

# КАЗАНСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ

Январь —  
февраль  
2014

1

ТОМ  
XCV

ОАО «ТАТМЕДИА»  
КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

УДК 54.061: 543.06: 577.121: 612.015.3: 616.15: 616.633: 616.24008.8-074

АА01

## МЕТАБОЛОМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В МЕДИЦИНЕ

Раиса Рустэмовна Фурина<sup>1\*</sup>, Нина Николаевна Митракова<sup>1</sup>, Виктор Леонидович Рыжков<sup>1</sup>,  
Ильдар Кавилович Сафиуллин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Республиканская клиническая больница, г. Йошкар-Ола,

<sup>2</sup>Мари-Турекская центральная районная больница, Республика Марий Эл, пос. Мари-Турек

### Реферат

В обзоре литературы затронуты вопросы применения метаболомических исследований в медицине. Основная идея метаболомики заключается в обнаружении специфических биомаркёров в биологическом образце для диагностики ряда заболеваний. В качестве биомаркёров рассматриваются летучие органические вещества — метаболиты, выделенные из различных биологических тканей и жидкостей (крови, мочи, мокроты, выдыхаемого воздуха). Отражены основные методы разделения и идентификации летучих органических веществ образца (газовая хроматография, масс-спектрометрия, спектроскопия ядерного магнитного резонанса), применяемые в метаболомике. Даны сравнительные характеристики масс-спектрометрии и спектроскопии ядерного магнитного резонанса как основных методов детектирования летучих метаболитов. Описан метод твердофазной микроэкстракции, используемый в качестве предварительной подготовки образца. Представлены результаты лабораторных исследований по поиску биомаркёров рака, хронических инфекций, наследственных заболеваний. Показаны качественные характеристики метаболома биологического образца пациента с той или иной патологией. Кроме того, уделено внимание применению возможностей метаболомики в экспериментальной медицине. Описаны результаты исследования изменений летучего метаболома клеточной культуры *in vitro* в зависимости от добавок в питательные среды; летучих продуктов распада  $\beta$ -каротина как проканцерогенных веществ; летучих органических веществ, выделяемых при распаде позвоночных животных. Дополнительно описан метод полной двухмерной газовой хроматографии, испытанный с целью повышения чувствительности и специфичности метаболомических исследований. Представленный подход может помочь в решении вопросов ранней диагностики многих заболеваний.

**Ключевые слова:** метаболомика, летучие органические вещества, биомаркёры, газовая хроматография, масс-спектрометрия.

**METABOLOMIC RESEARCH IN MEDICINE** R.R. Furina<sup>1</sup>, N.N. Mitrakova<sup>1</sup>, V.L. Ryzhkov<sup>1</sup>, I.K. Safiullin<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Republican Clinical Hospital, Yoshkar-Ola, Russia, <sup>2</sup>Mari-Turek Central Regional Hospital, Mari-Turek, Russia. The paper covers the questions of metabolomic research in medicine. The central idea of metabolomics is to identify the specific biomarkers in biological samples for diagnosis of a number of conditions. The biomarkers include volatile organic compounds — metabolites isolated from various tissues and biological fluids (blood, urine, sputum, exhaled air). Main methods of separation and identification of volatile organic compounds (gas chromatography, mass spectrometry, nuclear magnetic resonance spectroscopy) applied in metabolomics, are reviewed. Mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy are compared as the main methods of volatile metabolites detection. The method of solid phase microextraction, used for sample preparation, is described. The paper reviews laboratory research results aimed at the detection of cancer, chronic infections and inherited diseases biomarkers. The qualitative characteristics of biological sample metabolome taken from patients with different diseases are discussed. Besides, special attention is paid to the possible use of metabolomics in experimental medicine. The results of volatile metabolome changes in cell culture *in vitro* depending on the additives to nutrient media,  $\beta$ -carotene volatile decomposition products as suspected carcinogens, volatile organic compounds emitted at vertebrates decay are described. In addition, the method of two-dimensional gas chromatography aimed to increase the sensitivity and specificity of metabolomics tests is portrayed. The presented approach adds to early diagnosis of a number of diseases. **Key-words:** metabolomics, volatile organic compounds, biomarkers, gas chromatography, mass spectrometry.

