

doi 10.18699/vjgb-24-96

Изучение особенностей метаболизма тканей глиобластомы и перитуморального пространства при использовании таргетированного метаболомного скрининга методом ВЭЖХ-МС/МС и генных сетей

Н.В. Басов^{1, 2}✉, А.В. Адамовская^{1, 2, 3}§, А.Д. Рогачев^{1, 2}, Е.В. Гайслер², П.С. Деменков^{1, 2, 3}, Т.В. Иванисенко^{1, 2, 3}, А.С. Вензель^{2, 3}, С.В. Мишинов^{1, 4}, В.В. Ступак⁴, С.В. Чересиз², О.С. Олешко², Е.А. Бутикова^{2, 5}, А.Е. Осечкова^{1, 6}, Ю.С. Сотникова^{1, 2, 6}, Ю.В. Патрушев^{2, 6}, А.С. Поздняков⁷, И.Н. Лаврик³, В.А. Иванисенко^{1, 2, 3, 8}, А.Г. Покровский^{1, 2}

¹ Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁴ Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия

⁵ Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁶ Федеральный исследовательский центр Институт катализа им. Г.К. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁷ Федеральный исследовательский центр «Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского Сибирского отделения Российской академии наук», Иркутск, Россия

⁸ Курчатowskiй геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

✉ basov@nioch.nsc.ru

Аннотация. В ходе исследования проведен комплексный анализ метаболомных профилей глиобластомы и прилегающей ткани головного мозга, включавший 17 образцов глиобластомы и 15 образцов перитуморальной ткани. С использованием метода ВЭЖХ-МС/МС было проанализировано более 400 метаболитов, что позволило выявить значимые различия в их содержании между опухолевой и перитуморальной тканями. Статистический анализ, включавший тесты Манна-Уитни и Куккони, показал, что существенное количество метаболитов, в частности церамиды, значимо различается в тканях глиобластомы и перитуморального пространства. Анализ метаболитических путей из базы данных KEGG, выполненный с помощью MetaboAnalyst 6.0, выявил статистически значимую перепредставленность метаболизма сфинголипидов, что указывает на важную роль этих липидных молекул в патогенезе глиобластомы. С использованием методов компьютерной системной биологии и искусственного интеллекта, реализованных в когнитивной системе ANDSystem, реконструированы молекулярно-генетические регуляторные пути, описывающие потенциальные механизмы нарушения функции ферментов метаболизма сфинголипидов. Реконструированные пути были объединены в регуляторную генную сеть. Данная сеть включала 15 генов, 329 белков и 389 взаимодействий, при этом 119 из 294 белков, регулирующих ключевые ферменты сфинголипидного метаболизма, оказались ассоциированы с глиобластомой. Анализ перепредставленности биологических процессов Gene Ontology показал статистическую значимость 184 процессов, в том числе апоптоза, сигнального пути NF-κB, пролиферации, миграции, ангиогенеза и пироптоза, многие из которых играют важную роль в онкогенезе. Результаты исследования подчеркивают ключевую роль метаболизма сфинголипидов в развитии глиобластомы и открывают новые перспективы для разработки терапевтических подходов, направленных на его модуляцию.

Ключевые слова: глиобластома; перитуморальная ткань; маркеры; метаболомика; ВЭЖХ-МС/МС; сфинголипиды; метаболитические пути; генные сети; когнитивная система ANDSystem.

Для цитирования: Басов Н.В., Адамовская А.В., Рогачев А.Д., Гайслер Е.В., Деменков П.С., Иванисенко Т.В., Вензель А.С., Мишинов С.В., Ступак В.В., Чересиз С.В., Олешко О.С., Бутикова Е.А., Осечкова А.Е., Сотникова Ю.С., Патрушев Ю.В., Поздняков А.С., Лаврик И.Н., Иванисенко В.А., Покровский А.Г. Изучение особенностей метаболизма тканей глиобластомы и перитуморального пространства при использовании таргетированного метаболомного скрининга методом ВЭЖХ-МС/МС и генных сетей. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(8):882-896. doi 10.18699/vjgb-24-96

Финансирование. Изготовление монолитных колонок для HPLC поддержано средствами проекта № FWUR-2024-0032. Отбор, пробоподготовка и анализ образцов методом ВЭЖХ-МС/МС поддержаны средствами государственного задания № FSUS-2020-0035. Биоинформатический анализ поддержан бюджетным проектом FWNR-2022-0020.

© Басов Н.В., Адамовская А.В., Рогачев А.Д., Гайслер Е.В., Деменков П.С., Иванисенко Т.В., Вензель А.С., Мишинов С.В., Ступак В.В., Чересиз С.В., Олешко О.С., Бутикова Е.А., Осечкова А.Е., Сотникова Ю.С., Патрушев Ю.В., Поздняков А.С., Лаврик И.Н., Иванисенко В.А., Покровский А.Г., 2024

§ Авторы внесли равный вклад в работу.

Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

Investigation of metabolic features of glioblastoma tissue and the peritumoral environment using targeted metabolomics screening by LC-MS/MS and gene network analysis

N.V. Basov^{1,2}✉, A.V. Adamovskaya^{1,2,3}§, A.D. Rogachev^{1,2}, E.V. Gaisler², P.S. Demenkov^{1,2,3}, T.V. Ivanisenko^{1,2,3}, A.S. Venzel^{2,3}, S.V. Mishinov⁴, V.V. Stupak⁴, S.V. Cheresiz², O.S. Oleshko², E.A. Butikova^{2,5}, A.E. Osechkova^{1,6}, Yu.S. Sotnikova^{1,2,6}, Y.V. Patrushev^{2,6}, A.S. Pozdnyakov⁷, I.N. Lavrik³, V.A. Ivanisenko^{1,2,3,8}, A.G. Pokrovsky^{1,2}

¹ N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁴ Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics named after Ya.L. Tsvivan of the Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia

⁵ Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁶ Borekov Institute of Catalysis of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁷ A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

⁸ Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia

✉ basov@nioch.nsc.ru

Abstract. The metabolomic profiles of glioblastoma and surrounding brain tissue, comprising 17 glioblastoma samples and 15 peritumoral tissue samples, were thoroughly analyzed in this investigation. The LC-MS/MS method was used to analyze over 400 metabolites, revealing significant variations in metabolite content between tumor and peritumoral tissues. Statistical analyses, including the Mann–Whitney and Cuzco tests, identified several metabolites, particularly ceramides, that showed significant differences between glioblastoma and peritumoral tissues. Pathway analysis using the KEGG database, conducted with MetaboAnalyst 6.0, revealed a statistically significant overrepresentation of sphingolipid metabolism, suggesting a critical role of these lipid molecules in glioblastoma pathogenesis. Using computational systems biology and artificial intelligence methods implemented in a cognitive platform, ANDSystem, molecular genetic regulatory pathways were reconstructed to describe potential mechanisms underlying the dysfunction of sphingolipid metabolism enzymes. These reconstructed pathways were integrated into a regulatory gene network comprising 15 genes, 329 proteins, and 389 interactions. Notably, 119 out of the 294 proteins regulating the key enzymes of sphingolipid metabolism were associated with glioblastoma. Analysis of the overrepresentation of Gene Ontology biological processes revealed the statistical significance of 184 processes, including apoptosis, the NF-κB signaling pathway, proliferation, migration, angiogenesis, and pyroptosis, many of which play an important role in oncogenesis. The findings of this study emphasize the pivotal role of sphingolipid metabolism in glioblastoma development and open new prospects for therapeutic approaches modulating this metabolism.

Key words: glioblastoma; peritumoral tissue; markers; metabolomics; LC-MS/MS; sphingolipids; metabolic pathways; gene networks; cognitive system ANDSystem.

For citation: Basov N.V., Adamovskaya A.V., Rogachev A.D., Gaisler E.V., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Venzel A.S., Mishinov S.V., Stupak V.V., Cheresiz S.V., Oleshko O.S., Butikova E.A., Osechkova A.E., Sotnikova Yu.S., Patrushev Y.V., Pozdnyakov A.S., Lavrik I.N., Ivanisenko V.A., Pokrovsky A.G. Investigation of metabolic features of glioblastoma tissue and the peritumoral environment using targeted metabolomics screening by LC-MS/MS and gene network analysis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(8):882-896. doi 10.18699/vjgb-24-96

Введение

Глиобластома (ГБМ) – наиболее распространенная первичная опухоль головного мозга у взрослых, агрессивность которой во многом определяется ее инвазией – активной инфильтрацией отдельных злокачественных клеток или их групп в паренхиму мозга, окружающую опухоль (Vollmann-Zwerenz et al., 2020). Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) классифицирует глиомы в зависимости от их типа клеток и агрессивности: класс I включает доброкачественные опухоли, а класс IV включает наиболее агрессивные типы опухолей – глиобластомы (Louis et al., 2021). Плохая выживаемость пациентов с ГБМ даже после наиболее радикальной операции по удалению первичной опухоли, сопровождаемой мультимодальной химиорадиотерапией (Omuro, DeAngelis, 2013), связана с рецидивами опухоли, которые появляются непосредственно в послеоперационной полости или в ее

2-сантиметровой маргинальной зоне, или в виде отдаленных и множественных рецидивных опухолевых очагов. По-видимому, эти рецидивные опухоли формируются за счет того, что клетки ГБМ из перитуморальной зоны вновь мигрируют в полость первичной опухоли или в отдаленные участки мозга.

Несмотря на устоявшиеся подходы к верификации заболевания, проблема установления прогноза опухолевого роста и чувствительности опухоли к лечению в настоящие дни находится на стадии решения. Так, в 2016 г. ВОЗ представила новую систему классификации опухолей головного мозга, включающую генетические маркеры IDH1/IDH2, O-6-метилгуанин ДНК-метилтрансферазу (MGMT) и рецепторы эпидермального фактора роста (EGFR) (Louis et al., 2021). Использование результатов исследований маркерных молекул позволяет клиницистам дифференцировать опухоли не только по типу клеток и агрессив-

ности, как это было возможно при ранее существовавших методах, но и по генетическому фенотипу неопластических клеток, что обеспечивает лучшую корреляцию с прогнозом опухоли (Jaroch et al., 2021). Молекулярные биомаркеры стали неотъемлемой частью оценки глиальных опухолей, а их содержание определяет клинические решения при некоторых подтипах глиом, включая лечение. Обсуждается потенциал классификации глиом, в основе которой будут лежать молекулярные маркеры, что позволит более качественно внедрять персонализированные подходы в терапии (Siegal, 2015). Одним из перспективных направлений современной науки, ориентированной на поиск биомаркеров заболеваний, является применение омиксных технологий, среди прочего – метаболомного скрининга.

Как и большинство злокачественных опухолей, глиобластома обладает уникальным биоэнергетическим состоянием аэробного гликолиза, известным как эффект Варбурга (Siegal, 2015), при котором аэробный гликолиз служит основным источником АТФ для раковых клеток (Warburg, 1956). Представления о метаболизме раковых клеток активно развиваются, однако преимущества, которые дает раковым клеткам метаболическая трансформация, остаются неясными (Korpenol et al., 2011), как и неясен механизм воздействия гипоксии на метаболическое перепрограммирование опухолевых клеток. Недавние открытия связи между онкогенами и метаболическими процессами привели к возрождению интереса к работам Варбурга (Poteet et al., 2013). Появляется все больше данных, указывающих на то, что адаптация аэробного гликолиза в раковых клетках может способствовать накоплению биомассы и, следовательно, пролиферации злокачественных клеток (Heiden et al., 2009). Изучение метаболизма опухолевых клеток актуально для разработки моделей, отражающих состав микроокружения опухоли (Liberti, Locasale, 2016), и поиска новых эффективных терапевтических подходов. Метаболомный подход к изучению глиобластомы приобретает большой интерес как диагностический инструмент, а также инструмент для изучения метаболизма ГБМ, знание которого может помочь в разработке новых терапевтических подходов (Pandey et al., 2017; Zhou, Wahl, 2019). В некоторых аспектах метаболомный анализ превосходит анализ экспрессии генов, поскольку функция генов может быть затронута на эпигенетическом и посттрансляционном уровнях, тогда как метаболиты служат непосредственными индикаторами ферментативной активности и биохимических процессов в клетке (Pandey et al., 2017).

