

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2025

Ильюшонок С.К.^{1,2}, Роговская Н.Ю.¹, Гладчук А.С.^{1,2}, Шарапов Я.А.¹, Перевозников И.Е.¹,
Бельтюков П.П.¹, Подольская Е.П.², Бабаков В.Н.¹

Метаболомный анализ кондиционных сред клеток линии НераRG при токсическом действии бенз[а]пирена при цитопротекторном действии ингибиторов цитохромов CYP1A и CYP3A и агониста арилгидрокарбонового рецептора

¹ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, г. пос. Кузболовский, Российская Федерация;

²ФГБУН «Институт аналитического приборостроения» Российской академии наук, 198095, Санкт-Петербург, Российская Федерация

РЕЗЮМЕ

Введение. Бенз[а]пирен – один из самых токсичных канцерогенов I группы по классификации МАИР (IARC); он метаболически активируется ферментами системы цитохрома P450 (CYP) с образованием реакционноспособных метаболитов, которые могут повреждать клетки и ДНК, что приводит к канцерогенезу. Клеточная линия НераRG, обладающая активными ферментами I и II фазы биотрансформации, служит моделью для изучения метаболизма полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) и оценки влияния модуляторов CYP – кетоконазола, α -нафтофлавона и 6-формилиндоло[3,2-b]карбазол (FICZ) – на метаболизм клеток и возможность цитопротекции при воздействии бенз[а]пирена.

Цель исследования – оценка метаболических изменений при цитопротекторном действии кетоконазола, α -нафтофлавона и FICZ на фоне токсичности бенз[а]пирена в модели клеточной линии НераRG.

Материал и методы. Для определения метаболомных биомаркеров интоксикации полициклическими ароматическими углеводородами в клетках НераRG было исследовано изменение метаболомного профиля методами хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения. Потенциальные маркеры определяли с помощью статистического анализа.

Результаты. Показана возможность применения метаболомного анализа кондиционных сред для выявления маркеров воздействия бенз[а]пирена и оценки эффектов модуляторов CYP *in vitro* с использованием клеточной линии НераRG. Изменения метаболомного профиля кондиционных сред после воздействия бенз[а]пирена на клетки НераRG в присутствии α -нафтофлавона свидетельствует о снижении токсического действия ПАУ на клетки.

Ограничения исследования. Исследование выполнено *in vitro* на культуре клеток без анализа зависимости наблюдаемых изменений метаболома от доз исследуемых соединений и не позволяет экстраполировать полученные результаты на живой организм.

Заключение. По результатам метаболомного профилирования клеточной среды НераRG был выявлен ряд метаболомных маркеров: 5-гидрокситриптофол, лизофосфатиды, аргинин и глутаминовая кислота, которые свидетельствуют о цитопротекторном действии α -нафтофлавона на фоне токсического действия бенз[а]пирена.

Ключевые слова: бенз[а]пирен; НераRG; кетоконазол; α -нафтофлавон; FICZ; метаболомное профилирование

Соблюдение этических стандартов. Исследование не требует представления заключения комитета по биомедицинской этике или иных документов.

Для цитирования: Ильюшонок С.К., Роговская Н.Ю., Гладчук А.С., Шарапов Я.А., Перевозников И.Е., Бельтюков П.П., Подольская Е.П., Бабаков В.Н. Метаболомный анализ кондиционных сред клеток линии НераRG при токсическом действии бенз[а]пирена при цитопротекторном действии ингибиторов цитохромов CYP1A и CYP3A и агониста арилгидрокарбонового рецептора. *Токсикологический вестник*. 2025; 33(5): 306–315. <https://elibrary.ru/kokurq> <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2025-33-5-306-315>

Для корреспонденции: Ильюшонок Семён Кириллович, e-mail: ilushonoksem@gmail.com

Участие авторов: Ильюшонок С.К. – анализ и обработка материала, статистическая обработка, написание текста; Роговская Н.Ю. – сбор материала, написание текста; Гладчук А.С. – редактирование текста о метаболомном анализе; Бельтюков П.П. – обработка и интерпретация данных, редактирование; Шарапов Я.А. – написание текста; Подольская Е.П. – концепция и дизайн исследования; Бабаков В.Н. – концепция и дизайн исследования, редактирование. Все соавторы – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках ГК (222438810018200000000000/25.456.22.9), шифр «Мониторинг-СОЗ».

Поступила в редакцию: 07 августа 2025 / Принята в печать: 02 октября 2025 / Опубликовано: 19 ноября 2025

Semyon K. Ilyushonok^{1,2}, Nadezhda Yu. Rogovskaya¹, Alexey S. Gladchuk^{1,2}, Yaroslav A. Sharapov¹, Ilya E. Perevoznikov¹, Petr P. Beltyukov¹, Ekaterina P. Podolskaya², Vladimir N. Babakov¹

Metabolomic analysis of conditioned media of HepaRG cells under the toxic action of benz[a]pyrene under the cytoprotective action of cytochrome CYP1A and CYP3A inhibitors and an arylhydrocarbon receptor agonist

¹Scientific Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology of the Federal Medical Biological Agency of Russia, Leningrad region, Kuzmolovsky settlement, 188663, Russian Federation;

²Institute for Analytical Instrumentation of the RAS, Saint Petersburg, 198095, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction. Benz[a]pyrene is one of the most dangerous carcinogens of group I according to the IARC classification; it is metabolically activated by enzymes of the cytochrome system P450 (CYP) with the formation of reactive metabolites capable of damaging cells and DNA, which leads to carcinogenesis. The HepaRG cell line, which exhibits active enzymes of phases I and II of biotransformation, serves as a model for studying polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) metabolism and evaluating the effect of CYP modulators ketoconazole, α -naphthoflavone and 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) on cell metabolism and the possibility of cytoprotection when exposed to benz[a]pyrene.

The aim of the study was to evaluate metabolic changes under the cytoprotective action of ketoconazole, α -naphthoflavone and FICZ against the background of benz[a]pyrene toxicity in the HepaRG cell line model.

Material and methods. To identify metabolomic biomarkers of PAH intoxication in HepaRG cells, changes in the metabolomic profile were analyzed using high-resolution chromatographic mass spectrometry. Potential biomarkers were identified through statistical data analysis methods.

Results. The possibility of using a metabolomic analysis of conditioned media to identify markers of benz[a]pyrene exposure and evaluate the effects of CYP modulators *in vitro* using the HepaRG cell line has been shown. Changes in the metabolomic profile of conditioned media after exposure to benz[a]pyrene on HepaRG cells in the presence of α -naphthoflavone indicate a decrease of the PAHs toxic effect on cells.

Limitations. The study was performed *in vitro* on a cell culture without analyzing the dose-dependent changes in the metabolome after exposure to the compounds studied and does not allow extrapolating the results obtained to a living organism.

Conclusion. According to the results of the metabolomic profiling of the HepaRG cellular media, a number of metabolomic markers were identified: 5-hydroxytryptophol, lysophosphatides, arginine and glutamic acid, which indicate the cytoprotective effect of α -naphthoflavone against the background of the toxic effect of benz[a]pyrene.

Keywords: benz[a]pyrene; HepaRG; ketoconazole; α -naphthoflavone; FICZ; metabolomic profiling

Compliance with ethical standards. The study does not require the submission of a biomedical ethics committee opinion or other documents.