Одно из новых направлений в генетике и молекулярной биологии — метаболомика, которая может помочь практикующим врачам в диагностике и прогнозе различных заболеваний [29]. Метаболомика — область науки, изучающая конечные и промежуточные продукты обмена веществ в биологической системе, будь то клетка, орган или организм в целом [13]. Метаболом, или метаболический профиль, представляет собой совокупность всех низкомолекулярных метаболитов (<1500 Да) биологического образца, являясь уникальным химическим «отпечатком пальцев», специфичным для процессов, протекающих в живых клетках [8].

Идея применения метаболического профиля в диагностике заболеваний была выдвинута Linus Pauling и соавт. ещё в 1971 г. Они предложили производить анализ выдыхаемого воздуха пациентов методом газовой хроматографии в целях выявления метаболических изменений при определённых заболеваниях и выявили более 200 различных летучих органических соединений (ЛОС) [23]. В январе 2007 г. учёные университета Альберта и университета Калгари завершили исследование метаболомического профиля человека. Они каталогизировали около 2500 метаболитов, 1200 лекарств и 3500 компонентов пищи, которые могут быть найдены в биологических образцах человека [35].

В настоящее время описаны метаболы биологических жидкостей человека и животных — мочи, спинномозговой жидкости, плазмы и т.д. Последние исследования показали, что метаболомика может выявить специфические признаки болезни, так называемые биомаркёры, которые в будущем сыграют большую роль в диагностике и прогнозе заболевания [6, 10, 30].

Исследования метаболического профиля выполняют, как правило, с использованием гибридного метода анализа — сочетания газовой (ГХ) или жидкостной (ЖХ) хроматографии и масс-спектрометрии (МС) или спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопия).

ГХ — универсальный метод разделения смеси веществ, испаряющихся без разложения [1, 29]. Моча и мокрота богаты летучими органическими метаболитами, потенциальными биомаркёрами многих заболеваний, их получение не требует применения инвазивных процедур (в отличие от забора крови или спинномозговой жидкости) [11, 15, 29].

В метаболомических исследованиях

выделение ЛОС из образца чаще всего производят способом твердофазной микроэкстракции (ТФМЭ). Метод основан на сорбции компонентов газовой фазы образца на нить с полимерным покрытием с её последующей термической десорбцией в предварительно нагретом инжекторе газового хроматографа. Эта методика имеет несколько преимуществ перед традиционными методами извлечения растворителем: ТФМЭ не требует существенных временных затрат, удобна, высокочувствительна, проводится без использования растворителя [29].

Высокого уровня по информативности метаболомических данных достигли две технологии: МС и ЯМР-спектроскопия [22, 26]. Они имеют свои специфические преимущества и недостатки. Основным преимуществом МС является чувствительность: современный уровень масс-спектрометров может обнаружить аналиты в фемтомолярном ( $10^{-15}$ ) и аттомолярном ( $10^{-18}$ ) диапазоне. Связь МС с ЖХ или ГХ позволяет измерять сотни отдельных метаболитов в пределах одного образца и вместе с постоянно пополняемыми базами данных делает идентификацию этих метаболитов более рутинной.

Одна из слабых сторон МС — определение концентрации искомого метаболита. Также к недостаткам можно отнести и тот факт, что интенсивность МС-сигнала любого соединения зависит от подготовки образца и его молекулярного окружения [34].

Основные слабые стороны МС являются основными сильными сторонами ЯМР-спектроскопии. Высота пика конкретного метаболита в ЯМР-спектре напрямую связана с концентрацией ядер химического соединения, что делает его количественное определение в сложной смеси очень точным. Другой недооценённой характеристикой ЯМР-спектроскопии является её универсальность для анализа метаболитов в жидком состоянии (таких, как сыворотка крови, моча и т.д.), в неповреждённых тканях (например, опухолях) или в естественных условиях (*in vivo*) [34].

Хотя метаболомика — относительно молодое направление по сравнению с геномикой и протеомикой, её уже применяют в разнообразных областях медицины, в том числе при скрининге патологии новорождённых, в токсикологии и фармакологии.

В сравнении с геномикой и протеомикой на метаболомику возлагают большие надежды в поиске биомаркёров заболеваний, в первую очередь онкологических.

