

©Коллектив авторов

## МЕТАБОЛОМНЫЙ АНАЛИЗ КРОВИ: НАЗНАЧЕНИЕ, РЕАЛИЗАЦИЯ, ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ДАННЫХ

*П.Г. Лохов\*, А.В. Лисица, А.И. Арчаков*

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,  
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; эл. почта: lokhovpg@gmail.com

Организм человека является открытой системой, в которую поступает множество ксенобиотиков с пищей, воздухом, водой и в виде лекарственных веществ. Единновременно в организме обнаруживают десятки токсичных и потенциально токсичных веществ, существенно влияющих на здоровье и продолжительность жизни человека. Также существуют тысячи заболеваний, десятки из которых латентно протекают в организме каждого человека. Традиционная диагностика не в состоянии провести скрининг всего разнообразия ксенобиотиков и потенциально возможных заболеваний человека. Для этого существует метаболомный анализ крови, который носит нецелевой (обзорный) характер, что позволяет обнаруживать в крови все разнообразие низкомолекулярных веществ, среди которых десятки тысяч ксенобиотиков и маркеров различных заболеваний. Детекция ксенобиотиков в крови, направленная детоксикация организма и последующий мониторинг “химической чистоты” организма в совокупности с контролем “нормальности” всех биохимических процессов организма, используя метаболомный анализ крови, является необходимым, а возможно и достаточным условием реализации заложенного в генотипе человека долголетия. В статье описано назначение, реализация и интерпретация метаболомного анализа крови, способствующие внедрению данного метода на территории Российской Федерации, с целью значительного повышения средней продолжительности жизни населения.

**Ключевые слова:** диагностика, персонализация лечения, метаболомика, метаботип, плазма крови, масс-спектрометрия, ксенобиотики, токсикология

**DOI** 10.18097/PBMC20176303232

### ВВЕДЕНИЕ

*Первая причина актуальности применения метаболомного анализа*

Организм человека всегда находится в состоянии хронической интоксикации. Единновременно в организме каждого человека присутствуют десятки токсинов, причиняющие вред здоровью и снижающие продолжительность жизни человека. В связи с этим необходим метод, позволяющий выявлять в организме человека ксенобиотики, характеризующиеся чрезвычайным многообразием.

Токсины, попадая в организм, действуют как мутагенные или канцерогенные вещества, разрушают метаболические пути, приводят к дисфункции биологических систем, таких как нервная система, печень, почки и т.д. Источником ксенобиотиков является еда, которая всегда контаминирована токсинами, секретируемыми бактериями и грибами, и синтетическими ядами (пестициды, побочные продукты пищевого производства, лекарства, промышленные отходы) [1, 2]. Приготовление еды, в свою очередь, сопровождается процессом преобразования натуральных продовольственных продуктов в токсины. Высокие температуры преобразовывают содержащие азот вещества мяса и зерновых в мощные мутагены бензпирен и акриламид. Копченая рыба и сыры содержат предшественники токсинов, известных как N-нитрозо вещества, которые становятся мутагенными, попадая в организм [3]. Летучие органические вещества поступают через лёгкие и являются распространенной причиной многих

заболеваний, среди которых поражение почек, иммунологические проблемы, гормональные расстройства, болезни крови, астма, бронхиты [4]. Строительные материалы (напольные и настенные покрытия, древесностружечные плиты, клеи и краски), а также бытовая химия выделяют газообразные вещества, которые обнаруживаются в организме человека [5, 6]. Например, токсичные производные бензола, обычно входящие в состав дезинфицирующих средств и дезодорантов, были обнаружены у 98% обследованных добровольцев в исследовании Управления по охране окружающей среды (Environmental Protection Agency – EPA) [7]. В другом исследовании EPA, проведённом на территории США, три токсичных растворителя присутствовали в 100% человеческих образцов ткани [8]. Недавно построенные или отремонтированные здания могут выделять значительное количество токсичных веществ, чему было дано название “синдромом болезненной атмосферы в здании” (“sick building syndrome”) [9]. Ковры – особенно крупный источник многих нейротоксинов. При тестировании 400 разнообразных ковров нейротоксины присутствовали в более чем 90% исследованных образцов. При этом количество нейротоксинов в некоторых образцах было достаточным для того, чтобы вызвать в эксперименте смерть у мышей [10]. В исследовании воздействия непроизводственных источников пестицидов на организм (“Non-Occupational Pesticide Exposure Study” – NOPES) было обнаружено в среднем до 12 пестицидов и их производных в каждом исследованном образце ковра и установлено, что ковры могут являться основным источником

поступления в организм таких пестицидов, как ДДТ, альдрин, атразин и карбарил [11].

Сегодня описаны тысячи токсических веществ, эпизодически или постоянно присутствующих в организме. Например, база данных токсинов “Toxin and Toxin Target Database (T3DB)” (<http://www.t3db.ca>) насчитывает 42 тысячи записей. Ситуация усугубляется также тем, что к токсинам относят только вещества с подтвержденным токсическим эффектом, который измеряется в обозримом промежутке времени (в противном случае его нельзя было бы измерить). Удалённые же последствия и масштаб наносимого ущерба здоровью при длительном их воздействии на организм для основной массы веществ (включая лекарства) не известны. Таким образом, в масштабе длительности человеческой жизни, практически каждый ксенобиотик, попавший в организм, можно рассматривать в качестве вещества, наносящего ущерб здоровью человека и сокращающего его жизнь.

