

AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU

Michał J. Markuszewski

**METABOLOMIKA:
ANALIZY METABOLOMICZNE W OPARCIU
O ELEKTROFOREZĘ KAPILARNĄ**

Rozprawa habilitacyjna

Akademia Medyczna w Gdańsku
Wydział Farmaceutyczny
Katedra i Zakład Biofarmacji i Farmakodynamiki

Gdańsk 2006

**Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw Akademii Medycznej w Gdańsku**

© Copyright by Medical University of Gdańsk

**Wydawca: *Akademia Medyczna w Gdańsku*
Druk: *Dział Wydawnictw AMG*
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a,
*Zlecenie KW/379/06***

SPIS TREŚCI

WYKAZ PUBLIKACJI BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY HABILITACYJNEJ	5
1. WSTĘP.....	7
2. METABOLOMIKA W BIOLOGII SYSTEMOWEJ.....	8
2.1. Narzędzia badawcze w metabolomice	9
2.2. Strategie analityczne w badaniach metabolomicznych.....	12
3. ANALIZA METABOLOMICZNA W OPARCIU O ELEKTROFOREZĘ KAPILARNĄ.....	14
3.1. Oznaczanie „odcisku palca” metabolicznego (<i>Metabolic fingerprinting</i>) jako weryfikacja założonej koncepcji badań	14
3.2. Celowana analiza metabolomiczna (<i>Metabolite target analysis</i>) z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej i laserowo wzbudzonej detekcji fluorescencyjnej w próbkach biologicznych.....	16
3.3. Analiza profili metabolicznych ekstraktów bakterii <i>Bacillus subtilis</i> za pomocą elektroforezy kapilarnej (<i>Metabolic profiling analysis</i>).....	17
4. WNIOSKI	25
5. PIŚMIENNICTWO	26

WYKAZ PUBLIKACJI BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY HABILITACYJNEJ

1. Terabe S., Markuszewski M.J., Inoue N., Otsuka K., Nishioka T.: Capillary electrophoretic techniques toward the metabolome analysis, *Pure and Applied Chemistry* **73**, 1563-1572 (2001).
2. Markuszewski M.J., Britz-McKibbin P., Terabe S., Matsuda K., Nishioka T.: Determination of pyridine and adenine nucleotide metabolites in *Bacillus subtilis* cell extract by sweeping borate complexation capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A* **989**, 293-301 (2003).
3. Markuszewski M.J., Otsuka K., Terabe S., Matsuda K., Nishioka T.: Analysis of carboxylic acid metabolites from the tricarboxylic acid cycle in *Bacillus subtilis* cell extract by capillary electrophoresis using an indirect photometric detection method, *Journal of Chromatography A* **1010**, 113-121 (2003).
4. Britz-McKibbin P., Markuszewski M.J., Iyanagi T., Matsuda K., Nishioka T., Terabe S.: Picomolar analysis of flavins in biological samples by dynamic pH junction-sweeping capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, *Analytical Biochemistry* **313**, 89-96 (2003).
5. Markuszewski M.J., Szczykowska M., Siluk D., Kaliszan R.: Human red blood cells targeted metabolome analysis of glycolysis cycle metabolites by capillary electrophoresis using an indirect photometric detection method, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **39**, 636-642 (2005).
6. Markuszewski M.J., Szymańska E., Kaliszan R.: „Metabonomika i metabolomika”; w pracy „Miniaturyzacja w analityce” pod redakcją Z. Brzózki; Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2005, str. 219-235.
7. Szymańska E., Markuszewski M.J., Capron X., van Nederkassel A.-M., Vander Heyden Y., Markuszewski M., Krajka K., Kaliszan R.: Increasing conclusiveness of metabonomic studies by cheminformatic preprocessing of capillary electrophoretic data on urinary nucleoside profiles, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2006).
doi:10.1016/j.jpba.2006.08.015.

1. WSTĘP

Wraz z dynamicznym rozwojem cywilizacji, populacja ludzka doświadcza nowych, często trudnych wyzwań w medycynie. Do tych pojawiających się wyzwań należą odkrywane nowe czynniki chorobotwórcze, zjawiska wykształcania się leko- a szczególnie antybiotykooporności, czy insulinooporności oraz ciągle wysokie poziomy zachorowalności i umieralności na choroby nowotworowe. Dla lepszego zrozumienia procesów chorobowych wprowadzono zaawansowane platformy analityczne, jak genomika, transkryptomika, proteomika czy metabolomika, dostarczające nowych danych fizjologicznych, uzupełniających informację uzyskiwaną przez współczesną genomikę. Oczekuje się, że odpowiednie zastosowanie wiedzy pochodzącej z genomu wraz z nową informacją uzyskaną w wyniku badań proteomicznych i metabolomicznych nad fizjologią i metabolizmem zaowocuje wyraźną poprawą jakości zdrowia w całej populacji ludzkiej dzięki zindywidualizowanej osobniczo opiece zdrowotnej [1].

Odczytanie pełnej sekwencji kodu genetycznego zainicjowało dalsze badania nad genami, nad transkrypcją genów oraz białkami w żywych organizmach. mRNA i białka są bezpośrednio związane z genami, które kodują ich sekwencję. Transkryptomika i proteomika potwierdzają istnienie tych zależności. Badania nad genomem, transkryptomem i proteomem w naturalny sposób zwróciły zainteresowania badaczy na metabolity i ich współzależności z genami, mRNA i białkami.

Analiza genomu jest trudna do powiązania z analizą metabolitów. Metabolity są produktami reakcji enzymatycznych zachodzących w sieci szlaków metabolicznych. Podczas gdy mRNA i białka są bezpośrednimi produktami genów, metabolity należą do produktów pośrednich kodu genetycznego. Jest to jeden z powodów, który sprawia, że metabolomika jest trudniejsza do analizy i interpretacji biologicznej niż inne „-omiki”.

Dotychczas metabolizm definiowano jako szereg wewnątrzkomórkowych reakcji chemicznych, w wyniku których dochodziło do powstawania nowych związków chemicznych (metabolitów) oraz energii koniecznej do zapewnienia funkcjonowania organizmu. Dynamiczny rozwój genetyki i przejście w tzw. post-genomową fazę badań uświadomiło badaczom, że poza sferą reaktywności chemicznej kluczową rolę odgrywa także informacja zawarta w kodzie genetycznym. Na nowo zdefiniowane pojęcie określa metabolizm jako układ, w którym związki chemiczne (metabolity) i informacja zawarta w kodzie genetycznym oddziałują ze sobą za pomocą sieci reakcji chemicznych.

Transkryptomika i proteomika prowadzą do powstania olbrzymich ilości zróżnicowanych danych biologicznych. Także zastosowanie bioinformatyki do analizy danych eksperymentalnych prowadzi do powstania nowych informacji powiązanych z genami i białkami. Często poważnym problemem badawczym jest znalezienie biochemicznego wytłumaczenia dla biologicznie zdefiniowanych zależności. Za zidentyfikowaniem oddziaływania białko-białko konieczne jest określenie mechanizmu molekularnego oddziaływania oraz opisanie efektu biologicznego tego oddziaływania [2].

Wydaje się, że zaangażowanie metabolomiki pomoże w interpretacji danych biologicznych pochodzących z transkryptomiki i proteomiki.

2. METABOLOMIKA W BIOLOGII SYSTEMOWEJ

W metabolizmie organizmów żywych podstawową rolę odgrywają metabolity, czyli związki organiczne o małej masie cząsteczkowej, jak węglowodany, kwasy organiczne, aminokwasy, nukleozydy, nukleotydy itd. Wraz z makrocząsteczkami, takimi jak białka i kwasy nukleinowe, metabolity odgrywają różnorodne funkcje w zachodzących procesach życiowych.

Kompleksowa analiza ilościowa i jakościowa metabolomu jest kluczowa dla pełnego zrozumienia funkcji komórkowych. Metabolom, przez analogię do genomu, transkryptomu czy proteomu, odnosi się do całkowitej liczby metabolitów w organizmie, narządzie lub określonej komórce. Liczba metabolitów (wielkość metabolomu) jest zróżnicowana i zależy od gatunku i rodzaju organizmu. We wszystkich gatunkach roślin wielkość metabolomu szacowana jest na 90 - 200 tysięcy związków. Pojedyncze gatunki roślin charakteryzują się dużo mniejszą liczbą metabolitów. Przykładowo, metabolom rzodkiewnika (*Arabidopsis*) szacuje się na około 5000 związków organicznych. Metabolom organizmów roślinnych jest jednak dużo bogatszy niż organizmów jednokomórkowych w rodzaju drożdży. Na liczbę 6000 genów zidentyfikowanych w drożdżach przypada tylko niecałe 600 metabolitów, podczas gdy u rzodkiewnika stosunek ten wynosi 15000 do 5000. Duża wielkość metabolomu roślinnego wynika z licznych wtórnych metabolitów. Szacuje się, że całkowity metabolom człowieka może zawierać ok. 10000 metabolitów.

Dla głębszego poznania molekuł i zależności rządzących na poziomie komórkowym wykorzystywanych jest obecnie kilka technologii badawczych. Należą do nich genomika i transkryptomika, których zadaniem jest badanie komplementarności kodu genetycznego oraz ekspresji genu. Proteomika zajmuje się kompleksową analizą białek oraz ich syntezą. Metabolomika i metabonomika opisują procesy metaboliczne na poziomie pojedynczej komórki oraz całego organizmu. Metabolomika i metabonomika w sposób całościowy określają profile biochemiczne oraz funkcję zespołów metabolitów w całym organizmie przez analizę składu pojedynczych komórek, płynów biologicznych czy organów [3].

Definicje metabonomiki i metabolomiki nie są w literaturze jednakowo opisywane. Systematyzując pojęcia: metabonomika zajmuje się ustalaniem profili metabolicznych na poziomie całego organizmu analizując płyny ustrojowe, takie jak krew, mocz lub płyn mózgoworodzeniowy. W odróżnieniu od metabonomiki, metabolomika jest jednoczesną ilościową i jakościową analizą możliwie jak największej liczby metabolitów komórkowych.

