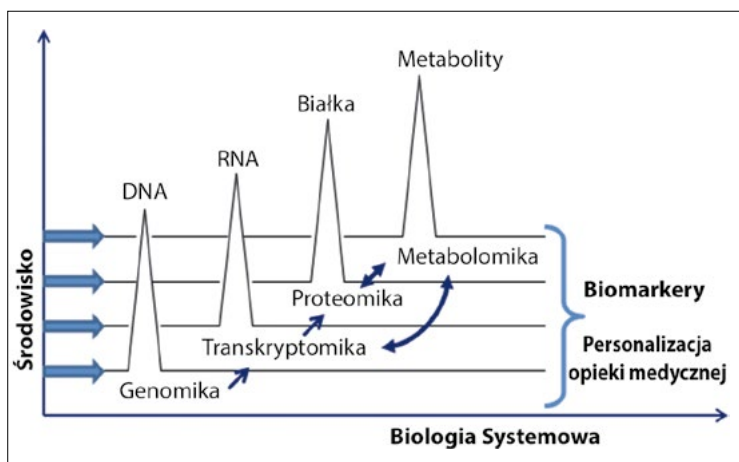


Metabolomika – współczesny trend badawczy w medycynie i farmacji

W obszarze rozwijających się nowych technologii oraz zaawansowanych metod obliczeniowych skomplikowane, wieloaspektowe problemy badawcze stają się możliwe do rozwiązania. W kontekście współczesnej medycyny oraz farmacji, dominuje poszukiwanie innowacyjnych narzędzi diagnostycznych oraz analitycznych, które mogłyby uzupełniać aktualną wiedzę na temat niepoznanych do końca procesów chorobowych. Charakterystyczną wspólną właściwością istot żywych jest zdolność do jednoczesnego prowadzenia wielu różnorodnych procesów biologicznych. Procesy biologiczne to jeden z skomplikowanych, najciekawszych i przez to najbardziej wymagających obiektów badawczych. Jednym z kierunków, które mają sprostać wyzwaniom współczesnej medycyny i farmacji są badania w zakresie genomiki, transkryptomiki, proteomiki oraz metabolomiki. Tworzą one podejście zwane biologią systemową, w skrócie – systeomiką (rys. 1). Biologia systemowa wykorzystuje holistyczne podejście do badania złożonych interakcji w układach biologicznych, traktując je jako zintegrowane systemy, na które składają się komórki, tkanki, organizmy lub określone gatunki. Aby opisać złożoność oddziaływań w systemach biologicznych, konieczna jest ich kompleksowa ocena z zastosowaniem odpowiednich technologii pomiarowych, modeli matematycznych i obliczeniowych. Celem biologii systemowej jest integracja danych ilościowych o matematycznie zdefiniowanych znaczeniach na różnych poziomach organizacji komórkowej (DNA, RNA, białka, metabolity)¹.

Metabolomika – ostatnie ogniwo „omik”

