

Определение метаболитов, связанных с ростом опухоли, в плазме крови мышей с перевитой гибридомой методом ЯМР-спектроскопии с применением критерия Манна-Уитни

Молчанов С.Г.^{1*}, Панкратова Н.М.², Панкратов А.Н.², Молчанов М.В.³, Чернов А.С.⁴, Тимченко М.А.³

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

²Институт математических проблем биологии РАН - филиал Института прикладной математики им. М.В.Келдыша РАН, Пущино, Россия

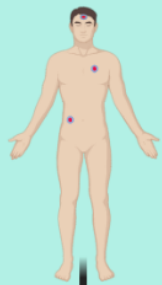
³Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН. Пущино, Россия

⁴Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Россия

**perehc1@gmail.com*

Целью настоящей работы было определение метаболитов в плазме крови мышей методом ^1H ЯМР-спектроскопии, изменение которых связано с развитием гибридомы

Два пациента с неспецифическими симптомами

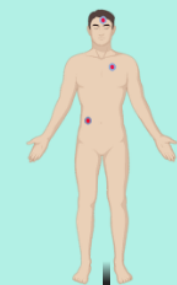


Ультрасовременное междисциплинарное исследование

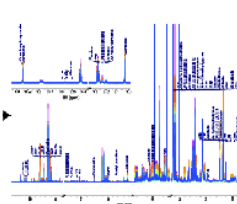


Общий анализ крови
СОЭ
С-реактивный белок
Мочевина и электролиты
Креатинин
Фосфат
HbA1c
Функция щитовидной железы
CA125 (женщины)
PSA (мужчины)
Иммунохимическое исследование кала
КТ (грудной клетки, брюшной полости и таза)

Диагноз Пациент 1
Не рак (доброкачественный узел, обычное наблюдение)
Пациент 2
Нет четкого диагноза



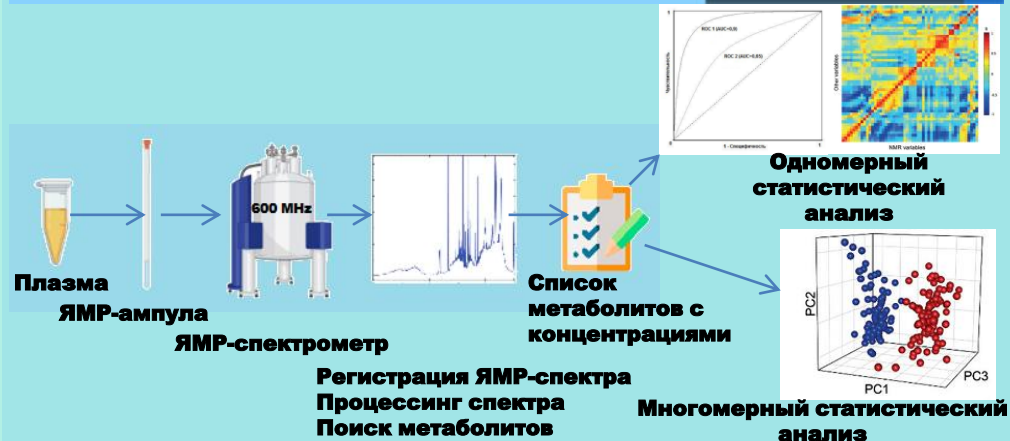
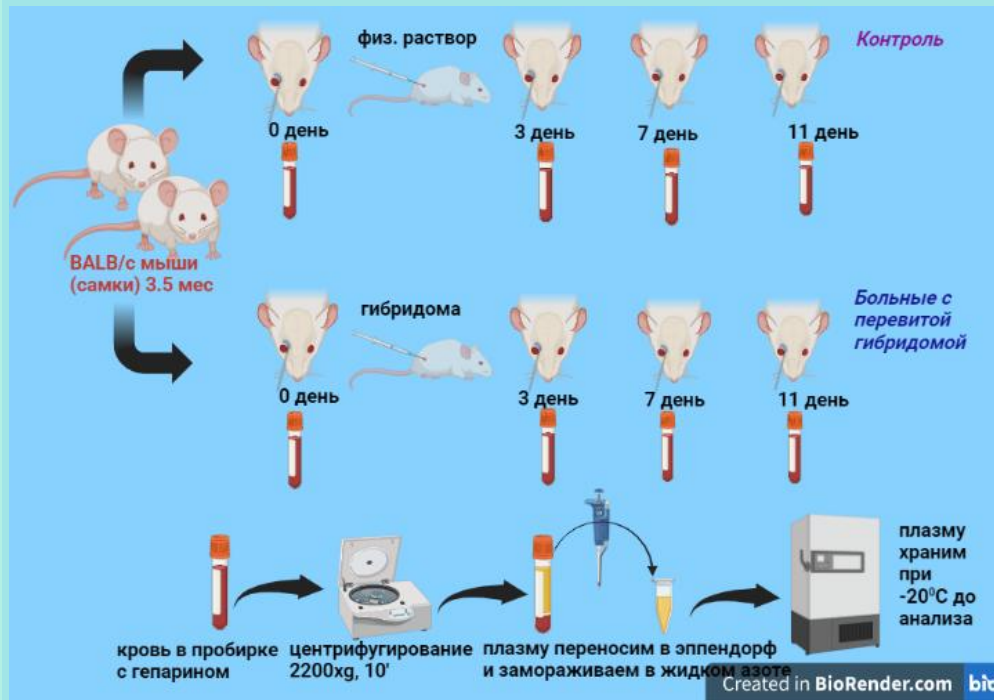
ЯМР-метаболомика



