись с использованием уже упомянутой ранее библиотеки metabom8, в которой для их выполнения есть соответствующие функции.

Статистический анализ. Для оценки уровня значимости межгрупповых различий полученных показателей был проведен анализ полученных метаболитов в 12-е и 36-е сутки исследования непараметрическим *U*-критерием Манна–Уитни. Кроме того, было проведено сравнение групп контроля в 12-е и 36-е сутки для исключения из исследования метаболитов, имеющих отличия в группах контроля. Различия считали достоверными при $U_{кр} \leq 4$ (для двух групп по 5 особей в каждой) и $p < 0.05$.

Для исследования отобраны метаболиты, у которых нет значимых отличий в группах контроля.

Также использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена как интегральный показатель отличий между разными особями.

Для определения метаболитов плазмы крови, которые вносят основной вклад в диагностику при развитии саркомы, были построены ROC-кривые для значимых по критерию Манна–Уитни метаболитов.

На основе анализа кривой рабочих характеристик приемника (ROC) также рассчитывали площадь под кривой ROC (AUC) для оценки значений чувствительности и специфичности.

Для поиска метаболитов были использованы интернет-ресурсы Biochemical Pathways (<https://biochemical-pathways.com/>, дата доступа: 14.02.2024) и MetaboLights (<https://www.ebi.ac.uk/metabolights>, дата доступа: 14.02.2024), для построения картинки применяли модуль python schemdraw. В качестве базы данных использовали KEGG PATHWAY (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>, дата доступа: 14.02.2024).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для контрольной группы крыс и группы с перерезанной саркомой М-1 были получены ^1H -ЯМР-спектры плазмы крови на 12-е и 36-е сутки после перевивки.

Для оценки, существует ли значительная разница между исследуемыми группами (здоровыми и больными животными), полученные ^1H -ЯМР-спектры, для которых предварительно была проведена фазовая коррекция в программе TOPSPIN, анализировались с помощью многомерного статистического анализа с использованием метода главных компонент в библиотеке metabom8 [14]. Метод главных компонент является наиболее популярным неконтролируемым статистическим методом для обработки данных, полученных с помощью различных омикс-техно-

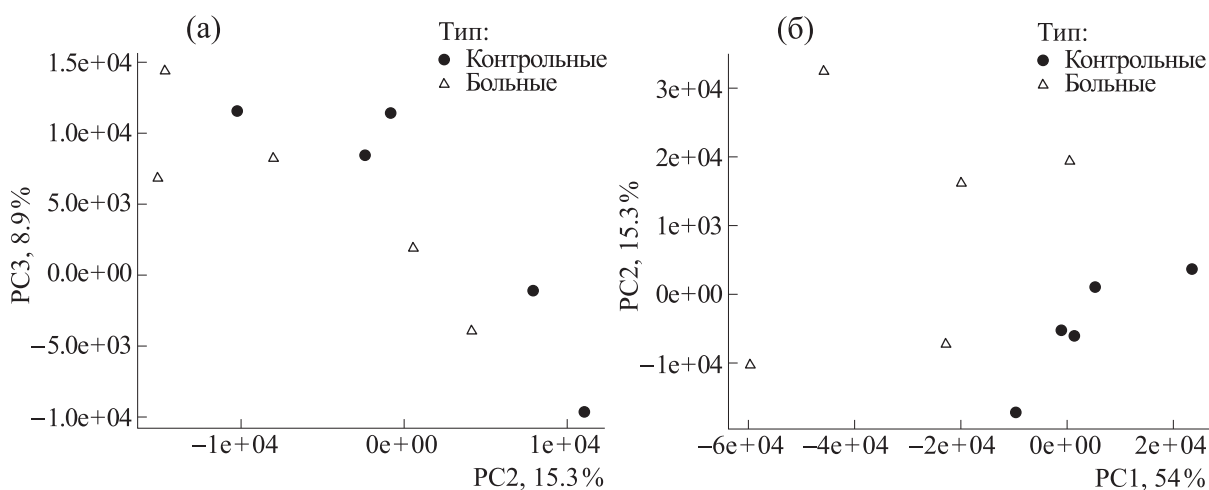


Рис. 1. Различия групп крыс (контрольной и с саркомой М-1) в пространстве главных компонент: (а) – различия, наблюдаемые на 12-е сутки перевивки опухоли, (б) – на 36-е сутки. Первые три главные компоненты описывают около 78% вариации исходных данных.

логий, и не требует никаких предварительных предположений или знаний. Неконтролируемые методы обычно представляют собой первый шаг в анализе данных, помогая визуализировать данные и обнаружить возможные выбросы [16]. Результаты анализа с помощью метода главных компонент спектров, полученных для плазмы крови здоровой группы и группы крыс с саркомой М-1 на 12-е сутки после ее перевивки, приведены на рис. 1.

Как видно из приведенных данных, группы дифференцируются между собой уже на 12-е сутки после привития саркомы, на 36-е сутки различия становятся значительными.

Для выявления метаболитов, которые вносят вклад в различие между группами, используются методы с обучающей выборкой [16], что позволяет более эффективно выявлять низкомолекуляр-

ные биомаркеры, характеризующие конкретное заболевание. К полученным данным для разных дней был применен один из таких статистических методов – дискриминантный анализ ортогональных проекций на латентные структуры (OPLS-DA) в библиотеке *metabom8* (рис. 2), который показал хорошее разделение групп на 36-е сутки.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что исследуемые группы отличаются, что позволяет предположить, что метаболиты, различие в которых позволяет дифференцировать группы, могут рассматриваться как биомаркеры данной стадии заболевания.

