



Diagnostyka wybranych chorób cywilizacyjnych z wykorzystaniem badań metabolomicznych

Wojciech Wojtowicz*

Metabolomika jest stosunkową nową dziedziną wiedzy należącą do systemowych nauk biologicznych, która po raz pierwszy oficjalnie została zdefiniowana przez Oliviera Fiehna w 2002 roku [1]. Zgodnie z założeniami, badania metabolomiczne bazują na jakościowym oraz ilościowym oznaczaniu metabolitów – związków niskocząsteczkowych (MW<1500 Da).

Do metod pomiarowych wykorzystywanych w metabolomice stosuje się chemiczne metody analityczne, z których często stosowaną metodą jest spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego ^1H oraz ^{13}C NMR [3,4,5] oraz rzadziej ^{31}P NMR [6]. Kolejną powszechnie używaną techniką analityczną jest spektrometria mas w połączeniu z chromatografią cieczą (LC-MS) [7] oraz gazową (GC-MS) [8]. Z tego powodu, że metodyka pomiarów w badaniach metabolomicznych polega na porównywaniu zmian wśród grupy obiektów badanych do grupy odniesienia, próbki do badań różnych rodzajów jednostek chorobowych pozyskiwane są zawsze od grupy pacjentów oraz od grupy kontrolnej odpowiadającej zbiorowi osób zdrowych. Źródła pochodzenia próbek mogą być bardzo różne, możliwe jest wykorzystanie szeroko pojętych biofluidów takich jak np. surowica [3,9], osocze [10], mocz [3,11] oraz ślina [12].

W badaniach sięga się również po fragmenty materiału tkankowego [13] czy też hodowle komórkowe [14]. Aby badane próbki były zanalizowane w jak najlepszy sposób stosuje się odpowiednie metody przygotowawcze, w zależności od rodzaju analizowanego materiału biologicznego. Wybór odpowiednich metod podyktowany jest rodzajem związków (polarnych lub/i niepolarnych), które zostaną poddane analizie, w tym celu stosuje się zarówno rozpuszczalniki wodne (bufory lub sól fizjologiczna) oraz metody ekstrakcji z wykorzystaniem rozpuszczalników organicznych takich jak metanol, chloroform, acetonitryl [10,15-18].

Dane otrzymywane w badaniach metabolomicznych, ze względu na ilość informacji, które niosą ze sobą, opracowywane są za pomocą metod chemometrycznych oraz statystycznych. Powszechnie wykorzystywane są: analiza głównych składowych (ang. PCA – Principal Component

