

Zastosowanie metabolomiki w medycynie – wybrane przykłady dotyczące chorób onkologicznych i metabolicznych

The use of metabolomics in medicine – some examples of oncological and metabolic diseases

¹Dominika Zimny, ¹Marta Szatkowska, ¹Joanna Połubok, ¹Julian Maciaszek, ¹Mikołaj Machaj,
²Ewa Barg

¹Studenckie Koło Naukowe Endokrynologii, Hematologii i Onkologii przy Zakładzie Podstaw Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

²Zakład Podstaw Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Streszczenie

Metabolomika jest nową dziedziną nauki zajmującą się badaniem oraz analizowaniem metabolitów powstających w żywych komórkach. Podstawowymi płynami biologicznymi używanymi w tej metodzie badawczej są: surowica, płyn mózgowo-rdzeniowy, ślina oraz moc. Do najpopularniejszych metod oceny składu metabolitów należą spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (*nuclear magnetic resonance*, NMR) oraz spektrometria mas (*mass spectrometry*, MS) w połączeniu z chromatografią gazową (*gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS) lub cieczą (*liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS). Metabolomika wykorzystywana jest w wielu dziedzinach medycyny. Zmienność procesów biochemicznych w komórkach nowotworowych w stosunku do komórek zdrowych jest punktem wyjścia dla tego rodzaju badań. Zmiany metaboliczne są obserwowane zarówno w nowotworach litych, takich jak rak sutka, jajnika czy prostaty, jak i w chorobach rozrostowych krwi. Celem obecnie prowadzonych badań jest przede wszystkim znalezienie biomarkerów służących do szybkiego rozpoznawania choroby, oceny jej zaawansowania oraz skuteczności leczenia. Metabolomika znajduje szerokie zastosowanie także w chorobach metabolicznych, głównie cukrzycy. Lista badanych metabolitów daje szansę na trafną prognozę, diagnozę, a także kompleksowe monitorowanie progresji tej choroby cywilizacyjnej. Rozwój metabolomiki może przyczynić się również do zindywidualizowania leczenia chorych, dostosowania leków w zależności od profilu metabolicznego, a tym samym może poprawić skuteczność terapii, zmniejszyć skutki uboczne i przyczynić się do poprawy jakości życia pacjentów.

Słowa kluczowe

metabolomika, biomarkery nowotworowe, spektroskopia NMR, metabolity, cukrzyca typu 1

Abstract

Metabolomics is a new field of medicine focused on examining and analyzing metabolites produced in biological cells. Biological fluids primarily used in this method include: plasma, cerebrospinal fluid, saliva and urine. The most common methods of evaluating the composition involve nuclear magnetic resonance (NMR) and magnetic resonance (MR) with addition of gas chromatography (GC-MS) or liquid chromatography (LC-MS). Metabolomics is used in a wide variety of medicine disciplines. The variability of biochemical processes in tumor cells in comparison to normal cells is the starting point of such studies. The metabolomic changes are observed not only in solid tumors, like the mammary tumor, ovarian cancer, prostate cancer but also in tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues. Nowadays, the aim of studies is to find biomarkers which would help to diagnose a disease quickly, assess its progression, and implement effective treatment. Metabolomics is also widely applied in metabolic diseases, mainly the diabetes. The list of examined metabolites gives promising chances for a successful prognosis, diagnosis and comprehensive monitoring of the progression of this civilization disease. The development of metabolomics will also contribute to the individualization of treatment, proper drugs adjustment, which will make a therapy more successful, cause less side effects and improve the quality of patient's life.

Key words

metabolomics, tumor biomarkers NMR spectroscopy, metabolites type 1 diabetes

Wstęp

Metabolomika jest nową dziedziną nauki zajmującą się badaniem oraz analizowaniem metabolitów powstających w żywych komórkach. Jej zadaniem jest oznaczenie całego zestawu produktów reakcji metabolicznych powstałych w wyniku przemian fizjologicznych lub patologicznych zachodzących w komórce, tkance lub w całym organizmie [1]. Do tej grupy związków zaliczamy m.in. aminokwasy, lipidy, peptydy, witaminy, kwasy organiczne, węglowodany [2]. Mogą one być zarówno pochodzenia endogennego, jak i egzogennego, np. leki. Przyjmuje się, że endogenne związki chemiczne uwalniane do płynów ustrojowych są lepszymi wyznacznikami biologicznego fenotypu organizmu niż ekspresja genów [3]. Profil metabolomiczny uwzględnia bowiem nie tylko fenotyp determinowany genetycznie, ale także różnice w ekspresji cech fenotypu uwarunkowane czynnikami środowiskowymi, takimi jak dieta, wiek, sprawność fizyczna [4]. Jest to istotna przewaga metabolomiki nad genomiką, czyli analizowaniem materiału genetycznego. Badanie produktów przemian biologicznych może doprowadzić do poszerzenia wiedzy na temat procesów zachodzących w komórce, a ich ilościowe oznaczanie umożliwi zbadanie patomechanizmów powstawania chorób oraz szukanie potencjalnych wczesnych markerów zachorowania [2, 3].

Początki badań nad metabolitami sięgają lat 70. XX wieku. Pauling i wsp. stworzyli koncepcję współczesnej metabolomiki. Stwierdzili, że ilościowe i jakościowe oznaczanie produktów przemiany materii w płynach ustrojowych odzwierciedla biologiczny stan organizmu [5]. W ostatniej dekadzie poczyniono znaczące postępy w poznawaniu składu ludzkich metabolitów. Przyczynił się do tego rozwój zaawansowanych technologii badawczych i stworzenie pierwszych specyficznych baz danych zawierających składowe ludzkiego metabolomu, które ułatwiają analizę i interpretację uzyskanych wyników [6]. Pionierami tych badań są Oliver Fiehn i Jeremi Nicholson, którzy opublikowali wyniki swoich doświadczeń w latach 90. XX wieku.

Współczesne metody badawcze umożliwiają wykorzystywanie różnych materiałów biologicznych do analizy metabolomu pacjenta. Podstawowymi płynami biologicznymi używanymi w metabolomice są: surowica, płyn mózgowo-rdzeniowy, ślina, mocz. Największy potencjał w wykrywaniu markerów chorób mają krew oraz mocz. Dostępność moczu (badanie nieinwazyjne) oraz możliwość wielokrotnego pobierania próbek od tego samego pacjenta sprawiają, że mocz często wykorzystywany jest do badań. Mocz zawiera stosunkowo wysokie stężenia produktów przemiany materii i badanie moczu jest podstawowym testem diagnostycznym w wykrywaniu zaburzeń metabolicznych. Rutynowa diagnostyka laboratoryjna pozwala ocenić zawartość białek, ketonów, węglowodanów, leukocytów, erytrocytów, ale oceniający jest również kolor, osad i zapach moczu. Stwierdzenie nieprawidłowych wyników pozwala na zdiagnozowanie wielu chorób, np. cukrzycy.

Metabolomika zajmuje się natomiast wykrywaniem substancji niskocząsteczkowych, które występują w stosunkowo niskim stężeniu i standardowo nie są wykrywane w podstawowych badaniach moczu. Metabolity w moczu są zazwyczaj

substancjami hydrofilnymi. W porównaniu do innych płynów biologicznych, takich jak ślina czy płyn mózgowo-rdzeniowy, mocz charakteryzuje się znacząco większą liczbą i różnorodnością związków chemicznych, w tym metabolitów [7]. Filtracja i zagęszczanie moczu w nerkach sprawiają, że produkty przemiany materii występujące w moczu ostatecznym są zazwyczaj w wyższym stężeniu niż we krwi, co ułatwia ich wykrycie. Dzięki użyciu nowoczesnych metod badawczych metabolity mogą być wykrywane w moczu już w śladowych ilościach. Ułatwia to znalezienie w próbce specyficznych substancji, które mogą świadczyć o zmianach chorobowych w organizmie.

Porównanie wyników badań osób zdrowych i osób chorych może przyczynić się do wyznaczenia potencjalnych markerów biologicznych wielu chorób i umożliwić wczesne rozpoznanie, nawet w początkowym stadium zaawansowania. Obecnie znanych jest około 3000 związków chemicznych w moczu. Powstają bazy zawierające listę związków zawartych w moczu, oznaczonych przy użyciu dostępnych technik. Jedną z nich jest The Urine Metabolome Database (UMDB). Zawiera ona listę metabolitów, informację o poziomie ich weryfikacji, miejscu występowania, stężeniu w moczu u osób zdrowych oraz powiązaniu ich z konkretną chorobą. Dla zobiektywizowania interpretacji wyników często stężenie związku chemicznego wykrytego w moczu podawane jest w stosunku do stężenia kreatyniny. Stężenie metabolitów wykrywanych w moczu u osób zdrowych zależy od rodzaju substancji macierzystej podlegającej metabolizmowi i jest zmienne w szerokich granicach: od +/- 50% dla części metabolitów do nawet 350%, np. dla normetanefryny – metabolitu noradrenaliny [7]. Przy interpretacji wyników należy uwzględnić wiele czynników, takich jak wiek, uwarunkowania genetyczne, sprawność fizyczną, mikroflorę jelitową, dietę. Innymi bazami danych zawierającymi informację na temat metabolitów są: The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), The Small Molecule Pathway Database (SMPDB), Madison Metabolomics Consortium Database (MMCD) oraz The METLIN Metabolite Database [8].

Współczesne techniki analityczne charakteryzują się wysoką czułością, precyzją, dokładnością oraz odtwarzalnością [9]. Do najpopularniejszych metod należą spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (*nuclear magnetic resonance*, NMR) oraz spektrometria mas (*mass spectrometry*, MS) [3]. Spektrometria mas opiera się na pomiarze stosunku masy do ładunku elektrycznego danego jonu, co pozwala na identyfikację danej substancji [8]. Połączenie spektrometrii mas z metodami chromatografii pozwoliło stworzyć dwie techniki wykorzystywane do oznaczania związków chemicznych w płynach ustrojowych. Są to chromatografia gazowa połączona ze spektrometrią mas (*gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS) oraz chromatografia cieczowa połączona ze spektrometrią mas (*liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS).

Oznaczanie całego panelu metabolitów w próbce za pomocą GC-MS lub LC-MS może czasami stwarzać trudności interpretacyjne, np. może wiązać się ze spadkiem rozdzielności metabolitów i zafalszowaniem wyników [9]. Związki o podobnej masie cząsteczkowej i polarności mogą być wymywa-

ne w tym samym czasie, co skutkuje tym, że nie ma możliwości ich rozróżniania. Dodatkowo może wystąpić tak zwany *matrix effect*, czyli interferencja oznaczanych metabolitów ze składem matrycy. Powoduje to trudności w oznaczaniu związków, w powtarzalności oraz odtwarzalności wyników [9].

Pomimo tych ograniczeń spektrometria mas charakteryzuje się dużą specyficznością i czułością przy selektywnym badaniu metabolitów. Metoda ta znalazła zastosowanie przy wykrywaniu leków [9]. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) jest w chwili obecnej najlepszą techniką badania metabolitów moczu, jest również metodą preferowaną przy identyfikacji związków chemicznych wydalanych przez nerki [3]. Za pomocą NMR można wykrywać i oznaczać więcej metabolitów, jakkolwiek najbardziej efektywna jest metoda spektrometrii mas, która umożliwia wykrycie nawet kilku tysięcy metabolitów. Należy również pamiętać, że podczas badania NMR nie dochodzi do modyfikacji związków chemicznych, tak jak to może się zdarzyć podczas GC-MS i LC-MS [7]. Przyjmuje się, że każda z powyższych metod ma swoje ograniczenia i może stanowić źródło błędów, dlatego do badania metabolomiki płynów ustrojowych najlepiej jest wykorzystywać obie metody jednocześnie [4].

Metabolomika może być wykorzystywana w różnych dziedzinach medycyny, szczególnie w onkologii i w diagnostyce oraz badaniu patomechanizmu chorób metabolicznych.

Przykłady zastosowania metabolomiki w onkologii

Podane zostaną przykłady zastosowania metabolomiki w przypadku nowotworów często występujących u ludzi oraz omówione będą perspektywy stosowania, potencjał poznawczy i użyteczność kliniczna tej metody badania.

Rak piersi jest najczęstszym nowotworem u kobiet. Według danych WHO w 2008 r. na całym świecie odnotowano 1 380 000 zachorowań. Co roku w Polsce wykrywa się około 14 000 nowych zachorowań, a ponad 5000 chorych umiera. Najczęściej rozpoznawanym rakiem piersi jest rak przewodowy naciekający (75%), drugi co do częstości jest rak zrazikowy naciekający (10–15%), pozostałe typy histologiczne raka występują z częstością około 5% [10].

Zmiany wykryte w samobadaniu piersi często są już w zaawansowanym stadium rozwoju, a wyczuwalne palpacyjnie są najczęściej wówczas, gdy średnica guza przekracza 1 cm. Guzy o większych rozmiarach zwykle wykazują gorsze rokowanie. W Polsce kobiety w wieku 50–69 lat objęte są bezpłatnym badaniem mammograficznym w programie przesiewowym mającym na celu wczesne wykrywanie zmian w gruczołach piersiowych. Bliżko 95% tych badań nie wykazuje niepokojących obrazów, jednak czułość mammografii w zależności od sprawności aparatu i doświadczenia lekarza opisującego wynosi 54–77%. Innym nieinwazyjnym popularnym badaniem jest USG piersi [10].

Zastosowanie metabolomiki umożliwia dużo wcześniejsze rozpoznanie choroby, a także sprecyzowanie typu i stadium

nowotworu. Rozpoznany w późnym stadium daje on znacznie niższą szansę na 5-letnie przeżycie. Natomiast rak piersi wykryty we wczesnym stadium jest niemal w 100% wyleczalny [11].

Metabolomika moczu za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (*MNR spectroscopy*) jest badaniem nieinwazyjnym, nieszkodliwym dla zdrowia. Slupsky i wsp. przeprowadzili badanie metabolitów moczu kobiet chorych na raka piersi i chorych na raka jajników przed operacjami oraz w grupie kontrolnej kobiet zdrowych. Spośród 67 oznaczonych w moczu metabolitów stężenia etanoloaminy, uracylu, hipuranu, leucyny, asparginy i acetonu znacząco różniły się między badanymi grupami [12].

Obniżenie stężenia metabolitów cyklu kwasów trójkarboksylowych u chorych na nowotwór piersi związane jest ze zmianą sposobu zużycia glukozy, zgodnie z efektem Warburga [13]. Twórca tej teorii twierdzi, że zmiana metabolizmu jest niezbędnym czynnikiem przemiany prawidłowej komórki w nowotworową.

Jednocześnie dochodzi do zaburzeń liczby aminokwasów i enzymów cykli biochemicznych z nimi związanych, co objawia się mniejszą zawartością aminokwasów wykrytych w badaniu w porównaniu do zdrowych ludzi. Badanie moczu metodą spektroskopii NMR jest bardzo obiecujące, co potwierdzają wyniki badań, które cechowały się 98% i 100% czułością oraz 99% i 93% swoistością odpowiednio dla raka jajnika i raka piersi [12].

Mocz nie jest jedyną substancją, w której można analizować metabolity u chorych na raka piersi. Ocenę taką możemy również wykonać w tkankach/komórkach. Zastosowanie wysokorozdzielczego jądrowego rezonansu magnetycznego z wirowaniem pod „magicznym” kątem (*high-resolution magic-angle spinning*, HR-MAS-NMR) umożliwia zmierzenie stężenia metabolitów w tkankach zarówno zdrowych, jak i zmienionych chorobowo. Prawidłowe tkanki, w przeciwieństwie do nowotworowych, nie zawierają wielu drobnocząsteczkowych substancji, w tym niektórych aminokwasów, metabolitów pośrednich cyklu przemian glukozy oraz substancji związanych z choliną. Zastosowanie tej metody umożliwia ocenę stopnia zaawansowania i typu nowotworu [11]. Metodą metabolomiki można ocenić także wrażliwość estrogenową komórek nowotworowych; oceniane jest stężenie β -alaniny, 2-hydroksyglutaranu, glutaminianu, ksantyny oraz glutaminy. W przypadkach nowotworów estrogenoujemnych stężenie pierwszych czterech rośnie, a glutaminy maleje, a największą zmianę wykazuje stężenie β -alaniny. Ta ocena ułatwia wybór personalizowanej terapii u chorych, a także wytycza drogi do powstania nowych leków przeciwnowotworowych. Na przykład stwierdzenie obecności glutaminy utlenowanej i zredukowanej w komórkach estrogenoujemnych (ale nie w komórkach estrogenododatnich) doprowadziło do rozwoju badań i opracowania nowych leków z grupy inhibitorów glutaminazy [14].

U mężczyzn jednym z najczęstszych nowotworów jest rak prostaty. Badanie palpacyjne (*per rectum*) oraz ocena specyficznych markerów nowotworowych nie pozwalają jednoznacznie prognozować rozwoju raka prostaty oraz ocenić jego stadium. Najczęściej nowotwór prostaty wykrywany jest

w zaawansowanym stadium choroby, gdy obecne są już przerzuty do innych narządów. Nie bez znaczenia jest opór mężczyźni przed badaniem *per rectum* i niska świadomość zagrożenia tym nowotworem.

Postęp w badaniach metabolomicznych doprowadził do odkrycia nowych, wczesnych biomarkerów raka prostaty. Nieinwazyjność badań metabolomiki może przekonać pacjentów do częstszych kontroli. Dobrze udokumentowanym przykładem substancji markerowej raka prostaty jest sarkozyna. Jest to aminokwas, N-metylowa pochodna glicyny, powstająca w reakcji katalizowanej przez N-metyloglicyno-transferazę. Aminokwas ten jest wykrywany przy użyciu chromatografii gazowej ze spektroskopią mas (GC-MS). Stężenie tego aminokwasu w moczu nieznacznie wzrasta w łagodnym przerście tkanki gruczołu krokowego, w raku prostaty jest wyraźnie podwyższone, a przy obecności przerzutów jest bardzo wysokie. Także stężenie enzymu N-metyloglicyno-transferazy zauważalnie wzrasta w chorobie nowotworowej [15]. Stężenie sarkozyny można oceniać również we krwi, wydzielinie gruczołu krokowego, w nasieniu, a w przypadku przerzutów również w materiałach z biopsji, np. w tkankach kostnych.

Do analizy metabolomicznej w raku prostaty wykorzystuje się chromatografię gazową ze spektroskopią mas (GC-MS) oraz wysokorozdzielczy jądrowy rezonans magnetyczny z wirowaniem pod magicznym kątem (HR-MAS NMR). Oprócz sarkozyny innymi wykrywanymi substancjami są: cytrynian, cholina, spermina, aminokwasy i ich pochodne. Dzięki postępowi diagnostycznemu, jaki dokonał się na skutek zastosowania metabolomiki, można lepiej zrozumieć mechanizm rozwoju tego nowotworu i optymalizować metody leczenia [16,17].

Narastającym problemem w onkologii jest zwiększająca się zapadalność i późna rozpoznawalność raka jajnika u kobiet. Nabłonkowy rak jajnika (*ovarian epithelial cancer*, EOC) jest najczęstszym oraz najbardziej złośliwym nowotworem jajników i stanowi główną przyczynę zgonów wśród nowotworów ginekologicznych.

Dotychczas używane metody diagnostyki tego nowotworu polegają głównie na oznaczaniu stężenia osoczkowego markera nowotworu CA 125 oraz na ultrasonografii transwaginalnej (*transvaginal scan*, TSV). Niestety metody te, nawet przy ich jednoczesnym stosowaniu, nie są dostatecznie czułe i nie pozwalają na wykrycie nowotworu w jego wczesnej fazie. Nadzieją na wcześniejszą diagnostykę raka jajników jest poznanie nowych biomarkerów tego nowotworu, których wykrywanie umożliwi metabolomikę [18–20].

W badaniu przy użyciu chromatografii cieczowej połączonej ze spektroskopią mas z analizatorem czasu przelotu z kwadrupolem (*ultra-performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry*, UPLC-QTOF/MS) porównano próbki moczu pobrane od pacjentek z nabłonkowym rakiem jajnika (*ovarian epithelial cancer*, EOC), łagodnym rakiem jajnika (*borderline ovarian tumor*, BOT) oraz od zdrowej grupy kontrolnej. Wykryto metabolity pozwalające na odróżnienie EOC od BOT. Należą do nich cystationina i kwas n-acetyloneuraminowy. Wykazano ponadto różnice w stężeniu n-acetylocytydyny i kwasu bursztynowego u pacjentek z EOC będących

przed operacją i po operacji, a także stwierdzono, że stężenia S-retikulin, pseudouridyliny oraz nikotynamidu monokleotydowego korelowały z etapami rozwoju nabłonkowego raka jajnika [18–20]. W moczu pacjentek zarówno z BOT, jak i z EOC wykryto podwyższone stężenie metabolitów puryn i pirymidyn: N4-acetylocytydyny, pseudouridyliny oraz 3-mocznikorybonukleozydów. W grupie pacjentek z BOTiz EOC wykazano także niższe stężenia metabolitów L-histydyny oraz N-acetyloglutaminy w porównaniu do grupy kontrolnej [21].

Denkert i wsp. opisali 51 metabolitów o różnych stężeniach w guzach o złośliwości granicznej i w rakach jajnika przy użyciu bezkontaminacyjnego systemu wstrzykiwania, gazowej chromatografii połączonej ze spektrometrią i analizatorem czasu przelotu (*gas chromatography – time of flight mass spectrometry*, GC-TOF MS) [19]. W badaniach tych różnice stężeń czterech związków chemicznych: cysteiny, kreatyny, fenyloalaniny oraz β -alaniny miały wysoki poziom istotności statystycznej i te cztery związki mogą być uznane za potencjalne biomarkery stopnia inwazyjności raka jajnika. Badanie potwierdziło, że GC-TOF MS jest odpowiednią techniką do analizy świeżych tkanek z guzów jajników i może być pomocne zarówno przy monitorowaniu zmian biochemicznych, jak i w diagnostyce. Buckendahl i wsp. [20] oceniali stężenia kinazy aktywowanej 5'AMP (AMPK), której aktywacja hamuje przemiany anaboliczne w komórkach, a stymuluje procesy kataboliczne. Monitorowanie stężenia tej fosfokinazy może być szczególnie istotne, gdyż komórki nowotworowe okazują istotne zmiany w szlakach metabolizmu energetycznego. Porównano poziom ekspresji AMPK w zmienionych tkankach u pacjentek z rakami jajników z poziomem ekspresji AMPK u pacjentów z guzami o złośliwości granicznej za pomocą gazowej chromatografii połączonej ze spektrometrią i analizą czasu przelotu. Wykazano znaczącą statystycznie korelację między obniżoną ekspresją AMPK a stopniem zaawansowania rozwoju nowotworu, co może wskazywać na złe rokowanie u takich pacjentek [20].

Rak jelita grubego jest poważnym problemem w onkologii i stanowi jedną z głównych przyczyn zgonów w krajach rozwiniętych. Mimo poprawiających się możliwości leczenia pięcioletnia przeżywalność rzadko przekracza 60%. W badaniach metabolomiki raka okrężnicy Jimenez i wsp. przy zastosowaniu wysokorozdzielczego jądrowego rezonansu magnetycznego zwirowaniem pod „magicznym” kątem (HR-MAS NMR) wykazali w nowotworowo zmienionych fragmentach jelita grubego w porównaniu do zdrowych tkanek niższe stężenia lipidów, w tym triglicerydów, oraz podwyższone stężenia izoglutaminy, choliny, fosfocholiny, tauryny, tyrozyny i fenyloalaniny [22]. Wyższe stężenie choliny i jej pochodnych ma związek z towarzyszącą nowotworom przyspieszoną regeneracją błon komórkowych, w których skład te związki wchodzi. Autorzy stwierdzili, że wyższe stężenie izomaślanu, acetoocetanu i choliny w zdrowej tkance jelita grubego wiąże się z większą szansą na uzyskanie 5-letniej remisji choroby. W badaniach tych stwierdzono ponadto podwyższone stężenie izoglutaminy (związku będącego produktem rozpadu ścian komórkowych bakterii jelitowych) w nowotworowo zmienionych tkankach, a także wykazano, że u pacjentów z bardziej agresywnymi po-

stacjami klinicznymi tego nowotworu dodatkowo obecne były podwyższone stężenia waliny, fenyloalaniny i tyrozyny, świadczące o zwiększonej degradacji aminokwasów [22].

Manna i wsp. w badaniach z zastosowaniem spektrometrii mas porównywali metabolity moczu i tkanek dzikiego szczepu myszy typu C57BL/6J oraz ApcMin/+ oraz ludzi z nowotworami jelita grubego i zdrowych [23]. U myszy we wczesnym stadium proliferacji komórek nowotworowych znaleziono 13 biomarkerów związanych z metabolizmem poliamin, metabolizmem kwasów nukleinowych oraz procesami metylacji. W moczu pobranym od pacjentów z nowotworami jelita grubego wykazano 12 biomarkerów powiązanych z tymi samymi szlakami metabolicznymi co u myszy. W moczu zarówno ludzi, jak i myszy ze zmianami nowotworowymi zaobserwowano znacznie wyższe stężenia proliny, treoniny, kwasu glutaminowego, argininy, N1-acetylospermidyny, ksantyny, uracylu, betainy, symetrycznej dimetyloargininy oraz niesymetrycznej dimetyloargininy w porównaniu do stężenia tych związków w moczu ludzi zdrowych. Wyniki te są bardzo zachęcające, gdyż ukazują możliwości zastosowania metabolomiki do wykrywania raka jelita grubego we wczesnym stadium.

Leichtle [24] wykazał z zastosowaniem elektrorozpylającej tandemowej spektrometrii mas znaczące różnice stężeń 11 aminokwasów w surowicy krwi między grupą chorych na nowotwory jelita grubego a grupą kontrolną. Szczególnie wysoką korelację stwierdzono między stężeniem glicyny a stadiem choroby. Glicyna jest ważnym metabolitem kwasu foliowego, którego wytwarzanie jest zaburzone przy nowotworach jelita grubego. Także stężenia tyroksyny wykazywały znaczące różnice między osobami z nowotworem a grupą kontrolną. Wykrywanie zmian stężenia glicyny i tyroksyny w surowicy może być przydatnym wczesnym biomarkerem raka okrężnicy [24]. Wykorzystując gazową chromatografię połączoną ze spektrometrią mas i analizatorem czasu przelotu (GC-TOF MS), Denkert i wsp. obserwowali u pacjentów z nowotworami jelita grubego obniżenie stężenia związków pośrednich cyklu kwasów trkarboksylowych (TCA cycle), a podwyższone stężenia metabolitów cyklu mocznikowego, puryn, pirymidyn oraz aminokwasów [25].

Metabolomika znalazła również zastosowanie w diagnostyce chorób hematologicznych i może pomagać w wyborze terapii celowanej. Wykorzystywany jest również diagnostyczny i prognostyczny potencjał tego badania w monitorowaniu przebiegu klinicznego choroby. Dotąd najczęściej była stosowana w diagnostyce szpiczaka mnogiego i przewlekłej białaczki limfoblastycznej u ludzi dorosłych [26].

W populacji pediatrycznej najczęściej występującym nowotworem hematologicznym jest ostra białaczka limfoblastyczna (*acute lymphoblastic leukemia*, ALL). Opisano wiele zaburzeń metabolicznych towarzyszących ALL. Tiziani i wsp., wykorzystując protonową spektroskopię jądrowego rezonansu magnetycznego (H(1)-NMR *spectroscopy*) oraz chromatografię gazową ze spektrometrią mas (LC-MS), scharakteryzowali zmiany składu metabolitów zarówno we krwi obwodowej, jak i w szpiku kostnym [26]. Zmiany te dotyczyły metabolizmu glukozy, lipidów oraz L-asparaginy. W metabolizmie lipidów

stwierdzono niższe stężenie kwasów tłuszczowych (mirystynowego, palmitynowego, palmitoilooleinowego) w szpiku kostnym w porównaniu do krwi obwodowej, co sugeruje wyższe zużycie wymienionych wolnych kwasów tłuszczowych przez złośliwe limfoblasty. Badania nad metabolitami lipidów mogą mieć istotne znaczenie w poznaniu patomechanizmu ALL, a duże badania epidemiologiczne wykazują związek między użyciem statyn u pacjentów onkologicznych i zmniejszeniem śmiertelności z powodu nowotworów w tej grupie chorych [27]. Znamienny wpływ statyn na metabolizm lipidów obserwowany był także w hodowlach ludzkich komórek białaczkowych [28].

Do monitorowania leczenia pacjentów hematologicznych mogą być również zastosowane techniki metabolomiki, np. w ocenie skuteczności leczenia L-asparaginazą – lekiem standardowo stosowanym w protokołach leczenia białaczek u dzieci [29]. Komórki białaczkowe nie mają zdolności produkcji asparaginy, dlatego do proliferacji niezbędna jest wolna frakcja asparaginy krążącej w organizmie. L-asparaginaza katalizuje rozkład asparaginy do kwasu asparaginowego i amoniaku, co indukuje śmierć komórek białaczkowych poprzez zahamowanie syntezy białek i kwasów nukleinowych. Badania z użyciem metabolomiki potwierdziły wcześniejsze doniesienia, że wolna frakcja asparaginy zostaje całkowicie wyczerpana od 8 dnia do końca fazy indukcji remisji [30]. Potwierdza to zasadność stosowania L-asparaginazy w protokołach leczenia ALL [26].

W badaniach metabolomiki przeprowadzonych w grupie 183 pacjentów z nowo rozpoznaną ostrą białaczką szpikową (*acute myeloid leukemia*, AML) i w grupie kontrolnej 232 ludzi zdrowych wykazano liczne zmiany stężenia metabolitów w surowicy, które mogą służyć jako dodatkowy ważny marker prognostyczny w stratyfikacji pacjentów do grup ryzyka cytogenetycznego. W ponad 60% nowo diagnozowanych przypadków AML komórki białaczkowe okazują różnorodne aberracje chromosomowe; wyróżniono zmiany najczęściej związane ze złym rokowaniem oraz te ze stosunkowo dobrym rokowaniem, czyli tzw. cytogenetyczne grupy ryzyka przebiegu tej białaczki.

W badaniu HNMR stwierdzono istotne różnice w aktywności szlaków glikolizy i glikoneogenezy w cyklu kwasów trkarboksylowych, biosyntezie w metabolizmie lipoprotein i kwasów tłuszczowych. Znaczące zmiany dotyczyły metabolizmu choline (składnika błon komórkowych), której niskie stężenie u pacjentów z AML może być skutkiem nadmiernej proliferacji komórek. Należy podkreślić, że wykryte zmiany dobrze korelowały z grupami cytogenetycznymi prognozowania ryzyka przebiegu AML [31]. Metabolomika może służyć do wyboru terapii celowanej nowymi środkami terapeutycznymi, optymalizacji i oceny odpowiedzi na te leki, np. imatinibu – inhibitora kinazy tyrozynowej BCR-ABL, w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej [32].

Do zmian metabolicznych, które można wykryć w przypadku białaczki odpowiadającej na leczenie imatinibem, należy zahamowanie glikolizy, które prowadzi do zmniejszenia zużycia glukozy, oraz stymulowanie metabolizmu mitochondriów powiązane z różnicowaniem komórek. W przypadku oporności na imatinib wykazano odmienne zmiany metaboliczne – spadek utleniania glukozy w mitochondriach, beztlenową syntezę rybozy z glukozy oraz wysokie stężenie choline. Zmiany te świadczą

również o progresji choroby. Metabolomika może być w tym przypadku metodą monitorowania zmian w metabolizmie komórkowym [33].

W szpiczaku mnogim metabolomika może być wykorzystana do wykrycia biomarkerów potwierdzających obecność nowotworu oraz do oceny progresji choroby. Takimi biomarkerami wydają się karnityna i acetylkarnityna – ich stężenie we krwi koreluje ze stopniem zaawansowania choroby nowotworowej [34]. Wzrost stężenia karnityny może prowadzić do wzrostu oksydacji lipidów w szczególnie aktywnych metabolicznie komórkach szpiczaka. Z tego powodu sugeruje się unikanie suplementacji karnityny (przetwory mleczne, mięso) podczas leczenia szpiczaka mnogiego.

Wykorzystanie technik metabolomiki w diagnostyce i leczeniu chorób metabolicznych

Choroby metaboliczne, takie jak miażdżyca, cukrzyca 2 typu i choroba metaboliczna/zespół metaboliczny oraz ich powikłania, stanowią coraz większe wyzwanie dla medycyny współczesnej, stąd oczywiste wydaje się szukanie nowych metod oceny zmian metabolicznych. Metabolomika ma szczególnie duży potencjał w chorobach metabolicznych, w identyfikacji wielorakich zaburzeń procesów biochemicznych, na które wpływają czynniki środowiskowe, zachowania zdrowotne oraz interwencje farmakologiczne [35, 36].

Metabolomika dostarczyła argumentów do nowego podejścia do patologii cukrzycy i umożliwiła wczesne wykrywanie zmian biochemicznych związanych z zagrożeniem cukrzycą typu 2. Znaczącymi markerami predykcyjnymi cukrzycy okazały się aminokwasy aromatyczne oraz aminokwasy z rozgałęzionymi łańcuchami, tj. izoleucyna, leucyna, walina, tyrozyna i fenyloalanina [36].

Salomaa i wsp. wykazali, że oznaczanie we krwi stężenia adiponektyny, ApoB, CRP i ferrytyny poprawiło ocenę ryzyka wystąpienia cukrzycy [37]. Na podstawie uzyskanych wyników badań można wnioskować, że badane biomarkery mogą znacznie poprawić prognozowanie ryzyka cukrzycy typu 2. Wykazano istotny związek podwyższonego stężenia ferrytyny z rozwojem cukrzycy, co może być wynikiem powstawania insulinooporności, uszkodzenia komórek przez wolne rodniki i kumulacji żelaza z uszkodzonych komórek w hepatocytach [35]. Stężenie polipeptydu trzustkowego jest również dobrym markerem niszczenia komórek β trzustki w cukrzycy typu 2 [38].

Doustny test obciążenia glukozą (*Oral Glucose Tolerance Test*, OGTT) pozwala uzyskać informacje o dynamicznych przemianach całego metabolizmu i jest wykorzystywany do wykrywania wczesnych zaburzeń gospodarki węglowodanowej. Wykorzystując metody metabolomiki, wykazano, że obciążenie glukozą powoduje spadek stężenia wolnych kwasów tłuszczowych, acylokarnityny, glicerolu, kwasu β -hydroksybutyrowego, puryny, hipoksantyny i kilku aminokwasów, szczególnie z rozgałęzionymi łańcuchami, oraz trzech aminokwasów aromatycznych [39].

Shaham i wsp. przedstawili wstępne dowody świadczące o korelacji zmniejszonej wrażliwości na insulinę z odpowiedzią na OGTT [40]. Odzwierciedla się to w stężeniu glicerolu, izomerycznych par rozgałęzionych aminokwasów, leucyny i izoleucyny. Wydaje się zatem, że próbki pobrane przed OGTT i po jego wykonaniu mogą pomóc we wczesnym wykryciu nieprawidłowości w specyficznych ścieżkach metabolicznych w progresji z insulinooporności do pełnego rozwinięcia cukrzycy typu 2. W badaniu Framingham Offspring Study wykazano znaczącą zmianę w 91 ze 110 mierzonych metabolitów w odpowiedzi na OGTT u badanych mężczyzn i kobiet, z których połowa wykazywała insulinooporność [39,41].

W badaniach polskich metabolomika jest także coraz szerzej wykorzystywana w diagnostyce chorób metabolicznych. Jedne z pierwszych badań przeprowadzono u pacjentów w wieku szkolnym z cukrzycą typu 1. Deja i wsp. podzielili grupę w zależności od wartości hemoglobiny glikowanej (HbA1c poniżej i HbA1c powyżej 6,5%) [42]. Metodą (1) H NMR spektroskopii autorzy wykazali różnice w pojawiających się w moczu stężeniach alaniny, pirogronianu i waliny. Według autorów metoda (1) H NMR pozwala na wykonanie analiz służącym monitorowaniu progresji cukrzycy oraz skuteczności jej leczenia.

Celem badań metabolicznych w cukrzycy jest stworzenie reprezentatywnego profilu wielu biomarkerów, gdyż wątpliwe wydaje się poleganie na badaniu pojedynczych metabolitów [35].

Podsumowanie

Większość obecnie dostępnych testów diagnostycznych opiera się na badaniu dobrze znanych pojedynczych markerów chorób, nie zawsze jednak są one wystarczająco wrażliwe i specyficzne dla danej jednostki chorobowej. Z pomocą przychodzi metabolomika, która umożliwi wykrycie specyficznych markerów występujących już we wczesnej fazie choroby, a także daje obraz zmian wielu parametrów metabolizmu – profilu metabolicznego danej choroby. Przyczynia się to do wczesnego diagnozowania, lepszego monitorowania i prognozowania wielu schorzeń, w tym również nowotworów [43]. Indywidualne, osobnicze zmiany w składzie metabolitów w płynach ustrojowych są przydatne do ustalania celowanej terapii oraz do oceny skuteczności leczenia. Oznaczenie metabolicznego fenotypu komórek nowotworowych stwarza możliwość lepszego poznania działania radioterapii, ilościowej oceny ryzyka napromieniowania oraz wykrywania efektów ubocznych, zanim staną się one klinicznie widoczne [44]. Fundamentalne znaczenie dla wyboru metody leczenia nowotworu i dla rokowania ma jak najwcześniejsze wykrycie nowotworu. Wielkie nadzieje związane są z rozwojem technik metabolomiki i zwiększeniem dostępności tych badań. Z pewnością pozwoli to na wykrywanie zmian nowotworowych na wczesnym etapie choroby i przyczyni się do znaczącej poprawy skuteczności leczenia nowotworów.

Także w chorobach metabolicznych bardzo wczesne wykrywanie markerów zagrożenia cukrzycą typu 2, miażdżycą i nadciśnieniem tętniczym jest możliwe dzięki zastosowaniu

metod proteomiki i metabolomiki. Zidentyfikowanie pacjentów z wysokim ryzykiem rozwoju tych chorób pozwoli na zastosowanie wczesnej i skutecznej profilaktyki, która znacznie opóźni rozwój objawów klinicznych lub będzie im zapobiegać.

Wykorzystanie technik metabolomiki w diagnostyce płynów ustrojowych i tkanek nie ogranicza się do chorób onkologicznych i metabolicznych. Techniki te są obecnie wykorzystywane w kardiologii, nefrologii i neurologii. Praktycznie w każdej

dziedzinie medycyny ta metoda diagnostyczna może pozwalać uzyskać cenne informacje służące wspomaganie diagnozy i monitorowaniu terapii. W niniejszej pracy podane zostały zastosowania metod metabolomiki w medycynie na przykładzie chorób onkologicznych i metabolicznych. Głównym celem autorów było ukazanie możliwości diagnostycznych, jakie stwarza ta metoda, oraz rysujących się perspektyw zastosowania jej do indywidualizacji i personalizacji terapii.