For citation: Ilyushonok S.K., Rogovskaya N.Yu., Gladchuk A.S., Sharapov Y.A., Perevoznikov I.E., Beltyukov P.P., Podolskaya E.P., Babakov V.N. Metabolomic analysis of conditioned media of HepaRG cells under the toxic action of benz[a]pyrene under the cytoprotective action of cytochrome CYP1A and CYP3A inhibitors and an arylhydrocarbon receptor agonist. *Toksikologicheskii vestnik / Toxicological Review*. 2025; 33(5): 306–315. <https://elibrary.ru/kokurq> <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2025-33-5-306-315>

For correspondence: Semyon K. Ilyushonok, e-mail: ilyushonoksem@gmail.com

Authors' contribution: Ilyushonok S.K. – collection and processing of material, statistical processing, writing a text; Rogovskaya N.Yu. – collection of material, writing a text; Gladchuk A.S. – editing; Sharapov Ya.A. – writing a text; Perevoznikov I.E. – writing a text; Beltyukov P.P. – data processing and interpretation, text editing; Podolskaya E.P. – research concept and design; Babakov V.N. – the concept and design of the study, editing. All co-authors are responsible for approving the final version of the article and ensuring the integrity of all parts of the article.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The work was carried out within the framework of the state contract (222438810018200000000000/25.456.22.9), cipher “Monitoring-SOZ”.

Received: August 08, 2025 / Accepted: October 2, 2025 / Published: November 19, 2025

Введение

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) представляют собой обширный класс органических соединений, состоящих из двух и более конденсированных ароматических колец. Эти вещества являются стойкими органическими загрязнителями и в основном образуются в результате неполного сгорания органических материалов, таких как нефть, древесина, уголь, табак и др. [1, 2].

Бенз[а]пирен (Б[а]П) – ароматический углеводород, состоящий из пяти конденсированных бензольных колец, один из наиболее токсичных и изученных представителей ПАУ. Он включён в перечень веществ I группы канцерогенности, согласно классификации Международного агентства по изучению рака МАИР (IARC) [3]. Б[а]П обладает выраженной способностью к метаболической активации с образованием химически активных метаболитов, способных ковалентно связываться с ДНК и белками [4, 5]. Результатом такого взаимодействия становится повреждение ДНК, приводящее к нарушениям регуляции клеточного цикла и инициации канцерогенеза [6]. Б[а]П относится к числу приоритетных соединений, подлежащих обязательному мониторингу среди ПАУ [7].

Клеточную линию НераRG широко используют в лабораторной практике для моделирования индукции и ингибирования метаболических путей ксенобиотиков. Данная линия обладает характеристиками зрелых гепатоцитов, включая экспрессию функционально активных ферментов I и II фазы биотрансформации [8]. Благодаря этим свойствам НераRG рассматривается как подходящая модель для скрининга индукторов и ингибиторов метаболизма ксенобиотиков, а также для оценки их токсикологического профиля [9]. НераRG используют для оценки биотрансформации и цитотоксичности ксенобиотиков и фармацевтических препаратов, в особенности при оценке метаболизма с участием ферментов системы цитохрома P450, таких как CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4, CYP2D6 [10]. Так же линия НераRG считается перспективной для тестирования генотоксичности благодаря сохранению функциональной активности гена *TP53* [11].

Ингибирование ферментов метаболизма ксенобиотиков потенциально может обеспечить защиту клеток от повреждающего действия реакционно-способных продуктов метаболической активации, в том числе Б[а]П. Поэтому исследование цитопротективных свойств соединений, способных блокировать метаболическую активацию ПАУ, является актуальной задачей. Ранее было продемонстриро-

вано, что ингибиторы цитохромов CYP1A и CYP3A α -нафтофлавоны и кетоконазол, а также агонисты арил-гидрокарбоновых рецепторов проявляют защитное цитопротекторное действие на фоне токсического действия Б[а]П [12, 13]. В настоящем исследовании выполнена оценка эффектов трёх соединений, модулирующих активность ферментов системы P450, участвующих в химической модификации ПАУ: кетоконазола, α -нафтофлавона и 6-формилиндоло[3,2-b]карбазол (FICZ) на метаболизм профили кондиционных сред клеток линии НераRG при воздействии Б[а]П. Анализ последствий влияния перечисленных соединений на клеточный метаболизм в условиях воздействия Б[а]П позволяет расширить представление о метаболических биомаркерах воздействия ПАУ на биообъекты в модельной системе на основе линии клеток НераRG.

В настоящем исследовании проведена оценка метаболических изменений при цитопротекторном действии кетоконазола, α -нафтофлавона и FICZ на фоне цитотоксичности Б[а]П в модели клеточной линии НераRG с целью определения потенциальных метаболических биомаркеров при интоксикации полициклическими ароматическими углеводородами.

Материал и методы

Культивирование клеток и получение образцов кондиционных сред. Клетки гепатомы человека линии НераRG (Gibco, США) культивировали в полной питательной среде (среда William's E с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 5 мкг/мл инсулин, 50 мкМ гидрокортизона гемисукцината, 10 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) в атмосфере CO₂-инкубатора (95% O₂ и 5% CO₂) при температуре 37 °C и насыщающей влажности.

Для получения кондиционных сред (КС) клетки высевали в 24-луночный планшет в количестве 400 тыс. клеток на лунку и культивировали в полной питательной среде. На следующий день после пассажа осуществляли замену на среду, содержащую Б[а]П в концентрации 10 мкМ, а также Б[а]П с добавлением 1 нМ FICZ, 500 нМ α -нафтофлавона и 2 мкМ кетоконазола. Для приготовления экспериментальных сред стоковые растворы Б[а]П (2,5 мг/мл в ацетоне), FICZ (10 мМ в диметилсульфоксиде – ДМСО), α -нафтофлавона (5 мМ в ДМСО), кетоконазола (2 мМ в ДМСО) разбавляли полной питательной средой до получения конечных концентраций. В контрольные лунки добавляли полную питательную среду. Каждый вариант среды вносили в

деяти повторах. Клетки выдерживали в CO_2 -инкубаторе в течение 48 ч, после чего кондиционные среды отбирали, центрифугировали при 14 000 g в течение 20 мин для удаления разрушенных клеток, супернатант аликвотировали и замораживали при минус 80 °С.

Нецелевой метаболомный анализ. Образцы кондиционных сред размораживали при комнатной температуре в течение 2–3 ч, затем перемешивали в термомиксере Thermomixer (Eppendorf, ФРГ) при 1000 об/мин и 4 °С в течение 1 мин. Объединённые образцы для контроля качества (Quality Control) готовили путём объединения аликвот объёмом по 5 мкл из каждого образца. По 100 мкл каждого образца смешивали с 400 мкл ацетонитрила (АЦН, Криохром), охлаждённого до минус 20 °С, с последующим перемешиванием в течение 2 мин в термомиксере при 1000 об/мин и 4 °С. Затем образцы центрифугировали в течение 15 мин (10 000 g; 4 °С), после чего 250 мкл супернатанта переносили в стеклянные вставки в хроматографические виалы для последующего анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ–МС/МС).

