

## МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТАБОЛОМНОГО ПРОФИЛЯ ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫХ МАКРОФАГОВ И МОНОЦИТОВ ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

В. Е. Франкевич<sup>1,2,3</sup>✉, А. В. Новоселова<sup>1</sup>, Н. Л. Стародубцева<sup>1</sup>, М. Р. Патышева<sup>2,4</sup>, И. В. Ларионова<sup>2,3,4</sup>, М. А. Ракина<sup>2</sup>, О. Д. Брагина<sup>4</sup>, Ю. Г. Кжышковска<sup>2,3,5,6</sup>

<sup>1</sup> Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия

<sup>2</sup> Лаборатория трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины, Национальный исследовательский томский государственный университет, Томск, Россия

<sup>3</sup> Лаборатория генетических технологий, Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

<sup>4</sup> Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

<sup>5</sup> Институт Трансфузионной медицины и иммунологии, медицинский факультет Маннгейм, университет Гейдельберга, Германия

<sup>6</sup> Германский Красный Крест Служба крови Баден-Вюртемберг-Гессен, Маннгейм, Германия

Рак молочной железы — ведущая причина смерти от рака среди женщин во всем мире. Опухолеассоциированные макрофаги (ОАМ) представляют собой основной компонент иммунных клеток в ткани при раке молочной железы. Новые подходы к лечению направлены на редактирование эпигенома ОАМ. Для изучения изменений в клетках иммунной системы при репрограмировании необходимы точные методы анализа метаболома. Целью исследования было создать на базе ВЭЖХ-МС/МС аналитический подход для определения особенностей метаболома иммунных клеток человека (ОАМ и моноцитов). Липидные экстракты анализировали на жидкостном хроматографе Dionex UltiMate 3000, соединенном с масс-анализатором Maxis Impact qTOF с ЭРИ источником ионов. Для количественного анализа 38 аминокислот в клетках использовали набор Jaseм Amino Acids LC-MS/MS Analysis Kit и хроматографическую систему ВЭЖХ-МС/МС, состоящую из тройного квадрупольного масс-спектрометрического детектора Agilent 6460 (Agilent) и жидкостного хроматографа Agilent 1260 II (Agilent) с колонкой Amino acids-HPLC Column (Jaseм). Модифицированный метод Фолча с двойной экстракцией позволяет одновременно выделить экстракт липидов и водорастворимых веществ, в частности аминокислот. Наиболее информативные данные о липидном составе клеток были получены методом обращенно-фазовой хроматографии по сравнению с гидрофильной хроматографией (HILIC). Для определения метаболома клеток иммунной системы (ОАМ и моноциты) минимальное число клеток оказалось равным 2 млн. Таким образом, разработан подход для определения особенностей липидного и аминокислотного состава ОАМ и моноцитов пациентов с раком молочной железы.

**Ключевые слова:** масс-спектрометрия, метаболомика, липидомика, опухолеассоциированные макрофаги

**Финансирование:** исследование выполнено при финансовой поддержке Российской Федерации в лице Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение от 29 сентября 2021 г. № 075-15-2021-1073 на тему: «Генетическое и эпигенетическое редактирование клеток опухоли и микроокружения с целью блокировки метастазирования»).

**Вклад авторов:** В. Е. Франкевич — планирование исследования, обсуждение результатов, редактирование рукописи; А. В. Новоселова — пробоподготовка, проведение ВЭЖХ-МС/МС; Н. Л. Стародубцева — анализ ВЭЖХ-МС/МС данных, написание и редактирование рукописи; М. Р. Патышева, И. В. Ларионова — подготовка и характеристика образцов моноцитов и макрофагов, постановка модельной системы ОАМ, обсуждение результатов; М. А. Ракина — получение кондиционных сред клеточных линий РМЖ; О. Д. Брагина — подбор и клиническая характеристика онкологических пациентов, Ю. Г. Кжышковска — планирование исследования, редактирование рукописи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО СИБГМУ Минздрава России (протокол № 7 от 14 января 2017 г.), федеральных законов Российской Федерации (№ 152, 323 и др.) и Хельсинкской декларации 1964 г.

✉ **Для корреспонденции:** Владимир Евгеньевич Франкевич  
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997; vfrankevich@gmail.com

**Статья получена:** 22.08.2022 **Статья принята к печати:** 13.09.2022 **Опубликована онлайн:** 13.10.2022

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2022.049

## METHODOLOGY OF DETERMINING THE METABOLOMIC PROFILE OF TUMOR-ASSOCIATED MACROPHAGES AND MONOCYTES IN ONCOLOGICAL DISEASES

Frankovich VE<sup>1,2,3</sup>✉, Novoselova AV<sup>1</sup>, Starodubtseva NL<sup>1</sup>, Patysheva MR<sup>2,4</sup>, Larionova IV<sup>2,3,4</sup>, Rakina MA<sup>2</sup>, Bragina OD<sup>4</sup>, Kzhyshkowska JG<sup>2,3,5,6</sup>

<sup>1</sup> Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Laboratory of translational cellular and molecular biomedicine, National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

<sup>3</sup> Laboratory of Genetic Technologies, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

<sup>4</sup> Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

<sup>5</sup> Institute of Transfusion Medicine and Immunology, MI3, Mannheim Faculty of Medicine, University of Heidelberg, Germany

<sup>6</sup> German Red Cross Blood Service Baden-Württemberg-Hessen, Mannheim, Germany

Breast cancer is the leading cause of cancer-related death among women worldwide. Tumor-associated macrophages (TAMs) constitute the primary component of innate immunity in breast cancer tissue. During the development of new approaches for breast cancer treatment aimed at editing the epigenome of TAM, precise methods for the analysis of macrophage metabolome are required to examine the effect on new approaches on macrophage metabolism. Our study aimed to develop an HPLC-MS/MS-based analytical approach to characterize the metabolome of human innate immune cells (TAMs and their precursors, monocytes). Analysis of lipid extracts was conducted on a Dionex UltiMate 3000 liquid chromatograph connected to a Maxis Impact qTOF mass analyzer with an ESI ion source. Quantitative analysis of 38 amino acids in the cells was conducted using the Jaseм Amino Acids LC-MS/MS Analysis Kit and an HPLC-MS/MS chromatographic system consisting out of an Agilent 6460 triple quadrupole mass spectrometric detector (Agilent), and an Agilent 1260 II liquid chromatograph (Agilent) with Amino acids-HPLC Column (Jaseм). The modified Folch method with double extraction was found to be the optimal approached for the sample preparation, since it enables to simultaneously isolate the lipid extract and water-soluble substances, in particular, amino acids. The method of reversed-phase chromatography yielded more useful data on the cell lipid composition than the method of hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC). The minimum number of cells required to determine the metabolome of immune system cells (TAM and monocytes) was identified as  $2 \times 10^6$ . Thus, we have developed the approach to determine the lipid and amino acid composition of modelled human TAMs and primary monocytes isolated out of breast cancer patients using minimal amount of clinical material.