Особая роль в проблеме интоксикации организма ксенобиотиками отведена нерациональной лекарственной терапии. Различное всасывание, распад и выведение лекарств из организма у различных людей, повсеместно распространенное самолечение, применение дженериков и комбинированной лекарственной терапии (единовременный приём нескольких лекарств) приводят к тому, что в 60% случаев наблюдается нерациональность в применении лекарств, связанная с тем, что представления врача о том, сколько, каких и в какой концентрации лекарственных веществ в данный момент присутствует в крови пациента, никак не согласуются с реальной ситуацией [12]. На масштаб проблемы указывает то, что нерациональная лекарственная терапия ведет к смерти пациента (в США 100 тыс. человек ежегодно умирает от нерациональной лекарственной терапии) или, как минимум, к хронической лекарственной интоксикации, которая сокращает продолжительность жизни пациента.

### *Вторая причина актуальности применения метаболомного анализа*

Для человека известно несколько тысяч заболеваний. Показанием для проведения диагностики, способной их выявить, является проявление клинических признаков заболевания, то есть когда заболевание уже наносит видимый урон здоровью. Однако, десятки заболеваний длительно и скрытно протекают в организме без подобных проявлений, ухудшая здоровье и сокращая продолжительность жизни человека. Поэтому необходим метод, позволяющий выявлять все разнообразие возможных патологических процессов в организме человека.

Всемирной организацией здравоохранения описано несколько тысяч болезней человека. При этом, прежде чем произойдет манифестация клинических проявлений какого-либо заболевания, в организме иногда годами проходят процессы, связанные с его развитием. Очевидно, что лечение на стадии проявления заболевания может только снизить уже нанесенный организму ущерб. Причём,

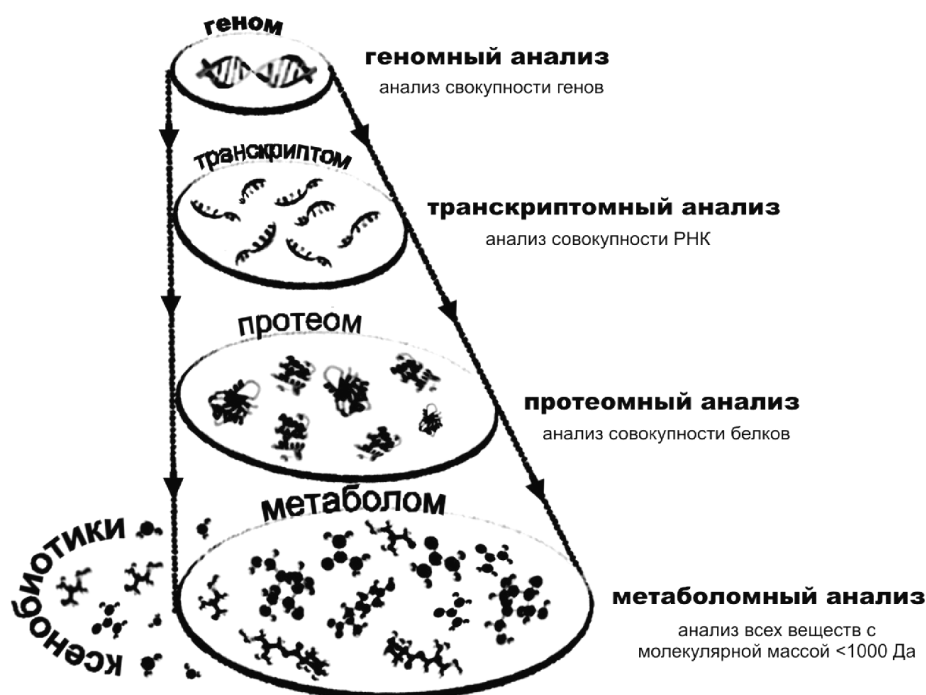
зачастую, как например, при многих формах рака, лечение бывает уже запоздалым, и пациента не всегда удаётся спасти или удаётся спасти с существенным уроном для здоровья. К сожалению, существующая лабораторная диагностика не в состоянии проводить необходимые превентивные исследования по всему спектру возможных заболеваний ввиду их чрезвычайного разнообразия.

При всей мрачности описанной ситуации с интоксикацией ксенобиотиками, которых десятки тысяч, и избытием вариантов патологических процессов, потенциально присутствующих в организме человека, существует современное средство, призванное помочь врачу и пациенту в достижении “объективного” здоровья и “химической чистоты” организма. Таким средством является метаболомный анализ крови, при котором происходит нецелевой анализ биоматериала человека на содержание ненормативных низкомолекулярных веществ. В результате подобного анализа выявляют все разнообразие низкомолекулярных веществ в крови пациента, среди которых все опасные для организма ксенобиотики и низкомолекулярные маркеры для подавляющего большинства заболеваний.

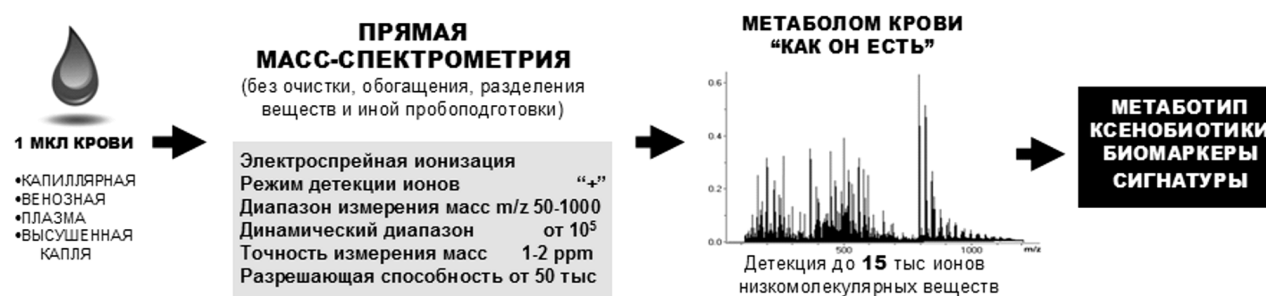
### 1. ПРОИСХОЖДЕНИЕ МЕТАБОЛОМНОГО АНАЛИЗА КРОВИ

Современная наука характеризуется наличием “глобальных” научных направлений, так называемых “-омных” наук. Латинский суффикс “-ом” обозначает организм или группу – в общепринятом смысле целостность организма или группы (например, “биом” – целостность живых организмов в определённом ареале обитания, “геном” – полный набор генов клетки) [13]. Подобная ситуация является следствием применения исследователями эффективных технологических платформ, позволяющих в рамках одного научного исследования полностью (целостно) проанализировать биологический объект на любом уровне организации – от генов до низкомолекулярных веществ [14].