Хромато-масс-спектрометрический анализ. Образцы анализировали с использованием аналитической системы, состоящей из жидкостного хроматографа Elute (Bruker Daltonik GmbH, ФРГ) с масс-спектрометром времяпролетного типа timsTOF Pro (Bruker Daltonik GmbH, ФРГ), оснащённым источником ионов с электрораспылительной ионизацией Apollo II. Параметры хроматографического разделения компонентов проб: хроматографическая колонка SeQuant ZIC-HILIC (150 × 2,1 мм; 100 Å; 3,5 мкм; Merck, ФРГ); хроматографическая предколонка SeQuant ZIC-HILIC Guard Column (20 × 2,1 мм, Merck, ФРГ); температура термостата колонки – 40 °С; скорость потока элюента – 300 мкл/мин; состав подвижной фазы: А – 0.1 об. % муравьиной кислоты в воде, Б – 0.1 об. % муравьиной кислоты в ацетонитриле; объём вводимой пробы – 2 мкл; режим элюирования – градиентный; программа градиента: 0–1 мин – 5% Б, 1–35 мин – 5–60% Б, 35–36 мин – 60–80% Б, 36–39 мин – 80% Б, 39–40 мин – 80–5% Б, 40–50 мин – 5% Б. Масс-спектрометрические параметры анализа: напряжение на капилляре – 4,5 кВ; температура источника ионов – 210 °С; скорость потока газа-осушителя – 8,0 л/мин; частота регистрации спектров – 4 Гц; энергия ионов – 5 эВ; диапазон m/z – 70–1300. Калибровку масс-спектрометра перед анализом осуществляли с использованием

1 mM раствора формиата натрия в 90 % (об/об) водном изопропанол.

Среди анализируемых образцов кондиционных сред были выделены 6 групп:

- 1-я (контрольная) – интактные клетки в полной ростовой среде;
- 2-я – клетки, обработанные Б[а]П (bp10);
- 3-я – клетки, обработанные смесью Б[а]П с кетоконазолом (Ket);
- 4-я – клетки, обработанные смесью Б[а]П с FICZ;
- 5-я – клетки, обработанные смесью Б[а]П с α -нафтофлавоном (aN500);
- 6-я – контроль качества (Quality Control, QC) – пул образцов каждой группы, смешанных в равных пропорциях.

Обработка масс-спектрометрических данных.

Экспериментальные данные регистрировали и обрабатывали с помощью программных пакетов Hystar 5.1 (Bruker Daltonik GmbH, ФРГ) и DataAnalysis 5.0 (Bruker Daltonik GmbH, ФРГ) соответственно. Деконволюция, идентификация пиков, заполнение промежутков и выравнивание пиков метаболитов по объединённым образцам QC выполняли с использованием программного обеспечения MetaboScape 6.0.2 (Bruker Daltonik GmbH, ФРГ). Для автоматического экстрагирования данных из трёхмерного пространства (m/z , время удерживания (RT), интенсивность сигнала) и связывания с ними тандемных масс-спектров использовали алгоритм поиска сигналов TReX 3D.

Параметры экстрагирования сигналов MetaboScape: минимальный порог интенсивности, равный 1000 отсчётов и минимальная длина пика в 7 спектров для обнаружения пиков с использованием площади пика для количественного анализа характеристик; минимальное количество *data points* – 60; при деконволюции ион $[M + H]^+$ определялся как первичный; $[M + Na]^+$, $[M + K]^+$, $[M + NH_4]^+$ определялись как затравочные ионы, а $[M + H-H_2O]^+$ и $[M + NH_4H]^+$ – как вторичные ионы. Отбирали только те сигналы, которые присутствуют как минимум в 9 из 45 образцов (45 сравниваемых образцов, 9 образцов контроля качества и 4 бланка).

Метаболиты идентифицировали путём сопоставления значений m/z и фрагментных спектров высокого разрешения метаболитов в образцах с внутренними стандартными базами данных MetaboScape (Bruker MetaboBASE Personal Library 2.0, NIST, 2020). Параметры для автоматического аннотирования в MetaboScape: значение совпадения экспериментальных МС/МС с библиотечными больше 800, ошибка по $m/z < 10$ ppm (ошибка по значению m/z иона-предшественника), $mSigma < 20$ (совпадение изотопного распределения).

Статистический анализ результатов метаболомного профилирования. Характеристика и визуализация различий в метаболомных профилях выполнены с использованием дискриминантного анализа методом частичных наименьших квадратов (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA). В этом анализе использовали полный набор идентифицированных метаболитов для оценки глобальных различий между группами. Статистически значимые различия между средними значениями в группах bp10 и aN500 выявлены с применением одномерного анализа на основе *t*-критерия Стьюдента с уровнем значимости 0,05 и построения вулканического графика (Volcano plot) с помощью веб-инструмента MetaboAnalyst 6.0 [14]. Также были проведены анализ методом главных компонент (Principal Component Analysis, PCA); анализ дисперсии (Analysis of Variance, ANOVA), отобранных *t*-критерием Стьюдента данных; построена тепловая карта на основе результатов ANOVA, дана оценка роли соединений, демонстрирующих существенные различия между группами, в метаболических процессах.

Результаты

Образцы контроля качества содержали репрезентативный пул всех клеточных групп, участвовавших в эксперименте, и распределялись при ВЭЖХ-МС/МС-анализе до, после и между исследуемыми образцами. Таким образом, на этапе предварительной обработки данных в извлечённую матрицу хромато-масс-спектрометрических данных было включено около 70 % ионных признаков, выявленных в образцах контроля качества. Отбор проводился с учётом воспроизводимости и стабильности сигналов; низкоинформативные и нестабильные компоненты были исключены. Дальнейшая обработка масс-спектрометрических данных в MetaboScape, позволила выявить 373 сигнала. После исключения сигналов без МС/МС-спектров и встречающихся в бланковых образцах было отобрано 338 сигналов. Аннотирование проводили в сравнении с данными спектральных библиотек, составленных Bruker и NIST. Затем эти данные были экспортированы для дальнейшего статистического анализа в сервисе MetaboAnalyst 6.0.

Нормализация данных была проведена путём преобразования квадратного корня (квадратный корень значения данных) и автоматического масштабирования (центрированного по среднему и делённого на квадратный корень стандартного отклонения каждой переменной). На первом этапе была построена многомерная модель для всех

сигналов, отобранных по результатам обработки в программном обеспечении MetaboScape. Двумерный график оценок (рис. 1, а, см. на вклейке) показал заметное разделение между контрольной группой (Control, синий кластер) и образцами с добавлением Б[а]П (bp10, Ket, FICZ и aN500). Распределение отдельных образцов по первой и третьей главным компонентам (PC1 и PC3) в совокупности объясняет 48% общей дисперсии. Результат анализа PLS-DA показывает, что существенные различия между группами bp10 и aN500 могут объясняться определённым подмножеством метаболитов.

Для определения этого подмножества был проведён анализ двухвыборочным *t*-критерием Стьюдента для сравнения групп bp10 и aN500 при уровне значимости $p < 0,05$. По результатам анализа построен вулканический график (рис. 1, б, см. на вклейке), который отображает значения достоверности и кратности изменения концентраций метаболитов. Цвет точек на графике отражает соотношение содержаний метаболитов: синим цветом отмечены сигналы метаболитов, которые имеют более высокое содержание в группе aN500 по сравнению с группой bp10; красным цветом – сигналы метаболитов, преобладающих в группе bp10 по сравнению с группой aN500. Серые точки относятся ко всем другим сигналам без существенных изменений между группами. Для дальнейшего анализа были отобраны сигналы метаболитов, удовлетворяющие критерию значимости (0,05) и порогу кратности изменения ≥ 2 (двукратное увеличение или уменьшение относительного содержания метаболита). Вулканический график выявил четкие различия в содержании 53 метаболитов между группами bp10 и aN500.

