

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 577.121

ДИЗАЙН МЕТАБОЛОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ: ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЙ ЭТАП

Кессених Е. Д.¹, Осинцева Е. С.², Мигунова М. А.¹,
Кривошеина М. И.¹, Мурашко Е. А.^{1, 2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Научный центр мирового уровня «Центр персонализированной медицины», Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт медицинского образования, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Мурашко Екатерина Александровна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: murashko_ea@almazovcentre.ru

Статья поступила в редакцию 13.02.2024
и принята к печати 26.03.2024.

РЕЗЮМЕ

Метаболомика — это комплексный анализ малых молекул, участвующих в метаболических путях, которые управляют биохимическими процессами и функциями клеток организма. Метаболомные исследования состоят из трех основных этапов: преаналитический, аналитический и постаналитический. В обзоре сделан акцент на важность преаналитического этапа, который представляет собой путь биообразца от пациента в биобанк и далее в аналитическую лабораторию. В обзоре на основе анализа литературных данных представлены факторы, которые влияют на качество образца и, следовательно, на качество конечного результата исследований: сбор клинической информации, выбор биоматрицы, сбор и обработка биообразцов и их последующее хранение. Правильный дизайн метаболомных исследований, контроль качества образцов от сбора до анализа физико-химическими методами обеспечивают получение данных, которые могут улучшить качество диагностики заболеваний, обеспечить переход к персонализированной медицине.

Ключевые слова: контроль качества биообразцов, кровь, метаболомика, плазма, преаналитический этап, сыворотка.

Для цитирования: Кессених Е.Д., Осинцева Е.С., Мигунова М.А. и др. Дизайн метаболомных исследований: преаналитический этап. Российский журнал персонализированной медицины. 2024;4(2):145-155. DOI: 10.18705/2782-3806-2024-4-2-145-155. EDN: PEIXAL

DESIGN OF METABOLOMIC STUDIES: PRE-ANALYTICAL PROCESS

**Kessenikh E. D.¹, Osintceva E. S.², Migunova M. A.¹,
Krivosheina M. I.¹, Murashko E. A.^{1, 2}**

¹ Almazov National Medical Research Centre, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Saint Petersburg, Russia

² Almazov National Medical Research Centre, Institute of medical education, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Murashko Ekaterina A.,
Almazov National Medical Research
Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg,
Russia, 197314.
E-mail: murashko_ea@almazovcentre.ru

Received 13 February 2024; accepted
26 March 2024.

PE3IOME

Metabolomics is the comprehensive analysis of small molecules involved in metabolic pathways that control biochemical processes and functions of cells in the body. Metabolomic studies consist of three major steps: pre-analytical, analytical and post-analytical. The review emphasizes the importance of the pre-analytical stage, which is the journey of a biosample from the patient to the biobank and then to the analytical laboratory. Based on the literature analysis, the review presents the factors that influence the quality of the sample and therefore the quality of the final research result: clinical information collection, biosample selection, biosample collection and processing, and subsequent storage. Proper design of metabolomic studies, quality control of samples from collection to analysis by physicochemical methods provides data that can improve the quality of disease diagnosis, provide a transition to personalized medicine.

Key words: blood, metabolomics, plasma, pre-analytical process, quality control of biosamples, serum.

For citation: Kessenikh ED, Osintceva ES, Migunova MA, et al. Design of metabolomic studies: pre-analytical process. Russian Journal for Personalized Medicine. 2024;4(2):145-155. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2024-4-2-145-155. EDN: PEIXAL

Список сокращений: ВЭЖХ-МС — высокоэффективная жидкостная хроматография — масс-спектрометрия, жидкостная хроматомасс-спектрометрия, ГХ-МС — газовая хроматография — масс-спектрометрия, газовая хроматомасс-спектрометрия, СОП — стандартная операционная процедура, ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота, ЯМР — спектроскопия ядерного магнитного резонанса.

ВВЕДЕНИЕ

Метабомика — это комплексный анализ малых молекул, участвующих в метаболических путях, которые управляют биохимическими процессами и функциями клеток организма [1]. Метаболом наиболее полно отражает состояние организма человека под влиянием внутренних и внешних факторов, включая изменение окружающей среды, образ жизни, наличие или отсутствие заболеваний, прием лекарств, диету. Метабомика лучше всего моделирует молекулярный фенотип здоровья и болезней, позволяет определить новые биомаркеры заболеваний [2]. Метабомика наряду с геномикой и протеомикой активно вовлекается в клиническую лабораторную диагностику для изучения различных патологий [3, 4].

