

# Metabolomika – chemiczny „odcisk palca” i istotny element medycyny spersonalizowanej

Metabolomics – the chemical „fingerprint” and important element  
of personalized medicine

Anna Słowikowska<sup>1</sup>, Beata Toczyłowska<sup>2,3</sup>, Romuald Cichoń<sup>1</sup>, Piotr Hendzel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinika Kardiologii i Katedry i Kliniki Kardiologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

<sup>2</sup>Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej Polskiej Akademii Nauk

<sup>3</sup>Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk

## Streszczenie

Metabolomika jako część biologii systemowej zajmuje się badaniem metabolomu, czyli związków o małej masie cząsteczkowej (< 1,5 kDa). Metody, którymi posługuje się metabolomika, to spektrometria mas (MS) i spektroskopia NMR. W ciągu ostatniej dekady obserwuje się dynamiczny rozwój technik „omicznych” jako narzędzi medycyny spersonalizowanej. Można również zaobserwować znaczny wzrost liczby publikacji z zakresu metabolomiki i lipidomiki w dziedzinie chorób układu krążenia. Nowe biomarkery mogą przyczynić się do poprawy oceny ryzyka zaburzeń kardio-metabolicznych.

Słowa kluczowe: metabolomika, medycyna spersonalizowana, technologie „omiczne”, lipidomika

Folia Cardiologica 2016; 11, 4: 353–358

*It's far more important to know what person the disease has than what disease the person has*

**Hipokrates**

## Wstęp

Tuż po zakończeniu badań i opisanii ludzkiego genomu wydawało się, że wiedza ta pozwoli na rozwiązanie większości problemów diagnostycznych. Szybko zrozumiano jednak, że znajomość samych genów nie jest wystarczająca, bo równie istotne znaczenie mają produkty genów, czyli białka, dlatego rozpoczął się bardzo dynamiczny rozwój dziedzin „omicznych”.

## Co to są technologie „omiczne”?

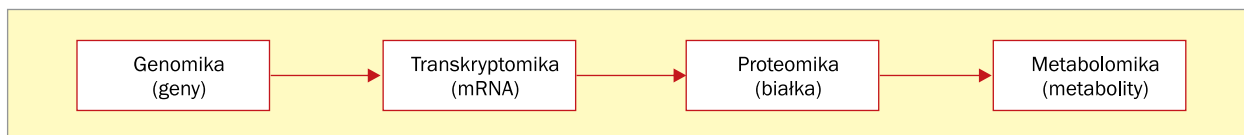
Technologie „omiczne” są stosunkowo nową dziedziną badań. Należy do nich genomika (ocena genomu), transkryptomika (ocena mRNA), proteomika (ocena białek)

i metabolomika (ocena metabolitów). W badaniach tych analizuje się bardzo duże ilości danych. Można oceniać całe genomy, proteomy lub metabolomy. Z tego powodu kluczowym elementem technologii „omicznych” są systemy informatyczne i matematyczno-analityczne. Oprócz zespołów badawczych zatrudniających biologów, biotechnologów, chemików, inżynierów biomedycznych równolegle pracują informatycy i matematycy tworzący programy do oceny danych. Metabolomika z proteomiką, transkryptomiką i genomiką stanowią element biologii systemowej [1, 2] (ryc. 1).

## Co to jest metabolomika?

Metabolomika to nauka zajmująca się analizą metabolitów, związków o małej masie cząsteczkowej (1,5 kDa)

Address for correspondence: lek. Anna Słowikowska, Klinika Kardiologii, I Katedra i Klinika Kardiologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1a, 02–097 Warszawa, e-mail: aslow@onet.eu



Rycina 1. Elementy biologii systemowej i zależności między nimi

w komórkach i tkankach. Metabolom jest ogromnym zbiorem związków chemicznych, które powstają w komórkach. Do analizy metabolomicznej mogą służyć między innymi surowica, mocz, płyn mózgowo-rdzeniowy, a także tkanki po odpowiednim przygotowaniu. Metabolomikę można również określić jako systematyczne badanie specyficznych markerów chemicznych, które powstają podczas różnych reakcji zachodzących w komórce.