Rozwój genomiki, poprzez odczytanie pełnej sekwencji kodu genetycznego, doprowadził do postawienia nowych hipotez dotyczących zależności pomiędzy ekspresją poszczególnych genów a procesami patofizjologicznymi występującymi w organizmie. W następstwie rozwoju genomiki, intensywny postęp obserwowany był również w kolejnych gałęziach systeomiki, tj. w transkryptomice i proteomice, gdzie mRNA oraz białka, jako produkty ekspresji genów, są z nimi bezpośrednio powiązane. Uzupełnieniem wiedzy na temat obserwowanych zależności między genomem, transkryptomem i proteomem a procesami patofizjologicznymi okazała się analiza metabolitów jako produktów pośrednich zapisu kodu genetycznego. Podczas gdy zmiany zachodzące na poziomie genomu, transkryptomu czy proteomu mogą warunkować predyspozycje do wystąpienia pewnych procesów biologicznych, zmiany w metabolomie odzwierciedlają aktualny stan fizjologiczny systemu biologicznego na poziomie komórki, tkanki, narządu czy całego organizmu. Genomika i proteomika mogą pomóc przewidzieć, co się zdarzy w organizmie, natomiast metabolomika przede wszystkim dostarcza informacji o tym, co faktycznie już się wydarzyło. Badania metabolomiczne uważane są zatem za integralne podejście, stanowiące uzupełnienie wiedzy dotyczącej zależności między genotypem, a fenotypem określonego układu biologicznego. Warty odnotowania jest fakt, iż podczas gdy organizm ludzki składa się z około 30-50 tysięcy genów, 150-300 tysięcy transkryptomów i około 1 miliona białek, to ilość metabolitów komórkowych, czyli endogennych związków małowcząsteczkowych, zawiera się w granicach 3,5-10 tysięcy. W porównaniu do transkryptomu oraz proteomu, liczba metabolitów w organizmie jest stosunkowo niewielka, ale szereg zależności wpływających na ostateczny profil metaboliczny ma wymiar wielopłaszczyznowy. To czyni metabolomikę interesującym kierunkiem badawczym, ale też z drugiej decyduje o jej poziomie zaawansowania i skomplikowania. Rozwój technik analitycznych prowadzący do zwiększenia czułości i dokładności oznaczeń, a także dostępne zaawansowane bioinformatyczne metody analizy danych sprawiają, iż dotychczas praktycznie niemożliwe do oznaczenia metabolity, występujące w śladowych ilościach, ale niosące dodatkową informację na temat stanu organizmu, stają się możliwe do oznaczenia, identyfikacji, a także do interpretacji. Uzyskane dane metaboliczne uzupełniają istniejący stan wiedzy a, wraz z genomiką, proteomiką, oraz transkryptomiką, pozwalają na ho-



Rys. 1. „Omiki” w biologii systemowej



Rys. 2. „Kolo uryny” wspomagające diagnozę jednostek chorobowych na podstawie analizy zapachu, smaku oraz zabarwienia moczu³

listychną ocenę procesów molekularnych charakterystycznych dla stanów zarówno fizjologicznych, jak i patofizjologicznych złożonych układów biologicznych².

Historia badań metabolomicznych

Poszukiwanie przyczyn procesów chorobowych jest tak stare, jak sama medycyna. Od medycyny diagnostycznej w starożytnym Egipcie, przez kontrowersyjne założenia frenologii, iż z pomiarów czaszki człowieka można przewidzieć jego cechy i osobowość, do odkryć nauki współczesnej, trwają poszukiwania wymiernych biologicznych wskaźników, rzetelnie odzwierciedlających fizjologiczne funkcjonowanie organizmu ludzkiego. Pogląd, że zmiany w płynach biologicznych sugerują występowanie choroby sięgają starożytnej Grecji. Rycina ilustrująca zestaw kolb z moczem służyła powszechnie do celów diagnostycznych w czasach średniowiecza (rys. 2)³. Analizę moczu przeprowadzano na podstawie badania smaku, zapachu oraz zabarwienia, a uzyskane wyniki interpretowano w oparciu o diagram kołowy. W ten sposób np. diagnozowano cukrzycę. Od tamtego czasu wiele się zmieniło, a idea badania składu próbek biologicznych ewoluowała w kierunku zastosowania bardziej zaawansowanych metod pomiarowych. Obecnie, poprzez analizę płynów ogólnoustrojowych, takich jak krew, mocz, ślina, a także ekstrakty tkanek, możliwe jest ustalenie profilu metabolomicznego, którego zmiany mogą być specyficzne dla różnych stanów patofizjologicznych, a pojawiać się znacznie wcześniej niż charakterystyczne objawy kliniczne.