Наиболее достоверным подходом к изучению особенностей метаболизма глиобластомы представляется анализ метаболических различий между разными областями глиобластомы (Wolf et al., 2010; Chinnaiyan et al., 2012), в частности между центральной областью опухоли и перитуморальной зоной, образцы которых можно получить интраоперационно в ходе резекции опухоли (Youngblood et al., 2021). Однако таких исследований в литературе представлено мало.

Для выявления молекулярно-генетических механизмов, объясняющих наблюдаемые метаболомные данные, применяют различные методы, основанные на анализе ме-

таболических путей и генных сетей. Генные сети могут дать ценную информацию о генетической регуляции идентифицированных метаболических путей, составляющих основу для интеграции метаболомных и геномных данных (Колчанов и др., 2013). Нами ранее была разработана программно-информационная система ANDSystem для автоматизированного извлечения биологических и медицинских знаний из научных публикаций на основе методов искусственного интеллекта (Demenkov et al., 2011; Ivanisenko V.A. et al., 2015, 2019; Ivanisenko T.V. et al., 2020, 2022). Эта программа позволяет пользователям проводить реконструкцию, расширение, графическую визуализацию генных сетей, осуществлять фильтрацию данных, а также с помощью шаблонов проводить поиск регуляторных путей в глобальной генной сети. ANDSystem применялась для анализа молекулярно-генетических механизмов широкого круга заболеваний, включая коморбидные состояния, ответ организма на стресс, поиск фармакологических мишеней, и других задач (Bragina et al., 2014, 2016, 2023; Popik et al., 2016; Saik et al., 2016, 2018a, b, 2019; Zolotareva et al., 2019; Антропова и др., 2022; Деменков и др., 2023).

С использованием ANDSystem проводился анализ метаболомных и протеомных данных (Pastushkova et al., 2013, 2019; Binder et al., 2014; Larina et al., 2015; Rogachev et al., 2021; Ivanisenko V.A. et al., 2022; Иванисенко и др., 2023). В частности, на основе метаболомного анализа плазмы крови пациентов с COVID-19 была установлена роль неструктурных вирусных белков в нарушениях метаболизма при данной патологии, что повлияло на изменение метаболомного профиля (Ivanisenko V.A. et al., 2022). Анализ метаболомного профиля пациентов с постоперационным делирием, выполненный с помощью ANDSystem, позволил идентифицировать потенциальные маркеры, представленные рядом сфинголипидов, и установить молекулярно-генетические механизмы нарушения их метаболизма (Иванисенко и др., 2023).

В настоящей работе был проведен таргетированный скрининг широкого профиля метаболитов в глиобластоме и перитуморальной ткани опухоли. В ходе статистического анализа данных скрининга были выявлены метаболиты, участвующие в метаболизме сфинголипидов, содержание которых в опухоли значительно отличалось от содержания в перитуморальной ткани. На основе реконструкции генных сетей определены гены, оказывающие наибольшее регуляторное влияние на функции и экспрессию ключевых ферментов метаболизма сфинголипидов, среди которых оказались как известные опухолевые маркеры (p53, TNF- α , VEGF и др.), так и перспективные кандидаты-маркеры (KLF4, E2F4 и др.). Нарушение функции этих генов при глиобластоме может объяснять наблюдаемые изменения метаболомного профиля.

Материалы и методы

Реактивы и материалы. Метанол и ацетонитрил, использованные для пробоподготовки и анализа, относились к градиентной ВЭЖХ и были приобретены в компании «Химмед» (Москва, Россия). Очищенную воду готовили на установке Sartorius arium 611DI. Элюэнт А готовили в соответствии с протоколом, описанным в (Li et al., 2017).

Пациенты – участники исследования. Для получения ткани опухолей в исследование были включены пациенты, подвергшиеся оперативному лечению в нейрохирургическом отделении Новосибирского научно-исследовательского института травматологии и ортопедии (НИИТО) им. Я.Л. Цивьяна (Новосибирск, Россия) по поводу впервые выявленной ГБМ в 2019–2022 гг., в том числе пациенты с глиомами IV класса, госпитализированные для хирургической резекции опухоли. Диагноз был подтвержден МРТ и гистопатологическим исследованием эксцизионного образца биопсии. Окончательный диагноз ставился на основании гистологического исследования и заключения двух патоморфологов в соответствии с классификацией ВОЗ. Образцы опухолей были собраны интраоперационно и анонимизированы для исследователей. Идентификатор клинических исследований NCT03865355. Всего в исследование было включено 17 пациентов. Ниже представлена их половозрастная характеристика:

Пол (М/Ж)	Возраст, лет				
	мин.	макс.	средний	медиана	станд. отклон.
8/9	28.2	69.6	54.9	63.22	15.9

Сбор образцов опухолевой ткани от пациентов. Образцы опухолевой ткани получали во время циторедуктивного оперативного вмешательства. После отбора образцы немедленно помещали в среду для культивирования клеток RPMI 1640 без добавок и хранили при +4 °С до обработки. Части опухоли из разных областей (центр опухоли и перитуморальная ткань) разделяли с помощью хирургического инструмента на фрагменты размером от 2×2×2 до 5×5×5 мм, заворачивали в пакетики из стерильной фольги, замораживали в жидком азоте и хранили в дальнейшем в низкотемпературном холодильнике (–80 °С). В общей сложности в исследовании были использованы образцы глиобластомы от 17 пациентов и образцы ткани перитуморального пространства от 15 пациентов.

Соответствие этическим стандартам. Исследование было рассмотрено Комитетом по этике Института медицины и психологии Зельмана Новосибирского государственного университета (протокол заседания от 04.01.2018), и все экспериментальные протоколы были утверждены. Все процедуры с участием людей признаны соответствующими этическим стандартам институционального исследовательского комитета и Хельсинкской декларации 1964 г. и последующим поправкам к ней или аналогичным этическим стандартам. Форма информированного согласия была заполнена и подписана каждым пациентом. Исследование одобрено Локальным этическим комитетом Новосибирского НИИТО им. Я.Л. Цивьяна (протокол заседания от 11.09.2017 № 050/17), информированное добровольное согласие получено у всех участников.

Пробоподготовка образцов глиобластомы и ткани перитуморального пространства. Экстракцию метаболитов из образцов глиобластомы проводили одновременно в соответствии с модифицированным протоколом, описанным в (Yuan et al., 2012; Li et al., 2017). В пробирке объемом 1.5 мл к образцу ткани массой от 9 до 33 мг добав-

ляли 250 мкл 80 % (об.) охлажденного метанола на 10 мг ткани. Затем образцы гомогенизировали в течение 2 мин на тканевом гомогенизаторе Bertin Minilys (Rockville, Мэриленд, США) (для улучшения дезинтеграции образцов добавляли гранитную крошку), после чего инкубировали 24 ч при –70 °С. Затем образцы перемешивали на вортексе и центрифугировали при +4 °С и 16000 g в течение 15 мин. Супернатант количественно переносили в новую полипропиленовую пробирку. К осадку добавляли тот же объем охлажденного 80 % (об/об) метанола, встряхивали на вортексе 1 мин, выдерживали при –70 °С в течение 30 мин и центрифугировали в аналогичных условиях. После центрифугирования супернатанты из обоих экстрактов объединяли, отбирали аликвоту объемом 500 мкл и упаривали досуха в вакуумной центрифуге SpeedVac concentrator (Thermo Fisher Scientific/Savant, Волтем, США). Высушенные образцы восстанавливали в 20 мкл воды MilliQ и анализировали.

Высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрической детекцией. Образцы анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС/МС) по методике, описанной в работе (Basov et al., 2024). Хроматографическое разделение проводили с использованием хроматографа LC-20AD Prominence (Shimadzu, Япония), оснащенного автодозатором SIL-20AC (Shimadzu, Япония), термостатированным при 10 °С. Объем пробы составлял 2 мкл. Элюент А – 5 % ацетонитрил в водном растворе 20 mM (NH₄)₂CO₃, доведенный до pH = 9.8 водным раствором аммиака. Элюент Б – 100 % ацетонитрил. Согласно методике, каждый образец анализировали дважды: в режимах гидрофильной (ГФХ) и обращенно-фазовой (ОФХ) хроматографии. Условия хроматографического разделения были следующие. Градиент ГФХ: 0 мин – 98 % Б, 2 мин – 98 % Б, 6 мин – 0 % Б, 10 мин – 0 % Б. Далее колонка уравнивалась на протяжении 4 мин. Градиент ОФХ: 0 мин – 0 % Б, 1 мин – 0 % Б, 6 мин – 98 % Б, 16 мин – 98 % Б. Далее колонка уравнивалась на протяжении 3 мин. Скорость потока в каждом из анализов составляла 300 мкл/мин. Анализ в обоих режимах хроматографии проводился при использовании монолитной колонки на основе 1-винил-1,2,4-триазола, 2 × 60 мм. Монолитный материал колонки был синтезирован в соответствии с методикой, описанной в работе (Patrushev et al., 2018): в стеклянной трубке с внутренним диаметром 2 мм выполнялась сополимеризация смеси стирола, дивинилбензола и 1-винил-1,2,4-триазола, взятых в объемном соотношении 10 : 50 : 40 соответственно.

Масс-спектрометрическую детекцию 489 метаболитов проводили в режиме MRM (multiple reaction monitoring – мониторинг множественных реакций) в виде положительных и отрицательных ионов с использованием масс-спектрометра API 6500 QTRAP (AB SCIEX, США), оснащенного источником ионизации электрораспылением. Основные масс-спектрометрические параметры: напряжение ионного распыления (IS) = 5500 В для режима положительной ионизации и –4500 В для режима отрицательной ионизации; температура газа-осушителя (TEM) –

Таблица 1. Схемы шаблонов молекулярно-генетических путей регуляции ферментов метаболических путей белками человека

№	Название шаблона	Схема шаблона регуляторного пути
P1	Белок-белковые взаимодействия	Hp – белок-белковые взаимодействия → Kp
P2	Регуляция функции белка	Hp – регуляция активности/деградации/протеолиза/транспорта → Kp
P3	Регуляция экспрессии	Hp – регуляция экспрессии → Kg – экспрессия → Kp

Примечание. Hp – белки человека; Kg – гены, кодирующие ферменты метаболического пути KEGG; Kp – ферменты метаболического пути KEGG.

475 °C, газ в ячейке соударений (CAD) – средний, давление газа-распылителя (GS1), газа-осушителя (GS2) и газовой завесы (CUR) – 33, 33 и 30 psi соответственно. Потенциал декластеризации (DP) составлял ±91 В, потенциал входа (EP) – ±10 В, потенциал на выходе из ячейки соударений (CXP) – ±9 В. Время сканирования перехода MRM – 5 мс. Переходы ионов-предшественников и фрагментных ионов, названия метаболитов, время фрагментации и соответствующие энергии столкновений были адаптированы из работ (Yuan et al., 2012; Li et al., 2017) (Приложение 1)¹. Управление устройством и сбор информации осуществляли с помощью программного обеспечения Analyst 1.6.3 (AB SCIEX). Хроматограммы обрабатывали в программном обеспечении Skyline 24.0 (Adams et al., 2020).

Предварительная обработка и статистический анализ данных. Статистический анализ результатов метаболомного скрининга глиобластомы и перитуморальной ткани проводился с помощью тестов Манна–Уитни и Куккони (Cusconi test), реализованных в пакетах Python (SciPy и Nonparstat). Тест Манна–Уитни использовали для выявления значимых различий между группами, тогда как тест Куккони – для дополнительного подтверждения выявленных различий в условиях неоднородности выборки. Коррекция выбросов осуществлялась следующим образом. Выбросом считалось значение, выходящее за 1.5 межквартильного интервала. Если значение было определено как выброс, оно заменялось на скорректированное по следующему правилу: замена производилась на значение, равное $1.5 \times$ значение межквартильного интервала $\pm 10^{-5}$ (значение вычиталось при выбросах «вверх» и прибавлялось при выбросах «вниз»).

Для выявления перепредставленных метаболических путей на основе установленных метаболитов с высокой значимостью использовалось программное онлайн-обеспечение MetaboAnalyst 6.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>) (Pang et al., 2021) с инструментом «Анализ обогащения» (Enrichment Analysis).

