

Обзорная статья

УДК 547.918:593.96:593.93:543.51:543.544.5

DOI: 10.31857/S0869769825010056

EDN: HHWXPА

Применение метаболомных подходов для анализа вторичных метаболитов морских звезд и голотурий в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН

Р. С. Попов[✉], Н. В. Иванчина, П. С. Дмитренко

Роман Сергеевич Попов

кандидат химических наук, старший научный сотрудник

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,

Владивосток, Россия

rs.popov@outlook.com

<https://orcid.org/0000-0002-1727-6164>

Наталья Владимировна Иванчина

кандидат химических наук, заведующая лабораторией

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,

Владивосток, Россия

ivanchina@piboc.dvo.ru

<https://orcid.org/0000-0001-9075-8584>

Павел Сергеевич Дмитренко

доктор химических наук, директор

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,

Владивосток, Россия

paveldmt@piboc.dvo.ru

<https://orcid.org/0000-0002-8191-6170>

Аннотация. Полярные стероидные соединения морских звезд и тритерпеновые гликозиды голотурий являются уникальными биологически активными вторичными метаболитами, имеющими необычные химические структуры и разнообразные биологические эффекты. Применение метаболомных подходов с использованием масс-спектрометрических методов для изучения экстрактов морских беспозвоночных позволяет обнаружить большое число ранее не изученных, в том числе минорных, соединений, быстро охарактеризовать полный набор метаболитов, идентифицировать известные соединения и предположить структуры или получить структурную информацию о строении отдельных частей молекул для новых соединений. В статье кратко обсуждаются основные достижения в исследовании вторичных метаболитов морских звезд и голотурий

с применением метаболомных подходов в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН. Использование масс-спектрометрических методов для изучения суммарных фракций полярных стероидных соединений из дальневосточных морских звезд *Aphelasterias japonica* (класс Asteroidea, отряд Forcipulatida, семейство Asteriidae), *Patiria pectinifera* (класс Asteroidea, отряд Valvatida, семейство Asterinidae) и *Lethasterias fusca* (класс Asteroidea, отряд Forcipulatida, семейство Asteriidae) позволило обнаружить и структурно охарактеризовать большой ряд как известных, так и новых стероидных соединений, включая астеросапонины, гликозиды полигидроксистероидов и полигидроксистероиды. Кроме того, было изучено влияние различных стрессовых факторов на стероидный метаболит *P. pectinifera* и распределение обнаруженных соединений в различных органах *L. fusca*. Полученные данные позволили сделать вывод о биосинтезе и биологических функциях этих метаболитов. Применение методов метаболомного профилирования позволило охарактеризовать состав тритерпеновых гликозидов дальневосточной голотурии *Eupentacta fraudatrix* (класс Holothuroidea, отряд Dendrochirotida, семейство Sclerodactylidae) и предположить схему их биосинтеза. На основе полученных данных для большого круга ранее выделенных тритерпеновых гликозидов была создана спектральная библиотека.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, морские звезды, голотурии, полярные стероиды, тритерпеновые гликозиды

Для цитирования: Попов Р.С., Иванчина Н.В., Дмитренко П.С. Применение метаболомных подходов для анализа вторичных метаболитов морских звезд и голотурий в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН // Вестн. ДВО РАН. 2025. № 1. С. 54–68. <http://dx.doi.org/10.31857/S0869769825010056>

Review article

Application of metabolomics approaches for the analysis of secondary metabolites of starfish and sea cucumbers at the G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS

R. S. Popov, N. V. Ivanchina, P. S. Dmitrenok

Roman S. Popov

Candidate of Sciences in Chemistry, Senior Researcher

G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok, Russia
rs.popov@outlook.com

<https://orcid.org/0000-0002-1727-6164>

Natalia V. Ivanchina

Candidate of Sciences in Chemistry, Head of Laboratory

G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok, Russia
ivanchina@piboc.dvo.ru

<https://orcid.org/0000-0001-9075-8584>

Pavel S. Dmitrenok

Doctor of Sciences in Chemistry, Director

G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok, Russia
paveldmt@piboc.dvo.ru

<https://orcid.org/0000-0002-8191-6170>

Annotation. Polar steroidal compounds of starfish and triterpene glycosides of sea cucumbers are unique biologically active secondary metabolites with unusual chemical structures and diverse biological effects. The application of metabolomic approaches involving mass spectrometry techniques to the investigation of marine invertebrate extracts makes it possible to detect many previously unstudied, including minor, compounds, to rapidly characterize a complete set of metabolites, to identify known compounds and to infer structures or to obtain information on the structure of specific parts of molecules for new compounds. The article briefly discusses key achievements in the study of secondary metabolites of starfish and sea cucumbers using metabolomic approaches at the G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS. The use of mass spectrometry-based approaches to investigate total fractions of polar steroidal compounds from the Far Eastern starfish *Aphelasterias japonica* (class Asteroidea, order Forcipulatida, family Asteriidae), *Patiria pectinifera* (class Asteroidea, order Valvatida, family Asterinidae) and *Lethasterias fusca* (class Asteroidea, order Forcipulatida, family Asteriidae) allowed the detection and structural characterization of a large number of both known and novel steroidal compounds, including asterosaponins, polyhydroxysteroid glycosides and polyhydroxysteroids. In addition, the effect of different stress factors on the steroid metabolome of *P. pectinifera* and the distribution of detected compounds in different organs of *L. fusca* were studied. The data obtained allowed us to draw conclusions about the biosynthesis and the biological functions of these metabolites. The application of metabolomic profiling allowed us to characterize the composition of triterpene glycosides of the Far Eastern sea cucumber *Eupentacta fraudatrix* (class Holothuroidea, order Dendrochirotida, family Sclerodactylidae) and to propose a scheme of their biosynthesis. Based on the data obtained, a spectral library was created for a large number of previously isolated triterpene glycosides.

Keywords: mass spectrometry, starfish, sea cucumber, polar steroids, triterpene glycosides

For citation: Popov R.S., Ivanchina N.V., Dmitrenok P.S. Application of metabolomics approaches for the analysis of secondary metabolites of starfish and sea cucumbers at the G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS. *Vestnik of the FEB RAS*. 2025;(1):54–68. <http://dx.doi.org/10.31857/S0869769825010056>

Неисчерпаемые метаболомы морских организмов – уникальный ресурс для получения новых биологически активных молекул. Иглокожие, которые характеризуются широким химическим разнообразием их метаболитов, являются одним из интереснейших объектов исследований. Полярные стероидные соединения морских звезд и тритерпеновые гликозиды голотурий имеют необычные химические структуры и демонстрируют разнообразные биологические эффекты [1–6].