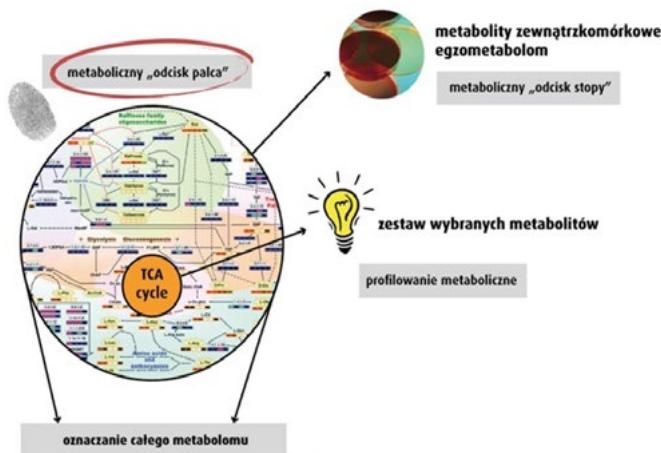
Pierwsze doniesienia na temat zastosowania metabolomiki odnotowano w latach 70. XX wieku. Ten kierunek badawczy został zastosowany w badaniach Horninga i wsp., którzy po raz pierwszy opisali metodę oznaczania profili metabolicznych z zastosowaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas⁴. Również w latach 70. XX wieku inni badacze, tj. Robinson i Pauling przeprowadzili analizę ilościową oparów oddechu oraz moczu proponując jednocześnie uwzględnienie nie jednego a wielu oznaczanych związków⁵. W miarę rozwoju tej dyscypliny naukowej do

powszechnego stosowania wprowadzono trzy zasadnicze pojęcia charakteryzujące badania metabolitów: metabolomikę, metabonomikę oraz metabolom. Według Nicholsona i wsp.⁶, a także Fiehn⁷ metabolomika i metabonomika w sposób całościowy określają profile biochemiczne oraz funkcje zespołów metabolitów w organizmie przez analizę składu metabolicznego pojedynczych komórek, płynów biologicznych oraz organów. Pojęcie metabolomu wprowadzono poprzez analogię do genomu, transkryptomu oraz proteomu, a określane jest ono jako liczba wszystkich związków małowcząsteczkowych (metabolitów) obecnych w określonej komórce, tkance czy narządzie⁸.

Podejścia badawcze stosowane w metabolomice

W nowoczesnych badaniach metabolomu najczęściej stosowane są podejścia badawcze, takie jak: celowana analiza metabolomiczna, czyli inaczej profilowanie metaboliczne (ang. *metabolic profiling*) oraz niecelowana analiza metabolomiczna, czyli tzw. metaboliczny odcisk palca (ang. *metabolic fingerprinting*)⁹. Celowana analiza metabolomiczna dotyczy analizy ograniczonej liczby metabolitów, które biorą udział w zmienionych, np. w wyniku mutacji genowej, procesach biologicznych. Poprzez oznaczanie metabolitów uczestniczących w zmienionym szlaku biochemicznym (na skutek np. mutacji enzymu), zastosowanie celowanej analizy metabolomicznej pozwala ocenić wpływ danej mutacji na przemiany metaboliczne. Ta strategia dotyczy badań nad konkretnymi metabolitami. Dlatego istotne jest zastosowanie odpowiedniej, selektywnej względem poszczególnych metabolitów, procedury przygotowania próbek do analizy, a także czułej i wysoce selektywnej techniki analitycznej. Celowana analiza metabolomiczna obejmuje również analizę określonej grupy metabolitów o podobnych właściwościach fizykochemicznych np. węglowodanów, aminokwasów, nukleozydów czy też związków, które występują w określonym szlaku biochemicznym (np. metabolizm RNA, cykl Krebsa, glukoneogeneza). Istotą badania jest wówczas określenie zmian w profilach metabolicznych w zależności od np. występowania zmian patologicznych organizmu (np. stany zapalne, choroby nowotworowe, choroby układu krążenia) lub czynników zewnętrznych (dieta, stosowana farmakoterapia, czynniki epidemiologiczne np. palenie tytoniu). Zmiany w profilach metabolicznych nie dotyczą obserwacji poziomów pojedynczych metabolitów, ale ilościowych zależności między poziomami wszystkich statystycznie istotnych związków małowcząsteczkowych tworzących dany profil.