Реконструкция генных сетей проводилась с помощью графического пользовательского интерфейса ANDVisio программно-информационной системы ANDSystem (<http://www-bionet.sbcc.ru/andvisio/>). В модуле «Мастер путей» (Pathway Wizard) программы ANDVisio были созданы шаблоны путей регуляции ферментов выявленных метаболических путей белками человека (табл. 1). Список

идентификаторов белков человека извлечен из базы данных SwissProt (<https://www.uniprot.org/>).

Список белков, ассоциированных с глиобластомой, получен из базы знаний ANDSystem. Анализ сверхпредставленности биологических процессов Gene Ontology проводился с использованием веб-сервиса DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) с настройками, заданными по умолчанию.

Результаты

В рамках исследования были собраны и проанализированы образцы глиобластомы и ткани головного мозга, прилегающей к опухоли (17 образцов глиобластомы и 15 образцов перитуморальной ткани). Метаболомный анализ проводился с помощью разработанного нами ранее подхода с использованием метода ВЭЖХ-МС/МС (Basov et al., 2024). Полученные хроматограммы обрабатывали, интегрируя пик каждого метаболита, после чего сравнивали сигнал каждого метаболита между образцами глиобластомы и перитуморальной ткани. По результатам анализа были получены значения площадей пиков 446 метаболитов.

В качестве основного подхода к статистическому анализу результатов метаболомного скрининга был использован тест Манна–Уитни с критическим значением $p < 0.05$. Как дополнительный тест сравнения групп был выбран непараметрический тест Куккони. Мы сопоставили списки метаболитов, удовлетворяющих каждому из тестов при $p < 0.05$, и получили группу метаболитов, удовлетворяющих обоим тестам (табл. 2).

Для полученного набора метаболитов с использованием MetaboAnalyst 6.0 был проведен анализ перепредставленности метаболических путей KEGG (табл. 3). Согласно данному анализу, статистически значимым перепредставленным метаболическим путем является метаболизм сфинголипидов (Sphingolipid metabolism). Еще одним обогащенным маркерами путем оказался метаболический путь KEGG «Биосинтез пантотеновой кислоты и КоА» (p -value = 0.012), однако после поправки на множественное сравнение значение p -value превысило порог значимости 0.05 и составило 0.46.

Среди метаболитов – потенциальных маркеров 5 из 22 (~23 %) относились к церамидам – классу липидных молекул, являющихся основным компонентом клеточных мембран, а 3 метаболита (4-фосфопантотеновая кислота, малонил-КоА и кофермент А) – к основным предшественникам в биосинтезе липидов *de novo* (см. табл. 2).

¹ Приложения 1–5 см. по адресу:
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2024-28/appx31.xlsx>

Таблица 2. Метаболиты, содержание которых достоверно ($p < 0.05$) различается в образцах глиобластомы и перитуморального пространства

№ п/п	Название метаболита		p-value	
	на английском языке	на русском языке (при наличии)	Тест Куккони	Тест Манна–Уитни
1	Malonyl-CoA	Малонил-КоА	9.99×10^{-4}	1.17×10^{-4}
2	SM (d18:1/22:0 OH)	Сфингомиелин (d18:1/22:0 OH)	3.00×10^{-3}	2.52×10^{-3}
3	Octanoylcarnitine	Октаноилкарнитин	8.99×10^{-3}	4.10×10^{-3}
4	Pyroglutamic acid	Пироглутамовая кислота	2.00×10^{-3}	4.62×10^{-3}
5	Ceramide (d18:1/16:0 OH)*	Церамид (d18:1/16:0 OH)	3.00×10^{-3}	4.62×10^{-3}
6	3-Phosphoglyceric acid	3-Фосфоглицериновая кислота	1.20×10^{-2}	5.20×10^{-3}
7	THC 18:1/20:0	–	1.60×10^{-2}	7.33×10^{-3}
8	Hexose Disaccharide Pool	Пул дисахаридов гексоз	1.30×10^{-2}	8.20×10^{-3}
9	4-Phosphopantothenate	4-Фосфопантотеновая кислота	2.80×10^{-2}	8.20×10^{-3}
10	2-Octenoylcarnitine	2-Октеноилкарнитин	2.80×10^{-2}	4.10×10^{-3}
11	Ceramide (d18:1/16:0)*	Церамид (d18:1/16:0)	4.00×10^{-3}	9.17×10^{-3}
12	Ceramide (d18:1/22:0)*	Церамид (d18:1/22:0)	8.99×10^{-3}	1.14×10^{-2}
13	Coenzyme A	Кофермент А (КоА)	4.00×10^{-2}	1.27×10^{-2}
14	Pyridoxal	Пиридоксаль	3.10×10^{-2}	1.41×10^{-2}
15	N-carbamoyl-L-aspartate	N-карбамоил-L-аспартат	4.40×10^{-2}	1.74×10^{-2}
16	Citrulline	Цитруллин	2.50×10^{-2}	1.92×10^{-2}
17	Decanoylcarnitine	Деканоилкарнитин	4.70×10^{-2}	2.12×10^{-2}
18	GC (18:2/16:0)	Глицерохолин (18:2/16:0)	2.40×10^{-2}	2.35×10^{-2}
19	Purine	Пурин	2.00×10^{-2}	3.45×10^{-2}
20	Ceramide (d18:1/16:2)*	Церамид (d18:1/16:2)	3.20×10^{-2}	4.14×10^{-2}
21	Ceramide (d18:1/16:1 OH)*	Церамид (d18:1/16:1 OH)	2.50×10^{-2}	4.53×10^{-2}
22	Glycerophosphocholine	Глицерофосфохолин	3.00×10^{-2}	4.95×10^{-2}

* Метаболиты, относящиеся к классу церамидов.

Таблица 3. Перепредставленные метаболические пути KEGG для набора метаболомных маркеров

Метаболический путь (KEGG)	p-value	FDR*
Метаболизм сфинголипидов	7.95×10^{-5}	6.36×10^{-3}
Биосинтез пантотеновой кислоты и КоА	11.5×10^{-3}	4.6×10^{-1}

* FDR (False Discovery Rate) – поправка на множественное сравнение.

Содержание церамидов было в два раза и более выше в ткани опухоли, чем в перитуморальной ткани. Кроме того, в группе образцов глиобластомы дисперсия была значительно выше, что свидетельствует о большей гетерогенности группы (рис. 1).

Содержание метаболитов пути синтеза пантотеновой кислоты и КоА в тканях опухоли было достоверно снижено (рис. 2), что может свидетельствовать об их активном расходовании на биосинтез липидов.

На следующем шаге нашего исследования был проведен анализ потенциальных механизмов нарушения функции ферментов метаболизма сфинголипидов. Для этого с помощью ANDSsystem были реконструированы моле-

кулярно-генетические регуляторные пути по шаблонам, приведенным в табл. 1. Они описывают потенциальную регуляцию ферментов, входящих в метаболизм сфинголипидов, белками человека (Приложения 2–4). Первым звеном реконструированных регуляторных путей являлись все белки человека, последним – ферменты метаболизма сфинголипидов из базы данных KEGG, участвующие в метаболизме церамидов (ceramide), сфингомиелина (SM, sphingomyelin), GC (glucosylceramide) и THC (trihexosylceramide). Эти ферменты метаболизма сфинголипидов далее будем называть ключевыми. Мы рассмотрели такие взаимодействия между участниками регуляторных путей, как белок-белковые взаимодействия,

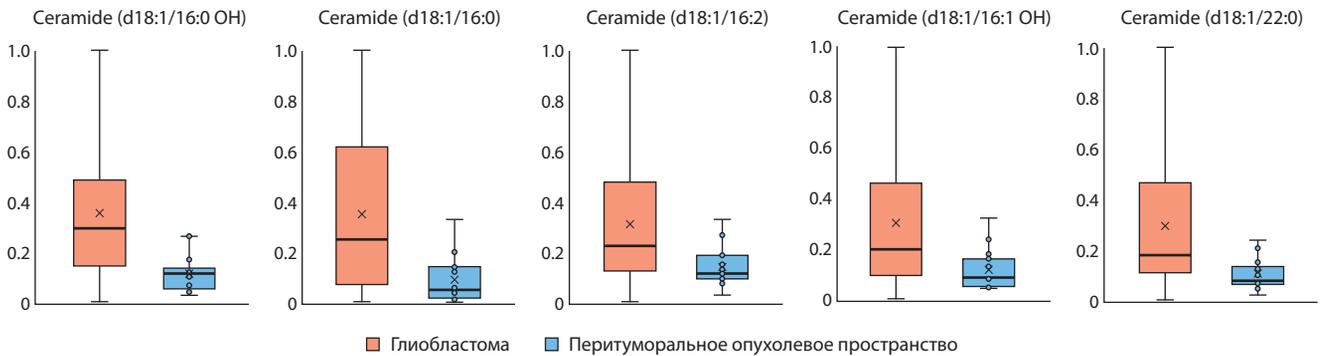


Рис. 1. Содержание маркерных церамидов в ткани опухоли и перитуморального пространства.

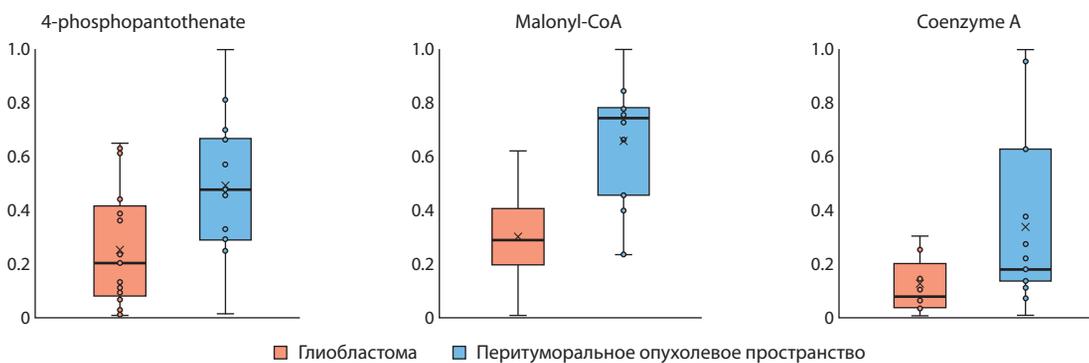


Рис. 2. Содержание КоА и связанных с ним метаболитов в ткани опухоли и перитуморального пространства.

регуляция экспрессии гена, регуляция активности/деградации/транспорта белка.

Реконструированные регуляторные пути были объединены в общую генную сеть (рис. 3). Регуляторная генная сеть включала 15 генов, 329 белков, среди которых 35 ферментов метаболизма сфинголипидов, и 389 взаимодействий между ними.

Согласно базе знаний ANDSystem, для 119 из 294 белков генной сети, регулирующих ключевые ферменты метаболизма сфинголипидов, в литературе приводятся данные о нарушении их функций при глиобластоме. Подсеть регуляторной генной сети, описывающая взаимодействия этих белков с ключевыми ферментами метаболизма сфинголипидов, показана на рис. 4.

Всего в ANDSystem хранится информация об ассоциации 2393 белков человека с глиобластомой, из которых 119 вошли в регуляторную генную сеть. Таким образом, согласно гипергеометрическому тесту, реконструированная генная сеть статистически значимо ассоциирована с глиобластомой (p -value < 10^{-35}).

Анализ перепредставленности биологических процессов Gene Ontology, выполненный для генов результирующей генной сети, показал статистическую значимость 184 процессов, включая апоптоз, сигнальный путь NF- κ B, пролиферацию, миграцию и ангиогенез, нарушаемые при многих онкологических заболеваниях, а также такие процессы, как пироптоз, роль которых при глиобластоме активно изучается (Приложения 5).

Обсуждение

Восприимчивость клеток глиобластомы к изменениям содержания метаболитов кофермента А

В нашей работе было установлено пониженное содержание КоА и малонил-КоА в тканях глиобластомы в сравнении с тканями перитуморального пространства (см. рис. 2). Для синтеза жирных кислот *de novo* глиобластома должна генерировать цитозольный ацетил-КоА, который может образовываться из цитрата под действием АТФ-цитратлиазы или из ацетата под действием ацетил-КоА-синтетазы (Santos, Schulze, 2012). В работе (Mashimo et al., 2014) показано, что опухоли головного мозга разного клеточного происхождения обладают способностью окислять введенный ацетат. Авторы утверждают, что для окисления ацетата клетка путем повышения экспрессии активирует изоформу ацетил-КоА-синтетазы ACSS2. Повышенная экспрессия ACSS2 при ГБМ по сравнению с глиомами более низкой степени злокачественности подтверждает утверждение о том, что активация этого фермента связана с увеличением окисления ацетата опухолью. При дефиците ACSS-2 у моделей мышей с гепатоцеллюлярной карциномой снижалась опухолевая нагрузка и ингибировался рост опухоли (Comerford et al., 2014).