Pojęcia metabolomu, czy metabolomiki jako kompleksowej analizy metabolitów są stosunkowo nowymi terminami analitycznymi. Dzieje się tak, ponieważ wraz z pojawieniem się zaawansowanych technologicznie metod badawczych oraz przy wykorzystaniu komputerowych metod przetwarzania danych możliwe jest oznaczanie dużej liczby metabolitów w stosunkowo krótkim czasie, na odpowiednio wysokim, powtarzalnym i wydajnym poziomie. Dotychczasowe badania ograniczały się głównie do oznaczania pojedynczych, uprzednio zidentyfikowanych związków czy grup metabolitów. Postęp w bioanalizie umożliwił wykorzystanie zaawansowanych technologii, takich jak NMR czy MS, a to z kolei wymusiło opracowanie odpowiednich narzędzi matematycznych do przetwarzania otrzymywanych w wyniku badań ogromnych ilości danych. Tak więc, chociaż badania metabolizmu komórkowego czy oznaczenia ilościowe procesów metabolicznych nie są czymś nowym w nauce, to paradoksalnie dopiero u schyłku XX wieku, możliwa stała się kompleksowa analiza praktycznie wszystkich metabolitów występujących w płynach komórkowych.

2.1. Narzędzia badawcze w metabolomice

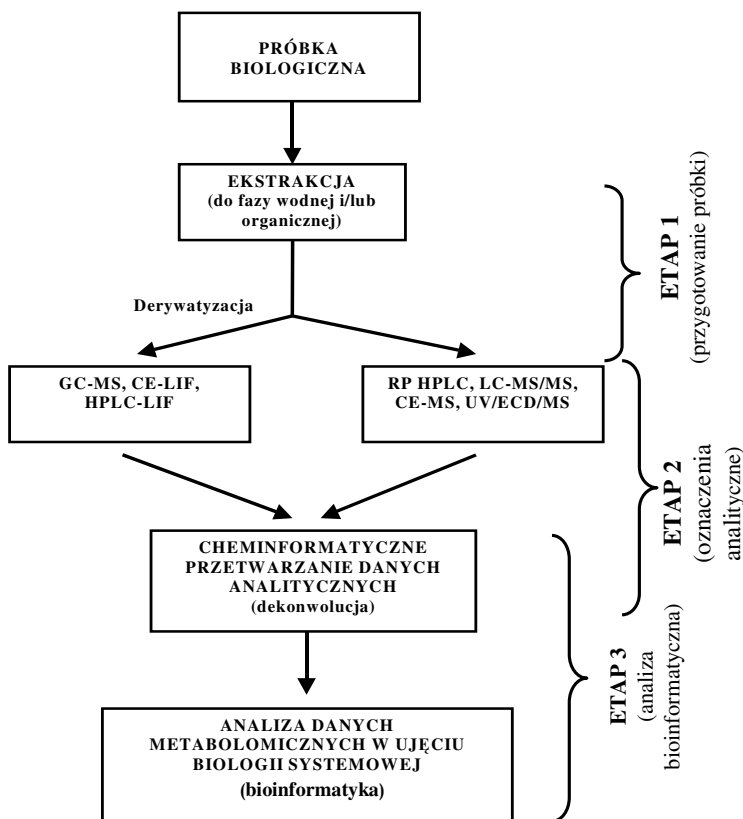
Pierwszym wymaganiem stawianym przez metabolomikę technikom analitycznym jest ich jak największa wszechstronność w badaniach metabolomicznych. Wszechstronność rozumiana przede wszystkim jako szerokie spektrum metabolitów dających się oznaczyć przy pomocy określonej techniki. Ze względu na bardzo duże zróżnicowanie w budowie chemicznej istniejących metabolitów, wydaje się oczywistym, że nie ma aktualnie jednej techniki, która umożliwiłaby oznaczanie wszystkich związków jednocześnie w trakcie pojedynczej analizy. Dodatkowo, duża część metabolitów ma charakter polarny, jest nietłoczna, nie posiada silnych grup chromoforowych w swojej strukturze, co utrudnia ich wykrywanie. To, co udaje się oznaczać za pomocą jednej techniki analitycznej jest zwykle ograniczone do określonej pod względem budowy lub właściwości grupy metabolitów. Z powodu braku jednej uniwersalnej dla wszystkich związków techniki oznaczania, w badaniach metabolicznych dąży się do zastosowania możliwie jak najszerszego zakresu istniejących technik i metod analitycznych, aby osiągnąć możliwie jak największą kompletność wyników.

Metodologia badań metabolomicznych składa się z trzech zasadniczych etapów: przygotowania próbki, oznaczeń analitycznych i bioinformatycznej analizy otrzymanych danych (rycina 1).

W praktyce jedynie w przypadku badań metabolomicznych z zastosowaniem techniki jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) nie jest konieczny zaawansowany etap przygotowania próbki. Technika NMR, jako mało destrukcyjna, pozwala na ponowne użycie tej samej badanej próbki do kolejnych oznaczeń. Jest to wyjątek wśród technik analitycznych, ponieważ zwykle w wyniku przeprowadzonej analizy próbka ulega nieodwracalnym zmianom i nie nadaje się do ponownych oznaczeń.

Metabolity są najczęściej ekstrahowane do roztworów wodnych lub metanolowych. Z tych roztworów są wyodrębniane i analizowane poszczególne frakcje polarne oraz lipofilowe. Nie ma jednej metody ekstrakcji, która byłaby odpowiednia dla wszystkich rodzajów metabolitów. Warunki, które są adekwatne dla jednych metabolitów mogą powodować degradację innych typów metabolitów lub zaburzać ich oznaczanie analityczne. Przykładowo, nukleotydy (np. ATP) ekstrahuje się przy pomocy bardzo mocnego kwasu nadchlorowego. Kwas ten jako silny utleniacz, powoduje utlenianie innych metabolitów. Alkaloidy są ekstrahowane w środowisku zasadowym, które jest niszczące dla związków aldehydowych. Związki tiolowe, jako bardzo niestabilne, wymagają użycia odczynników derywatyzujących, które przekształcają je do stabilnych pochodnych, ale jednocześnie uniemożliwiają analizę innych metabolitów.

Metody i rodzaje ekstrakcji muszą być ukierunkowane na konkretną grupę metabolitów. W dotychczasowych badaniach metabolomicznych koncentrowano się więc głównie na związkach o odpowiedniej trwałości, które mogły być ekstrahowane razem (węglowodany, estry fosforanowe, aminokwasy czy kwasy organiczne). Najbardziej kompletne analizy metabolomiczne wymieniane w literaturze charakteryzowały do 300 różnych związków. Oczywiście, wiele innych istotnych metabolitów jest w tej sytuacji pomijanych.



Rycina 1. Schemat przykładowej pełnej analizy matabolomicznej.

W badaniach metabolomicznych, ze względu na konieczność jednoczesnego oznaczania dużej liczby metabolitów, aktualnie najchętniej wykorzystywaną techniką analityczną jest spektrometria mas (MS). Jednocześnie stosuje się poprzedzające MS techniki separacyjne, które mają na celu rozdzielić metabolity o jednakowej masie cząsteczkowej. Wykorzystanie niezwykle wszechstronnej metod detekcji, jaką jest MS, umożliwia jednoczesną analizę związków na podstawie ich oddziaływań z układem separacyjnym jak również na podstawie mas cząsteczkowych analitów.

Chromatografia gazowa sprzężona z spektrometrią mas (GC-MS) wymaga derywatywacji próbki w celu zwiększenia trwałości i lotności metabolitów. Następnie, rozdzielone chromatograficznie frakcje zderywatywowanej próbki są wprowadzane na spektrometr mas, gdzie ulegają jonizacji i są oznaczane z wysoką rozdzielczością na podstawie stosunku ich masy do ładunku (m/z). Stosując technikę GC-MS Fiehn i wsp. [4] byli w stanie oznaczyć 326 różnych metabolitów w ekstraktach roślinnych jeżówki. Tylko połowę z oznaczonych metabolitów udało się zidentyfikować. Identyfikacja pozostałych byłaby teoretycznie możliwa po zastosowaniu techniki MS/MS lub NMR. Zastosowanie dwuwymiarowej (2D) chromatografii gazowej (GC/GC) w połączeniu z MS jest pomocne do separacji analitów oryginalnie nierozdzielonych w GC-MS. Dwuwymiarowa GC/GC łączy kolumny chromatograficzne o różnej polarności i analizy przy różnych temperaturach tak, aby maksymalnie zróżnicować retencję nierozdzielonych wcześniej metabolitów [5].

Inną techniką wstępnej separacji składników próbki jest wysokosprawna chromatografia cieczkowa sprzężona z spektrometrią mas (LC-MS). W odróżnieniu od GC-MS, w technice LC-MS próbki na ogół nie podlegają derywatywacji przed analizą. Rozdzielanie metabolitów

na poszczególne frakcje ma miejsce na kolumnie chromatograficznej. Technika LC-MS jest chętniej stosowana od GC-MS, ponieważ jest bardziej odpowiednia dla związków nietrwałych, trudnych do derywatyzowania lub nielotnych [6, 7].

Bardzo zbliżoną techniką analityczną jest elektroforeza kapilarna sprzężona z spektrometrią mas (CE-MS). CE jest stosunkowo nową techniką separacyjną, co raz bardziej powszechną w bioanalizie. Do zalet CE należy proste i łatwe w obsłudze instrumentarium, wysoka sprawność analityczna umożliwiająca osiągnięcie liczby pól teoretycznych od 100000 do 1000000 w krótkim czasie, bardzo małe objętości analizowanych próbek (w zakresie nL), szeroka aplikacyjność od związków małocząsteczkowych po biopolimery oraz niskie koszty analizy związane z bardzo małym zużyciem drogich odczynników chemicznych. Najpoważniejszą wadą elektroforezy kapilarnej jest czułość detekcji, która w przeliczeniu na stężenie molowe (*concentration sensitivity*) jest stosunkowo niska, podczas gdy czułość detekcji w przeliczeniu na masę (*mass sensitivity*) jest bardzo wysoka. Nieznacznie gorsza w porównaniu do HPLC, głównie za sprawą mało stabilnego przepływu elektroosmotycznego, jest również powtarzalność parametrów migracji [8, 9].

Znacznie większą czułość analizy zyskuje się korzystając z laserowo wzbudzonej detekcji fluorescencyjnej (LIF), chociaż ta metoda jest ograniczona tylko do tych związków, które wykazują fluorescencję, bądź które dają się w tym kierunku modyfikować (derywatyzować).

Spektroskopia fourierowska w podczerwieni (FTIR) polega na pomiarze absorbowanego światła z zakresu podczerwieni, przechodzącego przez badaną próbkę. Na podstawie uzyskanych widm identyfikowane są poszczególne grupy funkcyjne i struktury. W badaniach profili metabolicznych FTIR jest stosowana w odniesieniu do złożonych mieszanin. Identyfikacja pojedynczych związków jest zwykle niemożliwa. FTIR jest jednak traktowana jako wstępny krok do oceny różnic pomiędzy poszczególnymi ekstraktami. Pozwala to określić, jakie kolejne metody będą lepiej służyć do identyfikacji metabolitów. Analizowana techniką spektroskopii w podczerwieni próbka biologiczna nie ulega zniszczeniu i może być wykorzystywana w kolejnych badaniach [10, 11].

Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) jest techniką wykorzystującą promieniowanie elektromagnetyczne oraz działanie pola magnetycznego o stałym natężeniu do określania budowy strukturalnej związków organicznych. Spektroskopia NMR może być stosowana do oznaczania dużej liczby zróżnicowanych chemicznie mało-cząsteczkowych metabolitów komórkowych oraz do ich strukturalnej identyfikacji. NMR jest mniej czułą techniką niż spektrometria mas, w związku z czym nie może być wykorzystywana do oznaczania śladowych ilości związków. Jednak analizowana próbka nie ulega zniszczeniu, co umożliwia ponowne jej badanie przy zastosowaniu innych technik. Najczęściej wykorzystywana analiza ^1H -NMR opiera się na absorpcji fal elektromagnetycznych o częstotliwości radiowej przez jądra protonu (^1H) pod wpływem stałego pola magnetycznego. Otrzymywane informacje wyświetlane są w postaci widma, któremu w analizie metabolicznej jest przypisywana określona struktura analitu, bądź też widmo traktowane jest jako swoisty odcisk palca („*fingerprint*”) próbki [12, 13].

Trzecim kluczowym etapem badań metabolomicznych jest bioinformatyczne przetwarzanie danych.

Wyzwaniem dla współczesnej bioanalitiky jest ogromna ilość danych uzyskiwanych w wyniku rutynowych pomiarów analitycznych [14]. Dla efektywnej analizy metabolomicznej zwykle konieczne jest zastosowanie metod bioinformatycznych w trzech obszarach: dla przetwarzania (*preprocessing*) uzyskanych „wejściowych” danych analitycznych w celu umożliwienia ich bezpośredniego porównania, do poszukiwania, ekstrahowania i wizualizacji

zależności ukrytych w macierzy danych metabolomicznych oraz do wydajnego przechowywania danych w specjalnych skonstruowanych bazach danych [15].

Do wstępnego przetwarzania uzyskanych danych analitycznych, polegającego na korekcji linii bazowej, eliminacji „szumów” i wyrównywania zmierzonego sygnału, stosowane są różne zaawansowane narzędzia bioinformatyczne, takie jak *correlation optimized warping* (COW), *dynamic time warping* (DTW), algorytmy Savitzky-Golaya (SG) itp. [16].

Faza bioinformatyczna polega także na przetwarzaniu uzyskanych danych analitycznych i klinicznych z użyciem procedur chemometrycznych tak, aby wyekstrahować z macierzy danych biologicznie interpretowalną informację. Takie metody statystyczne, jak analiza głównych składników (PCA), umożliwiają redukcję dużych macierzy danych do 2-3 abstrakcyjnych parametrów kondensujących istotne informacje. W ten sposób zmiany w profilach metabolomicznych, opisywanych przez wiele zmiennych spektralnych, mogą być wymiennie określone. Następnie, stosując do zredukowanej macierzy danych inne procedury obliczeniowe, takie jak analiza różnicująca (DFA) lub analiza klasterowa (CA), zostają pogrupowane i zidentyfikowane poszczególne obiekty badań metabolomicznych. Do innych stosowanych metod obliczeniowych należą *partial least squares* (PLS) lub analiza SIMCA [17]. Popularne w bioanalizie są obecnie tzw. sztuczne sieci neuronalne (ANN). W metabolomice ANN są wykorzystywane do analizy profili metabolomicznych pod kątem ich zależności od warunków środowiska [18].

Ważnym aspektem bioinformatycznego analizowania danych metabolomicznych jest odpowiednia wizualizacja uzyskanych wyników. Tylko po zastosowaniu efektywnych narzędzi bioinformatycznych do wizualizacji danych możliwe jest maksymalne uproszczenie wszechstronnej analizy porównawczej wielowymiarowych baz danych [19, 20].

Budowanie referencyjnych baz danych związków chemicznych jest bardzo ważne dla prawidłowej identyfikacji metabolitów komórkowych. Wiele zespołów badawczych pracuje aktualnie nad stworzeniem otwartej bazy metabolitów pochodzenia roślinnego czy zwierzęcego [21-23].

2.2. Strategie analityczne w badaniach metabolomicznych

W badaniach nad metabolitami, poza metabonomiką i metabolomiką, wyraźnie wyodrębnione są jeszcze trzy inne strategie badawcze [24].

Celowana analiza metaboliczna (*Metabolite target analysis*) – stosowana w badaniach efektów wywołanych przez zmianę konkretnych czynników, np. mutację genową. Określony metabolit, będący substratem lub produktem reakcji kontrolowanej przez zmieniony na skutek mutacji enzym, można oznaczać ilościowo wnioskując na temat wpływu tej mutacji na metabolizm. Przy badaniu pojedynczego metabolitu można w trakcie przygotowywania próbki (ekstrakcji) usunąć inne, współistniejące metabolity, interferujące w trakcie oznaczeń ilościowych. Odpowiednie przygotowanie próbki pozwala na zwiększoną czułość analiz przez wyeliminowanie tzw. szumu, pochodzącego od substancji balastowych. Strategię taką wykorzystuje się głównie dla celów badań przesiewowych oraz do oznaczania metabolitów występujących w bardzo małych stężeniach (fitohormony).

Badanie profili metabolomicznych (*Metabolite profiling*) polega na badaniu zmian zachodzących w konkretnych cyklach metabolomicznych. W trakcie analizy można skupić się wyłącznie na określonej grupie metabolitów bez potrzeby monitorowania innych związków. Najczęściej, badane są w ten sposób związki podobne do siebie właściwościami chemicznymi (aminokwasy,

węglowodany) albo metabolity pochodzące z określonego cyklu biochemicznego (cykl Krebsa, glikoliza). Etapy przygotowania próbki oraz analizy jakościowej i ilościowej skoncentrowane są na badanych metabolitach, aby w możliwie jak największym stopniu zredukować wpływ matrycy próbki. W badaniach klinicznych często wykorzystuje się termin „oznaczanie profili metabolicznych” dla określenia profilu metabolicznego leku w ustroju.

Oznaczanie „odcisku palca” metabolitów (*Metabolic fingerprinting*) ma szerokie zastosowanie w genomice funkcjonalnej i w diagnostyce klinicznej. Nie zawsze konieczne jest oznaczanie ilościowe stężeń wszystkich metabolitów obecnych w próbce. Często wystarcza szybka analiza pozwalająca na porównanie jakościowe różnych próbek. W wyniku analizy porównawczej otrzymywana jest klasyfikacja zgodna z pochodzeniem próbki lub biologiczną zawartością. Pewnym ograniczeniem w oznaczaniu „odcisku palca” metabolitów jest trudna do uzyskania powtarzalność matrycy próbki biologicznej oraz metody analitycznej. Niska powtarzalność może stanowić problem przy poprawnej klasyfikacji próbek i interpretacji uzyskanych wyników [24].

3. ANALIZA METABOLOMICZNA W OPARCIU O ELEKTROFOREZĘ KAPILARNĄ

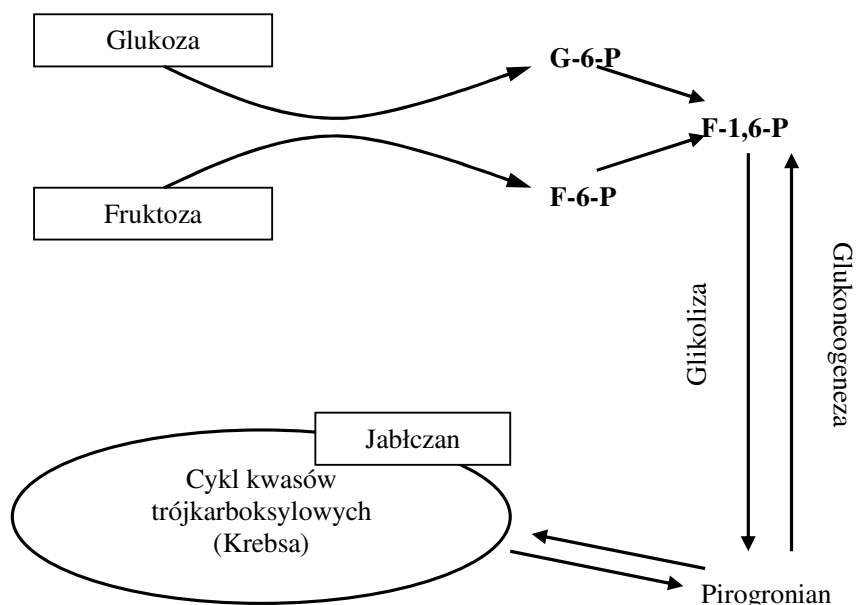
Założona w projekcie habilitacji koncepcja badań metabolomicznych polegała na zweryfikowaniu hipotezy o wpływie czynników zewnętrznych (środowiskowych) na wielkość i rodzaj metabolomu organizmów. Następnie, przy pomocy badań elektroforetycznych, zamierzano wykazać przydatność oznaczeń metabolomicznych do śledzenia zmian w profilach metabolicznych wywołanych warunkami zewnętrznymi, jak rodzaj kultury bakteryjnej, czy stan patofizjologiczny chorego.

Celem prowadzonych badań jest wykazanie zależności pomiędzy profilami metabolomicznymi oznaczanymi w płynach biologicznych człowieka, a rozwojem i zaawansowaniem chorób nowotworowych. Realizacja projektu mogłaby zaowocować opracowaniem dogodnej procedury diagnostycznej.