Метаболомные исследования состоят из трех основных этапов: преаналитический, аналитический и постаналитический. Преаналитический этап представляет собой путь биообразца от пациента в биобанк, из биобанка в аналитическую лабораторию. На аналитическом этапе проводят анализ собранного биоматериала. Основными физико-химическими методами метаболомики являются масс-спектрометрия и хроматомасс-спектрометрия, а также спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) на различных ядрах (^1H , ^{13}C , ^{31}P и пр.) [3, 4]. Преимущества ЯМР заключаются в простоте пробоподготовки и интерпретации спектра, а также в достижении высокой производительности. Метод ЯМР менее чувствителен, чем масс-спектрометрия, а также требует большого количества биообразца [3, 5]. Основные преимущества масс-спектрометрии — высокая чувствительность и селективность. Метаболомные исследования проводят как методом масс-спектрометрии прямого ввода (direct infusion mass spectrometry) [1, 6], так и с использованием гибридных методов с предварительным хроматографическим разделением — хроматомасс-спектрометрии [3, 7, 8]. Постаналитический этап заключается в статистической обработке полученных данных. Для этой цели зачастую используют доступное про-

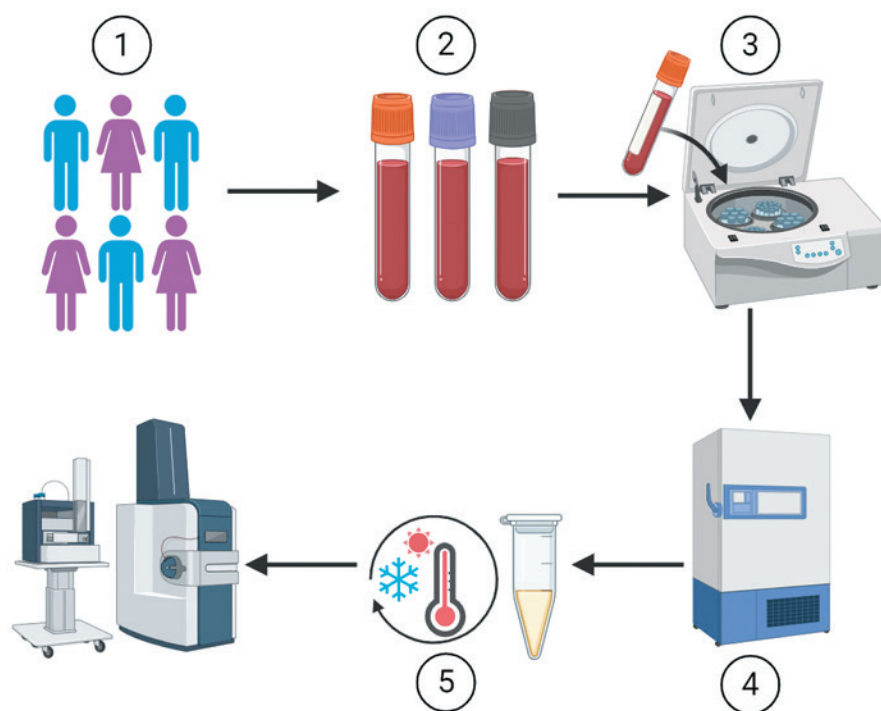


Рис. 1. Преаналитический этап метаболомных исследований (www.biorender.com)

Figure 1. Pre-analytical stage of metabolomics studies (www.biorender.com)

граммное обеспечение, например, Metaboanalyst 5.0 [9, 10]. Идентификация метаболитов проводится по базам данных, таким как HMDB (Human Metabolome Database) и KEGG Pathway Database (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) [11].

В данном обзоре сделан акцент на важность преаналитического этапа. Согласно статистике, большинство ошибок в лабораторной медицине происходит на преаналитическом этапе — 65 %, вклад аналитического и постаналитического этапов — 15 % и 20 % [12].

Преаналитический этап можно разделить на ряд подэтапов: 1 — дизайн эксперимента и сбор клинической информации; 2 — выбор биоматрицы и получение биообразцов от пациентов; 3 — пробоподготовка биообразцов до биобанкирования; 4 — длительное хранение; 5 — пробоподготовка перед анализом (рис. 1).

1. ДИЗАЙН ЭКСПЕРИМЕНТА

Преаналитический этап начинается с дизайна метаболических исследований. Метабомика позволяет изучать патологию без четкой гипотезы о взаимосвязи заболевания с каким-либо конкретным метаболитом или нарушением метаболического пути. Такой подход известен как нецелевая или обзорная метабомика. Второй подход — целевая метабомика позволяет подтвердить имеющуюся гипотезу с помощью количественного определения конкретных метаболитов [5, 13]. От выбранного подхода зависит протокол исследования. Нецелевой подход требует большей выборки изучаемых объектов, чем целевой подход [14]. Также возможен гибридный формат проведения метаболических исследований [13].

На этапе планирования врач должен ответить на целый ряд вопросов, например, выбор биоматрицы и количество образцов, происхождение этих образцов — из одного медицинского центра или нескольких, соблюдение этических норм и т. д. Важным этапом является разработка анкеты для сбора клинической информации, параметры включения или исключения из выборки. Такие минимальные параметры, как пол и возраст, должны быть дополнены данными о стадии течения изучаемого заболевания, сопутствующих заболеваниях, принимаемых лекарственных средствах, индексе массы тела, вредных привычках (курение), образе жизни (занятия спортом), диете и др. [15, 16]. Чем тщательнее собраны сведения об участниках исследования, тем лучше интерпретация полученных данных. Выбор образцов с различной клинической информацией может помочь лучше понять механизмы заболевания, его прогрессирование

и действие лекарств или выявить и исключить влияние этих факторов, в зависимости от цели исследования. Удобная схема планирования предложена в работе Kirwan и соавторов (2018) (рис. 2) [15].