Содержание малонил-КоА определяет направление метаболизма жирных кислот: синтез триглицеридов или окисление (Clarke S.D., Nakamura, 2004). Ранее в литературе отмечалось, что ингибирование β -окисления жирных

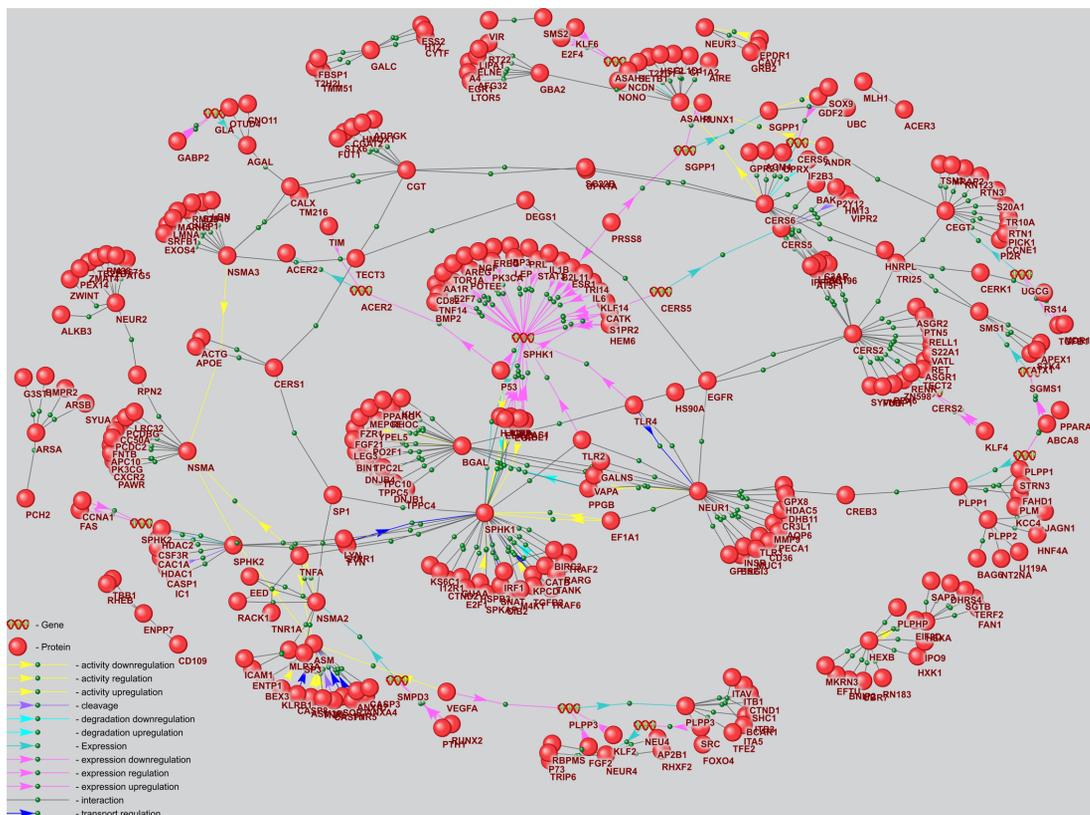


Рис. 3. Генная сеть регуляции ключевых ферментов метаболизма сфинголипидов, реконструированная путем объединения регуляторных путей, построенных по шаблонам трех типов.

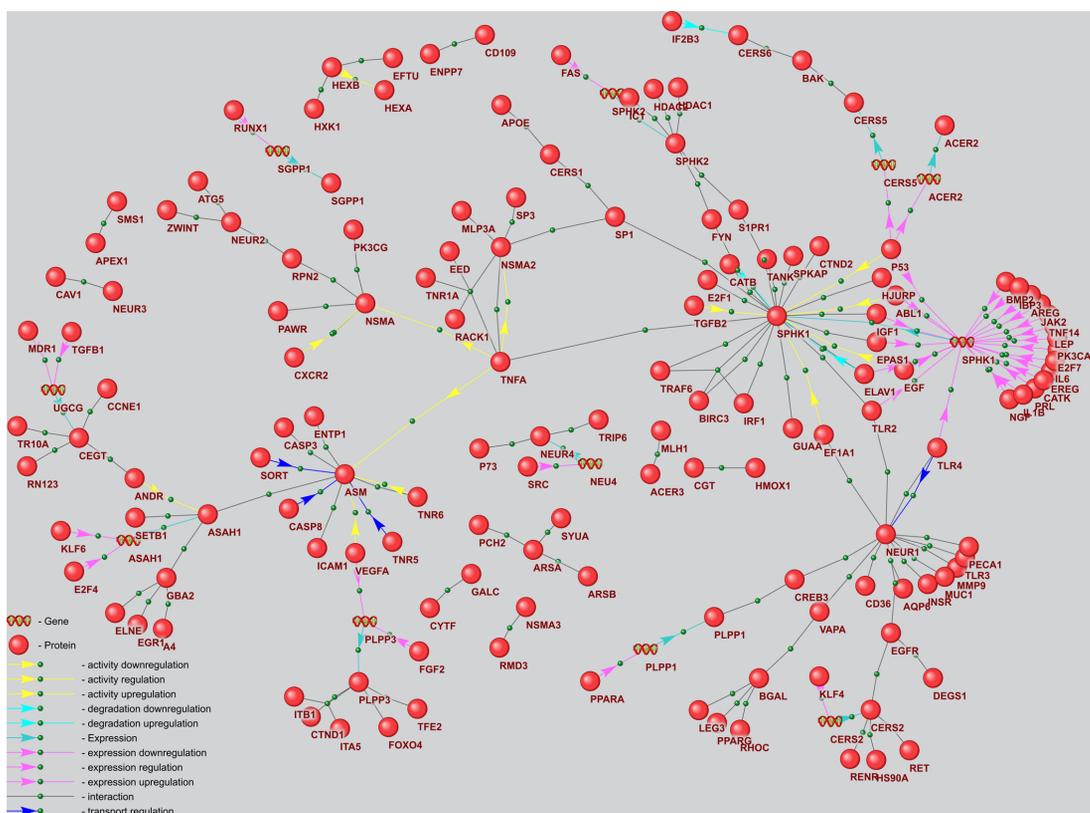


Рис. 4. Подсеть генной сети регуляции ключевых ферментов метаболизма сфинголипидов генетическими маркерами глиобластомы.

кислот в клетках глиобластомы человека этомоксиром, ингибитором карнитин-пальмитоилтрансферазы-1, заметно снижает уровень АТФ, НАДФН и восстановленного глутатиона, что оказывает влияние на их жизнеспособность (Pike et al., 2011). По всей видимости, β -окисление связано с устойчивостью к окислительному стрессу в клетках глиобластомы, а продемонстрированные нами результаты могут свидетельствовать в пользу этой гипотезы. Кроме того, имеются данные о связи содержания малонил-КоА с применением различных химиотерапевтических агентов. Так, в исследовании (Pizer et al., 2000) на клеточной модели рака молочной железы было обнаружено, что уровень малонил-КоА заметно повышался при ингибировании синтазы жирных кислот и снижался при ингибировании ацетил-КоА карбоксилазы. Ключевые метаболические пути, такие как гликолиз и цикл трикарбонных кислот (ЦТК), характеризуются наличием множества микроРНК, которые участвуют в регуляции этапов этих путей. Раковые клетки в основном используют аэробный гликолиз вместо ЦТК, что позволяет им поддерживать высокий уровень АТФ для обеспечения биосинтетических потребностей (Chan et al., 2015).

В нашей работе было показано возрастание содержания 4-фосфопантотената, что согласуется с изменениями липидного профиля. Синтез этого метаболита осуществляется при катализе пантотенаткиназой – первым ферментом в биосинтетическом пути КоА. Связь пантотенаткиназы с изменениями в глиобластоме активно обсуждается в литературе. Так, в работе (Poli et al., 2010) установлено, что рост клеток линии глиомы U373 снижался при сайленсинге пантотенаткиназы-2. Содержание ацетил-КоА и липидов может контролироваться микроРНК miR-103 и miR-107 (Wilfred et al., 2007). В свою очередь, литературные данные свидетельствуют об ингибировании miR-103 пролиферации и миграции клеток глиобластомы (Chen L.P. et al., 2018) и ингибировании ангиогенеза глиобластомы при повышении экспрессии miR-107 (Chen L. et al., 2016).

Связь биосинтеза церамидов с опухолевым ростом

Церамиды представляют собой липидные медиаторы класса сфинголипидов, которые участвуют в сигнальных путях, контролирующей пролиферацию, дифференцировку и гибель клеток (Riboni et al., 2002). В нашем исследовании показано, что содержание церамидов (16:0), (16:0 OH), (16:2), (16:1 OH), (22:0) – производных сфингомиелина (18:1) – повышено в ткани опухоли в сравнении с тканью перитуморального пространства (см. рис. 1). Ткань перитуморального пространства использовалась нами как контроль ввиду возможности получения ее образцов от пациентов оперативным путем, без вреда для прогноза лечения. Исходя из повышения содержания церамидов в опухолевой ткани, можно предположить изменения на уровне ферментных систем биосинтеза и деградации церамидов, которые могут быть связаны с опухолевым ростом и уходом опухолевых клеток от апоптоза.

Существует три основных пути образования церамидов. Сфингомиелиназный путь включает действие фермента сфингомиелиназы, который расщепляет сфингомиелин

в клеточной мембране для высвобождения церамидов. Церамиды могут также синтезироваться *de novo* путем синтеза из более простых молекул. Реутилизационный путь (salvage pathway) включает повторное использование сфинголипидов, которые расщепляются до сфингозина, через их реалкилирование для образования церамида.

Ключевой фермент сфингомиелиназного пути – сфингомиелиназа (SMase), катализирующая гидролиз сфингомиелина. Поскольку сфингомиелин является одним из наиболее представленных в клеточной мембране фосфолипидов, значимость этого пути синтеза церамидов заключается в том, что клеточная мембрана становится мишенью для внеклеточных сигналов, приводящих к программированной гибели клеток и клеточному стрессу (Haimovitz-Friedman et al., 1994). Различают три основных типа SMase: кислая (aSMase), нейтральная (nSMase) и щелочная (alk-SMase). Стимуляция активности сфингомиелиназы может быть вызвана разными факторами, в том числе действием противоопухолевых препаратов. Ингибиторы сфингомиелиназы, такие как перфеназин и флуфеназин, входящие в состав FIASMA (функционального ингибитора кислой сфингомиелиназы), могут применяться в терапии рака, хотя для подтверждения их эффективности необходимы дальнейшие исследования (Kornhuber et al., 2010). В недавних работах описаны ингибитор Atc39 (лабораторный код), блокирующий как лизосомальную, так и секреторную aSMase *in vitro* в клетках L929, HepG2 и B16 (Naser et al., 2020), и светоиндуцируемый ингибитор PCAI, способный ингибировать aSMase (Prause et al., 2020). Кроме того, сфингомиелиназа имеет важное значение в метаболизме сфинголипидов, что может оказывать влияние на развитие рака (Clarke C.J. et al., 2011). Ингибирование сфингомиелиназы и его влияние на экзосомы представляют интерес для онкологии и терапевтических подходов (Lin M. et al., 2018).