В соответствии с “-омными” представлениями, живые системы существуют в результате взаимодействия “-омных” уровней, осуществляемого путем потока вещества, энергии и информации от одного уровня к другому (рис. 1). Информации, заложенные на геномном уровне, передаются на следующий, транскриптомный уровень. Транскриптомика является функциональной геномикой, изучающей образование первичных транскриптов, процессы сплайсинга и определение количества каждой индивидуальной мРНК. Средствами геномики и транскриптомики осуществляют научный поиск генных и транскриптных биомаркеров заболеваний. Следующим уровнем организации живой системы является протеом, изучаемый протеомикой – наукой, исследующей белковый состав биологических объектов, а также модификации и структурно-функциональные свойства белковых молекул. Средствами протеомики пытаются выявить белковые биомаркеры заболеваний.



**Рисунок 1.** Последовательная взаимосвязь “-омов”, из которых состоит живая система, отражающая поток информации, заложенных в генах, к молекулярному фенотипу организма - метаболому. Указаны варианты анализа “-омов”, в том числе метаболомный анализ, при котором происходит единовременный анализ всей совокупности низкомолекулярных веществ в биопробе.



**Рисунок 2.** Схема метаболомного анализа крови. Масс-спектр получают прямой инъекцией образца крови в подкисленном метаноле в электроспрейный источник ионизации квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра. В результате получают картину метаболома, статистический анализ которого в группе с метаболомами здоровых добровольцев позволяет установить нормативность метаботипа, выявить ксенобиотики, низкомолекулярные биомаркеры заболеваний, применить метаболомные диагностические сигнатуры.

Метаболом, изучаемый метаболомикой, является совокупностью низкомолекулярных веществ (метаболитов) биологических объектов, и последним уровнем в потоке информации живых систем. Метаболиты формируют молекулярный фенотип организма, так как являются субстратами, интермедиатами или продуктами биохимических реакций. Поэтому в метаболоме, как в “молекулярном зеркале”, отражаются все процессы, проходящие в организме. По этой причине метаболомика занимает исключительную позицию среди других “-омных” наук в плане диагностики заболеваний. Посредством анализа метаболитов, задействованных в патологических биохимических процессах, метаболомный анализ может использоваться в клинической практике для эффективной диагностики и расчёта рисков возникновения заболеваний [15-18].

Метаболомный анализ, связанный с диагностикой заболеваний и токсикологией, в большинстве случаев связан с исследованием крови (рис. 2). Кровь – основной переносчик низкомолекулярных веществ в организме, являющихся питательными веществами, гормонами, субстратами и продуктами биохимических реакций. Кровь омывает все ткани в организме, и в неё выделяются вещества в ответ на внешние или внутренние стимулы [19]. Метаболомные исследования проводят методом ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии [20-23]. Однако, ввиду большей чувствительности, приоритетным для метаболомного анализа в медицинских целях является масс-спектрометрический анализ, детальное описание которого приведено в публикации Лохова и соавт [24].

Основная цель применения метаболомного анализа крови в медицинской практике это нецелевое выявление ненормативных низкомолекулярных веществ, которые имеют диагностическую, прогностическую или иную медицинскую ценность или присутствие которых в близкой или удаленной перспективе имеет или может иметь неблагоприятные последствия для здоровья. Нецелевой (обзорный) характер метаболомного анализа обеспечивается применением масс-спектрометров с высоким разрешением детекции масс. При этом масс-спектр является неким “окном” шириной в 1000 Да, в котором с разрешением в 0,0001 Да отражаются все низкомолекулярные вещества в диапазоне концентраций шириной до  $10^5$ , способные ионизироваться в электроспрейном источнике ионизации масс-спектрометра. Учитывая, что только незначительное количество низкомолекулярных веществ совсем не ионизируется в электросрее, метаболомный анализ потенциально пригоден для выявления всех отклонений в низкомолекулярном составе крови.

## 2. ПРОТОКОЛ ЗАБОРА КРОВИ

При заборе образцов крови для метаболомного анализа учитывают известные особенности метаболитов. Во-первых, это сильная изменчивость их концентраций в плазме крови. Так, распределение метаболитов в организме варьирует в зависимости от его состояния и времени суток, что налагает жёсткие требования к условиям получения проб для анализа, то есть образцы крови должны быть взяты в одно и то же время. Вторая особенность – это отсутствие видоспецифичности большинства метаболитов, что ведет к существенному влиянию поступающих, например, с пищей веществ на результаты анализа. Поэтому забор крови должен осуществляться до приема пищи.