Экстракты морских звезд и голотурий представляют собой очень сложные смеси химических веществ различного строения. Традиционно исследование таких смесей с целью определения биологически активных веществ основано на выделении из экстрактов отдельных соединений с применением различных хроматографических подходов и последующего установления их химического строения с помощью комбинации различных физико-химических методов [7]. Такой подход позволяет получить точную структуру соединения и изучить его биологическую активность, однако он часто сопряжен с проблемами, связанными со сложностью выделения индивидуальных веществ. Так, несмотря на развитие хроматографических методов и аналитической техники, выделение отдельных соединений из фракций, состоящих из сотен разнообразных компонентов, находящихся в широком диапазоне концентраций, остается чрезвычайно сложной задачей, в результате удастся описать лишь ограниченное число соединений. Как правило, весь пул метаболитов, включающий минорные соединения, остается малоизученным, хотя знания об их химических структурах важны, в том числе и для понимания путей их биогенеза.

Альтернативный подход, который используется при анализе сложных смесей биологически активных природных соединений, основан на применении масс-спектрометрических методов для идентификации и структурной аннотации изученных и новых метаболитов. Применение современных техник, сочетающих различные методы хроматографического разделения с масс-спектрометрией высокого разрешения и tandemной масс-спектрометрией, позволяет провести быстрый, селективный скрининг метаболома и определение качественного и количественного состава метаболитов [8].

В настоящее время современные масс-спектрометрические методы успешно используются для изучения природных соединений, в том числе при исследованиях полярных стероидных соединений морских звезд и тритерпеновых гликозидов голотурий. Так, Демейер с соавт. использовали комбинацию различных масс-спектрометрических подходов для изучения распределения астросапонинов в различных органах морской звезды *Asterias rubens* [9, 10]. В результате было обнаружено 17 известных и 9 новых астросапонинов, а также установлено, что каждый орган характеризуется своим специфическим составом астросапонинов. Изучение распределения астросапонинов *Echinaster sepositus* позволило обнаружить 11 соединений и описать значительную изменчивость состава астросапонинов в зависимости от органа, пола и сезона [11]. Ван Дик с соавт. при помощи комбинации масс-спектрометрических методов исследовали состав экстрактов из стенок тела и кювьеровых органов 5 видов голотурий, собранных в Индийском океане, и показали, что содержание фракций различно в стенках тела и кювьеровых органах, что подтверждает предположение о защитной роли тритерпеновых гликозидов [12]. Бондоц с соавт. получили масс-спектрометрические профили тритерпеновых гликозидов из стенок тела 3 тропических голотурий рода *Holothuria* [13], доказав, что метаболомный подход может быть эффективно использован для целей хемотаксономии рода *Holothuria*. Серия работ посвящена исследованию тритерпеновых гликозидов голотурии *Holothuria forskali*, в которых Ван Дик с соавт. использовали масс-спектрометрические методы для скрининга, структурного анализа и изучения распределения гликозидов в этой голотурии. Методами масс-спектрометрии были изучены гликозиды, выделенные из стенок тела и кювьеровых органов, при помощи методов масс-спектрометрической визуализации была изучена локализация гликозидов в кювьеровых органах этой голотурии в спокойном состоянии и в состоянии стресса, вызванного механическим повреждением [14, 15]. Сравнительное изучение гликозидов из стенок тела и внутренних органов голотурии *Holothuria lessoni*, позволило обнаружить 89 тритерпеновых гликозидов, включая 35 новых и 54 известных соединения [16].

С целью изучения химического состава и установления структурных особенностей ранее неизвестных вторичных метаболитов нашей группой впервые был применен метаболомный подход для анализа суммарных фракций полярных стероидных соединений, включая свободные полигидроксистероиды, родственные им гликозиды и астросапонины, и тритерпеновых гликозидов из некоторых видов морских звезд и голотурий.

Исследование полярных стероидных метаболитов морской звезды *Aphelasterias japonica*

Первой морской звездой, для исследования полярных стероидов которой мы применили метаболомный подход с использованием методов ВЭЖХ-ИЭР МС, была морская звезда *Aphelasterias japonica*, широко распространенная в дальневосточных водах. Ранние исследования с помощью традиционных хроматографических и физико-химических подходов позволили выделить из нее 17 индивидуальных веществ. Полученные нами в результате ВЭЖХ-ИЭР МС анализа *A. japonica* данные указали на присутствие 68 полярных стероидных соединений, которые были охарактеризованы при помощи методов масс-спектрометрии высокого разрешения и tandemной масс-спектрометрии [17].

Экстракт *A. japonica* содержал 33 астросапонины, в том числе 31 пентаозид и 2 гексаозиды. Структуры обнаруженных астросапонинов были охарактеризованы при помощи tandemной масс-спектрометрии. МС/МС спектры, полученные в режиме регистрации положительных ионов, содержали серии фрагментных ионов В- и С-типов, тогда как в МС/МС спектрах, полученных в режиме регистрации отрицательных ионов, наблюдались интенсивные серии фрагментных ионов Y-типа, образованные при последовательном отрыве моносахаридных остатков с сохранением заряда на агликоне (рис. 1). Полученная таким образом информация совместно с литературными данными позволила определить моносахаридный состав и установить строение олигосахаридных фрагментов. Анализ хроматографического поведения обнаруженных астросапонинов показал, что данные

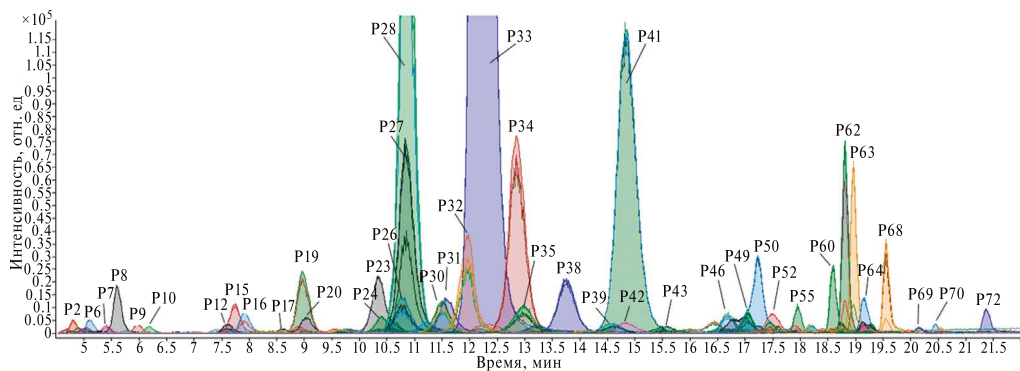


Рис. 2. Хроматограмма по ионному току обнаруженных в экстракте *P. pectinifera* стероидных соединений, полученная в режиме регистрации отрицательных ионов

В анализируемом образце было обнаружено 35 астеросапонинов, в том числе 21 пентаозид, 13 гексаозидов и 1 тетраозид. Данные tandemной масс-спектрометрии позволили установить состав и строение олигосахаридных цепей, а также предположить структуры боковых цепей агликонов обнаруженных астеросапонинов. Согласно полученным данным, среди выявленных астеросапонинов 27 содержали хиновозу в качестве первого моносахаридного остатка и терминального остатка при разветвлении и пентозу или дезоксигексозу (ксилозу или хиновозу) в качестве второго моносахаридного остатка. Мы предположили, что олигогликозиды, которые не содержат хиновозу в качестве первого моносахаридного остатка, имеют в данном положении продукты биологической трансформации хиновозы. Кроме того, анализ MS/MS спектров показал наличие соединений с редкими моносахаридными остатками – гидратированной формы 6-дезоксид-ксило-4-гексулозы и соединения, содержащие модифицированный моносахаридный остаток массой 126 Да, вероятно соответствующий $\Delta^{2(3)}$ -3-дегидроксихиновозе. В соответствии с хроматографическим поведением и паттернами фрагментации в условиях tandemной масс-спектрометрии все обнаруженные в *P. pectinifera* астеросапонины были разделены на 8 групп в соответствии с типами агликонов.