К примеру, Sreekumar и соавт. выделили метаболический профиль 42 образцов ткани, 110 образцов мочи и 110 образцов плазмы крови пациентов, страдающих доброкачественными заболеваниями простаты, ограниченной и распространённой формой рака предстательной железы. Они в состоянии отличить эти три состояния на основе данных ГХ и ЯМР-спектроскопии. Также ими обнаружено, что концентрация конкретного метаболита — саркозина (в том числе в моче) — была существенно увеличена на этапе метастатического прогрессирования рака предстательной железы [30].

В исследовании рака яичника лаборатория доктора Fiehn провела метаболомический скрининг тканей 66 образцов инвазивной формы рака и 9 образцов доброкачественных опухолей яичников [9]. Исследователи обнаружили различие между данными группами образцов более чем по 50 метаболитам. Многие из этих метаболитов играют важную роль в обмене пуринов, пиримидинов, глицеролипидов и в энергетическом обмене.

Хуе и соавт. использовали этот метод для исследования ЛОС крови, связанных с раком печени. Было установлено, что группа больных раком печени и контрольная группа различались по 19 ЛОС крови ( $p < 0,05$ ). Из этих 19 соединений 3 (гексанал, 1-октен-3-ол и октан) были найдены в повышенных концентрациях в крови группы больных раком печени по сравнению с контрольной группой [37].

Чтобы исследовать летучие метаболиты мочи как потенциальные биомаркёры рака C.L. Silva и соавт. качественно и количественно проанализировали образцы мочи 33 больных злокачественными новообразованиями (14 больных лейкозом, 12 — колоректальным раком, 7 — лимфомами) и 21 здорового пациента, используя ТФМЭ-ГХ-МС. В общей сложности в онкологической и контрольной группах идентифицировано 82 летучих метаболита, принадлежащих к различным химическим классам. Производные бензола, терпеноиды и фенолы были наиболее распространёнными классами в онкологической группе, тогда как кетоны и серосодержащие вещества оказались основными классами соединений, выделенными из мочи здоровых пациентов [29].

Метод идентификации летучих биомаркёров даёт возможность дополнить гистопатологическую характеристику опухоли метаболомическими данными. M.V. Brown и соавт. разработали методику параллельного

выделения метаболитов и гистологического анализа неповреждённых биоптатов. Ими также было обнаружено 69 метаболитов, отличающих раковую опухоль почки от образцов доброкачественной опухоли, и определены 83 метаболита, статистически значимо ( $p < 0,05$ ) отличающих биоптаты рака от доброкачественных образований предстательной железы. Выделение определённых метаболических характеристик опухолевой ткани, по данным M.V. Brown и соавт., может свидетельствовать не только о стадии рака, но и о степени злокачественности [4].

Ряд других метаболомических исследований указывает на возможность построения прогностической модели на наличие у пациентов хронической инфекции путём обнаружения ЛОС-биомаркёров микроорганизмов в биологических средах (мокроте, крови, моче, выдыхаемом воздухе и др.). ЛОС синтезируются всеми микроорганизмами, являясь частью их нормального обмена веществ. Типы и классы производимых микробами ЛОС обширны и включают жирные кислоты и их производные (например, углеводороды, алифатические спирты и кетоны), ароматические соединения, азотсодержащие вещества и летучие соединения серы [28].

P.C. Goeminne и соавт. определяли ЛОС, вырабатываемые *Pseudomonas aeruginosa*, в мокроте больных муковисцидозом (кистозным фиброзом) лёгких методом ТФМЭ-ГХ-МС [11]. Они обнаружили связь между присутствием *Pseudomonas aeruginosa* в организме пациента и высокой концентрацией терпенов 1-ундецена, 1- $\alpha$ -пинена и соединений додекана, терпинен-4-ола и 2,2,6-триметил-октана в образцах мокроты. На основе обзора литературы и своих результатов авторы пришли к выводу, что не одно ЛОС, а их сочетание может свидетельствовать о наличии *Pseudomonas aeruginosa* в организме [11].

Колонии *Aspergillus fumigates* из дыхательных путей пациентов с хроническими заболеваниями лёгких были ассоциированы с присутствием летучего вещества 2-пентилфурана при анализе выдыхаемого воздуха методом ГХ-МС, что в настоящее время разрабатывается в качестве нового диагностического дыхательного теста [7].