Metabolomika jest niezwykle trudną dziedziną nauki, gdyż będący przedmiotem analizy metabolom jest zbiorem ogromnych ilości cząsteczek o małej masie cząsteczkowej – kwasów organicznych, lipidów, węglowodanów czy hormonów. Ponadto, metabolom jest dynamiczny, zmienia się bardzo szybko w krótkim czasie.

Metabolomika jest dosyć młodą technologią, pierwsze publikacje z tego zakresu pojawiły się w 2002 roku. Niewątpliwie jednak jest to dziedzina, która rozwija się niezwykle dynamicznie, na świecie powstają rozbudowane ośrodki metabolomiczne. Od 2004 roku działa międzynarodowe Stowarzyszenie Metabolomiczne (*Metabolomic Society*), niezależna organizacja *non-profit*, której celem jest rozwijanie tej technologii. Ostatnia doroczna konferencja organizacji odbyła się w Dublinie w lipcu 2016 roku.

Pierwsza baza, METLIN, zawierająca dane na temat metabolitów, została opracowana przez naukowców *Scripps Research Institute* w 2005 roku. W 2007 roku naukowcy z *University of Alberta* oraz *University of Calgary* zakończyli pierwszy projekt określenia ludzkiego metabolomu. W wyniku ich prac skatalogowano 2500 metabolitów, 1200 składników leków oraz 3500 składników żywności, które zidentyfikowano w ludzkim organizmie.

Badacze z całego świata zauważają konieczność standaryzacji metod, wymiany informacji dotyczącej uzyskiwanych wyników, dlatego powstało wiele inicjatyw zajmujących się tymi tematami. Należą do nich między innymi: *Metabolomics Standards Initiative*, *MetaboLights database in Europe* (<http://www.ebi.ac.uk/metabolights>) i *Metabolomics Workbench* (<http://www.metabolomicsworkbench.org>) założone przez *National Institutes of Health Common Fund in the United States* [3].

## Czy nie wystarczą dotychczas poznane biomarkery?

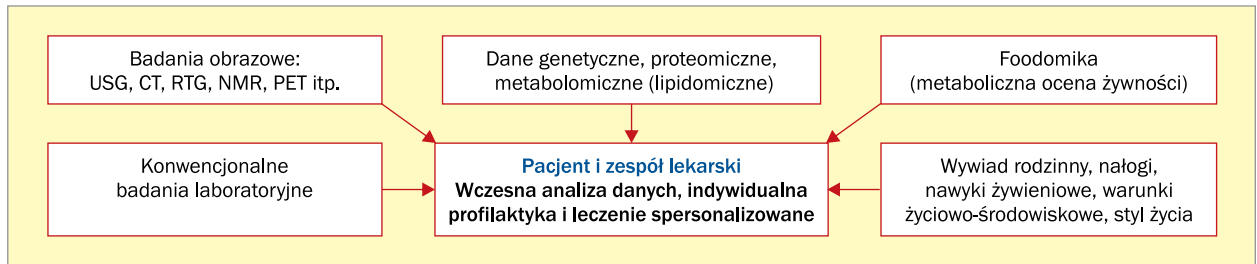
Pojedyncze biomarkery w kardiologii są bardzo skuteczne w potwierdzeniu wystąpienia ostrego incydentu, takiego jak na przykład zawał serca. Nie ma natomiast możliwości precyzyjnego oszacowania ryzyka wystąpienia choroby miażdżycowej na wczesnym etapie. Jak dotąd badacze opierają się na dobrze ugruntowanych czynnikach ryzyka, takich jak palenie tytoniu, nadciśnienie tętnicze, dyslipidemia, cukrzyca, jednak u prawie połowy osób, które na podstawie tych czynników ryzyka zostały zakwalifikowane do grupy niskiego i pośredniego ryzyka, rozwija się choroba wieńcowa [4–7].