Диагноз Пациент 1
Рак (узел в легком был подтвержден биопсией как аденокарцинома)
Пациент 2
Рак (рецидив рака желудка в анамнезе, подтвержденный эндоскопией)

Адаптировано из Larkin, J. R. et al, 2022, *Clinical cancer research*, 28(8), 1651–1661

Материалы и методы Схема эксперимента



Результаты: Одномерный статистический анализ

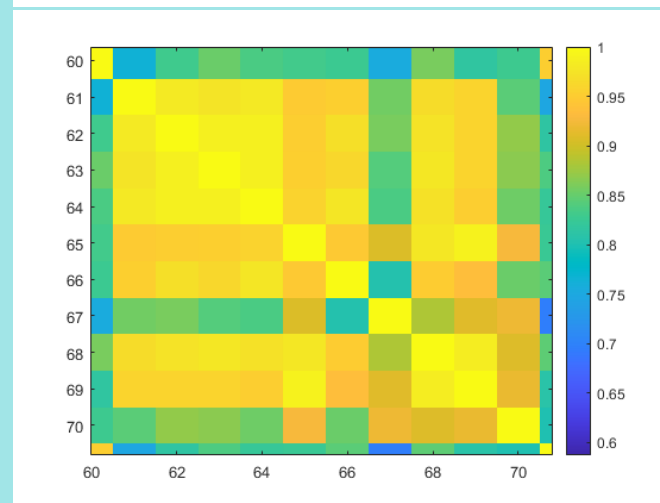
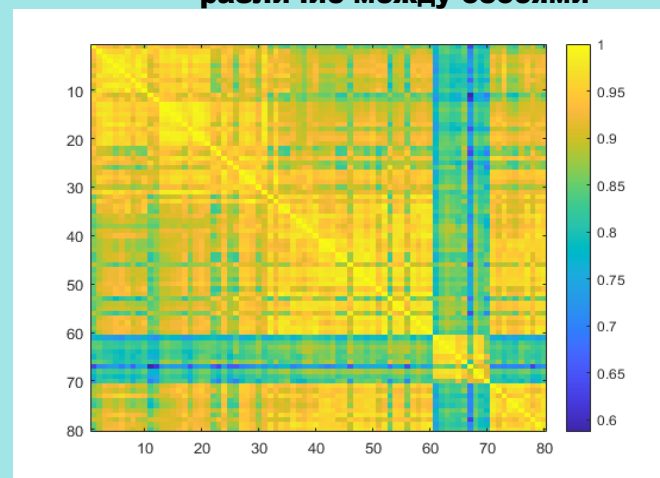
С помощью ЯМР-анализа с использованием базы данных AMIX (Bruker) обнаружено 36 метаболитов в плазме крови мышей