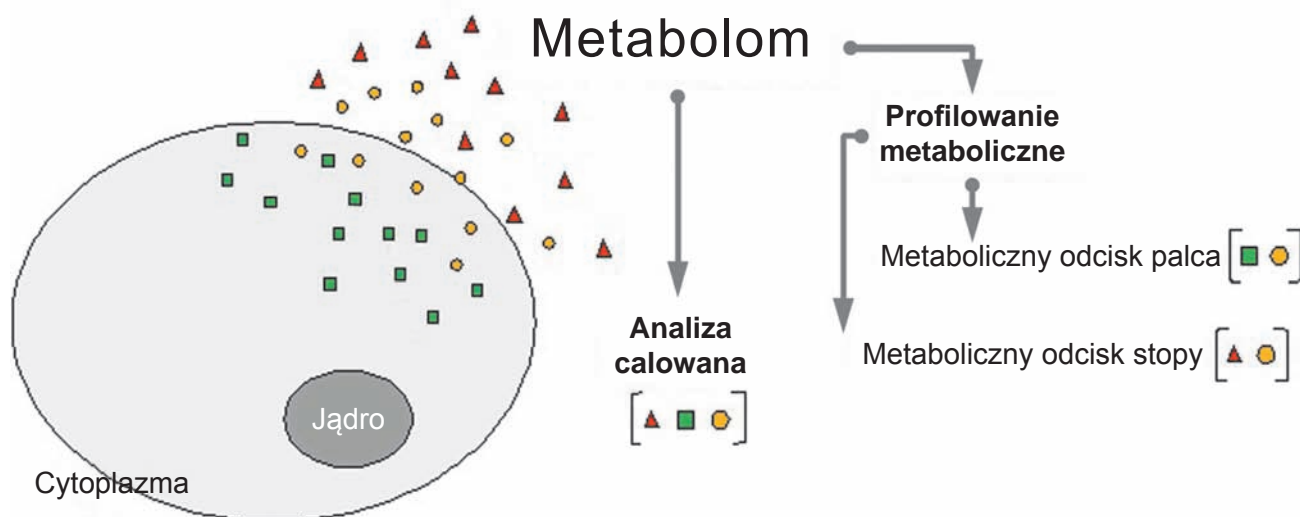
Analysis), regresja częściowa najmniejszych kwadratów (ang. PLS – Partial Least Squares Discriminant Analysis) oraz ortogonalna regresja częściowa najmniejszych kwadratów (ang. OPLS-DA – Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis) [19]. Dzięki tym metodom możliwe jest tworzenie między innymi modeli, które posiadają potencjalnie zastosowanie diagnostyczne. Dodatkowo do weryfikacji możliwości predykcyjnych obliczonych modeli wykorzystywana jest standardowa metoda krzywej operacyjnej odbiornika (ang. ROC – Receiver Operating Characteristic). Natomiast do sprawdzania różnicy w relatywnych stężeniach metabolitów pomiędzy porównywanymi grupami stosowana jest statystyka.

Ogólnie mówiąc, w metabolomice stosuje się dwa powszechne podejścia do analizy. Pierwszym podejściem jest analiza celowana, która polega na weryfikacji różnicy w relatywnych stężeniach

wcześniej zdefiniowanych metabolitów (np. grupy związków) w próbkach biologicznych. Drugim głównym nurtem jest profilowanie metabolomiczne, które polega na całościowym, ilościowym określaniu wszystkich występujących związków w próbce. Dodatkowo analizując za pomocą narzędzi metabolomicznych np. mikroorganizmy możemy wyróżnić dwa podejścia do badanego materiału. Pierwsze polega na analizie wewnątrzkomórkowych metabolitów, które nazywa się metabolomicznym odciskiem palca (ang. Fingerprinting), drugie – na badaniu substancji znajdujących się w płynie hodowlanym czyli medium metabolomicznym nazywane odciskiem stopy (ang. Footprinting) [2].

Choroby cywilizacyjne a metabolomika

Pomimo wysokiego rozwoju medycyny oraz technik diagnostycznych w XXI wieku nadal niewystarczająco dużo



Rys. 1. Schemat badań stosowanych w metabolomice

uwagi poświęca się zwiększaniu świadomości ludzi w zakresie kontroli stanu zdrowia. Dodatkowo, wraz z rozwojem współczesnej cywilizacji pojawił się problem chorób powiązanych ze stylem życia oraz towarzyszącymi czynnikami środowiskowymi (tzw. choroby cywilizacyjne). Do nich zaliczamy między innymi: cukrzycę typu II, choroby układu krążenia czy też niektóre rodzaje nowotworów [20]. Zbyt późna diagnostyka chorób cywilizacyjnych sprawia, że stanowią one przyczynę ponad połowy wszystkich notowanych zgonów. Diagnostyczne metody metabolomiczne mogą być wykorzystywane właśnie jako nowoczesne narzędzia do wczesnego, nieinwazyjnego oraz przesiewowego wykrywania chorób związanych z rozwojem cywilizacji. Duża liczba doniesień literaturowych wykorzystujących przedstawioną powyżej metodologię wskazuje na olbrzymi potencjał tej dziedziny wiedzy w diagnostyce medycznej [21].