2. ВЫБОР БИОМАТРИЦЫ И СБОР БИООБРАЗЦОВ ОТ ПАЦИЕНТОВ

Сбор проб — самый важный шаг в метаболических исследованиях. Качество биологических образцов определяет уровень качества последующих исследований. В метаболических исследованиях наиболее часто используют мочу и кровь, что обусловлено простотой и минимальной инвазивностью методов их сбора, при этом данные матрицы хорошо отражают метаболизм организма [4, 16]. Моча содержит большое число метаболитов и конечных продуктов, образовавшихся из метаболизируемых питательных веществ и лекарств, тогда как большинство метаболитов в крови отражают метаболизм эндогенных веществ [4, 17].

Стоит отметить, что состав мочи, в отличие от плазмы или сыворотки, сильно зависит от потребления жидкости, поэтому для использования данной матрицы при метаболическом профилировании необходимо проводить нормализацию данных, например, на содержание креатинина или диурез за 24 ч. Также немаловажным является тот факт, что образцы мочи собирают непосредственно участники исследования, а не медицинский персонал, что может привести к несоблюдению требований сбора и хранения, установленных соответствующей стандартной операционной процедурой (СОП) [16]. Особенности преаналитического этапа с использованием мочи разобраны в работах [16, 18, 19].

Основными объектами исследований в метабомике являются фракции крови — сыворотка и плазма. Сухие пятна (DBS — Dried Blood Spots) также используются в ряде работ, однако не так часто [20–24]. В настоящее время нет единого мнения, какой из образцов лучше — сыворотка или плазма. Эти биожидкости представляют собой водные растворы, содержащие белки и пептиды, углеводы, липиды, аминокислоты, электролиты и множество других небольших органических молекул [25, 26]. Обе фракции могут быть успешно применены в метабомике, если сбор образцов стандартизирован, и одна и та же матрица образцов остается постоянной на протяжении всего исследования.

Сыворотку и плазму получают из крови в результате разделения с клеточной массой, однако их рассматривают как разные биоматрицы. Различия связаны с биологической природой этих жидкостей: во время процесса свертывания клетки крови



Рис. 2. Схема планирования метаболомных исследований. Адаптировано из Kirwan, et al. (2018)

Figure 2. Metabolomics study design flowchart. Adapted from Kirwan, et al. (2018)

метаболически активны, что приводит к изменениям концентрации метаболитов. Затем влияние внешнего фактора небиологического происхождения — добавление антикоагулянта в случае плазмы или активатора свертывания крови в случае сыворотки. Эти соединения изменяют метаболом, влияя на концентрацию ряда соединений, их ионизацию, усиливают матричный эффект [25–27]. Ключевым фактором при работе с фракциями крови является выбор контейнера для забора крови.

2.1. Выбор биоматрицы

2.1.1. Сыворотка крови

Сыворотка — жидкая внеклеточная часть крови после завершения процесса свертывания крови — коагуляции. Для отделения сыворотки от клеточной массы пробирку с кровью оставляют при комнатной температуре в течение 30 и более минут. Период коагуляции может быть сокращен в случае использования активатора свертывания. В качестве активаторов применяют кремнезем (SiO_2) и тромбин. Пробирки для забора крови могут содержать биологически инертный гель, компоненты которого вносят вклад в химический шум [28]. Для метаболомных исследований предпочтительно использовать пустые пробирки для получения сыворотки.

2.1.2. Плазма крови

Для получения плазмы крови используют пробирки с добавленными антикоагулянтами, которые предотвращают свертывание крови. Наиболее распространенными являются гепарин, цитрат или ЭДТА.

Гепарин представляет собой полигликозаминогликан. Прямое антикоагулирующее действие связано с активацией перехода протромбина в тромбин. В пробирках для забора крови гепарин применяют в виде соли с ионом лития, реже — с ионом натрия. Оба иона могут оказывать влияние на профиль метаболитов, в случае использования масс-спектрометрии на аналитическом этапе метаболомных исследований. В масс-спектрах будут наблюдаться сигналы аналитов в протонированной форме $[\text{M}+\text{H}]^+$, а также в виде аддуктов $[\text{M}+\text{Li}]^+$ и $[\text{M}+\text{Na}]^+$, что приведет к усложнению интерпретации получаемых данных. Также данные ионы способствуют усилению ионизации полимеров, которые входят в состав пробирок для забора крови. Как следствие, наблюдается усиление матричного эффекта и фонового шума [17, 25].

ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота применяется в виде двукальевой (K_2EDTA), трикальевой (K_3EDTA) или динатриевой соли (Na_2EDTA). Антикоагулирующее действие основано на хелатировании ионов кальция и магния.