**Keywords:** mass spectrometry, metabolomics, lipidomics, tumor-associated macrophages

**Funding:** the study was financially supported by the Russian Federation represented by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement dated 29 September 2021 № 075-15-2021-1073 on the topic "Genetic and epigenetic editing of tumor cells and the microenvironment in order to block metastasis").

**Author contribution:** Frankovich VE, Kzhyshkowska JG — study planning and coordination, manuscript writing; Bragina OD — cancer patient selection and clinical characteristic preparation; Novoselova AV — sample preparation, HPLC-MS/MS; Larionova IV, Patysheva MR — monocyte and macrophage sample preparation and characterization, model TAM system set-up; Rakina MA — obtaining conditioned media of breast cancer cell lines; Starodubtseva NL — HPLC-MS/MS data analysis, manuscript writing; Frankovich VE, Larionova IV, Patysheva MR — discussion of results; Frankovich VE, Kzhyshkowska JG, Starodubtseva NL — manuscript editing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by ethical review board of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education of the Siberian State Medical University of the Ministry of Health of Russia (protocol № 7 of 14 January 2017), federal laws of the Russian Federation (№ 152, 323, and others), and the 1964 Declaration of Helsinki.

✉ **Correspondence should be addressed:** Vladimir E. Frankovich  
Akademika Oparina, 4, Moscow, 117997, Russia; vfrankevich@gmail.com

**Received:** 22.08.2022 **Accepted:** 13.09.2022 **Published online:** 13.10.2022

**DOI:** 10.24075/brsmu.2022.049

Рак молочной железы является наиболее часто диагностируемым злокачественным заболеванием и ведущей причиной смерти от рака среди женщин во всем мире [1]. При раке молочной железы микроокружение опухоли играет решающую роль в ее прогрессировании и влияет на рост новообразования, васкуляризацию, метастазирование и реакцию на терапию [2–4]. Опухольассоциированные макрофаги (ОАМ) представляют собой основной компонент иммунной системы в ткани при раке молочной железы, и их роль в его прогрессировании была продемонстрирована на животных моделях [5]. У пациентов с раком молочной железы как количество, так и выявление М2-фенотипа макрофагов являются индикатором плохого прогноза в большинстве исследований, которые не учитывают внутриопухольевую гетерогенность [2, 5, 6]. Наши предыдущие исследования показали, что в определенных внутриопухольевых компартаментах макрофаги могут сохранять противоопухолевые свойства, так как была обнаружена отрицательная корреляция ОАМ в ткани молочной железы с локальными метастазами [6]. Макрофаги контролируют рост и метастазирование опухоли за счет секреции цитокинов, компонентов внеклеточного матрикса и факторов роста, а профиль секреторируемых компонентов обусловлен программированием не только на транскрипционном уровне, но и на уровне эпигенетики и метаболизма [2, 9–11].

Первичную опухоль достаточно просто удалить хирургическим путем, не подвергая ее никаким дополнительным воздействиям, поскольку они не уничтожат микрометастазы. Опухольассоциированные макрофаги метаболизируют химиотерапевтические агенты и в ответ на химиотерапию значительно усиливают секрецию ростовых и проангиогенных факторов, стимулирующих процессы роста опухоли и дальнейшего метастазирования [12]. Эпигенетическая программа макрофагов является связующим звеном между генетическим кодом и взаимодействием со стрессовыми, эндогенными патологическими факторами и инфекционными агентами. При патологическом программировании макрофагов микрометастазы, состоящие даже из единичных клеток, способны развиться в убийственную и не поддающуюся ни химиотерапии, ни иммунотерапии вторичную опухоль. Новые подходы к лечению рака молочной железы направлены на редактирование эпигенома опухольассоциированных макрофагов и основаны на передовой технологии CRISPR/dCas для адресной доставки редакторов эпигенома к промоторам целевых генов. Авторами данной статьи была разработана модельная система макрофагов человека *ex vivo*, продемонстрировано долгосрочное программирование макрофагов человека с использованием новой системы высвобождения цитокинов на основе биоматериалов [13].

Для исследования изменений в клетках иммунной системы при репрограммировании необходимы точные методы анализа метаболома, в частности липидов — основной энергетической составляющей и строительного материала мембран, а также мономерных единиц белков — аминокислот. Создание методики анализа метаболома в модельных ОАМ и в моноцитах пациентов с опухолями различной локализации позволит исследовать особенности молекулярного состава моноцитов пациентов с опухолями различной локализации и будет способствовать разработке технологии для их клинического применения. Эти данные представляют

интерес для решения как фундаментальных, так и для прикладных вопросов биологии и медицины, в частности, в исследованиях, посвященных уточнению механизмов патогенеза злокачественных новообразований. Наиболее эффективным подходом к определению молекулярного состава биологических образцов в настоящее время является комбинация жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС/МС) [14]. Ключевой проблемой существующих подходов является отсутствие консенсуса о минимальном количестве клеток для анализа, что особенно актуально для моноцитов и ОАМ пациентов с онкологическими заболеваниями. Получение моноцитов и ОАМ сложная процедура, требующая большого количества цельной крови, длительной последующей обработки и культивирования при низком пролиферативном потенциале данных иммунных клеток.