МЕТАБОЛИТЫ В ПЛАЗМЕ

- 1) Формиат (Formate)
- 2) Аденозин (Adenosine)
- 3) Гипоксантин (Hypoxanthine)
- 4) Гистидин (Histidine)
- 5) Фенилаланин (Phenylalanine)
- 6) Тирозин (Tyrosine)
- 7) Фумарат (Fumarate)
- 8) D-глюкозофосфат (D-Glucose-phosphate)
- 9) Аллантаин (Allantoin)
- 10) D-глюкоза (D-Glucose)
- 11) Серин (Serine)
- 12) Бетаин (Betaine)
- 13) Глицерин (Glycerol)
- 14) Глицин (Glycine)
- 15) Сцилло-инозитол (Scyllo-inositol)
- 16) Таурин (Taurine)
- 17) Холин (Choline)
- 18) Ацетил-L-карнитин (Acetyl-L-carnitine)
- 19) Креатин (Creatine)
- 20) Диметилглицин (Dimethylglycine)
- 21) Триметиламин (Trimethylamine)
- 22) Метионин (Methionine)
- 23) Цитрат (Citrate)
- 24) Глутамин (Glutamine)
- 25) Сукцинат (Succinate)
- 26) Пируват (Pyruvate)
- 27) Глутамат (Glutamate)
- 28) Ацетат (Acetate)
- 29) Аланин (Alanine)
- 30) *t*-бутанол (*t*-butanol)
- 31) Лактат (Lactate)
- 32) Бета-гидроксимасляная кислота (3-OH-butyrate)
- 33) Изобутират (Isobutyrate)
- 34) Валин (Valine)
- 35) Изолейцин (Isoleucine)
- 36) Лейцин (Leucine)

Ранговая корреляция Спирмена по всем обнаруженным метаболитам для оценки корреляционной связи между двумя совокупностями признаков

Чем ближе коэффициент корреляции к единице, тем меньше различие между особями



По осям отложены мыши:

0 день - 1-20 (1-10 - больные, 11-20 - контроль)

3 день - 21-40 (21-30 - больные, 31-40 - контроль)

7 день - 41-60 (41-50 - больные, 51-60 - контроль)

11 день - 61-80 (61-70 - больные, 71-80 - контроль)

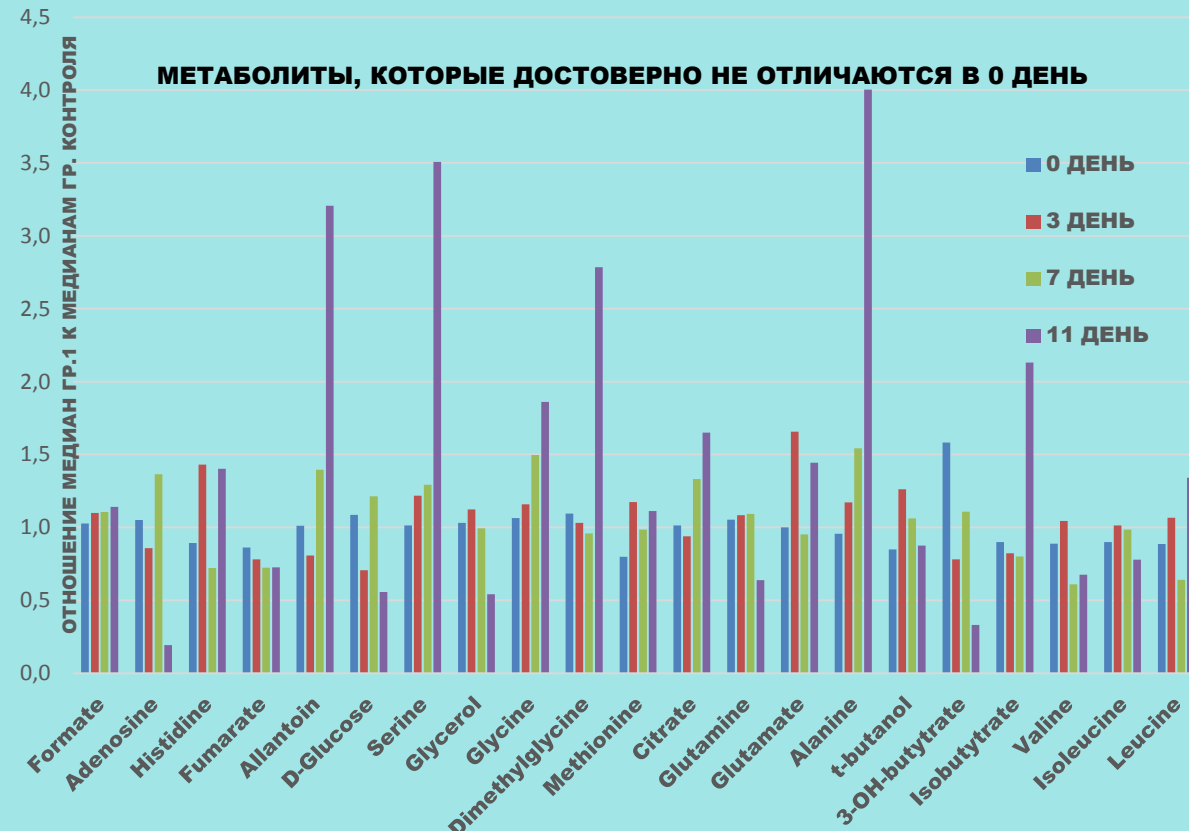
Результаты: Одномерный статистический анализ

