УДК 577.112.387:616-006.6-07-08 doi:10.25298/2221-8785-2024-22-6-565-571

ОПТИМИЗАЦИЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТАБОЛИТОВ ФЕНИЛАЛАНИНА И СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В МОЧЕ МЕТОДОМ ВЭЖХ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ТАРГЕТНОЙ МЕТАБОЛОМИКЕ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ПАЦИЕНТОВ

Е. М. Дорошенко[1], Ж. В. Мотылевич[2]

[1]Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

[2]Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, Гродно, Беларусь

Цель. Отработка метода определения в моче соединений, характеризующих метаболизм ароматических аминокислот, потенциально диагностически значимых в оценке активности злокачественного роста.

Методы исследования. Высокоэффективная жидкостная хроматография.

Результаты. Создана оригинальная модификация метода определения продуктов превращения фенилаланина, позволяющая оценивать их уровни в моче.

Ключевые слова: *аминокислоты, фенилаланин, глутамин, фенилацетат, фенилацетилглутамин, злокачественные новообразования, диагностика, маркеры, хроматография.*

Для цитирования: *Дорошенко, Е. М. Оптимизация определения метаболитов фенилаланина и свободных аминокислот в моче методом ВЭЖХ для использования в таргетной метаболомике у онкологических пациентов / Е. М. Дорошенко, Ж. В. Мотылевич // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2024. Т. 22, № 6. С. 565-571. https://doi.org/10.25298/2221-8785-2024-22-6-565-571.*

Введение

Злокачественные новообразования – по-прежнему одна из основных причин смертности в мире и, по прогнозам, к 2030 г. прогнозируется 22 млн новых случаев рака и 13 млн смертей, связанных с этим заболеванием, ежегодно [1]. Детальное изучение функционирования биологических структур позволило добиться более глубокого понимания механизмов развития рака. Однако диагностическая точность многих общепринятых тестов остается по-прежнему низкой, выполнение тестов требует забора крови или образцов ткани, поэтому исследователи сталкиваются с необходимостью разработки новых диагностических подходов, способных выявлять рак на ранней стадии, которая излечима. Эффективные скрининговые тесты должны быть неинвазивными, быстро поддающимися количественной оценке, легкодоступными, воспроизводимыми, надежными. Липидомика и метаболомика в этом смысле – наиболее перспективные направления исследований [2-6]. В 2021 г. исполнилось 100 лет открытия метаболического эффекта Варбурга, который в настоящее время приобрел новое звучание. Отто Варбург полагал, что изменения в обмене веществ – фундаментальная причина рака. Изменение метаболического ландшафта было зафиксировано при многих видах рака и его метастазировании [7]. Поэтому анализ факторов, отражающих измененный метаболизм при злокачественном росте, особо актуален, в том числе для контроля эффективности лечения и выявления рецидивов.

В настоящее время имеются лишь отдельные данные о пуле ароматических аминокислот крови при разных стадиях злокачественных новообразований. Эти данные косвенно свидетельствуют о возможности использования уровней ароматических аминокислот или их отдельных метаболитов в качестве диагностических маркеров злокачественного роста. В то же время эти результаты не позволяют сделать вывод о диагностической информативности уровней данных соединений в крови при злокачественном росте. Кроме того, забор крови – инвазивный метод, что ограничивает использование таких тестов для ранней диагностики. Поэтому была сделана попытка найти неинвазивный метод, основанный на изменении метаболического ландшафта при злокачественном росте.

Нами получены предварительные результаты, свидетельствующие о перспективности применения аминокислотного анализа для характеристики состояния метаболического гомеостаза при некоторых видах злокачественных опухолей [8, 9]. Полученные данные позволяют предполагать, что уровни ароматических аминокислот или метаболитов побочных путей их превращений могут отражать наличие и активность роста злокачественных клеток. Однако сравнительный анализ пула метаболитов ароматических аминокислот в норме и при разных стадиях и локализациях злокачественного роста, а также характеристика изменений пула метаболитов ароматических аминокислот в динамике течения опухолевого процесса остаются невыясненными. Это не позволяет использовать результаты исследования пула данных этих метаболитов с диагностической целью.

Изучение взаимосвязи между важнейшими метаболитами обмена фенилаланина и другими компонентами пула свободных аминокислот до сих пор не проводилось, хотя это может позволить повысить эффективность диагностики злокачественных новообразований.

Фенилаланин и продукты его превращений давно исследовались в качестве потенциальных диагностически значимых соединений в сыворотке крови при злокачественном росте; существуют надежные методы его определения, в том числе разработанный нами вариант аминокислотного анализа [10]. Фенилаланин играет значительную роль в стабилизации белковых структур, является составной частью функциональных центров ферментов и белковых молекул [11]. Превращение фенилаланина в тирозин в организме в большей степени необходимо для удаления избытка фенилаланина, а не для восстановления запасов тирозина, так как тирозин обычно в достаточном количестве поступает с белками пищи [11]. Эта реакция гидроксилирования катализируется фенилаланингидроксилазой, которая в качестве кофермента содержит тетрагидробиоптерин. Блокирование этой реакции приводит к развитию фенилкетонурии. При этом в организме происходит накопление фенилаланина и его метаболитов (фенилпируват, фенилактат, фенилацетат, о-гидроксифенилацетат, фенилацетилглутамин), избыточное количество некоторых их них отрицательно сказывается на развитии нервной системы.

