

Applicazione della metabolomica basata sulla risonanza magnetica nucleare alla medicina respiratoria

Nuclear magnetic resonance-based metabolomics applied to respiratory medicine

Debora Paris¹, Paola Cuomo¹, Annabella Tramice¹, Mauro Maniscalco², Andrea Motta¹

¹ Istituto di Chimica Biomolecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Pozzuoli (NA);

² UOC di Pneumologia Riabilitativa, Istituti Clinici Scientifici Maugeri IRCCS, Telesse Terme (BN)

Riassunto

La metabolomica studia l'insieme dei metaboliti endogeni di peso molecolare minore di 1.500 Dalton (il metaboloma), e che costituiscono i prodotti finali dei processi biologici nei sistemi viventi. Avvalendosi della combinazione di tecniche analitiche e di bioinformatica, essa registra, analizza e quantifica le variazioni dei metaboliti in risposta a qualsiasi tipo di sollecitazione: dallo stile di vita alle perturbazioni ambientali, dalle anomalie genetiche alla reazione a farmaci e terapie. Il profilo molecolare che si ottiene rappresenta una "impronta" unica che può fornire informazioni dirette su uno stato fisiologico o su una sequenza di eventi in un organismo. Pertanto, selezionando una appropriata matrice biologica [condensato dell'aria espirata (EBC), urina, siero, plasma, liquido di lavaggio broncoalveolare (BALF), saliva o estratti di cellule e tessuti] è possibile analizzare diversi aspetti delle patologie polmonari.

Parole chiave: metabolomica, NMR, outcome, profilo molecolare, biomarcatori, fenotipo

Summary

Metabolomics studies the set of endogenous metabolites with a molecular weight < 1500 Dalton (the metabolome), which constitute the end products of biological processes in living systems. Using a combination of analytical and bioinformatics techniques, it records, analyzes and quantifies changes in metabolites in response to any type of exposure: from lifestyle to environmental disturbances, from genetic anomalies to reactions to drugs and therapies. The molecular profile obtained represents a unique "fingerprint" that can provide direct information on a physiological state or on a sequence of events in an organism. Therefore, by selecting an appropriate biomatrix [exhaled air condensate (EBC), urine, serum, plasma, bronchoalveolar lavage fluid (BALF), saliva or cell and tissue extracts] it is possible to study different aspects of lung diseases.

Key words: metabolomics, NMR, outcome, molecular profiling, biomarkers, phenotype

Introduzione

La metabolomica studia i prodotti finali dei processi biologici che avvengono nei sistemi viventi. Unendo tecniche analitiche e bioinformatica, essa è in grado di quantificare le variazioni del metaboloma (l'insieme dei metaboliti endogeni di peso molecolare inferiore a 1.500 Dalton) in risposta a qualsiasi fattore che possa influenzare un organismo (per gli esseri umani, stress ambientale e genetico, stile di vita, terapie, inquinamento, presenza di comorbidità, ecc.). Pertanto, la selezione di una matrice biologica appropriata [ad es., il condensato dell'aria espirata (EBC), l'urina, il siero, il plasma, il liquido

Ricevuto il 22-3-2021
Accettato il 25-3-2021

Corrispondenza

Andrea Motta
Istituto di Chimica Biomolecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Comprensorio Olivetti, Edificio A
via Campi Flegrei 34, 80078 Pozzuoli (NA)
andrea.motta@icb.cnr.it

Conflitto di interessi

Gli autori dichiarano di non avere nessun conflitto di interesse con l'argomento trattato nell'articolo.

Come citare questo articolo: Paris D, Cuomo P, Tramice A, et al. Applicazione della metabolomica basata sulla risonanza magnetica nucleare alla medicina respiratoria. Rassegna di Patologia dell'Apparato Respiratorio 2021;36:51-55. <https://doi.org/10.36166/2531-4920-A060>

© Copyright by Associazione Italiana Pneumologi Ospedalieri – Italian Thoracic Society (AIPO – ITS)



OPEN ACCESS

L'articolo è open access e divulgato sulla base della licenza CC-BY-NC-ND (Creative Commons Attribuzione – Non commerciale – Non opere derivate 4.0 Internazionale). L'articolo può essere usato indicando la menzione di paternità adeguata e la licenza; solo a scopi non commerciali; solo in originale. Per ulteriori informazioni: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.it>

di lavaggio broncoalveolare (BALF), la saliva o gli estratti di cellule e tessuti] permette di studiare i diversi aspetti della medicina respiratoria.