3.1. Oznaczanie „odcisku palca” metabolicznego (*Metabolic fingerprinting*) jako weryfikacja założonej koncepcji badań [8]

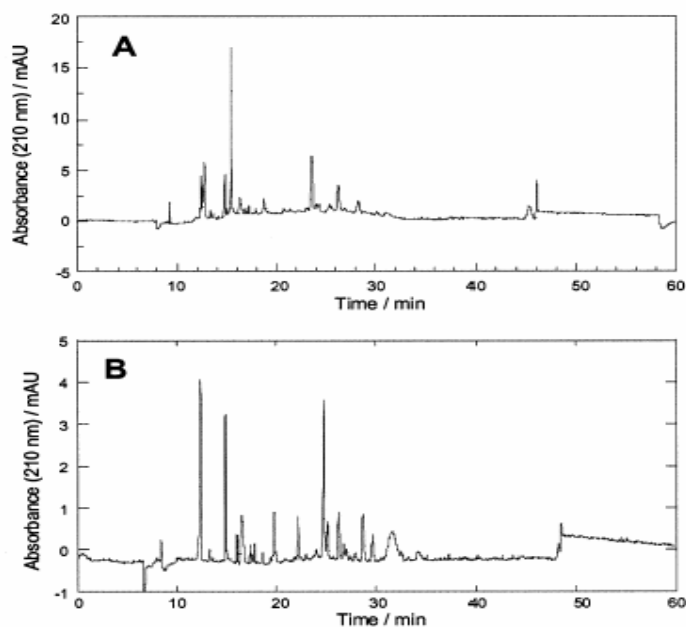
W celu zweryfikowania założonej na wstępie hipotezy należało w pierwszej kolejności wykazać istnienie wpływu czynników egzogennych (np. środowiskowych) na profile metaboliczne na przykładzie organizmów modelowych takich, jak bakterie z gatunku *Bacillus subtilis*. Przy zastosowaniu elektroforezy kapilarnej zebrano i porównano metaboliczny „odcisk palca” ekstraktów komórkowych z dwóch kultur bakteryjnych. Bakterie hodowano na podłożach, w których podstawową różnicą były związki organiczne stanowiące źródło węgla dla mikroorganizmów (rycina 2).

Wykazano, że spośród różnych związków organicznych obecnych w podłożu hodowli komórkowej, bakterie wykazują preferencje w katabolizmie pewnych związków przed innymi. Dochodzić wówczas może do zahamowania aktywności enzymów odpowiedzialnych za katabolizm mniej preferowanych związków organicznych. Zjawisko to nosi nazwę „hamowania katabolitu” („*catabolite repression*”). Bardzo często związkiem preferowanym przez bakterie wywołujący „hamowanie katabolitu” jest glukoza [25]. Mikroorganizmy rozwijając się na różnych podłożach organicznych mają zróżnicowane poziomy metabolitów wewnątrzkomórkowych. Zaproponowany przez Fujitę i wsp. [26] mechanizm „hamowania katabolitu” u bakterii *Bacillus subtilis* jest następujący: glukoza będąca w hodowli źródłem węgla przez swój metabolit fruktozo-1,6-bisfosforan (F-1,6-P) aktywuje kinazę HPr do fosforylacji białka HPr, które w postaci ufosforylowanej tworzy kompleks z czynnikiem transkrypcyjnym CcpA wiążący się z elementem *cre* tłumiąc w ten sposób ekspresję genów regulujących funkcję enzymów koniecznych do metabolizmu innych związków organicznych, stanowiących źródło węgla dla komórek.



Rycina 2. Drogi przemian biochemicznych związków organicznych stanowiących źródło węgla w hodowli bakteryjnej bakterii *Bacillus subtilis*. Atomy węgla ze środowiska kultury bakteryjnej dostają się do komórek jako glukozo-6-fosforan (G-6-P), fruktozo-6-fosforan (F-6-P) lub jako jabłczan.

W badaniach postanowiono zmierzyć profile metaboliczne pochodzące z ekstraktów komórkowych bakterii *Bacillus subtilis* hodowanych na dwóch różnych podłożach zawierających glukozę i jabłczan jako źródło węgla. Przy zastosowaniu 200 mM roztworu buforu boranowego o pH 9,3 przy długości fali 210 nm zebrano „metaboliczne odciski palca” dla ekstraktów z obu hodowli bakteryjnych (rycina 3).



Rycina 3. Elektroferogramy ekstraktów z hodowli komórek *Bacillus subtilis* na podłożu zawierającym S6-glukozę (A) i S6-jabłczan (B) [8].

Oznaczone „odciski palca” porównano ze sobą wykazując wyraźne różnice w jakości i ilości metabolitów pochodzących z komórek bakteryjnych rosnących w różnych hodowlach. Potwierdziło to stawianą na wstępie hipotezę o wpływie związku organicznego będącego źródłem węgla na metabolizm komórkowy a jednocześnie przydatność elektroforezy kapilarnej jako techniki analitycznej w badaniach metabolomicznych.

3.2. Celowana analiza metabolomiczna (*Metabolite target analysis*) z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej i laserowo wzbudzonej detekcji fluorescencyjnej w próbkach biologicznych [27]

Celowana analiza metabolomiczna wymaga wysoce czułych metod elektroforetycznych umożliwiających selektywne oznaczenia metabolitów na odpowiednio niskich poziomach stężeń. Ponieważ detekcję w CE charakteryzuje krótka droga optyczna i mała objętość wprowadzanej do kapilary próbki, to w celu zwiększenia czułości przeprowadzanych analiz, stosowane są metody zateżania składników próbki *on-line* w kapilarze krzemionkowej, np. *dynamic pH junction-sweeping* lub też *sweeping-borate complexation* [28]. Inną możliwością zwiększenia czułości metody elektroforetycznej jest zastosowanie detektora z laserowo wzbudzaną fluorescencją (LIF). Pewną niedogodnością przy stosowaniu detektora LIF jest fakt, że tylko nieliczne z metabolitów posiadają naturalną zdolność do fluorescencji. Do metabolitów posiadających naturalną zdolność do fluorescencji należą związki flawinowe.

Elektroforezę kapilarną wraz z techniką zateżania próbki *dynamic pH junction-sweeping* oraz detekcją LIF zastosowano jako metodę oznaczania śladowych ilości ryboflawiny (RF), nukleotydu flawinowego (FMN) oraz dinukleotydu flawinoadeninowego (FAD) w ekstraktach komórkowych i w płynach biologicznych. W technice *dynamic pH junction-sweeping* nastrzykiwano duże objętości analizowanej próbki bezpośrednio do kapilary wypełniając ok. 15% jej długości (8,2 cm). Uzyskane granice wykrywalności (LOD) przy zastosowaniu CE-LIF oraz techniki zateżania próbki wewnątrz kapilary *dynamic pH junction-sweeping* wynosiły dla nukleotydu FAD i FMN 4,0 pM (S/N = 3). Jest to ponad sześćdziesięciokrotny wzrost czułości w porównaniu do konwencjonalnych metod nastrzyku próbki. Opracowana metoda została zwalidowana pod kątem powtarzalności, czułości, liniowości i selektywności.

Stosując metodę zateżania próbki zmierzono submikromolowe ilości pochodnych flawinowych w ekstraktach komórkowych bakterii *Bacillus subtilis*. Stwierdzono istotne różnice stężeń związków flawinowych w ekstraktach komórkowych pochodzących z kultur bakteryjnych hodowanych na glukozie lub jabłczanie jako źródle węgla. Wykazano w ten sposób wyraźny wpływ środowiska zewnętrznego, w tym przypadku rodzaju pożywki bakteryjnej, na wewnątrzkomórkowe poziomy metabolitów. Warto odnotować, że zastosowanie metody do oznaczania poziomów pochodnych flawinowych w płynach biologicznych, jak osocze krwi ludzkiej i mocz, nie wymaga uprzednio etapu przygotowania próbki, np. na drodze ekstrakcji na podłożu stałym (SPE). Wysoka selektywność detekcji LIF, w połączeniu z poprawą czułości zapewnianą przez metodę zateżania próbki *dynamic pH junction-sweeping*, umożliwia oznaczanie metabolitów flawinowych na pikomolowym poziomie w płynach ustrojowych. Oznaczone w pracy poziomy metabolitów w osoczu wynosiły odpowiednio $10,2 \pm 0,7$ nM dla RF, $8,4 \pm 0,2$ nM dla FMN i $44,0 \pm 3,0$ nM dla FAD.

Analiza elektroforetyczna nukleotydu flawinowego przy zastosowaniu *dynamic pH junction-sweeping* i detekcji LIF jest prostą, bardzo czułą metodą oznaczania śladowych ilości pochodnych flawinowych w złożonych próbkach biologicznych różnego pochodzenia.

3.3. Analiza profili metabolicznych ekstraktów bakterii *Bacillus subtilis* za pomocą elektroforezy kapilarnej (*Metabolic profiling analysis*) [29, 30]

Wraz z rozwojem badań nad metabolomiką wzrasta potrzeba opracowywania nowych, czułych metod elektroforezy kapilarnej (CE) do oznaczania metabolitów komórkowych w materiałach biologicznych [31]. Jedną z takich metod jest opracowana analiza jednoczesnego oznaczania grupy siedmiu nukleotydów pirymidynowych i adeninowych w ekstraktach komórkowych bakterii *Bacillus subtilis* przy zastosowaniu CE i techniki zatężania próbki *sweeping-borate complexation* [32]. Bakterie *Bacillus subtilis*, jako powszechnie stosowane substraty do produkcji enzymów przemysłowych (α -amylazy, zasadowej proteazy, β -glukanazy), są wciąż słabo zbadane pod kątem metabolomu i jego zależności z genomem i środowiskiem zewnętrznym. Do oznaczanych nukleotydów pirymidynowych biorących udział w większości procesów katabolicznych i anabolicznych organizmu należały: dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NAD), fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADP), dinukleotyd dihydronikotynoamidoadeninowy (NADH), fosforan dinukleotydu dihydronikotynoamidoadeninowego (NADPH). Badane elektroforetycznie nukleotydy adeninowe w postaci trifosforanu adenozy (ATP), difosforanu adenozy (ADP) oraz monofosforanu adenozy (AMP) są donorami energii dla większości procesów metabolicznych organizmu.

Opisywane w literaturze metody analizy ilościowej nukleotydów opierają się na oznaczeniach enzymatycznych, fluorometrycznych, bioluminescencji, chromatografii cienkowarstwowej, wysokosprawnej chromatografii cieczowej i elektroforezie kapilarnej. Żadna z opisywanych w literaturze metod nie umożliwia jednoczesnego oznaczania nukleotydów pirymidynowych i adeninowych w próbkach biologicznych. Zastosowanie techniki zagęszczania próbki *sweeping-borate complexation*, czyli zatężania przez zmiatanie-kompleksowanie w obecności jonów boranowych [33], pozwala na efektywne zogniskowanie (skondensowanie) dużej objętości nastrzykiwanej próbki (ok. 10% długości kapilary). Umożliwia w ten sposób oznaczanie nukleotydów pirymidynowych i adeninowych przy wykorzystaniu CE z detekcją spektrofotometryczną UV na nanomolowym poziomie stężeń.

Uzyskano granice wykrywalności (LOD) metabolitów adeninowych i pirymidynowych na poziomie 2×10^{-8} M (S/N = 3). Opracowana metoda oznaczania nukleotydów została zweryfikowana pod względem liniowości, czułości i powtarzalności. Następnie, metodę zastosowano do oznaczania profili metabolitów w próbkach biologicznych. Zaobserwowane zostały różnice w składzie ilościowym nukleotydów w ekstraktach komórkowych pochodzących z dwóch różnych kultur bakteryjnych, zawierających jako źródło węgla glukozę lub jabłczan.