Целью работы было определить минимальное число иммунных клеток человека (ОАМ и моноцитов) методом ВЭЖХ-МС/МС, необходимое для анализа метаболомного профиля данных клеток при онкологических заболеваниях.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Для определения оптимального числа клеток, позволяющего получить результаты при исследовании метаболомного спектра, использовали образцы, полученные от здоровых добровольцев. Критериями включения здоровых добровольцев были: отсутствие онкологических заболеваний в анамнезе; отсутствие хронических заболеваний в фазе обострения. При исследовании группы больных были получены образцы четырех пациентов с раком молочной железы (РМЖ) T1-4N0-3M0 (IIA–IIIB стадии), люминального В-подтипа, проходивших лечение в клинике НИИ онкологии Томского НИМЦ в 2021 г. Критериями отбора пациенток были следующие параметры: возраст от 45 до 55 лет; отсутствие онкологического поражения другой локализации в анамнезе; отсутствие наследственной предрасположенности к РМЖ (на основании данных семейного анамнеза и результатов генетического тестирования на наличие мутаций 5382insC, 4153delA, 185delAG в гене BRCA1); состояние менструальной функции — перименопауза либо менопауза; морфологическая верификация диагноза — неспецифическая инвазивная карцинома (согласно классификации ВОЗ 2019 г.); экспрессия рецепторов к эстрогену (ER) — не менее 5 баллов; уровень Ki-67 — не менее 40%; отсутствие гематогенных метастазов. Критерии исключения: возраст моложе 45 либо старше 55 лет; наличие онкологического заболевания в анамнезе; наследственная предрасположенность; состояние менструальной функции — пременопауза; все гистологические подтипы, за исключением неспецифической инвазивной карциномы; экспрессия ER — менее 5 баллов; уровень Ki-67 — меньше 40%; наличие гематогенных метастазов. Перед лечением было проведено иммуногистохимическое исследование для определения молекулярного подтипа опухоли в соответствии с рекомендациями Американского общества клинической онкологии/Колледжа американских патологов. Для стадирования РМЖ использовали TNM-классификацию AJCC (8-е издание, 2017 г.).

В качестве исследуемого материала использовали модельную систему ОАМ [13], моноциты крови здоровых добровольцев и пациентов с РМЖ, взятые до лечения.

Моноциты были изолированы из цельной крови пациентов либо из лейкоцитарной пленки доноров. Фракцию CD14<sup>+</sup>-клеток получали с помощью позитивной магнитной сепарации с применением протокола Miltenyi Biotec. Для получения модельных дифференцированных M2-макрофагов моноциты здоровых добровольцев культивировали при концентрации 10<sup>6</sup> клеток на 1 мл макрофагальной среды X-VIVO (Lonza; Германия) с добавлением 1 нг/мл M-CSF (Peprotech; Германия) и 10<sup>-8</sup> М дексаметазона (Sigma-Aldrich; Германия). Для индукции дифференцировки макрофагов в проопухолевые M2-макрофаги использовали 10 нг/мл IL4 (Peprotech; Германия). Для получения модельных ОАМ к полученным макрофагам добавляли кондиционированные среды, полученные от клеток линии карциномы молочной железы MCF7 в объеме 10% от общего количества среды. Макрофаги дифференцировались в течение 6 дней при 7,5% CO<sub>2</sub>. По истечении 6 суток макрофаги снимали с культуральных планшетов с помощью резинового скребка на холоде.

Полученные моноциты и макрофаги отмывали трижды в растворе холодного 0,3%-ного ацетата аммония и 0,3%-ного формиата аммония при помощи центрифугирования в режиме 311g в течение 5 мин. После центрифугирования надосадок полностью удаляли, а осадок высушивали в жидком азоте при температуре -197 °С. Образцы хранили при -80 °С до последующего анализа.

#### Приготовление образцов для ВЭЖХ-МС/МС анализа

Определение метаболома (липидома и аминокислотного состава) ОАМ и моноцитов пациентов с раком молочной железы проводили посредством ВЭЖХ-МС/МС-анализа экстрактов клеток. Экстракцию липидов проводили модифицированным методом Фолча [15–17] с двойной экстракцией: к образцу клеток добавляли 480 мкл хлороформ-метанольной смеси (2 : 1, о/о) с 20 мкл IS (внутренний стандарт) при 4 °С и подвергали ультразвуковому воздействию в течение 10 мин; добавляли 150 мкл воды и центрифугировали при 13 000 g в течение 5 мин при комнатной температуре; нижний органический слой, содержащий липиды, отбирали и повторяли процедуру экстракции (добавив 250 мкл хлороформ-метанольной смеси (2 : 1, о/о, 10 мин на вортексе; центрифугирование при 13 000 g в течение 5 мин); в отдельные пробирки отбирали воднометанольный слой и органический слой соединяли с образцом, полученным на первом этапе, высушивали в потоке азота. Высушенные экстракты липидов (органический слой) перерастворяли в 100 мкл раствора изопропанола с ацетонитрилом (1 : 1, о/о), а экстракты водорастворимых соединений (водно-метанольная фаза) были использованы для анализа профиля аминокислот: их перерастворяли в 100 мкл раствора воды с ацетонитрилом (1 : 1, о/о) и с 1% муравьиной кислоты.

#### ВЭЖХ-МС/МС анализ

Липидные экстракты анализировали на жидкостном хроматографе Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific; Германия), соединенном с масс-анализатором Maxis Impact qTOF с ЭРИ источником ионов (Bruker Daltonics; Германия). Разделение липидов по методу HILIC выполняли в соответствии с модифицированной процедурой, описанной ранее [18, 19]: 3 мкл образца инжестрировали

в систему. Разделение проводили на колонке Spherisorb Si (150 × 2,1 мм, 5 мкм; Waters, США) при скорости потока 50 мкл/мин с использованием ацетонитрила в качестве растворителя А и водного раствора ацетата аммония (5 ммоль/л) в качестве растворителя В линейным градиентом от 6 до 23% (о/о) растворителя В в течение 25 мин. Температура колонки составляла 40 °С. Разделение липидов методом обращенно-фазовой хроматографии осуществляли на колонке Zorbax C18 (150 × 2,1 мм, 5 мкм; Agilent, США) с линейным градиентом от 30 до 90% элюента В (раствор ацетонитрил/изопропанол/вода, 90/8/2 об., с добавлением 0,1% муравьиной кислоты и 10 ммоль/л формиата аммония) за 20 мин. В качестве элюента А использовали раствор ацетонитрил/вода (60/40 об.) с добавлением 0,1% муравьиной кислоты и 10 ммоль/л формиата аммония. Скорость потока элюирования составила 40 мкл/мин, объем инжестрируемого образца — 3 мкл. Масс-спектры получали в режиме положительных и отрицательных ионов в диапазоне 100–1700 m/z со следующими установками: напряжение на капилляре — 4,1 кВ, давление распыляющего газа — 0,7 бар, скорость потока осушающего газа — 6 л/мин, температура осушающего газа — 200 °С. Для идентификации липидов выполняли тандемную масс-спектрометрию в режиме зависимого сканирования с шириной окна 5 Да.

