

ОПРЕДЕЛЕНИЕ 15 БИОМАРКЕРОВ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ В МОЧЕ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ТАНДЕМНЫМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

© 2023 г. М. А. Ленинский^a, *, Е. И. Савельева^a,
М. В. Беляков^a, Г. В. Каракашев^a, Н. А. Самченко^a

^aНаучно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека
Федерального медико-биологического агентства России
ст. Капитолово, г.п. Кузьмоловский, Всеволожский район, Ленинградская обл., 188663 Россия
*e-mail: m.leninskii@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.04.2023 г.

После доработки 24.04.2023 г.

Принята к публикации 25.04.2023 г.

Обсуждены возможности и ограничения комплексных процедур целевого метаболомного анализа с применением жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС). Представлена ВЭЖХ-МС/МС-методика, позволяющая одновременно определять содержание 15 биомаркеров функционального состояния человека в моче. В качестве целевых аналитов выступают биогенные вещества различной химической природы, базовые концентрации которых в биоматрицах могут различаться значительно — до трех порядков величины и более. Сложность комплексного анализа обусловлена также значительными различиями в гидрофильно-гидрофобных свойствах определяемых веществ. Апробация методики в биоаналитическом эксперименте позволила установить значимые различия в концентрациях ряда биомаркеров в моче людей с разным уровнем физической подготовки. При высоком уровне физической подготовки концентрации этих соединений в моче имеют более низкие значения в сравнении с контрольной группой.

Ключевые слова: жидкостная хроматография, масс-спектрометрическое детектирование, метаболомика, биомаркеры функционального состояния, анализ мочи.

DOI: 10.31857/S0044450223090074, EDN: ZWYNLZ

Масс-спектрометрические методы все чаще применяют в биомедицине, особенно для ранней диагностики и мониторинга заболеваний. Наиболее активно развиваются биоаналитические технологии, использующие в качестве анализируемого материала диагностические биосреды, отобранные неинвазивным способом и транспортируемые из фельдшерского пункта любой отдаленной территории в профильные лаборатории. Важнейшее приложение аналитической масс-спектрометрии в медицине — функциональная диагностика. Функциональная диагностика с помощью инструментальных методов позволяет установить причину плохого самочувствия пациента, особенно в тех случаях, когда симптомы не дают четкой клинической картины. С развитием современных технологий появляется возможность все более раннего выявления сбоев в регуляторных процессах организма. Аналитическая масс-спектрометрия решает многие задачи функциональной диагностики. Возможности хромато-масс-спектрометрии реализу-

ются в функциональной диагностике преимущественно в рамках метаболомики [1].

Функциональная метаболомика, согласно оптимистичным прогнозам, в обозримом будущем от диагностики сможет перейти к “метаболомному перепрограммированию” [2], но в настоящее время развитие метаболомного подхода в функциональной диагностике сдерживается не столько темпами поиска надежных биомаркеров функционального состояния, сколько недостатком надежных и в то же время высокопроизводительных аналитических методик их определения.

Метаболомика стресса. Влияние стресса на функциональное состояние организма исследуют с давних времен и до наших дней. Стресс может быть как провоцирующим, так и усугубляющим фактором для многих заболеваний и патологических состояний, включая резистентность к инсулину [3], метаболический синдром [4], сердечно-сосудистые заболевания [5] и др. Метаболические реакции на стресс настолько обширны, много-

плановы и в то же время индивидуальны, что в большинстве случаев не поддаются точному прогнозу и должны быть диагностированы [6]. Метаболические профили тканей и биожидкостей отражают функциональные изменения в организме. Определение метаболомных показателей биожидкостей позволяет не только выявлять реакции организма на стресс и оценивать изменения в физиологическом статусе, но и проводить мониторинг эффективности фармакологической поддержки в условиях стрессовых воздействий или их последствий.

Многоплановый метаболический ответ на стрессовое воздействие включает такие процессы, как нарушение метаболизма аминокислот и белков, нарушение липидного и углеводного обмена, механическое и/или химическое повреждение миоцитов и многие другие. Профиль низкомолекулярных метаболитов в биожидкостях складывается в результате целого комплекса биохимических процессов. Установить ключевые маркерные соединения, которые являлись бы индикаторами стрессовых воздействий, крайне сложно. Сложность, как это ни парадоксально, обусловлена не дефицитом научных данных, а их огромным количеством. Многочисленные исследования, выполненные средствами нецелевой метаболомики, выявили множество сигнальных биомаркеров применительно к конкретным воздействиям или заболеваниям. Если исследования проводятся с привлечением больших массивов данных, то значимыми оказываются эффекты, обусловленные даже незначительными однонаправленными изменениями концентраций метаболитов в исследуемых биосредах. Неизбежно возникает вопрос: можно ли считать эти незначительные изменения достоверными с учетом крайне низкой точности определения концентраций биомаркеров в нецелевой метаболомике. С другой стороны, зачастую одни и те же биомаркеры характеризуют метаболические последствия воздействия на организм стрессовых факторов различной природы, включая физическое перенапряжение [7, 8]. Это обстоятельство позволяет выделить группу стресс-маркеров, не ассоциированных с конкретным видом стресса. Можно полагать, что концентрации стресс-маркеров в диагностических биожидкостях тем ниже, чем выше ресурс устойчивости организма к стрессу. Однако эта гипотеза нуждается в проверке. Наиболее перспективным направлением представляется исследование мочевой сигнатуры физиологического состояния человека, складывающейся в результате определения абсолютных или нормированных к определенному показателю концентраций ограниченного набора биогенных веществ — стресс-маркеров.

Обоснование выбора мочи в качестве оптимальной биоматрицы. Метаболомные исследования мочи в последние годы оформились в качестве самостоятельного научного направления — уриномики.