Szczegółowe określenie profilu metabolicznego może zapewnić wgląd w molekularne mechanizmy leżące u podłoża miażdżycy [8–15].

## Czym jest medycyna spersonalizowana?

Każda jednostka jest wyjątkowa pod względem posiadanego kodu genetycznego i predyspozycji do chorób. Dlatego teza, że każdy lek jest dobry dla wszystkich, prowadzi do niepowodzeń leczenia i toksycznych powikłań. Z danych opublikowanych w 2001 roku wynika, że leczenie było nieefektywne u 38% osób przyjmujących leki z powodu depresji, 40% z powodu astmy, 43% z powodu cukrzycy, 50% z powodu zapalenia stawów, 70% z powodu choroby Alzheimera, 75% z powodu chorób nowotworowych [16]. Zapewne dane w 2016 roku są już inne, ale chodzi o skalę zjawiska i zwrócenie uwagi na mechanizm problemu. Analiza tych danych utworzyła drogę do dalszego rozwoju i poważnego spojrzenia na medycynę spersonalizowaną [17].

Nieskuteczność terapii to jedna strona medalu. Stosując leki nieskuteczne, chorzy narażeni są na potencjalne działania niepożądane i ponoszenie nieuzasadnionych kosztów, również tych spowodowanych leczeniem następstw działań niepożądanych. Według często cytowanych metaanaliz [18] w 1994 roku 1,8 miliona osób w Stanach Zjednoczonych było hospitalizowanych z powodu działań niepożądanych leków, z czego ponad 100 tysięcy zmarło.



Rycina 2. Proces diagnostyczno-terapeutyczny przyszłości

Podsumowując, jednym z celów medycyny spersonalizowanej jest spowodowanie użycia odpowiedniego leku, w odpowiedniej dawce i odpowiednim czasie [19].

Medycyna spersonalizowana wymaga dodatkowych narzędzi. Oprócz konwencjonalnych, nawet tych bardzo zaawansowanych, wciąż ulepszanych i rozwijanych metod obrazowych, takich jak pozytonowa tomografia emisyjna (PET, *positron emission tomography*), jądrowy rezonans magnetyczny (NMR, *nuclear magnetic resonance*), tomografia komputerowa (CT, *computed tomography*), potrzebne jest włączenie technologii „omicznych”. Osiągnięcia genetyki, transkryptomiki i metabolomiki (w tym lipidomiki) dynamicznie zaczynają wkraczać w obszar diagnostyki i terapii współczesnej medycyny (ryc. 2).

### Jakie narzędzia są używane w określaniu metabolomu?

Metabolomika wykorzystuje do badań cząsteczek o małej masie cząsteczkowej spektrometrię mas (MS, *mass spectrometry*) lub spektroskopię NMR. Badania wykonywane są *in vitro*. Pozwalają na zobrazowanie kilkudziesięciu metabolitów. Różnice między pomiarami z wykorzystaniem MS i spektroskopii NMR – zwykle protonowej – polegają na tym, że NMR nie niszczy próbki (można ją dalej badać innymi metodami), a wzorzec (substancja wzorcowa) jest obecna w każdym pomiarze (każdej próbce). Dlatego częściej wykorzystuje się spektroskopię NMR. Także koszt badania ilościowego w przypadku badań NMR jest mniejszy niż w przypadku MS. Zazwyczaj badana próbka płynu ustrojowego jest badana bez specjalnego przygotowania, natomiast do badania lipidów wymagana jest ich ekstrakcja.

Analiza metaboliczna lipidów nazywana jest lipidomiką. Oszacowana teoretyczna liczba różnych związków lipidowych o małej masie cząsteczkowej wynosi około 180 000 [20]. Lipidy według *Lipid Maps Structure Database* (LMSD) dzielą się na 8 grup głównych (tab. 1).