Для количественного анализа 38 аминокислот в клетках использовали набор Amino Acids LC-MS/MS Analysis Kit (Jasem; Турция) (1-метил-L-гистидин, 3-аминоизобутановая кислота, 3-метил-L-гистидин, β-аланин, DL-5-гидроксилизин, DL-гомоцистин, этаноламин, γ-аминобутановая кислота, L-2-аминоадипиновая кислота, L-2-аминобутановая кислота, L-аланин, L-ансерин, L-аргинин, L-аспарагин, L-аспарагиновая кислота, L-карнозин, L-цитруллин, L-цистатинин, L-цистин, L-глутаминовая кислота, L-глутамин, L-глицин, L-гистидин, L-гомоцитруллин, L-лизин, L-норвалин, L-орнитин, L-фенилаланин, L-пролин, L-серин, L-треонин, L-триптофан, L-тирозин, L-валин, саркозин, таурин, транс-4-гидрокси-L-пролин). К 40 мкл водного экстракта клеток добавляли 50 мкл раствора внутреннего стандарта и 300 мкл Reagent № 1 (Jasem; Турция). Полученную смесь тщательно встряхивали в течение 2 мин, затем центрифугировали при скорости вращения 13 000 g в течение 10 мин; 200 мкл супернатанта отбирали в виалу со вставкой, 15 мкл вводили в хроматографическую систему ВЭЖХ-МС/МС, состоящую из тройного квадрупольного масс-спектрометрического детектора Agilent 6460 (Agilent; США), и жидкостного хроматографа Agilent 1260 II (Agilent; США) с колонкой Amino acids-HPLC Column (Jasem; Турция). Условия хроматографического разделения: температура — 30 °С, элюент А: 0,1 об.% муравьиной кислоты в воде; элюент В: ацетонитрил 100%, градиентный режим элюирования с 78% В до 20% В за 4,5 мин; возвращение к 78% В и изократический режим. Для анализа аминокислот использовался Amino Acids LC-MS/MS Analysis Kit (Jasem; Турция). Параметры ионного источника ESI, положительная мода, температура осушающего газа — 150 °С, напряжение на капилляре — 2 кВ. Масс-спектрометрическое детектирование проводили в режиме мониторинга множественных реакций (MRM).

#### Идентификация липидов и анализ хромато-масс-спектрометрических данных

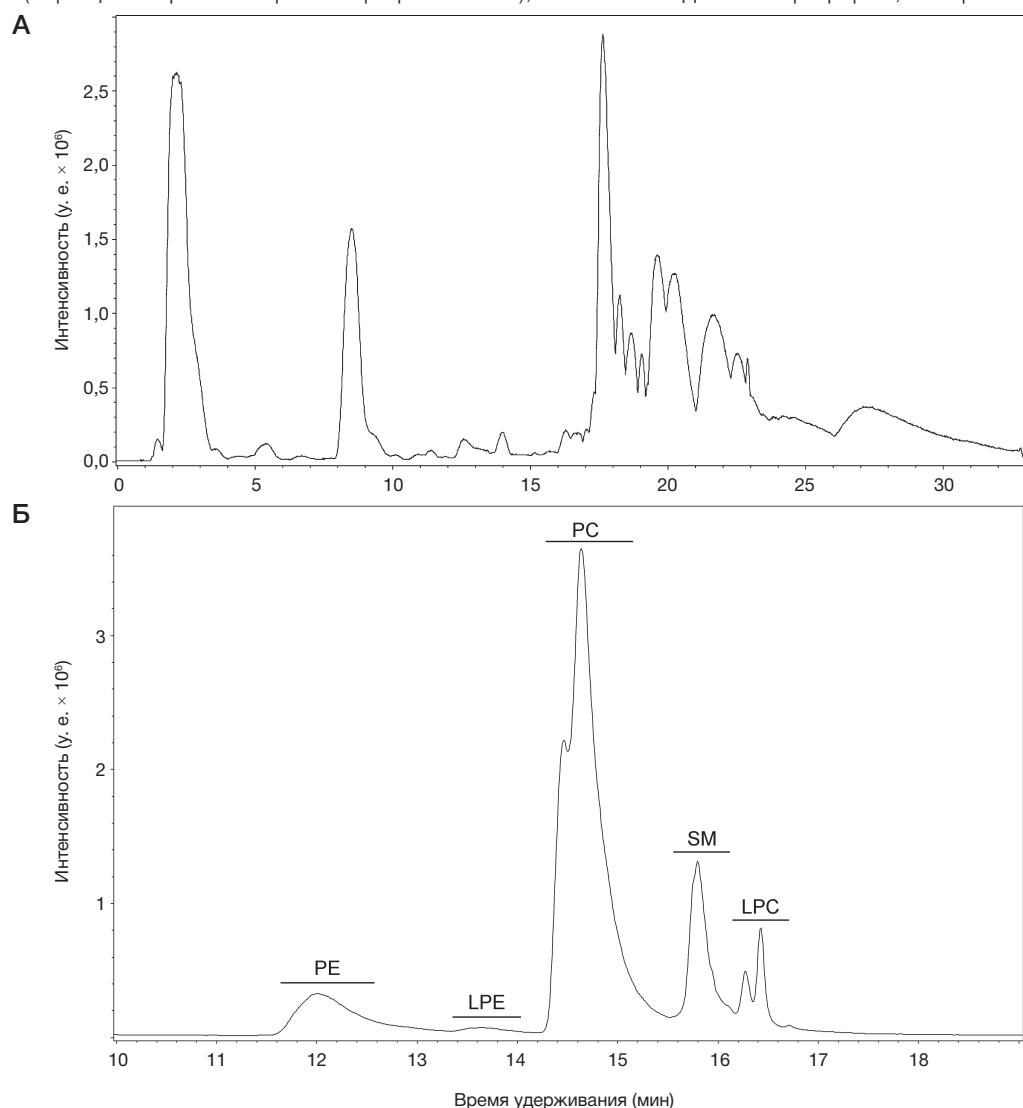
Для предобработки хромато-масс-спектрометрических данных использовали программы msConvert из пакета