Был проведен поиск и количественный анализ метаболитов в плазме крови контрольной и больной групп. С помощью ЯМР-анализа с использованием базы данных AMIX (Bruker, Германия)

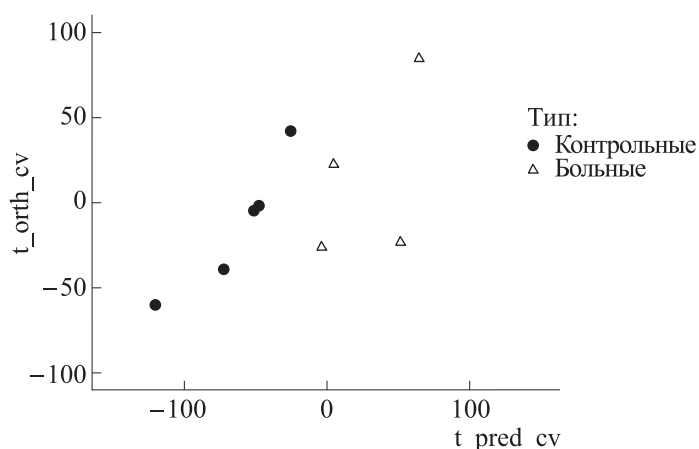


Рис. 2. Анализ различий групп крыс (контрольной и с саркомой М-1) с помощью OPLS-DA на 36-е сутки.

Таблица 1. Метаболиты, обнаруженные в плазме крови крыс с помощью ^1H -ЯМР-спектроскопии

	Метаболиты	Химические сдвиги (м.д.) и мультиплетность, $\text{pH } 7.2 \pm 0.1$	Отличие внутри контрольной группы на 12-е и 36-е сутки	Отличие между контрольной и экспериментальной группами на 12-е сутки	Отличие между контрольной и эксперимен- тальной группами на 36-е сутки
1	Формиат	8.459 s [CH]			
2	Тирозин	6.903 d [аром. CH]; 7.198 d [аром. CH]			
3	Аллантоин	5.393 s [CH]		+	+
4	Глюкоза	3.251 dd [2CH] (β -изомер); 5.239 d [1CH] (α -изомер)	+	+	
5	Серин	3.835 m [CH]; 3.970 m [CH ₂]			+
6	Бетаин	3.26 s [N-(CH ₃) ₃]; 3.91 s [CH ₂]			+
7	Треонин	1.331 d [CH ₃]; 3.579 d [CH]; 4.249 m [CH]			+
8	Глицин	3.56 s [CH ₂]			
9	Холин	3.207 s [N-(CH ₃) ₃]; 3.525 m [CH ₂]; 4.067 m [CH ₂]	+		
10	Креатинин	3.048 s [CH ₃]; 4.059 s [CH ₂]	+		
11	Креатин	3.040 s [CH ₃]; 3.933 s [CH ₂]			
12	Лизин	1.487 m [CH ₂]; 1.733 m [CH ₂]; 1.908 m [CH ₂]; 3.030 t [CH ₂]; 3.755 t [CH]	+		+
13	Глутамин	2.138 m [CH ₂]; 2.455 m [CH ₂]; 3.765 t [CH]			+
14	Сукцинат	2.41 s [CH ₂]			+
15	Пируват	1.487 s [CH ₃] (диол); 2.376 s [CH ₃] (кетон); (кетон/диол~10)			+
16	Ацетон	2.230 s [CH ₃]			
17	Ацетат	1.920 s [CH ₃]	+		+
18	Аланин	1.483 d [CH ₃]; 3.785 q [CH]	+		
19	Лактат	1.331 d [CH ₃]; 4.114 q [CH]		+	+
20	3-Гидроксibuтират	1.203 d [CH ₃]; 2.307 dd [CH ₂]; 2.410 dd [CH ₂]; 4.152 m [CH]	+		+

Таблица 1. Окончание

	Метаболиты	Химические сдвиги (м.д.) и мультиплетность, pH 7.2 ± 0.1	Отличие внутри контрольной группы на 12-е и 36-е сутки	Отличие между контрольной и экспериментальной группами на 12-е сутки	Отличие между контрольной и экспериментальной группами на 36-е сутки
21	Валин	0.994 d [CH ₃]; 1.045 d [CH ₃]; 2.277 m [CH]; 3.612 d [CH]	+		+
22	Изолейцин	0.943 t [CH ₃]; 1.013 d [CH ₃]; 1.986 m [CH]; 1.268 m [½CH ₂]; 1.477 m [½CH ₂]; 3.674 m [CH]			
23	Лейцин	0.965 t [CH ₃]; 1.719 m [CH; CH ₂]; 3.738 m [CH]			+

Примечание. s – Синглет, d – дублет, dd – дублет дублетов, t – триплет, m – мультиплет, «+» – достоверное отличие концентраций метаболитов в группах.

обнаружено и количественно определено 23 метаболита в плазме крови крыс (табл. 1).

U-критерий Манна–Уитни показал, что внутри контрольной группы на 12-е и 36-е сутки концентрации нескольких метаболитов достоверно отличались (табл. 1). Изменение концентраций данных метаболитов, скорее всего, связано с возрастом мышей. Для более точного определения маркеров развития саркомы эти метаболиты были исключены из дальнейшего рассмотрения. Различия считали достоверными при $U_{кр} \leq 4$ (для двух групп из 5 особей каждая), $p < 0.05$.