Фенилаланин – предшественник циннамата – одного из основных предшественников фенилпропаноидов. Фенилаланин может метаболизироваться в один из биогенных аминов – фенилэтиламин, продуктом катаболизма которого является фенилацетат. Известно, что фенилуксусная кислота имеет высокую степень проницаемости через гематоэнцефалический барьер, причем ее концентрация в мозге крыс регулируется не только за счет образования конъюгатов, но также и за счет транспорта из мозга [12]. В плазме крови крыс 90% от всего содержания фенилуксусной кислоты находится в связанном состоянии в виде конъюгата с глутатионом, и только 10% определяется в свободном виде [12]. Большое количество зарубежных публикаций, посвященных биологической активности фенилуксусной кислоты, связано с ее способностью подавлять рост опухолевых клеток разного происхождения без проявлений общей токсичности. Цитотоксическое действие фенилуксусной кислоты связано с подавлением генной экспрессии злокачественных клеток, независимым от фазы клеточного цикла. Хотя попытки экспериментального применения фенилацетата в качестве средства противоопухолевого средства показали противоречивые результаты [8], следует отметить, что фенилацетат первоначально был идентифицирован в моче онкологических пациентов [13,14]. Таким образом, исследование пула метаболитов фенилаланина в моче может быть актуальным с точки зрения потенциального диагностического использования их уровней в ранней диагностике злокачественных новообразований. Определение фенилацетата в моче связано с методическими трудностями, так как требует либо газохроматографического определения, при котором пробоподготовка обязательно включает этап экстракции и сложно определять малолетучий фенилацетилглутамин, либо дорогостоящих масс-селективных методов детектирования [15].

Материал и методы

В качестве контрольной группы обследованы 28 практически здоровых лиц (по данным доступной медицинской документации), 14 мужчин и 14 женщин. Контрольная группа включила пациентов в возрасте 44 (40-50) лет. Пациенты имели преимущественно нормальную массу тела – индекс массы тела равнялся 22,1 (20,0-24,3) кг/м^2 в группе. Значимые гендерные различия по этому показателю отсутствовали.

Однократно утром натощак производился забор мочи.

Сбор мочи проводился после тщательного туалета наружных половых органов. Моча собиралась в сухую, чистую, хорошо отмытую от чистящих и дезинфицирующих средств посуду. Использовался пластиковый сосуд с широким горлышком и с крышкой (пластиковые стаканчики с крышками). Моча, собранная для анализа, хранилась не более 1 часа при положительной температуре, длительное хранение проб – при -75°С. Порцию мочи для исследования замораживали в пробирках Эппендорфа.

Все обследуемые характеризовались нормальными значениями общеклинических, клинико-лабораторных и стандартных биохимических тестов.

Для осаждения белков образец смешивали с 1 М раствором хлорной кислоты, содержащим 0,2 мМ норвалина (nVal, внутренний стандарт), а также 40 мг/л ЭДТА, 40 мг/л Na2S2O5 и 1 мкМ ванилиновой кислоты, в соотношении 1:1. После тщательного перемешивания пробы центрифугировали при 4°С в течение 15 минут при 16000 g, после чего супернатант немедленно отсасывали и хранили до исследования при -18°С не более 15 суток. После размораживания экстракты повторно центрифугировали, при выпадении осадка супернатант отделяли. Полученные хлорнокислые экстракты использовали для анализа.

При отработке методов определения использовался прибор ВЭЖХ Agilent 1200 в конфигурации, включающей 4-канальную систему подачи растворителя с вакуумным дегазатором, термостатируемый автосамплер (ALS), термостат колонок, детектор флуоресценции и диодно-матричный детектор. В опытах использовались реактивы для приготовления подвижных фаз квалификации не ниже хч, стандарты определяемых соединений Aldrich, трижды дистиллированная вода. При пробоподготовке использовалась центрифуга Biofuge Primo R+ с охлаждаемым ротором.

Прием данных и обработка хроматограмм проводились с помощью программы Agilent ChemStation C01.03 с ручной коррекцией базовой линии, в режиме расчета по внешнему (для метаболитов фенилаланина) или внутреннему стандарту с использованием одноуровневой калибровки.

Для всех исследованных показателей определяли базовые параметры описательной ста-

тистики, а также оценивали отклонение распределения значений показателя в выборке от нормального с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Для всех показателей группа считалась однородной.

Использованные методы анализа данных реализованы с помощью пакета программ Statistica 10.0 (SN AXAR207F394425FA-Q).

