



МЕТОД РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ РАКА ЖЕЛУДКА НА ОСНОВЕ МЕТАБОЛОМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Фурина Р.Р.*, Рыжков В.Л.*, Митракова Н.Н.*, Коптина А.В.***, Сафиуллин И.К.***, Лычагин К.А.***, Ерошкин П.Р.**

* ГБУ РМЭ «Республиканская клиническая больница» г. Йошкар-Ола 424030, Республика Марий Эл, г. Йошкар-Ола, ул. Осипенко, д.33,

** ГБОУ ВПО «Поволжский Государственный технологический университет» (ГБОУ ВПО ПГТУ) г. Йошкар-Ола 424000, Республика Марий Эл, г. Йошкар-Ола, пл. Ленина, д. 3,

THE METHOD FOR EARLY DIAGNOSIS OF THE GASTRIC CANCER BASED METABOLOMICS RESEARCH

Furina R.R.*, Ryzhkov V.L.*, Mitrakova N.N.*, Coptina A.V.***, Safullin I.K.***, Lichagin K.A.***, Eroshkin P.R.**

* Republican Clinical Hospital, Yoshkar-Ola, Russia

** Volga State Technological University, Yoshkar-Ola, Russia

Фурина
Раиса Рустэмовна
Furina Raisa R.
E-mail:
furina_raisa@mail.ru

Фурина Раиса Рустэмовна — аспирант ФГБОУ ВПО «Государственный Поволжский технический университет», кафедра радио-технических и медико-биологических систем. Адрес: пл. Ленина, д. 3, г. Йошкар-Ола, Республика Марий Эл, 424000. Место работы: ГБУ РМЭ «Республиканская клиническая больница», 424030 г. Йошкар-Ола, ул. Осипенко, 33. Должность — врач-эндоскопист.

Рыжков Виктор Леонидович — аспирант ФГБОУ ВПО «Государственный Поволжский технический университет», кафедра радио-технических и медико-биологических систем. Место работы: ГБУ РМЭ «Республиканская клиническая больница». Должность — врач-эндоскопист.

Митракова Нина Николаевна — доктор медицинских наук, профессор ФГБОУ ВПО «Государственный Поволжский технический университет», кафедра радиотехнических и медико-биологических систем. Место работы: ГБУ РМЭ «Республиканская клиническая больница». Должность — заведующая эндоскопическим отделением.

Коптина Анна Владимировна — докторант ФГБОУ ВПО «Государственный Поволжский технический университет».

Сафиуллин Ильдар Кавилович — аспирант ФГБОУ ВПО «Государственный Поволжский технический университет», кафедра радио-технических и медико-биологических систем.

Лычагин Кирилл Андреевич — аспирант ФГБОУ ВПО «Государственный Поволжский технический университет», кафедра радио-технических и медико-биологических систем.

Ерошкин Павел Ростиславович — аспирант ФГБОУ ВПО «Государственный Поволжский технический университет», кафедра радио-технических и медико-биологических систем.

Furina Raisa R. — Doctor of the Republican Clinical Hospital, Yoshkar-Ola, Russia; Graduate student of the Volga State Technological University, Yoshkar-Ola, Russia

Ryzhkov Viktor L. — Doctor of the Republican Clinical Hospital, Yoshkar-Ola, Russia; Graduate student of the Volga State Technological University, Yoshkar-Ola, Russia

Mitrakova Nina N. — Doctor of the Republican Clinical Hospital, Yoshkar-Ola, Russia; Doctor of Medical Sciences of the Volga State Technological University, Yoshkar-Ola, Russia

Coptina Anna V. — Doctoral of the Volga State Technological University, Yoshkar-Ola, Russia

Safullin Ildar K. — Graduate student of the Volga State Technological University, Yoshkar-Ola, Russia

Lichagin Kirill A. — Graduate student of the Volga State Technological University, Yoshkar-Ola, Russia

Eroshkin Pavel R. — Graduate student of the Volga State Technological University, Yoshkar-Ola, Russia

Резюме

В представленной статье затронуты вопросы применения метаболомических исследований в диагностике рака желудка. Основная идея метаболомики заключается в обнаружении специфических биомаркеров в биологическом образце для диагностики этого заболевания. В качестве биомаркеров рассматриваются летучие органические вещества — метаболиты, выделенные из образцов мочи пациентов. В статье отражены основные методы разделения и идентификации летучих органических веществ образца (газовая хроматография, масс-спектрометрия), применяемые в метаболомике. Представлены результаты лабораторных исследований по поиску биомаркеров рака желудка. Представленный материал может помочь в решении вопросов ранней диагностики этого заболевания.