Dla przykładu badania metabolomiczne zostały wykorzystane do diagnostyki różnych zmian nowotworowych zachodzących w płucach, wątrobie, nerkach, jajnikach, piersi, przełyku czy gruczole prostaty [4,13,22-24]. Podejście metabolomiczne zostało zastosowane również w przypadku diagnostyki oraz określania zmian patologicznych na poziomie molekularnym wielu innych stanów chorobowych klasyfikowanych jako choroby układu krążenia [25,26].

Ze względu na częstotliwość występowania oraz możliwości prowadzenia badań na podstawie analiz różnego materiału biologicznego cukrzyca typu II została obszernie przebadana za pomocą metod metabolomicznych [27-31]. W tym zakresie, przeprowadzone badania można podzielić na cztery podgrupy. Pierwsza skupia się głównie na umożliwieniu utworzenia modeli diagnostycznych w oparciu o profilowanie metabolomiczne, druga wyko-

rzystuje metodykę pozwalającą na wskazanie biomarkerów chorobowych, trzecia śledzi przebieg zmian w organizmie pacjenta w odpowiedzi na zastosowaną terapię, czwarta natomiast pozwala na określenie ryzyka występowania choroby.

Badaniami wskazującymi na przydatność metabolomiki w tym zakresie są badania grupy K. Suhre. W oparciu o wykorzystanie próbek osocza dla platformy NMR oraz próbek surowicy dla MS, przeprowadzono badania wykorzystujące łącznie 100 próbek podzielonych na dwie podstawowe grupy – grupę osób cierpiących na cukrzycę typu II (n=40) oraz grupę kontrolną (n=60). Uzyskano profil metabolomiczny identyfikując łącznie 432 metabolity. Dla tego zestawu unikalnych metabolitów, wyszczególniono 9, które były obecne w obu użytych metodach. W publikacji wskazano, iż kilka grup metabolitów oraz niektóre pojedyncze związki, mogą

wskazywać na zmiany zachodzące w szlakach biochemicznych podczas przebiegu choroby. Były nimi: podwyższony poziom cukrowych metabolitów, rozgałęzionych aminokwasów, 3-hydroksymaślanu, kreatyniny, siarczanu 3-indoksyli, wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. W pracy interpretując podwyższone stany tych metabolitów ustalono, że mogą być one związane odpowiednio ze zmienioną wrażliwością na insulinę, wzrostem aktywności cyklu glukozy-alaninowego, kwasicą ketonową, zaburzeniami czynności nerek i nefropatii oraz zmian w lipidowej homeostazie. Odnotowano również obniżenie poziomu metabolitów takich jak 1,5-anhydroglucitol, fosfatydylocholina, fosfatydyloetanolamina, kwasów tłuszczowych o średniej długości łańcuchów, kwasu arachidonowego, powiązanych z glikemią oraz jak wcześniej wspomniano ze zmianami w gospodarce lipidowej.



Dodatkowo zaobserwowano możliwość detekcji lub brak obecności niektórych innych związków [26].

Kolejnym przykładem wykorzystaniem metabolomiki jest możliwość rozróżnienia grupy pacjentów z cukrzycą typu II (ang. T2DM. Diabetes Mellitus type 2) od grupy kontrolnej. Badania polegające na analizie fosfolipidów były wykonane za pomocą metody LC/MS na grupie 69 próbek osocza (T2DM, n=34; 35 kontrola). Otrzymano wyniki w postaci modeli PLS-DA posiadających wysokie właściwości predykcyjne umożliwiające rozróżnienie zbioru próbek na dwie oddzielne podgrupy, wykazując różne, biegunowe rozłożenie próbek na wykresie PLS-DA pomiędzy osobami chorymi i zdrowymi [27].