В анализируемом образце были обнаружены 22 полигидроксистероидных соединения и 15 сульфатированных гликозидов полигидроксистероидов. Найденные соединения были охарактеризованы при помощи tandemной масс-спектрометрии, в том числе с использованием режима фотоионизации при атмосферном давлении, применение которого позволило получить интенсивные пики молекулярных ионов для ряда несulfатированных полигидроксистероидных соединений и охарактеризовать их структуры. Сравнение времен удерживания и MS/MS спектров с данными, полученными для стандартных соединений, позволило идентифицировать 12 полигидроксистероидных соединений. Структуры остальных соединений были аннотированы на основании полученных масс-спектрометрических данных и времен удерживания, а также литературных данных и информации о биосинтетических закономерностях.

Изучение полярных стероидных метаболитов морской звезды *Lethasterias fusca*

Ранее было показано, что дальневосточная морская звезда *Lethasterias fusca* содержит уникальные метаболиты, обладающие значительной биологической активностью. Так, выделенный из нее астеросапонин летастериозид А показал перспективную противоопухолевую активность, в нецитотоксической концентрации почти полностью ингибируя образование колоний опухолевых клеток T-47D, HCT-116 и RPMI-7951 [19]. Для изучения полного набора полярных стероидных соединений *L. fusca* был применен метаболомный подход с использованием методов ВЭЖХ-ИЭР МС, при этом впервые

для метаболомных исследований иглокожих была использована хроматография в режиме нанопотоков в сочетании с tandemной масс-спектрометрией с ионизацией методом CaptiveSpray [20].

На первом этапе работы для изучения закономерностей масс-спектрометрической фрагментации и хроматографического поведения полярных стероидных метаболитов различной природы нами были рассмотрены 43 соединения, в том числе 5 астеросапонинов, 28 гликозидов полигидроксистероидов и 10 полигидроксистероидов, выделенных ранее в ТИБОХ ДВО РАН из *L. fusca* и других видов морских звезд. В результате были получены данные о временах удерживания, точных массах и МС/МС спектрах изученных стандартов. Все полученные масс-спектры, МС/МС спектры, а также времена удерживания были внесены в масс-спектрометрическую базу данных морских углеводсодержащих соединений.

Метаболическое профилирование экстракта *L. fusca* позволило обнаружить и охарактеризовать большой ряд различных стероидных гликозидов и родственных им соединений. Структурная аннотация обнаруженных соединений основывалась на данных масс-спектрометрии высокого разрешения и tandemной масс-спектрометрии, а также на значениях времен удерживания соответствующих соединений, литературных данных и биосинтетических закономерностях. В результате анализа было обнаружено и структурно охарактеризовано 207 компонентов (рис. 3).

Полученная информация позволила аннотировать структуры 106 обнаруженных астеросапонинов, в том числе установить состав и строение олигосахаридных фрагментов и боковых цепей агликонов. Астеросапонины *L. fusca* показали высокое структурное разнообразие как углеводных фрагментов, так и их агликонных частей. Было показано, что астеросапонины содержат агликоны 23 различных типов, при этом ряд из этих агликонов ранее не встречался в литературе. Также обнаруженные астеросапонины различались и длиной олигосахаридных цепей – 28 соединений являлись гексаозидами, 66 метаболитов имели пентасахаридные цепи, 7 – трисахаридные, а 5 являлись «укороченными» астеросапонидами с одним моносахаридным остатком при C-6. Анализ набора аннотированных структур позволил выявить характерные особенности биосинтеза астеросапонинов *L. fusca*.

Метаболический профиль также содержал 95 полигидроксистероидных соединений, в том числе 81 гликозид и 14 полигидроксистероидных соединений, которые были охарактеризованы методом tandemной масс-спектрометрии. Всего было обнаружено 14 несulfатированных полигидроксистероидных соединений, включая 5 полигидроксистероидов и 9 гликозидов полигидроксистероидов, 5 из них были однозначно идентифицированы с использованием стандартов, ранее выделенных из этого и других видов морских звезд. Также были идентифицированы 7 несulfатированных гликозидов полигидроксистероидов. Несмотря на огромное структурное разнообразие обнаруженных метаболитов, установленные закономерности фрагментации полигидроксистероидных соединений в условиях tandemной масс-спектрометрии наряду с информацией об особенностях биосинтеза *L. fusca* позволили определить структурные фрагменты гликозидов полигидроксистероидов и полигидроксистероидных соединений и предположить структуры для 91 метаболита.

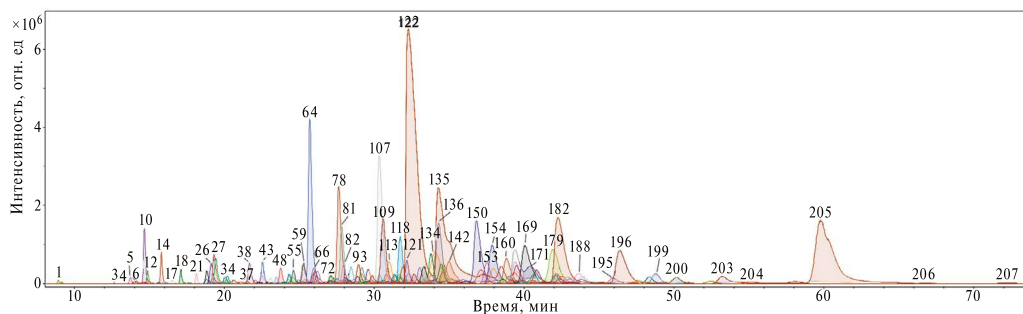


Рис. 3. Хроматограмма по ионному току обнаруженных в экстракте *L. fusca* стероидных соединений, полученная в режиме регистрации отрицательных ионов

Сравнительный анализ состава полярных стероидных соединений морских звезд *A. japonica*, *P. pectinifera* и *L. fusca*

Полученные нами данные о составах стероидных метаболитов морских звезд *A. japonica*, *P. pectinifera* и *L. fusca* позволяют отметить различия в путях их биосинтеза. Интересно, что все 3 вида морских звезд были собраны примерно в одном месте – на Морской экспериментальной станции ТИБОХ ДВО РАН в зал. Посыета Японского моря, и, таким образом, имеют похожие условия обитания. В то же время при сравнительном анализе их стероидных метаболитов можно отметить значительные различия в наборах структур обнаруженных веществ.