La metabolomica adopera prevalentemente due strumenti analitici: la spettrometria di massa (MS) e la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR). Entrambe le tecniche presentano vantaggi e limitazioni. Uno dei principali vantaggi della spettroscopia NMR è la sua capacità di determinare un rapido profilo metabolico riducendo al minimo la manipolazione dei campioni ¹. Inoltre, rappresenta una tecnica non distruttiva e consente di esaminare i campioni più volte. Al contrario, i metodi basati sulla MS presentano una maggiore sensibilità ed una specificità intrinseca, ma possono richiedere un'articolata manipolazione del campione e condizioni sperimentali diverse per analizzare un'ampia gamma di metaboliti. Di seguito descriviamo l'applicazione della metabolomica basata sull'NMR alla medicina respiratoria, seguendo lo schema generale illustrato nella Figura 1.

Come funziona?

L'NMR studia gli atomi che costituiscono le molecole. Il campione viene posto in un forte campo magnetico e i nuclei atomici vengono eccitati da una breve radiazione elettromagnetica aggiuntiva, proveniente da una sorgente che è fissata a una data frequenza (la "frequenza di risonanza"). Quando la radiazione viene poi spenta, i nuclei rilasciano l'energia assorbita che viene registrata come un segnale che si smorza in funzione del tempo. La trasformata di Fourier di questo segnale produce la classica traccia (lo "spettro") NMR (Fig. 1A). La posizione (lo "spostamento chimico") di ciascuna linea o segnale (la "risonanza") in uno spettro dipende dall'intorno chimico del nucleo eccitato, e i parametri che caratterizzano quella linea (frequenza, molteplicità, larghezza di riga e ampiezza) consentono di determinare la struttura molecolare, la conformazione e la dinamica della molecola. La maggior parte delle applicazioni metabolomiche utilizza spettrometri funzionanti a 600 MHz (corrispondenti a 14,1 Tesla), dotati di tecnologia CryoProbe, che ne aumenta la sensibilità e riduce il rumore termico ed elettronico.

Generalmente l'analisi di una matrice biologica consiste nello studio del profilo metabolico che si ottiene dai nuclei di idrogeno (i "protoni") delle molecole presenti nel campione, in quanto tali nuclei hanno un'abbondanza naturale e una sensibilità intrinseca elevate. L'identificazione (l'"assegnamento") delle risonanze a specifici metaboliti è ottenuta tramite lo studio di spettri bidimensionali, acquisiti con esperimenti che disperdono i segnali in due dimensioni, evitando così possibili errori di identificazione dovuti alla sovrapposizione di risonanze presente negli spettri monodimensionali. I valori delle frequenze osservate negli spettri possono essere confrontati con dati di riferimento ² o con banche dati disponibili online (per esempio, lo Human Metabolome Database; www.hmdb.ca/). Le matrici biologiche possono contenere migliaia di composti. Pertanto, i dati presenti in uno spettro NMR risultano essere numericamente complessi, comprendendo diverse fonti di varianza statistica e includendo informazioni che possono essere non rilevanti dal punto di vista biologico. In questo contesto, mediante l'analisi statistica multivariata è possibile ridurre la dimensionalità dei dati e ricavare informazioni statisticamente significative sul sistema biologico in esame. I metodi analitici multivariati creano modelli statistici che generano "variabili latenti" o "componenti principali", che consentono di proiettare i dati in un sistema di riferimento a ridotta dimensionalità e fornendone una visualizzazione immediata ed intuitiva.

Ciascuno spettro NMR viene trasformato in una matrice mediante un processo di suddivisione in sottosezioni (*binning* o *bucketing*) che identifica lo spostamento chimico e l'intensità di ogni "bin" come variabili spettrali. Successivamente, la matrice viene elaborata per "discriminare" le classi (i pazienti) inizialmente con algoritmi non supervisionati (cioè senza fornire indicazioni sulle classi) e successivamente mediante processi supervisionati (utilizzando informazioni aggiuntive sui campioni come l'appartenenza alle classi). Lo scopo è quello di ricercare similitudini e differenze tra gruppi di campioni, che si riflettono nei profili metabolici.

La visualizzazione dei dati in uno spazio ridotto nelle "componenti principali" avviene mediante grafici di *scores* e *loadings*, che rappresentano le nuove coordinate associate a ciascun campione che viene rappresentato da un punto nel grafico degli *scores*. I punti (pazienti) vicini tra loro nel grafico (per es., la classe "asma" identificata dai cerchi blu in Fig. 1B) sono caratterizzati dalle stesse variazioni nei profili metabolici, mentre i punti posti distanti tra loro rappresentano pazienti con concentrazioni di metaboliti differenti (la classe "BPCO" rappresentata dai cerchi rossi in Fig. 1B). I metaboliti responsabili della separazione dei campioni di EBC sono invece riportati come variabili numeriche (la loro posizione nello spettro NMR) nel corrispondente grafico dei *loadings*.

