

ПРОТЕОМИКА

УДК: 543.51.061:543.54.45:543.8

©Лохов, Арчаков

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В МЕТАБОЛОМИКЕ

П.Г. Лохов, А.И. Арчаков*

ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121, Москва,
Погодинская ул. д.10; эл. почта: lokhovpg@rambler.ru

Обзор посвящен метаболомике - новому и интенсивно развивающемуся направлению науки, осуществляющему всеобъемлющий анализ метаболитов биологических объектов. Метаболиты характеризуются различными физико-химическими свойствами, поэтому их традиционно изучали методами аналитической химии, ориентированными на определенные группы химических веществ. Однако прогресс масс-спектрометрической техники привел к формированию относительно унифицированных методов, таких как метаболомический фингерпринтинг и метаболомическое профилирование, которые позволяют определять тысячи метаболитов в биопробе и формируют современный облик метаболомики. В обзоре даны основные характеристики этих методов, описаны используемые при их применении способы разделения и масс-спектрометрического анализа метаболитов. Примеры, приведенные в обзоре, позволяют оценить возможности этих методов, сравнить их преимущества и недостатки. Помимо этого, авторы обзора приводят наиболее часто применяемые в метаболомике методы обработки результатов и необходимые для этого биоинформационные ресурсы, такие как программы обработки масс-спектров и масс-спектрометрические базы метаболитов. В заключение обзора кратко даны основные рекомендации по планированию метаболомных экспериментов.

Ключевые слова: метаболомика, метаболомический фингерпринтинг, метаболомическое профилирование, масс-спектрометрия.

ВВЕДЕНИЕ. Современное молекулярно-биологическое исследование характеризуется применением различных технологических платформ, описывающих свойства биологического объекта на геномном, транскриптомном, протеомном и метаболомном уровнях. Совместное применение этих платформ позволяет системно подойти к изучению процессов, протекающих в живых системах, последовательно проследив поток информации от генов к фенотипу биологического объекта. Метаболомика при этом является логическим завершением подобных исследований, так как именно профиль метаболитов является наиболее информативной характеристикой фенотипа.

Рассмотрим основные особенности метаболомики, отличающие её от других, так называемых, "пост-геномных" технологий. Во-первых, это сильная изменчивость концентраций метаболитов. Так, распределение метаболитов в организме варьирует от его состояния и времени суток, что налагает жесткие требования к стандартизации протоколов метаболомного анализа. Вторая особенность - это отсутствие видоспецифичности большинства метаболитов, что ведет к существенному влиянию поступающих, например, с пищей веществ на результаты исследования [1]. Третья особенность - это значительные различия физико-химических свойств и физиологических концентраций метаболитов,

* - адресат для переписки

связанные с тем, что метаболиты относятся к совершенно разным химическим классам и в организме выполняют различные функции, от строительных до регуляторных. Существующие сложности привели к тому, что на сегодняшний день пока не создано единой технологической платформы для анализа метаболомов различных биологических объектов [2]. С другой стороны, интенсивное развитие масс-спектрометрии, зарекомендовавшей себя как эффективный метод определения тысяч аналитов в биопробе, делает сегодня масс-спектрометры основными приборами в том числе и для анализа метаболомов, включающих в себя, например, до 2 тыс основных метаболитов для человека [3] и до 20 тыс метаболитов для растений [4]. Таким образом, современная метаболомика характеризуется применением основанных на масс-спектрометрии методов, наиболее распространенными из которых являются метаболитический фингерпринтинг (отпечаток) и метаболитическое профилирование [5].

Основные определения:

Метаболиты – молекулы массой менее 3000 Да, участвующие в метаболитических реакциях и необходимые для поддержания гомеостаза, роста и нормального функционирования клеток.

Метаболом – полный набор метаболитов биологического объекта.

Метаболомика – идентификация и количественное измерение всех метаболитов биологического объекта.

1. МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ФИНГЕРПРИНТИНГ.

Метаболитический фингерпринтинг (fingerprinting) - это классификация биопроб на основе паттернов, формируемых количественными характеристиками входящих в них метаболитов. Данный подход изначально направлен не на идентификацию метаболитов, а на сравнительный анализ формируемых ими паттернов, которые претерпевают изменения при болезни, внешнем воздействии на организм или при генетических аномалиях. При масс-спектрометрическом анализе паттерн биологического образца формируется набором масс метаболитов и интенсивностью масс-спектрометрических пиков. Если перед масс-спектрометрическим анализом используется хроматография, то в формировании паттерна может принимать участие время задержки метаболита на хроматографической колонке. Следует отметить, что при метаболитическом фингерпринтинге охватывается максимально широкий круг метаболитов, что позволяет считать его метаболомной технологией. В зависимости от наличия и способа разделения метаболитов перед масс-спектрометрией метаболитический фингерпринтинг реализуется в виде: (1) прямого масс-спектрометрического анализа, (2) высокоэффективной жидкостной хроматографии, сопряженной с масс-спектрометром (ВЭЖХ-МС), (3) газовой хроматографии, сопряженной с масс-спектрометром (ГХ-МС), (4) капиллярного электрофореза, сопряженного с масс-спектрометром (КЭ-МС).

1.1. Прямой масс-спектрометрический анализ.

Прямой масс-спектрометрический анализ подразумевает непосредственное внесение анализируемого биоматериала в источник ионизации масс-спектрометра без какого-либо предварительного разделения. Так, Smedsgaard и соавт., используя электроспрейный источник ионизации (ЭИИ) в режиме регистрации положительно заряженных ионов и квадрупольный масс-детектор, провели метаболитический фингерпринтинг неочищенного экстракта грибов [6, 7]. В режиме регистрации положительно заряженных ионов, но уже с масс-детектором, имеющим тройной квадруполь, Castrillo и соавт. проанализировали внутриклеточные метаболиты дрожжей [8]. Результаты этих и подобных исследований показали, что основным преимуществом прямой масс-спектрометрии является высокая воспроизводимость результатов, которая позволяет эффективно проводить последующую кластеризацию метаболитных фингерпринтов образцов.

При наличии в образце большого количества метаболитов или метаболитов с близкими молекулярными массами возникает необходимость применения масс-спектрометров, измеряющих массы с высоким разрешением (разрешение - это отношение высоты к ширине середины масс-спектрометрического пика). Описан прямой масс-спектрометрический анализ с использованием времяпролетных масс-спектрометров (ВП-МС) и масс-спектрометров ион циклотронного резонанса (ИЦР-МС). В зависимости от геометрии пролетной трубы и настройки прибора, времяпролетные масс-спектрометры дают разрешение по массе от 6000 до 17000 Да с точностью измерения масс $(3-5) \times 10^{-3}$ Да. Allen и соавт. использовали ВП-МС с ЭИИ для регистрации изменений состава ростовой среды в результате экскреции и поглощения метаболитов культурой клеток [9, 10]. Применение гибридного масс-спектрометра, такого как квадруполь-ВП-МС, описано для скрининга экстрактов клеток животных и растений. В данном случае ВП-МС используется как анализатор, обеспечивающий измерение масс ионов с высокой точностью [11, 12].