Во фракциях полигидроксильрованных стероидов и родственных им гликозидов наименее окисленные стероиды найдены в *A. japonica*, а наиболее окисленные (6 и более гидроксильных групп) – в *P. pectinifera*. Пути последовательного введения гидроксильных групп в стероидные предшественники в исследованных морских звездах похожи, можно отметить только замедленное гидроксильрование в положении 8 и раннее гидроксильрование в положении 5 в *A. japonica*. В *A. japonica* практически все соединения имеют холестерановую скелетную систему, что предполагает преимущественное использование пищевого холестерина животного происхождения для биосинтеза своих полярных стероидов. Присутствие большого количества соединений с эргостановыми и стигматановыми боковыми цепями в *P. pectinifera* и *L. fusca* указывает на то, что они используют также пищевые фитостерины в процессах биосинтеза полигидроксильрованных стероидных соединений.

В *A. japonica* полярные стероиды найдены только в сульфатированной форме, в *P. pectinifera* и *L. fusca* обнаружены как сульфатированные, так и несulfатированные стероиды. Однако в отличие от *P. pectinifera* количество несulfатированных соединений у *L. fusca* заметно более ограничено. Для всех этих видов морских звезд характерно сульфатирование моносахаридных остатков. Можно предположить, что этап сульфатирования завершает все биосинтетические трансформации в молекулах этого класса метаболитов.

Практически все гликозиды, найденные в *A. japonica* и *P. pectinifera*, являются монозидами, в то время как для *L. fusca* характерно присутствие большого количества так называемых двухцепочечных гликозидов. В большинстве гликозидов *A. japonica* моносахаридным остатком является ксилоза. Для гликозидов *P. pectinifera* характерно присутствие остатка сульфатированной арабинофуранозы, в некоторых случаях дополнительно метилированной. В полностью идентифицированных гликозидах из *L. fusca* моносахаридными остатками являются ксилоза и глюкоза, как и у *A. japonica*.

Сравнительный анализ метаболитных профилей астеросапонинов морских звезд *A. japonica*, *P. pectinifera* и *L. fusca* также позволил сделать выводы о гипотетических путях их биосинтеза. Нами предположено, что астеросапонины являются продуктами смешанного так называемого мозаичного биогенеза, т.е. биосинтез астеросапонинов может происходить двумя независимыми путями. Первый включает последовательное удлинение углеводных цепей при сформировавшихся агликонах путем присоединения дополнительных моносахаридных остатков. Во всех исследованных видах найдены нативные сульфатированные агликоны астеросапонинов. В морских звездах *A. japonica* и *L. fusca* найдены «укороченные» астеросапонины, имеющие один моносахаридный остаток у C-6 агликona. Увеличение числа идентифицированных метаболитов с помощью использования более чувствительного метода наноВЭЖХ-МС/МС для исследования *L. fusca* позволило обнаружить помимо «укороченных» астеросапонинов триозиды, которые, вероятно, являются промежуточными продуктами биосинтеза астеросапонинов.

В то же время во всех трех видах изученных с помощью ВЭЖХ-МС морских звезд были найдены гликозиды с одинаковыми углеводными цепями и различными агликонами. Это указывает на реализацию путей биосинтеза, которые заключаются в образовании гликозидов с тетра-, пента- или гексасахаридными фрагментами с последующей трансформацией боковых цепей агликонов. Подобный мозаичный тип биосинтеза также является характерной особенностью биогенеза тритерпеновых гликозидов голотурий.

В *A. japonica* и *P. pectinifera* первым от агликona моносахаридным остатком всегда является хиновоза либо продукты ее дополнительного окисления и/или модификации.

В *L. fusca* найден ряд астеросапонинов с гексозой в качестве первого моносахаридного звена. Нахождение астеросапонинов с редкими или модифицированными первыми от агликона моносахаридными остатками позволяет предположить, что некоторые астеросапонины могут образовываться при дополнительном окислении и модификации первого остатка хиновозы в углеводной цепи.

Исследование воздействия факторов окружающей среды и распределения по органам полярных стероидных соединений

На следующем этапе мы применили метаболомный подход для изучения того, как изменяется содержание полярных стероидных метаболитов морской звезды *P. pectinifera* при воздействии различных факторов окружающей среды [21]. Используя методы ВЭЖХ-ИЭРМС с последующим статистическим анализом полученных данных методом главных компонент (МГК) и методом частных наименьших квадратов в сочетании с дискриминантным анализом, мы оценили изменения уровней обнаруженных ранее полярных стероидных метаболитов при воздействии таких факторов, как питание, повреждение, недостаток кислорода в воде, изменение температуры воды и солености.

Статистический анализ МГК показал, что вследствие влияния изучаемых факторов происходят значимые изменения концентраций полярных стероидных метаболитов. Результаты дисперсионного анализа с поправкой на множественные сравнения (критерий Тьюки) показали, что данные метаболических профилей группы морских звезд, накормленных мидией, группы раненых морских звезд, а также группы животных, которых содержали при повышенной температуре, статистически отличались от данных контрольной группы на основании первой главной компоненты. Главная компонента 2 описывала различия данных контрольной группы и групп морских звезд, которые содержались при измененной солености воды, в условиях повышенной температуры и недостатка кислорода. Последующий анализ с использованием метода частных наименьших квадратов в сочетании с дискриминантным анализом позволил выявить конкретные метаболиты, изменения которых характеризуют действие того или иного фактора.

В соответствии с полученными результатами метаболические ответы, вызванные влиянием таких факторов, как кормление, повреждение и повышение температуры, оказались выражены в большей степени, чем остальные. Кроме того, эти три фактора имеют некоторое сходство в своем действии на стероидный метаболит морской звезды *P. pectinifera*. В результате влияния этих факторов концентрации большинства астеросапонинов снизились, в то время как концентрации большинства полигидроксистероидов и гликозидов полигидроксистероидов увеличились.

Еще одно перспективное применение метаболомного подхода – сравнительное исследование профилей целевых соединений в различных органах животных-продуцентов. Этот подход дает уникальную возможность прояснения биологических функций исследуемых веществ, которые тесно связаны с местами локализации метаболитов в организмах животных. Так, изучение содержания обнаруженных полярных стероидных метаболитов в стенках тела, желудке, гонадах, печени и целомической жидкости *L. fusca* показало, что состав полярных стероидов в исследуемых органах отличается качественно и количественно [22]. Наибольшие количества стероидных соединений были обнаружены в желудке морской звезды. Астеросапонины были обнаружены во всех органах, тогда как основная часть полигидроксистероидов и гликозидов полигидроксистероидов находилась в пищеварительных органах. Данные результаты подтвердили предположения о защитной роли астеросапонинов и участии полигидроксистероидов в процессах пищеварения.