Семейство сфингомиелин-синтаз (SMS), состоящее из трех представителей: SMS1, SMS2 и SMS-родственного белка (SMSr) (Chen Y., Cao, 2017), катализирует синтез сфингомиелинов из церамидов (Cer) и фосфатидилхолина, тем самым высвобождая диацилглицерин. Продemonстрировано, что селективное ингибирование SMS приводит к увеличению концентрации церамидов в эндоплазматическом ретикулуме и запускает аутофагию в нейронах гиппокампа (Gulbins et al., 2018). В то же время при глиобластоме было замечено, что лечение 2-гидроксиолеиновой кислотой, противоопухолевым препаратом, повышало активность SMS. Активация SMS2 вызывает снижение уровня церамидов и стимулирует пролиферацию клеток посредством активации сигнального пути трансформирующего фактора роста- β (TGF- β)/Smad. Напротив, ингибирование SMS2 специфической миРНК приводило к накоплению церамидов и ускорению гибели клеток (Zheng et al., 2019). В недавних работах обнаружено, что SMS2 активируется при раке молочной железы и индуцирует поляризацию макрофагов и прогрессирование опухоли (Deng et al., 2021). Более того, ингибирование SMS2 с помощью нокдауна снижало высвобождение цитокинов, которые стимулируют поляризацию макрофагов в M2-макрофаги, уменьшая рост опухоли (Deng et al.,

2021). У пациентов с метастатической меланомой была обнаружена понижающая регуляция SMS1, связанная с ухудшением прогноза из-за дисбаланса между уровнями сфингомиелина и глюкозилцерамида (Bilal et al., 2019).

Серинопальмитоилтрансфераза (SPT) – гетеромерный фермент, состоящий из трех субъединиц, который катализирует первый этап синтеза церамидов *de novo*. SPT катализирует конденсацию L-серина и пальмитоил-кофермента А с образованием 3-кетосфинганина. В нескольких исследованиях отмечено повышение активности SPT в ответ на химиотерапию и лучевую терапию при различных видах рака. К настоящему времени описаны некоторые ингибиторы SPT, которые блокируют рост опухоли. В частности, мириоцин (также известный как ISP-1) является мощным ингибитором SPT (Glaros et al., 2007), способным вызывать подавление роста клеток рака молочной железы (Ogretmen, 2018) и меланомы B16F10 за счет остановки фазы G2/M (Lee et al., 2011). Существует положительная корреляция между ингибированием фермента SPT и подавлением роста клеточной линии аденокарциномы легкого человека (HCC4006) (Sano et al., 2017). Помимо того, ингибирование SPT мириоцином или снижение экспрессии фермента с помощью специфической миРНК ингибировало пролиферацию клеток глиобластомы человека U87MG – действие, которое было связано с подавлением внутриклеточных уровней S1P (Bernhart et al., 2015). Было высказано предположение, что противоопухолевая активность SPT обусловлена повышением уровня проапоптотических церамидов. В действительности у некоторых противоопухолевых препаратов терапевтическая активность по крайней мере частично обусловлена активацией SPT. В частности, фенретинид, синтетический ретиноид, оказывающий цитотоксический эффект для различных раковых клеток, повышал концентрации дезиксидцерамидов и церамидов. Это приводило к апоптозу клеток нейробластомы, что было связано со взаимодействием фенретинида с SPT (Maurer et al., 1999).

Церамидсинтаза (CerS) участвует как в процессе синтеза церамидов *de novo*, так и в реутилизационном пути. CerS представляет собой семейство из шести разных изоформ, каждая из которых синтезирует церамиды с различной длиной цепи жирного ацил-КоА, что приводит к определенной активности. Этот факт важен, поскольку, например, CerS1 генерирует церамиды (18:0), для которых показано ингибирование роста опухоли (Wang Z. et al., 2017), тогда как CerS5/6 продуцирует церамиды (16:0) – антиапоптотические метаболиты при плоскоклеточном раке головы и шеи человека (Moro et al., 2019). Специфический ингибитор CerS1, называемый P053, снижает уровень церамида (18:0) в клетках HEK 293, полученных из эмбриональных почек человека (Turner et al., 2018). Интересно, что аналоги, полученные из финголимода (FTY720), специфически ингибируют изоформы CerS в клетках HCT-106 и HeLa. В частности, ингибиторы ST1058 и ST1074 преимущественно ингибируют CerS2 и CerS4, в то время как ST1072 блокирует активность CerS4 и CerS6, а ST1060 ингибирует CerS2 (Schiffmann et al., 2012).

Дигидроцерамиддесатураза (Des1, DEGS1) – последний фермент в процессе синтеза церамида *de novo*. Этот

фермент катализирует превращение дигидроцерамида в церамид путем введения транс-двойной связи в положении (C₄-C₅). Нокдаун Des1 с помощью миРНК приводил к остановке клеточного цикла в клетках нейробластомы человека (Kravcka et al., 2007). Например, было показано, что ресвератрол, который является полифенолом с хорошо известными антиоксидантными свойствами, ингибирует Des1, вызывая аутофагию в клетках рака желудка HGC27 (Signorelli et al., 2009). Другие ингибиторы Des1, включая γ -токотриенол, феноксодиол или целекоксиб, индуцируют аутофагию путем накопления дигидроцерамида в клеточных линиях глиобластомы T98G и U87MG за счет ингибирования Des1 (Signorelli et al., 2009). N-[(1R,2S)-2-гидрокси-1-гидроксиметил-2-(2-тридецил-1-циклопропенил)этил]октанамид является специфическим ингибитором Des1, который эффективно активирует аутофагию и апоптоз клеточной линии глиомы человека U87MG. Обработка клеток тетрагидроканнабинолом вызывает изменение липидного состава эндоплазматического ретикулума и, наряду с этим, накопление дигидроцерамида из-за снижения экспрессии Des1, что приводит к стимуляции аутофагии и апоптоза в клетках глиомы U87MG человека (Hernández-Tiedra et al., 2016).

Глюкозилцерамидсинтаза (GCS) – лизосомальный фермент, который осуществляет гликозилирование церамидов с образованием глюкозилцерамидов. Показано, что уровень GCS повышается при различных типах рака, что связано с устойчивостью к противоопухолевым методам лечения (Madigan et al., 2020).

Церамидаза – фермент, отщепляющий остатки жирных кислот от церамидов с образованием сфингозинов. Избыточная экспрессия кислой церамидазы (ASAH1) была выявлена в меланомах, что, вероятно, приводит к резистентности к химиотерапии. Обнаружено участие ASAH1 в функционировании митохондрий и клеточной аутофагии в клетках меланомы (Lai M. et al., 2021). Было описано, что alk-SMase тесно связана с ростом, миграцией и инвазией опухолевых клеток (Zhang et al., 2020). Структурные аналоги церамидов продемонстрировали свою эффективность в качестве селективных ингибиторов церамидсинтазы, блокирующих рост клеток и являющихся подходящими кандидатами для противоопухолевого лечения (Steiner et al., 2016).

Нарушение генетической регуляции метаболизма сфинголипидов при глиобластоме

Применение ANDSystem позволило реконструировать генную сеть, описывающую регуляцию ключевых ферментов метаболизма сфинголипидов (см. рис. 3). Анализ регуляторной генной сети показал, что 119 входящих в нее белков ассоциированы с глиобластомой. Это подтверждает связь реконструированной генной сети с данным заболеванием (p -value < 10⁻³⁵). Среди наиболее изученных белков, ассоциированных с глиобластомой и вошедших в регуляторную генную сеть, оказались такие, как p53, TNF- α , TGF- β , VEGF, KLF4, E2F4.

Известно, что p53 участвует во многих внутриклеточных процессах, а нарушение его функции наблюдается при многих онкологических заболеваниях. В частности,

p53 играет ключевую роль в метаболизме сфинголипидов. p53 регулирует активность пяти ключевых ферментов метаболизма сфинголипидов (CerS5, CerS6, SMPD3, ACER2, SPHK1) из 35, представленных в реконструированной генной сети. В статье (Lacroix et al., 2020) показано, что белок p53 в опухолевых клетках повышает экспрессию церамидсинтазы 5 (CerS5) и 6 (CerS6), нейтральной сфингомиелиназы 2 (SMPD3), трех ферментов, синтезирующих керамины. В свою очередь, индукция транскрипции alk-SMase-2 белком p53 была исследована в работах (Wang Y. et al., 2017; Xu et al., 2018).

Согласно регуляторной генной сети, фактор некроза опухоли альфа (TNF- α) стимулирует активность сразу трех ферментов метаболизма сфинголипидов, среди которых кислая сфингомиелиназа (ASM), нейтральная сфингомиелиназа (NSMA) и нейтральная сфингомиелиназа 2 (NSMA2). Повышая активность этих ферментов, TNF- α может способствовать гидролизу сфингомиелина и образованию кераминов.

Трансформирующий фактор роста-бета (TGF- β) играет важную роль во многих типах клеток. Он инициирует клеточную передачу сигналов, приводя к активации нижестоящих субстратов и регуляторных белков, тем самым индуцируя транскрипцию различных генов-мишеней. В регуляторной генной сети TGF- β 2 повышает активность сфингозинкиназы-1 (SPHK1). Данный факт подтвержден в статье (Ren et al., 2009).

Установлено, что VEGF является компонентом микроокружения опухоли, способным активировать эндотелиальные клетки. Передача сигналов VEGF активирует эндотелиальные клетки через тирозинкиназные рецепторы VEGFR1 и VEGFR2 и способствует миграции, выживанию, пролиферации и дифференцировке клеток, а также инициирует ангиогенез, рост и метастазирование опухоли. В регуляторной генной сети фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) участвует в подавлении активности ASM и регуляции экспрессии фосфолипид фосфатазы 3 (PLPP3). При глиобластоме наблюдается высокая степень васкуляризации, а также сверхэкспрессия VEGF, что делает этот ген привлекательной мишенью для терапии глиобластом (Tea et al., 2020).

Крупнель-подобный фактор 4 (KLF4) участвует в регуляции пролиферации, дифференцировки, апоптоза и в перепрограммировании соматических клеток. Имеющиеся данные свидетельствуют также о том, что KLF4 является супрессором опухолей при некоторых видах рака (El-Karim et al., 2013). В регуляторной генной сети KLF4 модулирует экспрессию гена церамидсинтазы 2 (CerS2). Действительно, анализ иммунопреципитации хроматина показал (Fan et al., 2015), что KLF4 напрямую связывается с промоторной областью *CerS2* и активирует его экспрессию.

Согласно реконструированным связям, представленным в генной сети, белок E2F4 регулирует экспрессию *ASAH1*. Литературные данные показывают, что E2F4 действует как репрессор транскрипции, играя ключевую роль в подавлении генов, связанных с пролиферацией. Мутации и сверхэкспрессия гена E2F4 могут быть связаны с раком человека. Связываясь с промотором гена *ASAH1*, E2F4 подавляет его экспрессию (Melland-Smith et al., 2015).

Значимые биологические процессы, ассоциированные с генной сетью

Перепредставленные биологические процессы, в которые вовлечены участники регуляторной генной сети (см. Приложение 5), можно разделить на несколько групп, включая программируемую клеточную гибель, клеточную мобильность, ангиогенез, пролиферацию, ассоциация которых с онкологическими заболеваниями описана в литературе (Hanahan, Weinberg, 2000). Особого интереса заслуживает такой процесс программируемой клеточной гибели, как пироптоз, роль которого в развитии и прогрессировании глиобластомы активно обсуждается в последние годы (Lin J. et al., 2022). Этот процесс в генной сети был представлен рядом каспаз (CASP1, CASP3 и CASP8), а также нейтрофильной эластазой (Neutrophil elastase), которая в определенных ситуациях расщепляет гасдермин D (GSDMD) и активирует пироптоз либо способствует расщеплению GSDMB, тем самым ингибируя пироптоз (Kambara et al., 2018; Oltra et al., 2023). Таким образом, белки генной сети, относящиеся к пироптозу, вносят значительный вклад в его функционирование (Rao et al., 2022) (см. Приложение 5).

Ангиогенез способствует обеспечению глиобластомы питательными веществами и кислородом, что необходимо для поддержания опухолевого роста (Lara-Velazquez et al., 2017). В процесс ангиогенеза оказались вовлечены участники генной сети, важные генетические маркеры глиобластомы: фактор роста сосудов A (VEGFA), эпидермальный фактор роста (EGF), каталитическая субъединица A фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат-3-киназы (PIK3CA) и др. Данные гены играют ключевую роль в ангиогенезе (Danielsen, Rofstad, 1998). Глиобластома обладает высокой способностью к инвазии – ее клетки проникают в окружающие ткани мозга, что делает полное хирургическое удаление опухоли затруднительным, а иногда невозможным (Vollmann-Zwerenz et al., 2020). С клеточной миграцией в регуляторной генной сети были связаны такие белки, как TRIP6 (Thyroid receptor-interacting protein 6), сверхэкспрессирующийся при глиобластоме и способствующий инвазии опухолевых клеток (Lai Y.-J. et al., 2010), TGF- β 1, ITAV (Integrin alpha-V), CREB3 (Cyclic AMP-responsive element-binding protein 3) и др.