Средствами уриномики исследуют нутрицевтические маркеры, маркеры водного баланса, мышечного статуса и т.д. Важнейшими в этом ряду являются маркеры толерантности к стрессовым нагрузкам, т.е. стресс-маркеры. Отбор мочи неинвазивен, может быть осуществлен без участия медперсонала, не требует обеспечения стерильности. В отличие от плазмы крови, моча не требует специальной обработки сразу после отбора, состав органических соединений в моче в меньшей степени подвержен искажениям в процессе отбора, хранения и транспортировки. Как правило, концентрации биогенных аналитов в моче не меняются значительно при прохождении нескольких циклов заморозки-разморозки. Моча в сравнении с кровью менее насыщена органическими соединениями, которые могут окисляться сами, а также выступать в качестве промоторов процесса окисления. В работе [9] сообщается, что в образцах мочи уровни метаболитов признаны стабильными в течение как минимум 24 ч при 10°C и 4 недель при 4°C. Для плазмы и особенно для сыворотки крови установленные периоды стабильности значительно короче.

Моча, в отличие от крови, не имеет механизмов для поддержания гомеостаза, поэтому метаболические профили мочи более изменчивы и быстрее откликаются на стрессовые воздействия.

Целевая метаболомика мочи. В целевой метаболомике достижение низких пределов определения аналитов не всегда является приоритетом, поскольку биогенные аналиты (метаболиты) присутствуют в пробах преимущественно в высоких концентрациях. Наиболее жесткие требования в целевой метаболомике предъявляются к достоверности количественных определений. В настоящее время не существует единого мнения относительно оптимального способа нормализации концентраций биомаркеров в моче. Нормализация необходима, так как содержание воды в моче зависит от ее потребления и ряда других физиологических факторов. Нормализация с отнесением к таким показателям, как концентрация креатинина, плотность, осмоляльность, вероятностная или интегральная нормализация используется наиболее часто [10]. После проведения нецелевого метаболомного анализа с использованием ВЭЖХ-МС/МС в качестве аналитического метода Розен-Волмар с соавт. [11] сравнил эффективность трех распространенных подходов для корректировки концентраций мочевых метаболитов — нормализацию по креатинину, по удельному весу (плотности) и вероятностную нормализацию (probabilistic quotient normalization, PQN). Результаты показали, что нормализация по креатинину не является надежным подходом для корректировки данных метаболомики мочи. Нормализация по плотности, либо PQN были охарактеризованы как более надежные подходы. Причиной ненадежности нормали-

зации данных метаболомных исследований по креатинину, по всей вероятности, следует считать то обстоятельство, что креатинин сам является чувствительным биомаркером, вовлеченным в реализацию ответов на внешние воздействия.

Разработка, валидация и практическая реализация методик для контроля физиологического статуса человека предусматривают решение следующих задач:

- обоснование группы диагностических маркеров, определяемых в биобразцах и характеризующих процессы липолиза, гликолиза, энергетического метаболизма в целом, нейротрансдукции, метаболизма пуринов, холина, креатина;

- разработка аналитической стратегии для определения группы актуальных стресс-маркеров в биопробе;

- определение фоновых концентраций выбранных биомаркеров в исследуемой биопробе (моче), а также ориентировочная оценка вариаций фоновых концентраций, обусловленных влиянием стрессовых факторов;

- определение концентрационных интервалов, в рамках которых необходимо выполнять измерения для каждого аналита-биомаркера и построение градуировочных характеристик внутри установленных интервалов.

На сегодняшний день приемлемой точности определения концентраций биогенных веществ в биопробах можно добиться только в режиме целевого анализа. При определении органических кислот в моче, по мнению ряда авторов [12, 13], стоит отдавать предпочтение газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, позволяющей добиваться эффективного разделения компонентов и работать в области низких матричных эффектов. Такие методики более длительны и трудоемки в исполнении по сравнению с ВЭЖХ-МС/МС, поскольку помимо экстракции включают проведение дериватизации.

Для определения аналитов, представленных группой веществ в широком диапазоне кислотно-основных свойств, методом выбора, как правило, является ВЭЖХ-МС/МС. В технике “dilute and shoot” [14] при подготовке к ВЭЖХ-МС/МС-анализу экстракция аналитов из биоматриц не проводится, поэтому нет необходимости последовательно извлекать аналиты кислой и основной природы, варьируя pH. Если предельную погрешность анализа установить на уровне 25–30%, то в рамках одной ВЭЖХ-МС/МС-методики можно определять все же ограниченное количество соединений, характеризующихся разной химической природой и разным уровнем фоновых концентраций. В целевой метаболомике мочи с 80-х годов прошлого века и до настоящего времени преобладают исследования, посвященные такой наиважнейшей теме, как диагностика врожденных мета-

болических расстройств. По мере появления новой информации о биомаркерах врожденных заболеваний появляется потребность в методиках, охватывающих определение все большего количества аналитов. В работе [15] описано определение в моче 71 аналита методом ВЭЖХ-МС/МС с времяпролетным детектором. Полного хроматографического разделения аналитов, судя по масс-хроматограммам, представленным в дополнительных материалах к статье, достичь не удалось, кроме того, не получены хроматографические пики правильной формы для большинства аналитов, однако методу удалось валидировать с приемлемыми метробиологическими характеристиками.

Авторы работы [16] предложили процедуру для определения 142 мочевых метаболитов, относящихся к разным классам соединений. Из 142 метаболитов 67 определили количественно, остальные – полуквантитативно. В отличие от целевой метаболомики наследственных болезней, метаболомика стресса гораздо менее изучена, формирование метаболитической сигнатуры стресса – вопрос будущего, несмотря на то, что биохимические основы стресса глубоко и всесторонне изучены.

Формирование группы целевых аналитов. Формируя набор стресс-маркеров, определяемых в моче, мы ориентировались на работы, выполненные в режиме нецелевой метаболомики, причем с использованием не только мочи, но и крови в качестве биоматрицы. При этом мы исходили из того, что неконъюгированные полярные аналиты быстро фильтруются через почки и выделяются с мочой. С учетом современных представлений о биохимии стресса [17] сформирована группа актуальных биомаркеров:

- 1) вторичные продукты метаболизма аденозинтрифосфорной кислоты: инозин и гипоксантин как маркеры сердечно-сосудистых рисков [18, 19];

- 2) ацетилкарнитин, аденозин и креатин как маркеры энергетического метаболизма и нейротрансдукции [20, 21];

- 3) 3-метилгистидин и 2-гидрокси-2-метилбутират как маркеры миофибрилярного протеолиза, риска потери мышечной массы [22, 23];

- 4) треонин как маркер катаболических процессов [24];

- 5) триптамин (продукт микробной биотрансформации триптофана) как маркер иммунного статуса организма [25, 26];

- 6) 3-гидроксибутират, 3-гидрокси-3-метилбутират и 2-гидроксибутират как маркеры катаболизма жирных кислот и кетоаминокислот [27];

- 7) молочная кислота как маркер гипоксии [28, 29];

- 8) уридин как маркер нейродегенеративных процессов [30];

9) креатинин как маркер нарушения функций выделительной системы [31].