Применение ИЦР-МС позволяет измерять массы ионов метаболитов с разрешением свыше 1 млн и наивысшей на сегодняшний день точностью измерения масс $0,1 \times 10^{-6}$ Да [13], что делает подобные масс-спектрометры идеальными для метаболомных исследований [14]. Aharoni и соавт. использовали ИЦР-МС для изучения метаболитов плодов земляники путем прямой инъекции неочищенного экстракта в источник ионизации масс-спектрометра [15]. В данном исследовании было зарегистрировано почти 6 тыс. уникальных масс ионов, а точность измерения масс позволила для половины из них поставить однозначное соответствие химической формуле. В другом исследовании Nigai и соавт. использовали ИЦР-МС для метаболомного фингерпринтинга экстракта *Arabidopsis thaliana* в интегрированном транскриптомно-метаболомном исследовании реакции растения на нутритивный стресс [16].

Для повышения эффективности прямой масс-спектрометрии некоторые исследователи применяют ЭИИ с нанопотоком впрыскиваемой биопробы (нано-ЭИИ). Описан также высокопродуктивный вариант нано-ЭИИ, заключающийся в применении ЭИИ, состоящего из набора наноэлектроспрейных сопел [11].

Хотя масс-спектрометрический анализ с прямой инъекцией является быстрым и хорошо воспроизводимым методом, он имеет ряд серьезных недостатков. К примеру, химические изомеры из-за идентичности молекулярной массы не могут быть распознаны этим методом. В случае применения ЭИИ, так же возникает проблема выраженной ионной супрессии, влияющей на количественность масс-спектрометрических измерений. Причиной усиления ионной супрессии при прямой масс-спектрометрии является одновременный ввод всех вещества биопробы в источник ионизации, что приводит к существенному подавлению сигнала отдельных метаболитов и затрудняет интерпретацию получаемых результатов.

1.2. Метаболический фингерпринтинг на основе ВЭЖХ-МС.

В целях устранения недостатков, проявляющихся при прямом масс-спектрометрическом анализе сложных биологических объектов, непосредственно масс-спектрометрической детекции может предшествовать разделение метаболитов жидкостной хроматографией. Жидкостная хроматография существенно снижает ионную супрессию и, устраняя фоновый шум, увеличивает динамический диапазон детекции метаболитов.

Как правило, для метаболомных исследований используют обратнофазовую жидкостную хроматографию с неподвижной фазой из углеводных цепочек длиной 18 атомов, прикрепленных к частицам размером 3–5 мкм. Применение подобной хроматографии описано во многих исследованиях метаболома растений [17, 18]. Однако, традиционное применение обратнофазовой ВЭЖХ часто недостаточно для разделения сложных биологических смесей. Одним из способов увеличения разрешающей способности хроматографии является использование частиц с

меньшим размером. Так для ультраэффективной жидкостной хроматографии (УЭЖХ) используют частицы размером менее 2 мкм. Показано, что при использовании колонки длиной 10 см, внутренним диаметром 2,1 мм и размерами частиц 1,7 мкм при хроматографическом разделении мочи мыши можно получить до 250 пиков [19, 20]. К недостаткам данного подхода можно отнести существенное увеличение давления, необходимого для осуществления потока элюентов через подобные колонки, что делает необходимым использование специальных УЭЖХ систем.

Перспективным для метаболомных исследований является применение нано-ВЭЖХ-МС. Эффективное разделение веществ хроматографией с нанопотоками элюентов значительно нивелирует ионную супрессию и позволяет количественно детектировать метаболиты. В результате применения нанохроматографии удаётся количественно измерять в сыворотке крови до 2000 метаболитов, при чувствительности детекции менее 1 нМ концентрации вещества (рис. 1) [21, 22].

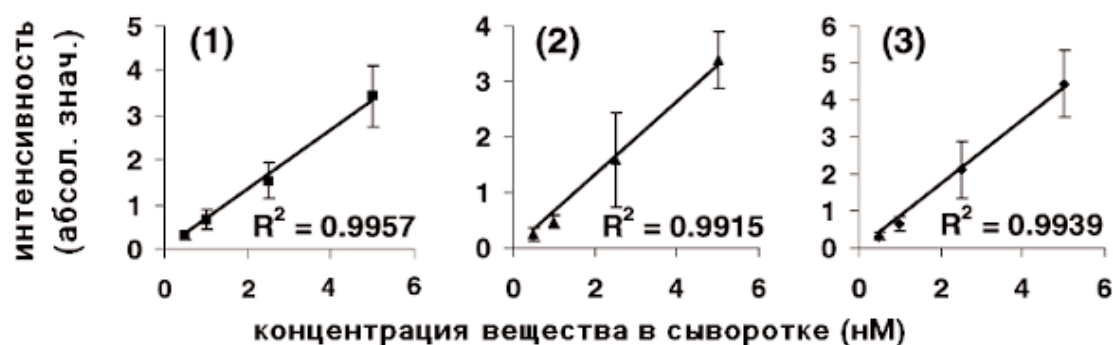


Рисунок 1.

Калибровочные кривые для сигнала, полученного нормализацией интенсивности масс-спектрометрических пиков для трех веществ с известными концентрациями в сыворотке крови [22]. График 1 - для витамина B12; 2 - для [вал4]ангиотензина; 3 - для дез-асп1-ангиотензина.

R^2 - величина достоверности аппроксимации данных к прямой. Масс-спектры получены на времяпролетном масс-спектрометре с электроспрейным источником ионизации ("New Objective", США). Вещества перед внесением в источник ионизации хроматографировали при нанопотоке элюентов.

Применение в большинстве случаев обратнофазовой хроматографии как стандартного средства разделения полярных и неполярных метаболитов несомненно оправдано. Однако, выражено полярные метаболиты не разделяются на обратнофазовых колонках, а попросту проскакивают их. Альтернативой для обратнофазовой хроматографии в данном случае является хроматография на полярном сорбенте (hydrophilic interaction chromatography, HILIC), эффективность которой была продемонстрирована именно на выражено полярных веществах [23, 24]. Следует обратить внимание, что HILIC, являясь ортогональным методом обратнофазовой хроматографии, тем не менее, имеет ряд отличий и от нормофазовой хроматографии. В частности, в отличие от нормофазовой хроматографии, HILIC использует смешиваемые с водой органические полярные растворители, такие как ацетонитрил и метанол. Более подробно их применение в системах ВЭЖХ-МС, а также механизм деления веществ при HILIC описан в обзоре Naidong [25].