Заключение

С использованием метода ВЭЖХ-МС/МС был проведен таргетированный метаболомный скрининг глиобластомы и ткани перитуморального пространства онкологических пациентов. Биоинформатический анализ полученных метаболомных профилей, основанный на статистических методах и реконструкции генных сетей, позволил получить новые данные о механизмах развития и прогрессирования глиобластомы. Было показано, что ткани глиобластомы обладают измененным метаболизмом кофермента A и связанных с ним метаболитов, что отличает их от клеток перитуморального пространства. Наши результаты продемонстрировали пониженное содержание КоА и малонил-КоА в тканях глиобластомы, что может быть связано с усилением β -окисления жирных кислот и устойчивостью клеток глиобластомы к окислительному стрессу. Дополнительно мы выявили повышение содержания кераминов

в опухолевой ткани, что указывает на возможное изменение активности ферментов, участвующих в их синтезе и деградации, и на их связь с опухолевым ростом. Данные подтверждают, что нарушение липидного метаболизма, включая метаболизм КоА и церамидов, играет важную роль в патогенезе глиобластомы. Эти изменения могут стать мишенями для разработки новых терапевтических стратегий, направленных на нарушенные метаболические пути опухолевых клеток. В частности, ингибирование ключевых ферментов, таких как серинопальмитоилтрансфераза и сфингомиелиназа, представляется многообещающим подходом для снижения жизнеспособности клеток глиобластомы и предотвращения их дальнейшего роста.

Таким образом, результаты настоящей работы расширяют понимание метаболических особенностей глиобластомы и открывают новые перспективы для разработки целевых терапевтических стратегий, направленных на нарушение метаболизма липидов в опухолевых клетках. Дальнейшие исследования специфических метаболических изменений в различных типах глиобластомы, а также разработка и тестирование ингибиторов ключевых ферментов могут привести к значительному прогрессу в лечении данного заболевания.

Список литературы / References

Антропова Е.А., Хлебодарова Т.М., Деменков П.С., Вензель А.С., Иванисенко Н.В., Гавриленко А.Д., Иванисенко Т.В., Адамовская А.В., Ревва П.М., Лаврик И.Н., Иванисенко В.А. Компьютерный анализ особенностей регуляции гиперметилированных маркерных генов гепатокарциномы вирусными белками гепатита С. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(8):733-742. doi 10.18699/VJGB-22-89

[Antropova E.A., Khlebodarova T.M., Demenkov P.S., Venzel A.S., Ivanisenco N.V., Gavrilenco A.D., Ivanisenco T.V., Adamovskaya A.V., Revva P.M., Lavrik I.N., Ivanisenco V.A. Computer analysis of regulation of hepatocarcinoma marker genes hypermethylated by HCV proteins. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(8):733-742. doi 10.18699/VJGB-22-89]

Деменков П.С., Антропова Е.А., Адамовская А.В., Мищенко Е.Л., Хлебодарова Т.М., Иванисенко Т.В., Иванисенко Н.В., Вензель А.С., Лаврик И.Н., Иванисенко В.А. Приоритизация потенциальных фармакологических мишеней для создания лекарств против гепатокарциномы, модулирующих внешний путь апоптоза, на основе реконструкции и анализа ассоциативных генных сетей. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(7):784-793. doi 10.18699/VJGB-23-91

[Demenkov P.S., Antropova E.A., Adamovskaya A.V., Mishchenko E.L., Khlebodarova T.M., Ivanisenco T.V., Ivanisenco N.V., Venzel A.S., Lavrik I.N., Ivanisenco V.A. Prioritization of potential pharmacological targets for the development of anti-hepatocarcinoma drugs modulating the extrinsic apoptosis pathway: the reconstruction and analysis of associative gene networks help. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(7):784-793. doi 10.18699/VJGB-23-91]

Иванисенко В.А., Басов Н.В., Макарова А.А., Вензель А.С., Рогачев А.Д., Деменков П.С., Иванисенко Т.В., Клещев М.А., Гайслер Е.В., Мороз Г.Б., Плеско В.В., Сотникова Ю.С., Патрушев Ю.В., Ломиворотов В.В., Колчанов Н.А., Покровский А.Г. Применение генных сетей к анализу результатов метаболомного скрининга плазмы крови пациентов с послеоперационным делирием. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(7):768-775. doi 10.18699/VJGB-23-89

[Ivanisenco V.A., Basov N.V., Makarova A.A., Venzel A.S., Rogachev A.D., Demenkov P.S., Ivanisenco T.V., Kleshchev M.A., Gaisler E.V., Moroz G.B., Plesko V.V., Sotnikova Y.S., Patrushev Y.V., Lomivorotov V.V., Kolchanov N.A., Pokrovsky A.G. Gene networks for use in metabolomic data analysis of blood plasma from patients with postoperative delirium. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(7):768-775. doi 10.18699/VJGB-23-89]

Колчанов Н.А., Игнатьева Е.В., Подколдная О.А., Лихошвай В.А., Матушкин Ю.Г. Генные сети. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013;17(4/2):833-850

[Kolchanov N.A., Ignatieva E.V., Podkolodnaya O.A., Likhoshvai V.A., Matushkin Yu.G. Gene networks. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2013;17(4/2):833-850 (in Russian)]

Adams K.J., Pratt B., Bose N., Dubois L.G., St. John-Williams L., Perrott K.M., Ky K., Kapahi P., Sharma V., Maccoss M.J., Moseley M.A., Colton C.A., Maclean B.X., Schilling B., Thompson J.W. Skyline for small molecules: a unifying software package for quantitative metabolomics. *J. Proteome Res.* 2020;19(4):1447-1458. doi 10.1021/acs.jproteome.9b00640

Basov N.V., Rogachev A.D., Aleshkova M.A., Gaisler E.V., Sotnikova Y.S., Patrushev Y.V., Tolstikova T.G., Yarovaya O.I., Pokrovsky A.G., Salakhutdinov N.F. Global LC-MS/MS targeted metabolomics using a combination of HILIC and RP LC separation modes on an organic monolithic column based on 1-vinyl-1,2,4-triazole. *Talanta*. 2024;267:125168. doi 10.1016/j.talanta.2023.125168

Bernhart E., Damm S., Wintersperger A., Nussold C., Brunner A.M., Plastira I., Rechberger G., Reicher H., Wadsack C., Zimmer A., Malle E., Sattler W. Interference with distinct steps of sphingolipid synthesis and signaling attenuates proliferation of U87MG glioma cells. *Biochem. Pharmacol.* 2015;96(2):119-130. doi 10.1016/j.bcp.2015.05.007

Bilal F., Montfort A., Gilhodes J., Garcia V., Riond J., Carpentier S., Filleron T., Colacios C., Levade T., Daher A., Meyer N., Andrieu-Abadie N., Ségui B. Sphingomyelin synthase 1 (SMS1) downregulation is associated with sphingolipid reprogramming and a worse prognosis in melanoma. *Front. Pharmacol.* 2019;10:443. doi 10.3389/fphar.2019.00443

Binder H., Wirth H., Arakelyan A., Lembcke K., Tiys E.S., Ivanisenco V.A., Kolchanov N.A., Kononikhin A., Popov I., Nikolaev E.N., Pastushkova L.K., Larina I.M. Time-course human urine proteomics in space-flight simulation experiments. *BMC Genomics*. 2014;15(Suppl.12):S2. doi 10.1186/1471-2164-15-S12-S2

Bragina E.Y., Tiys E.S., Freidin M.B., Koneva L.A., Demenkov P.S., Ivanisenco V.A., Kolchanov N.A., Puzyrev V.P. Insights into pathophysiology of dystrophy through the analysis of gene networks: an example of bronchial asthma and tuberculosis. *Immunogenetics*. 2014;66(7-8):457-465. doi 10.1007/s00251-014-0786-1

Bragina E.Y., Tiys E.S., Rudko A.A., Ivanisenco V.A., Freidin M.B. Novel tuberculosis susceptibility candidate genes revealed by the reconstruction and analysis of associative networks. *Infect. Genet. Evol.* 2016;46:118-123. doi 10.1016/j.meegid.2016.10.030

Bragina E.Y., Gomboeva D.E., Saik O.V., Ivanisenco V.A., Freidin M.B., Nazarenko M.S., Puzyrev V.P. Apoptosis genes as a key to identification of inverse comorbidity of Huntington's disease and cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(11):9385. doi 10.3390/ijms24119385

Chan B., Manley J., Lee J., Singh S.R. The emerging roles of microRNAs in cancer metabolism. *Cancer Lett.* 2015;356(2, Part A):301-308. doi 10.1016/j.canlet.2014.10.011

Chen L., Li Z.Y., Xu S.Y., Zhang X.J., Zhang Y., Luo K., Li W.P. Upregulation of miR-107 inhibits glioma angiogenesis and VEGF expression. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2016;36(1):113-120. doi 10.1007/s10571-015-0225-3

Chen L.P., Zhang N.N., Ren X.Q., He J., Li Y. miR-103/miR-195/miR-15b regulate SALL4 and inhibit proliferation and migration in glioma. *Molecules*. 2018;23(11):2938. doi 10.3390/molecules23112938

