



Metabolomika – wyzwanie dla współczesnej spektrometrii mas cz. 1

Agnieszka Ulanowska, Grzegorz Strączyński*

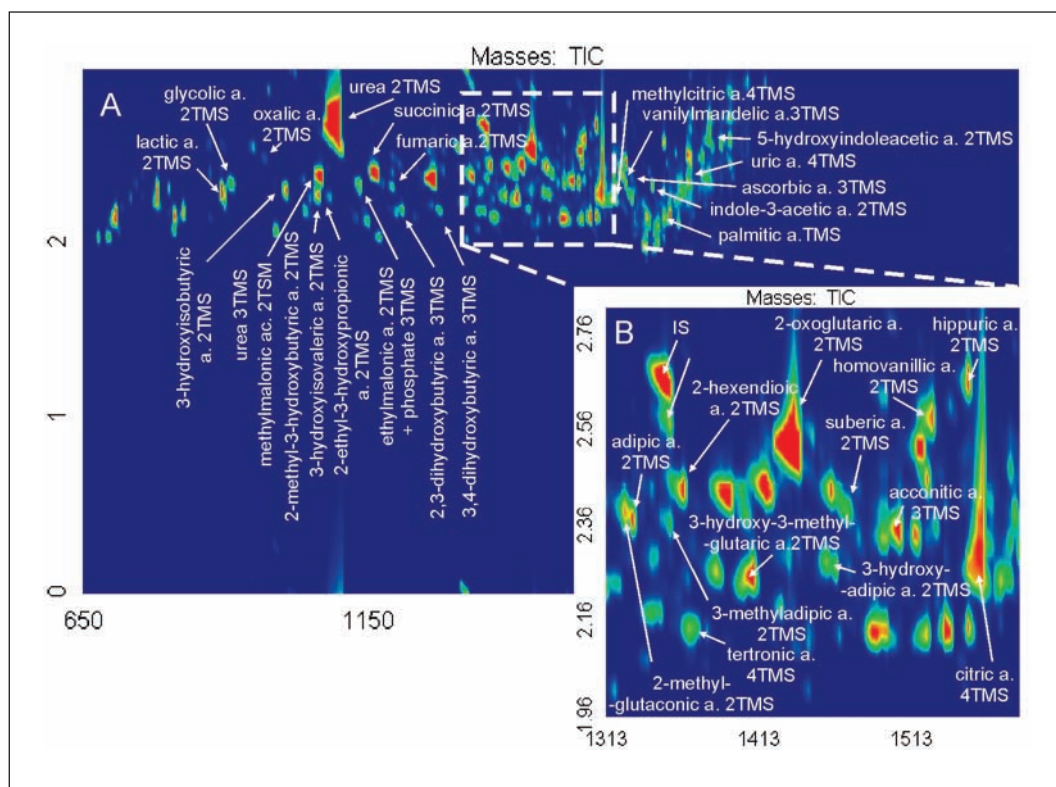
Pod określeniem metabolomika kryje się dziedzina nauki zajmująca się badaniem i analizą metabolitów obecnych w komórkach organizmów żywych. Niekiedy bezpośrednim celem metabolomiki jest poszukiwanie specyficznych biomarkerów, sygnalizujących zmiany zachodzące w ustroju. Metabolity są produktami lub półproduktami przemiany materii, najczęściej są to pochodne aminokwasów, lipidów, węglowodanów, nukleotydów oraz hormonów. Masa cząsteczkowa wymienionych substancji nie przekracza najczęściej 1kD, mimo to ich analiza jest bardzo skomplikowana ze względu na dużą różnorodność metabolitów, podobieństwa w ich budowie strukturalnej, a także skomplikowana matryca próbek biologicznych.