Для оценки вариации между особями использовали ранговую корреляцию Спирмена по всем обнаруженным метаболитам (рис. 3). Чем ближе коэффициент корреляции к единице, тем меньше различие между особями. На рис. 3 приведены результаты вычисления корреляции между векторами метаболитов для всех записей: записи 1–5 соответствуют контрольной группе на 12-е сутки, записи 6–10 – экспериментальной группе на 12-е сутки, записи 11–15 – контрольной группе на 36-е сутки и записи 16–20 – экспериментальной группе на 36-е сутки. Левая карта отображает корреляцию для полных векторов метаболитов, а правая карта – корреляцию для реду-

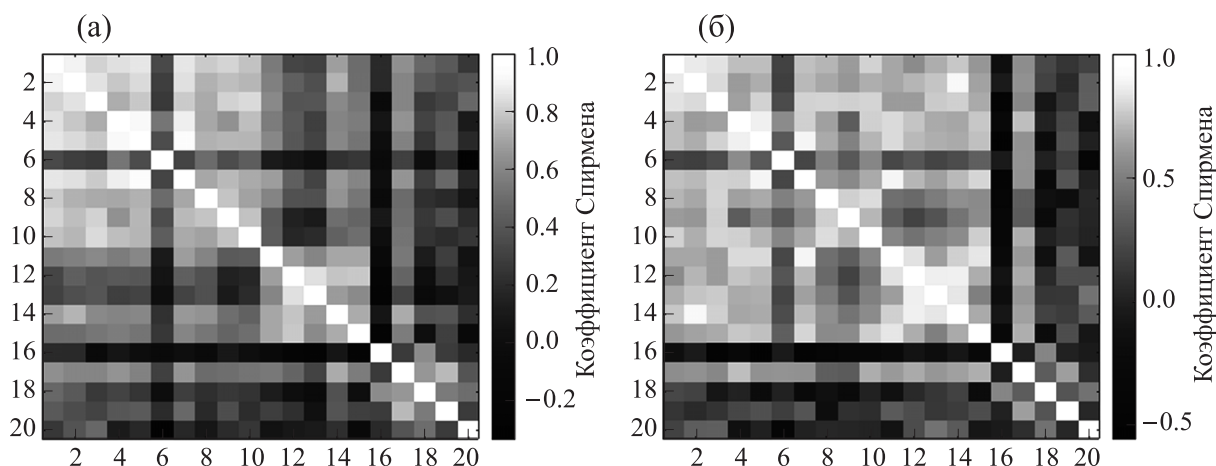


Рис. 3. Карта взаимной попарной ранговой корреляции Спирмена между векторами измерений метаболитов для всех особей: (а) – для всех метаболитов; (б) – после исключения метаболитов, достоверно изменяющихся внутри контрольной группы в ходе эксперимента.

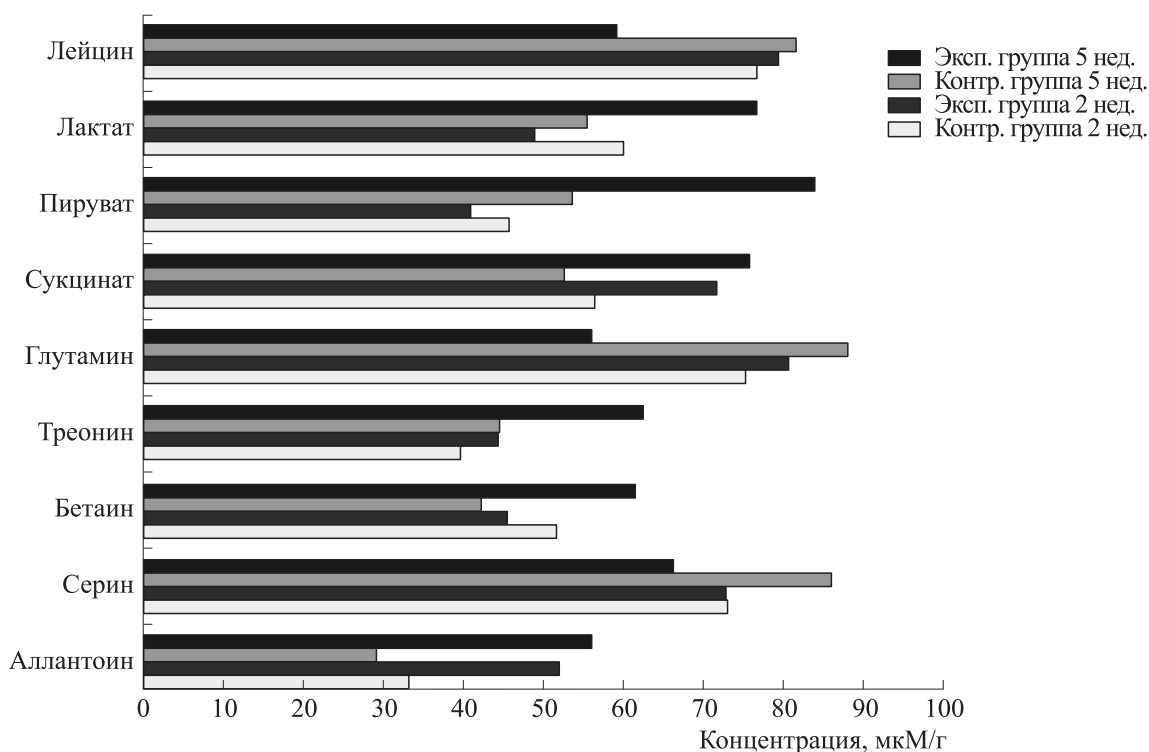


Рис. 4. Средние значения концентраций статистически значимых метаболитов в группах на 12-е и 36-е сутки эксперимента.