Ключевые слова: рак желудка, газовая хроматография, масс-спектрометрия, летучие метаболиты.

Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология 2014; 110 (10):14–17

Summary

This paper deals with the questions of the usage of metabolomics research results in the diagnosis of gastric cancer. The central idea metabolomics is to identify the specific biomarkers in a biological sample used in a diagnostics this disease. The volatile organic compounds — metabolites isolated from the urine samples from patients are considered as biomarkers. The paper also describes main methods of separation and identification of volatile organic compounds (gas chromatography, mass spectrometry) applied in metabolomics. The paper presents some results of laboratory research aimed at the detection of biomarkers of gastric cancer. The presented material will be of some help in solving the problems of early diagnosis of this disease.

Keywords: gastric cancer, gas chromatography, mass spectrometry, the volatile metabolites.

Eksperimental'naya i Klinicheskaya Gastroenterologiya 2014; 110 (10):14–17

Введение

В настоящее время большое внимание уделяется проблеме диагностики рака на ранней стадии. По данным Всемирной организации здравоохранения, каждый год от онкологических заболеваний в мире умирают более 7,5 млн. человек. Заболевание в 60% случаев диагностируется на III–IV стадии, когда болезнь уже затронула функции одного или нескольких жизненных органов или поразила весь организм [1].

Рак желудка занимает четвёртое место по заболеваемости, уступая раку лёгкого, молочной железы, толстой кишки, и является второй причиной смертности от опухолевых заболеваний во всем мире. Методы раннего обнаружения рака желудка чрезвычайно важны, так как практически всегда опухоль легче поддается лечению на начальной стадии [3].

Достижения генетики и молекулярной биологии последних десятилетий открывают в перспективе принципиально новые возможности в диагностике и лечении злокачественных новообразований. Одним из них является метаболомика — область науки, изучающая конечные и промежуточные продукты обмена веществ в биологической системе, будь то клетка, орган или организм в целом [10]. Последние исследования показали, что метаболомика может выявить специфические признаки болезни, так называемые биомаркеры, которые в будущем сыграют большую роль в диагностике и прогнозе заболевания [7,9,12].

Исследования метаболомического профиля образцов выполняются с использованием гибридного метода анализа — сочетания газовой (ГХ) или жидкостной (ЖХ) хроматографии и масс-спектрометрии (МС) или спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопия). Газовая хроматография — универсальный метод разделения смеси веществ, испаряющихся без разложения [5,8]. Биологические жидкости (например, кровь, моча или мокрота) — источники, богатые летучими органическими метаболитами, которые могут использоваться в качестве потенциальных биомаркеров заболеваний.

На наш взгляд, оптимальным объектом скринингового метаболомического исследования может стать моча пациентов, так как она является богатым источником летучих органических метаболитов, которые могут использоваться в качестве онкомаркеров рака желудка. Возможность легко собрать и сохранить образцы мочи является главным преимуществом этого подхода. Ряд исследований показал, что метаболиты определенного состава воспроизводятся у онкологических больных и секретируются в мочу. Таким образом, используя метод газовой хроматографии и масс-спектрометрии можно выявить уникальный состав метаболитов мочи, характерный для рака желудка [8,11].

Цель статьи. Показать разработку технологии определения информативных маркеров для диагностики рака желудка на основе метаболомического профиля мочи пациентов методом ГХ–МС.

Группы и сбор данных

Исследуемые отбирались из числа пациентов Республиканской клинической больницы Республики Марий Эл. Были сформированы две группы: группа больных, с гистологически подтвержденным диагнозом рака желудка — 24 человека и контрольная группа — 40 человек. Все пациенты были проинформированы об исследовании, добровольно дали согласие и имели право участвовать в исследовании, так как были старше 18 лет. Все исследуемые подписали информированное согласие об участии

в исследовании, и исследование было одобрено этическим комитетом больницы.