Pomimo występowania trudności w oznaczaniu metabolitów, zainteresowanie metabolomiką stale rośnie i znajduje ona coraz szersze zastosowanie, np. w toksykologii, gdzie dzięki analizie metabolitów możliwe jest wykrycie różnych zmian fizjologicznych w organizmie spowodowanych obecnością substancji toksycznych. Oznacza się substancje charakterystyczne dla określonych chorób, które nazywa się wówczas biomarkerami chorób. Metabolomikę wykorzystuje się także w genomice funkcjonalnej do oznaczania metabolomu po manipulacjach genetycznych (GMO) i w nutrigenomice, np. do śledzenia zmian w metabolizmie człowieka wywołanych stosowaniem określonej diety. Ta dziedzina nauki ma ogromne znaczenie w badaniach wpływu nowo zsyntezowanych substancji, które potencjalnie miałyby zostać zastosowane w medycynie jako leki.

W laboratoriach analitycznych do badania metabolitów wykorzystuje się najczęściej chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas (GC/MS), kolumnową chromatografię ciekłą sprzężoną ze spektrometrią mas (LC/MS) oraz elektroforezę kapilarną (CE). Jednakże to techniki sprzężone ze spektrometrią mas umożliwiającą jednoznaczny analizę jakościową oraz wykonanie analizy ilościowej analitów. Badanie metabolitów w próbkach biologicznych zalicza się do analiz nieukierunkowanych, w których nadrzędnym celem jest uzyskanie największej ilości informacji z próbki poprzez oznaczenie możliwie największej ilości analitów. Do tego typu analiz rekomenduje się stosowanie spektrometrii mas czasu przelotu (TOF MS), która zapewnia wysoką czułość, dużą szybkość akwizycji danych oraz automatyczną identyfikację analizowanych substancji. Ze względu na

ogromną ilość substancji obecnych w próbce biologicznej, niemalże doskonałym rozwiązaniem analitycznym jest dwuwymiarowa chromatografia gazowa (GCxGC), która pozwala na zwiększenie pojemności pikowej układu, co zapewnia lepsze rozdzielanie analitów. Ponadto dzięki stosowaniu modulacji między pierwszym a drugim wymiarem, piki w drugim wymiarze są bardzo wąskie (ok. 0,1-0,3 s), co bezpośrednio wpływa na obniżenie poziomu wykrywalności substancji. Duża częstotliwość zbierania danych pozwala na rejestrację widm bardzo dobrej jakości, które znacznie ułatwiają identyfikację analitów dzięki zastosowaniu dekonwolucji i automatycznego wyszukiwania pików dostępnych w oprogramowaniu. Mocz jest jednym z głównych materiałów biologicznych pobieranych do badania metabolitów różnego pochodzenia. Oznaczanie metabolitów

w tym płynie ustrojowym niesie ze sobą korzyści związane z łatwością pobierania próbki oraz nieinwazyjnością tego procesu w odniesieniu do pobierania krwi lub płynu mózgowo-rdzeniowego. Ponadto, mocz mimo iż zawiera dużą ilość kwasów organicznych, puryn, pirymidyn, pochodnych glicyny, aminokwasów oraz substancji będących metabolitami przyjmowanych leków lub pożywienia, jest zdecydowanie mniej skomplikowaną matrycą niż np. krew. Pilotażowe badania związane z określeniem substancji odpowiedzialnych za acydurię, wykonano poprzez analizę próbki moczu za pomocą dwuwymiarowej chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas czasu przelotu (GCxGC-TOFMS) [1]. Acyduria należy do chorób dziedzicznych związanych z problemem metabolizmu kwasów organicznych, które powodują zakwaszenie moczu. Istnieje kilka odmian



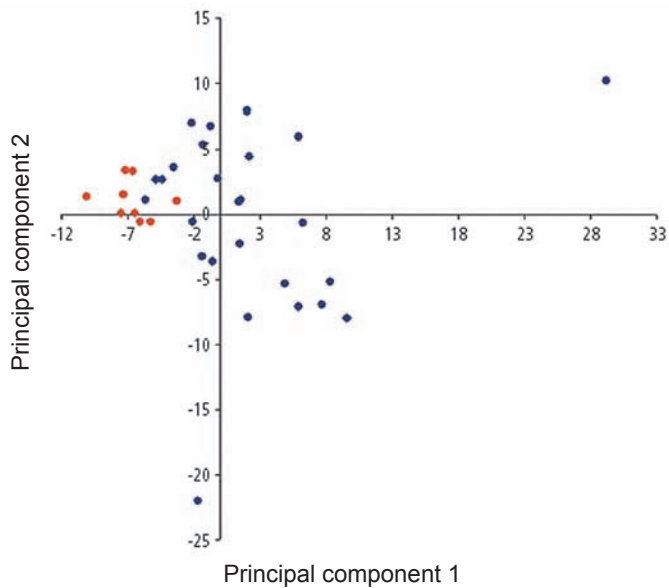
Rys. 1. Chromatogram analizy próbki moczu pobranej od osoby zdrowej wykonany techniką GCxGC-TOFMS [1]