Результаты и обсуждение

Отработка метода определения метаболитов фенилаланина осуществлялась с использованием безэкстракционного метода пробоподготовки, обращенно-фазной ВЭЖХ с градиентным элюированием и детектированием по поглощению в УФ-области. Такой подход использован с целью избежать внесения неизбежных при экстракции ошибок, связанных с переменным соотношением фаз, ввиду относительно низкой летучести фенилацетилглутамина. Супернатанты после центрифугирования вводили в колонку.

Использовалась колонка Zorbax SB C18 3,5 мкм, 2,1×150 мм с предколонкой 2,1×12,5 мм с тем же сорбентом, 5 мкм. Подбор условий градиентного элюирования (фосфатные и ацетатные буферы с pH от 3 до 5,5) позволил получить приемлемое разделение фенилацетата (PAC) и фенилацетил-L-глутамина (PAG) в моче при следующих условиях: подвижная фаза А – 0,107 М Na-фосфатный буфер, pH 3,25; подвижная фаза В – ацетонитрил:вода, 70:30 (об./об.). Градиент: линейный от 0 до 30% В в течение 35 минут, температура колонки 35°С. Скорость потока 0,2 мл/мин. Детектирование с помощью диодно-матричного детектора с полумикроячейкой, длина волны 214 нм, полоса пропускания 4 нм; длина волны сравнения 360 нм, полоса пропускания 100 нм. Для определения фенилацетата лучшее разрешение его пика от соседних пиков неидентифицированных соединений была выбрана длина волны 204 нм (полоса пропускания 4 нм), длина волны сравнения 296 нм (полоса пропускания 10 нм), что более точно соответствует спектру поглощения фенилацетата при данных условиях.

Подбором профиля градиента удалось получить удовлетворительное разрешение пиков фенилацетата и фенилацетилглутамина в моче. Спектр поглощения на вершинах пиков в моче не отличался от спектра поглощения стандарта (по максимуму поглощения и ширине полосы). Дополнительных пиков поглощения на вершинах пиков не регистрировалось, что указывает на достаточную степень спектральной чистоты пика. Хроматограммы стандартов и типичной пробы мочи приведены на рисунке 1.

Тестирование метода на образцах мочи человека показало удовлетворительное разрешение для фенилацетилглутамина и фенилацетата. Для их определения основным следует считать метод ВЭЖХ в связи с низкой летучестью и относительной неустойчивостью первого соединения при высоких температурах, а также достаточным разрешением пиков обоих соединений на хроматограммах.

Полученные нами уровни исследуемых соединений в моче в целом соответствуют литературным данным, составлявшим для фенилацетилглутамина от 384 до 855 мкМ [16-20], фенилацетата – от 0,46 до 4,16 мкМ [17, 18].

Обнаруженные концентрации фенилацетата в моче (табл. 1) соответствуют значениям, сообщавшимся для человека в норме [17, 18, 20]. Данный показатель обладает достаточно высокой вариабельностью в норме, однако делались попытки его использования в диагностических целях при депрессии [19], расстройствах пищевого поведения. В обеих работах фенилацетат расценивался как производное фенилэтиламина – минорного медиатора в ЦНС [19], а не продукта декарбоксилирования фенилпирувата. Имеются сообщения о более высоких уровнях фенилацетата в моче практически здоровых людей (4,16 мкмоль/ммоль креатинина), а также о более низких (3-1,9 мкМ) [6, 16].

Таблица 1. – Содержание фенилацетата и фенилацетил-L-глутамина в моче обследованных контрольной группы, женщины, мкМ; n=14
Table 1. – Content of phenylacetate and phenylacetyl-L-glutamine in the urine of subjects in the control group, women, μM; n=14

	Среднее ± средняя ошибка	Медиана (нижняя – верхняя квартиль)
PAG	806,6562±106,6846	826,1738 (555,5978-1145,512)
PAC	10,141±2,528	6,205 (4,174-18,84)

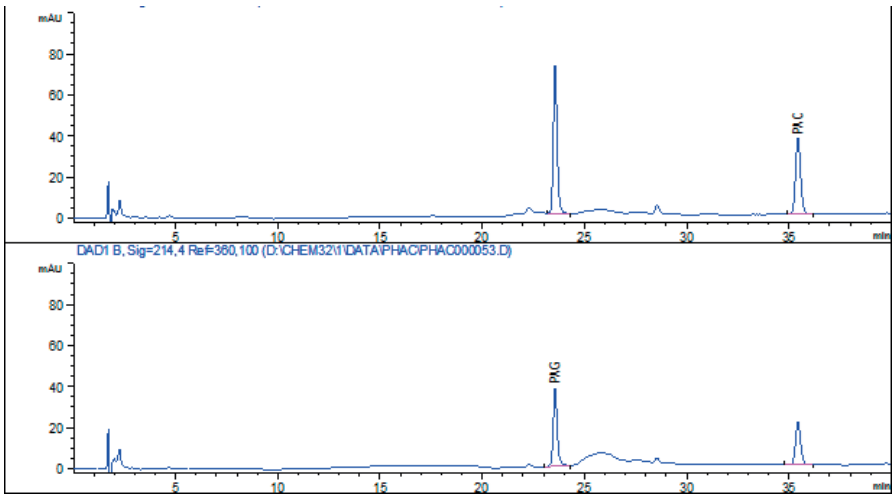
Распределение индивидуальных значений в исследуемой группе для уровней фенилацетилглутамина, фенилацетата не отличалось от нормального (тесты Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллифорса и Шапиро-Уилка, рис. 2-3)