цированных векторов, из которых удалены метаболиты, отличающиеся в контрольной группе на 12-е и на 36-е сутки, согласно табл. 1. Видно, что после удаления 8 метаболитов (табл. 1, столбец 3) корреляции между записями контрольной группы на 12-е и на 36-е сутки выравниваются по отношению к корреляциям между записями внутри группы. Также видно, что 6 запись, соответствующая одной особи в экспериментальной группе, существенно отличается уже на 12-е сутки от других особей в группе. Карта также показывает, что особи экспериментальной группы на 36-е сутки значимо различаются от группы контроля.

Обнаружено, что уже на 12-е сутки после перевивки саркомы содержание аллантаина и лактата в плазме крови крыс с опухолью достоверно возросло по сравнению с контрольной группой. К 36-м суткам развития опухоли у больных крыс в качестве возможных маркеров саркомы определяется уже 9 метаболитов (табл. 1).

На рис. 4 показано изменение концентраций метаболитов, имеющих достоверное отличие между контрольной и экспериментальной группами на 12-е и 36-е сутки, за исключением метаболитов, по которым найдено достоверное отличие в контрольной группе на 12-е и 36-е сутки.

Далее для метаболитов, которые достоверно отличались по *U*-критерию Манна–Уитни, были построены ROC-кривые. Площадь под ROC-

кривой (AUC) отражает диагностическую силу исследуемого параметра (в нашем случае — метаболита). В качестве маркеров развития саркомы были отобраны метаболиты, у которых AUC строго больше 0.8. На рис. 5 показаны ROC-кривые для аллантаина и лактата на 12-е сутки эксперимента, при этом AUC имеют хорошее диагностическое значение — 0.88 и 0.92 соответственно.

На 12-е сутки группы различались по содержанию двух метаболитов — лактата и аллантаина, а через 36 суток — по содержанию 9 метаболитов (аллантаина, серина, бетаина, треонина, глутамина, сукцината, пирувата, лактата, лейцина). Построенные ROC-кривые для этих метаболитов показаны на рис. 6 с указанием значений AUC.

Таким образом, были выделены метаболиты, достоверно значимые при развитии опухоли между контрольной группой и группой с саркомой М-1 на 12-е и 36-е сутки после перевивки опухоли. В табл. 2 показаны значения AUC для ROC-кривых метаболитов, которые могут быть маркерами развития саркомы, с указанием направления (+/–) динамики концентраций относительно группы контроля. Согласно экспертной шкале для значений AUC, по которой можно судить о качестве теста [17], считается, что значение $0.8 < AUC \leq 0.9$ говорит об очень хорошем качестве теста, значение $0.9 < AUC \leq 1$ — об отличном качестве теста. В соответствии с этой градацией

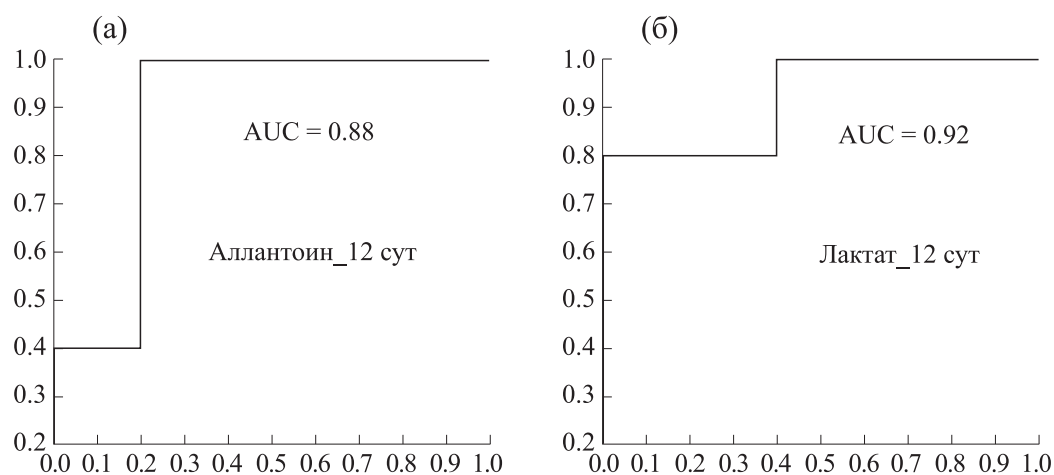


Рис. 5. ROC-кривые (AUC) для достоверно значимых метаболитов на 12-е сутки эксперимента.