Przeprowadzone badania z wykorzystaniem profilowania metabolomicznego pozwoliły na określenie poziomu zaawansowania nietolerancji glukozy oraz insulinooporności w przypadku pacjentów cierpiących na NGT (ang. Normal Glucose Tolerance), IGR (ang. Impaired glucose regulation) oraz T2DM [31]. Przy użyciu platformy NMR zmierzonych zostało 231 próbek surowicy (NGT, n=80;

IGR, n=77; T2DM, n=74) oraz przeprowadzono analizy chemiczne, które wyraźnie zwizualizowały rosnący trend zmian występujących pomiędzy grupami z NGT, IGR i T2DM. Poprzez analizę otrzymanych wyników określono, że zmiany obecne w surowicy oprócz tych oczywistych, związanych ze stężeniem glukozy również tyczą się zmian w metabolizmie aminokwasów oraz gospodarki lipidowej metabolitów. Zmiany w stężeniu zmierzonych związków, w zależności od grupy i porównania zaprezentowano w tabeli 1., w której zaobserwowano obszernie zmiany w zakresie stężeń aminokwasów oraz cytrynianu i mleczanu. Dzięki temu rozdziłowemu określono przynależność pacjentów do danych grup oznaczających rozwój, bądź ryzyko choroby.

Potencjalne biomarkery ryzyka zachorowania na cukrzycę typu II zostały określone metodą MS z zastosowaniem platformy łączącej analizę metabolitów i białek [29]. W przeprowadzonych porównaniach wytypowano zbiór trzech metabolitów takich jak glicyna, lizofosfatydylocholina (18:2) i acetylokarnityny (C2), u których zaobserwowano zna-

czącą różnicę w stężeniach. W przypadku glicyny i lizofosfatydylocholina jest to spadek stężenia, natomiast dla acetylokarnityny (C2) odnotowano wzrost, wyniki te potwierdzono również badaniami genetycznymi. W połączeniu dane te umożliwiły wyznaczenie związków, które mogą wskazywać na ryzyko zachorowania na T2DM. Ważny również jest fakt, że powyższe badania przeprowadzono na obszernej grupie próbek surowicy (n=4297).

Dzięki zastosowaniu badań metabolomicznych możliwa jest kontrola przebiegu terapii oraz jej skutków dla organizmu. W pracy zespołu Y. Gua, [30] przeprowadzono badania na bazie 116 próbek surowicy z zastosowaniem spektrometrii mas. Badania wykonano również z wykorzystaniem prób placebo. Miało to na celu weryfikację, poprzez analizę celowaną, wpływu berberyny na gospodarkę lipidową u pacjentów z T2DM. Wykazano poprzez analizę metabolomiczną różnicę w stężeniu 13 różnych kwasów tłuszczowych (C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, C20:0, C20:1, C20:2, C20:3, C20:4, C22:5, C22:6 and C24:1), na których

poziom wpływa stosowanie berberyny. Stężenia wyżej wymienionych kwasów tłuszczowych były znacznie obniżone w grupie chorych w stosunku do grupy osób chorych będących w grupie placebo. Dodatkowo stężenie C16:0 i C18:0 w grupie chorych poddanych działaniu berberyny było podobne do wyników uzyskanych dla osób zdrowych.

Metabolomika jako nauka bardzo szybko rozwija się i z roku na rok poszerzane są jej granice zastosowania. Możliwości jakie niesie ze sobą są coraz częściej doceniane i wykorzystywane w różnych gałęziach nauki, ale także sektora prywatnego. Badania opisywane w literaturze coraz częściej wskazują na możliwość wykorzystywania metabolomiki jako pomocy w diagnozowaniu chorób, ich przebiegu a nawet możliwości prewencji poprzez wykrywanie bardzo wczesnych zmian. Potencjalnie może to doprowadzić do zmniejszenia liczby występujących niektórych chorób cywilizacyjnych. Ilość publikacji ujawniających odkrycie nowych biomarkerów chorobowych, czy też utworzenia modeli diagnostycznych dla różnych jednostek chorobowych z bardzo