Proteowizard 3.0.9987 для преобразования файлов в формат MzXml, содержащий информацию о масс-спектре в любой момент времени, и формат ms2, содержащий информацию о тандемных масс-спектрах. Кроме того, использовали программу MzMine для выделения пиков и создания таблицы, содержащей информацию о зарегистрированных ионах: массе иона, площади его хроматографического пика и времени выхода. Для идентификации липидов использовали программу LipidMatch [20], в которой учитывали точную массу (0,01 Да) соответствующего иона, массу ионов-фрагментов из тандемных масс-спектров идентифицируемого иона, попадающих в заданное окно массы (3 Да) и заданную окрестность времени удерживания (0,5 мин). Для полуколичественного анализа липидов использовали ранее разработанные скрипты на языке R [11–23].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для разработки оптимальной методики анализа липидома иммунных клеток человека посредством ЖХ/МС-анализа экстрактов липидов было проведено сравнение нескольких методов экстракции, хроматографического разделения (обращенно-фазовая хроматография и HILIC),

а также определено минимальное необходимое количество клеток. Предварительно сравнивали эффективность трех методов экстракции. Первый метод был адаптирован из более ранней работы [19], в которой использовали модифицированный метод Фолча [2] с двойной экстракцией (см. раздел «Пациенты и методы»). Вторым методом был аналогичен подходу, описанному ранее [15] и тоже основанному на методе Фолча [16] с однократной экстракцией: к образцу клеток добавляли 200 мкл водного раствора ацетата аммония (155 ммоль/л) и 990 мкл холодного раствора хлороформ/метанол (10 : 1, о/о), ультразвуковое воздействие в течение 10 мин, добавляли 150 мкл воды, центрифугировали при 13 000 г в течение 5 мин при комнатной температуре; нижний органический слой, содержащий липиды, отбирали, высушивали в потоке азота и перерастворяли в 200 мкл раствора изопропанола с ацетонитрилом (1 : 1, о/о). В основу третьего метода легла экстракция Блайя–Дайера [24]: к образцу клеток добавляли 300 мкл смеси хлороформ/метанол (1/2), затем 100 мкл хлороформа и гомогенизировали 1 мин, добавляли 100 мкл воды и дополнительно гомогенизировали 1 мин; затем центрифугировали 10 мин при 1000 г при 4 °С, отбирали органическую фазу, к полярной фазе добавляли 2 мл холодного хлороформа, отбирали образовавшуюся



**Рис. 1.** Характерные хроматограммы полного ионного тока экстрактов липидов из клеток моноцитов, зарегистрированные в режиме положительных ионов. **А.** Обращенно-фазовая хроматография. **Б.** HILIC-хроматография. PC — фосфатидилхолины; PE — фосфатидилэтаноламины; SM — сфингомиелины; LPC — лизофосфатидилхолины; PE — фосфатидилэтаноламины



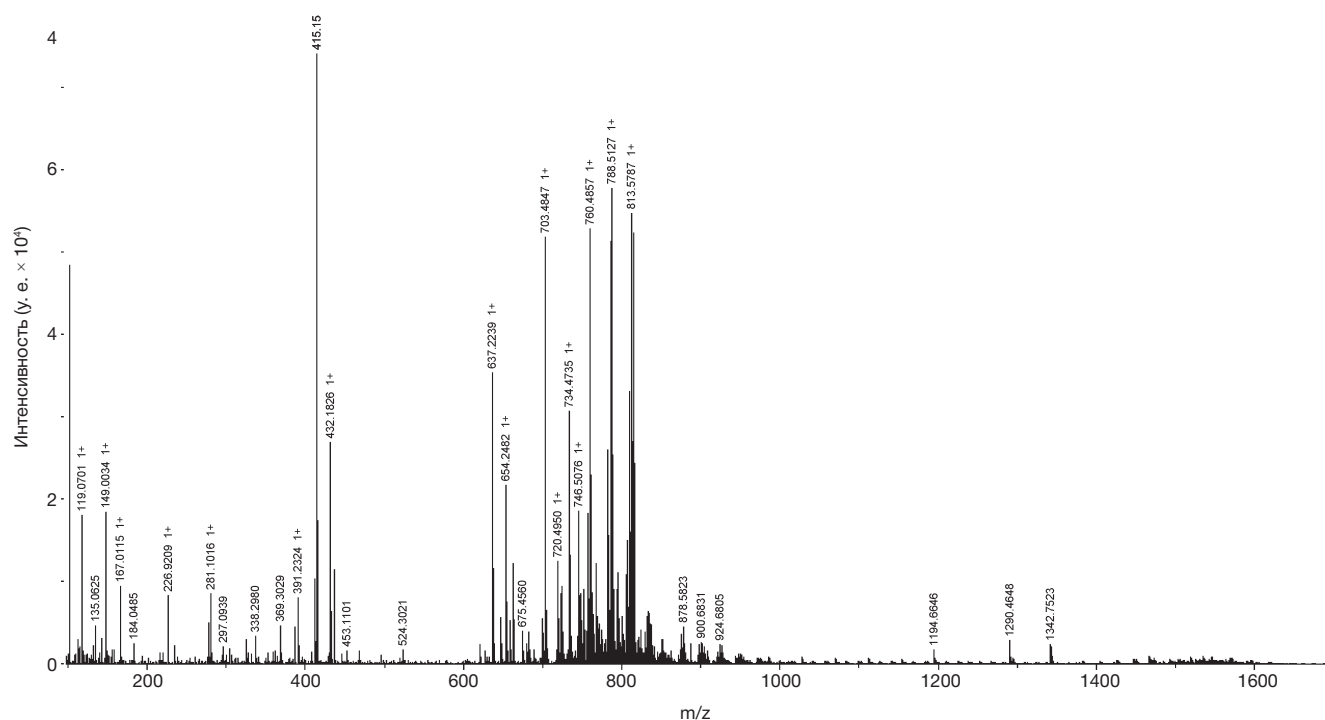


Рис. 2. Усредненный по времени масс-спектр ВЭЖХ-МС положительных ионов одного из исследованных образцов экстракта липидов макрофагов, полученный методом обращенно-фазовой хроматографии

органическую фазу и добавляли к экстракту, полученному на предыдущем шаге. Полученный состав высушивали в потоке азота и перерастворяли в 4 мл холодного раствора хлороформ/метанол (1/1) с добавлением 1,8 мл водного раствора NaCl (20 ммоль/л). Раствор дважды фильтровали через PTFE шприц-фильтр (0,2 мкм).