Кроме того, ЭДТА ингибирует действие Mg^{2+} -зависимых ферментов эритроцитов, что делает такую плазму более предпочтительной биоматрицей для метаболомики [16]. Выбор ЭДТА в качестве антикоагулянта зависит от метода исследования образцов. Отмечается, что при использовании спектроскопии ЯМР, ЭДТА дает несколько примесных сигналов в спектре, кроме самой кислоты присутствуют сигналы комплексов с кальцием и магнием [26]. А при использовании хроматомасс-спектрометрии, наоборот, ЭДТА-плазма — наиболее подходящая матрица (рис. 3).

Цитрат-ион, как и ЭДТА, обладает хелатирующим действием, связывая ионы кальция. В отличие от гепарина и ЭДТА, цитрат натрия в пробирках для забора крови присутствует в виде раствора с концентрацией 3,2–3,8 %. Это приводит к разбавлению образца и изменению pH и ионной силы, что негативно сказывается на метаболоме. Кроме того, использование данного антикоагулянта делает невозможным определение цитрата (лимонной кислоты) как эндогенного метаболита, входящего в цикл трикарбоновых кислот [18].

Целый ряд экспериментальных работ содержат сравнительный анализ метаболома сыворотки и плазмы [26, 27, 29]. В исследовании Sotelo-Orozco и соавторов (2021) сравнивали 6 различных образцов — сыворотка (без добавок, время коагуляции 45–60 мин) и плазма с антикоагулянтами: гепарин (Na^+); ЭДТА; цитрат натрия; раствор лимонной кислоты, цитрата натрия и декстрозы в воде (ADC — Acid-citrate-dextrose); фторид натрия [30]. Методом ЯМР были идентифицированы 50 метаболитов. Установлено, что плазма с гепарином наиболее близка к сыворотке, затем следует плазма с ЭДТА. Различия выявлены для 3 и 5 метаболитов соответственно. Одиннадцать параметров из 50 отличались в случае сравнения сыворотки и плазмы с фторидом натрия. Метаболиты, различающиеся в матрицах, принадлежали к аминокислотам. Плазма с антикоагулянтами на основе цитрата натрия наиболее сильно отличалась от сыворотки и демонстрировала наиболее сильные мешающие сигналы самих антикоагулянтов.

Аналогичные результаты показаны в работах Vignoli и коллег (2022) и Paglia и соавторов (2018), где сравнивались метаболомные профили сыворотки, плазмы с ЭДТА и цитратом методами спектроскопии ЯМР и ВЭЖХ-МС [26, 27]. Показано, что отличие между плазмой с цитратом в качестве антикоагулянта и сывороткой наиболее выражено, в то время как плазма с ЭДТА занимает промежуточное положение. Установлено, что в сыворотке статистически повышены концентрации ами-

нокислот и их производных, а также биогенных аминов. Отмечено понижение уровня креатинина в цитрат-плазме по сравнению с сывороткой. В ЭДТА-плазме наблюдается повышение концентрации триметиламин-N-оксида и саркозина в сравнении с цитрат-плазмой [26]. Причем в работе Paglia и коллег (2018) установлено, что саркозин идентифицируется в спектрах пустой пробирки с ЭДТА, что делает их нежелательными для измерения данного метаболита [27]. Уровень креатинина ниже в цитрат-плазме, чем в сыворотке. Кроме низкомолекулярных метаболитов, в работе Vignoli и соавторов (2022) показано, что для исследования таких биомаркеров воспаления и сердечно-сосудистых заболеваний, как гликопротеины GlycA и GlycB, больше подходит сыворотка, поскольку в плазме наблюдается занижение уровня данных аналитов. Изменения в профиле липопротеинов менее выражены в зависимости от типа матрицы. Установлено, что 46 из 112 исследованных параметров ниже в плазме, а 5 выше по сравнению с сывороткой. Общее снижение уровня липопротеинов в плазме крови предположительно может быть связано с разбавлением образца в результате осмотического переноса воды из клеток крови, причем данный эффект более выражен при использовании цитрата в качестве антикоагулянта [26].

Кроме уровня отдельных метаболитов, зачастую важно отмечать изменение концентрации одного метаболита в связи с другим. В работе Vignoli с соавторами (2022) отмечено, что подобные взаимосвязи наблюдаются при использовании для метаболомного профилирования различных матриц. Например, уровни янтарной, ацетоуксусной и 3-гидроксимасляной кислот коррелируют между собой в плазме, а в сыворотке крови данная информация утрачена. Для таких аминокислот, как глутамин, глицин и гистидин, наоборот, корреляция наблюдается при исследовании сыворотки, в отличие от плазмы [26].

На рисунке 3 представлены сводные данные, полученные в результате поиска по ключевым словам «метаболомика», «сердечно-сосудистые заболевания» в базе данных PubMed за 2019–2024 гг. К сожалению, многие авторы не указывают антикоагулянт при использовании плазмы, а, как отмечено выше, этот параметр очень важен для сравнения метаболомных данных, полученных разными исследователями.