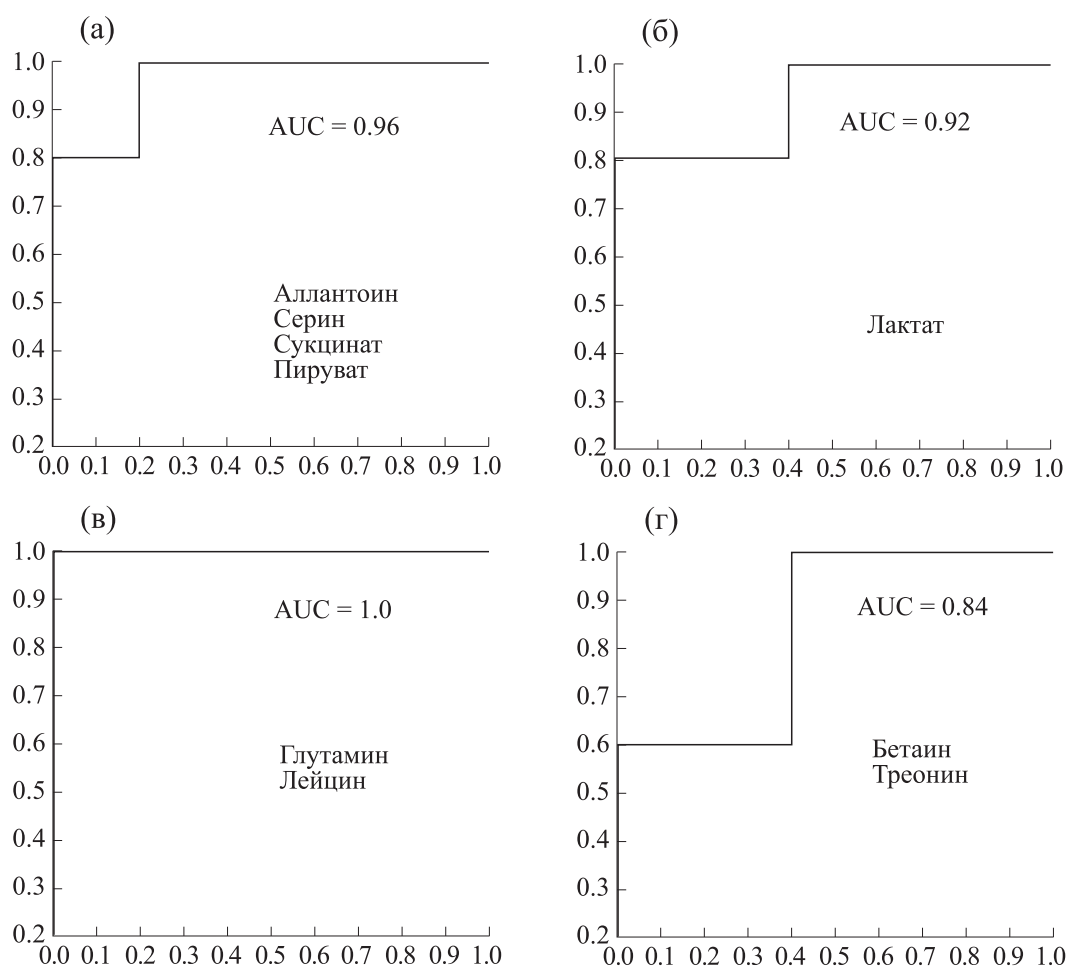


Рис. 6. ROC-кривые (AUC) для достоверно значимых метаболитов на 36-е сутки эксперимента.

Таблица 2. Площадь под ROC-кривой метаболитов-маркеров на 12-е и 36-е сутки после перевивки саркомы М-1

	Аллантоин	Серин	Бетаин	Треонин	Глутамин	Сукцинат	Пируват	Лактат	Лейцин
12-е сутки	0.88 +							0.92 —	
36-е сутки	0.96 +	0.96 —	0.84 +	0.84 +	1 —	0.96 +	0.96 +	0.92 +	1 —

Примечание. «+» — Увеличение концентрации метаболита в экспериментальной группе по сравнению с группой контроля, «—» — уменьшение концентрации метаболита в экспериментальной группе по сравнению с группой контроля.

на 12-е сутки эксперимента метаболит аллантоин является очень хорошим классификатором, а лактат — отличный классификатор развития саркомы. На 36-е сутки эксперимента 2 из 9 отобранных метаболита (бетаин и треонин) являются очень хорошими классификаторами, а остальные 7 (аллантоин, серин, глутамин, сукцинат, пируват, лактат, лейцин) — отличные классификаторы, они могут быть использованы в качестве маркеров развития саркомы. К тому же два из этих маркера (лактат и аллантоин) проявляют себя уже на 12-е сутки эксперимента.

Известно, что метаболические изменения, вызванные канцерогенезом, можно обобщить в шести признаках метаболизма рака: дерегулированное поглощение глюкозы и аминокислот, использование оппортунистических способов

получения питательных веществ, использование промежуточных продуктов цикла гликолиза/трикарбоновой кислоты для биосинтеза и производства НАДФН, повышенная потребность в азоте, изменения в регуляции генов, управляемых метаболитами, и метаболических взаимодействиях с микроокружением опухоли [18].

Метаболические пути, в которых участвуют метаболиты, различающиеся между группами, представлены на рис. 7.

На поздней стадии (36-е сутки после перевивки саркомы) изменение концентрации большей части обнаруженных метаболитов коррелирует с перечисленными признаками рака. Рост уровня лактата и пирувата обусловлен аэробным гликолизом (эффектом Варбурга) [18]. Пролиферирующие клетки используют эффект Варбурга регули-