Для выбранных биомаркеров возможность однозначной трактовки концентраций в моче отсутствует. Систематические данные по содержанию биомаркеров в моче как в норме, так и при отклонениях от нормы при нарушениях регуляторных процессов в организме практически отсутствуют. Немногочисленные данные об уровнях концентраций выбранных биомаркеров в моче в литературных источниках приведены по отношению к креатинину, границы нормального уровня которого в моче охватывают целый порядок величины, что не позволяет даже приблизительно пересчитать относительные концентрации на абсолютные. Кроме того, креатинин сам включен в группу выбранных биомаркеров (табл. 1).

Особенностью физиологического статуса людей, находящихся в хорошей физической форме, является хорошая переносимость физических нагрузок, которую в известной степени можно трактовать как стрессоустойчивость [32].

Цель настоящей работы — разработка методики определения 15 биогенных веществ в моче человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) и апробация методики в биоаналитическом эксперименте.

Разработанная методика определения стресс-маркеров в моче апробирована при анализе проб мочи молодых (20–35 лет) людей с высокой и недостаточной физической подготовкой.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. Использовали ацетонитрил для высокоэффективной жидкостной хроматографии (Panreac, Испания); метанол HPLC grade (J.T. Baker, Нидерланды); формиат аммония (ACROS organics, Бельгия); креатинин, креатин, молочную кислоту, инозин, ацетилкарнитин, треонин, 2-гидроксипутират, 3-гидроксипутират, 2-гидроксиметилпутират, 3-гидроксиметилпутират, гипоксантин, 3-метилгистидин, аденозин, уридин (Sigma-Aldrich, США). Дейтерированный (D-3) 2-(2-карбоксиэтил)-1,1,1-триметилгидразиний (изотопная чистота 99.9%) синтезирован в лаборатории химического моделирования НИИ ГПЭЧ в соответствии с процедурой, описанной в работе [33].

Приготовление градуировочных растворов. Исходные растворы 2-гидроксипутирата, 3-гидроксипутирата, 2-гидроксиметилпутирата, 3-гидроксиметилпутирата, молочной кислоты, креатинина, уридина, инозина, креатина, 3-метилгистидина, аденозина, треонина, ацетилкарнитина готовили растворением навесок веществ в деионизованной воде. Для полного растворения навески гипоксан-

тина в деионизованной воде раствор подщелачивали, добавляя 5%-ый водный раствор аммиака по каплям. Триптамин растворяли в ацетонитриле.

Отбор проб и пробоподготовка мочи. Пробы отбирали в утренние часы натощак при условии отсутствия интенсивных физических нагрузок в течение предшествующих суток. Образцы мочи замораживали и хранили при -18°C до начала проведения анализа.

В качестве внутреннего стандарта выбрали дейтерированный (D-3) 2-(2-карбоксиэтил)-1,1,1-триметилгидразиний. Использование изотопно-меченного стандарта позволило исключить предварительный контроль исследуемых образцов мочи на наличие фоновых сигналов в области регистрации пика внутреннего стандарта.

Пробоподготовку осуществляли следующим образом. В пластиковую пробирку, объемом 2.0 мл вносили 0.3 мл пробы мочи и 0.9 мл ацетонитрила, содержащего внутренний стандарт с концентрацией 3 мкг/мл, тщательно перемешивали и центрифугировали при скорости 14000 оборотов в минуту в течение пяти минут. Супернатант разбавляли в 10 и 1000 раз 0.1%-ной муравьиной кислотой в деионизованной воде и анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС. В пробах с разбавлением 10 раз определяли креатинин, уридин и инозин.

ВЭЖХ-МС/МС-анализ. Для анализа образцов мочи использовали жидкостной хроматограф LC-20 Prominence, оснащенный масс-спектрометрическим детектором LCMS-8050 с электрораспылительной ионизацией при атмосферном давлении (Shimadzu, Япония). Данные обрабатывали при помощи программного обеспечения Labsolution "Quant browser" (Shimadzu, Япония).

Хроматографическое разделение осуществляли на колонке Zorbax SB-C8 (Agilent, США) (150 мм $\times$ 4.6 мм, 1.8 мкм). Подвижная фаза: компонент А — 0.1%-ная муравьиная кислота и 10 мМ раствор формиата аммония в деионизованной воде; компонент В — 0.1%-ная муравьиная кислота и 10 мМ раствор формиата аммония в метаноле. Программа элюирования при скорости потока элюента 0.4 мл/мин: 0.0–1.0 мин 5% В; 1.0–7.0 мин 5–90% В; 7.0–10.0 мин 90% В; 10.1–15.0 мин 5% В. Температура термостата колонки 40°C . Температура термостата отделения для проб 5°C . Объем вводимой пробы составлял 5 мл.

Масс-спектрометрическое детектирование осуществляли в режиме мониторинга множественных реакций по заданным ионным реакциям (МРМ-переходам) — прекурсор-ион $>$ продукт-ион (табл. 2).