Z kolei niecelowana analiza metabolomiczna skupia się na oznaczaniu jakościowym zmian zachodzących w całym metabolomie. To podejście badawcze wymaga zastosowania czułych i komplementarnych technik analitycznych, aby możliwe było oznaczenie metabolitów o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych, tj.: polarność, masa cząsteczkowa, lotność czy pKa. Następnie konieczne jest zastosowanie zaawansowanych metod statystycznych (bioinformatycznych), aby poprawnie wyselekcjonować meta-



Rys. 3. Podejścia badawcze stosowane w metabolomice

bolity o największym potencjale dyskryminacyjnym w obrębie badanych grup (np. zdrowi ochotnicy vs pacjenci cierpiący na określoną jednostkę chorobową lub grupy pacjentów w różnym stadium zaawansowania choroby). Warto dodać, iż niecelowana analiza metabolomiczna często traktowana jest jako podejście umożliwiające wstępne wyselekcjonowanie metabolitów o największym prawdopodobnym potencjale diagnostycznym i poznawczym z puli tysięcy metabolitów znajdujących się w materiale biologicznym. Dzięki takiemu wstępnemu wyselekcjonowaniu metabolitów potencjalnie istotnych w kontekście wyjaśniania patomechanizmu czy diagnostyki choroby, często przystępuje się do tzw. celowanej ilościowej analizy metabolomicznej mającej na celu zweryfikowanie pierwszych wyników badań w oparciu o zwalidowaną metodę oznaczania. Zatem wspomniane podejścia badawcze wzajemnie się uzupełniają. Na rysunku 3 przedstawiono główne kierunki badawcze stosowane w metabolomice. Oprócz wspomnianych wcześniej: celowanej analizy metabolomicznej (profilowania metabolitów) oraz analizy tzw. metabolicznego „odcisku palca”, można wyróżnić także analizę tzw. metabolicznego „odcisku stopy” (ang. *metabolic footprinting*). To podejście

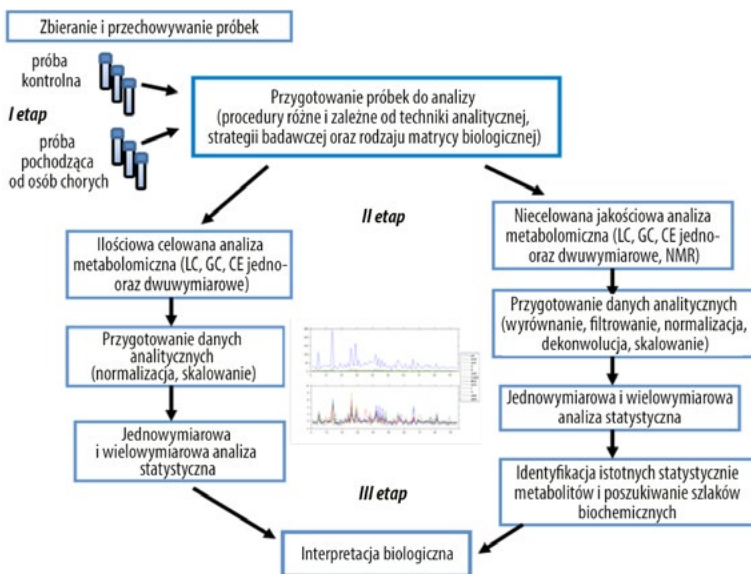
badawcze wykorzystywane jest do oznaczania metabolitów zewnątrzkomórkowych, np. egzometabolomów określonych szczepów bakterii.