Piśmiennictwo

1. Sana TR, Gordon DB, Fischer SM et al. *Global mass spectrometry based metabolomics profiling of erythrocytes infected with Plasmodium falciparum*. PLoS One. 2013;8(4):e60840.
2. Zhang A, Sun H, Wang X. *Saliva metabolomics opens door to biomarker discovery, disease diagnosis, and treatment*. Appl Biochem Biotechnol. 2012;168(6):1718-1727.
3. Peironcelly JE, Reijmers T, Coulier L et al. *Understanding and classifying metabolite space and metabolite-likeness*. PLoS One. 2011;6(12):e28966.
4. Mendrick DL, Schnackenberg L. *Genomic and metabolomic advances in the identification of disease and adverse event biomarkers*. Biomark Med. 2009;3(5):605-615.
5. Pauling L, Robinson AB, Teranishi R, Cary P. *Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography*. Proc Natl Acad Sci USA. 1971;68(10):2374-2376.
6. D'Alessandro A, Giardina B, Gevi F et al. *Clinical metabolomics: the next stage of clinical biochemistry*. Blood Transfus. 2012;10 suppl 2:19-24.
7. Bouatra S, Aziat F, Mandal R et al. *The human urine metabolome*. PLoS One. 2013;8(9):e73076.
8. Yu T, Bai Y. *Analyzing LC/MS metabolic profiling data in the context of existing metabolic networks*. Curr Metabolomics. 2013;1 (1):83-91.
9. Drexler DM, Reily MD, Shipkova PA. *Advances in mass spectrometry applied to pharmaceutical metabolomics*. Anal Bioanal Chem. 2011;399(8):2645-2653.
10. Murawa D, Dyzmann-Sroka A, Kycler W et al. *ABC raka piersi*. Wielkopolskie Centrum Onkologii;2010.
11. Denkert C, Bucher E, Hilvo M et al. *Metabolomics of human breast cancer: New approaches for tumor typing and biomarker discovery*. Genome Med. 2012;4(4)37.
12. Slupsky CM, Steed H, Wells TH et al. *Urine metabolite analysis offers potential early diagnosis of ovarian and breast cancers*. Clin Cancer Res. 2010;16(23):5835-5841.
13. Garber K. *Energy boost: the Warburg effect returns in a new theory of cancer*. J Natl Cancer Inst 2004;96(24):1805-1806.
14. Budczies J, Brockmüller SF, Müller BM et al. *Comparative metabolomics of estrogen receptor positive and estrogen receptor negative breast cancer: alterations in glutamine and beta-alanine metabolism*. J Proteomics. 2013;94:279-288.
15. Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM et al. *Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression*. Nature. 2009;457(7231):914-919.
16. Trock BJ. *Application of metabolomics to prostate cancer*. Urol Oncol. 2011;29(5):572-581.
17. Kumar V, Dwivedi DK, Jagannathan NR. *High-resolution NMR spectroscopy of human body fluids and tissues in relation to prostate cancer*. NMR Biomed. 2014;27(1):80-89.
18. Bast RC Jr. *Early detection of ovarian cancer: new technologies in pursuit of disease that is neither common nor rare*. Trans Am Clin Climatol Assoc. 2004;115:233-247.
19. Denkert C, Budczies J, Kind T et al. *Mass spectrometry-based metabolic profiling reveals different metabolite patterns in invasive ovarian carcinomas and ovarian borderline tumors*. Cancer Res. 2006;66(22):10795-10804.
20. Buckendahl AC, Budczies J, Fiehn O et al. *Prognostic impact of AMP-activated protein kinase expression in ovarian carcinoma: correlation of protein expression and GC/TOF-MS-based metabolomics*. Oncol Rep. 2011;25(4):1005-1012.
21. Zhang T, Wu X, Ke C et al. *Identification of potential biomarkers for ovarian cancer by urinary metabolomic profiling*. J Proteome Res. 2013;12(1):505-512.
22. Jimenez B, Mirnezami R, Kinross J et al. *JH HR-MAS NMR spectroscopy of tumor induced local metabolic "field-effects" enables colorectal cancer staging and prognostication*. J Proteome Res. 2013;12(2):959-968.
23. Manna SK, Tanaka N, Krausz KW et al. *Biomarkers of coordinate metabolic reprogramming in colorectal tumors in mice and humans*. Gastroenterology. 2014;S0016-5085(14)00054-7.
24. Leichtle AB, Nuoffer JM, Ceglarek U et al. *Serum amino acid profiles and their alterations in colorectal cancer*. Metabolomics. 2012;8(4):643-653.
25. Denkert C, Budczies J, Weichert W et al. *Metabolite profiling of human colon carcinoma – deregulation of TCA cycle and amino acid turnover*. Mol Cancer. 2008;7:72.
26. Tiziani S, Kang Y, Harjanto R et al. *Metabolomics of the tumor microenvironment in pediatric acute lymphoblastic leukemia*. PLoS One. 2013;8(12):e82859.
27. Nielsen SF, Nordestgaard BG, Bojesen SE. *Statin use and reduced cancer-related mortality*. N Engl J Med. 2012;367(19):1792-1802.
28. Santos CR, Schulze A. *Lipid metabolism in cancer*. FEBS J. 2012;279(15):2610-2623.
29. Kowalczyk J. *Ostra białaczka limfoblastyczna*. W: M Krzakowski, K Warzecha. *Zasady postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych*. Nowotwory wieku dziecięcego. Gdańsk:Via Medica; 2013:502-506.

30. Tsurusawa M, Chin M, Iwai A et al. *Japanese Children's Cancer and Leukemia Study Group. L-Asparagine depletion levels and L-asparaginase activity in plasma of children with acute lymphoblastic leukemia under asparaginase treatment.* Cancer Chemother Pharmacol. 2004;53(3):204-208.
31. Wang Y, Zhang L, Chen Wl et al. *Rapid diagnosis and prognosis of de novo acute myeloid leukemia by serum metabolomic analysis.* J Proteome Res. 2013;12(10):4393-4401.
32. Spratlin JL, Serkova NJ, Eckhardt SG. *Clinical applications of metabolomics in oncology: a review.* Clin Cancer Res. 2009;15(2):431-440.
33. Serkova N, Boros LG. *Detection of resistance to imatinib by metabolic profiling: clinical and drug development implications.* Am J Pharmacogenomics. 2005;5(5):293-302.
34. Lodi A, Tiziani S, Khanim FL et al. *Proton NMR-based metabolite analyses of archived serial paired serum and urine samples from myeloma patients at different stages of disease activity identifies acetylcarnitine as a novel marker of active disease.* PLoSOne .2013;8(2):e56422.
35. McKillop AM, Flatt PR. *Emerging applications of metabolomic and genomic profiling in diabetic clinical medicine.* Diabetes Care. 2011;34(12):2624-2630.
36. Friedrich N. *Metabolomics in diabetes research.* J Endocrinol. 2012;215(1):29-42.
37. Selomaa V, Havulinna A, Saarela O. *Thirty-one novel biomarkers as predictors for clinically incident diabetes.* PLoS ONE. 2010;5:e10100.
38. Christ A, Evers S, Krapfenbauer K, Sebokova E. *Pancreatic polypeptide as target/ marker of beta cell failure.* US patent 2009/0215069. <http://www.google.com,ar/patents/US20090215069> (stan z 17.10.2014)
39. Bain JR, Muehlbauer MJ. *Metabolomics reveals unexpected responses to oral glucose.* Diabetes. 2013;62(8):2651-3.
40. Shaham O, Wei R, Wang TJ et al. *Metabolic profiling of the human response to a glucose challenge reveals distinct axes of insulin sensitivity.* Mol Syst Biol. 2008;4:214.
41. Ho JE, Larson MG, Vasan RS et al. *Metabolite profiles during oral-glucose challenge.* Diabetes. 2013;62(8):2689-2698.
42. Deja S, Barg E, Mlynarz P et al. *WNMR-based metabolomics studies of urine reveal differences between type 1 diabetic patients with high and low HbAc1 values.* J Pharm Biomed Anal. 2013;83:43-48.
43. Silva CL, Passos M, Camara JS. *Investigation of urinary volatile organic metabolites as potential cancer biomarkers by solid-phase microextraction in combination.* Br J Cancer. 2011;105(12):1894-1904.
44. Aboud OA, Weiss RH. *New opportunities from the cancer metabolome.* Clin Chem. 2013;59(1):138-146.