Второй метод с однократной экстракцией по Фолчу показал низкую эффективность для экстракции слабополярных липидов (триглицеридов, диглицеридов и церамидов). К достоинствам третьего метода относится возможность успешной экстракции кардиолипинов наравне с остальными классами липидов, однако он самый трудоемкий и содержит наибольшее число стадий, что приводит к падению воспроизводимости результатов и производительности экстракции. Наиболее универсальным и оптимальным с точки зрения трудозатрат, воспроизводимости и времени оказался первый метод, использованный далее в работе. Кроме того, анализ водно-метанольной фазы, получаемой в первом методе, позволяет получать информацию о полярных метаболитах, в частности аминокислотном составе образца.

Для определения липида были также опробованы два варианта хроматографического разделения исследуемых смесей: обращенно-фазовая хроматография

и гидрофильная хроматография (HILIC). Характерные хроматограммы и масс-спектры исследованных экстрактов липидов представлены на рис. 1 и 2. В режиме положительных ионов было идентифицировано около 200 липидов с использованием характерных tandem масс-спектров и около 1000 липидов с идентификацией только по точной массе. В основном идентифицированные липиды относятся к классам моно-, ди- и триглицеридов, церамидов, различным формам фосфатидилхолинов и фосфатидилэтанолламинов, и в том числе к продуктам окисления данных фосфолипидов. К достоинствам метода HILIC следует отнести разделение по классам липидов, однако интенсивность масс-спектрометрических пиков липидов в среднем на 30% ниже, чем при обращенно-фазовой хроматографии. Кроме того, метод HILIC плохо разделяет неполярные липиды (в частности, триглицериды), которые плохо связываются с колонкой и элюируются за время, близкое к мертвому времени колонки. В результате количество идентификаций липидов оказалось на 25% меньше в случае HILIC. Дальнейшие эксперименты были проведены с использованием обращенно-фазовой хроматографии.

В табл. 1 суммирована информация о количестве идентифицированных липидов в проанализированных

Таблица 1. Количество идентифицированных липидов в проанализированных образцах

Тип клеток	Число клеток, млн	Количество липидов, идентифицированных по точной массе и характерному tandem масс-спектру	Количество липидов, идентифицированных по точной массе
Моноциты	1	80	638
	2	92	701
	5	111	726
	10	183	2727
ОАМ	1	137	825
	2	176	916
	5	194	900
	10	205	933

Таблица 2. Площади хроматографических пиков аминокислот, полученные в результате анализа образцов моноцитов и опухолеассоциированных макрофагов

Образец	Моноциты				ОАМ			
	1	2	5	10	1	2	5	10
Число клеток, млн	1	2	5	10	1	2	5	10
3-Methyl-Histidine	7	2	64	187	4	45	76	169
L-Arginine	167 432	85 895	169 003	261 068	192 217	425 313	775 226	798 153
L-Cystine	496	144	158	423	85	386	184	400
L-asparagine	1199	758	1674	3884	70	1443	1265	3290
L-Glutamine	97 176	39 931	105 365	288 808	53 604	145 366	465 023	472 766
L-Histidine	18 103	8496	17 941	34 787	12 253	33 254	114 909	65 534
L-Lysine	97 176	39 931	105 365	288 808	53 604	145 366	465 023	472 766
L-Ornithine	1354	562	1988	3836	725	2043	2720	1437
L-Phenylalanine	6023	6793	8427	30 896	3393	3052	0	5769
L-Serine	2675	2503	5180	14 425	2658	3134	2617	10421
L-Threonine	2438	1531	2835	8252	1614	2111	2089	7324
L-Tyrosine	646	1038	884	3756	278	326	0	9464
Sarcosine	6044	5857	12 512	34 552	5858	8329	10 555	28 340
Taurine	92	333	462	1311	204	247	201	944

образцах. В экстрактах из 2 млн моноцитов удалось идентифицировать на 15% больше липидов, чем в экстрактах из 1 млн. В 5 млн клеток идентифицировано на 21% больше липидов, чем в 2 млн, а в 10 млн на 65% больше, чем в 5 млн. Для ОАМ при аналогичном сравнении получены следующие результаты: в 2 млн на 28% больше, чем в 1 млн, в 5 млн на 10% больше, чем в 2 млн, и в 10 млн на 6% больше, чем в 5 млн. Таким образом, при ограниченном количестве клеточного материала (макрофагов) необходимо анализировать не менее 2 млн клеток, поскольку именно при переходе от 1 млн клеток к 2 млн достигается наибольший прирост идентификаций. В случае с моноцитами принципиальной разницы между образцами с 1, 2 или 5 млн клеток нет.

Результаты анализа профиля аминокислот в образцах моноцитов и ОАМ представлены в табл. 2. Площади хроматографических пиков коррелируют с числом клеток в образцах, за исключением образцов моноцитов, содержащих 1 млн клеток. В данном случае, по всей видимости, накладывается ограничение чувствительности хромато-масс-спектрометрического анализа. Рекомендуется исследовать образцы, содержащие не менее 2 млн клеток.