2.2. Сбор биообразцов

После того, как тип биоматрицы определен, наступает этап непосредственного забора образцов от пациента. Медицинскому персоналу не-

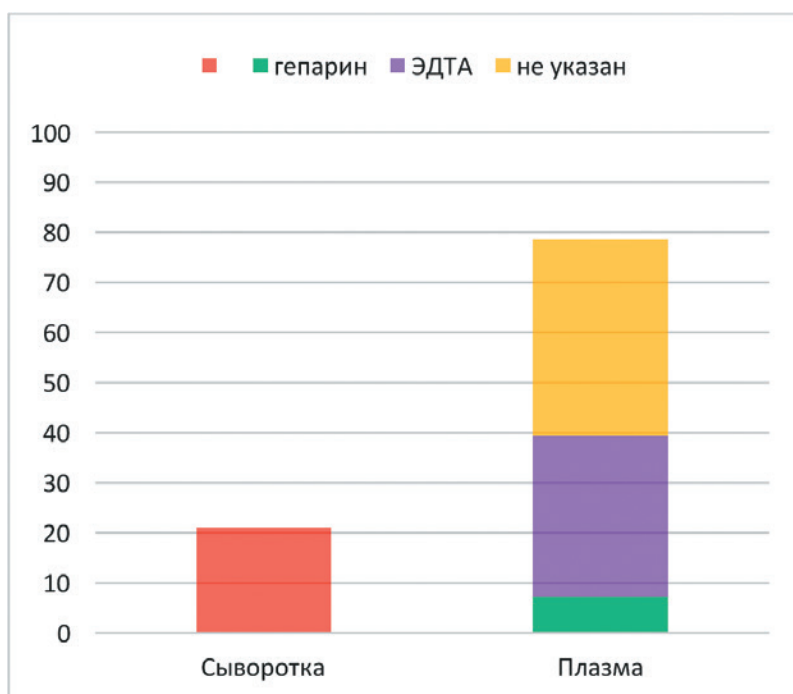


Рис. 3. Данные по типу биообразца при метаболомных исследованиях сердечно-сосудистых заболеваний

Figure 3. Data by biospecimen type in cardiovascular metabolomics studies

обходимо передать протокол или СОП, где четко прописаны метод забора образца, тип контейнера, время забора, последовательность взятия биоматериала в случае использования нескольких биоматриц и т. п. Важным фактором является уровень заполнения кровью вакуумных пробирок. Недостаточный объем крови приводит к разности в концентрациях антикоагулянтов, что вызывает изменения метаболома [12]. На качество образца также влияет количество перемешиваний непосредственно после забора. Рекомендовано 5–10 аккуратных переворачиваний на 180°. Чрезмерно сильное перемешивание может стать причиной гемолиза.

На качество образца также влияет соблюдение пациентами рекомендаций по подготовке к исследованию (натошак, прием лекарств, отсутствие стресса и спортивных нагрузок и т. д.). Эти факторы должны быть учтены при сборе клинической информации и последующем обобщении полученных метаболомных данных.

3. ПРОБОПОДГОТОВКА БИООБРАЗЦОВ

Следующим этапом после забора крови является пробоподготовка образцов, которая в случае крови сводится к получению сыворотки или плазмы и последующему аликвотированию. Критическими факторами на данном этапе являются время от забора до заморозки образца, температура, при которой происходит обработка, и метод обработки.

3.1. Влияние времени и температуры

Содержание метаболитов в крови динамически регулируется для достижения гомеостаза *in vivo*, изменения в составе могут происходить после взятия крови за счет продолжающихся химических реакций, например, процессов окисления и ферментативных реакций, а также за счет высвобождения внутриклеточных соединений [31–34]. Многие метаболиты нестабильны при комнатной температуре и на свету. Важно как можно быстрее получить фракцию крови после забора, аликвотировать образец и заморозить. Во многих исследованиях указан интервал 2 ч. как максимальное время обработки [15, 31, 32, 35]. В случае сыворотки в этот временной интервал входит время коагуляции, которое составляет 30–60 мин. Во время коагуляции продолжаются многие процессы, протекающие при комнатной температуре, которые замедлены или не идут при охлаждении до 4 °С. Плазму крови можно получить практически сразу или поместить образец цельной крови в холодильник до центри-

фугирования, что делает данную биоматрицу более привлекательной для метаболомных исследований [18, 36].

3.2. Центрифугирование цельной крови

Необходимой информацией на этапе планирования или при отборе образцов сыворотки или плазмы является сила центрифугирования, приложенная к цельной крови для разделения эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов. Принято указывать именно относительную центробежную силу (RCF — relative centrifugal force), так как эта величина не зависит от типа используемой центрифуги. А вот скорость центрифугирования, обычно выражаемая в оборотах в минуту (RPM — revolutions per minute), зависит от радиуса ротора. Данные величины могут быть пересчитаны с учетом радиуса ротора используемой центрифуги, где r — радиус ротора в сантиметрах:

$$RCF = 1,118 \times 10^{-5} \times r \times (RPM)^2$$

Обычные силы центрифугирования цельной крови, используемые в рутинных клинических лабораториях и биобанках по всему миру, составляют от 1500 до 4000 g в течение 5–15 мин. [15, 16, 36]. Эритроциты и лейкоциты в этих условиях могут быть удалены, но значительное количество тромбоцитов все еще остается во фракции плазмы. В работе Lesche и соавторов (2016) установлено, что после центрифугирования при 1500 g в течение 10 мин. в плазме с ЭДТА остается 137500 тромбоцитов на микролитр; при 3000 g в течение 5 мин. — 59500 тромбоцитов на микролитр [37]; а при 4000 g в течение 10 мин. было обнаружено 27000 оставшихся тромбоцитов на микролитр [38]. Получение плазмы крови, не содержащей тромбоциты, требует более сложного процесса центрифугирования, который невозможен в большинстве клинических лабораторий. Тромбоциты будут вносить вклад в изменение метаболома за счет высвобождения клеточных липидов и внутриклеточного содержимого в сыворотку или плазму. Однако в работе Liu и коллег (2018) показано лишь незначительное изменение метаболома при использовании 1500 и 3000 g [38]. Также на данном этапе обработки биообразцов влияние оказывает температура. Поскольку нахождение образца при комнатной температуре рекомендуется сводить к минимальному, то центрифугирование рекомендовано выполнять с охлаждением до 4 °С. Стоит отметить, что при многоцентровых исследованиях надлежит использовать образцы, полученные при сходных условиях.

3.3. Гемолиз

Использование чрезмерной силы при центрифугировании цельной крови является частой причиной гемолиза образца. Гемолиз характеризуется высвобождением гемоглобина и других внутриклеточных компонентов, включая структурные белки, ферменты и метаболиты, из эритроцитов после повреждения или разрыва клеточных мембран, что может существенно изменить спектр метаболитов в образцах крови [12, 39]. Гемолиз может произойти также на этапе забора крови, например, в случае использования слишком тонкой иглы. Также гемолиз может возникнуть *in vivo*, как следствие заболеваний или приема лекарственных препаратов.

В работе Kamlage и соавторов (2014) сравнивались профили метаболитов плазмы и искусственно гемолизированных образцов. Контролируемое разрушение эритроцитов проводили путем пропускания крови через шприц с тонкой иглой. Методами ГХ-МС и ВЭЖХ-МС показаны статистически значимые различия в концентрациях целого ряда метаболитов, связанные с гемолизом [31]. В работе Jain и коллег (2017) уровень 5-оксопролина, лактата и отношение концентраций орнитин/аргинин предложено использовать как маркеры метаболизма эритроцитов для оценки качества образцов [35].

Самым простым, хотя и самым ненадежным является визуальное определение наличия гемолиза [40]. Степень гемолиза устанавливают путем сравнения образца с эталонной цветовой шкалой. Более надежным методом является спектрофотометрическое определение концентрации свободного гемоглобина [17]. Если концентрация гемоглобина выше 50 мг/л, проба считается гемолизированной [41]. Образцы с гемолизом должны быть исключены из метаболомного исследования.

4. ДЛИТЕЛЬНОЕ ХРАНЕНИЕ

В 2018 г. в России была образована Национальная ассоциация биобанков и специалистов по биобанкированию (NASBIO) [42]. Сегодня она объединяет 23 российских биобанка, включая биобанк ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России. Это дает возможность проводить многоцентровые метаболомные исследования. На длительное хранение образцы обычно помещают в криохранилища при температуре -80°C . В работах Haid и соавторов (2017) и Wagner-Golbs и коллег (2019) представлены результаты изменения метаболома в течение 5, 7 и 16 лет. Наиболее подвержены изменению сложные липиды, жирные кислоты, ацилканитины и аминокислоты [43, 44].

Важным параметром является количество циклов заморозки-оттаивания. В биобанк необходимо помещать образцы, предварительно разделенные на аликвоты, чтобы исключить повторные циклы заморозки и оттаивания [16, 25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Профилирование метаболома организма помогает объективно диагностировать заболевания, обеспечивает переход к персонализированной медицине. Для благоприятного исхода научных исследований необходимы высококачественные биологические образцы, а достоверные наборы данных имеют решающее значение для успешной идентификации биомаркеров. Строгое соблюдение стандартных операционных процедур преаналитического этапа в конечном счете позволит получить надежные данные и установить связь между метаболитами, нарушениями метаболических путей и патологией.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Marques C, Liu L, Duncan KD, et al. A Direct Infusion Probe for Rapid Metabolomics of Low-Volume Samples. *Anal. Chem.* 2022;94:12875–12883.
2. Rischke S, Hahnefeld L, Burla B, et al. Small molecule biomarker discovery: Proposed workflow for LC-MS-based clinical research projects. *Journal of Mass Spectrometry and Advances in the Clinical Lab* 2023;28:47–55.
3. Yan M, Xu G. Current and future perspectives of functional metabolomics in disease studies — A review. *Analytica Chimica Acta* 2018;1037:41–54.
4. Wishart DS. Metabolomics for Investigating Physiological and Pathophysiological Processes. *Physiological Reviews* 2019;99:1819–1875.
5. Goncharov NV, Ukolov AI, Orlova TI, et al. Metabolomika: na puti integracii biohimii, analiticheskoy himii, informatiki. *Uspekhi sovremennoj biologii* 2015;135:3–17. In Russian [Гончаров Н.В., Уколов А.И., Орлова Т.И. и др. Метаболомика: на пути интеграции биохимии, аналитической химии, информатики. *Успехи современной биологии* 2015;135:3–17].
6. Kozlova A, Shkrigunov T, Gusev S, et al. An Open-Source Pipeline for Processing Direct Infusion Mass Spectrometry Data of the Human Plasma Metabolome. *Metabolites* 2022;12:768.
7. Rey-Stolle F, Dudzik D, Gonzalez-Riano C, et al. Low and high resolution gas chromatography-mass