Каждый человек (больной или здоровый доброволец) сдавал среднюю порцию утренней мочи (после ночного ограничения приема пищи) в объеме не менее 15,0 мл в стерильном контейнере из поливинилхлорида. Образцы хранились при температуре не выше +4°C до исследования, но не более 5 часов. Исследование проводилось в день сбора образцов мочи.

Материал и методы исследования

В исследовании использован метод газовой хроматографии с масс-спектрометрическим анализом. Газовая хроматография — универсальный метод разделения смеси веществ, испаряющихся без разложения [5,8]. ГХ основана на перемещении вещества вдоль слоя сорбента в потоке подвижной фазы, которой является инертный газ (газ-носитель). Масс-спектрометрия — метод исследования вещества путём определения отношения массы к заряду ионов, образующихся при ионизации полученных компонентов пробы. Используя эти методы для многокомпонентного анализа, можно получить метаболический профиль мочи, характерный для пациентов с раком желудка.

Исследование проводилось в лаборатории компании «ХРОМАТЭК», с помощью любезно предоставленного нам газового хроматографа «ХРОМАТЭК-Кристалл 5000» (Россия).

Подготовка проб (выделение летучих метаболитов) проводилась методом твердофазной микроэкстракции (ТФМЭ) образцов мочи. Метод основан на сорбции компонентов газовой фазы образца на нить с полимерным покрытием и ее последующей термической десорбцией в предварительно нагретом инжекторе газового хроматографа. Эта методика имеет несколько преимуществ перед традиционными методами извлечения растворителем: ТФМЭ быстра, удобна, высоко чувствительна, свободна от растворителя [8].

Перед микроэкстракцией, значения pH 15 мл пробы мочи были скорректированы, до значения

1–2 и добавлялось 0,8 г NaCl для большей эффективности достижения равновесия системы. Отбор проб проводили при t 50 °C путем введения волокна CAR / PDMS, 75 μm (Supelco) через клапан Мининерт® (Supelco) в свободное пространство емкости над уровнем мочи и экспозицией в течение 6 мин. Далее волокно переносилось в газовый хроматограф (ГХ Хроматэк-Кристалл 5000, Хроматэк, Россия), где в порте испарителя происходила десорбция летучих веществ образца в течение 6 мин при температуре 220 °C. Затем компоненты разделялись в капиллярной колонке Solgel-Wax GC (60м /320мкм, толщина неподвижной фазы 0,5 мкм). В качестве газа-носителя использовался сверхчистый гелий (99,999%). После хроматографического разделения, метаболиты анализировались масс-спектрометрическим детектором. Предварительная идентификация метаболитов производилась путем сравнения масс-спектров обнаруженных веществ с масс-спектрами библиотеки стандартов Национального института стандартов США (NIST 08/2008). Во внимание принимались только компоненты, обнаруженные с более чем 75% достоверностью совпадения [2].

Обработка данных производилась методом дисперсионного анализа математической статистики (ANOVA от англ. ANalysis Of Variance), направленного на поиск зависимостей в экспериментальных данных путём исследования значимости различий в средних значениях [4,6].

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе анализа летучих веществ из образцов мочи пациентов было выявлено присутствие 146 химических веществ, определенных с помощью сравнения полученных масс-спектров с масс-спектрами химических стандартов содержащихся в библиотеке масс-спектров NIST. Все синтезируемые вещества являются продуктами метаболических процессов в организме, и изучение природы их происхождения и причин, ведущих к изменению их биосинтеза крайне важно для понимания хода протекания болезни.

Анализ присутствующих летучих соединений показал наличие 15 веществ, встречающихся с частотой 75% и выше в образцах мочи в группе больных раком желудка, их относительная

концентрация отличается от контрольной группы (таблица 1).

Статистический анализ полученных данных с помощью однофакторного дисперсионного анализа не показал достоверного различия выделенных веществ между группами, что связано со значительным варьированием их концентрации внутри групп. В связи с этим необходимо увеличить количество образцов внутри каждой группы, особенно в контрольной группе или/и создать подгруппы.