Методом ионизации веществ в метаболомных исследованиях с применением ВЭЖХ-МС в большинстве случаев является ЭИИ. Для максимально полного анализа метаболома необходимо использовать ЭИИ в режиме регистрации как положительных, так и отрицательных ионов. Рисунок 2 показывает масс-спектры, полученные для метаболитов плазмы крови человека при обоих режимах регистрации ионов, из которых видно, что разные режимы позволяют детектировать разные, дополняющие друг друга наборы метаболитов.

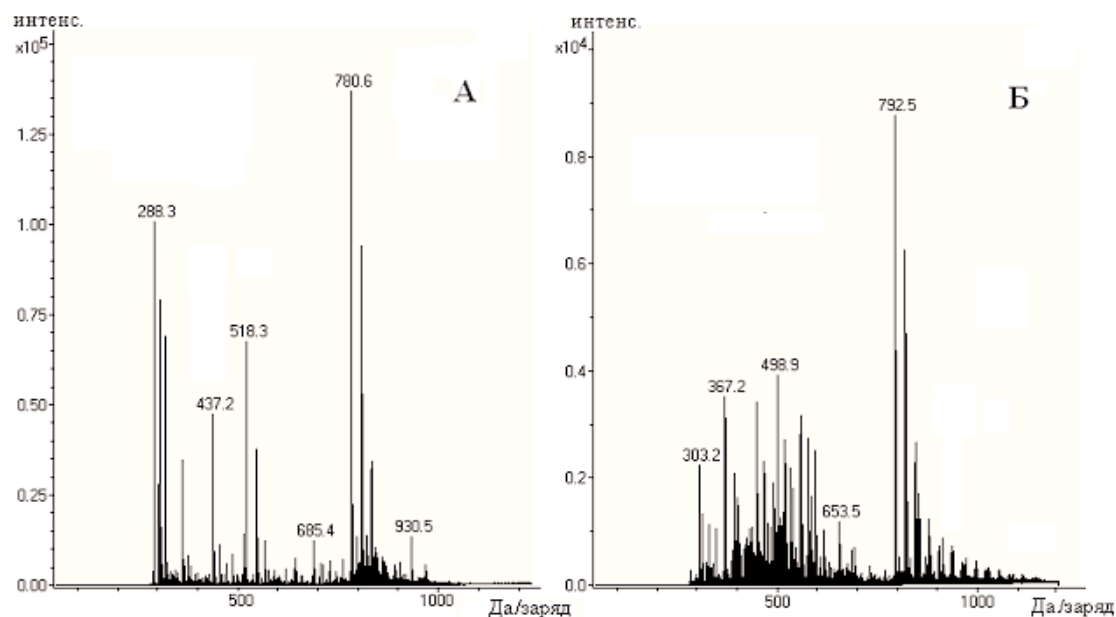


Рисунок 2.

Масс-спектры метаболитов плазмы крови, полученные прямой инъекцией раствора метаболитов в электроспрейный источник ионизации квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра.

А - масс-спектр положительно заряженных метаболитов,

Б - масс-спектр отрицательно заряженных метаболитов.

Масс-спектрометрические анализаторы, используемые в системах ВЭЖХ-МС, могут быть совершенно различные, например, ионные ловушки [22-24, 26], времяпролетные масс-детекторы [22], тройные квадрупольные [27], квадруполь-ВП-МС [28-32]. Тройной квадруполь или квадруполь-ВП-МС позволяют проводить фрагментацию метаболитов для их структурного анализа или идентификации. Ионные ловушки позволяют многократно фрагментировать метаболиты (получать фрагменты фрагментов), что увеличивает информативность получаемых масс-спектров и повышает вероятность идентификации метаболитов.

На сегодняшний день системы ВЭЖХ-МС успешно применены для метаболомного фингерпринтинга самых разнообразных биологических объектов в исследованиях различной направленности, например, для анализа мочи в токсикологических [26, 27, 30-32] и генетических исследованиях [28], для анализа метаболитов плазмы крови [22], экстрактов растений [23, 24] и грибов [33].

1.3. Метаболический фингерпринтинг на основе ГХ-МС.

Метаболический фингерпринтинг на основе ГХ-МС отличается возможностью идентификации дескрипторных метаболитов, то есть метаболитов, внесших наибольший вклад в результат кластеризации биопроб. Подобная

возможность возникает при применении в масс-спектрометре электронного удара для ионизации поступающих из ГХ газообразных веществ. Получаемые при этом спектры развала метаболитов отличаются высокой информативностью и воспроизводимостью, что необходимо для успешной идентификации, и, следовательно, стимулирует создание множества масс-спектрометрических библиотек для ГХ-МС.

Основным условием успешного ГХ-МС анализа является достаточная летучесть и термическая стабильность анализируемых веществ. Обычно перед анализом полярных метаболитов для увеличения их термической стабильности и летучести дериватизируют заряженные функциональные группы. Тиольные, амингидроксильные и карбоксильные группы могут быть дериватизированы алкилированием, ацилированием или силилированием. Чтобы наиболее полно охарактеризовать метаболит с помощью ГХ-МС рекомендуется применять двухстадийную дериватизацию метаболитов, включающую обработку метаболитов метоксимином, с последующим силилированием [34-36]. Пробоподготовка биологических жидкостей для ГХ-МС может включать лиофилизацию. Однако, некоторые вещества при концентрировании мешают анализу, что может потребовать дополнительной стадии пробоподготовки. Например, мочевины в моче могут перегружать газовую хроматографическую колонку и масс-детектор. Для устранения данного недостатка достаточно перед анализом провести обработку проб мочи уреазой для удаления избытка мочевины [37].

В метаболомных исследованиях с применением ГХ-МС используют квадрупольные [38, 39] или времяпролетные масс-анализаторы [40] и практически не используют ионные ловушки, считающиеся не адаптированными для ГХ. Времяпролетные масс-анализаторы преимущественно применяют из-за возможности быстрой детекции метаболитов, что, например, крайне важно при анализе метаболитов плазмы или сыворотки крови человека, когда за довольно короткое время необходимо детектировать до 1200 метаболитов (рис. 3) [41, 42].