Метаболомика как современная методика также может помочь определить значимость экологического воздействия экзогенных ЛОС на здоровье человека. Источники ЛОС включают табачный дым, нефтепродукты и хлорированную воду [3]. Длитель-

ная экспозиция токсичных ЛОС может увеличить риск лейкоза, рака мочевого пузыря, врождённых дефектов и нейрокогнитивных нарушений [16, 27]. Индивидуальные особенности в поглощении, распределении, метаболизме и выделении экологических ядов человеком усложняет оценку экспозиции ЛОС. Методом ТФМЭ-ГХ-МС В.С. Blount и соавт. определили 14 галогенизированных алканов, 5 галогенизированных алкенов, 10 соединений ароматического ряда и некоторых других ЛОС в образцах человеческой крови. В большинстве этих образцов данный метод зарегистрировал в крови бензол, 1,4-дихлорбензол, этилбензол, толуол, м/п-ксилол. Некоторые из образцов крови содержали также 13 дополнительных соединений: стирол, хлороформ, оксиллол, тетрахлорэтен, 2,5-диметилфуран, метил-трет-бутиловый эфир, бромдихлорометан, дибромхлорометан, бромформ, тетрахлорометан, трихлорэтан, метилхлорид и 1,2-дихлорэтан [3].

В настоящее время метаболомика имеет широкое применение в различных областях науки, в том числе и в экспериментальной медицине. Сегодня различные клеточные культуры широко используют в науке, эксперименты *in vitro* применяют в таких фундаментальных исследованиях, как характеристика метаболизма клетки [38] или анализ митоза [36]. В других научных работах культивируемые клетки используют как тест-системы для оценки воздействия химиотерапевтических препаратов на клетку [14].

Для поддержания клеточных культур необходимо добавление в питательные среды животной сыворотки, например сыворотки эмбриона телёнка. К сожалению, животные сыворотки имеют ряд недостатков, таких как возможное загрязнение образцов и высокая себестоимость.

Для определения влияния искусственных заменителей сыворотки на жизнедеятельность и метаболизм культивируемых клеток М. Hartmann и соавт. использовали метод определения летучих метаболомов опухолевых клеток с помощью ГХ-МС [12]. В целом было проанализировано около 50 ЛОС и установлено, что метаболизм культивируемых клеток сильно меняется при добавлении в питательную среду заменителя животной сыворотки. Таким образом, учёные пришли к выводу, что для роста и метаболизма опухолевых клеток и, соответственно, достоверности экспериментов с культурами клеток необходимо добавление в

питательную среду животной сыворотки [12].

Как отмечено выше, ГХ в сочетании с МС является наиболее «естественной» комбинацией для исследования метаболомического профиля биологических образцов. В своей работе G. Martano и соавт. стремились оптимизировать метод ГХ-МС с предшествующей ТФМЭ для определения концентрации летучих продуктов расщепления  $\beta$ -каротина в клеточной культуре [17]. Известно, что  $\beta$ -каротин, предшественник витамина А, уменьшает риск сердечно-сосудистых болезней, катаракты и дегенерации макулы. Однако было замечено, что при ежедневном приеме 20–30 мг  $\beta$ -каротина пациентами с большим стажем курения на 16–28% увеличилась заболеваемость раком лёгкого, влекущая за собой повышенный риск смертности по сравнению с плацебо-контролем.

Этот кажущийся парадокс был связан с прооксидантными и проканцерогенными свойствами продуктов распада  $\beta$ -каротина в сочетании с высоким парциальным давлением кислорода, окислительным стрессом и высоким уровнем реактивных форм кислорода в ткани лёгкого курильщиков [2, 5, 19, 20]. Очевидно, продукты распада  $\beta$ -каротина образуются эксцентральным (неферментативным) расщеплением в богатой радикалами окружающей среде лёгкого курильщика, и эти продукты распада  $\beta$ -каротина могут провоцировать канцерогенез разнообразными путями. Набор продуктов распада  $\beta$ -каротина содержит  $\beta$ -ионон, циклоцитраль, дигидроактинидиолид и 1,1,6-триметилтетралин. Эти продукты распада  $\beta$ -каротина являются пусковым механизмом в развитии скрытых опухолей [19, 21]. Таким образом, представленный метод позволил определить биологически значимые летучие продукты распада  $\beta$ -каротина в клеточных системах *in vitro* [17].