La validità del modello ottenuto viene verificata con campioni di un gruppo di pazienti non incluso nei calcoli del modello primario. A tal fine, è possibile dividere l'intero set iniziale di dati in un set di "addestramento" per costruire il modello statistico e un "test" set per valutare la sua capacità predittiva, purché sia disponibile un numero

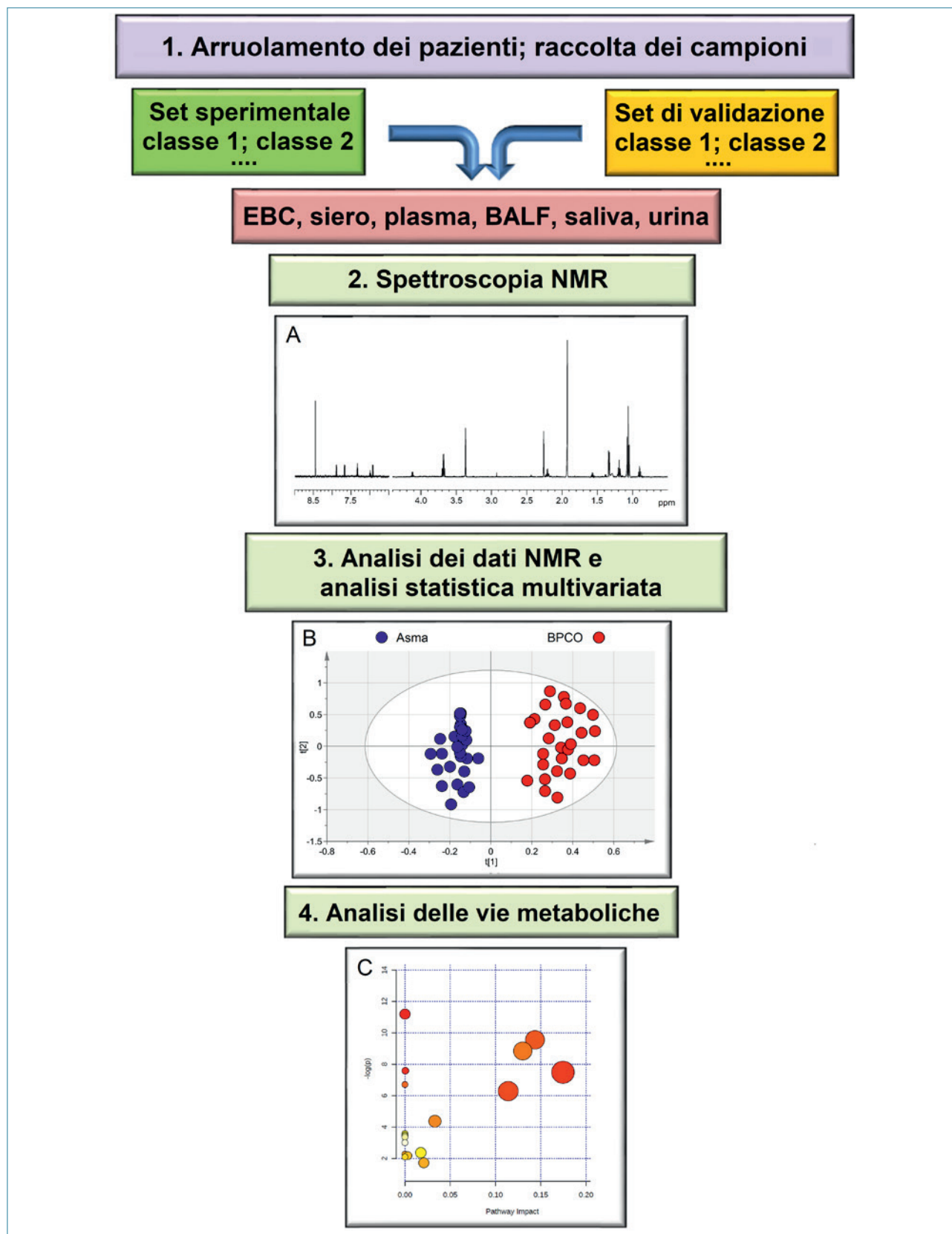


Figura 1. Schema di uno studio metabolomico basato sulla risonanza magnetica nucleare (NMR). In primo luogo, vengono raccolti campioni di condensato dell'aria espirata (EBC), siero, plasma, liquido di lavaggio broncoalveolare (BALF), saliva, urina, cellule, tessuti, ecc. Dopo la preparazione del campione, i dati spettrali vengono acquisiti ottenendo un profilo NMR (1A). Gli spettri vengono elaborati e viene applicata l'analisi statistica multivariata per ottenere informazioni su metaboliti specifici che discriminano le diverse patologie (1B). Dai metaboliti discriminanti tra classi è possibile identificare vie metaboliche associate a specifici stati fisiopatologici (1C).