Tabela 1. Statystycznie istotne zmiany metabolitów w grupach z inną nietolerancją na glukozę

Metabolity	IGR vs NGT	T2DM vs IGR	T2DM vs NGT	Metabolity	IGR vs NGT	T2DM vs IGR	T2DM vs NGT
HDL		↓	↓	Lizyna		↓	↓
Izoleucyna			↓	Cholina		↓	↓
Leucyna			↓	Tyrozyna		↓	↓
Walina			↓	Mleczan	↓	↓	↓
Alanina	↓	↓	↓	Tyrozyna	↓	↓	↓
Metionina			↓	Feniloalanina	↓	↓	↓
Glutamina	↓	↓	↓	Histydyna	↓	↓	↓
Cytrynian		↓	↓	Glukoza		↑	↑



wysoką czułością diagnostyczną ciągle wzrasta. Najważniejsze jest jednak obecnie doprowadzenie do wyznaczenia standardowych procedur, które będą możliwe do wykorzystania w różnych niezależnych placówkach umożliwiając powtarzalności otrzymanych wyników i tworzenie dobrze funkcjonujących, pewnych i czułych metod diagnostycznych. Na rynku obecnych jest już wiele firm oferujących kompleksowe badania metaboliczne.

Literatura

[1] Fiehn O. *Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes*. Plant Mol Biol. 2002 Jan; 48(1-2):155-71. Review. PubMed PMID: 11860207.

[2] Roberts LD, Souza AL, Gerszten RE, Clish CB. *Targeted Metabolomics*. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2012; Unit30.2. doi:10.1002/0471142727.mb3002s98.

[3] Dawiskiba T, Deja S, Mulak A, et al. *Serum and urine metabolic fingerprinting in diagnostics of inflammatory bowel disease*. World Journal of Gastroenterology: WJG. 2014;20(1):163-174. doi:10.3748/wjg.v20.i1.163.

[4] S. Deja, I. Porebska, A. Kowal, et al. *Metabolomics provide new insights on lung cancer staging and discrimination from chronic obstructive pulmonary disease*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Volume 100, November 2014, Pages 369-380, ISSN 0731-7085, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2014.08.020>.

[5] Bag, S., Banerjee, D.R., Basak, A., Das, A.K., Pal, M., Banerjee, R., Paul, R.R., Chatter-

jee, J. *NMR (1H and 13C) based signatures of abnormal choline metabolism in oral squamous cell carcinoma with no prominent Warburg effect*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015.

[6] Raffelt K, Moka, D, Süllentrop F, Dietlein M, Hahn J, Schicha H, *Systemic alterations in phospholipid concentrations of blood plasma in patients with thyroid carcinoma: an in vitro 31P high-resolution NMR study*, NMR Biomed 2000 Jan;13(1):8-13.

[7] Ciborowski M, Teul J, Martin-Ventura JL, Egido J, Barbas C, *Metabolomics with LC-QTOF-MS Permits the Prediction of Disease Stage in Aortic Abdominal Aneurysm Based on Plasma Metabolic Fingerprint*. PLoS ONE 7(2): e31982, 2012, doi:10.1371/journal.pone.0031982

[8] Jing Chen, Xinjie Zhao, Jens Fritsche, Peiyuan Yin, Philippe Schmitt-Kopplin, Wenzhao Wang, Xin Lu, Hans Ulrich Häring, Erwin D. Schleicher, Rainer Lehmann, Guowang Xu, *Practical Approach for the Identification and Isomer Elucidation of Biomarkers Detected in a Metabonomic Study for the Discovery of Individuals at Risk for Diabetes by Integrating the Chromatographic and Mass Spectrometric Information*, Analytical Chemistry, 2008 80 (4), 1280-1289 DOI: 10.1021/ac702089h.