В другой работе с целью улучшения понимания процесса посмертного распада позвоночных животных S. Paczkowski и S. Schutz объединили результаты исследований биохимической структуры ЛОС, обнаруженных во время процесса разложения [18]. Ими выдвинуто предположение о возможности существования зависимой от времени структуры ЛОС некротических масс, что может быть использовано в таких областях, как судебная медицина и диетология. Поиск жертв стихийных бедствий, например погребённых при землетрясениях [32], может быть ускорен с помощью методики

идентификации ЛОС [31].

В пищевой промышленности применение детектора для регистрации ранних посмертных ЛОС позвоночных может помочь в определении степени порчи или оценке сроков хранения рыбных и мясных продуктов. Rajamaki и соавт. нашли большое количество диметилдисульфида (образующегося из метантиола) в образцах испорченных цыплят-бройлеров [24]. Таким образом, метантиол или связанные метилированные сульфиды могут быть маркерами неправильного хранения мясных продуктов.

Несмотря на всё вышесказанное, в метабомике существует серьёзная проблема — все биологические образцы содержат многочисленные соединения с различными физико-химическими свойствами и в широком диапазоне концентраций, что делает метаболическое профилирование достаточно сложной задачей, требующей улучшения метода с точки зрения чувствительности и специфичности.

Полная двухмерная ГХ (ГХ-ГХ) с время-пролётной МС — относительно новая методика с очень высокой разрешающей способностью, которая была опробована в метаболических исследованиях. Используя колонки с двумя разными стационарными фазами (например, полярная-неполярная) в одной процедуре, ГХ-ГХ добавляет второе хроматографическое разделение компонентов исследуемого образца. При ГХ-ГХ-анализе пики веществ достаточно разграничены, чтобы следовые компоненты можно было легко детектировать и измерять их концентрацию.

S.M. Rocha и соавт. применили полную ГХ-ГХ с время-пролётной МС в сочетании с ТФМЭ образца для всестороннего изучения летучих соединений мочи человека [25]. Было идентифицировано около 300 соединений, которые были распределены по следующим химическим группам: углеводороды, амины, амиды, сложные эфиры, кетоны, альдегиды, спирты, карбоновые кислоты, эфиры, нитрилы, галогениды, сульфиды, тиолы, терпеноиды и гетероциклические соединения. Это наиболее полная на сегодняшний день информация о составе человеческой мочи, которая представляет собой ценные данные для будущих исследований в клинической медицине.

Полная ГХ-ГХ с время-пролётной МС образцов мочи была применена K.A. Kouremenos и соавт. для диагностики врождённых нарушений обмена веществ у детей и

детального анализа сложных профилей, которые часто связаны с этими расстройствами [15]. Врождённые нарушения обмена веществ можно диагностировать на основе обнаружения в моче аномально повышенных органических кислот, связанных с соответствующей ферментопатией. Повышенная чувствительность метода ГХ-ГХ с время-пролётной МС позволила обнаружить следовые уровни многих органических кислот, присутствующих в образцах, что бывает довольно сложно сделать при использовании подхода одномерного разделения ГХ. Метилмалоновая и метиллимонная кислоты служат основными маркерами метилмалоновой ацидемии. В свою очередь адипиновая и 3-метил-адипиновая кислоты не связаны с метилмалоновой ацидезией, но могут отражать вторичное торможение других метаболических путей. Гексаноил-глицин является основным маркером недостаточности среднепочечной ацил-КоА дегидрогеназы. 3-Метил-кротонил-глициновая и 3-гидрокси-изовалериановая кислоты — индикаторы недостаточности 3-метил-кротонил КоА карбоксилазы [15].

Таким образом, на метабомику возлагаются большие надежды в поиске биомаркеров заболеваний, таких как злокачественные новообразования, наследственные и инфекционные заболевания.