Содержание исследуемых соединений в моче обследуемых лиц мужского пола не имело статистически значимых различий от таковых у обследуемых женского пола (табл. 2). Это же касается и общей вариабельности концентраций. Однако у мужчин распределение уровней фенилацетата было нормальным, а фенилацетилглутамина – асимметричным с большей плотностью низких значений (рис. 4-5).

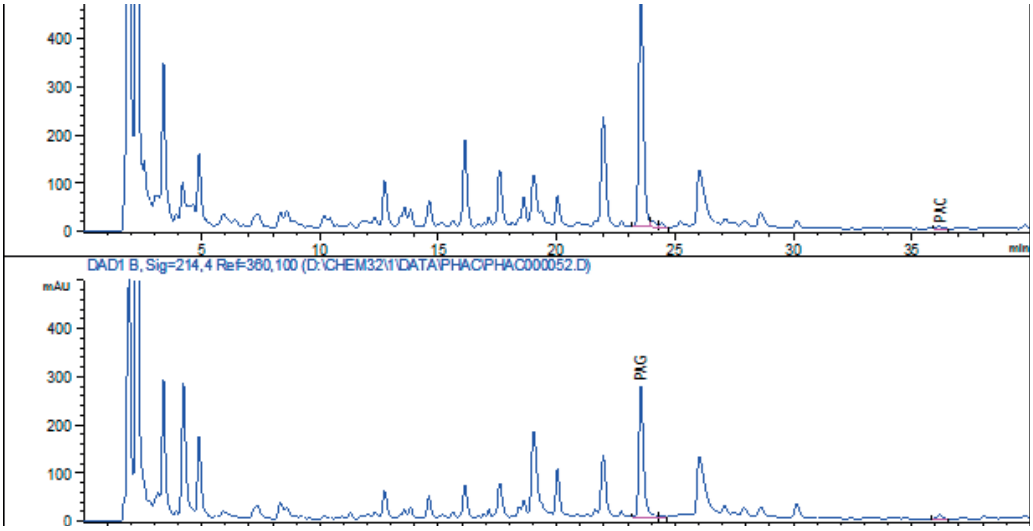
Таблица 2. – Содержание фенилацетата и фенилацетил-L-глутамина в моче обследованных контрольной группы, мужчины, мкМ; n=14
Table 2. – Phenylacetate and phenylacetyl-L-glutamine content in the urine of subjects in the control group, men, μM; n=14

	Среднее ± средняя ошибка	Медиана (нижняя – верхняя квартиль)
PAG	762,4545±174,0396	531,6585 (203,1304-1289,600)
PAC	18,1564±3,2656	13,690 (10,127-26,414)

A



B



C

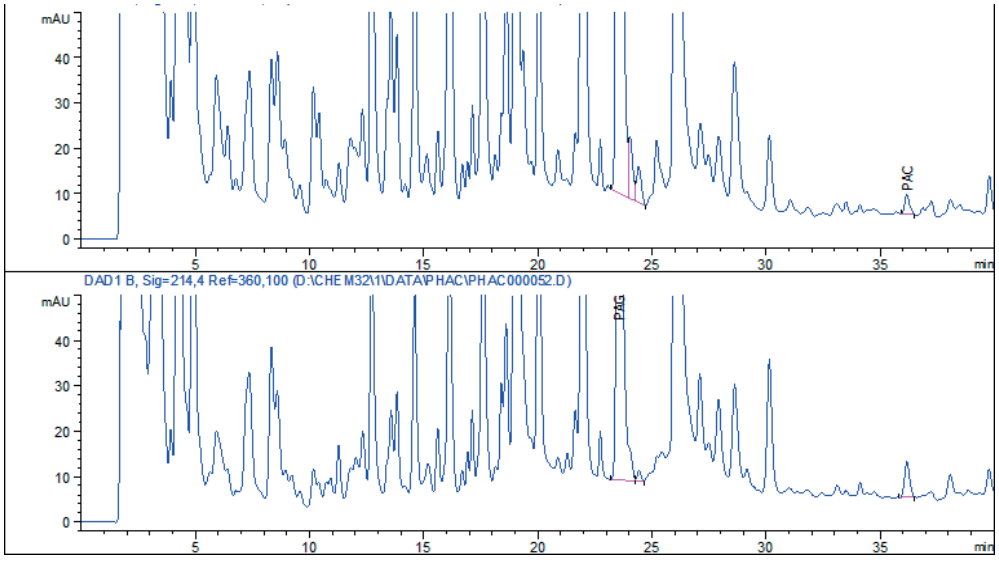


Рисунок 1. – A: хроматограмма 200 мкМ раствора PAG и PAC; B: типичная хроматограмма PAG и PAC в моче человека; C: та же хроматограмма в другом масштабе, позволяющем видеть пик PAC. На всех изображениях верхний сигнал – поглощение при 204 нм, нижний – при 214 нм (детали в тексте)