Параметры источника ионизации: скорость потока: газа-осушителя — 10 л/мин, вспомогательного газа — 10 л/мин, давление на распылителе — 3 л/мин, температура газа-осушителя — 300°C , температура вспомогательного потока — 350°C ,

Таблица 1. Список целевых биомаркеров для контроля в пробах мочи, их брутто формулы, константы гидрофобности ($\text{Log } P$), молярные массы и структурные формулы

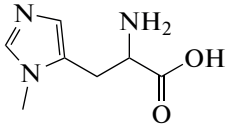
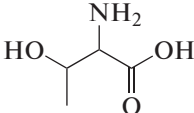
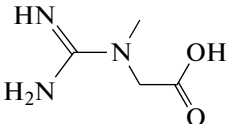
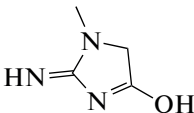
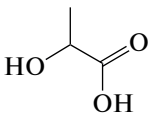
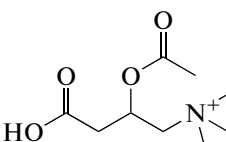
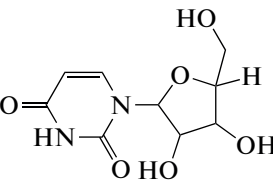
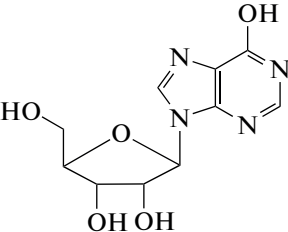
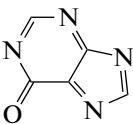
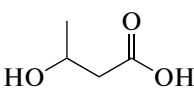
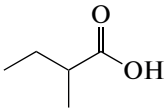
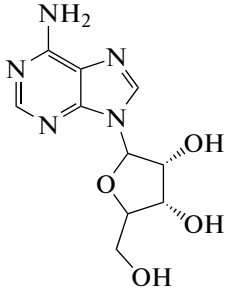
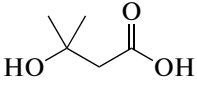
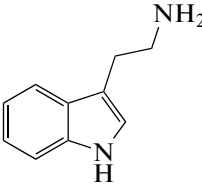
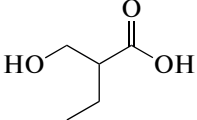
Название биомаркера	Брутто формула	$\text{Log } P^*$	Молярная масса, г/моль	Структурная формула
3-Метилгистидин	$\text{C}_7\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2$	−1.31	169.18	
Треонин	$\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_3$	−1.23	119.12	
Креатин	$\text{C}_4\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$	−1.88	131.13	
Креатинин	$\text{C}_4\text{H}_7\text{N}_3\text{O}$	−1.68	113.12	
Молочная кислота	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$	−0.70	90.08	
Ацетилкарнитин	$\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NO}_4$	−3.56	203.24	
Уридин	$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$	−1.61	244.20	
Инозин	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_5$	−1.45	268.23	
Гипоксантин	$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}$	−2.51	136.11	
3-Гидроксибутират	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_3$	−1.14	104.10	

Таблица 1. Окончание

Название биомаркера	Брутто формула	Log <i>P</i> *	Молярная масса, г/моль	Структурная формула
2-Гидроксипутират	C ₄ H ₈ O ₃	−0.17	104.10	
Аденозин	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	−1.02	267.24	
3-Гидроксиметилбутират	C ₅ H ₁₀ O ₃	−0.79	118.13	
Триптамин	C ₁₀ H ₁₂ N ₂	1.38	160.22	
2-Гидроксиметилбутират	C ₅ H ₁₀ O ₃	0.18	118.13	

Примечание: значения констант гидрофобности (Log *P*) взяты с сайта <http://www.chemspider.com/> (дата обращения: 28.03.2023).

Таблица 2. Аналитические характеристики исследуемых биомаркеров: режим ионизации, Rt (время удерживания), МРМ-переход (прекурсор- > продукт-ионы), СЕ (энергия коллизии)

Биомаркер (режим ионизации)	Rt, мин	МРМ-переход, <i>m/z</i> (СЕ)
3-Метилгистидин (+)	3.83	170.10 > 109.15 (−16); 126.20 (−16)
Треонин (+)	4.04	120.00 > 74.10 (−12); 56.10 (−17)
Креатин (+)	4.47	132.00 > 44.10 (−14); 90.05 (−22)
Креатинин (+)	4.56	114.00 > 44.1 (−17); 86.1 (−14)
Молочная кислота (−)	6.13	89.00 > 43.1 (12); 45.05 (12)
Ацетил карнитин (+)	6.49	204.00 > 85.1 (−21); 145.15 (−13)
Уридин (+)	7.83	245.00 > 113.10 (−12); 70.10 (−35)
Инозин (+)	8.15	269.00 > 137.10 (−11); 110.10 (−23)
Гипоксантин (−)	8.24	135.00 > 92.00 (18); 65.00 (25)
3-Гидроксипутират (−)	8.24	103.00 > 59.00 (11); 45.00 (25)
2-Гидроксипутират (−)	8.63	103.00 > 57.05 (14)
Аденозин (+)	8.93	268.00 > 136.10 (−22); 119.10 (−44)
3-Гидроксиметилбутират (−)	9.29	117.00 > 59.10 (12); 41.20 (25)
Триптамин (+)	9.60	161.00 > 144.15 (−14); 117.15 (−25)
2-Гидроксиметилбутират (−)	9.96	117.00 > 71.15 (13)
Дейтерированный (D-3) 2-(2-карбоксиэтил)-1,1,1-три-метилгидразиний, внутренний стандарт (+)	4.84	150.00 > 61.15 (−16); 62.15 (−16)

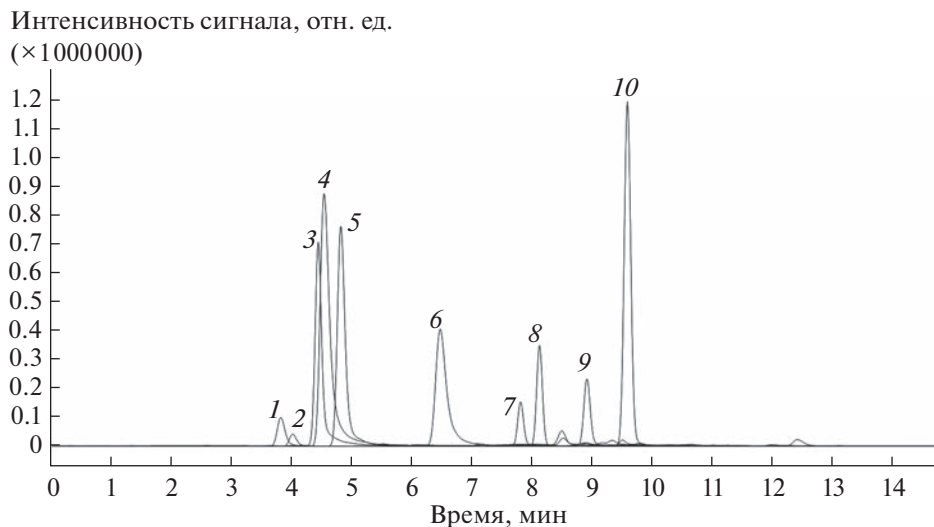


Рис. 1. Масс-хроматограмма в режиме положительной ионизации. 1 – 3-метилгистидин; 2 – треонин; 3 – креатин; 4 – креатинин; 5 – дейтерированный (D-3) 2-(2-карбоксиэтил)-1,1,1-триметилгидразиний; 6 – ацетилкарнитин; 7 – уридин; 8 – инозин; 9 – аденозин; 10 – триптамин.