В заключение отметим, что применение многих из вышеописанных методов по-прежнему в значительной степени ограничивается научно-исследовательской работой, но предполагается, что в будущем профилирование ЛОС «у постели больного» откроет возможность быстрой характеристики заболевания, обеспечивая жизненно важной информацией пациентов и медицинских работников [33].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Царёв Н.И., Царёв В.И., Камраков И.Б. Практическая газовая хроматография. — Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2000. — 156 с.
2. Arora A., Willhite C.A., Liebler D.C. Interactions of  $\beta$ -carotene and cigarette smoke in human bronchial epithelial cells // *Carcinogenesis*. — 2001. — Vol. 22, N 8. — P. 1173–1178.
3. Blount B.C., Kobelski R.J., McElprang D.O. et al. Quantification of 31 volatile organic compounds in whole blood using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry // *J. Chromatography B*. — 2006. — Vol. 832. — P. 292–301.
4. Brown M.V., McDunn J.E., Gunst P.R. et al. Cancer detection and biopsy classification using concurrent histopathological and metabolomic analysis of core biopsies // *Gen. Med.* — 2012. — Vol. 4. — P. 33.
5. Burton G., Ingold K. Beta-carotene: an unusual type of

- lipid antioxidant // *Science*. — 1984. — Vol. 224, N 4649. — P. 569-573.
6. *Catchpole G., Platzer A., Weikert C. et al.* Metabolic profiling reveals key metabolic features of renal cell carcinoma // *J. Cell. Mol. Med.* — 2011. — Vol. 15. — P. 109-118.
7. *Chambers S.T., Bhandari S., Scott-Thomas A., Syhre M.* Novel diagnostics: progress toward a breath test for invasive *Aspergillus fumigatus* // *Med. Mycol.* — 2011. — Vol. 49. — P. 54-61.
8. *Daviss B.* Growing pains for metabolomics // *The Scientist*. — 2005. — Vol. 19, N 8. — P. 25-28.
9. *Denkert C., Budczies J., Kind T. et al.* Mass spectrometry-based metabolic profiling reveals different metabolite patterns in invasive ovarian carcinomas and ovarian borderline tumors // *Cancer Res.* — 2006. — Vol. 66. — P. 10 795-10 804.
10. *Denkert C., Budczies J., Fiehn O. et al.* Metabolite profiling of human colon carcinoma — deregulation of TCA cycle and amino acid turnover // *Mol. Cancer*. — 2008. — Vol. 7. — P. 72.
11. *Goeminne P.C., Vandendriessche T., Eldere J.V. et al.* Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum headspace through volatile organic compound analysis // *BioMed. Central*. — 2012. — Vol. 13. — P. 83-87.
12. *Hartmann M., Zimmermann D., Nolte J.* Changes of the metabolism of the colon cancer cell line SW-480 under serum-free and serum-reduced growth conditions // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal*. — 2008. — Vol. 44. — P. 458-463.
13. *Jordan K.W., Nordenstam J., Lauwers G.Y. et al.* Metabolomic characterization of human rectal adenocarcinoma with intact tissue magnetic resonance spectroscopy // *Dis. Colon & Rectum*. — 2009. — Vol. 52, N 3. — P. 520-525.
14. *Jiang S., Jung S.M., Shin E.-C. et al.* Apoptosis in human hepatoma cell lines by chemotherapeutic drugs via fas-dependent and fas-independent pathways // *Hepatology*. — 1999. — Vol. 291. — P. 101-110.
15. *Kouremenos K.A., Pitt J., Marriott P.J.* Metabolic profiling of infant urine using comprehensive two-dimensional gas chromatography: application to the diagnosis of organic acidurias and biomarker discovery // *J. Chromatography A*. — 2010. — Vol. 1217. — P. 104-111.
16. *Lynberg M., Nuckols J.R., Langlois P. et al.* *Environ // Health Perspect.* — 2001. — Vol. 109. — P. 597.
17. *Martano G., Vogl C., Bojaxhi E. et al.* Solid-phase extraction and GC-MS analysis of potentially genotoxic cleavage products of  $\beta$ -carotene in primary cell cultures // *Anal. Bioanal. Chem.* — 2011. — Vol. 400. — P. 2415-2426.
18. *Paczkowski S., Schutz S.* Post-mortem volatiles of vertebrate tissue // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2011. — Vol. 91, N 4. — P. 917-935.