Wykonanie pomiarów i zebranie danych jest pierwszym krokiem w analizie metabolomicznej. Dopiero ich analiza statystyczna z wykorzystaniem analiz dyskryminacyjnych pozwala na ocenę różnic między badanymi grupami – zdro-

Tabela 1. Grupy główne lipidów

Grupy główne lipidów	Przykłady
Kwasy tłuszczowe	Kwasy rodziny omega-3, omega-6
Glicerolipidy	Triacyloglicerole
Glicerofosfolipidy	Fosfatydylocholina
Sfingolipidy	Ceramidy
Sterole	Cholesterol, kwasy żółciowe
Prenole	Witaminy E, K
Sacharolipidy	Disacharyd glukozaminy
Poliketydy	Epotilony

wych i chorych lub chorych. Można przeprowadzać analizę wielu grup, ale wówczas nie można wskazać biomarkerów. Biomarkery wskazywane są przy analizie dwóch grup. Są to potencjalne biomarkery, gdyż analiza wskazuje tylko metabolity różniące się istotnie statystycznie, ale trzeba ocenić jeszcze ich znaczenie biologiczne (tab. 2, ryc. 3, 4).

### Wybrane przykłady zastosowania metabolomiki w praktyce badawczej

#### Przecewnikowa implantacja zastawki aortalnej i ostre uszkodzenie nerek

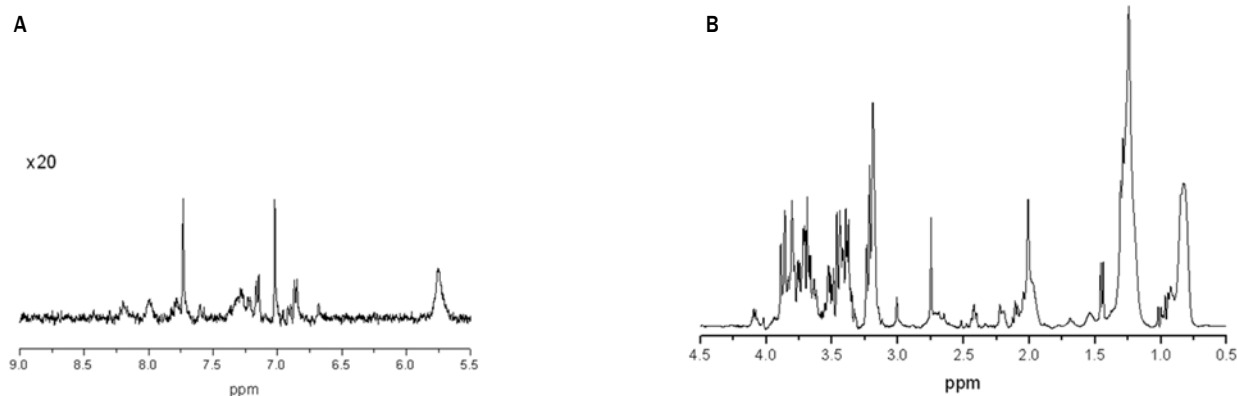
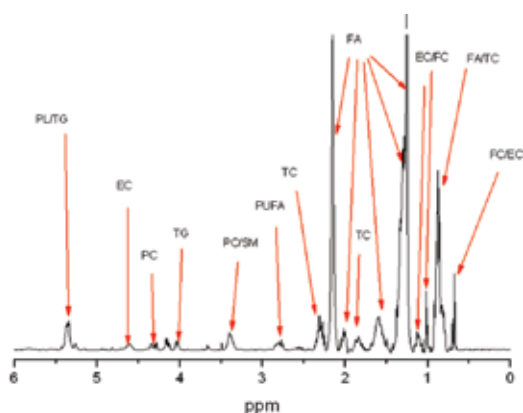
Przecewnikowa implantacja zastawki aortalnej (TAVI, *transcatheter aortic valve implantation*) z powodu ciężkiej stenozы wykonywana jest u osób z licznymi obciążeniami, w tym przewlekłą chorobą nerek. Ostre uszkodzenie nerek (AKI, *acute kidney injury*) jest dosyć częstym powikłaniem po TAVI i wiąże się ze znacznym zwiększeniem śmiertelności. Profil metaboliczny pacjentów kwalifikowanych do TAVI pozwolił na określenie grupy ryzyka ostrego uszkodzenia nerek niezależnie od wyjściowego wskaźnika filtracji kłębuszkowej (GFR, *glomerular filtration rate*) [22].