С другой стороны каждый профиль изменений всех 15 веществ, встречающихся в большинстве образцов исследуемых групп, является уникальным и может быть использован для постановки диагноза, при дальнейшем сохранении закономерности.

Вещество	Контрольная группа	Рак желудка	Δ , %
2-Butanone	8	8	3
2,6,10,10-Tetramethyl-1-oxa-spiro 4.5 dec-6-ene	9	33	249
4-Heptanone	435	94	-78
Acetone	30	172	482
Benzene	28	64	127
Disulfide, dimethyl	419	397	-5
Furan	15	27	81
Furan, 2-methyl-	6	17	194
Furan, 2-pentyl-	9	14	60
Furan, 2,5-dimethyl-	51	48	-7
Hexanal	67	96	44
Hexane	22	199	787
Methanethiol	135	121	-10
Tetrachloroethylene	31	40	30
Thiophene, 2-methoxy-	139	160	15

Таблица 1.
Вещества – потенциальные биомаркеры заболеваний и изменение площади пика на хроматограмме по отношению к контрольной группе (Δ ,%).

Примечание:
Среднее значение площади пика вещества на хроматограмме, мв*с*10⁻⁶

Заключение

Полученные методом ГХ–МС метаболиты могут использоваться как элементы для составления уникального метаболического профиля мочи, характерного для больных раком желудка, но вероятность их обнаружения на данный момент недостаточная.

Полученные результаты говорят о том, что требуется дальнейший анализ большего количества образцов мочи больных раком желудка и контрольной группы, позволяющий выявить уникальный метаболический профиль мочи пациентов, который будет использован в качестве онкомаркера рака желудка.

Литература

1. Злокачественные новообразования в России в 2008 году (заболеваемость и смертность). Под ред. В. И. Чиссова, В. В. Старинского, Г. В. Петровой — Москва — 2010—256с.
2. Карасек, Ф. В. Введение в хромато-масс-спектрометрию: Пер. с англ. Ф. В. Карасек, Р. С. Клемент — М.: Мир, 1993. — 237 с.
3. Рукавишников А. И. Азбука рака / А. И. Рукавишников. — Волгоград: Изд-во Волг. гос. мед. ун-та. 2007. — 360 с.: ил.
4. Смирнов Н. В., Дунин-Барковский И. В. Курс теории вероятностей и математической статистики для технических приложений. — 2. — М., 1965.
5. Царев Н. И., Царев В. И., Катраков И. Б. Практическая газовая хроматография. — Барнаул: Изд-во Алт. Ун-та — 2000—156 с.
6. Шеффе Г. Дисперсионный анализ, пер. с англ. — М., 1963.
7. Catchpole G., Platzer A., Weikert C. et al. Metabolic profiling reveals key metabolic features of renal cell carcinoma // J. Cell. Mol. Med. — 2011 — Vol. 15 — P. 109–118.
8. Silva C. L., Passos M., Camara J. S. Investigation of urinary volatile organic metabolites as potential cancer biomarkers by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry// British Journal of Cancer — 2011 — Vol.105 — P. 1894–1904
9. Denkert C., Budczies J., Fiehn O. et al. Metabolite profiling of human colon carcinoma- deregulation of TCA cycle and amino acid turnover. // Mol Cancer — 2008 — Vol.7 — P.72.
10. Jordan K. W., Nordenstam J., Lauwers G. Y. et al. Metabolomic characterization of human rectal adenocarcinoma with intact tissue magnetic resonance spectroscopy// Diseases of the Colon & Rectum — 2009 — Vol. 52, N3 — P. 520–525.
11. Silvia M. Rocha, Michael Caldeiraa, Joana Carrolac, Magda Santosa, Nadia Cruza, Iola F. Duarte. «Exploring the human urine metabolomic potentialities by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time of flight mass spectrometry» Journal of Chromatography A, (2012) 155–163.
12. Sreekumar A., Poisson L. M., Rajendiran T. M. et al. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression // Nature — 2009 — Vol. 457 — P. 910–914.