Для метаболомного анализа можно использовать любой образец крови: цельная венозная или капиллярная кровь, плазма крови и даже высушенные на бумаге капли крови. Сыворотку крови рекомендуется не использовать. Результаты анализа при использовании различного биоматериала могут незначительно различаться, что не критично для значимости результатов анализа. Важно отметить, что для определения нормативности метаболита пациента и детекции ненормативных низкомолекулярных веществ в крови необходим сравнительный анализ метаболитов, полученных по одному протоколу и для того же типа биоматериала. То есть, например, капиллярную кровь можно анализировать, сравнивая только с капиллярной кровью, венозную кровь с венозной и так далее. В остальном важно соблюдать требование идентичности условий забора для всех анализируемых образцов. В случае использования антикоагулянта используют ЭДТА (совместим с масс-спектрометрическим анализом). Ниже приведён пример забора венозной крови и получение плазмы для метаболомного анализа.

Кровь берут из кубитальной вены, утром, натощак, в объёме 2 мл, в пробирки, содержащие ЭДТА. Затем кровь, не позднее 10 мин после забора, центрифугируют при комнатной температуре в течение 15 мин при 3000 об/мин (1600 g). Полученную плазму переносят в пластиковую пробирку, маркируют и замораживают при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Транспортировку образцов проводят в замороженном состоянии в термоконтейнерах. Хранение образцов до проведения анализа осуществляют при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Используемые для анализа пробы не должны быть заморожены/разморожены более одного раза. Пробы аннотируют, обязательно указав пол, возраст, расу пациента и какие лекарства принимались в течение недели до сдачи крови на анализ. Желательно указание имеющихся заболеваний, их стадий, какое проводилось лечение, результаты лабораторных анализов.

Для метаболомного анализа необходимо не более 1 мкл биоматериала, поэтому объём забора биоматериала определяется исключительно удобством проведения манипуляций с ним.

## 3. МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МЕТАБОЛОМА КРОВИ

Метаболомный анализ крови для медицинских целей реализуется посредством прямой масс-спектрометрии (DIMS, direct infusion mass spectrometry). Прямой масс-спектрометрический анализ подразумевает внесение анализируемого биоматериала в источник ионизации масс-спектрометра, без предварительного выделения, разделения или обогащения анализируемых веществ. Исключение предварительной обработки биоматериала, например хроматографией, позволяет получить картину метаболома крови “как она есть”, то есть без искажений, вносимых любыми дополнительными стадиями обработки биоматериала. Потребность отражать метаболом “как он есть” исходит из необходимости получать идентичные или близкие к ним результаты анализа в разных лабораториях, что достигается их максимальной близостью к одному и тому же “реальному” метаболому. Отсутствие эффективного разделения метаболитов компенсируется применением современных масс-спектрометров с высоким разрешением детекции масс веществ. Так, применение гибридного квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра (Q-TOF) позволяет методом прямой масс-спектрометрии детектировать в крови 15 тысяч ионов метаболитов только в одном режиме детекции масс. Учитывая, что согласно данным Beecher [25] метаболом человека содержит примерно три тысячи основных метаболитов, можно утверждать, что масс-спектр отражает почти весь низкомолекулярный состав (метаболом) крови человека.

### 3.1. Основные характеристики метаболомного анализа крови на основе прямой масс-спектрометрии:

1) под анализ попадают низкомолекулярные вещества до 1000 Да, к которым относятся

токсины, лекарственные препараты и метаболиты протекающих в организме биохимических реакций как физиологических, так и патологических процессов;

2) ионы металлов не подпадают под анализ;

3) анализ носит нецелевой характер, что позволяет выявлять в крови все разнообразие ненормативных веществ;

4) возможна идентификация не каждого обнаруженного в крови ненормативного вещества;

5) масс-спектрометрический анализ пробы крови происходит “как он есть”, то есть без предварительной пробоподготовки и с применением прямой инъекции анализируемого образца в электроспрейный источник ионизации масс-спектрометра;

6) возможно использование любого биоматериала: плазма крови, венозная кровь, капиллярная кровь, высушенная на фильтровальной бумаге капля крови;

7) для анализа необходимо микроколичество биоматериала (не более 1 мкл);

8) эффективность метаболомного анализа зависит от мощности используемого масс-спектрометра; для эффективного анализа необходима разрешающая способность масс-спектрометра не менее 20 тыс (отношение высоты масс-спектрометрического пика к его ширине, измеренной на середине его высоты); точность измерения масс 1-2 ppm и ширина динамического диапазона измерения масс не менее  $10^5$ ;

9) используют масс-спектрометр с электроспрейным источником ионизации (мягкая ионизация почти не разрушает и хорошо ионизирует низкомолекулярные вещества);

10) масс-спектрометр используют в режиме детекции положительно заряженных ионов (наиболее полно отражается низкомолекулярный состав крови); измерение в режиме детекции отрицательно заряженных ионов является дополнительной опцией;

11) выравнивание масс-спектрометрических данных является обязательным этапом перед статистической обработкой масс-спектрометрических данных;

12) выявление ненормативных метаболитов осуществляют статистической обработкой данных, путём расчёта вероятности того, что концентрация вещества в крови не является нормативной;

13) идентификация ненормативных веществ осуществляется по стандартизированным методикам и включает 4 уровня достоверности идентификации;

14) соответствие метаболита норме, а также степень отклонения метаболита от нормы оценивают путём статистического расчёта вероятности того, что метаболит принадлежит к выборке метаболитов здоровых индивидуумов;

15) результаты метаболомного анализа не имеют статус результата клинической лабораторной диагностики или химико-токсикологического исследования;

16) интерпретацию результатов анализа осуществляет врач-биохимик или врач-токсиколог.