tej przypadłości, jak np. acyduria mewalonianowa lub aceduria etylmalonowa. Do badań wykorzystano próbki pobrane od siedmiorgo dzieci cierpiących na różne odmiany tej choroby. Jako grupę odniesienia stosowano próbki moczu pobrane od 10 zdrowych osób. Przed wykonaniem analiz chromatograficznych próbki poddano ekstrakcji oraz przeprowadzono derywatazację analitów za pomocą trimetylosililotrifluoroacetamidu (MTBSTFA). Zastosowanie GCxGC-TOFMS (Pegasus 4D, LECO Corp.) do analizy metabolitów w moczu pozwoliło na wykrycie prawie 3500 różnych substancji przy ustalonym S/N równym 200. W badanych próbkach zidentyfikowano ponad 200

związków chemicznych, które określono mianem metabolitów. Wśród nich wyselekcjonowano grupę 21 substancji, w przypadku których zaobserwowano wzrost stężenia w próbkach osób cierpiących z powodu acydurii w odniesieniu do osób zdrowych. Analogiczne badania wykonano z wykorzystaniem jednowymiarowej chromatografii gazowej. Jako detektor zastosowano spektrometr mas wyposażony w analizator kwadropolowy. Jednakże skomplikowana matryca uniemożliwiła uzyskanie satysfakcjonującego rozdzielenia analitów a przez to również identyfikacji. W zależności od matrycy próbki biologicznej pobranej od człowieka tj. osocze, su-

rowica czy mocz, może znajdować się w niej od 10^3 do nawet 10^7 substancji, a wśród nich ok. 2000-2500 metabolitów. Tak duża ilość analitów w próbce powoduje przeładowanie w przypadku chromatografii jednowymiarowej, stąd też celowym staje się stosowanie układów dwuwymiarowych do analizy tego typu próbek. System LECO Corp. o nazwie Pegasus 4D (GCxGC-TOFMS) zastosowano do analizy próbek osocza pobranego od 15 osób cierpiących z powodu niedoczynności układu sercowo-naczyniowego [2]. Jako grupę odniesienia stosowano osocze pobrane od 81 osób zdrowych. Celem badania było określenie profilu metabolitów charakterystycznych dla osób z chorobą ukła-

du krążenia oraz wskazanie użyteczności dużej przepustowości oraz bardzo dobrej rozdzielczości dwuwymiarowej chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas czasu przelotu (GCxGC-TOFMS) w analizach medycznych. Podczas prowadzenia eksperymentu udowodniono, że badając profil metabolomiczny człowieka naukowcy są w stanie określić skłonność pacjenta do zachorowania na konkretną chorobę. Wszystkie osoby poddane badaniu proszone były o wypełnienie ankiety dotyczącej stanu zdrowia i prowadzonego trybu życia (płeć, wiek, waga, palenie tytoniu, picie alkoholu, przebyte choroby, itp.). Parametry te uwzględniano następnie podczas wnioskowania statystycznego i oceny ryzyka zachorowania na choroby układu krążenia. Próbki osocza filtrowano, następnie metabolity poddawano derywatacji BSTFA i analizowano za pomocą Pegasus 4D w ciągu 20 minut. Tak krótki czas analizy próbek, pozwolił na przebadanie wszystkich 96 próbek w ciągu 2 dni. Dzięki dekonwolucji oraz funkcji automatycznego wyszukiwania pików, zidentyfikowano ponad 3000 różnych substancji organicznych w badanych próbkach. Obliczona na podstawie otrzymanych wyników pojemność pikowa systemu wynosiła w przybliżeniu $4,1 \times 10^3$. Dzięki tej wartości określono tak ogromną liczbę analitów. Otrzymane dane eksperymentalne eksportowano do pliku CSV w celu wykonania analizy PCA w programie statystycznym. Na rys. 2 zamieszczono wykres