Stężenia nukleotydów w ekstraktach komórkowych mieściły się w szerokim zakresie od 78,6 μ M dla NAD w ekstrakcie pochodzącym z kultury jabłczanowej do 0,66 μ M dla NADP w ekstrakcie pochodzącym z kultury bakteryjnej opartej na glukozie. NADH i NADPH nie zostały zmierzone w ekstraktach komórkowych, bądź ze względu na niskie stężenia nukleotydów poniżej ich wyznaczonej granicy wykrywalności, bądź z powodu niskiej stabilności analitów w roztworach wodnych.

Zauważono, że w roztworach wodnych o kwaśnym lub obojętnym pH, piki NADH i NADPH ulegają zmniejszeniu w funkcji czasu. W ciągu 5 h od przygotowania roztworów standardów wielkość piku NADH zmniejszała się do ok. 60% wartości początkowej a wielkość piku NADPH do ok. 20%. Niestabilność nukleotydów wymuszała prowadzenie analiz *ex tempore* zaraz po przygotowaniu próbki do analizy.

Z nukleotydów adeninowych najwyższe stężenia zmierzono dla AMP 7,71 μ M i 35 μ M w ekstraktach z kultur bakteryjnych hodowanych odpowiednio na glukozie i jabłczanie.

Zmierzone stężenia ADP i ATP były na odpowiednio niższych poziomach w obu rodzajach kultur bakteryjnych. Oznaczone stężenia nukleotydów adeninowych są zgodne ze zmierzonymi przez Sogę i wsp. [34] za pomocą CE/ESI-MS.

Zoptymalizowana i zastosowana metoda CE z zatężaniem próbki przez zmiatanie-kompleksowanie w obecności jonów boranowych (*sweeping-borate complexation*) jest odpowiednio czuła i selektywna do oznaczania zmian w stężeniach nukleotydów spowodowanych wpływem środowiska zewnętrznego, jak typ kultury bakteryjnej. Zaobserwowano, że w kulturach bakteryjnych hodowanych na jabłczanie stężenia nukleotydów pirymidynowych i adeninowych są około pięć razy większe niż w przypadku kultur bakteryjnych hodowanych na glukozie. Obliczone stężenia poszczególnych nukleotydów w przeliczeniu na pojedynczą komórkę bakteryjną były na poziomie milimolowym (mM). Najwyższe stężenia w komórce zostały oznaczone dla NAD i AMP na poziomie 94,7 i 42,2 mM dla kultury jabłczanowej oraz 20,8 i 9,3 mM dla kultury bakteryjnej hodowanej na glukozie. Zastosowanie opracowanej metody elektroforetycznej wraz z techniką zatężania próbki przez zmiatanie-kompleksowanie w obecności jonów boranowych pozwala na bardzo czułą i powtarzalną analizę metabolitów nukleotydów pirymidynowych i adeninowych w złożonych próbkach biologicznych, takich jak bakteryjne ekstrakty komórkowe [29].

W następnym etapie badań rozpatrywanym zagadnieniem badawczym było opracowanie metod analizy metabolomicznej tych metabolitów komórkowych, które jako nieposiadające silnych grup chromoforowych są trudne do oznaczenia za pomocą bezpośredniej (*direct*) detekcji spektrofotometrycznej. Podjęto próbę oznaczania, z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej i metody pośredniej (*indirect*) detekcji spektrofotometrycznej UV, metabolitów komórkowych alifatycznych kwasów mono-, di- i trikarboksylowych [30]. Analizowane metabolity jak kwas cytrynowy, kwas izocytrynowy, kwas 2-ketoglutarowy, kwas bursztynowy, kwas fumarowy, kwas jabłkowy, kwas pirogronowy, kwas mlekowy, kwas octowy, kwas mrówkowy, kwas glutaminowy, pochodziły z następujących szlaków przemian biochemicznych: cyklu kwasów trikarboksylowych (cykl Krebsa), cyklu mocznikowego, glikolizy i z metabolizmu aminokwasów.

Wybór metody *indirect* UV detekcji związany był ze słabymi właściwościami absorpcyjnymi badanych metabolitów. Zastosowano jako związek silnie absorbujący UV w roztworze elektrolitu tła (BGE) kwas 2,6-pirydynodikarboksylowy w stężeniu 4 mM oraz 10% dodatek składników organicznych: glikolu etylenowego i acetonitrylu. Składniki organiczne dodano w celu poprawy warunków rozdzielania pików oznaczanych związków. W niskim pH 3,5 znaleziono optymalne warunki do rozdzielania mieszaniny izomerów kwasów cytrynowego i izocytrynowego. Kwasy te przy wyższych wartościach pH roztworu BGE są praktycznie nierozdzielane metodą CE. Do wprowadzania próbki (nastrzyku) w analizie elektroforetycznej zastosowano metodę elektrokinetyczną, która pozwoliła na uzyskanie granic wykrywalności na poziomie od $1,1 \times 10^{-7}$ do $5,96 \times 10^{-7}$ M. Są to wartości o dwa rzędy wielkości niższe niż te uzyskane po zastosowaniu metody nastrzyku hydrostatycznego. Opracowana metoda spełnia wymogi liniowości i powtarzalności z wyliczonym względnym odchyleniem standardowym (RSD%) dla czasów migracji wynoszącym mniej niż 1,3%.

Stężenia kwasów karboksylowych w jabłczanowym ekstrakcie komórkowym wynosiły od 59 μ M dla mleczanu do 0,5 μ M dla cytrynianu, a w ekstrakcie komórkowym pochodzącym z glukozy wynosiły od 133 μ M dla glutaminianu do 0,5 μ M dla cytrynianu (tabela 1). Zaobserwowano istotną różnicę jakościową w ekstraktach komórkowych pochodzących z dwóch kultur bakteryjnych hodowanych na glukozie i na jabłczanie. Większa liczba zidentyfikowanych pików, jak również ich większe stężenia w jabłczanowym ekstrakcie komórkowym, związane są z obecnością w kulturze bakteryjnej kwasu jabłkowego jednego z metabolitów

cyklu Krebsa jako podłoża organicznego. Stwierdzono przy tym, brak wpływu rodzaju hodowli bakteryjnej na stężenia kwasów karboksylowych pochodzących z innych cykli metabolicznych niż cykl Krebsa.

Poziomy stężenie anionów kwasów karboksylowych pochodzących z cyklu glikolizy (pirogronian, mleczan, octan), z cyklu mocznikowego (mrówczan) czy ze szlaku przemian aminokwasów (glutaminian) nie są istotnie zmienione, gdy bakterie rozwijają się na różnych typach kultur bakteryjnych. W ekstraktach komórkowych bakterii *Bacillus subtilis* pochodzących z hodowli opartych na jabłczanie zidentyfikowano i oznaczono ilościowo dziesięć kwasów karboksylowych w tym pięć kwasów będących metabolitami cyklu Krebsa.

Opierając się na liczbie komórek w jednym mililitrze kultury bakteryjnej wynoszącej 4×10^8 komórek/ml i zakładając całkowitą objętość komórek w 1 ml jako 0,83 μ l [35] obliczono stężenia kwasów karboksylowych w pojedynczej komórce bakteryjnej (tabela 1). Wyznaczone stężenia poszczególnych metabolitów w przeliczeniu na pojedynczą komórkę bakteryjną były na poziomach mili- i submilimolowych (mM). Najwyższe stężenia metabolitów oznaczono w komórkach bakteryjnych dla mleczanu i glutaminianu, zarówno w kulturze opartej na jabłczanie, 70,7 i 68,2 mM, jak i na glukozie 59,6 i 160 mM. W komórkach bakteryjnych pochodzących z kultury zawierającej jabłczan zmierzono wysokie stężenie kwasu jabłkowego (na poziomie 64,8 mM).

Zaobserwowane wyniki dowodzą przydatności opracowanej metody elektroforetycznej w analizie metabolomicznej ekstraktów komórkowych różnego rodzaju hodowli bakteryjnych. Metoda detekcji spektrofotometrycznej UV typu *indirect* oraz elektrokinetyczny sposób wprowadzania próbki pozwoliły na uzyskanie granic oznaczalności kwasów karboksylowych na poziomie 0,1-0,5 μ M. Są to stężenia niższe niż uzyskane przy zastosowaniu hydrodynamicznego rodzaju wprowadzania próbki. Zastosowany w analizie elektroforetycznej roztwór elektrolitu tła o niskim pH 3,5 pozwolił na uzyskanie rozdzielenia dwóch izomerów strukturalnych kwasu cytrynowego i izocytrynowego, które w wyższych pH migrują z tą samą szybkością ze względu na taki sam stosunek ładunku do masy.

Tabela 1. Oznaczone stężenia kwasów karboksylowych w ekstraktach bakteryjnych oraz w przeliczeniu na pojedynczą komórkę [30].

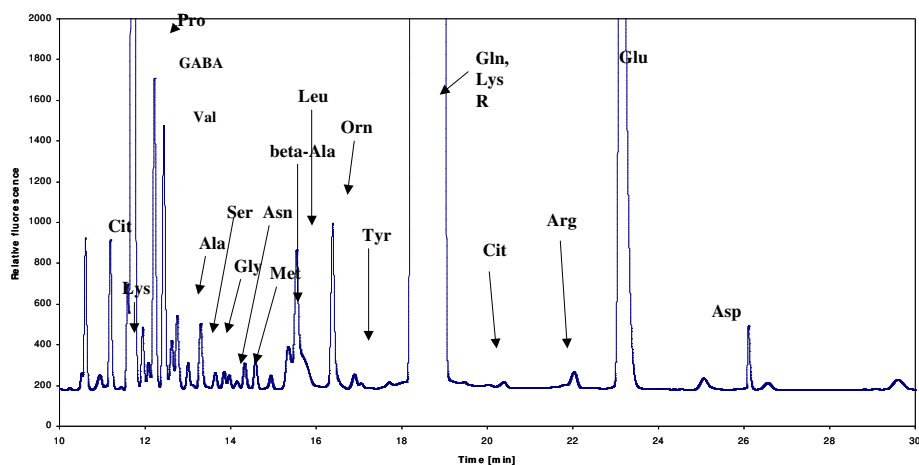
Aniony metabolitów	Stężenie (μ M) w ekstrakcie bakteryjnym		Stężenie (mM) w pojedynczej komórce bakteryjnej	
	jabłczan	glukoza	jabłczan	glukoza
Pirogronian	7,88	-*	9,5	-
2-Ketoglutaran	2,19	-	2,6	-
Fumaran	2,11	-	2,5	-
Mrówczan	0,59	1,25	0,7	1,5
Cytrynian	0,46	0,49	0,6	0,6
Jabłczan	53,93	-	64,8	-
Mleczan	58,86	49,62	70,7	59,6
Bursztynian	6,16	0,71	7,4	0,9
Glutaminian	56,78	133,09	68,2	160,0
Octan	5,41	6,46	6,5	7,8

* nie oznaczono

3.4. Analiza profili metabolicznych związków aminowych przy użyciu elektroforezy kapilarnej i laserowo wzbudzonej detekcji fluorescencyjnej (*Metabolite profiling analysis*) [8]

Aminokwasy, w swojej zdecydowanej większości, ze względu na brak silnych grup chromoforowych są trudne do oznaczania przy pomocy detekcji spektrofotometrycznej. Stąd też, dla odpowiednio czulej analizy związków aminowych konieczna jest ich wcześniejsza derywatyżacja (upoходnienie).