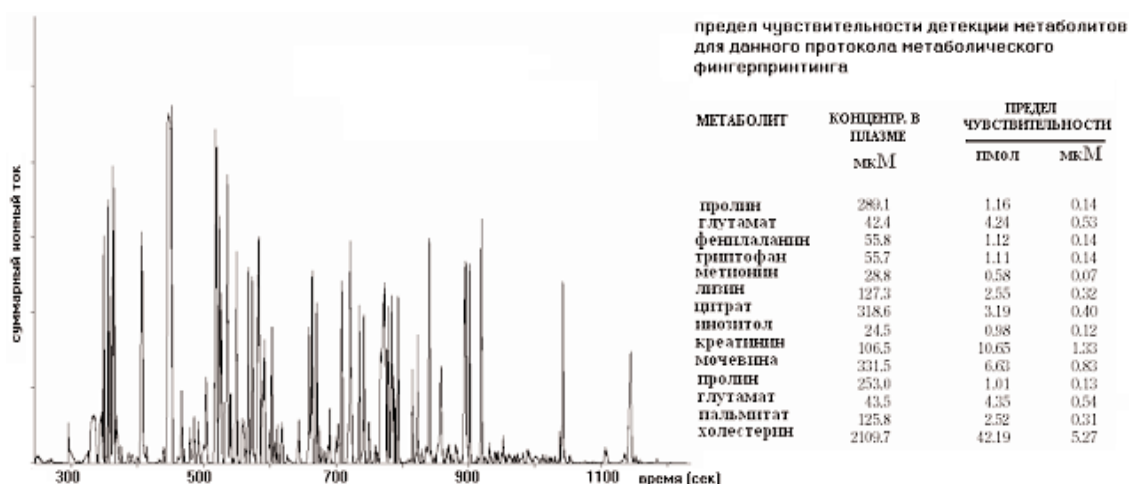


Рисунок 3.

Хроматограмма суммарного общего тока при метаболомном фингерпринтинге плазмы крови человека методом ГХ-МС. Общее количество детектируемых метаболитов 1200. В таблице указаны лимиты чувствительности для детекции некоторых метаболитов. Данные адаптированы из работы O'Hagan и сопр. [41].

Комбинация ГХ с времяпролетным масс-спектрометром обеспечивает быстрый анализ метаболома при так называемой быстрой ГХ, когда анализ занимает менее 10 мин [42]. В быстрой ГХ применяют более короткие колонки с меньшим диаметром, что существенно сокращает время анализа, а хроматографические пики могут быть менее 1 сек у основания.

Хотя стандартная капиллярная ГХ в большинстве случаев позволяет удачно разделять вещества для качественного анализа сложных биологических объектов одной колонки часто бывает недостаточно. Например, хроматограмма мочи человека содержит до 1,5 тыс компонентов, большинство которых, естественно, при ГХ не разделяются. Одним из путей улучшения разделения метаболитов является применение двухмерной газовой хроматографии (ГХ/ГХ) [44, 45]. При ГХ/ГХ, каждый пик с первой, обычно неполярной колонки, переносится на вторую, полярную, для дальнейшего разделения.

Технически ГХ/ГХ реализуется посредством соединения двух газовых колонок через так называемый модулятор. Метаболиты передаются из одной колонки в другую путем деления элюента, выходящего из первой колонки, на маленькие фракции, их фокусирования, быстрого нагревания и переноса во вторую колонку. Стадия фокусировки существенно сужает ширину хроматографических пиков и повышает динамический диапазон детекции метаболитов [46]. Для детекции узких хроматографических пиков, получаемых при ГХ/ГХ, обычно используют времяпролетный масс-спектрометр [47].

1.4. Метаболический фингерпринтинг на основе КЭ-МС.

В комбинации с масс-спектрометрией капиллярный электрофорез можно применять как средство анализа метаболома. Однако, в сравнении с ВЭЖХ, капиллярный электрофорез существенно проигрывает в разрешающей способности, что привело к его более редкому применению в метаболомике. Подробно недостатки и достоинства метаболомного анализа с применением КЭ-МС рассмотрены в обзоре Monton и Soga [48].

Ранее перспективным методом для метаболомных исследований считалась капиллярная электро-хроматография (КЭХ), являющаяся гибридом КЭ и ВЭЖХ, совместное применение которой с масс-спектрометрией подробно описано в обзоре Klampfl [49]. На сегодняшний день данный подход также не получил распространения в метаболомных исследованиях.

Таким образом, сравнивая существующие способы проведения метаболомного фингерпринтинга можно сделать следующие выводы. Научным группам, имеющим в своем распоряжении приборы, способные измерять метаболиты с разрешением в сотни тысяч единиц, например ИЦР-МС, представляется уникальная возможность реализовать метаболомный фингерпринтинг в режиме прямой масс-спектрометрии. Отсутствие предварительного разделения метаболитов хроматографическим или электрофоретическим способами не будет отражаться на качестве результатов, при этом получаемые данные будут отличаться хорошей воспроизводимостью, существенно улучшающей последующую классификацию биопроб статистическими методами.

Однако ИЦР-МС крайне дороги и по этой причине, скорее всего, не получат повсеместного распространения. Достойной альтернативой ИЦР-МС при осуществлении метаболомного фингерпринтинга могут являться гибридные масс-спектрометры, например квадруполь-ВП-МС, сопряженные с жидкостной хроматографией. Меньшая разрешающая способность в данном случае компенсируется хроматографическим разделением метаболитов. При этом использование нанопотоков элюентов при хроматографировании позволит проводить детекцию метаболитов количественно.

2. МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ.

Метаболическое профилирование - это количественный анализ метаболитов, относящихся к одному химическому классу веществ или определенному биохимическому пути, который проводится с целью поиска биомаркеров

заболеваний, исследования целевых групп метаболитов, диагностики или поиска мишеней для воздействия лекарств. Имея целевую направленность метаболическое профилирование нашло широкое применение в практической медицине, в частности, при диагностике врожденных нарушений метаболизма методом ГХ-МС мочи [50]. Успешно применяется и ВЭЖХ-МС, например, для скрининга новорожденных на наличие врожденных нарушений метаболизма аминокислот, жирных кислот и синтеза органических кислот. Стандартный протокол пробоподготовки включает экстракцию метанолом высушенных на фильтровальной бумаге капелек крови, добавление изотопно-меченных внутренних стандартов, упаривание растворителя и дериватизацию подкисленным бутанолом. Показательным можно считать метод, разработанный Piraud и соавт., основанный на ВЭЖХ-МС, и позволяющий анализировать 79 молекул, имеющих отношение к метаболическим нарушениям [51]. Более подробно эти методы описаны в обзорах [52-55].