19. *Palozza P., Serini S., Di Nicuolo F. et al.*  $\beta$ -Carotene exacerbates DNA oxidative damage and modifies p53-related pathways of cell proliferation and apoptosis in cultured cells exposed to tobacco smoke condensate // *Carcinogenesis*. — 2004. — Vol. 25, N 8. — P. 1315-1325.
20. *Paolini M., Antelli A., Pozzetti L. et al.* Induction of cytochrome p450 enzymes and over-generation of oxygen radicals in beta-carotene supplemented rats // *Carcinogenesis*. — 2001. — Vol. 22, N 9. — P. 1483-1495.
21. *Paolini M., Abdel-Rahman S.Z., Sapone A. et al.*  $\beta$ -Carotene: a cancer chemopreventive agent or a co-carcinogen? // *Mutat. Res., Rev. Mutat. Res.* — 2003. — Vol. 543, N 3. — P. 195-200.
22. *Patti G.J., Yanes O., Siuzdak G.* Innovation: metabolomics: the apogee of the omics trilogy // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* — 2012. — Vol. 13. — P. 263-269.
23. *Pauling L., Robinson A.B., Teranishi R., Cary P.* Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. — 1971. — Vol. 68. — P. 2374-2376.
24. *Rajamaki T., Alakomi H.L., Ritvanen T. et al.* Application of an electronic nose for quality assessment of modified atmosphere packaged poultry meat // *Food Control*. — 2006. — Vol. 17. — P. 5-13.
25. *Rocha S.M., Caldeira M., Carrola J. et al.* Exploring the human urine metabolomic potentialities by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time of flight mass spectrometry // *J. Chromatography A*. — 2012. — Vol. 1252. — P. 155-163.
26. *Sands C.J., Coen M., Ebbels T.M. et al.* Data-driven approach for metabolite relationship recovery in biological  $^1\text{H}$  NMR data sets using iterative statistical total correlation spectroscopy // *Anal. Chem.* — 2011. — Vol. 83. — P. 2075-2082.
27. *Schnatter A.R., Rosamilia K., Wojcik N.C.* Review of the literature on benzene exposure and leukemia subtypes // *Chem.-Biol. Interact.* — 2005. — Vol. 153. — P. 9-21.
28. *Schulz S., Dickschat J.S.* Bacterial volatiles: the smell of small organisms // *Nat. Prod. Rep.* — 2007. — Vol. 24. — P. 814-842.
29. *Silva C.L., Passos M., Camara J.S.* Investigation of urinary volatile organic metabolites as potential cancer biomarkers by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry // *Brit. J. Cancer*. — 2011. — Vol. 105. — P. 1894-1904.
30. *Sreekumar A., Poisson L.M., Rajendiran T.M. et al.* Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression // *Nature*. — 2009. — Vol. 457. — P. 910-914.
31. *Statheropoulos M., Mikedi K., Agapiou A. et al.* Discriminant analysis of volatile organic compounds data related to a new location method of entrapped people in collapsed buildings of an earthquake // *Anal. Chim. Acta*. — 2006. — Vol. 566. — P. 207-216.
32. *Statheropoulos M., Agapiou A., Spiliopoulou C. et al.* Environmental aspects of VOCs evolved in the early stages of human decomposition // *Sci. Total. Environ.* — 2007. — Vol. 385. — P. 221-227.
33. *Thorn R.M., Reynolds D.M., Greenman J.* Multivariate analysis of bacterial volatile compound profiles for discrimination between selected species and strains *in vitro* // *J. Microbiol. Methods*. — 2011. — Vol. 84. — P. 258-264.
34. *Veenstra T.D.* Metabolomics: the final frontier // *Gen. Med.* — 2012. — Vol. 4. — P. 40.
35. *Wishart D.S., Tzur D., Knox C. et al.* HMDB: the Human Metabolome Database // *Nucl. Acids Res.* — 2007. — Vol. 35. — P. 521-526.
36. *Wolf F., Wandke C., Isenberg N., Geley S.* Dose-dependent effects of stable cyclin B1 on progression through mitosis in human cells // *EMBO J.* — 2006. — Vol. 25. — P. 2802-2813.
37. *Xue R., Dong L., Zhang S. et al.* Rapid Commun // *Mass Spectrom.* — 2008. — Vol. 22. — P. 1181-1186.
38. *Zimmermann D., Hartmann M., Moyer M.P. et al.* Determination of volatile products of human colon cell line metabolism by GC/MS analysis // *Metabolomics*. — 2007. — Vol. 31. — P. 13-17.