Zastosowano w analizie metabolomicznej związków aminowych detekcję LIF opartą na laserze argonowym (488 nm). Jako związki derywatyżujące stosowane w oznaczeniach z detekcją LIF wykorzystano izotiocyjanian fluoresceiny (FITC), 4-fluoro-7-nitrobenz-2-oksa-1,3-diazol (NBD-F) i 3-(4-karboksybenzoylo)chinolino-2-karboksyaldehid (CBQCA). Przed rozpoczęciem derywatyżacji roztwór ekstraktu bakteryjnego zobojętniano a następnie dodawano odczynniki derywatyżujące wraz z wymaganymi katalizatorami reakcji. Najbardziej odpowiedni ze względu na czułość przeprowadzanych oznaczeń wydawał się być FITC, ponieważ jego maksimum wzbudzenia było przy długości fali 489 nm, bardzo zbliżonej do długości fali wzbudzania detektora LIF. Pozwala to zwykle na osiągnięcie bardzo niskich granic wykrywalności: na poziomie nM. Jednak wady, jakimi są stosunkowo długi czas reakcji oraz liczne powstające produkty uboczne, spowodowały, że derywatyżacja z FITC została zastąpiona przez NBD-F i CBQCA.



Rycina 4. Elektroferogram ekstraktu komórkowego bakterii *Bacillus subtilis* po derywatyżacji NBD-F. Warunki elektroforetyczne: 150 mM bufor boranowy (pH 9.0), 100 mM SDS, 2 M mocznika, 40 mM Brij-35. Pozostałe warunki: wprowadzenie próbki 10 s (50 mbar); przyłożone napięcie 20 kV; temp. 20°C; długość kapilary, $l = 41.5$ cm, średnica 50 μ m I.D.

NBD-F ma maksimum wzbudzenia przy długości fali 475 nm a czas reakcji jest zdecydowanie krótszy niż w przypadku FITC. Nie powstają również tak licznie produkty uboczne reakcji derywatyżacji. CBQCA ma maksimum wzbudzania przy długości fali 468 nm, krótki czas reakcji derywatyżacji i praktycznie brak powstających produktów ubocznych.

Oznaczone stężenia przykładowych aminokwasów po derywatyżacji z NBD-F (rycina 4) wynosiły w ekstrakcie komórkowym z glukozą Ala = $3,14 \times 10^{-5}$ M, Glu = $1,85 \times 10^{-3}$ M, Asp = $4,2 \times 10^{-6}$ M, a w ekstrakcie komórkowym z jabłczanem: Ala = $1,15 \times 10^{-4}$ M, Glu = $2,54 \times 10^{-3}$ M, Asp = $9,1 \times 10^{-6}$ M.

Liniowość badana była w zakresie stężeń aminokwasów od 1×10^{-6} M do 1×10^{-9} M. Uzyskane w metodzie CE-LIF po derywatywacji z NBD-F granice wykrywalności wynosiły dla Ala, Glu i Asp odpowiednio $8,53 \times 10^{-9}$ M, $7,34 \times 10^{-9}$ M i $5,71 \times 10^{-9}$ M.

3.5. Analiza elektroforetyczna profili metabolicznych metabolitów cyklu glikolizy w erytrocytach krwi ludzkiej (*Metabolic profiling analysis*) [36]

W dalszych badaniach podjęto próbę zastosowania opracowanych metod analizy metabolomicznej z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej w badaniach nad metabolomem człowieka. W oparciu o CE z detekcją spektrofotometryczną UV typu *indirect* oznaczono główne metabolity cyklu glikolizy w erytrocytach krwi ludzkiej.

U ludzi erytrocyty są specyficznym typem komórek, które nie zawierają organelli komórkowych, takich jak jądro i mitochondrium. Energia potrzebna do prawidłowego funkcjonowania erytrocytów pochodzi praktycznie w całości z cyklu glikolizy. Metabolity cyklu glikolizy są rutynowo oznaczane za pomocą metod enzymatycznych z tym jednak zastrzeżeniem, że w trakcie pojedynczej analizy może być oznaczony jeden metabolit. Zastosowanie CE z pośrednią detekcją spektrofotometryczną stanowić może alternatywę dla metod opartych na użyciu spektroskopii masowej połączonej z elektroforezą kapilarną (CE/ESI-MS) [9].

Pomimo, że CE z detekcją spektrofotometryczną UV typu *indirect* jest mniej selektywną i czułą techniką niż CE w połączeniu z detekcją masową, to jednak posiada takie zalety, jak niski stopień skomplikowania aparaturowego, łatwość przeprowadzania analiz i stosunkowo mały wpływ interferujących składników tła.

Oznaczane metabolity cyklu glikolizy: glukoza-6-fosforan (G-6-P), fruktoza-6-fosforan (F-6-P), fruktoza-1,6-difosforan (F-1,6-P), fosforan dihydroksyacetonu (DAP), kwas 2,3-difosfoglicerynowy (2,3-DPG), kwas 3-fosfoglicerynowy (3-PG), fosfoenolopirogronian (PEP), kwas pirogronowy (PYR) i kwas mlekowy (LA), są związkami małowcząsteczkowymi nieposiadającymi silnych grup chromoforowych w swojej strukturze. Dlatego metoda detekcji spektrofotometrycznej typu *indirect* jest najbardziej odpowiednią dla oznaczania tychże metabolitów.

W trakcie optymalizacji metody sprawdzono wpływ stężenia roztworu elektrolitu tła, pH oraz użytego surfaktanta na jakość rozdzielania metabolitów cyklu glikolizy. Najistotniejsze znaczenie dla jakości rozdzielania pików F-6-P i G-6-P ma wartość pH. Dopiero przy pH roztworu BGE powyżej 12 udało się uzyskać pełną separację F-6-P i G-6-P. Było to możliwe dzięki różnicy stopnia dysocjacji grup hydroksylowych fruktozy ($pK_a = 12,03$) i glukozy ($pK_a = 12,28$) [37].

Po optymalizacji metody zastosowano następujące warunki elektroforetyczne rozdzielania: roztwór elektrolitu tła składający się z 20 mM kwasu 2,6-pirydynodikarboksylowego oraz 4 mM bromku cetylotrimetylamoniowego (CTAB) o pH 12,3; kapilara krzemionkowa niemodyfikowana o długości całkowitej 100 cm (90 cm do detektora) i średnicy wewnętrznej 50 μ m; odwrócona polarność i przykładane napięcie 25 kV; termostatowanie kapilary w temperaturze 15° C; wprowadzanie próbki metodą hydrodynamiczną przy ciśnieniu 3447 Pa przez 20 s.

Powtarzalność metody, wyrażona % RSD, dla czasów migracji metabolitów cyklu glikolizy w ciągu jednego dnia mieściła się w zakresie od 0,3 do 1,9%, a między dniami od 3,8 do 5,1%. Powtarzalność pół powierzchni metabolitów w ciągu dnia wynosiła od 2,0 do 10,4% RSD, a między dniami od 10,2 do 15,8% RSD. Liniowość badana w zakresie stężeń od 12,5

do 2000 μM charakteryzowana była równaniami regresji o wysokim współczynniku korelacji od 0,997 do 0,999 (z wyjątkiem 2,3-DPG gdzie $R^2 = 0,991$). Granice wykrywalności metabolitów cyklu glikolizy wyznaczone zostały na poziomie od 38,1 $\mu\text{g/ml}$ (5×10^{-5} M) dla 2,3-DPG do 1,29 $\mu\text{g/ml}$ ($6,25 \times 10^{-6}$ M) dla PEP.

Zweryfikowana pod względem powtarzalności i liniowości metoda została zastosowana do oznaczania profili metabolicznych cyklu glikolizy u 22 zdrowych ochotników. Pobierane próbki krwi były wirowane z odpowiednimi szybkościami w celu wyizolowania erytrocytów, następnie poddawane lizie, a na koniec ponownie ultrawirowane. Oznaczone średnie stężenia metabolitów cyklu glikolizy w erytrocytach były w zakresie od 49,6 (± 23) μM dla F-6-P do 3,1 ($\pm 0,9$) mM dla 2,3-DPG (tabela 2).

Tabela 2. Średnie stężenia oraz odchylenia standardowe, metabolitów cyklu glikolizy w erytrocytach krwi ludzkiej uzyskane w badaniach profili metabolicznych z zastosowaniem CE z detekcją spektrofotometryczną UV typu *indirect*.

Metabolit	3-PG	2,3-DPG	F-1,6-P	DAP	PYR	F-6-P	G-6-P
Średnie stężenie [μM]	56,6	3 158,5	112,2	221,3	133,9	49,6	136,0
Odchylenie standardowe	17	925	40	129	106	23	73
Liczba przypadków (<i>n</i>)	22	22	22	13	17	14	19

Oznaczone średnie stężenia porównano z danymi dostępnymi w literaturze uzyskanymi przy pomocy testów immunologicznych (*immunoassay*) [38-40]. Dla większości metabolitów cyklu glikolizy wyznaczone średnie wartości stężeń są zgodne z danymi literaturowymi. Pewien wyjątek stanowi DAP, którego oznaczone średnie stężenie jest dwukrotnie większe od przedstawionego przez Minakami i wsp. [38]. Jednak stężenia DAP pochodzące z oznaczeń enzymatycznych także różnią się wyraźnie między sobą i mieszczą się w szerokim zakresie od 138 μM [38] do 9 μM [40].

Spośród licznych pików dodatkowych obecnych, oprócz metabolitów cyklu glikolizy, na elektroferogramach zidentyfikowano jeden odpowiadający jonowi wolnego (nieorganicznego) fosforanu. Najwyższym stężeniem charakteryzuje się 2,3-DPG, który jest specyficznym metabolitem dla cyklu glikolizy zachodzącego w erytrocytach.