Особое внимание в метаболическом профилировании уделяется липидомике – идентификации и количественному измерению липидов биологического объекта [56, 57]. Применение масс-спектрометрии для анализа липидов позволяет детально исследовать их метаболизм, липид-зависимые сигнальные пути, их изменение при заболеваниях и лекарственной терапии. Неполарные липиды успешно исследуют с помощью ГХ-МС. Как правило, при этом применяется дериватизация липидов метилированием или силилированием. Для компенсации плохой летучести некоторых липидов, например триглицеридов, используют высокотемпературную газовую хроматографию. Фосфолипиды перед анализом обычно гидролизуют, получившиеся свободные кислоты дериватизируют, после чего анализируют ГХ-МС. Помимо традиционного способа введения пробы с липидами в газовый хроматограф, возможно использование аналитического пиролиза. Аналитический пиролиз - это термическое расщепление нелетучих веществ в атмосфере инертного газа перед внесением в газовый хроматограф. Пиролиз веществ в комбинации с ГХ-МС – высоко эффективный метод для анализа сложных биологических проб. Snyder и соавт., используя пиролиз и ГХ, сопряженную с ионной ловушкой, провели типирование бактерий на основе их липидных профилей [58].

Предварительное разделение липидов перед масс-спектрометрией можно проводить не только ГХ, но и жидкостной хроматографией. Hermansson и соавт. в своей работе описали применение ВЭЖХ-МС для количественного измерения более чем 100 фосфолипидов [59].

Для анализа липида применяется также прямой масс-спектрометрический анализ. В частности, прямой инъекцией в ЭИИ проанализированы тканевые экстракты [60, 61]. В режиме регистрации положительных ионов детектировали фосфатидилхолин, лизофосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и сфингомиелины. Свободные жирные кислоты, фосфатидную кислоту, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, фосфатидилглицерол, и фосфатидилэтаноламин детектировали в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов [61-63]. Для идентификации липидов описано применение столкновительной диссоциации (фрагментации анализируемых молекул в масс-спектрометре путем столкновения их с молекулами инертного газа), которая позволяет получить специфичные масс-спектрометрические паттерны фрагментации липидов [64, 65].

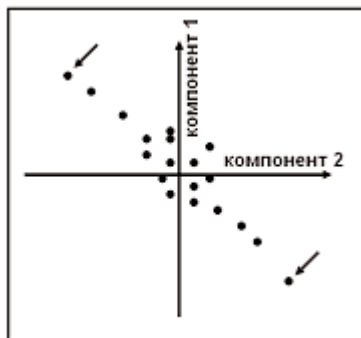
Сравнивая с метаболическим фингерпринтингом, ориентированным на глобальный анализ метаболитов в живой системе, можно утверждать, что метаболическое профилирование не является истинно метаболомной технологией, так как направлено на анализ отдельных групп метаболитов. Однако ввиду существования множества методик профилирования, исследователь может, применяя их в совокупности, осуществить полноценное метаболомное исследование. Исходя из того, что различные группы метаболитов существенно отличаются по физико-химическим свойствам, при выборе способа

метаболического профилирования необходимо ориентироваться на опубликованные протоколы анализа исследуемой группы метаболитов. При этом особое внимание необходимо уделять пробоподготовке, которая позволит обогатить пробу целевой фракцией метаболитов и существенно снизить в ней количество примесей. При использовании ЭИИ, следует обратить внимание на наличие доступных масс-спектрометрических библиотек, необходимых для проведения идентификации профилируемых метаболитов. В противном случае методом выбора следует считать ГХ-МС, отличающуюся возможностью идентификации метаболитов по спектрам развала веществ ионизированных электронным ударом.

3. АНАЛИЗ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИХ ДАННЫХ.

Статистические методы для обработки масс-спектрометрических данных выбирают в соответствии с поставленной задачей. Если целью является классификация биопроб, то, как правило, используют иерархический кластерный анализ, метод главных или независимых компонент (МГК и МНК, в англоязычной литературе - principal component analysis, PCA, и independent component analysis, ICA соответственно). Метод главных компонент в метаболомных исследованиях по праву можно считать наиболее популярным, реализовать который можно при помощи большинства статистических программ. Например, в программном пакете Matlab (Mathworks, США) метод главных компонент выполняется одной командой: `[comp, score] = princomp(X)`, где X – анализируемая матрица интенсивностей метаболитов, `comp` – рассчитанная матрица главных компонент, `score` – матрица проекций X на главные компоненты. Для визуализации результатов анализа необходимо воспользоваться функцией `plot`:

`plot(coeff(:,1), coeff(:,2), 'b');
для визуализации потенциальных
биомаркеров`



`plot(score(:,1), score(:,2), 'b');
для визуализации групп`



Другим перспективным методом для применения в метаболомике является метод независимых компонент, который менее требователен в выборе компонент. С помощью этого метода из масс-спектрометрических данных можно удалить вариабельность, связанную с работой масс-спектрометра, что существенно улучшает конечный результат анализа [11].

В исследованиях, ориентированных на поиск биомаркеров, преимущественно применяют методы с обучающей выборкой, такие как метод частных наименьших квадратов (МЧНК, в англоязычной литературе - partial least squares, PLS) или формальное независимое моделирование аналогии классов (soft-independent method of class analogy, SIMCA). Обучающая выборка позволяет использовать заранее известную информацию о принадлежности биопроб к здоровым или больным пациентам, что приводит к более достоверной идентификации биомаркеров [66].

Наиболее эффективным подходом для анализа масс-спектрометрических данных является совместное применение различных методов. Так, для поиска биомаркера в пробах известных групп можно применить такие статистические методы, как дисперсионный анализ (ANOVA) или недавно описанный дисперсионный анализ с одновременным анализом компонент - ASCA (ANOVA-simultaneous component analysis) [67-69]. После того, как статистически достоверно выявлен набор метаболитов, значения концентраций которых обладают диагностической силой, можно использовать метод главных компонент для наглядной визуализации полученных данных, то есть отобразить многомерные данные на двух- или трехмерной поверхности, что делает полученные данные доступными для восприятия человеком.

В последнее время стали появляться программные продукты, полностью ориентированные на комплексный анализ масс-спектров метаболитов. Среди них можно отметить свободно распространяемую программу MET-IDEA [70]. Программа использует в качестве входных данных масс-спектрограммы, генерирует из них полуколичественные данные о концентрации метаболитов и позволяет провести на основании полученных данных иерархический кластерный анализ. С 2007 года фирма Bruker Daltonics (Германия) продает или поставляет вместе со своим оборудованием программу Metabolic Profiler. Программа позволяет проводить классификацию биопроб на основе метода главных компонент и использует в качестве входных данных масс-спектрограммы, генерируемые масс-спектрометрами этой же фирмы.