Для определения этого подмножества был проведён анализ двухвыборочным *t*-критерием Стьюдента для сравнения групп bp10 и aN500 при уровне значимости $p < 0,05$. По результатам анализа построен вулканический график (рис. 1, б, см. на вклейке), который отображает значения достоверности и кратности изменения концентраций метаболитов. Цвет точек на графике показывает соотношение содержаний метаболитов: синим цветом отмечены сигналы метаболитов, которые имеют более высокое содержание в группе aN500 по сравнению с группой bp10; красным цветом – сигналы метаболитов, преобладающих в группе bp10 по сравнению с группой aN500; серые точки относятся ко всем другим сигналам без существенных изменений между группами. Для дальнейшего анализа были отобраны сигналы метаболитов, удовлетворяющие критерию

Аннотированные метаболиты со значимой вариабельностью между исследуемыми группами, выявленные на основе статистических анализов (t-критерий Стьюдента и ANOVA)
Annotated metabolites with significant variability between studied groups identified based on statistical analyses (Student's t-test and ANOVA).

PubChem (CID)	Название Name	Молекулярная формула Molecular formula	Время удерживания, мин Retention time, min	m/z [M+H] ⁺		Ошибка, ppm Error, ppm	f.value	-10log (p)
				расчётное calculated	обнаруженное detected			
24778931	1-олеил-2-миристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин 1-Oleoyl-2-myristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	C ₄₀ H ₇₈ NO ₈ P	8.31	732.554	732.551	-3.8	79.5	17.76
24779458	1-пентадеканоил-sn-глицеро-3-фосфохолин 1-pentadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	C ₂₃ H ₄₈ NO ₇ P	8.78	482.324	482.323	-2.3	72.30	17.04
7405	L-5-окспролин / L-5-Oxoproline	C ₅ H ₇ NO ₃	12.16	130.050	130.050	-0.8	68.58	16.64
24779463	1-гептадеканоил-sn-глицеро-3-фосфохолин 1-Heptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	C ₂₅ H ₅₂ NO ₇ P	8.74	510.355	510.355	-2.7	66.91	16.45
5287971	1-пальмитоил-2-линолеил-sn-глицеро-3-фосфохолин 1-Palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	C ₄₂ H ₈₀ NO ₈ P	8.30	758.569	758.569	-3.2	49.59	14.26
1136	5-(2-гидроксиэтил)-4-метилтиазол 5-(2-Hydroxyethyl)-4-methylthiazole	C ₆ H ₉ NOS	15.09	144.048	144.0478	-5.6	47.67	13.98
5497103	2-олеил-1-пальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин 2-Oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P	8.24	782.567	782.566 [M+Na] ⁺	-1.3	41.91	13.07
135398638	Гипоксантин / Hypoxanthine	C ₅ H ₄ N ₄ O	10.43	137.046	137.045	-5.8	38.49	12.49
1188	Ксантин / Xanthine	C ₅ H ₄ N ₄ O ₂	5.44	153.041	153.040	-3.9	25.93	9.92
9061	5-гидрокситриптофол / 5-Hydroxytryptophol	C ₁₀ H ₁₁ NO ₂	1.60	178.086	178.085	-7.3	23.93	9.43
158980	Метионин сульфоксид / Methionine Sulfoxide	C ₅ H ₁₁ NO ₃ S	12.09	166.053	166.052	-7.2	23.70	9.38
6262	Орнитин / Ornithine	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	22.68	133.097	133.097	-1.5	12.76	6.06
1662	3-гидрокси-3-метилглутаровая кислота 3-Hydroxy-3-methylglutaric acid	C ₆ H ₁₀ O ₅	9.63	163.060	163.059	-6.8	6.79	3.55
6322	Аргинин / Arginine	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	19.62	175.119	175.119	-5.7	29.61	10.75
305	Холин / Choline	C ₅ H ₁₄ NO ⁺	8.39	104.107	104.106	-9.6	21.28	8.74
33032	Глутаминовая кислота / L-Glutamic Acid	C ₅ H ₉ NO ₄	11.20	148.060	148.060	-2.7	55.37	15.05
460604	1-миристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин 1-Myristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	C ₂₂ H ₄₆ NO ₇ P	8.82	468.309	468.307	-3.2	67.22	16.49
497299	1-стеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин 1-Stearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P	8.71	524.371	524.369	-4.0	71.36	16.94

значимости (0,05) и порогу кратности изменения ≥ 2 (двукратное увеличение или уменьшение относительного содержания метаболита). Вулканический график выявил чёткие различия в содержании 53 метаболитов между группами bp10 и aN500.

На следующем этапе для отобранных *t*-критерием Стьюдента данных был проведён анализ методом PCA. Результаты, представленные графиками оценок и нагрузок, показаны на рис. 2, а, см. на вклейке. Модель объясняет значимую часть дисперсии данных ($R^2 = 0,79$; $p = 0,001$), PC1 и PC3 вместе составляют 79,8%. Группы bp10, FICZ и Ket образуют компактные кластеры, существенно отличающиеся от группы Control. В группе aN500 наблюдается значительная вариабельность, характеризующаяся кластером с широкой дисперсией вдоль PC1, что обусловлено существенными различиями метаболома между образцами кондиционных сред от контрольных клеток (Control) и клеток, обработанных Б[а]П. Результаты PCA-анализа позволяют сделать вывод, что отбор метаболитов с использованием *t*-критерия Стьюдента даёт возможность выявить в составе метаболома кондиционных сред «маркерные» соединения, концентрация которых близка к контрольным уровням и отражает цитопротекторные эффекты α -нафтофлавона.

Расчёт вариабельности относительного содержания метаболитов в анализируемых образцах оценён с использованием ANOVA методом наименьшего значимого различия (LSD Фишера, Least Significant Difference): статистически значимыми считались дисперсии содержания соединений со значением уровня ложного обнаружения (FDR, False Discovery Rate) $p < 0,05$ (рис. 2, а, б, см. на вклейке). По итогу анализа все исследуемые нами сигналы удовлетворяли критериям значимости: $FDR < 0,05$, $f. value > 4$ (статистика теста, вычисленная как отношение дисперсии между группами к дисперсии внутри групп). На основе результатов анализа ANOVA была построена тепловая карта (рис. 2, в, см. на вклейке) для 18 соединений с лучшими показателями дисперсии ($f. value$) с иерархической кластеризацией, наглядно демонстрирующая вариации содержания метаболитов в различных экспериментальных условиях. Каждая строка соответствует исследованному образцу, которые сгруппированы с учётом экспериментальных условий, в столбцах представлена информация о содержании метаболитов в этих образцах. Цветовая шкала показывает относительную концентрацию метаболита в каждой из сравниваемых групп, где красные оттенки соответствуют более высоким концентра-

циям, синие оттенки – более низким, а нейтральные цвета (жёлтый) отражают промежуточные уровни. Дендрограмма по строкам иллюстрирует иерархическую кластеризацию, группируя вместе образцы со схожими профилями. В частности, на рис. 2, в (см. на вклейке) показано наличие двух отдельных кластеров образцов: контрольной группы клеток и клеток с добавлением Б[а]П и α -нафтофлавона, а также для образцов из групп bp10, Ket, FICZ. Первый кластер, включающий контрольные образцы и образцы Б[а]П с α -нафтофлавоном, характеризуется преимущественно синим цветом на тепловой карте, что отражает более низкие относительные концентрации метаболитов. Напротив, второй кластер, состоящий из образцов bp10, Ket и FICZ, представлен на тепловой карте преимущественно красным цветом, что указывает на более высокие уровни содержания метаболитов. Однако исключения из этой общей тенденции наблюдаются для гипоксантина и орнитина, демонстрирующих снижение концентраций во всех клетках с Б[а]П. В таблице представлен список аннотированных метаболитов, отобранных при построении тепловой карты.