На основании результатов и U-критерия Манна-Уитни получили список метаболитов (выделены), которые достоверно не отличались у мышей уже в 0 день, перед введением гибридомы, и отслеживали их динамику при развитии патологии

Группы достоверно отличаются при $U < U_{кр}$
Для двух групп из 10 особей $U_{кр} = 27$

МЕТАБОЛИТЫ В ПЛАЗМЕ

- 1) Формиат (Formate)
- 2) Аденозин (Adenosine)
- 3) Гипоксантин (Hypoxanthine)
- 4) Гистидин (Histidine)
- 5) Фенилаланин (Phenylalanine)
- 6) Тирозин (Tyrosine)
- 7) Фумарат (Fumarate)
- 8) D-глюкозофосфат (D-Glucose-phosphate)
- 9) Аллантаин (Allantoin)
- 10) D-глюкоза (D-Glucose)
- 11) Серин (Serine)
- 12) Бетаин (Betaine)
- 13) Глицерин (Glycerol)
- 14) Глицин (Glycine)
- 15) Сцилло-инозитол (Scyllo-inositol)
- 16) Таурин (Taurine)
- 17) Холин (Choline)
- 18) Ацетил-L-карнитин (Acetyl-L-carnitine)
- 19) Креатин (Creatine)
- 20) Диметилглицин (Dimethylglycine)
- 21) Триметиламин (Trimethylamine)
- 22) Метионин (Methionine)
- 23) Цитрат (Citrate)
- 24) Глутамин (Glutamine)
- 25) Сукцинат (Succinate)
- 26) Пируват (Pyruvate)
- 27) Глутамат (Glutamate)
- 28) Ацетат (Acetate)
- 29) Аланин (Alanine)
- 30) t-бутанол (t-butanol)
- 31) Лактат (Lactate)
- 32) Бета-гидроксимасляная кислота (3-ОН-butyrate)
- 33) Изобутират (Isobutyrate)
- 34) Валин (Valine)
- 35) Изолейцин (Isoleucine)
- 36) Лейцин (Leucine)



Анализ площади под ROC-кривой (AUC) для оценки диагностической значимости обнаруженного метаболита

Значение AUC	Качество теста	ROC AUC			Metabolite	ROC AUC					
		3day	7day	11 day		3day	7day	11 day			
0.9 - 1.0	Отличное				2	Adenosine					
0.8 - 0.9	Очень хорошее	7	Fumarate	0,76	0,76	0,85	4	Histidine	0,69	0,96	0,74
0.7 - 0.8	Хорошее	11	Serine	0,83	0,81	1	9	Allantoin	0,77	0,7	1
0.6 - 0.7	Среднее	14	Glycine	0,8	0,98	0,98	10	D-Glucose	0,88	0,74	0,99
0.5 - 0.6	Неудовлетворительное	23	Citrate	0,33	0,89	1	33	Isobutyrate	0,8		1
		29	Alanine	0,78	0,83	0,8	36	Leucine	0,66	0,97	0,74
		34	Valine	0,37	0,94	0,84					
		35	Isoleucine			0,92					