4. ИДЕНТИФИКАЦИЯ МЕТАБОЛИТОВ.

4.1. Библиотеки масс-спектров для ГХ-МС.

Библиотеки масс-спектров для ГХ-МС появились одними из первых и непрерывно пополняются уже более 20 лет. На сегодняшний день наиболее крупные из них насчитывают сотни тысяч масс-спектров. Создание подобных библиотек стимулировалось высокой информативностью и воспроизводимостью спектров, получаемых в результате развала веществ электронным ударом, применяемым в системах ГХ-МС. К наиболее крупным библиотекам спектров относятся библиотеки от Palisade (~600 тыс. спектров), Национального Института Стандартов и Технологии США (~190 тыс. спектров) и от Wiley (~400 тыс. спектров). Существуют также специализированные библиотеки, содержащие спектры метаболитов определенных биологических объектов. Например, в рамках проекта Golm Metabolome Database (GMD) (http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de/csbdb/gmd/msri/gmd_msri.html) недавно создан ряд доступных для широкого пользования библиотек квадрупольных и времяпролетных спектров метаболитов растений [71]. Эти масс-спектрометрические библиотеки также содержат время задержки метаболитов на хроматографической колонке (MSRI библиотеки), что существенно улучшает идентификацию метаболитов со схожими масс-спектрами. Одной из программ, позволяющей проводить обсчет масс-спектров с учетом времени задержки, является AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System), свободно распространяемая Национальным Институтом Стандартов и Технологии США [72].

4.2. Библиотеки масс-спектров для ВЭЖХ-МС.

Системы ВЭЖХ-МС обычно снабжены электроспрейным или химическим источником ионизации, которые дают нефрагментированные положительно или отрицательно заряженные псевдомолекулярные ионы. Поэтому фрагментация анализируемых веществ проходит непосредственно в масс-анализаторе (в некоторых случаях фрагментация может проходить и в источнике ионизации). Получаемые при этом спектры фрагментации существенно варьируют между различными типами масс-спектрометров и даже между одними и теми же типами масс-спектрометров, произведенных разными фирмами [73, 74]. Таким образом, создание универсальных библиотек для ВЭЖХ-МС пока проблематично. Одним из подходов решения этой проблемы является создание библиотек

масс-спектров с калибрантами, что позволяет стандартизировать условия получения масс-спектров [75]. Вторым подходом является суммирование спектров, полученных при разных параметрах, критически влияющих на воспроизводимость [76]. Однако вопрос, насколько эти подходы пригодны для метаболомных исследований, остаётся открытым.

Несмотря на существующие сложности, библиотеки для ВЭЖХ-МС существуют и продолжают пополняться. Наглядный тому пример – библиотека спектров Национального Института Стандартов и Технологии США, содержащая более 5 тыс. спектров фрагментации веществ для тройных квадрупольных и ионных ловушек. Существуют также библиотеки спектров, полученные определенным типом масс-спектрометра для несколько сот наиболее известных метаболитов в базе METLIN (<http://metlin.scripps.edu/>) [77]. Как и для ГХ-МС, для улучшения поиска метаболитов по базе данных рекомендуется использовать время задержки метаболита на колонке. Данный подход был реализован для идентификации метаболитов лекарств в моче [78]. Более детальное описание доступных масс-спектрометрических библиотек можно прочитать в обзоре Halket и соавт. [79].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Наблюдаемое в последнее десятилетие развитие масс-спектрометрической техники привело к формированию ряда методов, позволяющих эффективно изучать метаболом и его изменения при различных патологиях, генетических вариациях и внешних воздействиях. Высокая селективность и чувствительность масс-спектрометров, а также возможность их комбинирования с хроматографической техникой, сделали масс-спектрометрию идеальным средством для подобных исследований, и уже имеющиеся на сегодняшний день научные публикации являются неоспоримым тому подтверждением. Тем не менее, метаболомика продолжает интенсивно развиваться и, скорее всего, в ближайшее время можно будет наблюдать повсеместное внедрение метаболомных технологий в научную практику, подобно тому, как это недавно наблюдалось в отношении протеомных технологий.

Обращая внимание на основные преимущества метаболомики перед другими “омными” технологиями, можно указать на ее особую роль в отношении медицины. В метаболоме, как наиболее приближенному к фенотипу, наиболее быстро и выражено отображаются все изменения, происходящие в организме, инициируемые как внутренними, так и внешними факторами. Данное обстоятельство делает метаболомику высоко эффективным средством диагностики заболеваний, мониторинга результатов лечения больного и токсических воздействий на организм. Сложности же метаболомных исследований происходят от имеющегося разнообразия метаболитов, относящихся к разным классам химических веществ и, соответственно, имеющих различные физико-химические свойства. Однако исследователь уже сегодня имеет возможность выбрать из арсенала метаболомных технологий именно ту, которая наиболее полно подходит ему для достижения поставленных целей. Вкратце напомним, что исследования, ориентированные на быстрый, хорошо воспроизводимый анализ метаболитов, который может так же являться прототипом клинических анализов, целесообразно основывать на прямой масс-спектрометрии. Особая роль при этом отводится метаболитическому фингерпринтингу, позволяющему по анализу совокупности метаболитов делать заключения самого разнообразного характера. Другой распространенный вариант метаболомного анализа - метаболитическое профилирование - больше подойдет для тех, кто ориентируется на детальное изучение отдельных групп метаболитов с возможностью их идентификации, а так же для тех, кто занят поиском биомаркеров заболеваний. Эффективное разделение метаболитов при этом, как правило, обеспечивается хроматографией, существенно снижающей наложение масс-спектрометрических пиков и обеспечивающей повышение чувствительности анализа. Следует отметить, что при этом снижается и воспроизводимость результатов, особенно в случае применения многомерной хроматографии.