На последнем этапе работы нами был проведён анализ метаболомных путей (Metabolome Pathway), по результатам которого определены пути с участием исследуемых метаболитов. Эффекты, связанные с метаболизмом глицерофосфолипидов показали наивысшее (0,5) значение влияния по сравнению с другими метаболическими путями. Значимое влияние воздействия на клетки выявлено также в путях метаболизма аргинина (рис. 3, см. на вклейке).

Обсуждение

Наиболее существенными изменениями метаболома кондиционных сред в результате воздействия Б[а]П является существенное изменение соотношений ряда метаболитов, образующихся при синтезе глицерофосфолипидов (ГФЛ) *de novo* и при ресинтезе ГФЛ из лизофосфатидов, а также при распаде ГФЛ. Обращает на себя внимание существенный рост уровней свободного холина в кондиционных средах после обработки клеток Б[а]П, что может быть следствием выхода продуктов деградации ГФЛ при гибели клеток или результатом ускоренного распада ГФЛ после воздействия Б[а]П. При этом не выявлено существенных различий в направленности изменений концентрации свободного холина при совместном действии Б(а)П с агонистом AhR FICZ или с кетоконазолом. Уровни содержания лизофосфатидов (CID: 24779458, 24779463, 460604, 497299;

см. таблицу) в образцах из всех групп после обработки Б[а]П, кроме aN500, имеют практически одинаковые профили. Профили ГФЛ, которые не подверглись гидролитической деградации (CID: 5497103, 5287971; см. таблицу), существенно отличаются от профилей лизофосфатидов. Для кондиционных сред в группах Control, aN500 и bp10 характерны низкие уровни ГФЛ. Высокие уровни ГФЛ в группах FICZ и Ket, вероятно, обусловлены опосредованными эффектами воздействия FICZ и кетоконазола на скорость деградации мембранных липидов. Содержание одного из идентифицированных ГФЛ (CID 24778931, 1-олеоил-2-миристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин; см. таблицу) в образцах сред из группы bp10 существенно выше, чем во всех остальных образцах. Является ли эта находка артефактом или выявленное соединение может служить биомаркером воздействия Б[а]П при его изолированном воздействии на клетки пока не ясно.

Три соединения из числа отобранных — гипоксантин (CID 790), 5-(2-гидроксиэтил)-4-метилтиазол (CID 1136) и орнитин (CID 6262) в значительно более высоких количествах присутствуют в образцах кондиционных сред группы Control, а в остальных группах (где выполнялась обработка клеток Б[а]П) этих соединений крайне мало. При этом уровень ксантина возрастает в кондиционных средах в ряду Control→aN500→bp10→FICZ→Ket. Накопление ксантина в образцах после обработки кетоконазолом может быть связано с хелатирующими свойствами азолов, поскольку завершающая стадия утилизации пуринов в клетках млекопитающих — это окисление ксантина с участием ксантиноксидазы (EC 1.17.3.2) — фермента, активность которого существенно зависит от концентрации двухвалентных катионов, в первую очередь от содержания Fe^{2+} , которое в среде William's E сравнимо с использованной в эксперименте концентрацией кетоконазола. Выявленный в кондиционных средах группы Control высокий уровень гипоксантина свидетельствует о сохранении способности неповреждённых клеток HpaRG реутилизировать пуриновые азотистые основания. В остальных группах, вероятно, имеют место существенные потери гипоксантина и, по-видимому, других пуринов, пригодных для синтеза нуклеотидов.

Похожие различия (рост содержания в ряду Control→aN500→bp10→FICZ→Ket) выявлены для 5-гидрокситриптофола (CID 9061) — продукта метаболизма серотонина, образующегося в результате двух последовательных реакций, катализируемых моноаминоксидазой (EC 1.4.3.4) и алкогольдегидрогеназой (EC 1.1.1.1). В норме

этот метаболит утилизируется после конъюгации с глюкуроновой кислотой с участием глюкуронозилтрансферазы, UGT (EC 2.4.1.17). Следовательно, накопление 5-гидрокситриптофола свидетельствует о нарушении каталитического переноса глюкуроновой кислоты в указанной реакции или о снижении содержания необходимого для этой реакции субстрата (УДФ-глюкуроновой кислоты). Можно предположить, что эффект накопления 5-гидрокситриптофола обусловлен действием кетоконазола, поскольку для этого вещества описан ингибирующий эффект в отношении двух изоферментов UGT1A1 и UGT1A9 [15].

Изменения содержания аргинина, орнитина и глутаминовой кислоты (CID 6322, 6262, 33032) отражают нарушения обмена аргинина и синтеза мочевины, индуцированные токсическим воздействием Б(а)П или его метаболитов. Для аргинина самое высокое содержание зарегистрировано в группе bp10, в меньшей степени — в группе FICZ. При этом в группах Ket, aN500 и Control — уровни аргинина низкие. Накопление аргинина, вероятнее всего, отражает нарушение реакции гидролиза аргинина, катализируемой цитоплазматической аргиназой (EC 3.5.3.1). Однако накопление (сохранение) орнитина имеет место в образцах группы Control, а во всех образцах после обработки Б[а]П содержание орнитина существенно ниже. Расходование этого метаболита может указывать на ускорение процессов утилизации аммиака в культуре HpaRG после воздействия Б[а]П. Вероятно, культивирование клеток в присутствии ПАУ влечет за собой ускорение реакций, сопровождающихся выделением аммиака (дезаминирование).

5-Оксопролин, или пироглутаминовая кислота (CID 7405), имеет отличающийся от большинства других метаболитов профиль в исследованных образцах кондиционных сред (рост содержания наблюдается в ряду Control~aN500~FICZ→bp10→Ket). Данный метаболит может образоваться в результате лактамной циклизации глутамина в ходе реакции, катализируемой глутаминил-пептид циклотрансферазой (EC 2.3.2.5) или в процессах, связанных с метаболизмом глутатиона: в обратимой реакции, катализируемой глутатион-специфичной γ -глутамилциклотрансферазой (EC 4.3.2.7). Накопление пироглутаминовой кислоты, по-видимому, является следствием нарушения её дальнейшей утилизации либо в реакциях синтеза глутатиона, либо в ходе гидролиза с участием АТФ-зависимой 5-оксопролиназы (EC 3.5.2.9). Нельзя исключить, что продукты активации ПАУ и/или кетоконазол могут приводить к нарушениям этих процессов.

Ограничения исследования. Исследование выполнено *in vitro* на культуре клеток без анализа зависимости наблюдаемых изменений метаболома от доз исследуемых соединений и не позволяет экстраполировать полученные результаты на живой организм.

Заключение

Проведён метаболомный анализ с помощью гидрофильной хроматографии и масс-спектрометрии высокого разрешения кондиционных сред клеток линии HeraRG при остром токсическом действии B[a]П и при совместном действии

цитопротекторных соединений ингибиторов цитохромов CYP1A и CYP3A α -нафтофлавона и кетоконазола, снижающих вероятность образования генотоксичных метаболитов B[a]П и агониста арил-гидрокарбонового рецептора FICZ, снижающего вероятность транспорта B[a]П и его метаболитов в ядро. С помощью методов статистической обработки данных обзорной метаболомики выявлены маркерные соединения, ассоциированные с токсическим действием на клетки B[a]П и статистически значимо меняющиеся при совместном действии цитопротекторных изученных соединений и B[a]П.