#### Wstrząs kardiogeny i septyczny

Obecnie toczy się wielośrodkowe, prospektywne badanie obserwacyjne *The ShockOmics*. Celem badania jest określenie nowych markerów metabolomicznych mogących

**Tabela 2.** Porównanie spektrometrii mas i spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR, *nuclear magnetic resonance*)

Parametr	Spektrometria mas	Spektroskopia NMR
Wymagana objętość próbki	10–50 µl	100–400 µl
Przygotowanie próbki	Zależne od próbki – dodanie wody, chloroformu, metanolu	Dodanie buforu (deuterowanego)
Pomiary ilościowe stężeń metabolitów	Pomiary względne Do pomiarów bezwzględnych dla każdego metabolitu niezbędny wzorzec wewnętrzny	Pomiary bezwzględne – jeden wzorzec dla wszystkich metabolitów
Powtarzalność pomiarów próbek	Zmienna	Wysoka
Analiza próbek	Destrukcyjna	Niedestrukcyjna
Analiza lipidów	Wyrafinowane metody przygotowawcze, selekcji metabolitów	Wymagana ekstrakcja
Koszt pomiaru próbki	Wysoki	Niski
Identyfikacja metabolitów	Często wymagająca (skomplikowana)	Bardzo dobra
Czułość (zależna od metabolitu)	Wysoka (10 nM)	Niska (10 µM)
Wykrywalność metabolitów	100–1000 metabolitów	Poniżej 100 metabolitów (nakładanie się sygnałów)

**Rycina 3A, B.** Przykładowe widmo protonowe surowicy zdrowego ochotnika**Rycina 4.** Przykładowe widmo protonowe ekstraktu lipidowego surowicy zdrowego ochotnika (opracowano na podstawie [21]); PL – plazmalogen; TG – triglicerydy; EC (*esterified cholesterol*) – cholesterol estryfikowany; TC (*total cholesterol*) – cholesterol całkowity; PC (*phosphatidylcholine*) – fosfatydylocholina; SM – sfingomielina; PUFA (*polyunsaturated fatty acids*) – wielonienasycone kwasy tłuszczowe; FA (*fatty acids*) – kwasy tłuszczowe

pomóc lepiej zrozumieć patofizjologię wstrząsu septycznego i kardiogennego, a co za tym idzie, poprawić skuteczność leczenia. Jednocześnie oceniane będą parametry hemodynamiczne i metabolomiczne. Do stycznia 2016 roku do badania włączono 68 pacjentów [23].

### Niewydolność serca z zachowaną frakcją wyrzutową

Jak dotąd znanych jest kilkanaście cech patofizjologicznych różnicujących chorych z niewydolnością serca z zachowaną (HFpEF, *heart failure with preserved ejection fraction*) i obniżoną frakcją wyrzutową (HFrEF, *heart failure with reduced ejection fraction*); jednak molekularne mechanizmy są jak dotąd mało poznane. Analiza metaboliczna umożliwiła zidentyfikowanie unikatowego metabolomicznego odcisku palca grupy HFpEF od grupy HFrEF i grupy kontrolnej [24, 25].

### Długowieczność

W badaniach kohortowych dotyczących rodzin zaobserwowano związek długowieczności kobiet z określonymi

lipidami, nie zaobserwowano natomiast takiego związku w przypadku mężczyzn [26].

