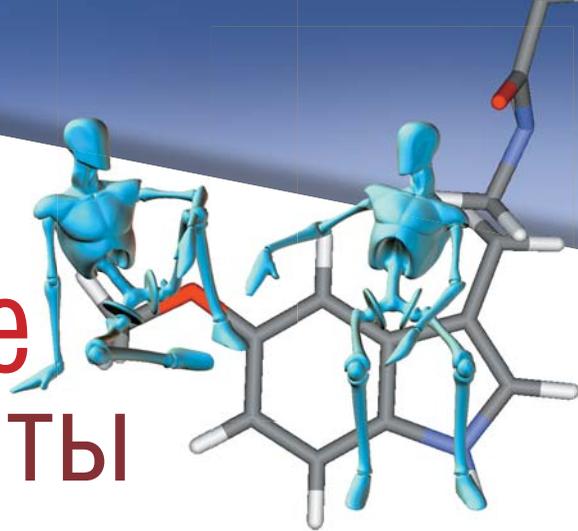


Красноречивые метаболиты



Примелькавшееся выражение «болезнь легче предупредить, чем лечить» наполняется новым смыслом, когда человек, обратившийся к врачу с запущенной болезнью, вынужден тратить средства, время и нервы на лечение. Задача раннего обнаружения и диагностики заболеваний появилась одновременно с самой медициной. Однако долгое время основными инструментами анализа для врачей были их органы восприятия, а параметрами служили цвет и запах выделяемых жидкостей и общее состояние больного. Сегодня на помощь медицине приходит наука. В данном случае речь идет о метаболомике, занимающейся изучением небольших молекул, являющихся результатом различных биохимических процессов в организме, в том числе патологических



ЧЕРНОНОСОВ Александр Анатольевич – кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории исследования модификации биополимеров Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск) и старший научный сотрудник лаборатории иммунобиотехнологии Института экологии человека СО РАН (Кемерово). Автор и соавтор 10 научных работ

Метаболомика – область биологии, изучающая так называемый *метаболом*, т. е. всю совокупность относительно небольших молекул-метаболитов, функционирующих в живом организме. Очевидно, что состав такого метаболома тесно связан с геномом и протеомом организма, с составом поступающей пищи, а также с условиями окружающей среды.

Метаболомика органично встраивается в иерархию наук, изучающих геном и гены живых организмов, синтез и распределение транскриптов (молекул РНК), белки и их взаимодействия в живых организмах.

Однако спускаясь вниз по этой иерархической лестнице, мы приходим к парадоксальному открытию: если в связке геном–транскриптом–протеом наблюдается увеличение количества молекул различной структуры, то метаболом (набор всех метаболитов) оценивается гораздо меньшим числом составных частей. Например, если геном человека состоит примерно из 28 тыс. генов, протеом – более чем из 1 млн белков, то метаболом содержит примерно 2400 метаболитов.

Ключевые слова: метаболомика, масс-спектрометрия, маркеры заболеваний.

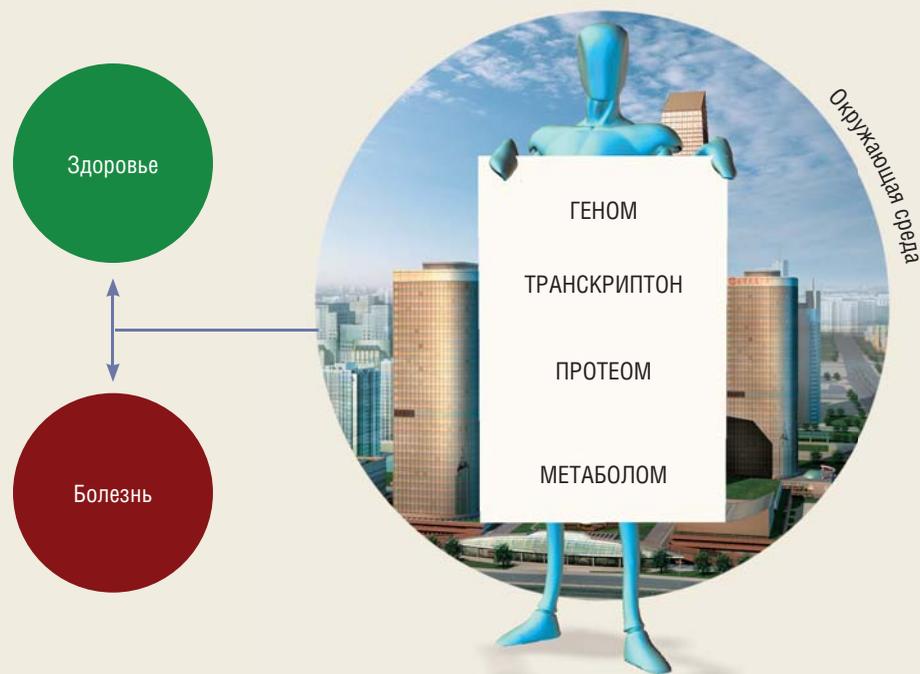
Key words: metabolomics, mass spectrometry, disease markers

Генетика – образ жизни – среда

Почему же количество метаболитов, образующихся в результате биохимических реакций, намного меньше, чем число молекул, ответственных за протекание этих реакций?