Rys. 2. Rozmieszczenie próbek osocza pobranych od mężczyzn o normalnym wskaźniku BMI cierpiących na choroby układu krążenia (kolor czerwony) i zdrowych mężczyzn o normalnym BMI (kolor niebieski) w przestrzeni dwóch składników głównych [2]

PCA obrazujący rozmieszczenie próbek pobranych od mężczyzn o normalnym wskaźniku masy ciała (ang. *body mass index*, BMI) cierpiących na choroby układu krążenia i zdrowych mężczyzn o normalnym BMI w przestrzeni dwóch składników głównych.

Na podstawie przeprowadzonych badań zaobserwowano, że kwas aminomalony oraz kwas acetylooctowy wykryto odpowiednio w 75% i 23% próbek pobranych od osób zdrowych. Te same substancje identyfikowano znacznie częściej u osób cierpiących z powodu chorób układu krążenia: kwas aminomalony w 95% i kwas acetylooctowy w 93% populacji. Według naukowców kwas acetylooctowy powstaje w wątrobie, a jego obecność w organizmie związana jest z degradacją nadmiaru kwasów

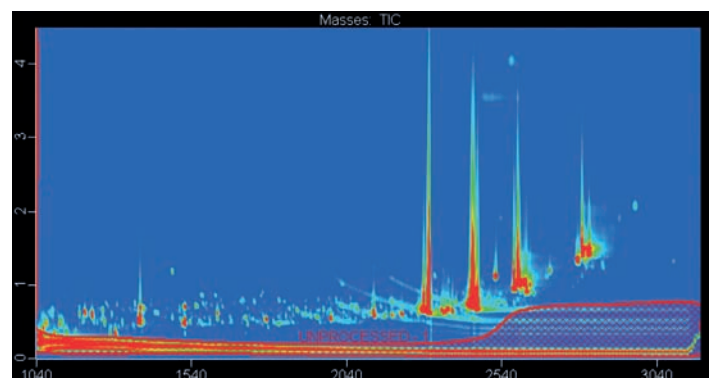
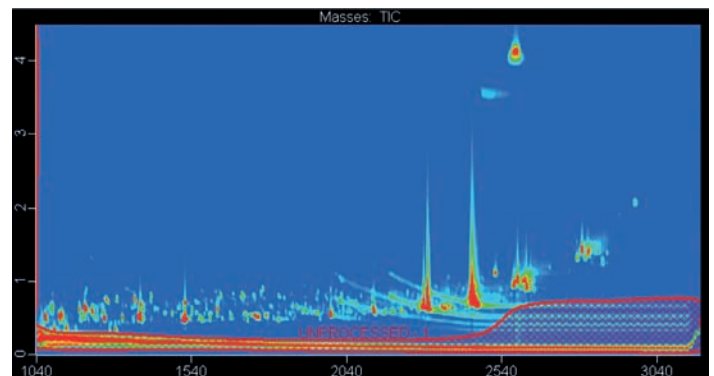
tłuszczowych. Metabolit ten został uznany za biomarker chorób serca u osób ze skłonnością do ketozy.

Dwuwymiarowa chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas czasu przelotu (GCxGC-TOFMS) może być również z powodzeniem stosowana do badań nad określeniem metabolitów obecnych w tkankach zwierzęcych. Celem przeprowadzonego eksperymentu było rozróżnienie poszczególnych gatunków ryb wykorzystując ich profil metabolomiczny [3]. Próbkę do badań stanowiło 2,5 g tkanki mięśniowej pobranej z okonia i pstrąga. Próbkę przygotowano poprzez ekstrakcję i derywatyzację za pomocą MTBSTFA. Przeprowadzona analiza chromatograficzna pozwoliła na wykrycie ponad 1900 sub-