#### 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НОРМАТИВНОСТИ МЕТАБОТИПА ПАЦИЕНТА

Метаботип человека – характерный профиль метаболитов крови, который определяется генотипом и зависит от внешних факторов среды, таких как диета, образ жизни, проводимое лечение, состав вдыхаемого воздуха и микробной флоры кишечника. Этот профиль существенно варьируется между отдельными людьми и различными популяциями. Поэтому метаболомное типирование применяют в популяционной и персонифицированной медицине [26-28]. Например, было показано, что различные отклонения в метаболите были связаны с раком, диабетом, сердечно-сосудистыми заболеваниями, неврологическими болезнями и врождёнными нарушениями метаболизма [27, 29-33]. В контексте метаболомного анализа крови метаболитом является набор измеренных масс ионов и соответствующих им интенсивностей масс-спектрометрических пиков (мера концентрации веществ в крови).

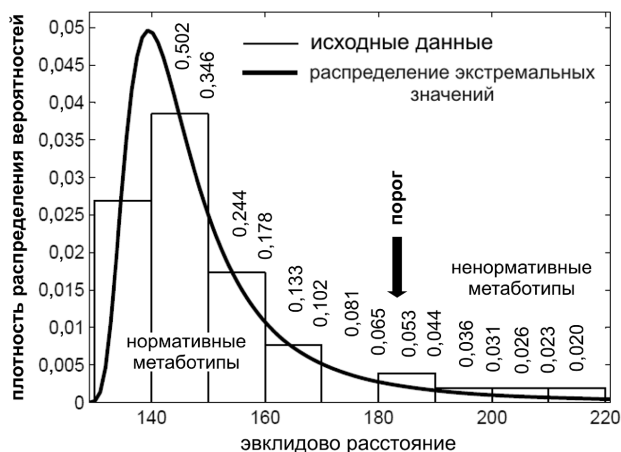
На первом этапе анализа метаболомных данных определяют соответствие исследуемого метаболита нормам. В Федеральном государственном бюджетном научном учреждении “Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича” имеется полученная прямой масс-спектрометрией база метаболомов здоровых людей, чьё соответствие “здоровью” было подтверждено врачебным осмотром, инструментальными методами диагностики и результатами расширенного анализа крови, включающего 60 тестов. Соответствие анализируемого метаболита метаболитам нормы определяют стандартным для таких случаев статистическим анализом. А именно, используя интенсивности масс-спектрометрических пиков выровненных масс-спектров, рассчитывают евклидовы расстояния между масс-спектрами. Полученные расстояния усредняют для каждого метаболита, после чего строят распределение этих расстояний. Данное распределение описывают обобщённым распределением экстремальных значений (generalized extreme value distribution), кумулятивная функция распределения вероятности которого определяет вероятность принадлежности метаболитов к норме, то есть их нормативность (рис. 3).

Если вероятность нормативности метаболита ниже 0,05, то можно говорить о том, что метаболит ненормативен. Подобная величина порога является стандартной вероятностью при обработке биомедицинских данных и указывает на отсутствие достоверной принадлежности переменной к генеральной совокупности.

Если вероятность нормативности метаболита лежит в диапазоне 0,05-0,1, то можно говорить о пограничном состоянии метаболита.

Если вероятность нормативности метаболита больше 0,1, то метаболит можно считать нормативным.

Если в процессе наблюдения за пациентом происходит увеличение вероятности нормативности



**Рисунок 3.** Определение нормативности метаболита. Распределение эвклидовых расстояний между метаболитами в группе здоровых индивидуумов описывают обобщённым *распределением экстремальных значений*. Из данного распределения определяют кумулятивную функцию распределения вероятности, значение которой в точке расположения тестируемого на нормальность метаболита, вычитенное из единицы, указывает на вероятность его нормативности. На графике цифрами указаны рассчитанные вероятности нормативности метаболитов и порог, за которым следуют ненормативные метаболиты.

метаболита, то это указывает на объективную и отражённую в молекулярном фенотипе человека нормализацию здоровья, уменьшение – наоборот, уход от нормального молекулярного фенотипа, то есть ухудшение здоровья.

Детекцию ненормативных метаболитов целесообразно проводить как в нормативных метаболитах, так и в ненормативных. К ненормативным низкомолекулярным веществам причисляют те вещества, чьи масс-спектрометрические пики не встречаются в норме или отличаются от соответствующих интенсивностей пиков в “нормальных” метаболитах более, чем пороговое значение, определённое Z-статистикой ([https://en.wikipedia.org/wiki/Standard\\_score](https://en.wikipedia.org/wiki/Standard_score)). Значение Z-статистики используется как мера (степень выраженности) ненормативности концентрации низкомолекулярного вещества и позволяет оценивать динамику его изменения во времени (например, при лечении).

## 5. ИДЕНТИФИКАЦИЯ НЕНОРМАТИВНЫХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЕЩЕСТВ

Детектированные ненормативные метаболиты подлежат идентификации. Особенности идентификации ненормативных низкомолекулярных веществ крови вытекают из особенностей метаболомного анализа, позволяющего выявлять разнообразные низкомолекулярные вещества, включая их продукты распада, среди которых присутствует в том числе и большое количество неизвестных веществ. Согласно установленным стандартам метаболомного анализа выделяют четыре

уровня достоверности результатов идентификации низкомолекулярных веществ:

- Уровень 1 – идентифицированные вещества;
- Уровень 2 – предположительно аннотированные вещества (putatively annotated compounds);
- Уровень 3 – предположительно охарактеризованные классы веществ (putatively characterised compound classes);
- Уровень 4 – неизвестные вещества.

Идентификация уровня 1 соответствует достоверной идентификации вещества, которая требует, чтобы два или более независимых свойства идентифицируемого вещества были подтверждены путем анализа химического стандарта вещества и сравнены с данными метаболомного анализа, полученными в той же самой лаборатории, тем же самым аналитическим методом.