[9] Lin L, Huang Z, Gao Y, Yan X, Xing J, Hang W. *LC-MS based serum metabonomic analysis for renal cell carcinoma diagnosis, staging, and biomarker discovery*. J Proteome Res. 2011 Mar 4;10(3):1396-405. doi: 10.1021/pr101161u.



Pomiary w laboratorium

Rozwiązania METTLER TOLEDO do laboratorium obejmują automatyczne pomiary analityczne, wydajne opracowywanie procesów chemicznych oraz automatyzację pomiarów laboratoryjnych i procesów produkcyjnych. Dodatkowe usługi gwarantują zgodność z oficjalnymi normami oraz spójne i dokładne dane pomiarowe.

Produkty i rozwiązania

Automatyzacja badań chemicznych
Wagi, ważenie laboratoryjne
Instrumenty analityczne
Pipety i końcówki
Kontrola procesów przemysłowych



www.mt.com

METTLER TOLEDO



- [10] Jiye A, Johan Trygg, Jonas Gullberg, Annika I. Johansson, Pär Jonsson, Henrik Antti, Stefan L. Marklund, Thomas Moritz, *Extraction and GC/MS Analysis of the Human Blood Plasma Metabolome*, Analytical Chemistry, 2005 77 (24), 8086-8094 DOI:10.1021/ac051211v.
- [11] KIm, K., Aronov, P., Zakharkin, S.O., Anderson, D., Perroud, B., Thompson, I.M., Weiss, R.H. *Urine metabolomics analysis for kidney cancer detection and biomarker discovery*, Molecular and Cellular Proteomics, 2009, 8 (3), pp. 558-570.
- [12] Bertram HC, Eggers N, Eller N., *Potential of human saliva for nuclear magnetic resonance-based metabolomics and for health-related biomarker identification*, Anal Chem. 2009 Nov 1;81(21):9188-93. doi: 10.1021/ac9020598.
- [13] Deja S, Dawiskiba T, Balcerzak W, Orczyk-Pawiliowicz M, Głód M, et al. (2013) *Follicular Adenomas Exhibit a Unique Metabolic Profile. 1H NMR Studies of Thyroid Lesions*, PLoS ONE 8(12): e84637. doi: 10.1371/journal.pone.0084637.
- [14] C. Ibáñez, C. Simó, A. Valdés, L. Campone, A. L. Piccinelli, V. García-Cañas, A. Cifuentes, *Metabolomics of adherent mammalian cells by capillary electrophoresis-mass spectrometry: HT-29 cells as case study*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Volume 110, 10 June 2015, Pages 83-92, ISSN 0731-7085, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2015.03.001>.
- [15] Nagana Gowda GA, Gowda YN, Raftery D. *Expanding the limits of human blood metabolite quantitation using NMR spectroscopy*, Anal Chem, 2015 Jan 6;87(1):706-15. doi: 10.1021/ac503651e. Epub 2014 Dec 8. PubMed PMID: 25485990;
- [16] Huifeng Wu, Andrew D. Southam, Adam Hines, Mark R. Viant, *High-throughput tissue extraction protocol for NMR- and MS-based metabolomics*, Analytical Biochemistry, Volume 372, Issue 2, 15 January 2008, Pages 204-212, ISSN 0003-2697, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2007.10.002>.
- [17] Lin, C.Y., Wu, H., Tjeerdema, R.S., Viant, M.R. *Evaluation of metabolite extraction strategies from tissue samples using NMR metabolomics*, Metabolomics, 2007, 3 (1), pp. 55-67.
- [18] André B. Canelas, Angela ten Pierick, Cor Ras, Reza M. Seifar, Jan C. van Dam, Walter M. van Gulik, and Joseph J. Heijnen, *Quantitative Evaluation of Intracellular Metabolite Extraction Techniques for Yeast Metabolomics*, Analytical Chemistry, 2009 81 (17), 7379-7389 DOI: 10.1021/ac900999t.