spectrometry for untargeted metabolomics: A tutorial. *Analytica Chimica Acta* 2022;1210:339043.

8. Segers K, Declerck S, Mangelings D, et al. Analytical techniques for metabolomic studies: a review. *Bioanalysis* 2019;11:2297–2318.

9. Howell A, Yaros C. Downloading and Analysis of Metabolomic and Lipidomic Data from Metabolomics Workbench Using MetaboAnalyst 5.0 [Internet]. In: Bhat-tacharya SK, editor. *Lipidomics*. New York, NY: Springer US; 2023:313–321.

10. Pang Z, Zhou G, Ewald J, et al. Using MetaboAnalyst 5.0 for LC–HRMS spectra processing, multi-omics integration and covariate adjustment of global metabolomics data. *Nat Protoc* 2022;17:1735–1761.

11. Wishart DS, Guo A, Oler E, et al. HMDB 5.0: the Human Metabolome Database for 2022. *Nucleic Acids Research* 2022;50:D622–631.

12. Lippi G, Von Meyer A, Cadamuro J, et al. Blood sample quality. *Diagnosis* 2019;6:25–31.

13. Chen L, Zhong F, Zhu J. Bridging Targeted and Untargeted Mass Spectrometry-Based Metabolomics via Hybrid Approaches. *Metabolites* 2020;10:348.

14. Broadhurst DI, Kell DB. Statistical strategies for avoiding false discoveries in metabolomics and related experiments. *Metabolomics* 2007;2:171–196.

15. Kirwan JA, Brennan L, Broadhurst D, et al. Pre-analytical Processing and Biobanking Procedures of Biological Samples for Metabolomics Research: A White Paper, Community Perspective (for “Precision Medicine and Pharmacometabolomics Task Group” — The Metabolomics Society Initiative). *Clinical Chemistry* 2018;64:1158–1182.

16. Bi H, Guo Z, Jia X, et al. The key points in the pre-analytical procedures of blood and urine samples in metabolomics studies. *Metabolomics* 2020;16:68.

17. Yin P, Lehmann R, Xu G. Effects of pre-analytical processes on blood samples used in metabolomics studies. *Anal Bioanal Chem* 2015;407:4879–4892.

18. González-Domínguez R, González-Domínguez Á, Sayago A, et al. Recommendations and Best Practices for Standardizing the Pre-Analytical Processing of Blood and Urine Samples in Metabolomics. *Metabolites* 2020;10:229.

19. Stevens VL, Hoover E, Wang Y, et al. Pre-Analytical Factors that Affect Metabolite Stability in Human Urine, Plasma, and Serum: A Review. *Metabolites* 2019;9:156.

20. Trifonova, Maslov, Balashova, et al. Evaluation of Dried Blood Spot Sampling for Clinical Metabolomics: Effects of Different Papers and Sample Storage Stability. *Metabolites* 2019;9:277.

21. Li K, Naviaux JC, Monk JM, et al. Improved Dried Blood Spot-Based Metabolomics: A Targeted, Broad-Spectrum, Single-Injection Method. *Metabolites* 2020;10:82.

22. Tobin NH, Murphy A, Li F, et al. Comparison of dried blood spot and plasma sampling for untargeted metabolomics. *Metabolomics* 2021;17:62.

23. Jain A, Morris M, Lin EZ, et al. Hemoglobin normalization outperforms other methods for standardizing dried blood spot metabolomics: A comparative study. *Science of The Total Environment* 2023;854:158716.

24. Ward C, Nallamshetty S, Watrous JD, et al. Non-targeted mass spectrometry of dried blood spots for interrogation of the human circulating metabolome. *J Mass Spectrom* 2021;56:e4772.

25. Chen D, Zhao S, Li L, et al. Controlling pre-analytical process in human serum/plasma metabolomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2023;169:117364.

26. Vignoli A, Tenori L, Morsiani C, et al. Serum or Plasma (and Which Plasma), That Is the Question. *J. Proteome Res.* 2022;21:1061–1072.

27. Paglia G, Del Greco FM, Sigurdsson BB, et al. Influence of collection tubes during quantitative targeted metabolomics studies in human blood samples. *Clinica Chimica Acta* 2018;486:320–328.