напряжение на капилляре – 3500 В, напряжение на фрагментаторе – 120 В.

Предварительная оптимизация параметров детектирования (m/z прекурсор- и продукт-ионов, энергия коллизии) осуществлялась в автоматическом режиме с помощью настройки “Auto-tuning”.

Статистическая обработка результатов измерений. Различия между концентрациями биомаркеров в пробах мочи двух групп добровольцев оценивали с помощью параметрического t -критерия Уэлча после логарифмического преобразования полученных данных. Статистически значимыми признавали результаты при уровне $p < 0.05$. Все вычисления выполнены в программе GraphPad Prizm 8.

В биоаналитическом исследовании по апробации методики принимали участие мужчины и женщины возраста 20–35 лет. Добровольцы были разделены на две группы: низко (Н/Т) и высоко (В/Т) тренированные. Группа Н/Т ($n = 9$) представлена людьми, ведущими малоактивный образ жизни: работа в офисе за компьютером, нерегулярные физические нагрузки, индекс массы тела >30 . В группу В/Т ($n = 29$) отобраны люди, ведущие активный образ жизни, посещающие тренажерный зал не менее двух раз в неделю, имеющие индекс массы тела 20–27. Для участия в эксперименте от добровольцев получали информированное согласие.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Процедура ВЭЖХ-МС/МС-анализа. Хроматограммы рассматриваемых веществ представлены на рис. 1 и 2. Из табл. 1 видно, что гидрофильно-гидрофобные свойства аналитов варьировали в

широких пределах, что следует учитывать при выборе режима хроматографического разделения. Как видно из представленных масс-хроматограмм, подобранный режим элюирования позволил достичь приемлемого разделения всех аналитов.

Метрологические характеристики предложенной процедуры совместного определения 15 биомаркеров функционального состояния человека получали на основе определения их концентраций в водных растворах и с учетом размаха уровней их концентраций в моче добровольцев (табл. 3).

Подготовка проб к анализу ограничивалась разбавлением с последующим центрифугированием, при этом достигались высокие степени извлечения аналитов: от 95.2 до 98.9%.

Сравнение результатов определения содержания стресс-маркеров в моче добровольцев групп В/Т и Н/Т. Перед выполнением статистической обработки полученные результаты проходили тест на нормальность/логнормальность распределения. В связи с малым количеством наблюдений в группе Н/Т для всех биомаркеров, кроме креатинина, распределение было логнормальным. Для креатинина наблюдалось нормальное распределение. По этой причине применение параметрического критерия было возможным после логарифмического преобразования полученных результатов [34], которое выполняли по формуле (1):

$$y = \lg(x + 0.01), \quad (1)$$

где y – преобразованное значение найденной концентрации биомаркера; x – найденное значение концентрации биомаркера; 0.01 – константа, необходимая для корректировки расчетов при на-

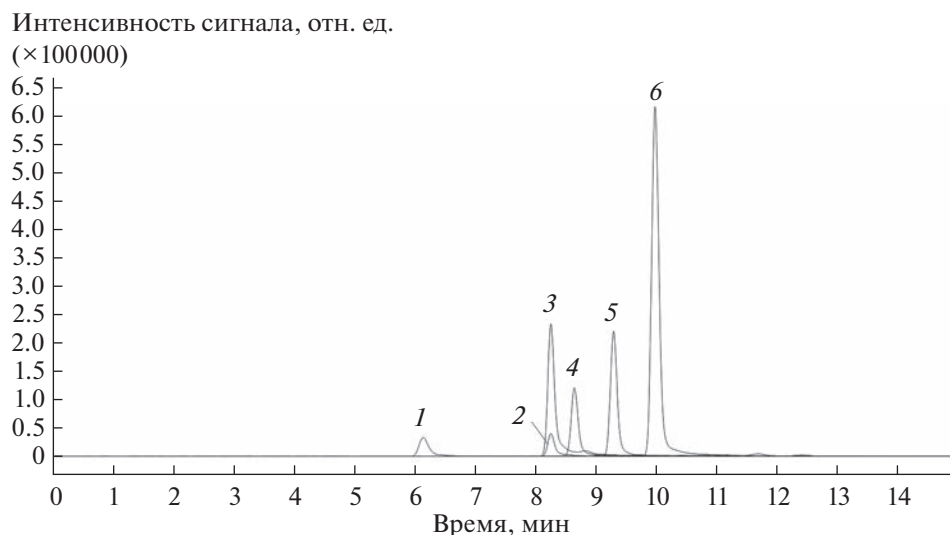


Рис. 2. Масс-хроматограмма в режиме отрицательной ионизации. 1 – молочная кислота; 2 – гипоксантин; 3 – 3-гидроксибутират; 4 – 2-гидроксибутират; 5 – 3-гидроксиметилбутират; 6 – 2-гидроксиметилбутират.

личии результатов ниже нижней границы определяемых содержаний.