- Chen Y., Cao Y. The sphingomyelin synthase family: proteins, diseases, and inhibitors. *Biol. Chem.* 2017;398(12):1319-1325. doi 10.1515/hsz-2017-0148
- Chinnaiyan P., Kensicki E., Bloom G., Prabhu A., Sarcar B., Kahali S., Eschrich S., Qu X., Forsyth P., Gillies R. The metabolomic signature of malignant glioma reflects accelerated anabolic metabolism. *Cancer Res.* 2012;72(22):5878-5888. doi 10.1158/0008-5472.CAN-12-1572-T
- Clarke C.J., Cloessner E.A., Roddy P.L., Hannun Y.A. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2) is the primary neutral sphingomyelinase isoform activated by tumour necrosis factor- α in MCF-7 cells. *Biochem. J.* 2011;435(2):381-390. doi 10.1042/BJ20101752
- Clarke S.D., Nakamura M.T. Fatty acid synthesis and its regulation. In: *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Acad. Press, 2004;99-103. doi 10.1016/B0-12-443710-9/00224-6
- Comerford S.A., Huang Z., Du X., Wang Y., Cai L., Witkiewicz A.K., Walters H., Tantawy M.N., Fu A., Manning H.C., Horton J.D., Hammer R.E., Mcknight S.L., Tu B.P. Acetate dependence of tumors. *Cell.* 2014;159(7):1591-1602. doi 10.1016/j.cell.2014.11.020
- Danielsen T., Rofstad E.K. VEGF, bFGF and EGF in the angiogenesis of human melanoma xenografts. *Int. J. Cancer.* 1998;76(6):836-841. doi 10.1002/(sici)1097-0215(19980610)76:6<836::aid-ijc12>3.0.co;2-0
- Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. ANDVisio: a new tool for graphic visualization and analysis of literature mined associative gene networks in the ANDSystem. *In Silico Biol.* 2011;11(3-4):149-161. doi 10.3233/ISB-2012-0449
- Deng Y., Hu J.C., He S.H., Lou B., Ding T.B., Yang J.T., Mo M.G., Ye D.Y., Zhou L., Jiang X.C., Yu K., Dong J.B. Sphingomyelin synthase 2 facilitates M2-like macrophage polarization and tumor progression in a mouse model of triple-negative breast cancer. *Acta Pharmacol. Sin.* 2021;42(1):149-159. doi 10.1038/s41401-020-0419-1
- El-Karim E.A., Hagos E.G., Ghaleb A.M., Yu B., Yang V.W. Krüppel-like factor 4 regulates genetic stability in mouse embryonic fibroblasts. *Mol. Cancer.* 2013;12:89. doi 10.1186/1476-4598-12-89
- Fan S.H., Wang Y.Y., Wu Z.Y., Zhang Z.F., Lu J., Li M.Q., Shan Q., Wu D.M., Sun C.H., Hu B., Zheng Y.L. AGPAT9 suppresses cell growth, invasion and metastasis by counteracting acidic tumor microenvironment through KLF4/LASS2/V-ATPase signaling pathway in breast cancer. *Oncotarget.* 2015;6(21):18406-18417. doi 10.18632/oncotarget.4074
- Glaros E.N., Kim W.S., Wu B.J., Suarna C., Quinn C.M., Rye K.A., Stocker R., Jessup W., Garner B. Inhibition of atherosclerosis by the serine palmitoyl transferase inhibitor myriocin is associated with reduced plasma glycosphingolipid concentration. *Biochem. Pharmacol.* 2007;73(9):1340-1346. doi 10.1016/j.bcp.2006.12.023
- Gulbins A., Schumacher F., Becker K.A., Wilker B., Soddemann M., Boldrin F., Müller C.P., Edwards M.J., Goodman M., Caldwell C.C., Kleuser B., Kornhuber J., Szabo I., Gulbins E. Antidepressants act by inducing autophagy controlled by sphingomyelin-ceramide. *Mol. Psychiatry.* 2018;23(12):2324-2346. doi 10.1038/s41380-018-0090-9
- Haimovitz-Friedman A., Kan C.C., Ehleiter D., Persaud R.S., McLoughlin M., Fuks Z., Kolesnick R.N. Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J. Exp. Med.* 1994;180(2):525-535. doi 10.1084/jem.180.2.525
- Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70. doi 10.1016/s0092-8674(00)81683-9
- Heiden M.G.V., Cantley L.C., Thompson C.B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009;324(5930):1029-1033. doi 10.1126/science.1160809
- Hernández-Tiedra S., Fabriàs G., Dávila D., Salanueva J.J., Casas J., Montes L.R., Antón Z., García-Taboada E., Salazar-Roa M., Lorente M., Nylandstedt J., Armstrong J., López-Valero I., McKee C.S., Serrano-Puebla A., García-López R., González-Martínez J., Abad J.L., Hanada K., Boya P., Goñi F., Guzmán M., Lovat P., Jäättelä M., Alonso A., Velasco G. Dihydroceramide accumulation mediates cytotoxic autophagy of cancer cells via autolysosome destabilization. *Autophagy.* 2016;12(11):2213-2229. doi 10.1080/15548627.2016.1213927
- Ivanisenko T.V., Saik O.V., Demenkov P.S., Ivanisenko N.V., Savostianov A.N., Ivanisenko V.A. ANDDigest: a new web-based module of ANDSystem for the search of knowledge in the scientific literature. *BMC Bioinformatics.* 2020;21(Suppl.11):228. doi 10.1186/s12859-020-03557-8
- Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. The new version of the ANDDigest tool with improved ai-based short names recognition. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(23):14934. doi 10.3390/ijms232314934
- Ivanisenko V.A., Saik O.V., Ivanisenko N.V., Tiys E.S., Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Kolchanov N.A. ANDSystem: an Associative Network Discovery System for automated literature mining in the field of biology. *BMC Syst. Biol.* 2015;9(Suppl.2):S2. doi 10.1186/1752-0509-9-S2-S2
- Ivanisenko V.A., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Mishchenko E.L., Saik O.V. A new version of the ANDSystem tool for automatic extraction of knowledge from scientific publications with expanded functionality for reconstruction of associative gene networks by considering tissue-specific gene expression. *BMC Bioinformatics.* 2019;20(Suppl.1):34. doi 10.1186/s12859-018-2567-6
- Ivanisenko V.A., Gaisler E.V., Basov N.V., Rogachev A.D., Chereziz S.V., Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Mishchenko E.L., Khripko O.P., Khripko Yu.I., Voevoda S.M., Karpenko T.N., Velichko A.J., Voevoda M.I., Kolchanov N.A., Pokrovsky A.G. Plasma metabolomics and gene regulatory networks analysis reveal the role of non-structural SARS-CoV-2 viral proteins in metabolic dysregulation in COVID-19 patients. *Sci. Rep.* 2022;12(1):19977. doi 10.1038/s41598-022-24170-0
- Jaroch K., Modrakowska P., Bojko B. Glioblastoma metabolomics – in vitro studies. *Metabolites.* 2021;11(5):315. doi 10.3390/metabo11050315
- Kambara H., Liu F., Zhang X., Liu P., Bajrami B., Teng Y., Zhao L., Zhou S., Yu H., Zhou W., Silberstein L.E., Cheng T., Han M., Xu Y., Luo H.R. Gasdermin D exerts anti-inflammatory effects by promoting neutrophil death. *Cell Rep.* 2018;22(11):2924-2936. doi 10.1016/j.celrep.2018.02.067
- Koppenol W.H., Bounds P.L., Dang C.V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat. Rev. Cancer.* 2011;11(5):325-337. doi 10.1038/nrc3038
- Kornhuber J., Tripal P., Reichel M., Mühle C., Rhein C., Muehlbacher M., Groemer T.W., Gulbins E. Functional inhibitors of acid sphingomyelinase (FIASMs): a novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications. *Cell Physiol. Biochem.* 2010;26(1):9-20. doi 10.1159/000315101
- Kraveka J.M., Li L., Szulc Z.M., Bielawski J., Ogretmen B., Hannun Y.A., Obeid L.M., Bielawska A. Involvement of dihydroceramide desaturase in cell cycle progression in human neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 2007;282(23):16718-16728. doi 10.1074/jbc.M700647200
- Lacroix M., Riscal R., Arena G., Linares L.K., Le Cam L. Metabolic functions of the tumor suppressor p53: implications in normal physiology, metabolic disorders, and cancer. *Mol. Metab.* 2020;33:2-22. doi 10.1016/j.molmet.2019.10.002
- Lai M., La Rocca V., Amato R., Freer G., Costa M., Spezia P.G., Quaranta P., Lombardo G., Piomelli D., Pistello M. Ablation of acid ceramidase impairs autophagy and mitochondria activity in melanoma cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(6):3247. doi 10.3390/ijms22063247
- Lai Y.-J., Lin V.T.G., Zheng Y., Benveniste E.N., Lin F.-T. The adaptor protein TRIP6 antagonizes fas-induced apoptosis but promotes its effect on cell migration. *Mol. Cell. Biol.* 2010;30(23):5582-5596. doi 10.1128/MCB.00134-10
- Lara-Velazquez M., Al-Kharboosh R., Jeanneret S., Vazquez-Ramos C., Mahata D., Tavaniaepour D., Rahmathulla G., Quinone-Hinojosa A. Advances in brain tumor surgery for glioblastoma in adults. *Brain Sci.* 2017;7(12):166. doi 10.3390/brainsci7120166

- Larina I.M., Pastushkova L.K., Tiys E.S., Kireev K.S., Kononikhin A.S., Starodubtseva N.L., Popov I.A., Custaud M.A., Dobrokhотов I.V., Nikolaev E.N., Kolchanov N.A., Ivanisenco V.A. Permanent proteins in the urine of healthy humans during the Mars-500 experiment. *J. Bioinform. Comput. Biol.* 2015;13(1):1540001. doi 10.1142/S0219720015400016
- Lee Y.S., Choi K.M., Choi M.H., Ji S.Y., Lee S., Sin D.M., Oh K.W., Lee Y.M., Hong J.T., Yun Y.P., Yoo H.S. Serine palmitoyltransferase inhibitor myriocin induces growth inhibition of B16F10 melanoma cells through G₂/M phase arrest. *Cell Prolif.* 2011;44(4):320-329. doi 10.1111/j.1365-2184.2011.00761.x
- Li K., Naviaux J.C., Bright A.T., Wang L., Naviaux R.K. A robust, single-injection method for targeted, broad-spectrum plasma metabolomics. *Metabolomics.* 2017;13(10):122. doi 10.1007/s11306-017-1264-1
- Liberti M.V., Locasale J.W. The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? *Trends Biochem. Sci.* 2016;41(3):211-218. doi 10.1016/j.tibs.2015.12.001
- Lin J., Lai X., Liu X., Yan H., Wu C. Pyroptosis in glioblastoma: a crucial regulator of the tumour immune microenvironment and a predictor of prognosis. *J. Cell. Mol. Med.* 2022;26(5):1579-1593. doi 10.1111/jcmm.17200
- Lin M., Liao W., Dong M., Zhu R., Xiao J., Sun T., Chen Z., Wu B., Jin J. Exosomal neutral sphingomyelinase 1 suppresses hepatocellular carcinoma via decreasing the ratio of sphingomyelin/ceramide. *FEBS J.* 2018;285(20):3835-3848. doi 10.1111/febs.14635
- Louis D.N., Perry A., Wesseling P., Brat D.J., Cree I.A., Figarella-Branger D., Hawkins C., Ng H.K., Pfister S.M., Reifenberger G., Soffietti R., Von Deimling A., Ellison D.W. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Neuro-Oncology.* 2021;23(8):1231-1251. doi 10.1093/neuonc/noab106
- Madigan J.P., Robey R.W., Poprawski J.E., Huang H., Clarke C.J., Gottesman M.M., Cabot M.C., Rosenberg D.W. A role for ceramide glycosylation in resistance to oxaliplatin in colorectal cancer. *Exp. Cell Res.* 2020;388(2):111860. doi 10.1016/j.yexcr.2020.111860
- Mashimo T., Pichumani K., Vemireddy V., Hatanpaa K.J., Singh D.K., Sirasnanagandla S., Nannepaga S., Piccirillo S.G., Kovacs Z., Foong C., Huang Z., Barnett S., Mickey B.E., Deberardinis R.J., Tu B.P., Maher E.A., Bachoo R.M. Acetate is a bioenergetic substrate for human glioblastoma and brain metastases. *Cell.* 2014;159(7):1603-1614. doi 10.1016/j.cell.2014.11.025
- Maurer B.J., Metelitsa L.S., Seeger R.C., Cabot M.C., Reynolds C.P. Increase of ceramide and induction of mixed apoptosis/necrosis by N-(4-hydroxyphenyl)-retinamide in neuroblastoma cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 1999;91(13):1138-1146. doi 10.1093/jnci/91.13.1138
- Melland-Smith M., Ermini L., Chauvin S., Craig-Barnes H., Tagliaferro A., Todros T., Post M., Caniggia I. Disruption of sphingolipid metabolism augments ceramide-induced autophagy in preeclampsia. *Autophagy.* 2015;11(4):653-669. doi 10.1080/15548627.2015.1034414
- Moro K., Nagahashi M., Gabriel E., Takabe K., Wakai T. Clinical application of ceramide in cancer treatment. *Breast Cancer.* 2019;26(4):407-415. doi 10.1007/s12282-019-00953-8
- Naser E., Kadow S., Schumacher F., Mohamed Z.H., Kappe C., Hessler G., Pollmeier B., Kleuser B., Arenz C., Becker K.A., Gulbins E., Carpinteiro A. Characterization of the small molecule ARC39, a direct and specific inhibitor of acid sphingomyelinase in vitro. *J. Lipid Res.* 2020;61(6):896-910. doi 10.1194/jlr.RA120000682
- Ogretmen B. Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 2018;18(1):33-50. doi 10.1038/nrc.2017.96
- Oltra S.S., Colomo S., Sin L., Pérez-López M., Lázaro S., Molina-Crespo A., Choi K.H., Ros-Pardo D., Martínez L., Morales S., González-Paramos C., Orantes A., Soriano M., Hernández A., Lluch A., Rojo F., Albanell J., Gómez-Puertas P., Ko J.K., Sarrió D., Moreno-Bueno G. Distinct GSDMB protein isoforms and protease cleavage processes differentially control pyroptotic cell death and mitochondrial damage in cancer cells. *Cell Death Differ.* 2023;30(5):1366-1381. doi 10.1038/s41418-023-01143-y
- Omuro A., DeAngelis L.M. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *JAMA.* 2013;310(17):1842-1850. doi 10.1001/jama.2013.280319
- Pandey R., Cafilisch L., Lodi A., Brenner A.J., Tiziani S. Metabolomic signature of brain cancer. *Mol. Carcinog.* 2017;56(11):2355-2371. doi 10.1002/mc.22694
- Pang Z., Chong J., Zhou G., de Lima Morais D.A., Chang L., Barrette M., Gauthier C., Jacques P.-É., Li S., Xia J. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(W1):W388-W396. doi 10.1093/nar/gkab382
- Pastushkova L.K., Kireev K.S., Kononikhin A.S., Tiys E.S., Popov I.A., Starodubtseva N.L., Dobrokhотов I.V., Ivanisenco V.A., Larina I.M., Kolchanov N.A., Nikolaev E.N. Detection of renal tissue and urinary tract proteins in the human urine after space flight. *PLoS One.* 2013;8(8):e71652. doi 10.1371/journal.pone.0071652
- Pastushkova L.K., Kashirina D.N., Brzhozovskiy A.G., Kononikhin A.S., Tiys E.S., Ivanisenco V.A., Koloteva M.I., Nikolaev E.N., Larina I.M. Evaluation of cardiovascular system state by urine proteome after manned space flight. *Acta Astronaut.* 2019;160:594-600. doi 10.1016/j.actaastro.2019.02.015
- Patrushev Y., Yudina Y., Sidelnikov V. Monolithic rod columns for HPLC based on divinylbenzene-styrene copolymer with 1-vinylimidazole and 4-vinylpyridine. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2018;41(8):458-466. doi 10.1080/10826076.2018.1455149
- Pike L.S., Smift A.L., Croteau N.J., Ferrick D.A., Wu M. Inhibition of fatty acid oxidation by etomoxir impairs NADPH production and increases reactive oxygen species resulting in ATP depletion and cell death in human glioblastoma cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011;1807(6):726-734. doi 10.1016/j.bbabi.2010.10.022
- Pizer E.S., Thupari J., Han W.F., Pinn M.L., Chrest F.J., Frehywot G.L., Townsend C.A., Kuhajda F.P. Malonyl-coenzyme-A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts. *Cancer Res.* 2000;60(2):213-218
- Polì M., Derosas M., Luscieti S., Cavadini P., Campanella A., Verardi R., Finazzi D., Arosio P. Pantothenate kinase-2 (Pank2) silencing causes cell growth reduction, cell-specific ferroportin upregulation and iron deregulation. *Neurobiol. Dis.* 2010;39(2):204-210. doi 10.1016/j.nbd.2010.04.009
- Popik O.V., Petrovskiy E.D., Mishchenko E.L., Lavrik I.N., Ivanisenco V.A. Mosaic gene network modelling identified new regulatory mechanisms in HCV infection. *Virus Res.* 2016;218:71-78. doi 10.1016/j.virusres.2015.10.004
- Poteet E., Choudhury G.R., Winters A., Li W., Ryou M.G., Liu R., Tang L., Ghorpade A., Wen Y., Yuan F., Keir S.T., Yan H., Bigner D.D., Simpkins J.W., Yang S.H. Reversing the Warburg effect as a treatment for glioblastoma. *J. Biol. Chem.* 2013;288(13):9153-9164. doi 10.1074/jbc.M112.440354
- Prause K., Naseri G., Schumacher F., Kappe C., Kleuser B., Arenz C. A photocaged inhibitor of acid sphingomyelinase. *Chem. Commun.* 2020;56(94):14885-14888. doi 10.1039/d0cc06661c
- Rao Z., Zhu Y., Yang P., Chen Z., Xia Y., Qiao C., Liu W., Deng H., Li J., Ning P., Wang Z. Pyroptosis in inflammatory diseases and cancer. *Theranostics.* 2022;12(9):4310-4329. doi 10.7150/thno.71086
- Ren S., Babelova A., Moreth K., Xin C., Eberhardt W., Doller A., Pavenstädt H., Schaefer L., Pfeilschifter J., Huwiler A. Transforming growth factor-B2 upregulates sphingosine kinase-1 activity, which in turn attenuates the fibrotic response to TGF-B2 by impeding CTGF expression. *Kidney Int.* 2009;76(8):857-867. doi 10.1038/ki.2009.297
- Riboni L., Campanella R., Bassi R., Villani R., Gaini S.M., Martinelli-Boneschi F., Viani P., Tettamanti G. Ceramide levels are inversely associated with malignant progression of human glial tumors. *Glia.* 2002;39(2):105-113. doi 10.1002/glia.10087

