

Фурина Р.Р.

МЕТАБОЛОМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ОНКОЛОГИИ

ГБУ РМЭ «Республиканская клиническая больница», 424030, г. Йошкар-Ола

В представленной статье затронуты вопросы применения метаболомических исследований в онкологии. Основная идея метаболомики заключается в обнаружении специфических биомаркеров в биологическом образце для диагностики. В качестве биомаркеров рассматриваются летучие органические вещества – метаболиты, выделенные из различных биологических образцов (ткани, кровь, моча, выдыхаемый воздух). В статье отражены основные методы разделения и идентификации летучих органических веществ образца (газовая хроматография, масс-спектрометрия, спектроскопия ядерного магнитного резонанса), применяемые в метаболомике. Представлены результаты лабораторных исследований по поиску биомаркеров онкологических заболеваний различных органов. Показаны качественные характеристики метаболома биологического образца пациента с той или иной патологией. Кроме того, уделено внимание применению возможностей метаболомики в экспериментальной медицине. Материал может помочь в решении вопросов ранней диагностики онкологических заболеваний.

Ключевые слова: метаболомика; летучие органические вещества; биомаркеры; газовая хроматография; масс-спектрометрия.

METABOLOMIC RESEARCH IN ONCOLOGY

Furina R.R.

Republican clinical hospital, 424030, Yoshkar-Ola, Russia Federation

This paper deals with the questions of the metabolomics research results application in medicine. The central idea metabolomics is to identify the specific biomarkers in a biological sample used in a diagnostics. The volatile organic compounds - metabolites isolated from various tissues and biological fluids (blood, urine, sputum, exhaled air) are considered as biomarkers. The paper also describes main methods of separation and identification of volatile organic compounds (gas chromatography, mass spectrometry, nuclear magnetic resonance spectroscopy) applied in metabolomics. The paper presents some results of laboratory research aimed at the detection of different organs' cancer biomarkers. The quality characteristics of the metabolome from a biological patient sample with different pathology are discussed. Special attention is paid to the application of metabolomics possibilities in experimental medicine. The presented material will be of some help in solving the problems of early diagnosis of cancer.

Key words: metabolomics; volatile organic compounds; biomarkers; gas chromatography; mass spectrometry.

По данным Всемирной организации здравоохранения, каждый год от онкологических заболеваний в мире умирают более 7,5 млн человек. В России на конец 2012 г. на учете в онкологических учреждениях состояли более 3,0 млн больных. Заболевание в 60 % случаев диагностируется в III–IV стадиях. Высокий уровень смертности в России от онкологических заболеваний обусловлен поздним выявлением недугов [1].

Для обнаружения опухолевого процесса необходимо применение разнообразных методов диагностики, каждый из которых имеет свои возможности и ограничения. На сегодня скрининговые исследования сосредоточились, прежде всего, на методиках отображения, таких как компьютерная томография, магнитно-резонансная томография, эндоскопия и ультрасонография, в сочетании с клиническими анализами; однако эти методы отнимают много времени и дискомфортны для пациентов, требуют квалифицированного штата врачей и дорогого оборудования.

Золотым стандартом для диагностики и определения стадии раковых заболеваний является гисто-

патология. Развитие молекулярных аналитических методов, таких как иммуногистохимия и флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) расширили микроскопическое исследование и способствовали открытию биомаркеров. Оба метода были широко приняты в практике патологии. Совсем недавно были предложены молекулярные аналитические методы определения нецелевых РНК, ДНК и белка. Дополнительной для этих подходов является метаболомика – область науки, изучающая конечные и промежуточные продукты обмена веществ в биологической системе, будь то клетка, орган или организм в целом [2]. Метаболом или метаболомический профиль представляет собой совокупность всех низкомолекулярных метаболитов (< 1500 Da) биологического образца, являясь уникальным химическим «отпечатком пальцев», специфичным для процессов, протекающих в живых клетках [3]. Последние исследования показали, что метаболомика может выявить специфические признаки болезни, так называемые биомаркеры, которые в будущем сыграют большую роль в диагностике и прогнозе заболевания [4–6].

Еще в 1971 г. L. Pauling и соавт. [7] выдвинули идею применения метаболомического профиля в диагностике заболеваний. Они предложили производить анализ выдыхаемого воздуха пациентов методом газовой хроматографии для выявления метаболомических изменений при определенных заболеваниях и

Для корреспонденции: Фурина Раиса Рустэмовна – врач-эндоскопист эндоскопического отделения, аспирант Поволжского государственного технического университета; 424030, г. Йошкар-Ола, ул. Осипенко, д. 33, e-mail: furina_raisa@mail.ru.