После логарифмического преобразования полученные данные оценивали с помощью *t*-критерия Уэлча. Рассчитывали среднее арифметическое, среднеквадратическое отклонение и доверитель-

ный интервал. Затем обратным пересчетом получали молярные концентрации. Например, среднее арифметическое значение данных для молочной кислоты группы В/Т после логарифмического преобразования составляло 2.226, а значение доверительного интервала (при $p = 0.95$) – 0.080. В соответ-

Таблица 3. Метрологические характеристики предложенной процедуры

Биомаркер	Диапазон измерений, мкг/мл	Показатель воспроизводимости s_r , %	Показатель правильности (границы относительной систематической погрешности при $P = 0.95$), $\pm \delta_c$, %	Показатель точности (границы относительной погрешности при $P = 0.95$), $\pm \delta$, %
3-Метилгистидин	1–50	1.0	3.0	4.8
Треонин	1–50	7.0	1.3	7.1
Креатин	1–50	10.6	1.4	8.8
Креатинин	0.2–10	6.4	2.6	6.6
Молочная кислота	2–100	7.7	1.4	8.1
Ацетилкарнитин	2–100	6.7	0.9	7.2
Уридин	0.2–10	9.1	2.1	7.5
Инозин	0.2–10	4.0	1.2	5.2
Гипоксантин	1–50	11.3	1.1	10.3
3-Гидроксибутират	1–50	5.7	1.0	6.7
2-Гидроксибутират	1–50	4.8	1.3	5.4
Аденозин	1–50	6.0	1.4	6.5
3-Гидроксиметилбутират	2–100	5.6	1.0	6.5
Триптамин	1–50	7.2	1.8	8.1
2-Гидроксиметилбутират	1–50	3.8	2.2	5.5

Таблица 4. Результаты измерений (референтный диапазон) в моче добровольцев

Биомаркер	Референтный интервал (без нормализации по креатинину), мкМоль		Референтный интервал (с нормализацией по креатинину), мкМоль/мМоль креатинина	
	В/Т (<i>n</i> = 29)	Н/Т (<i>n</i> = 9)	В/Т (<i>n</i> = 29)	Н/Т (<i>n</i> = 9)
Креатинин (мМ)	4.0–4.8	4.7–6.9*		
3-Метил гистидин	21.5–47.0	29.1–92.2	5.6–11.3	5.5–16.0
Треонин	94.4–162.1	119.2–254.9	22.5–38.1	25.1–39.6
Креатин	80.0–177.5	79.8–290.9	19.9–40.0	14.8–51.4
Молочная кислота	117.6–241.2	265.3–675.0	28.5–55.7	51.8–113.0**
Ацетилкарнитин	177.2–463.9	115.9–1106.6	36.3–98.2	32.0–176.4
Уридин	5.4–10.1	4.5–12.5	1.8–2.9	1.7–2.6
Инозин	1.8–3.4	3.8–15.0	2.2–5.4	1.6–3.0
Гипоксантин	97.8–142.1	84.4–245.3	23.8–32.7	17.8–38.0
3-Гидроксibuтират	15.7–26.6	24.0–82.7*	3.8–5.9	4.1–16.1
2-Гидроксibuтират	222.6–384.6	249.9–535.7	55.6–86.2	49.9–87.7
Аденозин	11.2–19.2	19.5–53.3	2.8–4.3	4.0–8.5*
3-Гидроксиметилбутират	173.9–314.1	371.2–971.1	43.7–70.0	69.4–169.9**
Триптамин	34.5–41.6	38.0–56.4	8.0–10.0	6.8–10.3
2-Гидроксиметилбутират	28.2–48.0	34.3–74.6	7.0–10.8	6.7–12.5

Примечание: достоверные различия при: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

ствии с предложенным автором работы [34] подходом референтный диапазон для молочной кислоты вычисляли следующим образом: $(2.226 \pm [1.96 \times \times 0.080])$ или $(2.070–2.382)$. При обратном преобразовании он составит $(10^{2.070}–10^{2.382})$, что соответствует $(117.6–241.2)$ мкМ. Аналогичным образом получали остальные данные, за исключением креатинина, для которого логарифмирование не проводили.

Для оценки концентраций биомаркеров, нормализованных по креатинину, сначала вычисляли их уровни относительно креатинина (мкМоль/мМоль креатинина), а затем выполняли логарифмическое преобразование и анализ полученных данных с дальнейшим пересчетом по описанному выше алгоритму.

Результаты измерений (референсный диапазон), пересчитанные из массовых в молярные концентрации с учетом молярной массы аналитов (табл. 1) и последующей нормализации по креатинину, представлены в табл. 4.

При использовании нормализации мочевых биомаркеров по креатинину обычно исходят из предположения о том, что скорость выведения креатинина с мочой для разных людей постоянна, а также из того, что концентрация растворенных в моче веществ зависит от процесса реабсорбции воды в почках [35]. Однако нормализация данных по креатинину для оценки результатов анализов мочи людей с аномальной функцией почек [35, 36] приводит к искажению их интерпретации.

Так как в нашем эксперименте принимали участие молодые люди без диагностированных заболеваний за счет относительно близких значений креатинина в моче нормализация к его уровню приводила к “сглаживанию” данных, поэтому приведены данные как с нормализацией по креатинину, так и без нее.

Результаты, полученные при апробации методики (табл. 4), следует интерпретировать с осторожностью. При всех отмеченных ранее преимуществах мочи как биоматрицы, нельзя не принимать во внимание и ограничения при интерпретации результатов метабомики мочи. Прежде всего, это влияние пищевого рациона на метаболические профили мочи. Добровольцы, принимавшие участие в эксперименте, по данным анкетирования не придерживались диеты и не принимали пищевых добавок или лекарств в течение недели, предшествовавшей тестированию, при этом их рацион не был стандартизован, что не могло не сказаться на результатах тестирования. Тем не менее полученные результаты позволяют отметить некоторые тенденции и сделать предварительные выводы. Несмотря на то, что группа Н/Т была менее многочисленной ($n = 9$) в сравнении с группой В/Т ($n = 29$), для нее могут быть отмечены более широкие интервалы значений концентраций для большинства биомаркеров, т.е. группа В/Т может быть охарактеризована как более однородная. Еще одной тенденцией является смещение концентраций большинства стресс-маркеров в

область более высоких значений в моче людей из группы Н/Т в сравнении с группой В/Т. Полученный результат можно объяснить тем, что состояние покоя (накануне отбора мочи физических нагрузок не было) в группе В/Т характеризуется как полная релаксация, а группой Н/Т это время проживается с ненулевым уровнем стресса. Другое возможное объяснение — пониженная способность у добровольцев группы Н/Т к реабсорбции стресс-маркеров почками и/или их распределению в ткани.