Figure 1. – A: chromatogram of 200 μM solution of PAG and PAC; B: typical chromatogram of PAG and PAC in human urine; C: the same chromatogram at a different scale allowing the PAC peak to be seen. In all images, the upper signal is the absorption at 204 nm, the lower one – at 214 nm (details in the text)

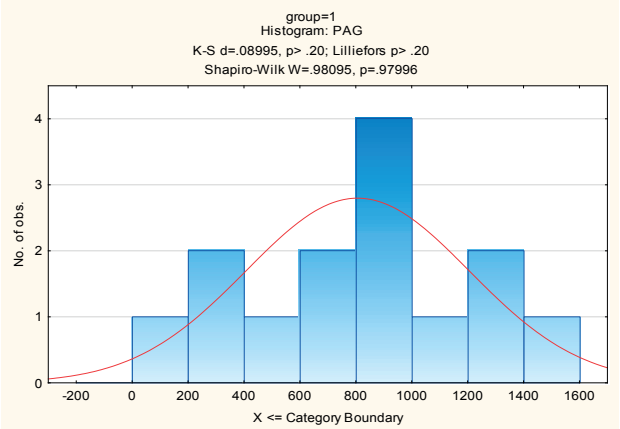


Рисунок 2. – Распределение индивидуальных значений уровня фенилацетил-глутамина в моче у женщин контрольной группы, мкМ

Figure 2. – Distribution of individual values of phenylacetylglutamine level in urine in women of the control group, μM

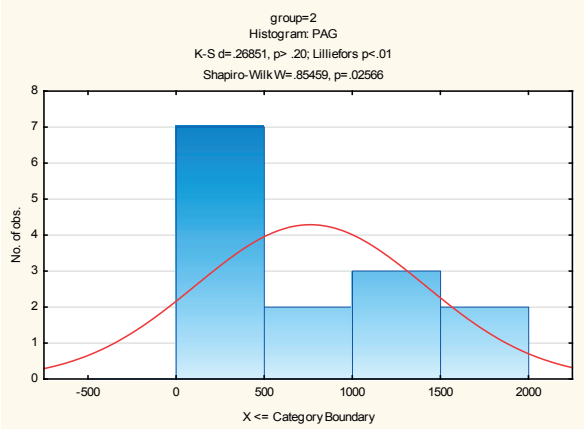


Рисунок 4. – Распределение индивидуальных значений уровня фенилацетил-глутамина в моче у мужчин контрольной группы, мкМ

Figure 4. – Distribution of individual values of phenylacetylglutamine level in urine in men of the control group, μM

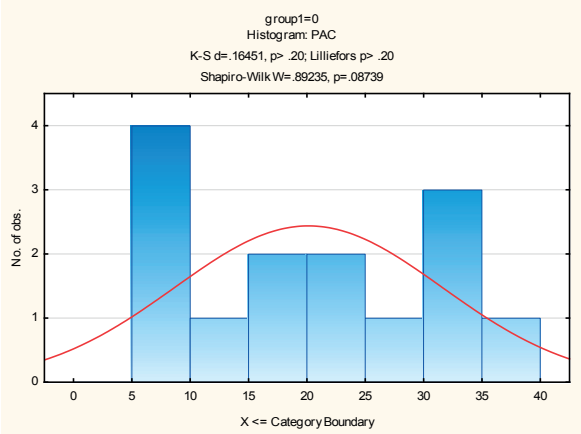


Рисунок 3. – Распределение индивидуальных значений уровня фенилацетата в моче у женщин контрольной группы, мкМ

Figure 3. – Distribution of individual values of phenylacetate levels in urine in women of the control group, μM

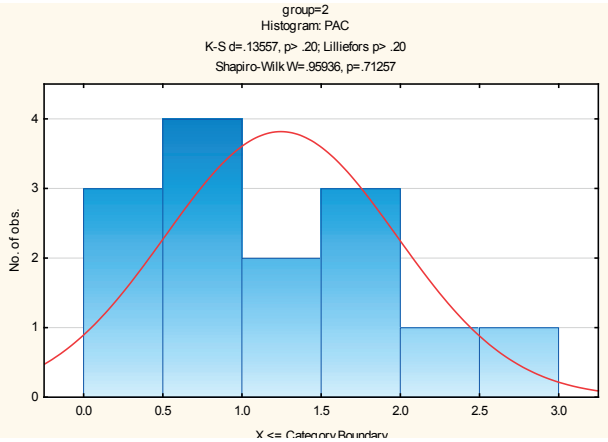


Рисунок 5. – Распределение индивидуальных значений уровня фенилацетата в моче у мужчин контрольной группы, мкМ

Figure 5. – Distribution of individual values of phenylacetate levels in urine in men of the control group, μM

Заключение

Разработан метод, позволяющий дать количественную характеристику содержания фенилацетата и фенилацетил-L-глутамина в моче человека. Такие данные, особенно примененные совместно с данными анализа свободных аминокислот, могут послужить основой для разработки синтетических показателей (индексов), обладающих более высокой диагностической информативностью по отношению к концентрациям отдельных соединений.