Correspondence to: Raisa Furina – doctor-endoscopist; e-mail: furina_raisa@mail.ru.

обнаружили более 200 различных летучих органических соединений (ЛОС). В январе 2007 г. ученые университета Альберта и университета Калгари завершили исследование метаболомического профиля человека. Они каталогизировали около 2500 метаболитов, 1200 лекарств и 3500 компонентов пищи, которые могут быть найдены в биологических образцах человека [8].

Исследования метаболомического профиля образцов выполняются с использованием гибридного метода анализа – сочетания газовой (ГХ) или жидкостной (ЖХ) хроматографии и масс-спектрометрии (МС) или спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопия). ГХ – универсальный метод разделения смеси веществ, испаряющихся без разложения [9, 10]. Биологические жидкости (кровь, моча и мокрота), выдыхаемый пациентом воздух – источники, богатые летучими органическими метаболитами, которые могут использоваться в качестве потенциальных биомаркеров заболеваний.

Для сбора метаболомических данных используются две основные технологии: МС и ЯМР-спектроскопия, обе достигли высокого уровня по сбору данных [11, 12]. Основным преимуществом МС является чувствительность: современный уровень масс-спектрометров может обнаружить аналиты в фемтомольном (10^{-15}) и аттомольном (10^{-18}) диапазоне. Связь МС с ЖХ или ГХ позволяет измерять сотни отдельных метаболитов в пределах одного образца, и вместе с постоянно пополняемыми базами данных делает идентификацию этих метаболитов более рутинной [13].

Основной сильной стороной ЯМР-спектроскопии является возможность очень точного количественного определения вещества в сложной смеси. Другой важной характеристикой ЯМР-спектроскопии является его универсальность для анализа метаболитов в жидком состоянии (сыворотка крови, моча и т. д.), в неповрежденных тканях (например, опухоль) или в естественных условиях (*in vivo*) [13].

Хотя метаболомика менее зрелая, чем геномика и протеомика, она уже применяется в разнообразных областях медицины, в том числе скрининге патологии новорожденных, токсикологии, фармакологии.

В сравнении с геномикой и протеомикой на метаболомику возлагаются большие надежды в поиске биомаркеров заболеваний, и в первую очередь онкологических. Исследования уже показали потенциальную перспективу метаболомики в этой области. А. Sreekumar и соавт. [6] исследовали метаболомический профиль 42 образцов ткани, 110 образцов мочи и 110 образцов плазмы с целью выявить особенности такой патологии, как рак предстательной железы. На основе данных ГХ и ЯМР-спектроскопии в общей сложности ими были идентифицированы 1126 метаболитов различных химических классов. Из них только 87 метаболитов отличали биообразцы больных раком предстательной железы от доброкачественной патологии. Концентрация шести метаболитов – саркозина, урацила, кинуренина, глицерин-3-фосфата, лейцина и пролина значительно повышалась в образцах больных по мере озлокачествления и прогрессирования заболевания предстательной железы. Также ими установлено, что концентрация конкретного метаболита – саркозина – была существенно увеличена на этапе метастатического про-

грессирования изучаемой патологии. Этот повышенный уровень саркозина может быть обнаружен в моче. Авторами сделан вывод, что саркозин может стать маркером метастазирования рака предстательной железы. В продолжение исследования Мичиганские ученые планируют разработать анализ мочи, который позволит недорого и надежно измерять уровень саркозина [6].

В исследовании рака яичника, лаборатория доктора Fiehn провела метаболомический скрининг тканей 66 образцов инвазивной формы рака и 9 образцов доброкачественных опухолей яичников [14]. Исследователи обнаружили различие между данными группами образцов по более чем 50 определенным метаболитам. Многие из этих метаболитов играют важную роль в обмене пуринов, пиримидинов, глицеролипидов и в энергетическом обмене. R. Xue и соавт. использовали этот метод для исследования ЛОС крови, связанных со злокачественной патологией печени. Было установлено, что группа пациентов, страдающих раком печени, и контрольная группа отличались девятнадцатью ЛОС крови ($p < 0,05$). Из этих девятнадцати соединений 3 (гексанал, 1-октен-3-ол и октан) были найдены в повышенных концентрациях в крови группы больных раком печени по сравнению с контрольной группой [15].

Чтобы исследовать летучие метаболиты мочи, как потенциальные биомаркеры рака С. Silva и соавт. [10] качественно и количественно проанализировали образцы мочи 33 онкологических больных (14 больных лейкемией, 12 – колоректальным раком и 7 – лимфомой) и 21 здорового пациента, используя ТФМЭ-ГХ-МС. В общей сложности в онкологической и контрольной группах идентифицировано 82 летучих метаболита, принадлежащих различным химическим классам. Производные бензола, терпеноиды и фенолы были наиболее распространенными классами в онкологической группе, тогда как кетоны и серосодержащие вещества оказались основными классами соединений, выделенными из мочи здоровых пациентов [10].

Метод идентификации летучих биомаркеров дает возможность повысить гистопатологическую диагностику опухоли в образце ткани метаболомическими данными. М. Brown и соавт. [16] разработали методику параллельного выделения метаболитов и гистологического анализа биоптатов. Особенность их технологии заключалась в регистрации метаболомического профиля неповрежденных биоптатов, что позволяет проводить оба метода диагностики на одном образце. Изучая также здоровые ткани, ученым впервые удалось описать метаболомический профиль тонкого кишечника, надпочечника и селезенки человека. Были выделены метаболиты, принадлежащие ко всем важнейшим биохимическим классам: аминокислотам, пептидам, углеводам, липидам, нуклеотидам, кофакторам, ксенобиотики. Ими также было обнаружено 69 метаболитов отличающих раковую опухоль почки от образцов доброкачественной опухоли, и определены 83 метаболита, значительно отличающих ($p < 0,05$) биоптаты рака от доброкачественных образований простаты.

Сравнивая результаты, М. Brown и соавт. [16] сделали предположение, что метаболомический профиль опухоли может характеризовать ее стадию и степень злокачественности. Так, некоторые образцы

доброкачественных форм опухоли предстательной железы имели сходный с раком набор летучих метаболитов. Авторы связали данный факт с высокой агрессивностью доброкачественной опухоли (быстрый рост, озлокачествление и метастазирование) [16].

Эти исследования демонстрируют реальную взаимосвязь между определенными ЛОС в биологических образцах и злокачественными заболеваниями.

Метаболомика находит широкое применение в различных областях науки, в том числе в экспериментальной медицине. М. Hartmann и др. [17] исследовали обнаруженный летучий метаболитом культивируемых клеток опухоли толстой кишки линии SW-480 на предмет влияния искусственных добавок в питательную среду на рост и метаболизм опухолевых клеток. Сегодня различные клеточные культуры *in vitro* широко используются в науке. Эксперименты *in vitro* применяются в таких фундаментальных исследованиях, как характеристика метаболизма клетки [18] или анализ митоза [19]. В других научных работах культивированные клетки используются как тест-системы для исследования воздействия химиотерапевтических препаратов на клетку [20]. Однако для клеточных культур необходимо добавление в питательные среды животной сыворотки, например сыворотки эмбриона теленка. К сожалению, животные сыворотки имеют ряд недостатков, таких как возможное загрязнение образцов и высокая себестоимость. Для определения влияния искусственных заменителей сыворотки на жизнедеятельность и метаболизм культивируемых клеток М. Hartmann и соавт. [17] использовали метод определения летучих метаболитов клеток методом ГХ-МС. В целом были проанализированы около 50 ЛОС и установлено, что метаболизм культивируемых клеток сильно меняется при добавлении в питательную среду заменителя животной сыворотки. Таким образом, ученые пришли к выводу, что для роста и метаболизма опухолевых клеток и соответственно достоверности экспериментов с культурами клеток линии SW-480 необходимо добавление в питательную среду животной сыворотки [17].

Таким образом, цель метаболомики – расширить возможность ее применения в клинической практике для оценки и мониторинга состояния здоровья населения. Метаболомические исследования летучих соединений сыворотки крови, мочи и прочих биобразцов развиваются в геометрической прогрессии на протяжении ряда последних лет с целью разработки новых быстрых, простых, недорогих методик, которые могут помочь в диагностике и/или прогнозировании различных заболеваний, в первую очередь онкологических. Обнаруживая и измеряя индивидуальные метаболомические профили с повышением специфичности и чувствительности методов, метабомика подходит к развитию персонализированной медицины.

ГХ в сочетании с МС является наиболее «естественной» комбинацией для исследования метаболомического профиля. ГХ – универсальный метод разделения смеси испаряющихся веществ. Из двух основных технологий идентификации и количественного анализа метаболитов, МС более предпочтительна, чем ЯМР-спектроскопия. Основным преимуществом МС является чувствительность.

Несмотря на то, что большинство клинических МС-анализов проведены в референс-лабораториях, эта картина может измениться в течение ближайших нескольких лет, так как масс-спектрометры стали стандартным инструментом лабораторий и число ученых и врачей, знакомых с этой технологией, продолжает увеличиваться.

По сравнению с геномикой или протеомикой метабомика имеет ряд преимуществ, так как биологически максимально близка к фенотипу и, следовательно, имеет возможность быстрого наблюдения за системными изменениями в метаболоме. Хотя аналитические платформы для метабомики дороги, затраты на образцы низки, и в сочетании с высокой пропускной способностью (время анализа обычно менее 30 мин), они делают возможным проводить метаболомическое профилирование как скрининговое исследование большого количества образцов за низкую общую стоимость по сравнению с другими «-омика»-платформами (например, геномикой или протеомикой) [21].

ЛИТЕРАТУРА

1. Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В., ред. *Злокачественные новообразования в России в 2008 году (заболеваемость и смертность)*. М.; 2010.
2. Jordan K.W., Nordenstam J., Lauwers G.Y. Metabolomic characterization of human rectal adenocarcinoma with intact tissue magnetic resonance spectroscopy. *Dis. Colon Rect.* 2009; 52 (3): 520–5.
3. Daviss B. Growing pains for metabolomics. *Scientist.* 2005; 19 (8): 25–8.
4. Catchpole G., Platzer A., Weikert C., Kempkensteffen C., Johannsen M., Krause H. et al. Metabolic profiling reveals key metabolic features of renal cell carcinoma. *J. Cell. Mol. Med.* 2011; 15: 109–18.
5. Denkert C., Budczies J., Fiehn O., Wohlgemuth G., Scholz M., Kind T. et al. Metabolite profiling of human colon carcinoma: deregulation of TCA cycle and amino acid turnover. *Mol. Cancer.* 2008; 7: 72.
6. Sreekumar A., Poisson L.M., Rajendiran T.M., Khan A.P., Cao Q., Yu J. et al. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature.* 2009; 457: 910–4.
7. Pauling L., Robinson A.B., Teranishi R., Cary P. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1971; 68: 2374–6.
8. Wishart D.S., Tzur D., Knox C. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35: 521–6.
9. Царев Н.И., Царев В.И., Каграков И.Б. *Практическая газовая хроматография*. Барнаул: Издательство Алтайского Университета; 2000.
10. Silva C.L., Passos M., Camara J.S. Investigation of urinary volatile organic metabolites as potential cancer biomarkers by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry. *Br. J. Cancer.* 2011; 105: 1894–904.
11. Patti G.J., Yanes O., Siuzdak G. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 2012; 13: 263–9.
12. Sands C.J., Coen M., Ebbels T.M., Holmes E., Lindon J.C., Nicholson J.K. Data-driven approach for metabolite relationship recovery in biological 1H NMR data sets using iterative statistical total correlation spectroscopy. *Analyt. Chem.* 2011; 83: 2075–82.
13. Veenstra T.D. Metabolomics: the final frontier. *Genome Medicine.* 2012; 4: 40.
14. Denkert C., Budczies J., Kind T., Weichert W., Tablack P., Sehoul J. et al. Mass spectrometry-based metabolic profiling reveals different metabolite patterns in invasive ovarian carcinomas and

- ovarian borderline tumors. *Cancer Res.* 2006; 66: 10 795–804.
15. Xue R., Dong L., Zhang S., Deng, C., Liu T., Wang J. et al. Investigation of volatile biomarkers in liver cancer blood using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008; 22 (18): 1181–6.
 16. Brown M.V., McDunnl J.E., Gunst1P.R., Smith E.M., Milburn M.V., Troyer D.A. et al. Cancer detection and biopsy classification using concurrent histopathological and metabolomic analysis of core biopsies. *Genom Med.* 2012; 4: 1–33.
 17. Hartmann M., Zimmermann D., Nolte J. Changes of the metabolism of the colon cancer cell line SW-480 under serum-free and serum-reduced growth conditions. *In Vitro Cell.Dev.Biol. Anim.* 2008; 44: 458–63.
 18. Zimmermann D., Hartmann M., Moyer M. P., Nolte J., Baumbach J. I. Determination of volatile products of human colon cell line metabolism by GC/MS analysis. *Metabolomics.* 2007; 3: 13–7.
 19. Wolf F., Wandke C., Isenberg N., Geley S. Dose-dependent effects of stable cyclin B1 on progression through mitosis in human cells. *EMBO J.* 2006; 25: 2802–13.
 20. Jiang S., Jung Song M., Shin E.-C., Lee M.-O., Jong Kim S., Han Park J. Apoptosis in human hepatoma cell lines by chemotherapeutic drugs via fas-dependent and fas-independent pathways. *Hepatology.* 1999; 29 (1): 101–10.
 21. Dunn W.B., Broadhurst D., Begley P., Zelena E., Francis-McIntyre S., Anderson N. et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature.* 2011; 6 (7): 1060–83.

REFERENCES

1. Chissov V.I., Starinskiy V.V., Petrova G.V., eds. *Malignancies in Russia in 2008 (morbidity and mortality)*. [Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 2008 godu (zabolevaemost' i smertnost')]. Moscow; 2010. (in Russian)
2. Jordan K.W., Nordenstam J., Lauwers G.Y. Metabolomic characterization of human rectal adenocarcinoma with intact tissue magnetic resonance spectroscopy. *Dis. Colon Rect.* 2009; 52 (3): 520–5.
3. Daviss B. Growing pains for metabolomics. *Scientist.* 2005; 19 (8): 25–8.
4. Catchpole G., Platzer A., Weikert C., Kempkensteffen C., Johannsen M., Krause H. et al. Metabolic profiling reveals key metabolic features of renal cell carcinoma. *J. Cell. Mol. Med.* 2011; 15: 109–18.
5. Denkert C., Budczies J., Fiehn O., Wohlgemuth G., Scholz M., Kind T. et al. Metabolite profiling of human colon carcinoma-deregulation of TCA cycle and amino acid turnover. *Mol. Cancer.* 2008; 7: 72.
6. Sreekumar A., Poisson L.M., Rajendiran T.M., Khan A.P., Cao Q., Yu J. et al. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature.* 2009; 457: 910–4.
7. Pauling L., Robinson A.B., Teranishi R., Cary P. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1971; 68: 2374–6.
8. Wishart D.S., Tzur D., Knox C. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35: 521–6.
9. Tsarev N.I., Tsarev V.I., Katrakov I.B. *Practical gas chromatography*. [Prakticheskaya gazovaya khromatografiya]. Barnaul: Izdatelstvo Altayskogo universiteta; 2000. (in Russian)
10. Silva C.L., Passos M., Camara J.S. Investigation of urinary volatile organic metabolites as potential cancer biomarkers by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry. *Br. J. Cancer.* 2011; 105: 1894–904.
11. Patti G.J., Yanes O., Siuzdak G. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 2012; 13: 263–9.
12. Sands C.J., Coen M., Ebbels T.M., Holmes E., Lindon J.C., Nicholson J.K. Data-driven approach for metabolite relationship recovery in biological 1H NMR data sets using iterative statistical total correlation spectroscopy. *Analyt. Chem.* 2011; 83: 2075–82.
13. Veenstra T.D. Metabolomics: the final frontier. *Genome Medicine.* 2012; 4: 40.
14. Denkert C., Budczies J., Kind T., Weichert W., Tablack P., Sehouli J. et al. Mass spectrometry-based metabolic profiling reveals different metabolite patterns in invasive ovarian carcinomas and ovarian borderline tumors. *Cancer Res.* 2006; 66: 10 795–804.
15. Xue R., Dong L., Zhang S., Deng, C., Liu T., Wang J. et al. Investigation of volatile biomarkers in liver cancer blood using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008; 22 (18): 1181–6.
16. Brown M.V., McDunnl J.E., Gunst1P.R., Smith E.M., Milburn M.V., Troyer D.A. et al. Cancer detection and biopsy classification using concurrent histopathological and metabolomic analysis of core biopsies. *Genom Med.* 2012; 4: 1–33.
17. Hartmann M., Zimmermann D., Nolte J. Changes of the metabolism of the colon cancer cell line SW-480 under serum-free and serum-reduced growth conditions. *In Vitro Cell.Dev.Biol. Anim.* 2008; 44: 458–63.
18. Zimmermann D., Hartmann M., Moyer M. P., Nolte J., Baumbach J. I. Determination of volatile products of human colon cell line metabolism by GC/MS analysis. *Metabolomics.* 2007; 3: 13–7.
19. Wolf F., Wandke C., Isenberg N., Geley S. Dose-dependent effects of stable cyclin B1 on progression through mitosis in human cells. *EMBO J.* 2006; 25: 2802–13.
20. Jiang S., Jung Song M., Shin E.-C., Lee M.-O., Jong Kim S., Han Park J. Apoptosis in human hepatoma cell lines by chemotherapeutic drugs via fas-dependent and fas-independent pathways. *Hepatology.* 1999; 29 (1): 101–10.
21. Dunn W.B., Broadhurst D., Begley P., Zelena E., Francis-McIntyre S., Anderson N. et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature.* 2011; 6 (7): 1060–83.

Поступила 19.05.14

Received 19.05.14