Достоверные различия в концентрациях стресс-маркеров в моче добровольцев из двух групп установлены для креатинина и 3-гидроксibuтирата без нормализации по креатинину. Также значимые различия обнаружены для молочной кислоты, аденозина и 3-гидроксиметилбутирата без и при их нормализации по креатинину.

Полученный результат не противоречит литературным данным, свидетельствующим о том, что молочная кислота, гидроксibuтираты и аденозин входят в группу биомаркеров, характеризующих уровень физической подготовки, в значительной мере определяемый переносимостью физических нагрузок [37–39].

Следует отметить, что в различных источниках [40, 41 и др.] установлены разные биомаркеры, характеризующие уровень физической подготовки. Все они пока имеют статус биомаркеров-кандидатов. Необходимым этапом на пути формирования перечня актуальных стресс-маркеров в различных диагностических биосредах является разработка методик определения биомаркеров-кандидатов.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы выражают благодарность кандидату медицинских наук А.Л. Куцало за помощь в организации эксперимента по апробации методики, а также сотрудникам ФГУП «НТЦ РХБ» ФМБА России за участие в межлабораторном эксперименте по подтверждению валидационных характеристик методики.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Swiner D.J., Jackson S., Burris B.J., Badu-Tawiah A.K. Applications of mass spectrometry for clinical diagnostics: The influence of turnaround time // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. № 1. P. 183.
2. Li H., Peng B., X.X. Peng. Functional metabolomics: From biomarker discovery to metabolome reprogramming // *Protein Cell.* 2015. V. 6. № 9. P. 628.
3. Blessing E.M., Reus V., Mellon S.H., Wolkowitz O.M., Flory J.D., Bierer L. Biological predictors of insulin resistance associated with posttraumatic stress disorder in young military veterans // *Psychoneuroendocrinology.* 2017. V. 82. P. 91.
4. Kuo W., Bratzke L.C., Oakley L.D., Kuo F., Wang H., Brown R.L. The association between psychological stress and metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis // *Obes. Rev.* 2019. V. 20. № 11. P. 1651.
5. Iliou A., Mikros E., Karaman I., Elliott F., Griffin J.L., Tzoulaki I., Elliott P. Metabolic phenotyping and cardiovascular disease: an overview of evidence from epidemiological settings // *Heart.* 2021. V. 107. № 14. P. 1123.
6. Yaribeygi H., Panahi Y., Sahraei H., Johnston T.P., Sahhebkar A. The impact of stress on body function: A review // *EXCLI J.* 2017. V. 16. P. 1057.
7. Muradyan A., Macheiner T., Mardiyani M., Sekoyan E., Sargsyan K. The evaluation of biomarkers of physical activity on stress resistance and wellness // *Appl. Psychophysiol. Biofeedback.* 2022. V. 47. P. 121.
8. Morey J.N., Boggero I.A., Scott A.B., Segerstrom S.C. Current directions in stress and human immune function // *Curr. Opin. Psychol.* 2015. V. 5. P. 13.
9. Bernini P., Bertini I., Luchinat C., Nincheri P., Staderini S., Turano P. Standard operating procedures for pre-analytical handling of blood and urine for metabolomic studies and biobanks // *J. Biomol. NMR.* 2011. V. 49. № 3–4. P. 231.
10. Hertel J., Van der Auwera S., Friedrich N., Wittfeld K., Pietzner M., Budde K., Teumer A., Kocher T., Nauck M., Grabe H.J. Two statistical criteria to choose the method for dilution correction in metabolomic urine measurements // *Metabolomics.* 2017. V. 13. P. 42.
11. Rosen Vollmar A.K., Rattray N.J.W., Cai Y., Santos-Neto Á.J., Deziel N.C., Jukic A.M.Z., Johnson C.H. Normalizing untargeted periconceptional urinary metabolomics data: A comparison of approaches // *Metabolites.* 2019. V. 9. № 10. P. 198.
12. Christou C., Gika H.G., Raikos N., Theodoridis G. GC-MS analysis of organic acids in human urine in clinical settings: A study of derivatization and other analytical parameters // *J. Chromatogr. B.* 2014. V. 964. № 1. P. 195.
13. Keyfi F., Lukacs Z., Varasteh A. A description of reference ranges for organic acids in urine samples from a pediatric population in Iran // *Rep. Biochem. Mol. Biol.* 2017. V. 6. № 1. P. 40.
14. Greer B., Chevallier O., Quinn B., Botana L.M., Elliott C.T. Redefining dilute and shoot: The evolution of the technique and its application in the analysis of foods and biological matrices by liquid chromatography mass spectrometry // *Trends Anal. Chem.* 2021. V. 141. e. 116284.
15. Körver-Keularts I.M.L.W., Wang P., Waterval H.W.A.H., Kluijtmans L.A.J., Wevers R.A., Langhans C.D., Scott C., Habets D.D.J., Bierau J. Fast and accurate quantitative organic acid analysis with LC-QTOF/MS facilitates screening of patients for inborn errors of metabolism // *J. Inher. Metab. Dis.* 2018. V. 41. № 3. P. 415.