## ВЫВОДЫ

Разработан метод анализа метаболома клеточных культур моноцитов и ОАМ с помощью ВЭЖХ-МС/МС. В

качестве оптимального метода пробоподготовки выбран модифицированный метод Фолча с двойной экстракцией, позволяющий одновременно выделить экстракт липидов (органическая фаза) и экстракт водорастворимых веществ, в частности аминокислот (водно-метанольная фаза). Наиболее интенсивные пики в масс-спектрах соответствуют липидам и другим метаболитам, что делает данный подход эффективным для получения метаболомного профиля. В рамках данного исследования были проанализированы возможности ВЭЖХ-МС/МС липидных экстрактов клеток с различным хроматографическим разделением: HILIC и обращенно-фазовая хроматография. Наиболее информативные данные получены с помощью обращенно-фазовой хроматографии. Проведен сравнительный анализ липидома и аминокислотного состава образцов моноцитов и макрофагов, содержащих 1, 2, 5 и 10 млн клеток. Липиды и аминокислоты обнаружены во всех исследованных образцах, но наиболее эффективная идентификация может быть выполнена для образцов, содержащих не менее 2 млн клеток. Разработанный подход для анализа метаболома клеточных культур методом ВЭЖХ-МС будет использован для определения метаболомного состава макрофагов и моноцитов, а также для поиска характерных различий в метаболомном профиле опухолеассоциированных макрофагов и моноцитов при онкологических заболеваниях.

## Литература

1. Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncol.* 2017; 3: 524–48.
2. Riabov V, Gudima A, Wang N, Mickley A, Orekhov A, Kzhyshkowska J. Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Front Physiol.* 2014; 5 (75).
3. Lewis CE, Harney AS, Pollard JW. The multifaceted role of perivascular macrophages in tumors. *Cancer Cell.* 2016; 30: 18–25.
4. Larionova I, Kazakova E, Gerashchenko T, Kzhyshkowska J. New Angiogenic Regulators Produced by TAMs: Perspective for Targeting Tumor Angiogenesis. *Cancers.* 2021; 13: 3253.
5. Riabov V, Yin S, Song B, Avdic A, Schledzewski K, Ovsy I, et al. Stabilin-1 is expressed in human breast cancer and supports tumor growth in mammary adenocarcinoma mouse model. *Oncotarget.* 2016; 7: 31097.
6. Larionova I, Tuguzbaeva G, Ponomaryova A, Stakheyeva M, Cherdynseva N, Pavlov V, Choinzonov E and Kzhyshkowska J. Tumor-Associated Macrophages in Human Breast, Colorectal, Lung, Ovarian and Prostate Cancers. *Front Oncol.* 2020; 10: 566511.
7. Ding M, Fu X, Tan H, Wang R, Chen Z, Ding S. The effect of vascular endothelial growth factor C expression in tumor-associated macrophages on lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in breast cancer. *Mol Med Rep.* 2012; 6: 1023–9.

8. Mitrofanova I, Zavyalova M, Telegina N, Buldakov M, Riabov V, Cherdyntseva N, et al. Tumor-associated macrophages in human breast cancer parenchyma negatively correlate with lymphatic metastasis after neoadjuvant chemotherapy. *Immunobiology*. 2017; 222: 101–9.
9. Rhee I. Diverse macrophages polarization in tumor microenvironment. *Arch Pharm Res*. 2016; 39: 1588–96.
10. Liu T, Larionova I, Litviakov N, Riabov V, Zavyalova M, Tsyganov M, et al. Tumor-associated macrophages in human breast cancer produce new monocyte attracting and pro-angiogenic factor YKL-39 indicative for increased metastasis after neoadjuvant chemotherapy. *Oncoimmunology*. 2018; 7 (6): e1436922.
11. Larionova I, Kazakova E, Patysheva M, Kzhyshkowska J. Transcriptional, Epigenetic and Metabolic Programming of Tumor-Associated Macrophages. *Cancers*. 2020; 12 (6): 1411.
12. Larionova I, Cherdyntseva N, Liu T, Patysheva M, Rakina M, Kzhyshkowska J. Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy. *Oncoimmunology*. 2019; 8 (7): e1596004.
13. Riabov V, Salazar F, Htwe SS, Gudima A, Schmuttermaier C, Barthes J, et al. Generation of anti-inflammatory macrophages for implants and regenerative medicine using self-standing release systems with a phenotype-fixing cytokine cocktail formulation. *Acta biomaterialia*. 2017; 53: 389–98.
14. Nguyen A, Rudge SA, Zhang Q, Wakelam MJ. Using lipidomics analysis to determine signalling and metabolic changes in cells. *Curr Opin Biotechnol*. 2017; 43: 96–103.
15. Cifková E, Holčapek M, Lisa M, Vrána D, Gatěk J, Melichar B. Determination of lipidomic differences between human breast cancer and surrounding normal tissues using HILIC-HPLC/ESI-MS and multivariate data analysis. *Anal Bioanal Chem*. 2015; 407 (3): 991–1002.
16. Folch J. Simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957; 226 (1): 497–509.
17. Husen P, Tarasov K, Katafiasz M, Sokol E, Vogt J, Baumgart J, et al. Analysis of Lipid Experiments (ALEX): A Software Framework for Analysis of High-Resolution Shotgun Lipidomics Data. *PLoS One*. 2013; 8 (11): e79736.
18. Cifkova E, Holcapek M, Lisa M. Nontargeted lipidomic characterization of porcine organs using hydrophilic interaction liquid chromatography and off-line two-dimensional liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Lipids*. 2013; 48 (9): 915–28.
19. Li M, Yang L, Bai Y, Liu H. Analytical Methods in Lipidomics and Their Applications. *Anal Chem*. 2014; 86 (1): 161–75.
20. Koelmel JP, Kroeger NM, Ulmer CZ, Bowden JA, Patterson RE, Cochran JA, et al. LipidMatch: An automated workflow for rule-based lipid identification using untargeted high-resolution tandem mass spectrometry data. *BMC Bioinformatics*. 2017; 18 (1): 1–11.
21. Токарева А. О., Чаговец В. В., Кононихин А. С., Стародубцева Н. Л., Франкевич В. Е., Николаев Е. Н.. Алгоритм обработки масс-спектрометрических данных для получения диагностической панели молекулярных соединений на примере поиска маркеров метастазирования при раке молочной железы. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*. 2021; 4 (3): e00156
22. Tokareva AO, Chagovets VV, Kononikhin AS, Starodubtseva NL, Nikolaev EN, Frankevich VE. Normalization methods for reducing interbatch effect without quality control samples in liquid chromatography-mass spectrometry-based studies. *Anal Bioanal Chem*. 2021; 413 (13): 3479–86.
23. Tokareva AO, Chagovets VV, Starodubtseva NL, Nazarova NM, Nekrasova ME, Kononikhin AS, et al. Feature selection for OPLS-DA discriminant analysis of cancer tissue lipidomics data. *JMS*. 2019; 55 (1): e4457.
24. Han X, Yang J, Cheng H, Yang K, Abendschein DR, Gross RW. Shotgun lipidomics identifies cardioplin depletion in diabetic myocardium linking altered substrate utilization with mitochondrial dysfunction. *Biochemistry*. 2005; 44 (50): 16684–94.