Kobiety w średnim wieku będące potomkami kobiet 90–100-letnich wykazywały wyższą proporcję jednonasyconych kwasów tłuszczowych do wielonasyconych; z tego powodu autorzy sugerowali wyższą odporność lipidów surowicy tej grupy kobiet na stres oksydacyjny. Co więcej, zidentyfikowano konkretne związki lipidowe, takie jak fosfatydylocholina i sfingomielina, jako nowe biomarkery długowieczności, niezależnie od stężenia trójglicerydów [27].

### **„Obrzeża” profilaktyki sercowo-naczyniowej, czyli zastosowanie metabolomiki w ocenie wina**

Metabolomika jest dziedziną wiedzy, z której zdobywcy czerpią również producenci i badacze wina. Dzięki tym badaniom precyzyjnie ocenić można zawarte w winach związki, a co za tym idzie, pośrednio region, z którego pochodzą, wiek, szczepy winogron, rodzaj ziemi itp. Można udowodnić winiarskie fałszerstwa. Producenci wina

badają wpływ procesów kontrolowanej oksigenacji na skład metaboliczny wina [28, 29]. Ponieważ z coraz lepszą dokładnością identyfikuje się poszczególne związki zawarte w winach i wiedza o tych związkach będzie coraz lepsza, nie jest to nieprawdopodobne, że w przyszłości możliwe będzie zalecanie w profilaktyce chorób układu krążenia określonego wina określonemu osobom.

### **Podsumowanie**

Celem niniejszej publikacji jest zwrócenie uwagi na dynamicznie rozwijający się obszar technologii „omicznych”, dzięki którym będzie możliwe stawianie diagnozy znacznie wcześniej niż dotąd, zapobieganie rozwojowi niektórych chorób poprzez stosowanie indywidualnie ustalonej profilaktyki, jak również wdrażanie spersonalizowanej terapii. Oczywiście niezbędne są dalsze, zwłaszcza kohortowe badania.

### **Konflikt interesów**

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów.

### **Abstract**

Metabolomics, the part of systemic biology, is the study of the metabolome, defined as those molecules with an atomic mass less than 1.5 kDa. There are two main metabolomics methods: mass spectrometry (MS) and proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR) spectroscopy. During last 10 years we can observe dynamic development of omic technologies as tools of personalized medicine. We can also observe the rising number of metabolomic and lipidomic publications in cardiovascular area. Novel metabolomics biomarkers may improve risk prediction of cardio-metabolic disorders.

Key words: metabolomic, personalized medicine, omic technologies, lipidomic

Folia Cardiologica 2016; 11, 4: 353–358

### **Piśmiennictwo**

1. Kell D.B. The virtual human: towards a global systems biology of multiscale, distributed biochemical network models. *IUBMB Life* 2007; 59: 689–695.
2. Westerhoff H.V., Palsson B.O. The evolution of molecular biology into systems biology. *Nature Biotechnol.* 2004; 22: 1249–1252.
3. Clary B. ClishCold Spring Harb Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine. *Mol. Case Stud.* 2015; 1: a000588.
4. Catapano A.L., Reiner Z., De Backer G. i wsp. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Atherosclerosis* 2011; 217: 3–46.
5. Wang T.J. Assessing the role of circulating, genetic, and imaging biomarkers in cardiovascular risk prediction. *Circulation* 2011; 123: 551–565.
6. Yla-Herttuala S., Bentzon J.F., Daemen M. i wsp. Stabilization of atherosclerotic plaques: an update. *Eur. Heart J.* 2013; 34: 3251–3258.
7. Perk J., De Backer G., Gohlke H. i wsp. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur. Heart J.* 2012; 33: 1635–1701.
8. Inouye M., Kettunen J., Soininen P. i wsp. Metabonomic, transcriptomic, and genomic variation of a population cohort. *Mol. Syst. Biol.* 2010; 6: 441.
9. Inouye M., Ripatti S., Kettunen J. i wsp. Novel Loci for metabolic networks and multi-tissue expression studies reveal genes for atherosclerosis. *PLoS Genet.* 2012; 8: e1002907.
10. Quehenberger O., Dennis E.A. The human plasma lipidome. *N. Engl. J. Med.* 2011; 365: 1812–1823.