Metodologia badań metabolomicznych

Badania metabolomiczne są przykładem podejścia, w którym wykorzystuje się inne dziedziny nauki m.in. chemię analityczną, zaawansowane metody obliczeniowe (bioinformatyka), jak również biochemię. Pojawienie się wysoce czułych oraz dokładnych technik analitycznych pozwoliło na jednoczesne oznaczanie szeregu metabolitów o różnym zakresie stężeń w stosunkowo krótkim czasie. Ze względu na chemiczną oraz fizyczną różnorodność związków małowymiarowych (węglowodany, aminokwasy, kwasy tłuszczowe, związki aminowe, związki polarne, nietłone etc.) nie można przyjąć, iż istnieje uniwersalna technika analityczna umożliwiająca jednoczesne ich oznaczenie w próbkach biologicznych, które często charakteryzują się złożonym składem matrycy. Aby uzyskać możliwie największą komplementarność wyników, dąży się do zastosowania kilku technik analitycznych, które dedykowane są związkom o zupełnie innych właściwościach fizykochemicznych. Wykorzystuje się zatem technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej, chromatografii gazowej, elektroforezy kapilarnej, które sprzężone są zazwyczaj ze spektrometrią mas. Technika magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) także znajduje częste zastosowanie w niecelowanych analizach metabolomicznych. Warto wspomnieć, iż oznaczenia analityczne poprzedzone są zawsze odpowiednim przygotowaniem próbek do analizy, zależnym od stosowanej techniki analitycznej, właściwości fizykochemicznych oznaczanych związków oraz rodzaju materiału biologicznego. W następstwie oznaczeń analitycznych kolejny etap stanowi bioinformatyczna analiza uzyskanych danych. Otrzymane dane pomiarowe zawierają bardzo dużą ilość informacji ukrytą w wielowymiarowych macierzach danych a prawidłowe wyekstrahowanie z nich istotnych informacji przebiega dzięki zastosowaniu odpowiednich zaawansowanych metod obliczeniowych. Wszystkie te etapy tworzą razem metodologię badań metabolomicznych przedstawioną schematycznie na rysunku 4.

Zastosowanie metabolomiki we współczesnych badaniach bioanalitycznych

Zarówno niecelowana, jak i celowana analiza metabolomiczna są dość często wykorzystywane w badaniach bioanalitycznych. Niecelowana analiza metabolomiczna jest aktualnie często stosowana w badaniach dotyczących poszukiwania dodatkowych przyczyn różnych jednostek chorobowych, takich jak np. nowotwory, cukrzyca, choroby nerek czy choroby sercowo-naczyniowe¹⁰⁻¹². Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, iż np. nukleozydy czy metabolity cyklu Krebsa wyraźnie różnicują grupy zdrowych oraz chorych na nowotwory układu moczowo-płciowego i mogą potencjalnie odgrywać istotną rolę w ich diagnostyce^{13, 14}. W innych badaniach prowadzonych aktualnie w Katedrze Biofarmacji i Farmakodynamiki we współpracy z Ka-