Исследование суммарной фракции тритерпеновых гликозидов голотурии *Eupentacta fraudatrix*

Дальневосточная голотурия *Eupentacta fraudatrix* является хорошо изученным распространенным видом, из которого ранее был выделен ряд тритерпеновых гликозидов с уникальной химической структурой и разнообразной биологической активностью. Для изу-

чения суммарной фракции тритерпеновых гликозидов *E. fraudatrix* этанольные экстракты голотурий анализировались методом ВЭЖХ-ИЭР МС [23]. Полученные данные позволили обнаружить и охарактеризовать как ранее известные, так и новые соединения. Всего было обнаружено 54 соединения, в том числе 26 сульфатированных, 18 несulfатированных и 10 дисульфатированных гликозидов. Данные масс-спектрометрии высокого разрешения и тандемной масс-спектрометрии совместно с хроматографическими данными позволили идентифицировать известные соединения и установить элементный состав и предложить структуры новых тритерпеновых гликозидов. МС/МС спектры обнаруженных гликозидов содержали интенсивные серии фрагментных ионов, которые позволили установить последовательности моносахаридных звеньев в углеводных фрагментах (рис. 4). В ряде случаев в МС/МС спектрах также наблюдались характерные пики ионов, образованные при разрыве связей в агликоне, что позволило охарактеризовать строение тритерпеновых ядер и боковых цепей агликонов.

Все обнаруженные тритерпеновые гликозиды имели олигосахаридные фрагменты, которые можно разделить на 11 типов. Следует отметить, что 5 найденных нами типов олигосахаридных цепей ранее не встречались в *E. fraudatrix*. Кроме того, все ранее выделенные из этого источника тритерпеновые гликозиды имели метилированную ксилозу в качестве терминального моносахаридного остатка. Мы обнаружили новые гликозиды, имеющие метилированную глюкозу в качестве терминального моносахаридного остатка.

Анализ пула аннотированных структур гликозидов *E. fraudatrix* позволил предложить теоретическую схему биосинтеза углеводных цепей тритерпеновых гликозидов этой голотурии. Согласно предложенной схеме, удлинение олигосахаридной цепи происходит путем добавления моносахаридных остатков в различные положения образующейся олигосахаридной цепи, при этом сульфатирование тритерпеновых гликозидов может происходить на разных стадиях биосинтеза углеводной цепи.

Кроме того, при помощи метаболомного подхода было изучено содержание тритерпеновых гликозидов в органах *E. fraudatrix*. Данные, полученные при профилировании экстрактов отдельных органов голотурии (стенки тела, кишки, аквафарингеальный комплекс, гонады, легкие) методами ВЭЖХ-ИЭР МС, указали на то, что стенки тела содержали максимальные количества тритерпеновых гликозидов. Наибольшие концентрации в экстракте стенок тела имела группа гликозидов, содержащая пентасахаридные несulfатированные или тетрасахаридные моно- или дисульфатированные углеводные цепи. Эти данные подтверждают предполагаемую защитную роль тритерпеновых гликозидов голотурий. Метаболические профили экстрактов из разных органов показали, что относительные количества большинства соединений были примерно одинаковыми, однако в некоторых случаях обнаружены специфические метаболиты, более характерные для отдельных органов. Эти данные могут указывать на дополнительные биологические функции тритерпеновых гликозидов в организме-продуcente.

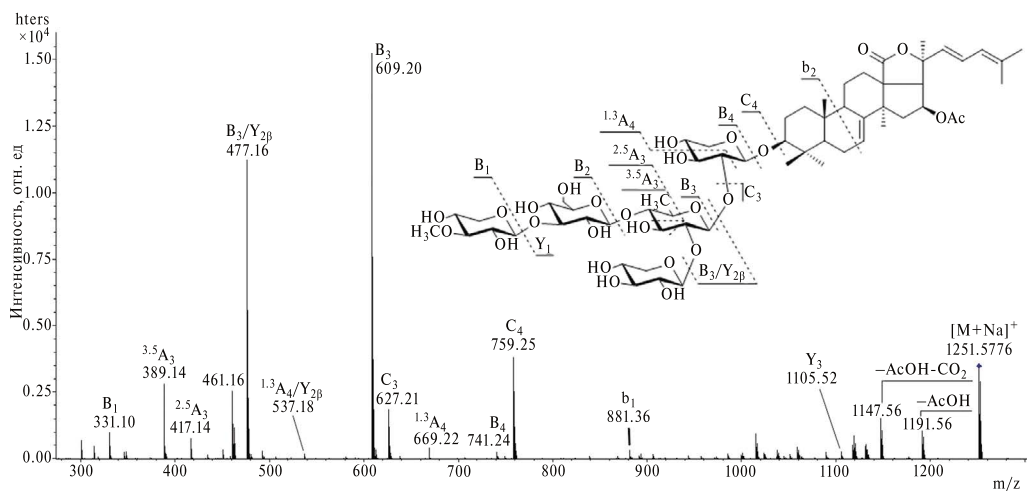


Рис. 4. МС/МС спектр иона $[M + Na]^+$ при m/z 1251,58 тритерпенового гликозида кукумариозида C_2

Создание масс-спектрометрической библиотеки тритерпеновых гликозидов

Использование масс-спектрометрических подходов при изучении природных соединений позволяет быстро оценить структурное разнообразие метаболитов, однако идентификация обнаруженных соединений является чрезвычайно сложной задачей. Для увеличения эффективности использования масс-спектрометрических методов при изучении вторичных метаболитов иглокожих и повышения достоверности идентификации нами была создана масс-спектрометрическая библиотека тритерпеновых гликозидов голотурий [24].

На первом этапе из ранее изученных в ТИБОХ ДВО РАН соединений была сформирована химическая библиотека, состоящая из 191 тритерпенового гликозида, выделенных из 15 видов голотурий и 1 морской звезды. Выбранные в данной работе тритерпеновые гликозиды обладали значительным структурным разнообразием, охватывающим широкий диапазон возможных структур олигосахаридных фрагментов и агликонов. Собранный пул тритерпеновых гликозидов был проанализирован методом ультравысокоэффективной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией с ионизацией электрораспылением для получения МС, МС/МС спектров и времен удерживания исследуемых соединений. Полученные в результате анализа методом ультраВЭЖХ-МС/МС набора тритерпеновых гликозидов данные были использованы для формирования базы данных, содержащей точные моноизотопные массы молекулярных ионов и их МС/МС спектры, снятые с различными параметрами для получения высоко- и низкоэнергетических паттернов фрагментации, данные о времени удерживания, структуры, формулы и названия соединений.