ЛИТЕРАТУРА

(пп. 1–11 см. в References)

12. Малыгина Д.А., Роговская Н.Ю., Бельтюков П.П., Бабаков В.Н. Роль цитохромов CYP1A и CYP3A в генотоксическом действии бенз(а)пирена. *Токсикологический вестник*. 2022; 30(3): 158–66. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2022-30-3-158-166>
13. Бабаков В.Н., Роговская Н.Ю., Курдюков И.Д., Бельтюков П.П., Дулов С.А., Радилов А.С. Влияние агонистов арилгидрокарбонового рецептора и липополисахарида на маркеры генотоксического действия бенз(а)пирена. *Токсикологический вестник*. 2019; 3(156): 19–25. <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2019-3-19-25>
14. Программное обеспечение MetaboAnalyst 6.0. Доступно: <https://www.metaboanalyst.ca/>

REFERENCES

1. Moorthy B., Chu C., Carlin D.J. Polycyclic aromatic hydrocarbons: from metabolism to lung cancer. *Toxicol Sci*. 2015; 145(1): 5–15. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv040>
2. Ravindra K., Sokhi R., Van Grieken R. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: source attribution, emission factors and regulation. *Atmos Environ*. 2008; 42(13): 2895–921. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.12.010>
3. Kim K.H., Jahan S.A., Kabir E., Brown R.J. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environ Int*. 2013; 60: 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.07.019>
4. International Agency for Research on Cancer (IARC). Chemical agents and related occupations: a review of human carcinogens. *IARC Monogr*. 2012; 100F: 111–44.
5. Boström C.E., Gerde P., Hanberg A., et al. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ Health Perspect*. 2002; 110(3): 451–88. <https://doi.org/10.1289/ehp.110-1241197>
6. Androutsopoulos V.P., Tsatsakis A.M., Spandidos D.A. Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer*. 2009; 9: 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-187>
7. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). *Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)*. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services; 1995.
8. Kanebratt K.P., Andersson T.B. HepaRG cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction in humans. *Drug Metab Dispos*. 2008; 36(1): 137–45. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.017418>
9. Hart S.N., Li Y., Nakamoto K., Subileau E.A., Steen D., Zhong X.B. A comparison of whole genome gene expression profiles of HepaRG cells and HepG2 cells to primary human hepatocytes and human liver tissues. *Drug Metab Dispos*. 2010; 38(6): 988–94. <https://doi.org/10.1124/dmd.109.031831>
10. Kim N., Bang J.H., Yi H., et al. Comparison of in vitro models for drug-induced liver injury assessment. *J Biomed Transl Res*. 2024; 25: 53–67. <https://doi.org/10.12729/jbtr.2024.25.2.53>
11. Guo X., Xu H., Seo J.E. Application of HepaRG cells for genotoxicity assessment: a review. *J Environ Sci Health C Toxicol Carcinog*. 2024; 42: 214–37. <https://doi.org/10.1080/26896583.2024.2331956>
12. Malygina D.A., Rogovskaya N.Y., Belyukov P.P., Babakov V.N. The role of cytochromes CYP1A and CYP3A in the genotoxic effect of benzo(a)pyrene. *Toxicologicheskiy Vestnik* 2022; 30(3): 158–66. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2022-30-3-158-166> (In Russian)
13. Babakov V.N., Rogovskaya N.Y., Kurdyukov I.D., Belyukov P.P., Dulov S.A., Radilov A.S. Effect of hydrocarbon receptor agonists and lipopolysaccharide on benzo(a)pyrene genotoxicity markers. *Toxicologicheskiy Vestnik*. 2019; 3(156): 19–25. <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2019-3-19-25> (In Russian)
14. Software MetaboAnalyst 6.0. Available at: <https://www.metaboanalyst.ca>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Ильюшонок Семён Кириллович – научный сотрудник, ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, г. пос. Кузьмоловский, Россия. E-mail: ilushonoksem@gmail.com

Роговская Надежда Юрьевна – научный сотрудник, ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, г. пос. Кузьмоловский, Россия. E-mail: nadin-r@mail.ru

Гладчук Алексей Сергеевич – кандидат техн. наук, старший научный сотрудник, ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, г. пос. Кузьмоловский, Россия. E-mail: aleglad24@gmail.com

Шарапов Ярослав Артемович – лаборант, ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, г. пос. Кузьмоловский, Россия. E-mail: yarostloff@yandex.ru

Перевозников Илья Евгеньевич – младший научный сотрудник, ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, г. пос. Кузьмоловский, Россия. E-mail: ilyaperveznikov@gmail.com

Бельтюков Петр Петрович – кандидат мед. наук, ведущий научный сотрудник, ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, г. пос. Кузьмоловский, Россия. E-mail: beltiukov@gpRech.ru

Подольская Екатерина Петровна – доктор техн. наук, ведущий научный сотрудник, ФГБУН «Институт аналитического приборостроения» РАН, 198095, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: ek.podolskaya@gmail.com

Бабаков Владимир Николаевич – кандидат биол. наук, заведующий лабораторией № 63, ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, г. пос. Кузьмоловский, Россия. E-mail: babakov@gpRech.ru

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Semyon K. Ilyushonok – Researcher, Scientific Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology of the Federal Medical Biological Agency of Russia, Leningrad region, Kuzmolovsky urban settlement, 188663, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0003-1672-4583> E-mail: ilushonoksem@gmail.com

Nadezhda Yu. Rogovskaya – Researcher, Scientific Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology of the Federal Medical Biological Agency of Russia, Leningrad region, Kuzmolovsky urban settlement, 188663, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0002-7054-6100> E-mail: nadin-r@mail.ru

Alexey S. Gladchuk – Candidate of Technical Sciences, Senior Researcher, Scientific Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology of the Federal Medical Biological Agency of Russia, Leningrad region, Kuzmolovsky urban settlement, 188663, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0002-4411-2069> E-mail: aleglad24@gmail.com