Во-первых, метаболиты – это молекулы небольшого размера, уже претерпевшие каскад биохимических превращений, и потому сами по себе достаточно устойчивы к дальнейшим преобразованиям.

Во-вторых, в человеческом геноме, при всех его различиях у разных людей, закодированы одни и те же или очень схожие биохимические процессы, необходимые для жизнедеятельности. Поэтому индивидуальные особенности строения ферментов или других важных составляющих биохимических процессов не должны оказывать существенного влияния на конечные метаболиты, но лишь при том условии, что речь идет о норме.



На текущий профиль метаболитов в живом организме оказывает влияние целый ряд факторов – от внутренних (генетических) до внешних (окружающая среда). Эти влияния в совокупности и определяют состояние здоровья человека, информацию о котором можно получить по анализу конечных звеньев метаболических процессов

В противном случае такое влияние может приводить к серьезным патологиям или даже нежизнеспособности организма.

При знакомстве с объектами новой науки возникает закономерный вопрос: если число метаболитов относительно невелико, как же их можно использовать для выявления патологий? Ведь если предположить, что каждый метаболит может служить биомаркером, то в этом случае можно идентифицировать не более двух с половиной тысяч болезней, хотя реально их много больше. И это при том, что маркерами могут служить далеко не все метаболиты.

Более того, выделение, идентификация и даже количественное определение отдельных метаболитов, как правило, не позволяют однозначно судить о наличии или отсутствии того или иного заболевания. Но это затруднение преодолимо – метаболиты следует рассматривать не по отдельности, а в комплексе и следить за изменением в составе всего комплекса. При таком подходе любые отклонения от нормы могут служить биомаркерами болезней или неблагоприятных изменений в организме пациента.

Кроме генетической предрасположенности к определенным заболеваниям на здоровье человека влияют его образ жизни, в том числе диета, и окружающая среда. Поэтому последние факторы имеют огромное влияние на текущий уровень метаболитов. При этом в течение жизни их роль возрастает, поскольку со временем они оказывают воздействие уже на всю цепочку биохимических преобразований в организме.

В связи с этим главной целью метабомики является поиск и характеристика значимых различий в составе

метаболитов между здоровым и любым патологическим состоянием человека, вызванных именно заболеванием.

Для успешного использования различий в составе метаболитов в качестве биомаркеров нужно решить еще одну важнейшую проблему, связанную со статистической достоверностью таких отклонений. Ведь изменения, достаточные для детектирования заболевания у одного пациента, могут быть недостаточными для определения патологии у другого.

Возможна и обратная ситуация: благодаря индивидуальным особенностям состава метаболитов здоровый человек может быть, наоборот, признан больным. Цель метабомики как раз и состоит в том, чтобы разработать подходы, применение которых корректно не только по отношению к определенному индивидууму, но и для группы, популяции и даже всего вида в целом. Рациональное решение этой проблемы – анализ всего набора метаболитов, но сама по себе эта задача достаточно сложная.

По ступеням анализа

Пациенты, у которых патологические изменения в составе метаболитов детектируются легко и однозначно, обычно являются тяжелобольными и имеют значительные нарушения в обмене веществ.

Большинство же нарушений не так явны. Они обусловлены косвенными эффектами патологического процесса или попытками организма компенсировать изменения в обмене веществ, вызываемые первоначальной патологией. В связи с этим поиск биомаркера



Поиск метаболита-маркера заболевания длителен и сложен. В ходе предварительного исследования определяют изменения в составе метаболитов при различных состояниях организма: в норме и при патологии, до и после внешнего воздействия окружающей среды или приема лекарств, и проводят сравнительный анализ. В более сложных случаях проводят дополнительные исследования: изучают выборку образцов из разных тканей, определяют состав метаболитов в зависимости от стадии болезни или концентрации применяемых лекарств. В результате выявляют метаболиты-указатели, уровень которых либо понижается, либо повышается при патологических изменениях в организме.

какого-либо заболевания, как правило, длительный и многоступенчатый процесс.