Идентификация уровня 2 не требует соответствия данных по стандартному веществу, полученных в той же самой лаборатории. Сравнение происходит с физико-химическими свойствами вещества, содержащегося в базе данных, и поэтому результаты идентификации классифицируют не как идентификация, а как предположительная аннотация вещества.

Идентификация уровня три указывает на то, что по физико-химическим свойствам аннотируется только химический класс вещества.

Четвертый уровень указывает на то, что соответствие идентифицируемому веществу в базе данных не найдено, тем не менее, вещество чётко определяется на основе спектральных данных.

Указание уровня идентификации метаболитов чрезвычайно важно, так как от этого зависит ценность результатов метаболомного анализа.

### 6.1 Независимые свойства вещества, используемые при их идентификации в метаболомном анализе:

1) Точно измеренная молекулярная масса вещества (accurate mass tag). Данную характеристику можно использовать для идентификации вещества, если измерение молекулярной массы произведено с точностью 1-2 ppm или более точно.

2) Изотопное распределение вещества (isotopic pattern). Изотопное распределение является специфичным для элементного состава вещества. Соответствие изотопного распределения вещества в масс-спектре веществу с известным элементным составом позволяет повысить достоверность идентификации. Следует отметить, что многие ксенобиотики имеют довольно специфичное изотопное распределение, что в совокупности с точно измеренной массой позволяет достоверно их идентифицировать.

3) Набор масс-фрагментов вещества (MS-MS). Это свойство позволяет достоверно идентифицировать вещество и может использоваться как самостоятельно, так и дополнять другие способы идентификации. Метод заключается в том, что при воздействии

на вещество в масс-спектрометре осуществляется его развал на фрагменты, которые специфичны, так как соответствуют развалу исходной структуры анализируемого вещества.

4) Специфические массы фрагментов вещества (MRM). Данное свойство используют при идентификации веществ, известной как мониторинг множественных реакций (multiple reaction monitoring). Этот подход отличается от предыдущего тем, что среди фрагментов развала определяют по массе только определенные фрагменты (обычно один или два фрагмента), высокоспецифичные для конкретного вещества.

5) Время удержания вещества на хроматографической колонке (retention time). Данное свойство не используется при прямой масс-спектрометрии.

На уровнях 2 и 3 идентификация ненормативных масс-спектрометрических пиков осуществляется путём сопоставления их свойств с данными метаболитов в базах данных (например, база "Human Metabolome Database" (<http://www.hmdb.ca>) или Metlin (Scripps Center for Mass Spectrometry, США; <http://metlin.scripps.edu>)). Для идентификации по набору масс фрагментов вещества существует метрика достоверности идентификации (показатели Fit, Rfit, Purity). Результаты идентификации вносят в специальный бланк, который содержит всю необходимую информацию для интерпретации результата метаболомного анализа врачом-биохимиком и его архивирования для последующего использования в научных (например, в эпидемиологических) исследованиях.

## 6. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ НЕНОРМАТИВНЫХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЕЩЕСТВ

Результат идентификации ненормативных низкомолекулярных веществ (ксенобиотиков и метаболитов) требует интерпретации для определения их влияния на здоровье человека.

Так как продукты питания, являющиеся основным источником поступления ксенобиотиков в организм человека, импортируются из различных стран, результаты метаболомного анализа следует проверять по всему спектру известных токсичных веществ и лекарств. Для этого пригодны базы данных EPA (<http://www.epa.gov/iris/>), которая содержит информацию об опасных и потенциально опасных для здоровья человека веществах, присутствующих в окружающей среде и продуктах питания. При этом указывается, к какому классу опасности относятся идентифицированные в крови вещества. Дополнительно можно использовать базу T3DB (<http://www.t3db.ca>), которая насчитывает 42 тысячи записей, базу DBETH (<http://www.hpppi.iicb.res.in/btox/>) и базу DrugBank (<http://www.drugbank.ca/>).

Для того, чтобы определить, являются ли идентифицированные ненормативные метаболиты диагностическими маркерами или факторами риска развития заболеваний, необходимо проверить их наличие в соответствующих базах данных.

Так, например, база данных GVKBio Online Biomarker Database (<https://gobiomdb.com/gobiom/>) насчитывает более 46 тысяч биомаркеров, значительная часть которых относится к низкомолекулярным веществам. Дополнительно можно задействовать базу, созданную Integrative Biomedical Informatics Group (<http://ibi.imim.es/disease-related-biomarker-database/>) или базу BiomarkerBase (<https://www.biomarkerbase.com/about>).

## 7. МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ СИГНАТУРЫ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В перспективе при интерпретации результатов метаболомного анализа крови будут применяться метаболитические сигнатуры заболеваний (сигнатура – набор значений переменных, формирующий специфическую картину). На сегодняшний день применение метаболитических сигнатур в диагностических целях не прошло регистрацию. Однако в ближайшем будущем именно сигнатуры заболеваний, выявленные в результате метаболомного анализа, будут определять облик современной клинической лабораторной диагностики, так как совместное использование отдельных маркеров заболеваний, входящих в сигнатуру, приводит к синергии их диагностического потенциала и высокой (иногда близкой к 100%) точности диагностики любых, в том числе трудно диагностируемых заболеваний.

Ниже, в качестве примера, приведена масс-спектрометрическая сигнатура рака лёгкого, записанная в унифицированной форме и совместимая с прямым масс-спектрометрическим анализом крови [34]:

$m/z_{\text{квантиль}}$ : 151,075<sup>0,87</sup>; 153,024<sup>0,92</sup>; 210,935<sup>0,70</sup>; 268,891<sup>0,64</sup>; 270,888<sup>0,87</sup>; 278,088<sup>0,76</sup>; 391,086<sup>0,80</sup>; 477,087<sup>0,81</sup>; 478,091<sup>0,86</sup>; 479,085<sup>0,74</sup>; 480,089<sup>0,63</sup>; 481,091<sup>0,73</sup>.