28. Ercan M, Firat Oğuz E, Akbulut ED, et al. Comparison of the effect of gel used in two different serum separator tubes for thyroid function tests. *Clinical Laboratory Analysis* 2018;32:e22427.

29. Bovo S, Schiavo G, Galimberti G, et al. Comparative targeted metabolomic profiles of porcine plasma and serum. *animal* 2023;17:101029.

30. Sotelo-Orozco J, Chen SY, Hertz-Picciotto I, et al. A Comparison of Serum and Plasma Blood Collection Tubes for the Integration of Epidemiological and Metabolomics Data. *Front. Mol. Biosci.* 2021;8:682134.

31. Kamlage B, Maldonado SG, Bethan B, et al. Quality Markers Addressing Preanalytical Variations of Blood and Plasma Processing Identified by Broad and Targeted Metabolite Profiling. *Clinical Chemistry* 2014;60:399–412.

32. Moriya T, Satomi Y, Kobayashi H. Intensive determination of storage condition effects on human plasma metabolomics. *Metabolomics* 2016;12:179.

33. Nishiumi S, Suzuki M, Kobayashi T, et al. Differences in metabolite profiles caused by pre-analytical blood processing procedures. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2018;125:613–618.

34. Wang Y, Carter BD, Gapstur SM, et al. Reproducibility of non-fasting plasma metabolomics measurements across processing delays. *Metabolomics* 2018;14:129.

35. Jain M, Kennedy AD, Elsea SH, et al. Analytes related to erythrocyte metabolism are reliable biomarkers for preanalytical error due to delayed plasma processing in metabolomics studies. *Clinica Chimica Acta* 2017;466:105–111.

36. Lehmann R. From bedside to bench — practical considerations to avoid pre-analytical pitfalls and

assess sample quality for high-resolution metabolomics and lipidomics analyses of body fluids. *Anal Bioanal Chem* 2021;413:5567–5585.

37. Lesche D, Geyer R, Lienhard D, et al. Does centrifugation matter? Centrifugal force and spinning time alter the plasma metabolome. *Metabolomics* 2016;12:159.

38. Liu X, Hoene M, Wang X, et al. Serum or plasma, what is the difference? Investigations to facilitate the sample material selection decision making process for metabolomics studies and beyond. *Analytica Chimica Acta* 2018;1037:293–300.

39. Lippi G, Blanckaert N, Bonini P, et al. Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2008;46.

40. Piskunov DP, Danilova LA, Peterson AI, et al. Evaluation of methods of determination of hemolized samples at the preanalytical stage of laboratory studies in the performance of biochemical analysis of human blood. *Lab. sluzh.* 2018;7:111.

41. Sivakova OV, Pokrovskaya MS, Efimova IA, et al. Quality control of serum and plasma samples for scientific research. *Profil. med.* 2019;22:91.

42. Anisimov SV, Meshkov AN, Glotov AS, et al. National Association of Biobanks and Biobanking Specialists: New Community for Promoting Biobanking Ideas and Projects in Russia. *Biopreservation and Biobanking* 2021;19:73–82.

43. Haid M, Muschet C, Wahl S, et al. Long-Term Stability of Human Plasma Metabolites during Storage at –80 °C. *J. Proteome Res.* 2018;17:203–211.

44. Wagner-Golbs A, Neuber S, Kamlage B, et al. Effects of Long-Term Storage at –80 °C on the Human Plasma Metabolome. *Metabolites* 2019;9:99.

Информация об авторах:

Мурашко Екатерина Александровна, к.х.н., заведующий НИЛ метаболомного и метаболического профилирования НИЦ неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины», ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, ассистент кафедры математики и естественнонаучных дисциплин Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Кессених Елизавета Дмитриевна, научный сотрудник НИЛ метаболомного и метаболического профилирования НИЦ неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины», ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Осинцева Екатерина Сергеевна, студент 3 курса лечебного факультета Института медицинского об-

разования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Мигунова Маргарита Александровна, лаборант-исследователь НИЛ метаболомного и метаболического профилирования НИЦ неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины», ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Кривошеина Мария Игоревна, лаборант-исследователь НИЛ метаболомного и метаболического профилирования НИЦ неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины», ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Authors information:

Murashko Ekaterina A., Ph.D, head of laboratory, Laboratory of metabolomic and metabolic profiling, Research Centre of unknown, rare and genetically determined diseases, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Almazov National Medical Research Centre;

Kessenikh Elizaveta D., researcher, Laboratory of metabolomic and metabolic profiling, Research Centre of unknown, rare and genetically determined diseases, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Almazov National Medical Research Centre;

Osintseva Ekaterina S., student, Medical faculty, Institute of medical education Almazov National Medical Research Centre;

Migunova Margarita A., research assistant, Laboratory of metabolomic and metabolic profiling, Research Centre of unknown, rare and genetically determined diseases, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Almazov National Medical Research Centre;

Krivosheina Maria I., research assistant, Laboratory of metabolomic and metabolic profiling, Research Centre of unknown, rare and genetically determined diseases, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Almazov National Medical Research Centre.