Применение же хроматографии при нанопотоках элюентов дает исследователю дополнительную возможность количественного измерения метаболитов. До недавнего времени одним из главных недостатков применения масс-спектрометрии в метаболомных исследованиях была именно проблема количественности измерений. Проблема в некоторых случаях решалась посредством применения изотопно-меченных стандартов. Однако кажется маловероятным, что подобные стандарты будут в ближайшее время доступны для хоть сколько-нибудь значимого количества метаболитов, что делает нано-ВЭЖХ-МС на ближайшие годы методом выбора для “количественной” метаболомики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vigneau-Callahan K.E., Shestopalov A.I., Milbury P.E., Matson W.R., Kristal B.S. (2001) *J. Nutr.*, **131**, 924–932.
2. Bino R.J., Hall R.D., Fiehn O., Kopka J., Saito K., Draper J., Nikolau B.J., Mendes P., Roessner-Tunali U., Beale M.H., Trethewey R.N., Lange B.M., Wurtele E.S., Sumner L.W. (2004) *Trends Plant Sci.*, **9**, 418–425.
3. Beecher C.W.W. (2003) In: *Metabolic profiling: Its role in biomarker discovery and gene function analysis* (George G. and Harrigan R.G., eds.) Springer, New York, pp. 311–335.
4. Weckwerth W. (2003) *Annu. Rev. Plant. Biol.*, **54**, 669–689.
5. Dettmer K., Hammock B.D. (2004) *Environ. Health Perspect.*, **112**, 396–397.
6. Smedsgaard J., Frisvad J.C. (1996) *J. Microbiol. Meth.*, **25**, 5–17.
7. Smedsgaard J., Frisvad J.C. (1997) *Biochem. Syst. Ecol.*, **25**, 51–64.
8. Castrillo J.I., Hayes A., Mohammed S., Gaskell S.J., Oliver S.G. (2003) *Phytochemistry*, **62**, 929–937.
9. Allen J., Davey H.M., Broadhurst D., Heald J.K., Rowland J.J., Oliver S.G., Kell D.B. (2003) *Nat. Biotechnol.*, **21**, 692–696.
10. Allen J., Davey H.M., Broadhurst D., Rowland J.J., Oliver S.G., Kell D.B. (2004) *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 6157–6165.
11. Scholz M., Gatzek S., Sterling A., Fiehn O., Selbig J. (2004) *Bioinformatics*, **20**, 2447–2454.
12. Vaidyanathan S., Kell D.B., Goodacre R. (2002) *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **13**, 118–128.
13. Marshall A.G., Hendrickson C.L., Jackson G.S. (1998) *Mass Spectrom. Rev.*, **17**, 1–35.
14. Brown S.C., Kruppa G., Dasseux J.L. (2005) *Mass Spectrom. Rev.*, **24**, 223–231.
15. Aharoni A., Ric de Vos C.H., Verhoeven H.A., Maliepaard C.A., Kruppa G., Bino R., Goodenowe D.B. (2002) *Omics*, **6**, 217–234.
16. Hirai M.Y., Yano M., Goodenowe D.B., Kanaya S., Kimura T., Awazuhashi M., Arita M., Fujiwara T., Saito K. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 10205–10210.
17. Tolstikov V.V., Lommen A., Nakanishi K., Tanaka N., Fiehn O. (2003) *Anal. Chem.*, **75**, 6737–6740.
18. De Vos R.C., Moco S., Lommen A., Keurentjes J.J., Bino R.J., Hall R.D. (2007) *Nature Protocols*, **2**, 778–791.
19. Wilson I.D., Nicholson J.K., Castro-Perez J., Granger J.H., Johnson K.A., Smith B.W., Plumb R.S. (2005) *J. Proteome Res.*, **4**, 591–598.
20. Wilson I.D., Plumb R., Granger J., Major H., Williams R., Lenz E.M. (2005) *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **817**, 67–76.
21. Roy S.M., Becker C.H. (2007) *Methods Mol. Biol.*, **359**, 87–105.
22. Wang W., Zhou H., Lin H., Roy S., Shaler T.A., Hill L.R., Norton S., Kumar P., Anderle M., Becker C.H. (2003) *Anal. Chem.*, **75**, 4818–4826.
23. Tolstikov V.V., Fiehn O. (2002) *Anal. Biochem.*, **301**, 298–307.

24. Tolstikov V.V., Fiehn O., Tanaka N. (2007) *Methods Mol. Biol.*, **358**, 141–155.
25. Naidong W. (2003) *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **796**, 209–224.
26. Lafaye A., Junot C., Ramounet-Le Gall B., Fritsch P., Tabet J.C., Ezan E. (2003) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 2541–2549.
27. Idborg-Bjorkman H., Edlund P.O., Kvalheim O.M., Schuppe-Koistinen I., Jacobsson S.P. (2003) *Anal. Chem.*, **75**, 4784–4792.
28. Plumb R., Granger J., Stumpf C., Wilson I.D., Evans J.A., Lenz E.M. (2003) *Analyst.*, **128**, 819–823.
29. Plumb R.S., Stumpf C.L., Granger J.H., Castro-Perez J., Haselden J.N., Dear G.J. (2003) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 2632–2638.
30. Williams R.E., Major H., Lock E.A., Lenz E.M., Wilson I.D. (2005) *Toxicology*, **207**, 179–190.
31. Lenz E.M., Bright J., Knight R., Wilson I.D., Major H. (2004) *Analyst.*, **129**, 535–541.
32. Lenz E.M., Bright J., Knight R., Wilson I.D., Major H. (2004) *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **35**, 599–608.
33. Nielsen K.F., Smedsgaard J. (2003) *J. Chromatogr. A*, **1002**, 111–136.
34. Colebatch G., Desbrosses G., Ott T., Krusell L., Montanari O., Kloska S., Kopka J., Udvardi M.K. (2004) *Plant J.*, **39**, 487–512.
35. Jonsson P., Gullberg J., Nordstrom A., Kusano M., Kowalczyk M., Sjostrom M., Moritz T. (2004) *Anal. Chem.*, **76**, 1738–1745.
36. Roessner U., Wagner C., Kopka J., Trethewey R.N., Willmitzer L. (2000) *Plant J.*, **23**, 131–142.
37. Fu X., Iga M., Kimura M., Yamaguchi S. (2000) *Early Hum. Dev.*, **58**, 41–55.
38. Roessner U., Luedemann A., Brust D., Fiehn O., Linke T., Willmitzer L., Fernie A. (2001) *Plant Cell*, **13**, 11–29.
39. Roessner U., Willmitzer L., Fernie A.R. (2001) *Plant Physiol.*, **127**, 749–764.
40. Winder C.L., Dunn W.B., Schuler S., Broadhurst D., Jarvis R., Stephens G.M., Goodacre R. (2008) *Anal. Chem.*, **80**, 2939–2948.
41. O'Hagan S., Dunn W.B., Brown M., Knowles J.D., Kell D.B. (2005) *Anal. Chem.*, **77**, 290–303.
42. Jiye A., Trygg J., Gullberg J., Johansson A.I., Jonsson P., Antti H., Marklund S.L., Moritz T. (2005) *Anal. Chem.*, **77**, 8086–8094.
43. Watson N.E., Vanwingerden M.M., Pierce K.M., Wright B.W., Synovec R.E. (2006) *J. Chromatogr. A*, **1129**, 111–118.
44. Dalluge J., Beens J., Brinkman U.A.T. (2003) *J. Chromatogr. A*, **1000**, 69–108.
45. Welthagen W., Shellie R.A. (2005) *Metabolomics*, **1**, 65–73.
46. Adahchour M., Brandt M., Baier H.U., Vreuls R.J., Batenburg A.M., Brinkman U.A. (2005) *J. Chromatogr. A*, **1067**, 245–254.
47. Guo X., Lidstrom M.E. (2008) *Biotechnol. Bioeng.*, **99**, 929–940.
48. Monton M.R., Soga T. (2007) *J. Chromatogr. A*, **1168(1-2)**, 237–246.
49. Klampfl C.W. (2004) *J. Chromatogr. A*, **1044**, 131–144.
50. Kuhara T. (2005) *Mass Spectrom. Rev.*, **24**, 814–827.
51. Piraud M., Vianey-Saban C., Petritis K., Elfakir C., Steghens J.P., Morla A., Bouchu D. (2003) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 1297–1311.
52. Schulze A., Lindner M., Kohlmuller D., Olgemoller K., Mayatepek E., Hoffmann G.F. (2003) *Pediatrics*, **111**, 1399–1406.
53. Chace D.H., Kalas T.A., Naylor E.W. (2003) *Clin. Chem.*, **49**, 1797–1817.
54. Chace D.H., Kalas T.A., Naylor E.W. (2002) *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **3**, 17–45.
55. Chace D.H., Kalas T.A. (2005) *Clin. Biochem.*, **38**, 296–309.
56. Watkins S.M., Reifsnyder P.R., Pan H.J., German J.B., Leiter E.H. (2002) *J. Lipid Res.*, **43**, 1809–1817.
57. German J.B., Roberts M.A., Watkins S.M. (2003) *J. Nutr.*, **133**, 2078–2083.