- Rogachev A.D., Alemasov N.A., Ivanisenko V.A., Ivanisenko N.V., Gaisler E.V., Oleshko O.S., Cheresiz S.V., Mishinov S.V., Stupak V.V., Pokrovsky A.G. Correlation of metabolic profiles of plasma and cerebrospinal fluid of high-grade glioma patients. *Metabolites*. 2021;11(3):133. doi 10.3390/metabo11030133
- Saik O.V., Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Ivanisenko V.A. Interaction of the hepatitis C virus: literature mining with ANDSystem. *Virus Res*. 2016;218:40-48. doi 10.1016/j.virusres.2015.12.003
- Saik O.V., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Bragina E.Y., Freidin M.B., Dosenko V.E., Zolotareva O.I., Choyzonov E.L., Hofstaedt R., Ivanisenko V.A. Search for new candidate genes involved in the comorbidity of asthma and hypertension based on automatic analysis of scientific literature. *J. Integr. Bioinform.* 2018a;15(4):20180054. doi 10.1515/jib-2018-0054
- Saik O.V., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Bragina E.Y., Freidin M.B., Goncharova I.A., Dosenko V.E., Zolotareva O.I., Hofstaedt R., Lavrik I.N., Rogaev E.I., Ivanisenko V.A. Novel candidate genes important for asthma and hypertension comorbidity revealed from associative gene networks. *BMC Med. Genomics*. 2018b;11(Suppl.1):15. doi 10.1186/s12920-018-0331-4
- Saik O.V., Nimaev V.V., Usmonov D.B., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Lavrik I.N., Ivanisenko V.A. Prioritization of genes involved in endothelial cell apoptosis by their implication in lymphedema using an analysis of associative gene networks with ANDSystem. *BMC Med. Genomics*. 2019;12(Suppl.2):47. doi 10.1186/s12920-019-0492-9
- Sano O., Kazetani K.I., Adachi R., Kurasawa O., Kawamoto T., Iwata H. Using a biologically annotated library to analyze the anticancer mechanism of serine palmitoyl transferase (SPT) inhibitors. *FEBS Open Bio*. 2017;7(4):495-503. doi 10.1002/2211-5463.12196
- Santos C.R., Schulze A. Lipid metabolism in cancer. *FEBS J*. 2012; 279(15):2610-2623. doi 10.1111/j.1742-4658.2012.08644.x
- Schiffmann S., Hartmann D., Fuchs S., Birod K., Ferreirs N., Schreiber Y., Zivkovic A., Geisslinger G., Grösch S., Stark H. Inhibitors of specific ceramide synthases. *Biochimie*. 2012;94(2):558-565. doi 10.1016/j.biochi.2011.09.007
- Siegel T. Clinical impact of molecular biomarkers in gliomas. *J. Clin. Neurosci*. 2015;22(3):437-444. doi 10.1016/j.jocn.2014.10.004
- Signorelli P., Munoz-Olaya J.M., Gagliostro V., Casas J., Ghidoni R., Fabriàs G. Dihydroceramide intracellular increase in response to resveratrol treatment mediates autophagy in gastric cancer cells. *Cancer Lett*. 2009;282(2):238-243. doi 10.1016/j.canlet.2009.03.020
- Steiner R., Saied E.M., Othman A., Arenz C., Maccarone A.T., Poad B.L.J., Blanksby S.J., Von Eckardstein A., Hornemann T. Elucidating the chemical structure of native 1-deoxysphingosine. *J. Lipid Res*. 2016;57(7):1194-1203. doi 10.1194/jlr.M067033
- Tea M.N., Poonnoose S.I., Pitson S.M. Targeting the sphingolipid system as a therapeutic direction for glioblastoma. *Cancers (Basel)*. 2020;12(1):111. doi 10.3390/cancers12010111
- Turner N., Lim X.Y., Toop H.D., Osborne B., Brandon A.E., Taylor E.N., Fiveash C.E., Govindaraju H., Teo J.D., McEwen H.P., Couttas T.A., Butler S.M., Das A., Kowalski G.M., Bruce C.R., Hoehn K.L., Fath T., Schmitz-Peiffer C., Cooney G.J., Montgometry M.K., Morris J.C., Don A.S. A selective inhibitor of ceramide synthase 1 reveals a novel role in fat metabolism. *Nat. Commun*. 2018;9(1):3165. doi 10.1038/s41467-018-05613-7
- Vollmann-Zwerenz A., Leidgens V., Feliciello G., Klein C.A., Hau P. Tumor cell invasion in glioblastoma. *Int. J. Mol. Sci*. 2020;21(6):1932. doi 10.3390/ijms21061932
- Wang Y., Zhang C., Jin Y., Wang S., He Q., Liu Z., Ai Q., Lei Y., Li Y., Song F., Bu Y. Alkaline ceramidase 2 is a novel direct target of p53 and induces autophagy and apoptosis through ROS generation. *Sci. Rep*. 2017;7:44573. doi 10.1038/srep44573
- Wang Z., Wen L., Zhu F., Wang Y., Xie Q., Chen Z., Li Y. Overexpression of ceramide synthase 1 increases C18-ceramide and leads to lethal autophagy in human glioma. *Oncotarget*. 2017;8(61):104022-104036. doi 10.18632/oncotarget.21955
- Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123(3191):309-314. doi 10.1126/science.123.3191.309
- Wilfred B.R., Wang W.X., Nelson P.T. Energizing miRNA research: a review of the role of miRNAs in lipid metabolism, with a prediction that miR-103/107 regulates human metabolic pathways. *Mol. Genet. Metab*. 2007;91(3):209-217. doi 10.1016/j.ymgme.2007.03.011
- Wolf A., Agnihotri S., Guha A. Targeting metabolic remodeling in glioblastoma multiforme. *Oncotarget*. 2010;1(7):552-562. doi 10.18632/oncotarget.190
- Xu R., Garcia-Barros M., Wen S., Li F., Lin C.L., Hannun Y.A., Obeid L.M., Mao C. Tumor suppressor p53 links ceramide metabolism to DNA damage response through alkaline ceramidase 2. *Cell Death Differ*. 2018;25(5):841-856. doi 10.1038/s41418-017-0018-y
- Youngblood M.W., Stupp R., Sonabend A.M. Role of resection in glioblastoma management. *Neurosurg. Clin. N. Am*. 2021;32(1):9-22. doi 10.1016/j.nec.2020.08.002
- Yuan M., Breitkopf S.B., Yang X., Asara J.M. A positive/negative ion – switching, targeted mass spectrometry-based metabolomics platform for bodily fluids, cells, and fresh and fixed tissue. *Nat. Protoc*. 2012;7(5):872-881. doi 10.1038/nprot.2012.024
- Zhang S., Huang P., Dai H., Li Q., Hu L., Peng J., Jiang S., Xu Y., Wu Z., Nie H., Zhang Z., Yin W., Zhang X., Lu J. TIMELESS regulates sphingolipid metabolism and tumor cell growth through Sp1/ACER2/SIP axis in ER-positive breast cancer. *Cell Death Dis*. 2020;11(10):892. doi 10.1038/s41419-020-03106-4
- Zheng K., Chen Z., Feng H., Chen Y., Zhang C., Yu J., Luo Y., Zhao L., Jiang X., Shi F. Sphingomyelin synthase 2 promotes an aggressive breast cancer phenotype by disrupting the homeostasis of ceramide and sphingomyelin. *Cell Death Dis*. 2019;10(3):157. doi 10.1038/s41419-019-1303-0
- Zhou W., Wahl D.R. Metabolic abnormalities in glioblastoma and metabolic strategies to overcome treatment resistance. *Cancers (Basel)*. 2019;11(9):1231. doi 10.3390/cancers11091231
- Zolotareva O., Saik O.V., Königs C., Bragina E.Y., Goncharova I.A., Freidin M.B., Dosenko V.E., Ivanisenko V.A., Hofstaedt R. Comorbidity of asthma and hypertension may be mediated by shared genetic dysregulation and drug side effects. *Sci. Rep*. 2019;9(1):16302. doi 10.1038/s41598-019-52762-w

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 20.09.2024. После доработки 30.10.2024. Принята к публикации 02.11.2024.