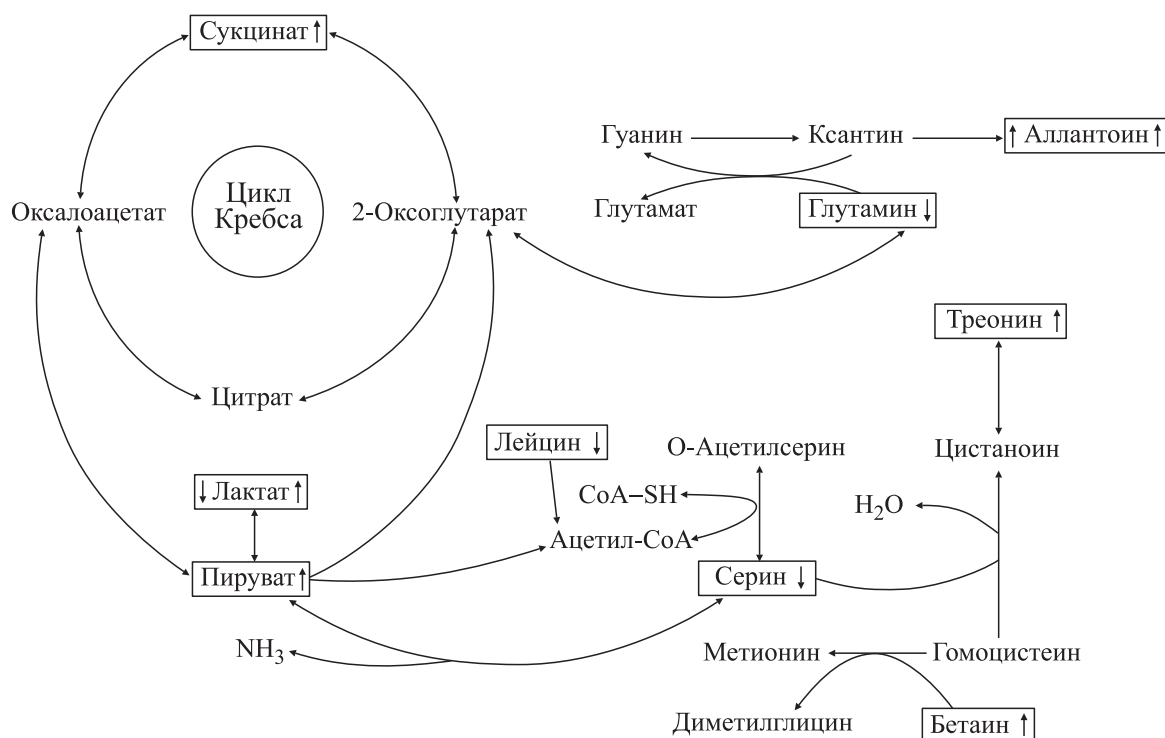


Рис. 7. Схематическое представление метаболических путей, в которых участвуют метаболиты, различающиеся между группами (выделены рамками).

руемым образом в периоды повышенной потребности в биосинтезе. Они превращают избыток пирувата в лактат вместо того, чтобы транспортировать его в митохондрии. Надо отметить, что в работе [11] при исследовании метаболизма сыворотки крови при остеосаркоме авторы описывают значительное снижение содержания пирувата и лактата, что не согласуется с метаболическими изменениями при других видах рака. Возможно, это характерная особенность остеосаркомы, но нельзя исключать, что это может быть связано как с малой выборкой, представленной в работе, так и со сложностью установления стадии рака и вероятными сопутствующими патологиями у пациентов, которые сложно детектировать, поскольку исследования проводятся не на модельных организмах.

Еще одним важным спутником канцерогенеза является глутамин, наиболее распространенная аминокислота в плазме, которая обеспечивает критические элементы для пролиферации клеток, такие как углерод и азот [18]. Снижение уровня глутамина может быть связано с усилением глутаминализа, необходимого для обеспечения предшественников для синтеза нуклеиновых кислот [19, 20]. Приток глутамина в цитоплазму зависит, в том числе, и от серина, уровень которого также снижается. Изменения затрагивают и другие аминокислоты: снижаются уровни тирозина, лейцина, в то же время растет содержание треонина.

Кроме того, очевидно влияние развития опухоли на цикл Кребса, о чем свидетельствует рост уровней сукцината и пирувата.

Также на поздней стадии развития саркомы М-1 было обнаружено повышение уровня бетаина. Раковым клеткам требуются одноуглеродные фрагменты для поддержания их биосинтеза, пролиферации и выживания. Будучи важным донором метила, бетаин играет решающую роль в метаболизме рака. Бетаин может синтезироваться эндогенно в результате двухстадийной реакции окисления холина посредством митохондриальной холиндегидрогеназы и бетаин-альдегиддегидрогеназы. Как было показано в работе [21], высокий уровень бетаина в сыворотке связан с повышенным риском развития рака.

Следует отметить, что на ранней стадии развития саркомы (М-1) достоверно отличались между группами только два метаболита — лактат и аллантоин. Уровень лактата на начальном этапе снижался, как и в работе [11] при развитии остеосаркомы, а уровень аллантоина возрастал, причем эта тенденция характерна и для поздней стадии саркомы М-1. Аллантоин представляет собой основной продукт окисления уратов, конечных продуктов пуринового обмена, и является биомаркером окислительного стресса [22], кото-

рый, как известно, ассоциируется со всеми этапами опухолевой болезни.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение ^1H -ЯМР-спектроскопии в сочетании с многомерным статистическим анализом позволило успешно отличить метаболический профиль плазмы крыс с саркомой М-1 от профиля здорового контроля. Библиотека metabom8 дала возможность существенно ускорить процедуру обработки и анализа ЯМР-спектров, что позволяет рассматривать ее в качестве перспективного подхода в клинической практике, имеющей дело с большими выборками. Метаболический профиль саркомы М-1 обнаружил нарушение в метаболизме лактата и аллантоина на ранней стадии развития опухоли (12-е сутки после перевивки), на более поздней стадии (36-е сутки после перевивки) наблюдалось нарушение в метаболических циклах, в которых были задействованы 9 метаболитов — ряд аминокислот (тирозин, серин, треонин, лейцин, глутамин), метаболиты, задействованные в аэробном гликолизе и цикле Кребса (лактат, пируват и сукцинат), биомаркер окислительного стресса аллантоин, а также бетаин. Полученные данные о составе метаболитов, обнаруженных на поздней стадии, коррелируют с накопленными в литературе данными по метаболизму различных видов рака.