Разработанный метод определения фенилацетилглутамина и фенилацетата отличается простой процедурой пробоподготовки, не содержащей источников случайных ошибок, связанных с экстракцией, упариванием, перерастворением.

Разрешение метода достигнуто тщательным подбором условий хроматографического разделения и детектирования, которые и обеспечивают достоверность получаемых результатов.

Определенные нами концентрации фенилацетилглутамина и фенилацетата в моче у практически здоровых лиц соответствуют литературным данным для человека в норме.

Литература

1. 1. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, [et al.] // CA Cancer J. Clin. – 2018. – Vol. 68, iss. 6. – P. 394-424. – doi: 10.3322/caac.21492.
2. 2. Circulating metabolites serve as diagnostic biomarkers for HER2-positive breast cancer and have predictive value for trastuzumab therapy outcomes / C. Mao, M. Wang, L. Li, J. H. Tang // J. Clin. Lab. Anal. – 2022. – Vol. 36, iss. 2. – doi: 10.1002/jda.24212.
3. 3. How previous treatment changes the metabolomic profile in patients with metastatic breast cancer / J. Nees, S. Schafferer, B. Yang [et al.] // Arch Cynecol Obestet. – 2022. – Vol. 306, iss. 6. – P. 2115-2122. – doi: 10.1007/s00404-022-06558-5.
4. 4. Plasma metabolites as possible biomarkers for diagnosis of breast cancer / J. Park, Y. Shin, T. Hyun [et al.] // PloS ONE. – 2019. – Vol. 14, iss. 12. – P. e0225129. – doi: 10.1371/journal.pone.0225129.
5. 5. Metabolomics of breast cancer: a Review / R. Subramani, S. Poudel, K. D. Smith [et al.] // Metabolites. – 2022. – Vol. 12, iss. 7 – P. 643. – doi: 10.3390/metabo12070643.
6. 6. Cancer metabolites: promising biomarkers for cancer liquid biopsy / W. Wang, Z. Rong, G. Wang [et al.] // Biomarker Research. – 2023. – Vol. 11, iss. 6. – P. 66. – doi: 10.1186/s40364-023-00507-3.
7. 7. Lipidomics and metabolomics as potential biomarkers for breast cancer progression / A. Carmona, S. Mitri, T. A. James, J. M. Ubellacker // NPJ Metab Health Dis. – 2024. – Vol. 2. – Art. 24. – doi: 10.1038/s44324-024-00027-0.
8. 8. Результаты исследования противоопухолевой активности нового лекарственного препарата «Деглутам» / А. В. Каравай, И. О. Леднева, М. Г. Величко [и др.] // Шестой съезд фармацевтов Республики Беларусь : тез. докл., Минск, 21-22 окт. 1999 г. / редсовет: Г. В. Годовальников [и др.]. – Минск, 1999. – С. 132. – edn: TEZHLR.
9. 9. Мотылевич, Ж. В. Перспектива использования ароматических аминокислот и их производных в качестве диагностических маркеров при фиброаденоме молочной железы / Ж. В. Мотылевич, Е. М. Дорошенко // Актуальные проблемы медицины : сб. материалов итоговой науч.-практ. конф, Гродно, 28-29 янв. 2021 г. / редкол.: Е. Н. Кроткова, С. Б. Вольф. М. Н. Курбат. – Гродно, 2021. – С. 589-591. – edn: ZTOSYI.
10. 10. Дорошенко, Е. М. Структура пула свободных аминокислот и их производных плазмы крови у пациентов с ишемической болезнью сердца и проявлениями хронической сердечной недостаточности / Е. М. Дорошенко, В. А. Снежицкий, В. В. Лелевич // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2017. – Т. 15, № 5. – С. 551-556. – doi: 10.25298/2221-8785-2017-15-5-551-556. – edn: YKYYNI.
11. 11. Nelson, D. L. Lehninger Principles of Biochemistry / D. L. Nelson, M. M. Cox. – 8th ed. – San Francisco : W.H. Freeman & Company, 2023. – 1248 p.
12. 12. Dyck, L. E. Conjugation of phenylacetic acid and *m*- and *p*-hydroxyphenylacetic acids in the rat striatum / L. E. Dyck, D. A. Durden, A. A. Boulton // Life Sci. – 1993. – Vol. 53, iss. 11. – P. 901-909. – doi: 10.1016/0024-3205(93)90442-6.
13. 13. Burzynski, S. R. Antineoplastons: biochemical defense against cancer / S. R. Burzynski // Physiol. Chem. Phys. – 1976. – Vol. 8, iss. 3. – P. 275-279.
14. 14. Burzynski, S. R. The present state of antineoplaston research (1) / S. R. Burzynski // Integr. Cancer Ther. – 2004. – Vol. 3, iss. 1. – P. 47-58. – doi: 10.1177/1534735403261964.
15. 15. Combined HPLC, NMR spectroscopy, and ion-trap mass spectrometry with application to the detection and characterization of xenobiotic and endogenous metabolites in human urine / J. P. Shockcor, S. E. Unger, I. D. Wilson [et al.] // Anal. Chem. – 1996. – Vol. 68, iss. 24. – P. 4431-4435. – doi: 10.1021/ac9606463.
16. 16. Highly sensitive GC/MS/MS method for quantitation of amino and nonamino organic acids / H. F. Kvitvang, T. Andreassen, T. Adam [et al.] // Anal. Chem. – 2011. – Vol. 83, iss. 7. – P. 2705-2711. – doi: 10.1021/ac103245b.
17. 17. Profiling of urinary amino-carboxylic metabolites by in-situ heptafluorobutyl chloroformate mediated sample preparation and gas chromatography-mass spectrometry / P. Husek, Z. Svagera, D. Hanzlikova [et al.] // J Chromatogr. A. – 2016. – Vol. 1443. – P. 211-232. – doi: 10.1016/j.chroma.2016.03.019.
18. 18. Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects / L. Y. Rios, M. P. Gonthier, C. Remesy [et al.] // Am. J. Clin. Nutr. – 2003. – Vol. 77, iss. 4. – P. 912-918. – doi: 10.1093/ajcn/77.4.912.
19. 19. Urinary phenyl acetate: a diagnostic test for depression? / H. C. Sabelli, J. Fawcett, F. Gusovsky [et al.] // Science. – 1983. – Vol. 220, iss. 4602. – P. 1187-1188. – doi: 10.1126/science.6857245.
20. 20. The human urine metabolite / S. Bouarta, F. Aziat, R. Mandal [et al] // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, iss. 9. – P. e73076. – doi: 10.1371/journal.pone.0073076.