## References

1. Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncol*. 2017; 3: 524–48.
2. Riabov V, Gudima A, Wang N, Mickley A, Orekhov A, Kzhyshkowska J. Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Front Physiol*. 2014; 5 (75).
3. Lewis CE, Harney AS, Pollard JW. The multifaceted role of perivascular macrophages in tumors. *Cancer Cell*. 2016; 30: 18–25.
4. Larionova I, Kazakova E, Gerashchenko T, Kzhyshkowska J. New Angiogenic Regulators Produced by TAMs: Perspective for Targeting Tumor Angiogenesis. *Cancers*. 2021; 13: 3253.
5. Riabov V, Yin S, Song B, Avdic A, Schledzewski K, Ovsy I, et al. Stabilin-1 is expressed in human breast cancer and supports tumor growth in mammary adenocarcinoma mouse model. *Oncotarget*. 2016; 7: 31097.
6. Larionova I, Tuguzbaeva G, Ponomaryova A, Stakheyeva M, Cherdyntseva N, Pavlov V, Choinzonov E and Kzhyshkowska J. Tumor-Associated Macrophages in Human Breast, Colorectal, Lung, Ovarian and Prostate Cancers. *Front Oncol*. 2020; 10: 566511.
7. Ding M, Fu X, Tan H, Wang R, Chen Z, Ding S. The effect of vascular endothelial growth factor C expression in tumor-associated macrophages on lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in breast cancer. *Mol Med Rep*. 2012; 6: 1023–9.
8. Mitrofanova I, Zavyalova M, Telegina N, Buldakov M, Riabov V, Cherdyntseva N, et al. Tumor-associated macrophages in human breast cancer parenchyma negatively correlate with lymphatic metastasis after neoadjuvant chemotherapy. *Immunobiology*. 2017; 222: 101–9.
9. Rhee I. Diverse macrophages polarization in tumor microenvironment. *Arch Pharm Res*. 2016; 39: 1588–96.
10. Liu T, Larionova I, Litviakov N, Riabov V, Zavyalova M, Tsyganov M, et al. Tumor-associated macrophages in human breast cancer produce new monocyte attracting and pro-angiogenic factor YKL-39 indicative for increased metastasis after neoadjuvant chemotherapy. *Oncoimmunology*. 2018; 7 (6): e1436922.
11. Larionova I, Kazakova E, Patysheva M, Kzhyshkowska J. Transcriptional, Epigenetic and Metabolic Programming of Tumor-Associated Macrophages. *Cancers*. 2020; 12 (6): 1411.
12. Larionova I, Cherdyntseva N, Liu T, Patysheva M, Rakina M, Kzhyshkowska J. Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy. *Oncoimmunology*. 2019; 8 (7): e1596004.
13. Riabov V, Salazar F, Htwe SS, Gudima A, Schmuttermaier C, Barthes J, et al. Generation of anti-inflammatory macrophages for implants and regenerative medicine using self-standing release systems with a phenotype-fixing cytokine cocktail formulation. *Acta biomaterialia*. 2017; 53: 389–98.
14. Nguyen A, Rudge SA, Zhang Q, Wakelam MJ. Using lipidomics analysis to determine signalling and metabolic changes in cells. *Curr Opin Biotechnol*. 2017; 43: 96–103.
15. Cifková E, Holčapek M, Lisa M, Vrána D, Gatěk J, Melichar B. Determination of lipidomic differences between human breast cancer and surrounding normal tissues using HILIC-HPLC/ESI-MS and multivariate data analysis. *Anal Bioanal Chem*. 2015; 407 (3): 991–1002.
16. Folch J. Simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957; 226 (1): 497–509.
17. Husen P, Tarasov K, Katafiasz M, Sokol E, Vogt J, Baumgart J, et al. Analysis of Lipid Experiments (ALEX): A Software Framework for Analysis of High-Resolution Shotgun Lipidomics Data. *PLoS One*. 2013; 8 (11): e79736.
18. Cifkova E, Holcapek M, Lisa M. Nontargeted lipidomic

- characterization of porcine organs using hydrophilic interaction liquid chromatography and off-line two-dimensional liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Lipids*. 2013; 48 (9): 915–28.
19. Li M, Yang L, Bai Y, Liu H. Analytical Methods in Lipidomics and Their Applications. *Anal Chem*. 2014; 86 (1): 161–75.
  20. Koelmel JP, Kroeger NM, Ulmer CZ, Bowden JA, Patterson RE, Cochran JA, et al. LipidMatch: An automated workflow for rule-based lipid identification using untargeted high-resolution tandem mass spectrometry data. *BMC Bioinformatics*. 2017; 18 (1): 1–11.
  21. Tokareva AO, Chagovets VV, Kononikhin AS, Starodubtseva NL, Frankevich VE, Nikolaev EN. Algoritm obrabotki mass-spektrometricheskix dannyx dlya polucheniya diagnosticheskoy paneli molekulyarnyx soedinenij na primere poiska markerov metastazirovaniya pri rake molochnoj zhelezy. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*. 2021; 4 (3): e00156. Russian.
  22. Tokareva AO, Chagovets VV, Kononikhin AS, Starodubtseva NL, Nikolaev EN, Frankevich VE. Normalization methods for reducing interbatch effect without quality control samples in liquid chromatography-mass spectrometry-based studies. *Anal Bioanal Chem*. 2021; 413 (13): 3479–86.
  23. Tokareva AO, Chagovets VV, Starodubtseva NL, Nazarova NM, Nekrasova ME, Kononikhin AS, et al. Feature selection for OPLS-DA discriminant analysis of cancer tissue lipidomics data. *JMS*. 2019; 55 (1): e4457.
  24. Han X, Yang J, Cheng H, Yang K, Abendschein DR, Gross RW. Shotgun lipidomics identifies cardiolipin depletion in diabetic myocardium linking altered substrate utilization with mitochondrial dysfunction. *Biochemistry*. 2005; 44 (50): 16684–94.