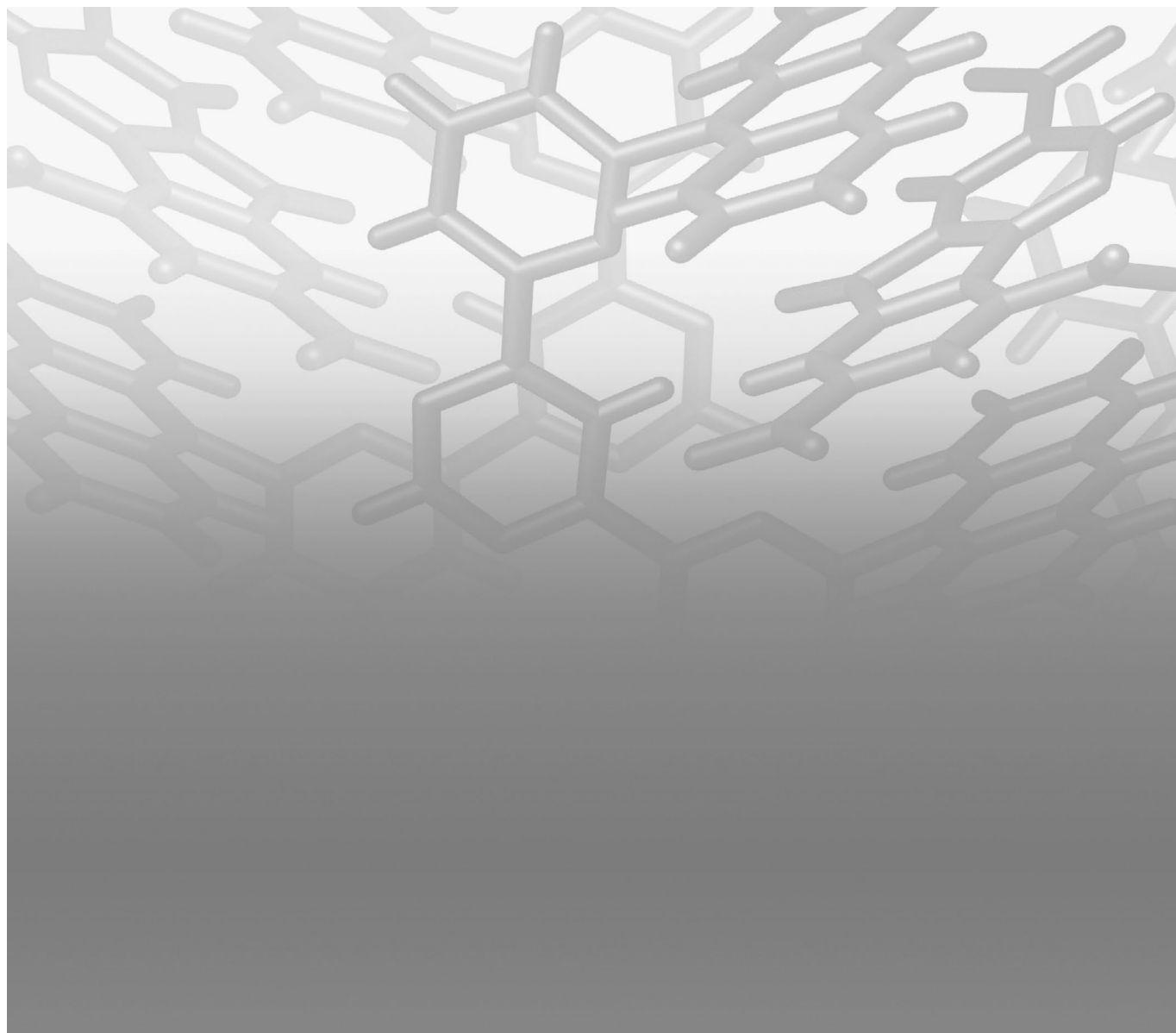
Yaroslav A. Sharapov – Laboratory Assistant, Scientific Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology of the Federal Medical Biological Agency of Russia, Leningrad region, Kuzmolovsky urban settlement, 188663, Russian Federation, E-mail: yarostloff@yandex.ru

Ilya E. Perevoznikov – Junior Researcher, Scientific Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology of the Federal Medical Biological Agency of Russia, Leningrad region, Kuzmolovsky urban settlement, 188663, Russian Federation, <https://orcid.org/0009-0000-0190-6558> E-mail: ilyaperevoznikov@gmail.com

Petr P. Beltyukov – Candidate of Medical Sciences, Leading Researcher, Scientific Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology of the Federal Medical Biological Agency of Russia, Leningrad region, Kuzmolovsky urban settlement, 188663, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0003-4050-6172> E-mail: beltyukov@gpech.ru

Ekaterina P. Podolskaya – Doctor of Technical Sciences, Leading Researcher, Institute for Analytical Instrumentation of the RAS, Saint Petersburg, 198095, Russian Federation, E-mail: ek.podolskaya@gmail.com

Vladimir N. Babakov – Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory, Scientific Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology of the Federal Medical Biological Agency of Russia, Leningrad region, Kuzmolovsky urban settlement, 188663, Russian Federation, E-mail: babakov@gpech.ru



К статье С.К. Ильющонок и соавт.
To the article by Semyon K. Ilyushonok et al.

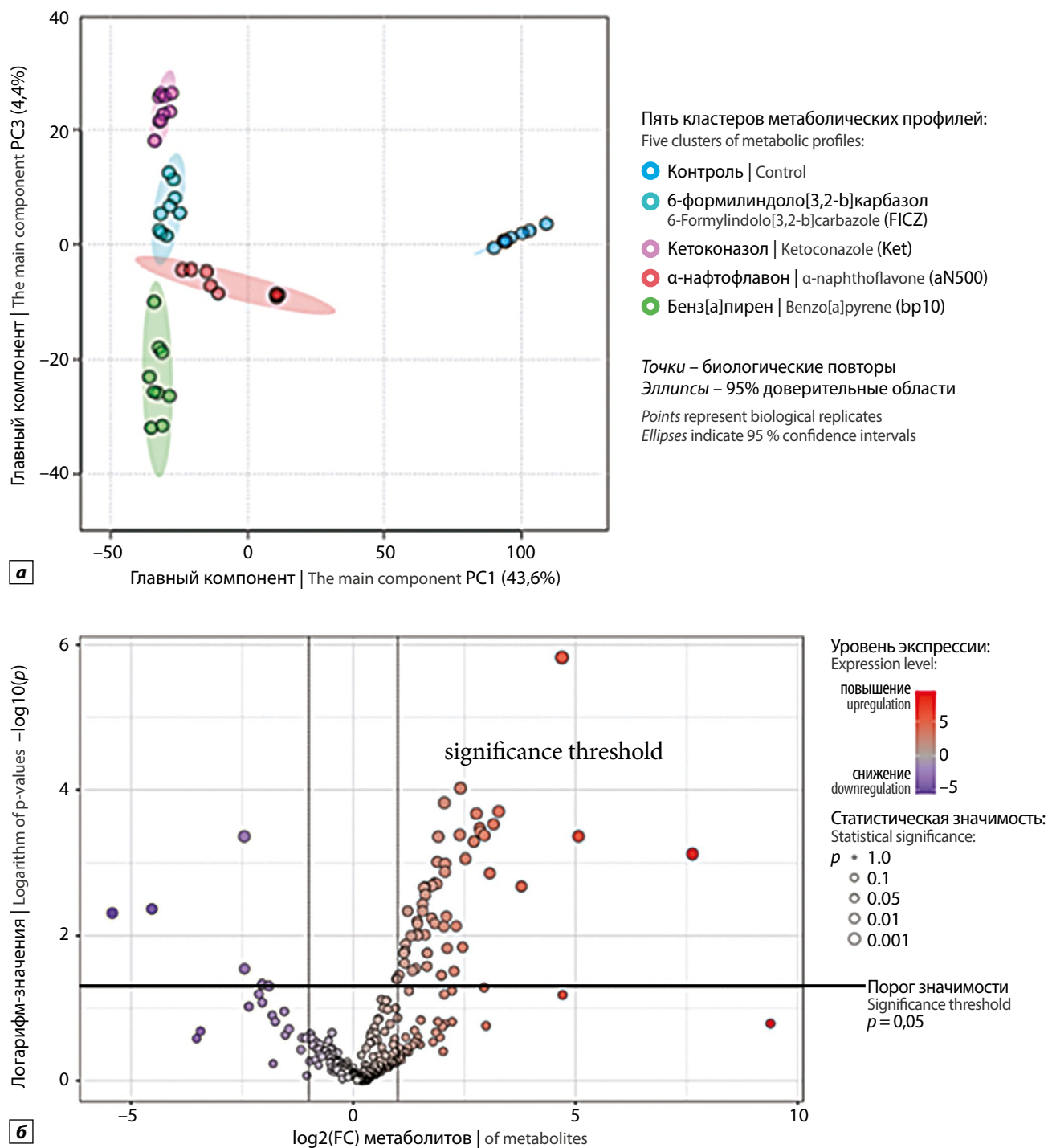


Рис. 1. Статистический анализ всех обнаруженных сигналов: а – двумерный график оценок PLS-DA; б – вулканический график.
Fig. 1. Statistical analysis of all detected signals: а – Two-dimensional PLS-DA score plot; б – Volcano plot.