Полученные масс-спектрометрические данные для большой группы тритерпеновых гликозидов голотурий позволили определить основные пути фрагментации в условиях диссоциации, активированной столкновениями. Тандемные масс-спектры в режиме регистрации отрицательных ионов включали пики фрагментных ионов, образованные при последовательном отрыве моносакхаридных звеньев углеводного фрагмента. Получаемая при этом информация позволяет определить структуру и последовательность моносакхаридных остатков в углеводном фрагменте изучаемого тритерпенового гликозида, однако определение точной структуры агликона на основе фрагментации в условиях диссоциации, активируемой столкновениями, часто является сложной задачей, поскольку большинство гликозидов демонстрируют ограниченную фрагментацию агликона. Анализ и сравнение паттернов фрагментации ряда моносальфатированных гликозидов позволил выявить характерную для этих соединений серию фрагментных ионов, связанную со структурой боковых цепей. Данная серия включала фрагментные ионы, возникающие при разрыве связи C-20–C-22 (ионы, соответствующие потере боковой цепи), сопровождающиеся элиминацией молекул CO₂, C₂H₄O₂ и фрагментов D-кольца, а также фрагментные ионы, образующиеся при разрыве связей В-кольца. Анализ хроматографического поведения позволил изучить связь структурных особенностей тритерпеновых гликозидов и времени удерживания и выявить отдельные структурные детали, оказывающие наиболее заметное влияние на времена удерживания в условиях обращенно-фазовой хроматографии.

Полученные данные были использованы для быстрой характеристики обнаруженных тритерпеновых гликозидов голотурии *E. fraudatrix*. Анализ методом ультраВЭЖХ-ИЭР МС/МС экстракта голотурии позволил идентифицировать 27 соединений. Среди идентифицированных метаболитов были выделенные ранее из *E. fraudatrix* гликозиды и соединения, также выделенные ранее из других видов голотурий. Использование инструмента Analog Search на платформе GPNS [25] позволило значительно расширить список аннотированных метаболитов, выявив 113 структурных аналогов, МС/МС спектры которых показали паттерны фрагментации, подобные тем, что содержатся в созданной библиотеке масс-спектров. Было выявлено несколько типичных различий в массах ионов, которые соответствуют специфическим изменениям в структурах соединений. Для того чтобы подчеркнуть химическое разнообразие компонентов экстракта *E. fraudatrix*, была создана молекулярная сеть с использованием МС/МС спектров в качестве исходных данных. Было обнаружено, что структурно близкие соединения часто представлены близко расположенными узлами в молекулярных сетях (рис. 5).

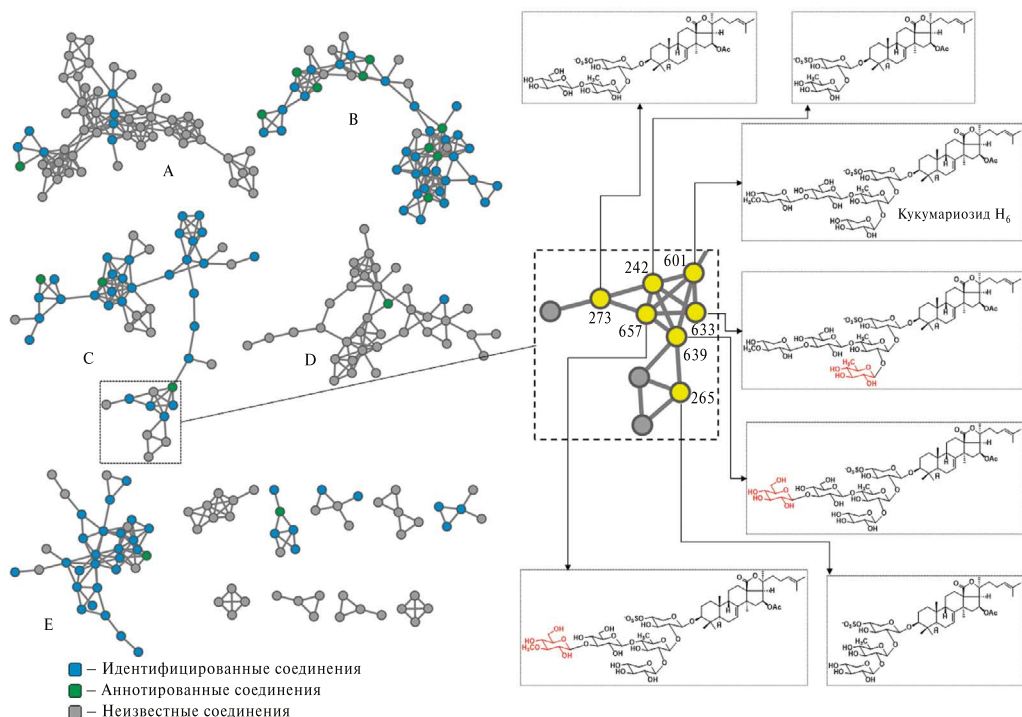


Рис. 5. Результаты анализа методом молекулярных сетей с последующей идентификацией и аннотацией обнаруженных в экстракте голотурии *E. fraudatrix* тритерпеновых гликозидов с помощью созданной базы данных

Полученные результаты позволили предложить структуры для ряда новых тритерпеновых гликозидов и продемонстрировали эффективность использования созданной базы данных для идентификации известных метаболитов и аннотации структур новых тритерпеновых гликозидов голотурий.

Таким образом, в результате применения метаболомного подхода для изучения биологически активных вторичных метаболитов морских звезд и голотурий было обнаружено большое количество как известных, так и новых соединений, структуры которых были описаны при помощи полученных масс-спектрометрических и хроматографических данных и данных о биосинтетических закономерностях. Разработанный нами подход позволяет быстро охарактеризовать полный набор метаболитов, идентифицировать известные соединения, а выявленные закономерности фрагментации полярных стероидных соединений морских звезд и тритерпеновых гликозидов голотурий в условиях диссоциации, активируемой столкновениями, помогают аннотировать структуры или получить структурную информацию о строении отдельных частей молекул для новых соединений на основе данных тандемной масс-спектрометрии. Полученная информация может в дальнейшем использоваться для выделения биологически активных соединений, для изучения биосинтеза или биологической роли целевых метаболитов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Ivanchina N.V., Kicha A.A., Stonik V.A. Steroid glycosides from marine organisms // Steroids. 2011. Vol. 76, N5. P. 425–454.
2. Ivanchina N., Kicha A., Malyarenko T., Stonik V. Recent studies of polar steroids from starfish: structures, biological activities and biosynthesis // Advances in Natural Products Discovery. New York: Nova Sci., 2017. P. 191–224.