11. Shah S.H., Kraus W.E., Newgard C.B. Metabolomic profiling for the identification of novel biomarkers and mechanisms related to common cardiovascular diseases: form and function. *Circulation* 2012; 126: 1110–1120.
12. Wang Z., Klipfell E., Bennett B.J. i wsp. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 2011; 472: 57–63.
13. Wurtz P., Raiko J.R., Magnussen C.G. i wsp. High-throughput quantification of circulating metabolites improves prediction of subclinical atherosclerosis. *Eur. Heart J.* 2012; 33: 2307–2316.
14. Tang W.H., Wang Z., Levison B.S. i wsp. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N. Engl. J. Med.* 2013; 368: 1575–1584.
15. Stegemann C., Pechlaner R., Willeit P. i wsp. Lipidomics profiling and risk of cardiovascular disease in the prospective populationbased Bruneck study. *Circulation* 2014; 129: 1821–1831.
16. Spear B.B., Heath-Chiozzi M., Huff J. Clinical application of pharmacogenetics. *Trends Mol. Med.* 2001; 7: 201–204.
17. Government of Australia. National Health and Medical Research Council. Personalized Medicine and Genetics. 2013. Available from: [https://www.nhmrc.gov.au/\\_files\\_nhmrc/file/your\\_health/genetics/g004\\_personalised\\_medicine\\_genetics\\_131120.pdf](https://www.nhmrc.gov.au/_files_nhmrc/file/your_health/genetics/g004_personalised_medicine_genetics_131120.pdf).
18. Lazarou J., Pomeranz B.H., Corey P.N. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients. *J. Am. Med. Assoc.* 1998; 279: 1200–1205.
19. Annadurai K., Danasekaran R., Mani G. Personalized medicine: a paradigm shift towards promising health care. *J. Pharm. Bioallied. Sci.* 2016; 8: 77–78.
20. Yetukuri L., Ekroos K., Vidal-Puig A., Oresic M. Informatics and computational strategies for the study of lipids. *Mol. Biosyst.* 2008; 4: 121–127.
21. Toczyłowska B., Slowikowska A., Mierzejewska A., Zieminska E. Preliminary study of serum lipid profile obtained from patients with coronary heart disease and aortic stenosis. *Atherosclerosis* 2015; 241: e122.
22. Elmariah S., Farrell L.A. Metabolite Profiles Predict Acute Kidney Injury and Mortality in Patients Undergoing Transcatheter Aortic Valve Replacement. *J. Am. Heart Assoc.* 2016; 5: e002712.
23. Aletti F., Conti C., Ferrario M. i wsp. ShockOmics: multiscale approach to the identification of molecular biomarkers in acute heart failure induced by shock. *Scand. J. Trauma Resusc. Emerg. Med.* 2016; 24: 9.
24. Zordoky B.N., Sung M.M., Heart A. Metabolomic Fingerprint of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *PLoS One* 2015; 10: e0124844.
25. Borlaug B.A., Paulus W.J. Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Eur. Heart J.* 2011; 32: 670–679.
26. Gonzalez-Covarrubias V., Beekman M., Uh H.W. i wsp. Lipidomics of familial longevity. *Aging Cell* 2013; 12: 426–434.
27. Hinterwirth H., Stegemann C., Mayr M. Lipidomics Quest for Molecular Lipid Biomarkers in Cardiovascular Disease. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2014; 7: 941–954.
28. Ali K., Maltese F., Toepfer R., Choi Y.H., Verpoorte R. Metabolic characterization of Palatinate German white wines according to sensory attributes, varieties, and vintages using NMR spectroscopy and multivariate data analyses. *J. Biomol. NMR* 2011; 49: 255–266.
29. Metabolomics: wine-omics. Technology feature. *Nature* 2008; 455: 699.