Rys. 4. Metodologia badawcza w analizach metabolomicznych

tedrą i Kliniką Nadciśnienia Tętniczego i Diabetologii zaobserwowano, iż ważną rolę w wyjaśnianiu przyczyn oporności na farmakoterapię nadciśnienia tętniczego mogą odgrywać lizofosfolipidy, sfingolipidy, eikozanoidy czy też utlenione pochodne kwasów tłuszczowych¹⁵. Obecnie uznanie w świecie znalazły badania, w których metabolomika wykorzystywana jest do oceny zaburzeń metabolicznych mikrobioty jelitowej w różnych stanach patofizjologicznych. W badaniach opublikowanych w czasopiśmie *Nature*¹⁶ podkreślono rolę mikroflory jelitowej w przekształcaniu fosfatydylocholino w szkodliwe metabolity takie jak N-tlenek trimetyloaminy, betainę i cholinę, które mogą zwiększać ryzyko chorób sercowo-naczyniowych. W innych badaniach Monleona i wsp. zastosowano niecelowaną analizę metabolomiczną do badania mikrobioty jelitowej u pacjentów z rakiem jelita grubego, u których wykazano zmniejszony poziom kwasu masłowego i octowego a zwiększony leucyny, proliny, cysteiny¹⁷. Ciekawym przykładem zastosowania metabolomiki w medycynie klinicznej są badania przeprowadzone przez badaczy z *Imperial College London* związane z użyciem elektrycznego skalpela o nazwie *iknife*. Ten elektryczny skalpel w połączeniu z metodą detekcji REMIS (ang. *rapid evaporative ionization mass spectrometry*) pozwala na bardzo szybką (1-2 sekundy) analizę oparów dymu chirurgicznego unoszącego się z tkanki i dostarcza informacji o składzie chemicznym miejsca interwencji chirurgicznej co może być przydatne w określeniu dokładności zakresu wycięcia nowotworowo zmienionej tkanki^{18,19}. Ponadto, jedną z gałęzi metabolomiki jest tzw. farmakometabolomika, która zajmuje się oznaczaniem poziomów metabolitów w płynach ustrojowych pacjenta w celu przewidywania efektów terapeutycznych lub też oceny metabolizmu leków oraz lepszego zrozumienia profilu farmakokinetycznego. Farmakometabolomika może też być stosowana do pomiaru poziomów metabolitów przed i po podaniu leku w celu monitorowania wpływu danego leku na poszczególne szlaki metaboliczne. Takie podejście zmierza w kierunku wyjaśniania mechanizmu występowania zmienności osobniczej w odpowiedzi na wdrożoną farmakoterapię co jest niezwykle istotne w kontekście zastosowania medycyny personalizowanej (ang. *personalised medicine*) oraz *pharmacovigilance*^{20,21}. Metabolomika może służyć również do poszukiwania oraz identyfikacji nieznanymi dotąd metabolitów lub produktów degradacji nowych leków.

Wspomniane powyżej przykłady zastosowań metabolomiki potwierdzają duży potencjał aplikacyjny i badawczy w biomedycynie oraz bioanalizie. Metabolomika, stanowi innowacyjny na skalę światową kierunek prac badawczo-rozwojowych użyteczny zarówno we współczesnej medycynie, farmacji jak i generalnie badaniach bioanalitycznych.

Wiktoria Struck-Lewicka,

Renata Wawrzyniak,

Małgorzata Waszczuk-Jankowska,

Roman Kaliszan,

Michał J. Markuszewski,

Katedra Biofarmacji i Farmakodynamiki

Bibliografia:

- Hertog M.L.A.T.M., Rudell D.R., Pedreschi R., Schaffer R.J., Geeraerd A.H., Nicolai B.M., Ferguson I.: *Where systems biology meets postharvest*. *Postharvest Biol Technol*, 2011, 62, 223-237.
- Struck W., Markuszewski M.J., Kaliszan R.: *Analiza śladowa w zastosowaniu do wczesnej diagnostyki medycznej i do monitoringu wybranych leków: metabolomika i metabonomika*. Rozdział w książce *Analiza śladowa: zastosowania* / pod red. Ireny Baranowskiej, Warszawa, Wydawnictwo MALAMUT, 2013, 286-302.
- Nicholson J.K., Lindon J.C.: *Metabonomics*. *Nature*, 2008, 455, 1054-1056.
- Horning E.C., Horning M.G.: Human metabolic profiles obtained by GC and GC/MS. *J Chromatogr Sci*, 1971, 9, 129-140.
- 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, 2374-2376.
- Nicholson J.K., Connelly J., Lindon J.C., Holmes E.: *Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function*. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 405, 153-161.
- Fiehn O.: *Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modeling to understand metabolic networks*. *Comp Funct Genom*, 2001, 2, 155-168.
- Nicholson J.K., Wilson I.D.: *Opinion: understanding 'global' systems biology: metabonomics and the continuum of metabolism*. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2, 668-676.
- Patti J.G., Yanes O., Siuzdak G.: *Metabonomics: the apogee of the omic triology*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 13, 263-269.
- Barderas M.G., Laborde C.M., Posada M., de la Cuesta F., Zubiri I., Vivanco F., Alvarez-Llamas G.: *Metabolomic profiling for identification of novel potential biomarkers in cardiovascular diseases*. *J Biomed Biotechnol*, 2011, doi: 10.1155/2011/790132.
- Holmes E., Loo R.L., Stamler J., Bictash M., Yap I.K., Chan Q., Ebbels T., Brown I.J., Veselkov K.A.: *Human metabolic phenotype diversity and its association with diet and blood pressure*. *Nature*, 2008, 453, 396-400.
- Chan Q., Loo R.L., Ebbels T.M., Van Horn L., Daviglius M.L., Stamler J., Nicholson J.K., Holmes E., Elliott P.: *Metabolic phenotyping for discovery of urinary biomarkers of diet, xenobiotics and blood pressure in the INTERMAP Study: an overview*. *Hypertens Res*, 2017, 40, 336-345.
- Struck W., Siluk D., Yumba-Mpanga A., Markuszewski M., Kaliszan R., Markuszewski M.J.: *Liquid chromatography tandem mass spectrometry study of urinary nucleosides as potential cancer markers*. *J Chromatogr A*, 2013, 1283, 122-131.
- Daghir-Wojtkowiak E., Struck-Lewicka W., Waszczuk-Jankowska M., Markuszewski M., Kaliszan R., Markuszewski M.J.: *Statistical-based approach in potential diagnostic application of urinary nucleosides in urogenital tract cancer*. *Biomark Med*, 2015, 9, 577-95.
- Bujak R., Yumba-Mpanga A., Struck-Lewicka W., Kordalewska M., Polonis K., Patejko M., Mironiuk M., Szyndler A., Chrostowska M., Hoffmann M., Smoleński R.T., Kaliszan R., Narkiewicz K., Markuszewski M.J.: *Untargeted metabolomics provides insight into mechanisms underlying resistant hypertension*. *Curr Med Chem*, 2017, doi: 10.2174/0929867324666171006122656.
- Wang Z., Klipfell E., Bennett B.J., Koeth R., Levison B.S., Dugar B., Feldstein A.E., Britt E.B., Fu X., Chung Y.M., Wu Y., Schauer P., Smith J.D., Allayee H., Tang W.H., DiDonato J.A., Lusis A.J., Hazen S.L.: *Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease*. *Nature*, 2011, 472, 57-63.
- Monleón D., Morales J.M., Barrasa A., López J.A., Vázquez C., Celda B.: *Metabolite profiling of fecal water extracts from human colorectal cancer*. *NMR Biomed*, 2009, 22, 342-348.
- Alexander J., Gildea L., Balog J., Speller A., McKenzie J., Muirhead L., Scott A., Kontovounisios C., Rasheed S., Teare J., Hoare J., Veselkov K., Goldin R., Tekkis P., Darzi A., Nicholson J., Kinross J., Takats Z.: *A novel methodology for in vivo endoscopic phenotyping of colorectal cancer based on real-time analysis of the mucosal lipidome: a prospective observational study of the iKnife*. *Surg Endosc*, 2017, 31, 1361-1370.
- St John E.R., Balog J., McKenzie J.S., Rossi M., Covington A., Muirhead L., Bodai Z., Rosini F., Speller A.V.M., Shousha S., Ramakrishnan R., Darzi A., Takats Z., Leff D.R.: *Rapid evaporative ionisation mass spectrometry of electrosurgical vapours for the identification of breast pathology: towards an intelligent knife for breast cancer surgery*. *Breast Cancer Res*, 2017, 19, 1-14.
- Kantae V., Krekels E.H.J., Esdonk M.J.V., Lindenburg P., Harms A.C., Knibbe C.A.J., Van der Graaf P.H., Hankemeier T.: *Integration of pharmacometabolomics with pharmacokinetics and pharmacodynamics: towards personalized drug therapy*. *Metabolomics*, 2017, 13, 1-11.
- Clayton T.A., Lindon J.C., Cloarec O., Antti H., Charuel C., Hanton G., Provost J.P., Le Net J.L., Baker D., Walley R.J., Everett J.R., Nicholson J.K.: *Nature*, 2006, 440, 1073-1077.