sufficiente di campioni. Infine, dai metaboliti che discriminano le classi è possibile identificare le alterazioni più rilevanti delle vie metaboliche che caratterizzano gli stati fisiopatologici (Fig. 1C).

Qual è lo stato dell'arte?

Le applicazioni della metabolomica mediante NMR alla medicina respiratoria riguardano due aspetti principali. Il primo, di natura diagnostico-descrittiva, confronta i profili metabolici patologici con quelli di soggetti sani, utilizzati come riferimento. In questo modo è possibile ottenere e quantificare possibili biomarcatori di ciascuna patologia, definendo la specificità del fenotipo patologico. Le applicazioni riguardano l'asma³, la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO)⁴, la fibrosi cistica (FC)⁵, la discinesia ciliare primaria (PCD)⁶, il carcinoma polmonare⁷, l'apnea ostruttiva del sonno (OSAS)⁸ e lo stato di infiammazione in generale⁹. Questi studi non identificano un singolo biomarcatore, ma piuttosto un gruppo di metaboliti che caratterizza uno stato patologico. Inoltre, sebbene i metaboliti presenti nelle matrici biologiche siano ricorrenti (acidi grassi a catena corta, amminoacidi, zuccheri, lipidi, ecc.), è la differenza di concentrazione a caratterizzare e discriminare i diversi stati patologici.

Il secondo aspetto riguarda la definizione del fenotipo e la descrizione della sua evoluzione nel tempo. Ad esempio, mediante lo studio del profilo delle urine è possibile evidenziare differenze fenotipiche tra asma stabile e instabile³, mentre l'analisi metabolomica dell'EBC può discriminare asma e BPCO¹⁰. L'influenza su un fenotipo (per es. l'asma) di una comorbidità (per es. l'obesità) può essere facilmente rilevata identificando uno specifico profilo molecolare associato al fenotipo obeso-asmatico che è completamente diverso da quello registrato nei fenotipi singoli corrispondenti all'obesità e all'asma¹¹. Può anche essere studiata l'evoluzione del fenotipo in patologie diverse ma correlate, per es. la BPCO e l'istiocitosi a cellule di Langerhans aventi entrambe il fumo come fattore causale¹². La stadiazione della BPCO è ottenibile dallo studio del siero⁷, che è utile anche per indagare il suo legame con il cancro del polmone⁷. La combinazione di siero, urina ed EBC può inoltre aiutare a discriminare BPCO e OSAS⁸. L'applicazione della spettroscopia NMR può differenziare i versamenti pleurici maligni da quelli benigni¹³ e la FC stabile rispetto a quella instabile mediante l'analisi dell'EBC⁵. Il siero può essere anche utilizzato per valutare lo stato di pazienti ventilati che sviluppano polmonite associata alla ventilazione¹⁴. Il BALF è stato utilizzato per studiare con successo la sindrome da bronchiolite obliterante con diversi livelli di gravità¹⁵ e per monitorare l'esposizione all'inquinamento atmosferico¹⁶. L'EBC può anche essere utilizzato per valutare l'effetto di agenti inquinanti nei luoghi di lavoro¹⁷.

Quali sono le prospettive di utilizzo in futuro?

Nel prossimo futuro la metabolomica basata sull'NMR può diventare un valido mezzo di supporto per la medicina polmonare personalizzata e di precisione. Il profilo metabolomico dei singoli pazienti con patologie respiratorie può rivelare percorsi individuali di patogenesi e consentirne una migliore classificazione, una previsione della risposta alla terapia, l'identificazione dei pazienti non responsivi e l'individuazione di nuovi bersagli terapeutici. La metabolomica potrebbe anche aiutare a comprendere le complesse interazioni gene-ambiente coinvolte nell'insorgenza e nella progressione dei disturbi respiratori. A questo proposito, un punto interessante potrebbe essere lo studio dell'esposoma (l'insieme di sostanze xenobiotiche che un individuo ha accumulato nella sua vita) e dei suoi effetti sulle malattie respiratorie.