3. Stonik V.A., Kicha A.A., Malyarenko T.V., Ivanchina N.V. Asterosaponins: Structures, Taxonomic Distribution, Biogenesis and Biological Activities // *Marine Drugs*. 2020. Vol. 18, N12.
4. Kalinin V.I., Aminin D.L., Avilov S.A., Silchenko A.S., Stonik V.A. Triterpene Glycosides from Sea Cucumbers (Holothurioidea, Echinodermata). Biological Activities and Functions // *Studies in Natural Products Chemistry (Bioactive Natural Products)*. Elsevier Science Publisher, 2008. Vol. 35. P. 135–196.
5. Kalinin V.I., Avilov S.A., Silchenko A.S., Stonik V.A., Elyakov G.B. Triterpene glycosides of sea cucumbers (Holothurioidea, Echinodermata) as taxonomic markers // *Natural Product Communications*. 2015. Vol. 10, N1.
6. Kalinin V.I., Silchenko A.S., Avilov S.A., Stonik V.A. Progress in the Studies of Triterpene Glycosides From Sea Cucumbers (Holothurioidea, Echinodermata) Between 2017 and 2021 // *Natural Product Communications*. 2021. Vol. 16, N10.
7. Minale L., Riccio R., Zollo F. Steroidal Oligoglycosides and Polyhydroxysteroids from Echinoderms // *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 1993. Vol. 62. P. 75–308.
8. Wolfender J.L., Litaudon M., Touboul D., Queiroz E.F. Innovative omics-based approaches for prioritisation and targeted isolation of natural products-new strategies for drug discovery // *Natural Product Reports*. 2019. Vol. 36, N6. P. 855–868.
9. Demeyer M., De Winter J., Caulier G., Eeckhaut I., Flammang P., Gerbaux P. Molecular diversity and body distribution of saponins in the sea star *Asterias rubens* by mass spectrometry // *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2014. Vol. 168. P. 1–11.
10. Demeyer M., Wisztorski M., Decroo C., De Winter J., Caulier G., Hennebert E., Eeckhaut I., Fournier I., Flammang P., Gerbaux P. Inter- and intra-organ spatial distributions of sea star saponins by MALDI imaging // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015. Vol. 407, N29. P. 8813–8824.
11. Dahmoune B., Bachari-Houma F., Chibane M., Jéhan P., Guegan J.-P., Dahmoune F., Aissou-Akrour C., Mouni L., Ferrières V., Hauchard D. Saponin contents in the starfish *Echinaster sepositus*: chemical characterization, qualitative and quantitative distribution // *Biochemical Systematics and Ecology*. 2021. Vol. 96. P. 104262.
12. Van Dyck S., Gerbaux P., Flammang P. Qualitative and quantitative saponin contents in five sea cucumbers from the Indian Ocean // *Marine Drugs*. 2010. Vol. 8, N1. P. 173–189.
13. Bondoc K.G.V., Lee H., Cruz L.J., Lebrilla C.B., Juinio-Meñez M.A. Chemical fingerprinting and phylogenetic mapping of saponin congeners from three tropical holothurian sea cucumbers // *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2013. Vol. 166, N3/4. P. 182–193.
14. Van Dyck S., Flammang P., Meriaux C., Bonnel D., Salzert M., Fournier I., Wisztorski M. Localization of secondary metabolites in marine invertebrates: contribution of MALDI MSI for the study of saponins in cuvierian tubules of *H. forskali* // *PLoS One*. 2010. Vol. 5, N11. e13923.
15. Van Dyck S., Caulier G., Todesco M., Gerbaux P., Fournier I., Wisztorski M., Flammang P. The triterpene glycosides of *Holothuria forskali*: usefulness and efficiency as a chemical defense mechanism against predatory fish // *Journal of Experimental Biology*. 2011. Vol. 214, N8. P. 1347–1356.
16. Bahrami Y., Zhang W., Franco C. Distribution of saponins in the sea cucumber *Holothuria lessoni*; the body wall versus the viscera, and their biological activities // *Marine Drugs*. 2018. Vol. 16, N11. P. 423.
17. Popov R.S., Ivanchina N.V., Kicha A.A., Malyarenko T.V., Dmitrenok P.S., Stonik V.A. Metabolite profiling of polar steroid constituents in the Far Eastern starfish *Aphelasterias japonica* using LC-ESI MS/MS // *Metabolomics*. 2014. Vol. 10, N6. P. 1152–1168.
18. Popov R.S., Ivanchina N.V., Kicha A.A., Malyarenko T.V., Dmitrenok P.S., Stonik V.A. LC-ESI MS/MS profiling of polar steroid metabolites of the Far Eastern starfish *Patiria* (= *Asterina*) *pectinifera* // *Metabolomics*. 2016. Vol. 12, N2. P. 21.
19. Ivanchina N.V., Kalinovskiy A.I., Kicha A.A., Malyarenko T.V., Dmitrenok P.S., Ermakova S.P., Stonik V.A. Two new asterosaponins from the Far Eastern starfish *Lethasterias fusca* // *Natural Product Communications*. 2012. Vol. 7, N7.
20. Popov R.S., Ivanchina N.V., Kicha A.A., Malyarenko T.V., Dmitrenok P.S. Structural characterization of polar steroid compounds of the Far Eastern starfish *Lethasterias fusca* by nanoflow liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2019. Vol. 30, N5. P. 743–764.
21. Popov R.S., Ivanchina N.V., Kicha A.A., Malyarenko T.V., Grebnev B.B., Dmitrenok P.S., Stonik V.A. LC–MS-based metabolome analysis on steroid metabolites from the starfish *Patiria* (= *Asterina*) *pectinifera* in conditions of active feeding and stresses // *Metabolomics*. 2016. Vol. 12, N6. P. 106.

22. Popov R.S., Ivanchina N.V., Kicha A.A., Malyarenko T.V., Grebnev B.B., Stonik V.A., Dmitrenok P.S. The distribution of asterosaponins, polyhydroxysteroids and related glycosides in different body components of the Far Eastern starfish *Lethasterias fusca* // *Marine Drugs*. 2019. Vol. 17, N9. P. 523.
23. Popov R., Ivanchina N., Silchenko A., Avilov S., Kalinin V., Dolmatov I., Stonik V., Dmitrenok P. Metabolite Profiling of Triterpene Glycosides of the Far Eastern Sea Cucumber *Eupentacta fraudatrix* and Their Distribution in Various Body Components Using LC-ESI QTOF-MS // *Marine Drugs*. 2017. Vol. 15, N10. P. 302.
24. Popov R.S., Ivanchina N.V., Silchenko A.S., Avilov S.A., Kalinin V.I., Malyarenko T.V., Stonik V.A., Dmitrenok P.S. A Mass Spectrometry Database for Sea Cucumber Triterpene Glycosides // *Metabolites*. 2023. Vol. 13, N7. P. 783.
25. Wang M., Carver J.J., Phelan V.V., Sanchez L.M., Garg N., Peng Y., Nguyen D.D., Watrous J., Kapono C.A., Luzzatto-Knaan T., Porto C., Bouslimani A., Melnik A.V., Meehan M.J., Liu W.T., Crüsemann M., Boudreau P.D., Esquenazi E. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking // *Nature Biotechnology*. 2016. Vol. 34, N8. P. 828–837.