Таким образом, ЯМР-метабомика является, несомненно, перспективным диагностическим подходом для выявления рака, причем отдельные обнаруженные метаболиты могут выступать в качестве маркеров определенного его вида.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность сотрудникам vivария Комплекса протонной терапии МРНЦ им. А.Ф. Цыба Т.С. Хозяшевой и Т.В. Колесниковой, а также заведующему группой прикладной энзимологии ИБП ФИЦ ПНЦБИ РАН Е.А. Согорину за помощь в проведении эксперимента.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственных заданий № 075-00224-24-00 (для ИТЭБ РАН) и № 122041100157-2 (для ИМПБ РАН — филиала ИПМ им. М.В. Келдыша РАН).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены. Все манипуляции с животными проводились в соответствии с требованиями, разработанными комиссией по этике МРНЦ им. А.Ф. Цыба, и с Директивой Совета 2010/63 ЕС Европейского парламента и Регламентом Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в научных целях (Страсбург, Франция).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Vignoli A., Ghini V., Meoni G., Licari C., Takis P. G., Tenori L., Turano P., and Luchinat C. High-throughput metabolomics by 1D NMR. *Angewandte Chemie (Int. ed. in English)*, **58** (4), 968–994 (2019). DOI: 10.1002/anie.201804736
- Larkin J. R., Anthony S., Johanssen V. A., Yeo T., Sealey M., Yates A. G., Smith C. F., Claridge T. D. W., Nicholson B. D., Moreland J. A., Gleeson F., Sibson N. R., Anthony D. C., and Probert F. Metabolomic biomarkers in blood samples identify cancers in a mixed population of patients with nonspecific symptoms. *Clin. Cancer Res.*, **28** (8), 1651–1661 (2022). DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-21-2855
- Casadei-Gardini A., Del Coco L., Marisi G., Conti F., Rovesti G., Ulivi P., Canale M., Frassinetti G. L., Foschi F. G., Longo S., Fanizzi F. P., and Giudetti A. M. ¹H-NMR based serum metabolomics highlights different specific biomarkers between early and advanced hepatocellular carcinoma stages. *Cancers*, **12** (1), 241 (2020). DOI: 10.3390/cancers12010241
- Singh A., Prakash V., Gupta N., Kumar A., Kant R., and Kumar D. Serum metabolic disturbances in lung cancer investigated through an elaborative NMR-based serum metabolomics approach. *ACS Omega*, **7** (6), 5510–5520 (2022). DOI: 10.1021/acsomega.1c06941
- Florou V., Nascimento A. G., Gulia A., and de Lima Lopes G. Jr. Global health perspective in sarcomas and other rare cancers. *American Society of Clinical Oncology Educational Book (Am. Soc. of Clin. Oncol. Annu. Meet.)*, **38**, 916–924 (2018). DOI: 10.1200/EDBK_200589
- Casali P. G., Abecassis N., Aro H. T., Baue S., Biagini R., Bielack S., Bonvalot S., Boukovinas I., Bovee J. V. M. G., Brodowicz T., Broto J. M., Buonadonna A., De Álava E., Dei Tos A. P., Del Muro X. G., Dileo P., Eriksson M., Fedenko A., Ferraresi V., Ferrari A., Ferrari S., Frezza A. M., Gasperoni S., Gelderblom H., Gil T., Grignani G., Gronchi A., Haas R. L., Hassan B., Hohenberger P., Issels R., Joensuu H., Jones R. L., Judson I., Jutte P., Kaal S., Kasper B., Kopeckova K., Krákorová D. A., Le Cesne A., Lugowska I., Merimsky O., Montemurro M., Pantaleo M. A., Piana R., Picci P., Piperno-Neumann S., Pousa A. L., Reichardt P., Robinson M. H., Rutkowski P., Safwat A. A., Schöffski P., Sleijfer S., Stacchiotti S., Sundby Hall K., Unk M., Van Coevorden F., van der Graaf W. T. A., Whelan J., Wardelmann E., Zaikova O., and Blay J. Y. ESMO Guidelines Committee and EURACAN. Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO-EURACAN clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals Oncol.*, **29** (Suppl. 4), iv51–iv67 (2018). DOI: 10.1093/annonc/mdy096
- Chen K., Zhu C., Cai M., Fu D., Cheng B., Cai Z., Li G., and Liu J. Integrative metabolome and transcriptome profiling reveals discordant glycolysis process between osteosarcoma and normal osteoblastic cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **140** (10), 1715–1721 (2014). DOI: 10.1007/s00432-014-1719-y
- Das S., Chatterjee N., Bose D., Banerjee S., Jha T., and Saha K. D. Leishmanial sphingolipid induces apoptosis in Sarcoma 180 cancer cells through regulation of tumour growth via angiogenic switchover. *Tumour Biol.*, **36** (4), 3109–3118 (2015). DOI: 10.1007/s13277-014-2947-0
- Lou S., Balluff B., Cleven A. H. G., Bovée J. V. M. G., and McDonnell L. A. Prognostic metabolite biomarkers for soft tissue sarcomas discovered by mass spectrometry imaging. *J. Am. Soc. Mass Spectrometry*, **28** (2), 376–383 (2017). DOI: 10.1007/s13361-016-1544-4
- Shungu D. C., Bhujwala Z. M., Li S. J., Rose L. M., Wehrle J. P., and Glickson J. D. Determination of absolute phosphate metabolite concentrations in RIF-1 tumors in vivo by ³¹P-¹H-²H NMR spectroscopy using water as an internal intensity reference. *Magnetic Resonance in Medicine*, **28** (1), 105–121 (1992). DOI: 10.1002/mrm.1910280111
- Zhang Z., Qiu Y., Hua Y., Wang Y., Chen T., Zhao A., Chi Y., Pan L., Hu S., Li J., Yang C., Li G., Sun W., Cai Z., and Jia W. Serum and urinary metabonomic study of human osteosarcoma. *J. Proteome Res.*, **9** (9), 4861–4868 (2010). DOI: 10.1021/pr100480r
- López-Garrido L., Bañuelos-Hernández A. E., Pérez-Hernández E., Tecualt-Gómez R., Quiroz-Williams J., Ariza-Castolo A., Becerra-Martínez E., and Pérez-Hernández N. Metabolic profiling of serum in patients with cartilage tumours using ¹H-NMR spectroscopy: A pilot study. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **58** (1), 65–76 (2020). DOI: 10.1002/mrc.4925
- Южаков В. В., Севаньяева Л. Е., Ульяненко С. Е., Яковлева Н. Д., Кузнецова М. Н., Цыганова М. Г., Фомина Н. К., Ингель И. Э. и Лычагин А. А. Эффективность фракционированного воздействия γ-излучения и быстрых нейтронов на саркому М-1. *Радиаци. биология. Радиоэкология*, **53** (3), 267–279 (2013). DOI: 10.7868/S0869803113020148, EDN: QBHSLV
- Kimhofer T. Metabom8 (Version 1.0.0) [Computer software] (2021). URL: <https://github.com/tkimhofer/metabom8> (дата обращения: 10.06.2023).