References

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492.
2. Mao C, Wang M, Li L, Tang JH. Circulating metabolites serve as diagnostic biomarkers for HER2-positive breast cancer and have predictive value for trastuzumab therapy outcomes. *J Clin Lab Anal*. 2022;36(2):e24212. doi: 10.1002/jcla.24212.
3. Nees J, Schafferer S, Yuan B, Tang Q, Scheffler M, Hartkopf A, Golatta M, Schneeweiß A, Burwinkel B, Wallwiener M. How previous treatment changes the metabolomic profile in patients with metastatic breast cancer. *Arch Gynecol Obstet*. 2022;306(6):2115-2122. doi: 10.1007/s00404-022-06558-5.
4. Park J, Shin Y, Kim TH, Kim DH, Lee A. Plasma metabolites as possible biomarkers for diagnosis of breast cancer. *PLoS One.* 2019;14(12):e0225129. doi: 10.1371/journal.pone.0225129.
5. Subramani R, Poudel S, Smith KD, Estrada A, Lakshmanaswamy R. Metabolomics of Breast Cancer: A Review. *Metabolites*. 2022;12(7):643. doi: 10.3390/metabo12070643.
6. Wang W, Rong Z, Wang G, Hou Y, Yang F, Qiu M. Cancer metabolites: promising biomarkers for cancer liquid biopsy. *Biomark Res.* 2023;11(1):66. doi: 10.1186/s40364-023-00507-3.
7. Carmona A, Mitri, S. James TA, Ubellacker JM. Lipidomics and metabolomics as potential biomarkers for breast cancer progression. *NPJ Metab Health Dis*. 2024;2:24. doi: 10.1038/s44324-024-00027-0.
8. Karavai AV, Ledneva IO, Velichko IM, Nefyodov LI, Borodinskii AN, Gorenshtein BI, Karayedora LM, Smirnov VYu, Doroshenko YeM, Uglyanitsa KN, Prokopchik NI, Valiuk TCh, Zhavrid EA, Istomin YuP, Aleksandrova EH, Kurbat NM. Rezultaty issledovanija protivoopuholevoj aktivnosti novogo lekarstvennogo preparata “Deglutam”. In: Godovalnikov GV, Gorenkov VF, Grinkova LM, Gurina NS, Ishhenko V I, Kurchenkov AS, Lopatina KS, Stelmah VA, Carenkov VM, Shalaeva MG, Sherjakov AA, editors. *Shestoj sezd farmacevtov Respubliki Belarus*. Tezisy dokladov; 1999 Oct 21-22; Minsk. Minsk; 1999. p. 132. edn: TEZHLR. (Russian).
9. Motylevich ZhV, Doroshenko YeM. Perspektiva ispolzovanija aromaticheskih aminokislot i ih proizvodnyh v kachestve diagnosticheskih markerov pri fibroadenome molochnoj zhelezy. In: Krotkova EN, Volf SB, Kurbat MN, editors. *Aktualnye problemy mediciny*. Sbornik materialov itogovoj nauchno-prakticheskoj konferencii; 2021 Jan 28-29; Grodno. Grodno: GrSMU; 2021. p. 589-591. edn: ZTOSYI. (Russian).
10. Doroshenko YeM, Snezhitsky VA, Lelevich VV. Structure of the pool of free amino acids and their derivatives in plasma of patients with ishemic heart disease and chronic cardiac insufficiency. *Journal of the Grodno State Medical University.* 2017;15(5):551-556. doi: 10.25298/2221-8785-2017-15-5-551-556. edn: YKYYNI. (Russian).
11. Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. 8th ed. San Francisco: W.H. Freeman & Company; 2023. 1248 p.
12. Dyck LE, Durden DA, Boulton AA. Conjugation of phenylacetic acid and m- and p-hydroxyphenylacetic acids in the rat striatum. *Life Sci.* 1993;53(11):901-9. doi: 10.1016/0024-3205(93)90442-6.
13. Burzynski SR. Antineoplastons: biochemical defense against cancer. *Physiol Chem Phys*. 1976;8(3):275-9.
14. Burzynski SR. The present state of antineoplaston research (1). *Integr Cancer Ther.* 2004;3(1):47-58. doi:

10.1177/1534735403261964.
15. Shockcor JP, Unger SE, Wilson ID, Foxall PJ, Nicholson JK, Lindon JC. Combined HPLC, NMR spectroscopy, and ion-trap mass spectrometry with application to the detection and characterization of xenobiotic and endogenous metabolites in human urine. *Anal Chem.* 1996;68(24):4431-5. doi: 10.1021/ac9606463.
16. Kvitvang HF, Andreassen T, Adam T, Villas-Bôas SG, Bruheim P. Highly sensitive GC/MS/MS method for quantitation of amino and nonamino organic acids. *Anal Chem*. 2011;83(7):2705-11. doi: 10.1021/ac103245b.
17. Hušek P, Švagera Z, Hanzlíková D, Řimnáčová L, Zahradníčková H, Opekarová I, Šimek P. Profiling of urinary amino-carboxylic metabolites by in-situ heptafluorobutyl chloroformate mediated sample preparation and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2016;1443:211-32. doi: 10.1016/j.chroma.2016.03.019.
18. Rios LY, Gonthier MP, Rémésy C, Mila I, Lapierre C, Lazarus SA, Williamson G, Scalbert A. Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects. *Am J Clin Nutr.* 2003;77(4):912-8. doi: 10.1093/ajcn/77.4.912.
19. Sabelli HC, Fawcett J, Gusovsky F, Javaid J, Edwards J, Jeffriess H. Urinary phenyl acetate: a diagnostic test for depression? *Science.* 1983;220(4602):1187-8. doi: 10.1126/science.6857245.
20. Bouatra S, Aziat F, Mandal R, Guo AC, Wilson MR, Knox C, Bjorndahl TC, Krishnamurthy R, Saleem F, Liu P, Dame ZT, Poelzer J, Huynh J, Yallou FS, Psychogios N, Dong E, Bogumil R, Roehring C, Wishart DS. The human urine metabolome. *PLoS One.* 2013;8(9):e73076. doi: 10.1371/journal.pone.0073076.

IMPROVEMENT OF HPLC METHODS FOR EVALUATION OF PHENYLALANINE METABOLITES AND FREE AMINO ACIDS IN THE URINE OF CANCER PATIENTS FOR TARGET METABOLOMIC STUDIES

Ye. M. Doroshenko[1], Zh. V. Motylevich[2]

[1]Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

[2]Institute of Biochemistry of Biologically active compounds of NAS of Belarus.

Objective: to improve the method for evaluation of compounds in urine characterizing the metabolism of aromatic amino acids which are potentially diagnostically significant in assessing the activity of malignant growth.

Methods of study: high-performance liquid chromatography.

Results: unique modification of the method for evaluation of phenylalanine metabolites that allows to assess their levels in urine has been created.

***Keywords**: amino acids, phenylalanine, glutamine, phenylacetic acid, phenylacetylglutamine, malignant tumors, diagnostics, markers, chromatography.*

***For citation**: Doroshenko YeM, Motylevich ZhV. Improvement of HPLC methods for evaluation of phenylalanine metabolites and free amino acids in the urine of cancer patients for target metabolomic studies . Journal of the Grodno State Medical University. 2024;22(6):565-571. https://doi.org/10.25298/2221-8785-2024-22-6-565-671.*

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was performed without external funding.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом.
Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee.

Об авторах / About the authors
Дорошенко Евгений Михайлович / Doroshenko Yevgeni, e-mail: dgi03@mail.ru, ORCID: 0000-0001-9939-8749
Мотылевич Жанна Витальевна / Motylevich Zhanna, ORCID: 0009-0004-3311-9320
* – *автор, ответственный за переписку / corresponding author*

Поступила / Received: 03.10.2024 *Принята к публикации / Accepted for publication: 26.11.2024*