Оборудование и протоколы для определения метаболитов, используемые в подобных исследованиях, должны отвечать ряду требований. Ведь анализируемые метаболиты могут, например, очень сильно различаться по своим физическим свойствам, таким как масса, гидрофобность и т. п.

Не менее сложной является и задача извлечения, идентификации и количественного определения всех метаболитов в биологическом образце. Поскольку результаты должны быть воспроизводимыми даже в том случае, когда сам исследователь еще не знает, ни что это за соединение, ни что оно вообще присутствует в образце. Поэтому, как правило, используется комбинация различных методов выделения и анализа.

Другая существенная проблема в анализе метаболитов – широкий диапазон их концентраций в биологических жидкостях и тканях. Например, концентрация аминокислот в крови составляет от 50 до 500 микромолей, а в спинно-мозговой жидкости она в 100 раз меньше. Впечатляет и сам диапазон концентраций

После установления метаболитов-указателей проводится анализ их соответствия основной патологии, а не побочным проявлениям. Только после этого выявленные метаболиты можно считать кандидатами в биомаркеры. Следующий этап – подтверждение правильности и точности работы метаболитов в качестве биомаркеров, определение возможных ограничений для их использования. Подтвердив статистическую достоверность анализа при использовании таких метаболитов, их можно считать доказанными биомаркерами и использовать для решения прикладных задач профилактики и ранней диагностики заболевания

у отдельных метаболитов: от нано- до миллимолярных (т. е. в 1000 раз больше)!

Существенно упростить методику анализа метаболитов как биомаркеров заболевания позволяет использование масс-спектрометрического оборудования. Особый интерес представляет тандемный масс-спектрометр с электро-спрей системой ввода образца в анализатор (ES-MS/MS), с помощью которого можно провести анализ в течение нескольких минут.

Детекция небольших, но достоверных изменений состава метаболитов этим методом позволяет определять болезни на самых ранних стадиях, что особенно важно при неонатальном скрининге – обследовании новорожденных детей для выявления наиболее распространенных врожденных и наследственных заболеваний. Метабомика находит применение при разработке анализов индивидуальной восприимчивости к лекарственным средствам, например, варфарину, при определении уровня проканцерогенов – полиароматических углеводородов и т. д.

Безусловно, разработка и внедрение метаболомных методов анализа в первую очередь происходит для



В исследованиях по метаболомике эффективно используется тандемный масс-спектрометр с электро-спрей системой ввода образца в анализатор (ES-MS/MS) – прибор позволяет провести анализ в течение нескольких минут. Суть методики заключается в объединении процессов очистки раствора образца методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрического анализа. После хроматографии очищенный раствор с исследуемыми метаболитами сразу попадает в масс-спектрометр. Все вещества, находящиеся в растворе, ионизируются и под действием электромагнитного поля попадают на детектор. Соотношение массы и заряда для каждого метаболита уникально, за счет чего происходит дальнейшее разделение молекул во время их движения к детектору. На основании массы молекул можно делать предположение относительно их строения, что позволяет идентифицировать метаболиты

наиболее распространенных заболеваний. К сожалению, пока еще рано говорить, что в распоряжении врачей имеются полностью «готовые» методы анализа метаболитов, прошедших испытание временем и применением в клинике. Поэтому развитие метаболомики как науки, нацеленной на практическое применение в медицине, является актуальной задачей во всем мире.

Разработкой и оптимизацией методов анализа метаболитов занимаются в России. В новосибирском Академгородке на базе Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН совместно с Центром новых медицинских технологий и Институтом экологии человека СО РАН (Кемерово) проводятся исследования, позволяющие упростить анализ и увеличить точность определения врожденных и наследственных заболеваний.

Область возможного применения анализа метаболитов и использования их в качестве биомаркеров практически не ограничена. Развитие метаболомики как науки и успешное внедрение анализа метаболитов в практическую медицину в будущем позволит последней эффективно работать в направлении профилактики заболеваний. Теперь основные усилия по защите здоровья пациентов сосредоточились в рамках совместной работы науки и медицины — тандеме, основанном на инструментальной базе самого высочайшего уровня.

Lumepamypa

Hollywood K., Brison D.R., Goodacre R. Metabolomics: current technologies and future trends // Proteomics. 2006. N 6(17). P. 4716–4723.

Ellis D.I., Dunn W.B., Griffin J.L. et al. Review etabolic fingerprinting as a diagnostic tool // Pharmacogenomics. 2007. N 8. P. 1243–1266.

Koulman A., Lane G.A., Harrison S.J., Volmer D.A. From differentiating metabolites to biomarkers // Anal. Bioanal. Chem. 2009. N 394. P. 663–670.