2,3-DPG wpływa na powinowactwo hemoglobiny do tlenu i ułatwia uwalnianie tlenu z połączeń z oksyhemoglobina. W przeciwieństwie do większości innych komórek, gdzie obecne są zaledwie śladowe ilości 2,3-DPG, w erytrocytach osiąga on najwyższe stężenia. Uzyskane wyniki potwierdzają wysoką specyficzność opracowanej metody a także jej czułość i powtarzalność. Metoda jest unikatowa ze względu na możliwość oznaczenia siedmiu głównych metabolitów cyklu glikolizy w trakcie pojedynczego oznaczenia w czasie krótszym niż 15 min. Jest to zdecydowana korzyść w porównaniu do metod enzymatycznych, które umożliwiają oznaczanie tylko pojedynczych metabolitów. Metoda wydaje się być odpowiednia do przeprowadzenia badań porównawczych profili metabolicznych cyklu glikolizy u osób zdrowych i chorych.

3.6. Bioinformatyczne przetwarzania danych metabolomicznych profili nukleozydów w moczu [41]

Współczesna bioinformatyka oferuje zaawansowane narzędzia i procedury analizy danych nastawione na znalezienie systemowych zależności pomiędzy wieloma zmiennymi. Korzystając ze współczesnych wysoce wydajnych metod analitycznych możliwe jest oznaczanie dużej liczby związków w określonej próbce biologicznej. Jednakże, tak uzyskane dane mogą zawierać wiele „szumu”, informacji bezwartościowych, które powstają w wyniku zakłóceń analitycznych. W takich sytuacjach szerokie zastosowanie znajdują zaawansowane metody bioinformatyczne, które potrafią wyeliminować niechciane sygnały z oryginalnie zebranych danych bez ryzyka utraty istotnych informacji. Takie zastosowanie metod bioinformatycznych zostało przedstawione w pracy dotyczącej analizy porównawczej profili metabolicznych nukleozydów i modyfikowanych nukleozydów, oznaczonych elektroforezą kapilarną w moczu zdrowych ochotników i chorych na choroby nowotworowe [41, 42].

Głównym źródłem obserwowanych w moczu modyfikowanych nukleozydów jest kwas rybonukleinowy (RNA), a szczególnie jego forma transportująca (tRNA). W fizjologicznie prawidłowo funkcjonującym mechanizmie komórkowym cztery powszechnie występujące nukleozydy, adenozyne (A), gwanozyna (G), cytydyna (C) i urydyna (U), powstają w procesach metabolizmu wewnątrzkomórkowego w trakcie degradacji RNA. Z dalszego ich rozpadu w przypadku adenozyne i gwanozyny powstaje kwas moczowy, a z cytydiny i urydiny – aminokwas β -alanina.

Kwas moczowy jako produkt końcowy przemian nukleotydów i nukleozydów wydzielany jest u ludzi z moczem. β -Alanina jest produktem końcowym rozpadu wielu związków endogennych, a zatem poziom wydzielania β -alaniny z moczem nie może być traktowany jako miara wewnątrzkomórkowego metabolizmu cytydiny i urydiny.

Na skutek posttranskrypcyjnych chemicznych modyfikacji nukleozydów w cząsteczce RNA powstają tzw. modyfikowane nukleozydy. Z powodu braku specyficznych układów enzymatycznych, umożliwiających ponowne wbudowanie zmodyfikowanych nukleozydów do makrocząsteczek kwasów nukleinowych, są one wydzielane w formie niezmienionej z moczem. W konsekwencji, poziomy zawartości modyfikowanych nukleozydów w moczu są miarą degradacji RNA w organizmie. Większość ze znanych posttranskrypcyjnie zmodyfikowanych nukleozydów pochodzi z tRNA (79), rRNA (28) i mRNA (12) [43, 44]. Dane dotyczące stężeń fizjologicznych pochodnych zasad purynowych i pirymidynowych, jak również posttranskrypcyjnie zmodyfikowanych nukleozydów, są dostępne w literaturze [45].

Można wyróżnić następujące dwie przyczyny zwiększonego wydzielania modyfikowanych nukleozydów do moczu u osób chorych na choroby nowotworowe w porównaniu do osób zdrowych. Pierwsza związana jest z hiperreaktywnością enzymów metylujących, występujących w komórkach nowotworowych, które produkują zwiększone ilości modyfikowanych nukleozydów. Innym powodem może być zwiększona szybkością obrotu (*turnover*) tRNA w komórkach nowotworowych [46-50].

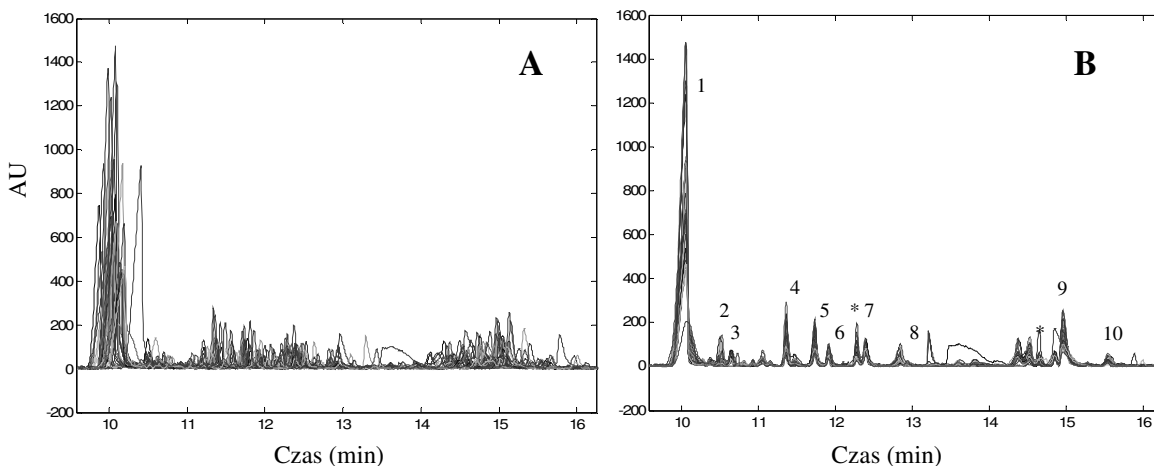
Występujące na stosunkowo wysokim poziomie takie modyfikowane nukleozydy, jak pseudourydyna, dihydrourydyna, 1-metyloinozyna, N²-metyloguanozyna czy 1-metyloguanozyna były często stosowane do porównywania różnic w profilu nukleozydów w moczu u osób zdrowych i chorych na nowotwory. Podwyższone stężenia modyfikowanych nukleozydów zostały zaobserwowane w wielu chorobach nowotworowych, m.in. białaczkę [51-53], chłoniaku [53, 54], drobnokomórkowym raku płuc [55-56], nowotworach przetyku [57], piersi [58-61], mózgu [62], raku oskrzeli [63], okrężnicy [64, 65], nowotworach dróg moczowych

[66], nowotworze żołądkowo-jelitowym [67]. Oznaczanie poziomów modyfikowanych nukleozydów w moczu zostało zaproponowane jako możliwe biomarkery karcynogenezy [47, 68-73], a także do monitorowania postępów choroby w odpowiedzi na stosowaną terapię [19, 23, 26, 33-35, 74].

Próbki moczu pochodzące od zdrowych ochotników i chorych na nowotwory układu moczowo-płciowego przed rozpoczęciem analiz elektroforetycznych poddane zostały ekstrakcji i liofilizacji. Następnie, profile metaboliczne nukleozydów w moczu zostały zebrane przy użyciu CE w zoptymalizowanych warunkach elektroforetycznych: roztwór elektrolity tła składający się z 100 mM boranu, 72,5 mM fosforanu, 160 mM dodecylosulfonianu sodu (SDS), pH 6,7; przykładane napięcie 25 kV; termostatowanie kapilary w temperaturze 30° C; kapilara krzemionkowa niemodyfikowana o długości do detektora 70 cm i średnicy wewnętrznej 50 µm. Otrzymane dane elektroforetyczne utworzyły trójwymiarową macierz, na którą składają się czas x absorbancja x długość fali.

Do wstępnego przetwarzania uzyskanych danych elektroforetycznych, polegającego na korekcji linii bazowej, eliminacji „szumów” i wyrównywaniu elektroferogramów, zostały zastosowane różne zaawansowane narzędzia bioinformatyczne. Takie zaawansowane chemometryczne podejście zostało porównane ze standardową procedurą integracji pików.

Najlepsze rezultaty wstępnego przetwarzanie danych otrzymano po zastosowaniu metody *correlation optimized warping* (COW) w celu wyrównywania elektroferogramów.



Rycina 5. Porównanie danych elektroforetycznych profili metabolitów nukleozydów w moczu przed (A) i po przetworzeniu chemometrycznym metodą COW (B) [42]. Zidentyfikowane piki kolejno odpowiadają: 1 – pseudourydyna; 2 – urydyna; 3 – cytydyna; 4 – 5-metylourydyna; 5 – inozyna; 6 – N⁴-acetylocytydyna; 7 – guanozyna; 8 – adenozyzna; 9 – N²,N²-dimetyloguanozyna, 10 – ksantozyna; * – niezidentyfikowane piki.

Zastosowana następnie analiza głównych składowych (PCA) dla przetworzonych chemometrycznie danych elektroforetycznych wykazała wyraźnie lepszą zgodność pomiędzy profilami metabolicznymi nukleozydów a stanem zdrowia niż analiza PCA dla oryginalnie zebranych, nieprzetworzonych danych elektroforetycznych profili nukleozydów [41].

4. WNIOSKI

W przebiegu przeprowadzonych badań wykazano przydatność elektroforezy kapilarnej w badaniach metabolomicznych do oznaczania jakościowego i ilościowego profili związków. Oznaczone profile metaboliczne różnią się w zależności od wpływu czynników zarówno zewnętrznych jak i wewnętrznych. Do czynników zewnętrznych wpływających na profile metaboliczne należą czynniki środowiskowe (np. rodzaj kultury tkankowej). Zmieniony metabolizm RNA w przebiegu choroby nowotworowej, jako czynnik wewnętrzny, będzie wpływał na wielkość oznaczanych metabolitów nukleozydów. Zastosowanie elektroforezy kapilarnej z odpowiednio czułymi i selektywnymi technikami detekcji poparte zaawansowanymi metodami obliczeń chemometrycznych daje szansę na opracowanie nowych sposobów diagnostycznych, także o charakterze prognostycznym [75].