Точность диагностики рака лёгкого I-IV стадий по данной сигнатуре составляет 88% (специфичность 99%, чувствительность 77%, AUC 0,93). В сигнатуре указаны молекулярные массы ионов веществ, детектируемых при прямой масс-спектрометрии плазмы крови. В верхнем регистре указывается пороговое значение в квантилях, при превышении которого диагностический показатель повышается на единицу. Результат диагностики считается положительным при значениях диагностического показателя >7. Подобные сигнатуры существуют также для диагностики рака простаты и нарушенной толерантности к глюкозе [35].

Подобная запись метаболомной сигнатуры является унифицированной, то есть пригодной для записи диагностической сигнатуры любого заболевания.

## 8. СТАТИСТИКА РЕЗУЛЬТАТОВ МЕТАБОЛОМНОГО АНАЛИЗА КРОВИ

Для характеристики возможностей метаболомного анализа крови ниже представлен статистический анализ полученных результатов для 52 здоровых индивидуумов. Соответствие добровольцев критериям

“здоровья” подтверждено врачебным осмотром, инструментальными методами исследования, а также результатами расширенного анализа крови, включающего 40 биохимических, 17 гематологических и 3 иммунологических теста. Выбор здоровых людей для анализа обусловлен нецелесообразностью оценки эффективности метаболомного анализа на больных людях, так как это будет частный случай для выбранной нозологии, которых великое множество. Более того, важным для характеристики метода является именно исследование людей, не имеющих каких-либо проявлений заболеваний с точки зрения современной медицинской диагностики, что подтвердит актуальность и безальтернативность применения метаболомного анализа в медицинской практике.

Из таблицы следует, что ненормативные вещества присутствуют в крови у всех людей. При этом их регистрируют на порядок больше у ненормативных метаботипов. Следует обратить внимание на процент индивидуальных, то есть регистрируемых только у одного человека ненормативных веществ, который равен 95,6%. Это указывает на персональный характер перечня ненормативных метаболитов у “здоровых” людей.

**Таблица.** Статистика результата метаболомного анализа крови 52 здоровых добровольцев. Анализ проводили прямой масс-спектрометрией на квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре (maXis, Bruker)

Проанализировано метаботипов	52
Возраст пациентов (ср.±ст.откл)	26,3±6,4
Определено ненормативных метаботипов	9,6%
Количество ненормативных веществ (ср.±ст. откл.)	
по всем метаботипам	46±82
по нормативным метаботипам	22±21
по Ненормативным метаботипам	271±91
Индивидуальных (встречающихся только у одного пациента) ненормативных веществ	95,6%
Процент идентифицируемых ненормативных веществ	
уровень 2 и 3	24%
уровень 2 -4	78%

Примечание: результаты, представленные в таблице, получены для диапазона детекции масс  $m/z$  50-1000 и режима детекции положительно заряженных ионов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наиболее распространенное мнение, к которому склоняется абсолютное большинство экспертов, — в человеческом организме заложена длительность жизни 120-150 лет. Данные цифры исходят из генетических возможностей, приписываемых человеку. Фактическая продолжительность жизни является результатом взаимодействия генов и факторов окружающей среды, таких как диета, образ жизни, состав микробной флоры кишечника, проводимое лечение. Результатом подобного же взаимодействия является и метаботип человека (см. определение метаботипа). Поэтому

не удивительно, что метаботип является объективным показателем здоровья, и в нём, как в молекулярном “зеркале”, отражаются все воздействия, которые не позволяют реализовать заложенный в геноме потенциал долголетия. Выявляя их (метаболические, эндокринные и другие заболевания, хронические и острые интоксикации, нерациональная лекарственная терапия, риск-факторы и т.д.), человеку предоставляется возможность взять их под контроль, избавиться или, по крайней мере, минимизировать наносимый ими ущерб здоровью. Поэтому нет оснований полагать, что приведение метаботипа к норме, то есть к объективному молекулярному показателю здоровья, и пожизненный контроль “химической чистоты” метаболома крови не приведёт к полной реализации заложенного в геноме долголетия при сохранении высокого качества здоровья на всем протяжении жизни.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана Российской Академией Наук (грант “Метаболомная диагностика нарушенной толерантности к глюкозе”).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Prakash A.S., Pereira T.N., Reilly P.E., Seawright A.A. (1999) *Mutat Res.*, **443**(1-2), 53-67.
2. Borchers A., Teuber S.S., Keen C.L., Gershwin M. (2010) *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **39**(2), 95-141.
3. Ferguson L.R., Philpott M. (2008) *Annu. Rev. Nutr.*, **28**, 313-329.
4. Crinnion M.J. (2000) *Altern. Med. Rev.*, **5**(2), 133-143.
5. Nielsen G.D., Larsen S.T., Olsen O., Løvik M., Poulsen L.K., Glue C., Wolkoff P. (2007) *Indoor Air*, **17**(3), 236-255.
6. Wallace L.A., Pellizzari E.D., Hartwell T.D., Sparacino C.M., Sheldon L.S., Zelon H. (1967) *Atmospheric Environment*, **19**(10), 1651-1661.
7. Hill R.H.Jr., Ashley D.L., Head S.L., Needham L.L., Pirkle J.L. (1995) *Arch. Environ. Health*, **50**, 277-280.
8. Broad scan analysis of the FY82 national human adipose tissue survey specimens. (2012) EPA Office of Toxic Substances. EPA 560/5-86-035.
9. Ruhl R.A., Chang C.C., Halpern G.M., Gershwin M.E. (1993) *J. Asthma*, **30**, 297-308.
10. Duehring C. *Carpet* (1993) *Informed Consent*, **1**, 6-32.
11. Whitmore R.W., Immerman F.W., Camann D.E., Bond A.E., Lewis R.G., Schaum J.L. (1994) *Arch. Environ. Contain Toxicol.*, **26**(1), 47-59.
12. Лохов П.Г., Маслов Д.Л., Трифонова О.П., Балашова Е.Е., Арчаков А.И. (2014) *Биомед. химия*, **60**, 201-216. DOI: 10.18097/PBMC20146002201.
13. Пирюзян Л.А. (2004) *Вестник Российской Академии Наук*, **74**, 610-618.
14. Арчаков А.И. (2000) *Биомед. химия*, **46**, 4-7.
15. Schnackenberg L.K. (2007) *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **7**, 247-259.
16. Dunn W.B., Broadhurst D.I., Atherton H.J., Goodacre R., Griffin J.L. (2011) *Chem. Soc. Rev.*, **40**, 387-426.
17. Barrett D. (2012) *Bioanalysis*, **4**, 643-644.
18. Schnackenberg L.K., Beger R.D. (2006) *Pharmacogenomics*, **7**, 1077-1086.