К статье С.К. Ильющонок и соавт.
To the article by Semyon K. Ilyushonok et al.

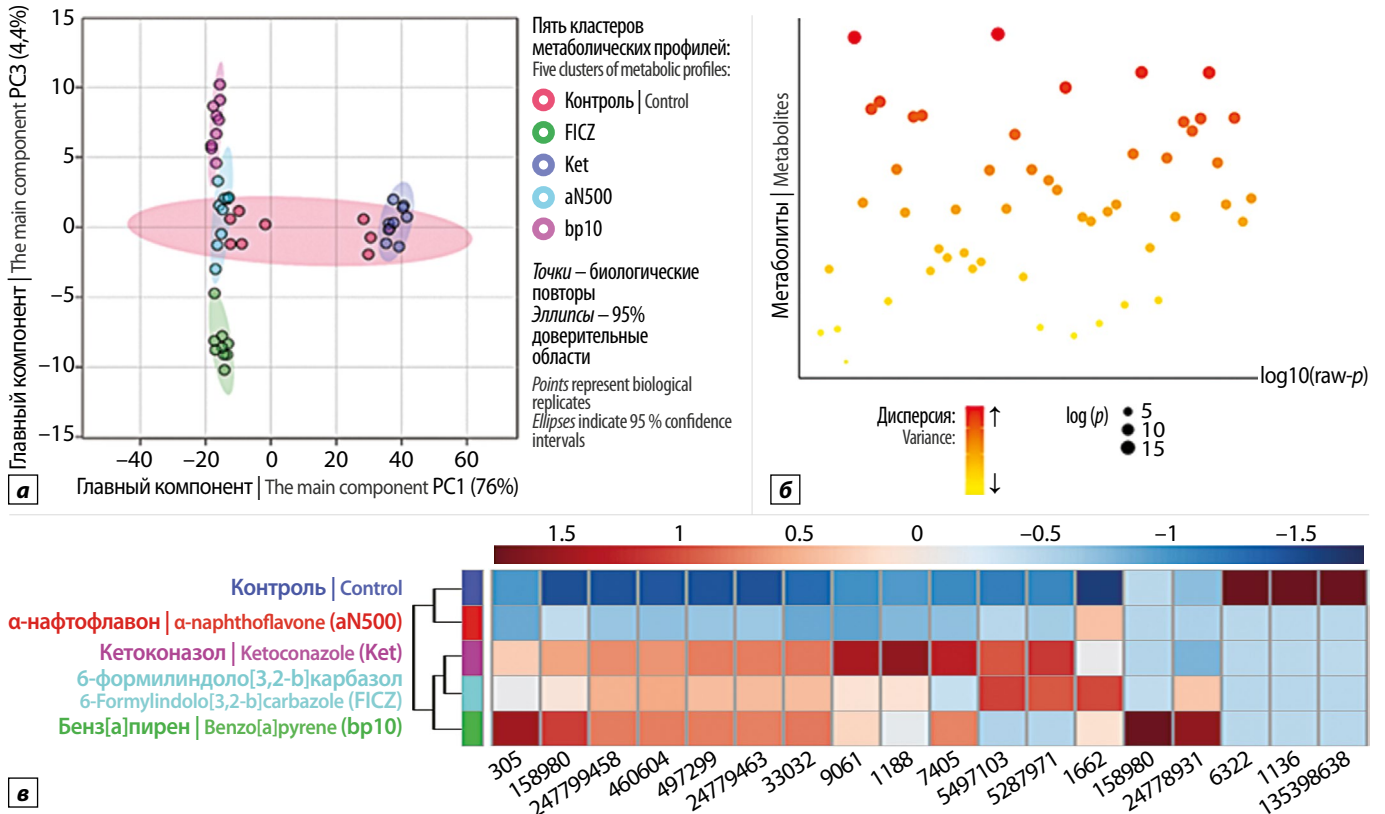


Рис. 2. Результаты поиска подмножества метаболитов, отвечающих за дисперсию группы aN500: а – PCA-анализ; б – ANOVA сравнение групп bp10 и aN500; в – тепловая карта результатов дисперсионного анализа относительных количественных профилей метаболитов в среде, полученных методом ЖХ/МС, по сравнению с контрольной группой (без добавления Б[а]П); высокие концентрации метаболитов отмечены красным цветом, низкие – синим; $p < 0,001$.

Fig. 2. Results of the search for a subset of metabolites responsible for the variance of the aN500 group: а – PCA analysis; б – ANOVA comparison of bp10 and aN500 groups; в – Heatmap of the ANOVA results for relative quantitative profiles of metabolites in the culture medium obtained by LC-MS, compared to the control group (without B[a]P addition); high metabolite concentrations are shown in red, low concentrations – in blue; $p < 0.001$.

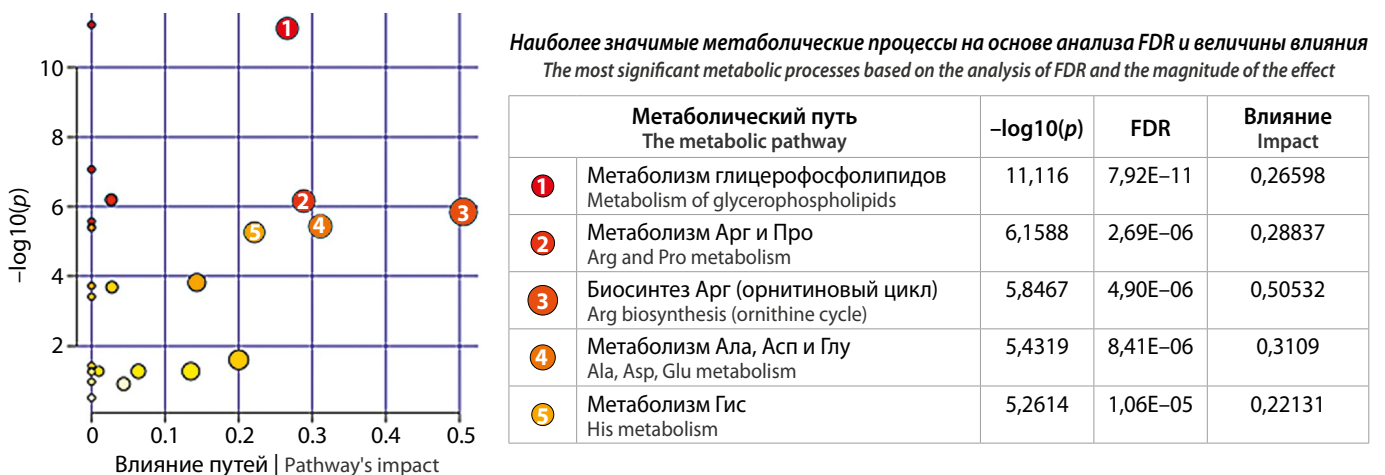


Рис. 3. Анализ влияния на метаболические пути (размер кругов соответствует степени влияния на метаболический путь; цветовой градиент от белого к красному отражает скорректированные значения значимости (FDR)).

Fig. 3. Analysis of the effect on metabolic pathways (the size of the circles corresponds to the degree of influence on the metabolic pathway; the color gradient from white to red reflects the adjusted significance values (FDR)).