- [19] Madsen R, Lundstedt T, Trygg J. *Chemometrics in metabolomics – a review in human disease diagnosis*, Anal Chim Acta. 2010 Feb 5;659(1-2):23-33. doi:10.1016/j.aca.2009.11.042. Epub 2009 Nov 22. Review. PubMed PMID: 2010310.
- [20] Howe GM, Loraine JA, *Environmental Medicine*, Elsevier, 2013.
- [21] Vermeersch KA, Styczynski MP. *Application of metabolomics in cancer research*, J Carcinog 2013; 12:9.
- [22] Roberts MJ, Schirra HJ, Lavin MF, Gardiner RA., *Metabolomics: a novel approach to early and non-invasive prostate cancer detection*, Korean J Urol. 2011 Feb;52(2):79-89. doi:10.4111/kju.2011.52.2.79.
- [23] Kumar V, Dwivedi DK, Jagannathan NR. *High-resolution NMR spectroscopy of human body fluids and tissues in relation to prostate cancer*. NMR Biomed 2013; DOI:10.1002/nbm.2979.
- [24] Abbasi-Ghadi N, Kumar S, Huang J, Goldin R, Takats Z, Hanna GB. *Metabolomic profiling of oesophago-gastric cancer: a systematic review*, Eur J Cancer 2013 Jul 26 pii: S0959-8049(13)00548-0. doi: 10.1016/j.ejca.2013.07.004.
- [25] Wheelock, C.E., Wheelock, A.M., Kawashima, S., Diez, D., Kanehisa, M., Van Erk, M., Kleemann, R., Haegström, J.Z., Goto, S., *Systems biology approaches and pathway tools for investigating cardiovascular disease*, 2009, Molecular BioSystems, 5 (6), pp. 588-602, DOI: 10.1039/b902356a
- [26] Lewis, G. D., Asnani, A., Gerszten, R.E., *Application of Metabolomics to Cardiovascular Biomarker and Pathway Discovery*, 2008, Journal of the American College of Cardiology, 52 (2), pp. 117-123, DOI: 10.1016/j.jacc.2008.03.043.
- [27] C. Wang, H. Kong, Y. Guan, J. Yang, J. Gu, S. Yang, G. Xu, *Plasma Phospholipid Metabolic Profiling and Biomarkers of Type 2 Diabetes Mellitus Based on High-Performance Liquid Chromatography/ Electrospray Mass Spectrometry and Multivariate Statistical Analysis*, Anal. Chem. 2005, 77, 4108-4116.
- [28] Suhre K, Meisinger C, Döring A, Altmaier E, Belcredi P, et al., *Metabolic Footprint of Diabetes: A Multiplatform Metabolomics Study in an Epidemiological Setting*, 2010, PLoS ONE 5(11): e13953. doi: 10.1371/journal.pone.0013953.
- [29] R. Wang-Sattler, Z. Yu, c. Herder et al., *Novel biomarkers for pre-diabetes identified by metabolomics*, Molecular Systems Biology, 2012, 8: 615, DOI 10.1038/msb.2012.43.
- [30] Y. Gu, Y. Zhang, X. Shi, X. Li, J. Hong, J. Chen, W. Gu, X. Lu, G. Xu, G., Ning, *Effect of traditional Chinese medicine berberine on type 2 diabetes based on comprehensive metabolomics*, Talanta, Volume 81, Issue 3, 15 May 2010, Pages 766-772, ISSN 0039-9140, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2010.01.015>.
- [31] X. Zhang, Y. Wang, F. Hao, X. Zhou, X. Han, H. Tang, L. Ji, *Human Serum Metabolomic Analysis Reveals Progression Axes for Glucose Intolerance and Insulin Resistance*, Journal of Proteome Research, 2009 8 (11), 5188-5195 DOI: 10.1021/pr900524z/

* Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław