

Metabolické profilovanie – nový pohľad na hodnotenie biologického materiálu

Birková A., Dubayová K., Kušnir J.

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie a LABMED, a. s., Lekárska fakulta Univerzity P.J.Šafárika, Košice, Slovensko

SÚHRN

Metabolické profilovanie je zjednodušenou charakteristikou metabolómu, ktorý je kompletným súborom prirodzene sa vyskytujúcich malých molekúl (metabolitov) v živom systéme. Patologické procesy zasahujú do metabolizmu a menia tento súbor metabolitov. Odlíšnosti v metabolických profiloch môžu slúžiť na skríning a diagnostiku určitých chorôb. Niektorými technikami sa môžu sledovať skupiny metabolitov naraz na základe určitých spoločných kritérií, a čiastočne tak prispievať k štúdiu metabolómu. Ako veľmi výhodné sa ukazujú analýzy s minimálnymi úpravami biologického materiálu. Pomáhajú objavovať látky nové alebo nepredpokladané. Biologické tekutiny obsahujú charakteristický súbor prirodzene fluoreskujúcich látok. Porovnávaním fluorescenčných profilov zdravých a chorých je možné vytypovať charakteristické znaky, ktoré by mohli slúžiť na skríning alebo diagnostiku vybraných ochorení.

Kľúčové slová: metabolický profil, metabolomika, fluorescencia, diagnostika.

SUMMARY

Birková A., Dubayová K., Kušnir J.: Metabolic profiling – the novel look at the valuation of biological material

Metabolic profiling is the simplified characteristics of the metabolome, which is a complete set of naturally occurred small molecules (metabolites) in living system. This set of metabolites can be changed by pathological processes encroached on metabolism. Differences in metabolic profiles can help to screen or to diagnose selected diseases. Some analytical techniques may characterise groups of metabolites with common properties in one step and particularly support the study of metabolome. Very useful seems to be the analysis with minimal preparation of biological material. It helps to discover new or unexpected analytes. Biological fluids contain characteristic set of naturally fluorescent compounds. Comparison of fluorescent profiles in healthy and diseased humans determines characteristic signs usable for screening or diagnostics particular diseases.

Key words: metabolic profile, metabolomics, fluorescence, diagnostics.

Úvod

Každý zdravý organizmus je ohraničený systém dynamicky reagujúci na rôzne podnety z okolia aj z vnútra organizmu a snaží sa udržať v rovnováhe zloženie svojho vnútorného prostredia. Výsledkom fyziologických pochodov v organizme je súbor rôznych metabolitov, ktoré participujú na udržaní homeostázy. Narušenie rovnováhy je prejavom choroby a spôsobí zmenu tohto súboru v zmysle zvýšenia, respektíve zníženia počtu metabolitov alebo zmien ich koncentrácií. Metabolický profil je preto nástrojom vhodným na skríning alebo diagnostiku patologických stavov.

Už niekoľko rokov trvá éra biomík, ku ktorým patrí napríklad trend kompletne mapovať celý genóm nazvaný genomika, trend identifikovať všetky proteíny a ich funkcie nazvaný proteomika alebo štúdium celého súboru molekúl informačnej mRNA v bunke, tkanive alebo orgáne a spôsobu transkripcie s názvom transkriptomika. Mladšou biomikou je metabolomika, čo je snaha skompletizovať celý súbor metabolitov v bunke, orgáne alebo organizme v danom momente. Keďže metabolitov je rádovo menej ako proteínov, RNA alebo DNA, metabolomika, ako veda zaoberajúca sa štúdiom kompletného metabolického profilu, sa javí ako najvhodnejšia a najjednoduchšia stratégia na analýzu biochemických zmien. Niektorí autori dokonca označujú metabolický

profil ako najpravdivejší z doterajších náhľadov na fyziologický stav biologického materiálu. Sledovaním metabolických profilov biologických tekutín chorých a ich porovnávaním s metabolickými profilmi vzoriek od zdravej kontrolnej skupiny, by sa mohli vytypovať charakteristické znaky spojené s jednotlivými ochoreniami.

Metabolomika/metabonomika – stratégia výhodná na diagnostiku

V ostatných rokoch sa výrazne urýchlil výskum, ktorý sa zaoberá štúdiom mnohých zložiek bunkových metabolických ciest naraz. Skladba metabolitov odráža aktuálny stav systému, a preto má veľký informačný potenciál. Zároveň o biologických systémoch poskytuje také informácie, ktoré sa nemôžu získať inými „ómickými prístupmi“ [3, 6, 12, 13, 23, 34]. Tým metabolomika ostatné biomiky dopĺňa a prepája s aktuálnym metabolickým stavom a tkanivovou histológiou [27]. Na človeka a jeho metabolizmus vplyva obrovské množstvo podnetov z prostredia a metabolomika poskytuje unikátnu príležitosť nahliadnuť na genotypovo-fenotypové a genotypovo-environmentálne vzťahy [4]. Hľadá sa preto *skrínigová metóda*, ktorá je lacná a rýchla a hneď pri prvej analýze umožní rozlíšiť dáta podľa vrodenej biologických charakteristík a oddeliť od nich nesúvisiaci šum prostredia.

Význam týchto prístupov ako diagnostického nástroja na metabolickú klasifikáciu jednotlivcov vyzdvihol Kussmann et al. [16]. Analýza ľahko dostupných biologických tekutín (moč, krvné sérum) dovoľuje študovať aj metabolické schémy a biomarkery, u ktorých dochádza k rytmickým zmenám. Sledovať sa môžu dokonca simultánne prebiehajúce regulácie niekoľkých metabolitov v rámci vyšetovaných schém [27].

Metabolomika sa veľmi rýchlo stala akceptovanou nielen v biochemickom výskume, ale aj v oblastiach predklinických a klinických, a dokonca aj v niektorých odvetviach priemyslu [1, 5, 9, 11, 27, 28, 30, 32, 33, 35]. Je vhodná najmä na:

- poskytovanie indikátorov chorôb a identifikáciu nových biomarkerov;
- skrýning rôznych ochorení;
- klasifikáciu skupín pacientov založenú na ich špecifickom metabolizme;
- sledovanie invazivity tumorov a pravdepodobnosti metastázovania;
- indikovanie funkcie génov;
- skúmanie enzýmovej aktivity;
- rýchle vyvíjanie liekov a predpovedanie ich orgánovej toxicity v predklinickom výskume;
- monitoring niektorých účinkov (fosfolipidózy, účinky na mitochondrie, proliferácia peroxizómov, zmeny v biosyntéze steroidov, zmeny v črevnej mikroflóre);
- poskytovanie obrazu metabolizmu, študovanie zmien koncentrácie metabolitov;
- sledovanie rozsahu biochemických efektov indukovaných rôznymi podmienkami;
- sledovanie efektov chorôb a chemikálií na „environmentálne organizmy“;
- typizáciu a charakteristiku mikroorganizmov vo farmaceutickom priemysle, biológii aj medicíne. Vzorky od zdravotných inštitúcií, výrobcov jedla, z priemyselných miest a poľnohospodárske produkty môžu byť rýchlo a lacno monitorované pri podozrení na bakteriálnu kontamináciu;
- niektoré ciele v biotechnológii rastlín;
- sledovanie stavu výživy ľudí.

Metabolické profilovanie

Technológie metabolického profilovania umožňujú *komplexne mapovať* bunkový a systémový biochemický profil. Na základe takejto komplexnosti sa môžu všetky metabolity prítomné v biologických vzorkách principiálne detekovať súčasne. Cieľom spomínaných technológií je extrahovať skryté biochemické informácie do formy metabolických profilov a pozorovať časovo závislé zmeny zloženia metabolitov v biologických vzorkách. Metabolické profily majú vysokú diagnostickú aj prediktívnu hodnotu najmä vo farmakológii a toxikológii [27].

Cieľom metabolomiky je správne identifikovať a kvantifikovať všetky malé molekuly v bunke. Súčasnú metódu dovoľujú stanovovať jednotlivé molekuly alebo menšie skupiny molekúl *selektívnou analýzou* s dobre vyvinutými kalibračnými metódami. Pri *analý-*

ze celého metabolómu je nevyhnutné použiť stratégie so širším pokrytím z hľadiska typu a počtu analyzovaných metabolitov, napríklad kombináciou separačných a detekčných analytických techník (LC-MS, LC-NMR). Väčšina extrakčných procedúr uvádzaných v literatúre je zatiaľ menej zložitá. Tieto procedúry niektoré metabolity vynechávajú a tým vedú k sledovaniu „len“ časti metabolómu. Aj obsah čiastkových informácií potenciálne vedie ku komplexnému monitorovaniu metabolómu [21, 24]. Prístupy ako fingerprinting a profilovanie dovoľujú namerať bez predchádzajúcej separácie alebo následnej fragmentácie veľké množstvo často anonymných zložiek [31]. Biologické tekutiny sú najjednoduchšie získavané vzorky a môžu sa analyzovať bez prípravy alebo s malou prípravou. Tkanivá a bunky živočíšnych, rastlinných alebo mikrobiálnych systémov však pred analýzou určitú úpravu vzorky nevyhnutne vyžadujú [7, 21, 24]. Prínosom profilu je monitorovanie súboru zložiek a spoľahlivé zhrnutie spoločných kritérií týchto zložiek. Výsledkom je schéma koncentrácií viacerých analytov nameraných počas rôznych experimentálnych podmienok namiesto monitorovania jediného metabolitu. Profilové metódy teda znamenajú určovanie súboru podobných zložiek naraz, použitím jednej prípravy vzorky [26, 31]. Stratégie bez individuálneho určovania identity metabolitov sa označili ako metabolický fingerprinting. Ich výhodou je, že aj bez náročnej analytickej techniky sú postačujúce na poskytovanie hodnotných informácií o metabolických reguláciách v biologickej vzorke. Metabolický fingerprint je vhodný najmä na rýchlu klasifikáciu typov vzorky, napr. na diagnostické ciele, kontrolu kvality produktu alebo skrýning súboru zmien [4].

Fluorescenčný spektrálny profil (fingerprint) – definovanie biologického materiálu ako celku

Fluorescenčné techniky sú pre svoju vysokú citlivosť a jednoduchosť merania veľmi vhodné na vyhotovenie metabolických profilov. Biologický materiál obsahuje charakteristickú zmes prirodzene fluoreskujúcich látok, u ktorých analogicky zmeny prítomnosti alebo koncentrácií môžu svedčiť o zmenenom biochemizme a teda patologickom procese. Počet analyzovaných metabolitov sa tak znižuje len na fluoreskujúce látky a fluorescencia sa stáva ich spoločným menovateľom. Spomínané výhody fluorescencie a skutočnosť, že prirodzene fluoreskujú molekuly biochemicky veľmi významné (katecholamíny, aminokyseliny, vitamíny, koenzýmy, porfyríny atď.) predurčujú fluorescenčné profily na rýchly a nízkonákladový skrýning alebo diagnostiku vybraných ochorení využiteľnú aj prakticky.

Ako fluorescenčný fingerprint/profil použiteľný na definovanie alebo typizáciu minimálne upravovaného biologického materiálu (zmesi fluorofórov) môžu slúžiť trojrozmerné záznamy rôzne snímaných fluorescenčných spektier (excitačno-emisné matrice – EEM, synchronne fluorescenčné matrice – SFM), ktoré charakterizujú zmes ako jeden celok [2, 17, 18, 22] – obr. 1.

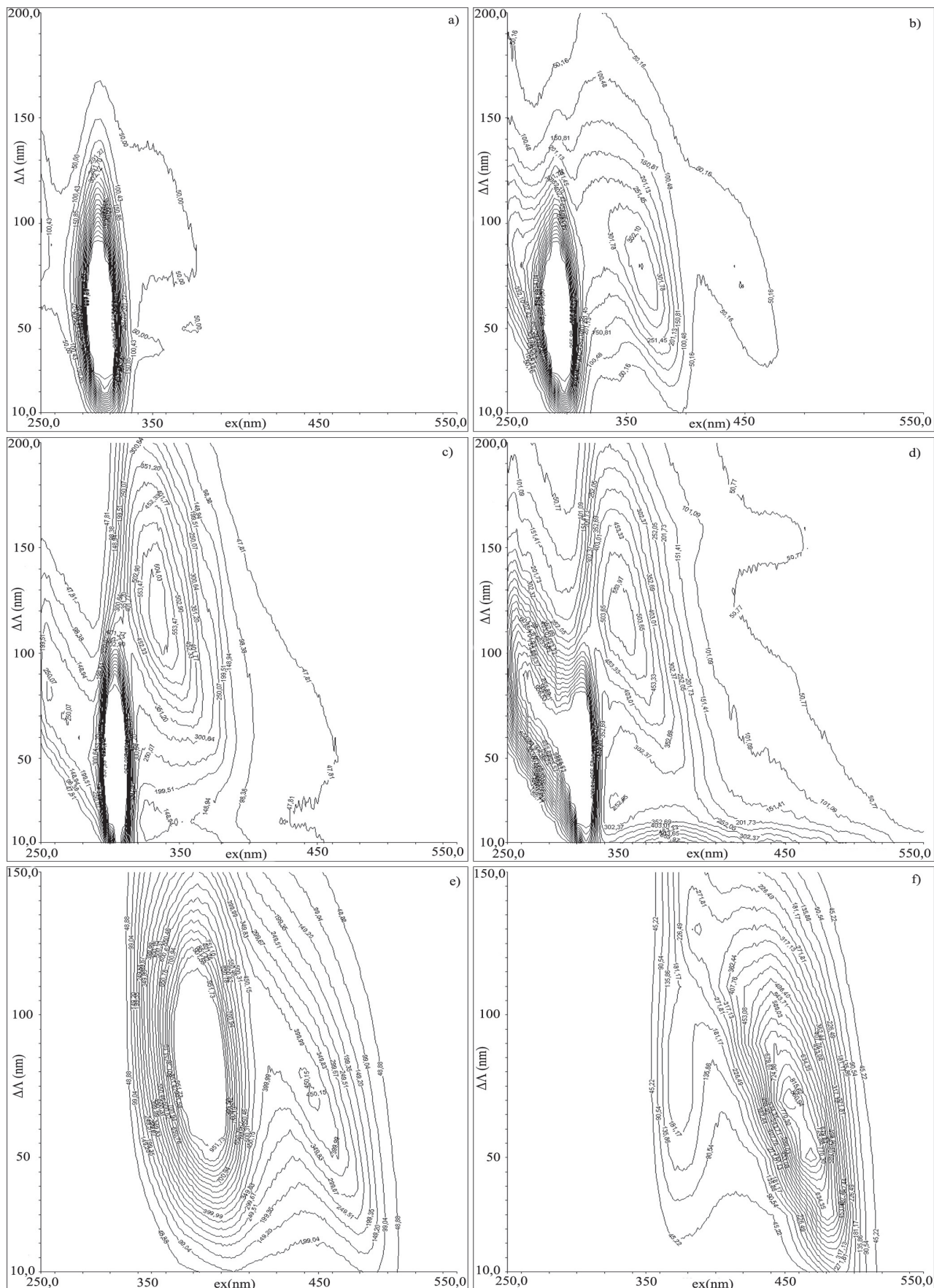


Fig. 1. The illustration of synchronous fluorescence profiles of cerebrospinal fluid, serum and urine, based on 3-D matrices (SFM). Cerebrospinal fluid samples: a) healthy; b) tumor CNS (8) Serum samples: c) healthy; d) celiac sprue Urine samples: e) healthy; f) celiac sprue.

Individual samples of cerebrospinal fluid, serum and urine, diluted with redistilled water or phosphate buffer were measured using Perkin-Elmer Luminescence Spectrometer LS 55. (Unpublished results of authors)

Súradnice fluorescenčných centier, ich intenzita fluorescencie ako aj minoritné charakteristiky dané priebehom vrstevníc vytvárajú jedinečný obraz – „odtlačok“ – fingerprint. Toto grafické vyjadrenie je veľmi špecifické, lebo je výsledkom jedinečného vnútorného zloženia metabolitov a ich vzájomných interakcií. Každá zmena v zložení biologického materiálu naruší veľmi jemnú rovnováhu vnútorných vzťahov, čo má za následok zmenu fingerprintu. Nameraná zmena fingerprintu automaticky odráža zmenu v zložení biologického materiálu. Ak sa takéto fingerprinty dajú do vzťahu s konkrétnymi fyziologickými (patologickými) zmenami, prinášajú dostatok informácií na diagnostické posúdenie.

Jedným z možných využití merania celkovej fluorescencie moča je detekcia exkrécie fluoreskujúcich koncových produktov radikálových reakcií. Skúmal sa vplyv rôznych typov zápalových ochorení obličiek na prítomnosť koncových produktov progresívnej glykácie a di-tyrozínu v moči a potvrdili sa jednoznačné rozdiely medzi skupinami pacientov klasifikovaných podľa diagnóz [14]. Fluorescenčné matrice sú vo svete využívané aj na sledovanie ďalších biologických tekutín a tkanív. EEM bola napríklad použitá na sledovanie oxidácie sérových lipoproteínov a ich vzťahu ku ateroskleróze [15, 29]. EEM je obzvlášť výhodná aj na toxikologické analýzy, napr. na detekciu polutantov (herbicídy, biocídy) a drog v biologickom materiáli. Fluorescenčnú charakteristiku srvátky získanej z mlieka od rôznych cicavcov (aj človeka) sledoval Pulgarin et al. [25]. Tento postup navrhuje ako rýchly kontrolný systém kvality mlieka. Aplikácia EEM sa s 75–90% špecificitou a vysokou citlivosťou využila na skrining a real-time diagnostiku prekanceróz krčka maternice [10]. V gastroenterologickej oblasti je možné EEM využiť na diagnostiku rakoviny hrubého čreva [19].

Záver

Metabolické profilovanie patrí vo svete medzi najmodernejšie prístupy k analýze biologických tekutín. Jeho obrovskou výhodou je unikátna jednoduchosť v zmysle dobre vytypovanej jednej analýzy, pokiaľ možno s čo najmenšími úpravami vzorky. Neustále sa objavujú nové informácie, ktoré potvrdzujú a zvyšujú význam profilovania pri rôznych aplikáciách. Hoci je skoro na to, aby sa dosiahnuté výsledky dali aplikovať rutinne a je ešte veľa nezodpovedaných otázok pri spracúvaní a interpretácii získaných dát, je veľmi pravdepodobné, že sa v budúcnosti tento analytický prístup bude reálne využívať a medzi oblasťami s jeho aktívnou účasťou určite nebude chýbať klinická biochémia a diagnostika chorôb.

Literatúra

1. **Boros, L. G., Brackett, D. J., Harrigan, G. G.** Metabolic Biomarker and Kinase drug Target Discovery in Cancer Using Stable Isotope-Based Dynamic Metabolic Profiling (SIDMAP). *Current Cancer Drug Targets*, 2003, 3, p. 447–455.

2. **Dubayová, K., Kušník, J., Podracká, L.** Diagnostic monitoring of urine by means of synchronous spectrum. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2003, 55, p. 111–119.
3. **Dunn, W. B., Bailey, N. J., Johnson, H. E.** Measuring the metabolome: current analytical Technologies, *Analyst*, 2005, 130, p. 606–625.
4. **Fiehn, O.** Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modeling to understand metabolic networks. *Comparative and Functional Genomics*, 2001, 2, p. 155–168.
5. **Gibney, M. J., Walsh, M., Brennan, L., Roche, H. M., German, B., van Ommen, B.** Metabolomics in human nutrition: opportunities and challenges. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2005, 82, p. 497–503.
6. **Glassbrook, N., Ryals, J.** A systematic approach to biochemical profiling. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2001, 4, p. 186–190.
7. **Goodacre, R., Vaidyanathan, S., Dunn, W. B., Harrigan, G. G., Kell, D. B.** Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends in Biotechnology*, 2004, 22, 5, p. 245–252.
8. **Harakalová, M., Mokry, M.** *Fluorescenčný spektrálny profil mozgovomiechového moku ako možný diagnostický marker*. Košice : Práca ŠVOČ, LF UPJŠ 2006.
9. **Hirai, M. Y., Yano, M., Goodenowe, D. B., Kanaya, S., Kimura, T., Awazuhara, M., Arital, M., Fujiwara, T., Saito, K.** Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101, 27, p. 10205–10210.
10. **Chang, S. K., Dawood, M. Y., Staerkel, G., Utzinger, U., Atkinson, E. N., Richards-Kortum, R. R., Follen, M.** Fluorescence spectroscopy for cervical precancer detection: Is there variance across the menstrual cycle? *Journal of Biomedical Optics*, 2002, 7, 4, p. 595–602.
11. **Jorgensen, K., Rasmussen, A. V., Morant, M., Nielsen, A. H., Bjarnholt, N., Zagrobelny, M., Bak, S., Moller, B. L.** Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products. *Current Opinion in Plant Biology*, 2005, 8, p. 280–291.
12. **Kell, D. B.** Metabolomics and systems biology: making sense of the soup. *Current Opinion in Microbiology*, 2004, 7, p. 296–307.
13. **Kimball, E., Rabinowitz, J. D.** Identifying decomposition products in extracts of cellular metabolites. *Analytical Biochemistry*, 2006, 358, 2, p. 273–280.
14. **Kirschbaum, B.** Correlative studies of urine fluorescence and free radical indicators. *Clinical Nephrology*, 2002, 58, 5, p. 344–349.
15. **Koller, E., Quehenberger, O., Jürgens, G., Wolfbeis, O. S., Esterbauer, H.** Investigation of human plasma low density lipoprotein by three-dimensional fluorescence spectroscopy. *FEBS LETTERS*, 1986, 198, 2, p. 229–234.
16. **Kussmann, M., Raymond, F., Affolter, M.** OMICS-Driven biomarker discovery in nutrition and health. *Journal of Biotechnology*, 2006, 124, 4, p. 758–787.
17. **Kušník, J., Dubayová, K., Lešková, L., Lajtár, M.** Concentration Matrices-Solutions for Fluorescence Definition of Urine. *Analytical Letters*, 2005, 38, 10, p. 1559–1567.
18. **Leiner, M. J., Hubmann, M. R., Wolfbeis, O. S.** The Total Fluorescence of Human Urine. *Analytica Chimica Acta*, 1987, 198, p. 13–23.
19. **Li, B. H., Xie, S. S.** Autofluorescence excitation-emission matrices for diagnosis of colonic cancer. *World J. Gastroenterol*, 2005, 11, 25, p. 3931–3934.