58. Snyder A.P., McClennen W.H., Dworzanski J.P., Meuzelaar H.L. (1990) *Anal. Chem.*, **62**, 2565–2573.
59. Hermansson M., Uphoff A., Kakela R., Somerharju P. (2005) *Anal. Chem.*, **77**, 2166–2175.
60. Han X., Gross R.W. (2003) *J. Lipid Res.*, **44**, 1071–1079.
61. Han X., Gross R.W. (2005) *Mass Spectrom. Rev.*, **24**, 367–412.
62. Hsu F.F., Turk J. (1999) *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **10**, 587–599.
63. Duffin K.L., Henion J.D., Shieh J.J. (1991) *Anal. Chem.*, **63**, 1781–1788.
64. Pulfer M., Murphy R.C. (2003) *Mass Spectrom. Rev.*, **22**, 332–364.
65. Griffiths W.J., Jonsson A.P., Liu S., Rai D.K., Wang Y. (2001) *Biochem J.*, **355**, 545–561.
66. Jonsson P., Bruce S.J., Moritz T., Trygg J., Sjoström M., Plumb R., Granger J., Maibaum E., Nicholson J.K., Holmes E., Antti H. (2005) *Analyst.*, **130**, 701–707.
67. Smilde A.K., Jansen J.J., Hoefsloot H.C., Lamers R.J., van der Greef J., Timmerman M.E. (2005) *Bioinformatics*, **21**, 3043–3048.
68. Chang W.T., Thissen U., Ehlert K.A., Koek M.M., Jellema R.H., Hankemeier T., van der Greef J., Wang M. (2006) *Planta Med.*, **72**, 458–467.
69. Vis D.J., Westerhuis J.A., Smilde A.K., van der Greef J. (2007) *BMC Bioinformatics*, **8**, 322.
70. Broeckling C.D., Reddy I.R., Duran A.L., Zhao X., Sumner L.W. (2006) *Anal. Chem.*, **78**, 4334–4341.
71. Schauer N., Steinhäuser D., Strelkov S., Schomburg D., Allison G., Moritz T., Lundgren K., Roessner-Tunali U., Forbes M.G., Willmitzer L., Fernie A.R., Kopka J. (2005) *FEBS Lett.*, **579**, 1332–1337.
72. Stein S.E. (1999) *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **10**, 770–781.
73. Jansen R., Lachatre G., Marquet P. (2005) *Clin. Biochem.*, **38**, 362–372.
74. Bristow A.W., Webb K.S., Lubben A.T., Halket J. (2004) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18**, 1447–1454.
75. Lemire S.W., Busch K.L. (1996) *J. Mass Spectrom.*, **31**, 280–288.
76. Josephs J.L., Sanders M. (2004) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18**, 743–759.
77. Smith C.A., O'Maille G., Want E.J., Qin C., Trauger S.A., Brandon T.R., Custodio D.E., Abagyan R., Siuzdak G. (2005) *Ther. Drug Monit.*, **27**, 747–751.
78. Pelander A., Ojanpera I., Laks S., Rasanen I., Vuori E. (2003) *Anal. Chem.*, **75**, 5710–5718.
79. Halket J.M., Waterman D., Przyborowska A.M., Patel R.K., Fraser P.D., Bramley P.M. (2005) *J. Exp. Bot.*, **56**, 219–243.

Поступила: 20. 05. 2008.

MASS SPECTROMETRY METHODS IN METABOLOMICS

P.G. Lokhov, A.I. Archakov

Institute of Biomedical Chemistry, RAMS, Pogodinskaya st.10, Moscow, 119121 Russia;
e-mail: lokhovpg@rambler.ru

The review is devoted to metabolomics, a new and rapidly growing area directed to the comprehensive analysis of metabolites of biological objects. Metabolites are characterized by various physical and chemical properties, traditionally studied by methods of analytical chemistry focused on certain groups of chemical substances. However current progress of mass spectrometry has led to the formation of unified methods, such as metabolic fingerprinting and metabolomic profiling, which allow defining thousands of metabolites in one probe. The current review describes basic characteristics of these methods, ways of metabolite separation, and the analysis of metabolites by mass spectrometry. The examples shown in this review, allow to estimate these methods and to compare their advantages and disadvantages. Besides that, authors show the methods most frequently used in metabolomics for data processing and the required resources, such as software for mass spectra processing and metabolite search database. In the conclusion, general suggestions for successful metabolomic experiments are given.

Key words: metabolomics, metabolic fingerprinting, metabolomic profiling, mass spectrometry.