REFERENCES

1. Ivanchina N.V., Kicha A.A., Stonik V.A. Steroid glycosides from marine organisms. *Steroids*. 2011; 76(5):425–454.
2. Ivanchina N., Kicha A., Malyarenko T., Stonik V. Recent studies of polar steroids from starfish: structures, biological activities and biosynthesis. In: *Advances in Natural Products Discovery*. New York: Nova Sci.; 2017. P. 191–224.
3. Stonik V.A., Kicha A.A., Malyarenko T.V., Ivanchina N.V. Asterosaponins: Structures, Taxonomic Distribution, Biogenesis and Biological Activities. *Marine Drugs*. 2020;18(12).
4. Kalinin V.I., Aminin D.L., Avilov S.A., Silchenko A.S., Stonik V.A. Triterpene Glycosides from Sea Cucumbers (Holothuroidea, Echinodermata). Biological Activities and Functions. In: *Studies in Natural Products Chemistry (Bioactive Natural Products)*. Elsevier Science Publisher; 2008. Vol. 35. P. 135–196.
5. Kalinin V.I., Avilov S.A., Silchenko A.S., Stonik V.A., Elyakov G.B. Triterpene glycosides of sea cucumbers (Holothuroidea, Echinodermata) as taxonomic markers. *Natural Product Communications*. 2015;10(1).
6. Kalinin V.I., Silchenko A.S., Avilov S.A., Stonik V.A. Progress in the Studies of Triterpene Glycosides From Sea Cucumbers (Holothuroidea, Echinodermata) Between 2017 and 2021. *Natural Product Communications*. 2021;16(10).
7. Minale L., Riccio R., Zollo F. Steroidal Oligoglycosides and Polyhydroxysteroids from Echinoderms. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 1993;62:75–308.
8. Wolfender J.L., Litaudon M., Touboul D., Queiroz E.F. Innovative omics-based approaches for prioritisation and targeted isolation of natural products-new strategies for drug discovery. *Natural Product Reports*. 2019;36(6):855–868.
9. Demeyer M., De Winter J., Caulier G., Eeckhaut I., Flammang P., Gerbaux P. Molecular diversity and body distribution of saponins in the sea star *Asterias rubens* by mass spectrometry. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2014;168:1–11.
10. Demeyer M., Wisztorski M., Decroo C., De Winter J., Caulier G., Hennebert E., Eeckhaut I., Fournier I., Flammang P., Gerbaux P. Inter- and intra-organ spatial distributions of sea star saponins by MALDI imaging. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015;407(29):8813–8824.
11. Dahmoune B., Bachari-Houma F., Chibane M., Jéhan P., Guegan J.-P., Dahmoune F., Aissou-Akrour C., Mouni L., Ferrières V., Hauchard D. Saponin contents in the starfish *Echinaster sepositus*: chemical characterization, qualitative and quantitative distribution. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2021;96:104262.
12. Van Dyck S., Gerbaux P., Flammang P. Qualitative and quantitative saponin contents in five sea cucumbers from the Indian Ocean. *Marine Drugs*. 2010;8(1):173–189.
13. Bondoc K.G.V., Lee H., Cruz L.J., Lebrilla C.B., Juinio-Meñez M.A. Chemical fingerprinting and phylogenetic mapping of saponin congeners from three tropical holothurian sea cucumbers. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2013;166(3/4):182–193.
14. Van Dyck S., Flammang P., Meriaux C., Bonnel D., Salzert M., Fournier I., Wisztorski M. Localization of secondary metabolites in marine invertebrates: contribution of MALDI MSI for the study of saponins in cuvierian tubules of *H. forskali*. *PLoS One*. 2010;5(11). e13923.

15. Van Dyck S., Caulier G., Todesco M., Gerbaux P., Fournier I., Wisztorski M., Flammang P. The triterpene glycosides of *Holothuria forskali*: usefulness and efficiency as a chemical defense mechanism against predatory fish. *Journal of Experimental Biology*. 2011;214(8):1347–1356.
16. Bahrami Y., Zhang W., Franco C. Distribution of saponins in the sea cucumber *Holothuria lessoni*; the body wall versus the viscera, and their biological activities. *Marine Drugs*. 2018;16(11):423.
17. Popov R.S., Ivanchina N.V., Kicha A.A., Malyarenko T.V., Dmitrenok P.S., Stonik V.A. Metabolite profiling of polar steroid constituents in the Far Eastern starfish *Aphelasterias japonica* using LC–ESI MS/MS. *Metabolomics*. 2014;10(6):1152–1168.
18. Popov R.S., Ivanchina N.V., Kicha A.A., Malyarenko T.V., Dmitrenok P.S., Stonik V.A. LC-ESI MS/MS profiling of polar steroid metabolites of the Far Eastern starfish *Patiria* (= *Asterina*) *pectinifera*. *Metabolomics*. 2016;12(2):21.
19. Ivanchina N.V., Kalinovskiy A.I., Kicha A.A., Malyarenko T.V., Dmitrenok P.S., Ermakova S.P., Stonik V.A. Two new asterosaponins from the Far Eastern starfish *Lethasterias fusca*. *Natural Product Communications*. 2012;7(7).
20. Popov R.S., Ivanchina N.V., Kicha A.A., Malyarenko T.V., Dmitrenok P.S. Structural characterization of polar steroid compounds of the Far Eastern starfish *Lethasterias fusca* by nanoflow liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2019;30(5):743–764.
21. Popov R.S., Ivanchina N.V., Kicha A.A., Malyarenko T.V., Grebnev B.B., Dmitrenok P.S., Stonik V.A. LC–MS-based metabolome analysis on steroid metabolites from the starfish *Patiria* (= *Asterina*) *pectinifera* in conditions of active feeding and stresses. *Metabolomics*. 2016;12(6):106.
22. Popov R.S., Ivanchina N.V., Kicha A.A., Malyarenko T.V., Grebnev B.B., Stonik V.A., Dmitrenok P.S. The distribution of asterosaponins, polyhydroxysteroids and related glycosides in different body components of the Far Eastern starfish *Lethasterias fusca*. *Marine Drugs*. 2019;17(9):523.
23. Popov R., Ivanchina N., Silchenko A., Avilov S., Kalinin V., Dolmatov I., Stonik V., Dmitrenok P. Metabolite Profiling of Triterpene Glycosides of the Far Eastern Sea Cucumber *Eupentacta fraudatrix* and Their Distribution in Various Body Components Using LC-ESI QTOF-MS. *Marine Drugs*. 2017;15(10):302.
24. Popov R.S., Ivanchina N.V., Silchenko A.S., Avilov S.A., Kalinin V.I., Malyarenko T.V., Stonik V.A., Dmitrenok P.S. A Mass Spectrometry Database for Sea Cucumber Triterpene Glycosides. *Metabolites*. 2023;13(7):783.
25. Wang M., Carver J.J., Phelan V.V., Sanchez L.M., Garg N., Peng Y., Nguyen D.D., Watrous J., Kapono C.A., Luzzatto-Knaan T., Porto C., Bouslimani A., Melnik A.V., Meehan M.J., Liu W.T., Crüsemann M., Boudreau P.D., Esquenazi E. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*. 2016;34(8):828–837.