16. Zheng J., Zhang L., Johnson M., Mandal R., Wishart D.S. Comprehensive targeted metabolomic assay for urine analysis // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. № 15. P. 1062.
17. McKetney J., Jenkins C.C., Minogue C., Mach P.M., Hussey E.K., de Trevor G.G., Coon J., Dhumakupt E.S. Proteomic and metabolomic profiling of acute and chronic stress events associated with military exercises // *Mol. Omics.* 2022. V. 18. P. 279.
18. Farthing D.E., Farthing C.A., Xi L. Inosine and hypoxanthine as novel biomarkers for cardiac ischemia: From bench to point-of-care // *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 2015. V. 240. № 6. P. 821.
19. Furuhashi M., Koyama M., Higashiura Y., Murase T., Nakamura T., Matsumoto M., Sakai A., Ohnishi H., Tanaka M., Saitoh S., Moniwa N., Shimamoto K., Miura T. Differential regulation of hypoxanthine and xanthine by obesity in a general population // *J. Diabetes Invest.* 2020. V. 11. № 4. P. 878.
20. База данных метаболитов человека HMDB IDHMDB0000050, URL: <https://hmdb.ca/> (дата обращения 10.04.2023).
21. Pettegrew J., Levine J., McClure R. Acetyl-L-carnitine physical-chemical, metabolic, and therapeutic properties: Relevance for its mode of action in Alzheimer's disease and geriatric depression // *Mol. Psychiatry.* 2000. V. 5. P. 616.
22. Sheffield-Moore M., Dillon E.L., Randolph K.M. Isotopic decay of urinary or plasma 3-methylhistidine as a potential biomarker of pathologic skeletal muscle loss // *J. Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2014. V. 5. № 1. P. 19.
23. Kuriyan R., Lokesh D.P., Selvam S., Jayakumar J., Mamatha P.G., Shreeram S., Kurpad A.V. The relationship of endogenous plasma concentrations of β -hydroxy β -methyl butyrate (HMB) to age and total appendicular lean mass in humans // *Exp. Gerontol.* 2016. V. 81. P. 13.
24. Cheng Z.X., Guo C., Chen Z.G., Yang T.C., Zhang J.Y., Wang J., Zhu J.X., Li D., Zhang T.T., Li H., Peng B., Peng X.X. Glycine, serine and threonine metabolism confounds efficacy of complement-mediated killing // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 3325.
25. Beloborodova N.V., Chervenskaya E.A., Getsina M.L. Indolic structure metabolites as potential biomarkers of non-infectious diseases // *Curr. Pharm. Des.* 2021. V. 27. № 2. P. 238.
26. Gao J., Xu K., Liu H., Liu G., Bai M., Peng C., Li T., Yin Y. Impact of the gut microbiota on intestinal immunity mediated by tryptophan metabolism // *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2018. V. 8. P. 13.
27. Miyazaki T., Honda A., Ikegami T., Iwamoto J., Monma T., Hirayama T., Saito Y., Yamashita K., Matsuzaki Y. Simultaneous quantification of salivary 3-hydroxybutyrate, 3-hydroxyisobutyrate, 3-hydroxy-3-methylbutyrate, and 2-hydroxybutyrate as possible markers of amino acid and fatty acid catabolic pathways by LC-ESI-MS/MS // *Springer Plus.* 2015. V. 4. P. 494.
28. Nikolaidis S., Karpouzi C., Tsalis G., Kabasakalis A., Papaioannou K.G., Mougios V. Reliability of urine lactate as a novel biomarker of lactate production capacity in maximal swimming // *Biomarkers.* 2016. V. 21. № 4. P. 328.
29. Zhang Z., Xu X., Chen K. Lactate clearance as a useful biomarker for the prediction of all-cause mortality in critically ill patients: A systematic review study protocol // *BMJ Open.* 2014. V. 4. Article e004752.
30. de Leeuw F.A., Tijms B.M., Doorduijn A.S., Hendriksen H.M.A., van de Rest O., de van der Schueren M., Visser M., van den Heuvel E.G.H.M., van Wijk N., Bierau J., Scheltens P., Kester M. I., van Der Flier W., Teunissen C. E. LDL cholesterol and uridine levels in blood are potential nutritional biomarkers of AD progression: The NUDAD project // *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring.* 2020. V. 16 (S4). Article e043108.
31. Waikar S.S., Betensky R.A., Bonventre J.V. Creatinine as the gold standard for kidney injury biomarker studies? // *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2009. V. 24. № 11. P. 3263.
32. Muradyan A., Macheiner T., Mardiyani M., Sekoyan E., Sargsyan K. The Evaluation of biomarkers of physical activity on stress resistance and wellness // *Appl. Psychophysiol. Biofeedback.* 2022. V. 47. P. 121.
33. Görgens C., Guddat S., Dib J., Geyer H., Schänzer W., Thevis M. Mildronate (Meldonium) in professional sports – monitoring doping control urine samples using hydrophilic interaction liquid chromatography – high resolution/high accuracy mass spectrometry // *Drug Test. Analysis.* 2015. V. 7. P. 973.
34. West R.M. Best practice in statistics: The use of log transformation // *Ann. Clin. Biochem.* 2022. V. 59. № 3. P. 162.
35. Tang K.W., Toh Q.C., Teo B.W. Normalization of urinary biomarkers to creatinine for clinical practice and research – when and why. // *Singapore Med. J.* 2015. V. 56. № 1. P. 7.
36. Wagner B.D., Accurso F.J., Laguna T.A. The applicability of urinary creatinine as a method of specimen normalization in the cystic fibrosis population // *J. Cystic Fibrosis: Official J. Eur. Cystic Fibrosis Soc.* 2010. V. 9. № 3. P. 212.
37. Kim H.Y., Lee J.D., Lee Y.H., Seo S.W., Lee H.S., Kim S., Kim K.B. Urinary metabolomics in young soccer players after winter training season // *Metabolites.* 2022. V. 12. P. 1283.
38. Moreira L.P., Silveira L. Jr., da Silva A.G., Fernandes A.B., Pacheco M.T.T., Rocco D.D.F.M. Raman spectroscopy applied to identify metabolites in urine of physically active subjects // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2017. V. 176. P. 92.
39. Simpson R.E., Phillis J.W. Adenosine in exercise adaptation // *Br. J. Sp. Med.* 1992. V. 26. № 1. P. 54.
40. Castro A., Duft R.G., Silva L.M., Ferreira M.L.V., Andrade A.L.L., Bernardes C.F., Cavaglieri C.R., Chacon-Mikahil M.P.T. Understanding the relationship between intrinsic cardiorespiratory fitness and serum and skeletal muscle metabolomics profile // *J. Proteome Res.* 2021. V. 20. № 5. P. 2397.
41. Duft R.G., Castro A., Bonfante I.L.P., Brunelli D.T., Chacon-Mikahil M.P.T., Cavaglieri C.R. Metabolomics approach in the investigation of metabolic changes in obese men after 24 weeks of combined training // *J. Proteome Res.* 2017. V. 16. № 6. P. 2151.