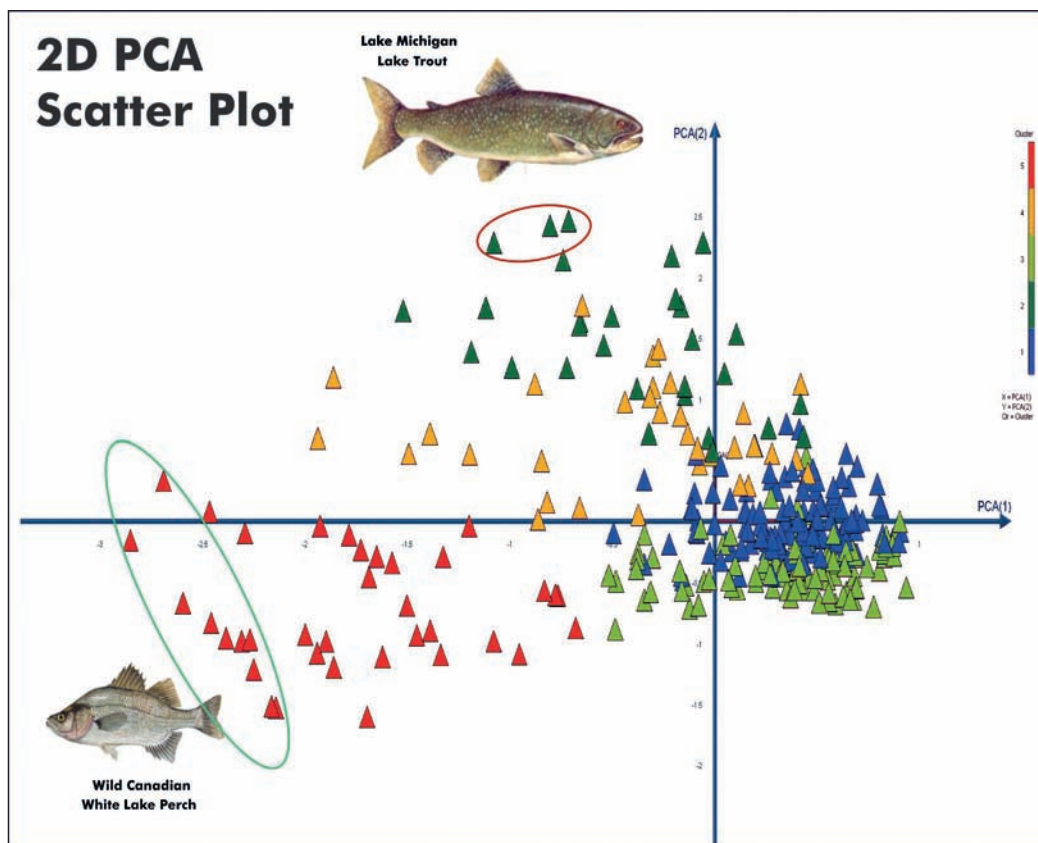
stancji w przypadku próbki pobranej od pstrąga i ponad 1950 w przypadku okonia, przy zastosowanym S/N równym 200. Dwuwymiarowe chromatogramy wykonane techniką GCxGC-TOFMS zaprezentowano na rys. 3. Na chromatogramach czerwonym kolorem zaznaczono obszar, który nie został przeanalizowany pod kątem obróbki danych, ponieważ obejmuje on substancje stanowiące wypełnienie kolumny oraz rozpuszczalniki zastosowane do przygotowania próbki. Stosując taki zabieg można skrócić czas przetwarzania i obróbki zgromadzonych danych analitycznych. Do porównania ze sobą dwóch otrzymanych grup próbek

wykorzystano jedną z opcji oprogramowania ChromaTOF – „*Statistical Compare*”. Funkcja ta pozwala podzielić próbki wykorzystując dane z tabeli otrzymywanej zawsze po przeanalizowaniu próbek, czyli wysokość i powierzchnia piku, czas retencji, etc. i stworzyć tabelę z substancjami statystycznie istotnymi. Ponadto oprogramowanie pozwala na obliczenie parametru o nazwie „*Fisher Ratio*”, który wskazuje na nie zaobserwowane wcześniej różnice chemiczne pośród stworzonych klas próbek o skomplikowanej macierzy.