20. Li, Y. Q., Huang, X. Z., Xu, J. G. Synchronous fluorescence spectrometric methodology in the wavelength domain. *Journal of Fluorescence*, 1999, 9, 3, p. 173–179.
21. Linton, J. C. et al. So what's the deal with metabonomics? Metabonomics measures the fingerprint of biochemical perturbations caused by disease, drugs, and toxins. *Anal. Chem.*, 2003, 75, p. 384A–391A.
22. Lloyd, J. B. F. Partly quenched, synchronously excited fluorescence emission spectra in the characterisation of complex mixtures. *Analyst*, 1974, 99, p. 729–738.
23. Nielsen, J., Oliver, S. The next wave in metabolome analysis. *Trends Biotechnol.*, 2005, 23, p. 544–546.
24. Nicholson, J. K., Wilson, I. D. Understanding "global" systems biology: metabonomics and the continuum of metabolism. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2003, 2, p. 668–676.
25. Pulgarin, J. A. M., Molina, A. A., Pardo, M. T. A. Fluorescence characteristics of several whey samples subjected to different treatments and conditions. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 536, p. 153–158.
26. Roessner, U., Luedemann, A., Brust, D., Fiehn, O., Linke, T., Willmitzer, L., Fiehn, A. R. Metabolic Profiling Allows Comprehensive Phenotyping of Genetically or Environmentally Modified Plant Systems. *The Plant Cell*, 2001, 13, p. 11–29.
27. Senn, H. Metabonomics: Metabolic Profiles and Biomarkers in Pharma Research. *Chimia*, 2005, 59, 4, p. 173.
28. Schmidt, C. Metabolomics Takes Its Place as Latest Up-and-Coming „Omic“ Science. *Journal of the National Cancer Institute*, 2004, 96, 10, p. 732–734.
29. Singh, S., Suri, R., Agrawal, C. G. Fluorescence properties of oxidised human plasma low-density lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1254, p. 135–139.
30. Strauss, A. W. Tandem Mass-Spectrometry in Discovery of Disorders of The Metabolome. *J. Clin. Invest.*, 2004, 113, p. 354–356.
31. Sweetlove, L. J., Last, R. L., Fernie, A. R. Predictive Metabolic Engineering: A Goal for Systems Biology. *Plant Physiology*, 2003, 132, p. 420–425.
32. Viant, M. R. Environmental Metabolomics: The Study of Disease and Toxicity in Wildlife, 2006. Dostupné na WWW: <http://www.actionbioscience.org/genomic/viant.html>.
33. Want, E. J., Cravatt, B. F., Siuzdak, G. The Expanding Role of Mass Spectrometry in Metabolite Profiling and Characterization. *ChemBioChem*, 2005, 6, p. 1941–1951.
34. Weckwerth, W. Metabolomics in systems biology. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 2003, 54, p. 669–689.
35. Wilson, I. D., Plumb, R., Granger, J., Major, H., Williams, R., Lenz, E. M. HPLC-MS-based methods for the study of metabonomics. *Journal of Chromatography B*, 2005, 817, p. 67–76.

Táto práca vznikla s podporou grantov VEGA 1/3364/06 a VEGA 1/2267/05. Všetky postupy použité pri odberoch a spracovaní biologického materiálu sú v zhode so zásadami etickej komisie fakulty.

Do redakcie došlo 5. 3. 2007.

Adresa pro korespondenci:

MUDr. Anna Birková

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie
a LABMED, a. s.

Lekárska fakulta Univerzity P. J. Šafárika

Trieda SNP 1

040 66 Košice

Slovenská republika

e-mail: birkova@medic.upjs.sk