19. Трифонова О.П., Лохов П.Г., Арчаков А.И. (2014) Биомед. химия, **60**, 281-294. DOI: 10.18097/PBMC20146003281.
20. Dunn W.B., Broadhurst D.I., Atherton H.J., Goodacre R., Griffin J.L. (2011) Chem. Soc. Rev., **40**, 387-426.
21. Psychogios N., Hau D.D., Peng J., Guo A.C., Mandal R., Bouatra S., Sinelnikov I., Krishnamurthy R., Eisner R., Gautam B. et al. (2011) PLoS One, **6**(2), P.e16957.
22. Lin L., Yu Q., Yan X., Hang W., Zheng J., Xing J., Huang B. (2010) Analyst., **135**(11), 2970-2978.
23. Dettmer K., Aronov P.A., Hammock B.D. (2007) Mass Spectrom. Rev., **26**(11), 51-78.
24. Лохов П.Г., Арчаков А.И. (2008) Биомед. химия, **54**, 497-511.
25. Beecher C.W.W. (2003) Metabolic profiling: Its role in biomarker discovery and gene function analysis. Springer, New York, p.335.
26. Engel J., Blanchet L., Engelke U.F.H., Wevers R.A., Buydens L.M.C. (2014) PLoS ONE, **9**(4), P.e92452.
27. Nicholson J.K., Holmes E., Kinross J.M., Darzi A.W., Takats Z., Lindon J.S. (2012) Nature, **491**, 384-392.
28. Holmes E., Wilson I.D., Nicholson J.K. (2008) Cell, **134**, 717.
29. Madsen R., Lundstedt T., Trygg J. (2010) Analytica Chimica Acta, **659**, 23-33.
30. Engelke U.F.H., Moolenaar S.H., Houndersop S.M.G.C., Morava E., van der Graaf M. (2007) Handbook of 1H-NMR spectroscopy in inborn errors of metabolism: body fluid NMR spectroscopy and *in vivo* MR spectroscopy: Heilbronn: SPS Verlagsgesellschaft.
31. Lindon J.C., Holmes E., Nicholson J.K. (2007) FEBS J., **274**, 1140-1151.
32. Lokhov P.G., Dashtiev M.I., Moshkovskii S.I., Archakov A.I. (2010) Metabolomics, **6**(1), 156-163.
33. Lokhov P.G., Trifonova O.P., Maslov D.L., Archakov A.I. (2013) European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organization (ECP), **22**(4), 335-341.
34. Lokhov P.G., Balashova E.E., Voskresenskaya A.A., Trifonova O.P., Maslov D.L., Archakov A.I. (2016) Biomedical Reports, **4**(1), 122-126.
35. Lokhov P.G., Trifonova O.P., Maslov D.L., Balashova E.E., Archakov A.I., Shestakova M.V., Dedov I.I. (2014) Plos One, **9**(9), P.e105343.

Поступила: 21. 12. 2016.  
Принята к печати: 14. 03. 2017.

## METABOLOMIC BLOOD TEST: PURPOSE, IMPLEMENTATION AND INTERPRETATION OF DATA

*P.G. Lokhov, A.V. Lisitsa, A.I. Archakov*

Institute of Biomedical Chemistry,  
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; e-mail: lokhovpg@gmail.com

The human body is an open system that receives a variety of xenobiotics in the course of dietary route or respiration and in the form of the drugs. As a lump sum scores of toxic and potentially toxic substances are detected in a human body that significantly affect health and human lifespan. There are also thousands of diseases, dozens of which latently occur in the body of each person. Traditional diagnosis is not able to screen all the variety of xenobiotics and potential human diseases. For this purpose metabolomic blood test is available which is of non-targeted (review) nature. The test can reveal all the diversity of low molecular weight substances in blood, including tens of thousands of xenobiotics and markers of different diseases. Detection of xenobiotics in the blood, directional detoxification and subsequent monitoring of "body's chemical purity" together with the control of "normality" of all biochemical processes in the organism, using metabolomics blood tests is a necessary and presumably a sufficient condition in the implementation of inherent human genotype longevity. This article describes the purpose, implementation and interpretation of metabolomic blood test facilitating the implementation of this method in the Russian Federation, in order to significantly increase the average life expectancy.

**Key words:** diagnosis, treatment personalization, metabolomics, metabotype, blood plasma, mass spectrometry, xenobiotics, toxicology