15. Dieterle F., Ross A., Schlotterbeck G., and Senn H. Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in ¹H NMR metabonomics. *Anal. Chem.*, **78** (13), 4281–4290 (2006). DOI: 10.1021/ac051632c
16. Trygg J., Holmes E., and Lundstedt T. Chemometrics in metabonomics. *J. Proteome Res.*, **6** (2), 469–479 (2007). DOI: 10.1021/pr060594q
17. Metz C. E. Basic principles of ROC analysis. *Seminars in Nuclear Medicine*, **8** (4), 283–298 (1978). DOI: 10.1016/s0001-2998(78)80014-2
18. Esperança-Martins M., Fernandes I., Soares do Brito J., Macedo D., Vasques H., Serafim T., Costa L., and Dias S. Sarcoma metabolomics: current horizons and future perspectives. *Cells*, **10** (6), 1432 (2021). DOI: 10.3390/cells10061432
19. Lai H. S., Lee J. C., Lee P. H., Wang S. T., and Chen W. J. Plasma free amino acid profile in cancer patients. *Seminars in Cancer Biology*, **15** (4), 267–276 (2005). DOI: 10.1016/j.semcancer.2005.04.003
20. Altman B. J., Stine Z. E., and Dang C. V. From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer*, **16** (10), 619–634 (2016). DOI: 10.1038/nrc.2016.71
21. Xie H., Zhang K., Wei Y., Ruan G., Zhang H., Li S., Song Y., Chen P., Liu L., Wang B., and Shi H. The association of serum betaine concentrations with the risk of new-onset cancers: results from two independent nested case-control studies. *Nutrition & Metabolism*, **20** (1), 46 (2023). DOI: 10.1186/s12986-023-00755-y
22. Gruber J., Tang S. Y., Jenner A. M., Mudway I., Blomberg A., Behndig A., Kasiman K., Lee C. Y., Seet R. C., Zhang W., Chen C., Kelly F. J., and Halliwell B. Allantoin in human plasma, serum, and nasal-lining fluids as a biomarker of oxidative stress: avoiding artifacts and establishing real *in vivo* concentrations. *Antioxidants & Redox Signaling*, **11** (8), 1767–1776 (2009). DOI: 10.1089/ars.2008.2364

¹H-NMR Spectroscopy of Blood Plasma for Detection of Changes in Metabolism during the Development of Sarcoma M-1 in Rats

A.Y. Egorov*, A.S. Bykov*, T.I. Ponomareva**, M.V. Molchanov*, N.M. Pankratova***, A.N. Pankratov***, A.G. Arakelyan*, S.N. Koryakin****, and M.A. Timchenko*

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

**Branch of M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, prosp. Nauki 6, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

***Institute of Mathematical Problems of Biology, Russian Academy of Sciences – Branch of M.V. Keldysh Institute of Applied Mathematics, Russian Academy of Sciences, ul. Professora Vitkevicha 1, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

****A.F. Tsyba Medical Radiological Research Centre – Branch of the «National Medical Research Radiological Centre», Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Koroleva 4, Obninsk, Kaluga Region, 249036 Russia

An assessment of the effectiveness of ¹H NMR-based metabolomic analysis for the detection of metabolic changes during carcinogenesis was made based on a comparison of the quantitative composition of metabolites in the blood plasma of rats for healthy rats and rats receiving M-1 sarcoma transplantation. Plasma was collected from the rats under study on day 12 and day 36 after sarcoma transplantation to identify metabolites associated with tumor development. Analysis of NMR spectra using multivariate statistical methods showed differences in the composition of metabolites for the groups of animals under study already on day 12 after sarcoma transplantation; on day 36 the differences were significant. 23 metabolites were quantified. On day 12, only the lactate and allantoin levels were significantly different between the groups, while on day 36, the levels of 9 metabolites were different in rats in all groups. All of the metabolites identified are involved in cancer metabolism, which makes ¹H NMR spectroscopy a promising method for cancer diagnosis.

Keywords: NMR spectroscopy, metabolomics, sarcoma M-1