Dane otrzymane w wyniku zastosowania opcji statystycznego porównania próbek zostały wykorzystane do wykonania



Rys. 3. Chromatogramy wykonane techniką GCxGC TOF MS dla wyekstrahowanych substancji z tkanki pstrąga (góra) i okonia (dół) po derywatywacji za pomocą MTBSTFA [3]



Rys. 4. Wizualizacja analizy głównych składowych (PCA) i analizy skupień (CA), które umożliwiły określenie 10 metabolitów charakterystycznych dla okonia (zaznaczone zielonym owalem) i 3 substancji charakterystycznych dla pstrąga (zaznaczonych czerwonym owalem) [3]

analizy głównych składowych (ang. principal component analysis, PCA) i analizy klastrowej (ang. cluster analysis, CA), co w konsekwencji pozwoliło na określenie metabolitów charakterystycznych dla okonia i pstrąga. Wykres obrazujący wynik analizy głównych składowych (PCA) i analizy skupień (CA) zamieszczono na rys. 4.

Stosowanie systemu Pegasus 4D (GCxGC-TOFMS) do analizy próbek biologicznych w kierunku badań nad metabolitami, pozwala na bardzo dobre rozdzielanie analitów ukrytych w skomplikowanej macierzy. Dobre rozdzielanie substancji jest zasługą dużej

pojemności pikowej układu dwuwymiarowego. Pegasus 4D charakteryzuje się dużą przepustowością i umożliwia przeanalizowanie ponad 50 próbek dziennie, dzięki zoptymalizowanemu programowi temperatury pieca. Aparat ten może pracować w trybie ciągłej pracy przez kilka dni, dlatego też z powodzeniem stosowany jest w laboratoriach medycznych do analizy próbek biologicznych. Dzięki przyjaznemu użytkownikowi oprogramowaniu ChromaTOF, większość analitów identyfikowana jest automatycznie, co znacznie skraca czas obróbki chromatogramów. Dane chromatograficzne i spektro-

skopowe, zapisywane w pamięci komputera bez problemu zapisywane są w formacie pliku, który pozwala na dalsze ich przetwarzanie np. za pomocą wybranych przez operatora programów statystycznych.

Oprócz układów GCxGC-TOFMS o rozdzielczości nominalnej, które zapewniają bardzo dobre rozdzielanie analitów, coraz częściej w metabolomice stosowane są systemy sprzężone z wysokorozdzielczą spektrometrią mas, w przypadku których rozdzielanie substancji w kolumnie jest nieco mniej istotne. Wysokorozdzielcze spektrometry mas dokonują

bardzo dokładnego pomiaru masy substancji, co pozwala na niemalże jednoznaczną ich identyfikację. Aspekt wykorzystania układów wyposażonych w wysokorozdzielcze spektrometry mas w metabolomice będzie przedmiotem rozważań drugiej części artykułu.

Literatura

- [1] P. Wojtowicz, J. Zrostlikova, T. Kovalczuk, J. Schurek, T. Adam, Evaluation of comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry for the diagnosis of inherited metabolic disorders using an automated data processing strategy, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 8054–8061
- [2] A.W. Culbertson, W.B. Williams, A.G. Mckee, X. Zhang, K.L. March, S. Naylor, S.J. Valentine, Inside the personalized medicine toolbox: GCxGC mass spectrometry for high-throughput profiling of the human plasma metabolome, *LCGC North America* 26 (2008) 560-569
- [3] J. Heim, Utilization of Statistical Compare Software and Fisher Ratios Prior to Multivariate Analysis for Complex GCxGCTOFMS Data in Order to Define Statistical Variation Between the Small Molecule Metabolite Profiles of Different Fish Species, *LECO Application Notes* No. 203-821-377 3/10-REV1 (2010)

* Agnieszka Ulanowska, Grzegorz Strączyński, LECO Polska Sp. z o.o., ul. Czarna 4, 43-100 Tychy, e-mail: leco@leco.com.pl