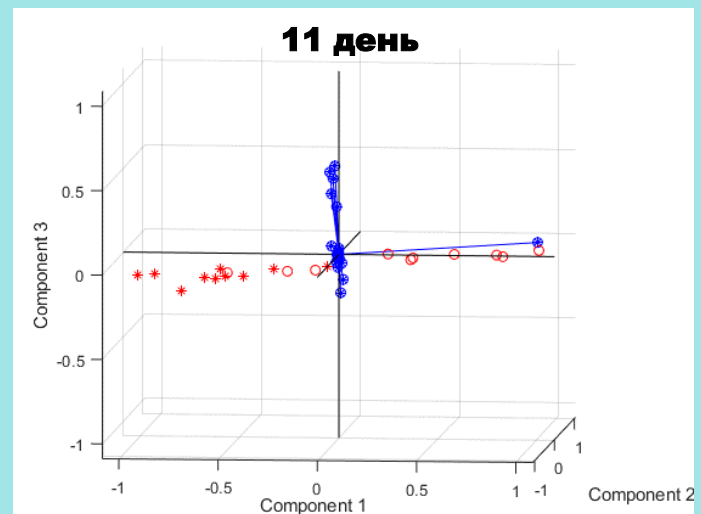
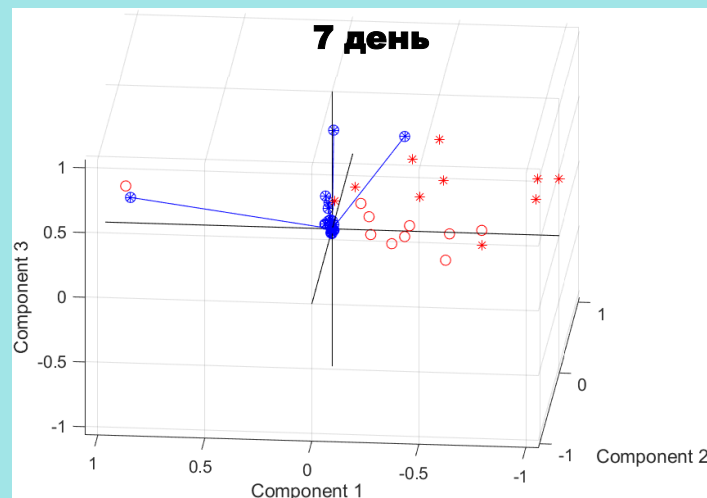
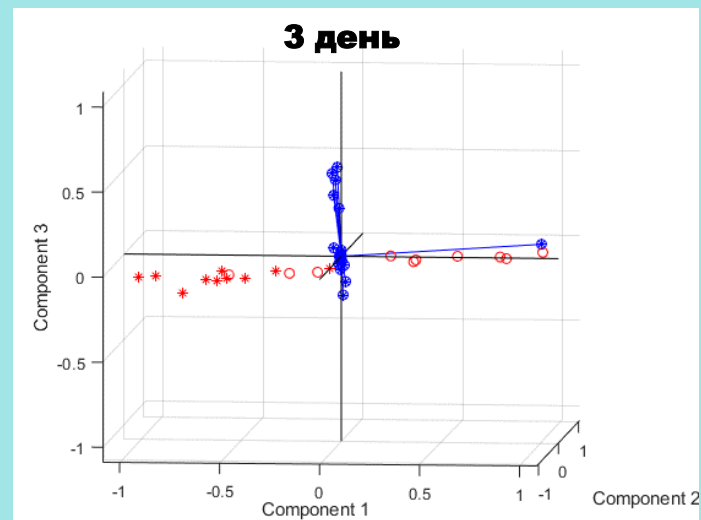
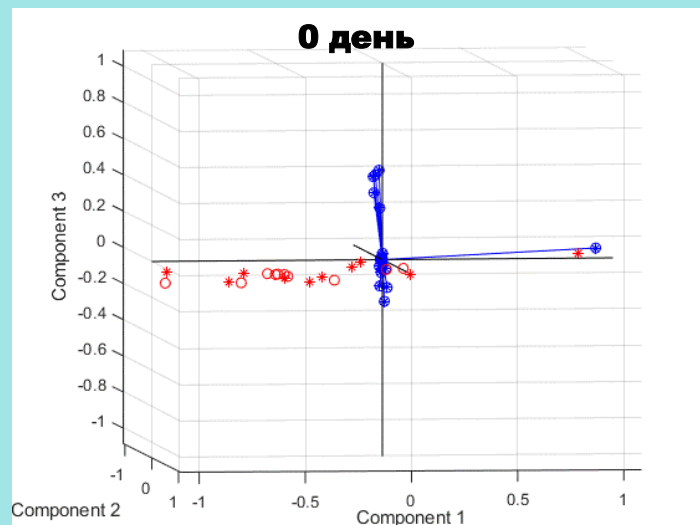
Динамика изменений:

- неясно +/-
- уменьшилось отн. конт
- возросло
- нет отличий

Результаты: Многомерный статистический анализ

Применение метода главных компонент для достоверно значимых метаболитов плазмы

○ - контроль, * - больные



Метод главных компонент показал, что группы больных и здоровых мышей значимо разделяются уже на 3 день после введения гибридомы

Выводы:

- 1. В плазме крови мышей методом ЯМР-спектроскопии обнаружено 36 метаболитов**
- 2. Уже на 3-й день после привития гибридомы содержание аланина, глицина и серина в плазме крови мышей с опухолью возрастало по сравнению с контрольной группой, в то время как содержание фумарата снижалось, и такая тенденция сохранялась до 11-го дня эксперимента.**
- 3. К 7-му дню развития опухоли у больных значимо снижалось содержание валина, а цитрата возрастало, что наблюдалось вплоть до 11-го дня.**
- 4. К 11-му дню изменялось содержание 31 метаболита у мышей с опухолью из 36.**

Таким образом, показано, что в случае мышей с перевитой гибридомой, в первую очередь, затрагивается биосинтез аминокислот и цитратный цикл, что на ранних этапах позволяет выявить метод ЯМР-спектроскопии