Affinché gli studi di metabolomica basati sulla NMR abbiano un impatto maggiore nella medicina respiratoria, questi studi dovrebbero diventare parte di una strategia investigativa che coinvolga diversi paesi e laboratori. Ciò aiuterebbe a risolvere problemi come la standardizzazione del campionamento, la presenza di elementi quali comorbidità, fattori demografici, differenze di genere, dieta, ecc., e, infine, il contributo del microbiota e delle sue alterazioni ai disturbi respiratori.

Bibliografia

- 1 Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, et al.; Standard Metabolic Reporting Structures working group. Summary recommendations for standardization and reporting of metabolic analyses. *Nature Biotech* 2005;23:833-838. <https://doi.org/10.1038/nbt0705-833>
- 2 Fan TW. Metabolite profiling by one- and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 1996;8:161-219. [https://doi.org/10.1016/0079-6565\(95\)01017-3](https://doi.org/10.1016/0079-6565(95)01017-3)
- 3 Saude EJ, Skappak CD, Regush S, et al. Metabolomic profiling of asthma: diagnostic utility of urine nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:757-764. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.12.1077>
- 4 de Laurentiis G, Paris D, Melck D, et al. Metabonomic analysis of exhaled breath condensate in adults by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Eur Respir J* 2008;32:1175-1183. <https://doi.org/10.1183/09031936.00072408>

- 5 Montuschi P, Paris D, Melck D, et al. NMR spectroscopy metabolomic profiling of exhaled breath condensate in patients with stable and unstable cystic fibrosis. *Thorax* 2012;67:222-228. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2011-200072>
- 6 Montuschi P, Paris D, Montella S, et al. Nuclear magnetic resonance-based metabolomics discriminates primary ciliary dyskinesia from cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;190:229-233. <https://doi.org/10.1164/rccm.201402-0249LE>
- 7 Deja S, Porebska I, Kowal A, et al. Metabolomics provide new insights on lung cancer staging and discrimination from chronic obstructive pulmonary disease. *J Pharm Biomed Anal* 2014;100:369-380. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.08.020>
- 8 Ząbek A, Stanimirova I, Deja S, et al. Fusion of the ¹H NMR data of serum, urine and exhaled breath condensate in order to discriminate chronic obstructive pulmonary disease and obstructive sleep apnea syndrome. *Metabolomics* 2015;11:1563-1574. <https://doi.org/10.1007/s11306-015-0808-5>
- 9 Maniscalco M, Motta A. Clinical and inflammatory phenotyping: can electronic nose and NMR-based metabolomics work at the bedside? *Arch Med Res* 2018;49:74-76. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2018.04.001>
- 10 Maniscalco M, Paris D, Melck DJ, et al. Differential diagnosis between newly diagnosed asthma and COPD using exhaled breath condensate metabolomics: a pilot study. *Eur Respir J* 2018;51:1701825. <https://doi.org/10.1183/13993003.01825-2017>
- 11 Maniscalco M, Paris D, Melck DJ, et al. Coexistence of obesity and asthma determines a distinct respiratory metabolic phenotype. *J Allergy Clin Immunol* 2017;139:1536-1547. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.08.038>
- 12 de Laurentiis G, Paris D, Melck D, et al. Separating smoking-related diseases using NMR-based metabolomics of exhaled breath condensate. *J Proteome Res* 2013;12:1502-1511. <https://doi.org/10.1021/pr301171p>
- 13 Zhou XM, He CC, Liu YM, et al. Metabonomic classification and detection of small molecule biomarkers of malignant pleural effusions. *Anal Bioanal Chem* 2012;404:3123-3133. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6432-6>
- 14 Antcliffe D, Jiménez B, Veselkov K, et al. Metabolic profiling in patients with pneumonia on intensive care. *EBioMedicine* 2017;18:244-253.
- 15 Ciaramelli C, Fumagalli M, Viglio S, et al. ¹H NMR to evaluate the metabolome of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in bronchiolitis obliterans syndrome (BOS): toward the development of a new approach for biomarker identification. *J Proteome Res* 2017;16:1669-1682. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b01038>
- 16 Surowiec I, Karimpour M, Gouveia-Figueira S, et al. Multi-platform metabolomics assays for human lung lavage fluids in an air pollution exposure study. *Anal Bioanal Chem* 2016;408:4751-4764. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9566-0>
- 17 Maniscalco M, Paris D, Melck D, et al. Biomonitoring of workers using nuclear magnetic resonance-based metabolomics of exhaled breath condensate: a pilot study. *Toxicol Lett* 2018;298:4-12. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.10.018>