W przeprowadzonych badaniach metabolomicznych opracowano nowe metody rozdzielania i analizowania profili metabolicznych kwasów karboksylowych, nukleotydów adeninowych i purynowych, związków flawinowych oraz, po zastosowaniu procesu derywatywacji, także związków aminowych. Opracowana została także procedura oznaczania profili nukleozydów i modyfikowanych nukleozydów w moczu za pomocą elektroforezy kapilarnej, a następnie chemometryczna analiza danych w celu wyeliminowania zbędnego „szumu” informacyjnego. Odpowiednio przetworzone dane metabolomiczne pozwalają w macierzy danych na znalezienie i uporządkowanie istniejącej zmienności, co daje możliwość różnicowania badanych przypadków chorób nowotworowych na osoby zdrowe i chore.

5. PIŚMIENICTWO

- [1] J.K. Nicholson, E. Holmes, J.C. Lindon, I.D. Wilson, *Nat. Biotechnol.* **22** (2004) 1268.
- [2] T. Nishioka, „Metabolomics and medical sciences”; w “Metabolomics. The frontier of systems biology” pod red. M. Tomita, T. Nishioka, Springer-Verlag, 2005, str.233-243.
- [3] J.K. Nicholson, J.Connelly, J.C.Lindon, E.Holmes, *Nat. Rev. Drug Discov.* **405** (2002) 153.
- [4] O. Fiehn, J. Kopka, P. Dormann, T. Altmann, R.N. Trethewey, L. Willmitzer, *Nat. Biotechnol.* **18** (2000) 1157.
- [5] V.G. van Mispelaar, A. C. Tas, A. K. Smilde, P. J. Schoenmakers, A. C. van Asten, *J. Chromatogr. A* **1019** (2003) 15.
- [6] K. Raith, S. Zellmer, J. Lasch, R. H. H. Neubert, *Anal. Chim. Acta* **418** (2000) 167.
- [7] F. Beaudry, J. C. Y. Le Blanc, M. Coutu, I. Ramier, J. P. Moreau, N. K. Brown, *Biomed. Chromatogr.* **13** (1999) 363.
- [8] S. Terabe, M.J. Markuszewski, N. Inoue, K. Otsuka, T. Nishioka, *Pure Appl. Chem.* **73** (2001) 1563.
- [9] T. Soga, Y. Ohashi, Y. Ueno, H. Naraoka, M. Tomita, T. Nishioka, *J. Proteome. Res.* **2** (2003) 488.
- [10] A. Aharoni, C. H. Ric de Vos, H. A. Verhoeven, C. A. Maliepaard, G. Kruppa, R. Bino, D. B. Goodenowe, *OMICS* **6** (2002) 217.
- [11] M.Y. Hirai, M. Klein, Y. Fujikawa, M. Yano, D.B. Goodenowe, Y. Yamazaki, S. Kanaya, Y. Nakamura, M. Kitayama, H. Suzuki, N. Sakurai, D. Shibata, J. Tokuhsa, M. Reichelt, J. Gershenzon, J. Papenbrock, K. Saito, *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 25590.
- [12] J.C. Lindon, E. Holmes, J.K. Nicholson, *Anal. Chem.* **75** (2003) 384A.
- [13] J.T. Brindle, H. Antti, E. Holmes, G. Tranter, J. K. Nicholson, H. W. Bethell, S. Clarke, P. M. Schofield, E. McKilligin, D. E. Mosedale, D. J. Grainger, *Nat. Med.* **8** (2002) 1439.
- [14] R. Goodacre, *J. Exp. Bot.* **56** (2005) 245.
- [15] J. van der Greef, P. Stroobant, R. van der Heijden, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8** (2004) 559.
- [16] M.M.W.B. Hendriks, L. Cruz-Juarez, D. De Bont, R.D. Hall, *Anal. Chim. Acta* **545** (2005) 53.
- [17] R.D. Hall, *New Phytol.* **169** (2006) 453.

-
- [18] A. Buciński, A. Nasal, R. Kaliszan, *Comb. Chem. High Throughput. Screen* **6** (2000) 525.
- [19] D.B. Kell, *Trends Genet.* **18** (2002) 555.
- [20] D.B. Kell, *Bioinformatics World* **1** (2002) 16.
- [21] J. Kopka, N. Schauer, S. Krueger, C. Birkenmeyer, B. Usadel, E. Bergmüller, P. Dörmann, Y. Gibon, L. Willmitzer, A.R. Fernie, D. Steinhauser, *Bioinformatics* **21** (2005) 1635.
- [22] N. Schauer, D. Steinhauser, S. Strelkov, D. Schomburg, G. Allison, T. Moritz, K. Lundgren, U. Roessner-Tunali, M.G. Forbes, L. Willmitzer, A.R. Fernie, J. Kopka, *FEBS Lett.* **579** (2005) 1322.
- [23] N. Schauer, D. Zamir, A.R. Fernie, *J. Exp. Bot.* **56** (2005) 298.
- [24] O. Fiehn, *Comp. Funct. Genomics* **2** (2001) 155.
- [25] K. Yoshida, K. Kobayashi, Y. Miwa, C.M. Kang, M. Matsunaga, H. Yamaguchi, S. Tojo, M. Yamamoto, R. Nishi, N. Ogasawara, T. Nakayama, Y. Fujita, *Nucleic Acids Res.* **29** (2001) 683.
- [26] Y. Fujita, Y. Miwa, A. Galinier, J. Deutscher, *Mol. Microbiol.* **17** (1995) 953.
- [27] P. Britz-McKibbin, M.J. Markuszewski, T. Iyanagi, K. Matsuda, T. Nishioka, S. Terabe, *Anal. Biochem.* **313** (2003) 89.
- [28] P. Britz-McKibbin, D.D.Y. Chen, *Anal. Chem.* **72** (2000) 1242.
- [29] M.J. Markuszewski, P. Britz-McKibbin, S. Terabe, K. Matsuda, T. Nishioka, *J. Chromatogr. A* **989** (2003) 293.
- [30] M.J. Markuszewski, K. Otsuka, S. Terabe, K. Matsuda, T. Nishioka, *J. Chromatogr. A*, **1010** (2003) 113.
- [31] Y. Baba, *Anal. Bioanal. Chem.* **372** (2002) 14.
- [32] P. Britz-McKibbin, K. Otsuka, S. Terabe, *Anal. Chem.* **74** (2002) 3736.
- [33] S. Honda, S. Iwase, A. Makino, S. Fujiwara, *Anal. Biochem.* **176** (1989) 72.
- [34] T. Soga, Y. Ueno, H. Naraoka, Y. Ohashi, M. Tomita, T. Nishioka, *Anal. Chem.* **74** (2002) 2233.
- [35] Y. Fujita, E. Freese, *J. Biol. Chem.* **254** (1979) 5340.
- [36] M.J. Markuszewski, M. Szczykowska, D. Siluk, R. Kaliszan, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **39** (2005) 636.
- [37] T. Soga, D.N. Heiger, *Anal. Biochem.* **261** (1998) 73.

- [38] S. Minakami, H. Yoshikawa, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18** (1965) 345.
- [39] M.V. Martinov, A.G. Plotnikov, V.M. Vitvitsky, F.I. Ataullakhanov, *Biochim. Biophys. Acta* **1457** (2000) 75.
- [40] J.W. Harvey, w pracy: J.J. Kaneko, J.W. Harvey, M.L. Bruss, *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Academic Press, San Diego, 1997, pp. 157–203.
- [41] E. Szymańska, M.J. Markuszewski, X. Capron, A.-M. van Nederkassel, Y. Vander Heyden, M. Markuszewski, K. Krajka, R. Kaliszan, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, (2006), doi:10.1016/j.jpba.2006.08.015.
- [42] E. Szymańska, M.J. Markuszewski, X. Capron, A.-M. van Nederkassel, Y. Vander Heyden, M. Markuszewski, K. Krajka, R. Kaliszan, *Electrophoresis*, submitted for publication.
- [43] P.A. Limbach, P.F. Crain, J.A. McCloskey, *Nucl. Acids Res.* **22** (1994) 2183.
- [44] H. Grosjean, M. Sprinzl, S. Steinberg, *Biochem.* **77** (1995) 139.
- [45] T.W. Traut, *Mol. Cell Biochem.* **140** (1994) 1.
- [46] G. Schoch, G. Heller-Schoch, J. Muller, M. Heddrich, R. Gruter, *Klin. Pediatr.* **194** (1982) 317.
- [47] G. Schoch, G. Sander, H. Topp, G. Heller-Schoch, w pracy: C.W. Gehrke, K.C. Kuo, *Chromatography and modification of nucleotides, part C*. Amsterdam, Elsevier, 1990.
- [48] E. Borek, *Cancer Res.* **31** (1971) 596.
- [49] E. Borek, B.S. Baliga, C.W. Gehrke, *Cancer Res.* **37** (1977) 3362.
- [50] S.J. Kerr, *Methods Cancer Res.* **15** (1978) 163.
- [51] R.W. Trewyn, M.R. Grewer, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **24** (1986) 71.
- [52] T. Rasmuson, G.R. Bjork, *Acta Oncol.* **34** (1995) 61.
- [53] D.A. Heldman, M.R. Grewer, J.S. Miser, R.W. Trewyn, *J. Natl. Cancer Inst.* **71** (1983) 269.
- [54] T. Rasmuson, G.R. Bjork, L. Damber, *Recent Results Cancer Res.* **84** (1983) 331.
- [55] B. Krattiger, A.E. Bruno, H. Widmer, *Anal. Chem.* **67** (1995) 124.
- [56] T.P. Waalkes, M.D. Abeloff, D.S. Ettinger, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **18** (1982) 1267.
- [57] S. Tamura, J. Fujii, T. Nakano, T. Hada, K. Higashino, *Clin. Chim. Acta.* **154** (1986) 125.
- [58] M. Matsuda, T. Nishihira, K. Itoh, M. Mizugaki, N. Ishida, S. Mori, *Cancer* **72** (1993) 3571.

- [59] T. Samuelsson, *Nucl. Acids Res.* **19** (1991) 6139.
- [60] T. Rasmuson, G.R. Bjork, L. Damber, *Acta Oncol.* **26** (1987) 261.
- [61] B.S. Vold, L.E. Kraus, V.G. Rimer, R.C. Coombes, *Cancer Res.* **46** (1986) 3164.
- [62] A.J. Sasco, F. Rey, C. Reynaud, J. Bobin, M. Clavel, A. Niveleau, *Can. Lett.* **108** (1996) 157.
- [63] C.C. Marvel, J. Del Rowe, E.G. Bremer, J.G. Moskal, *Mol. Chem. Neuropathol.* **21** (1994) 353.
- [64] T. Rasmuson, G.R. Bjork, L. Damber, *Acta Radiol. Oncol.* **22** (1983) 209.
- [65] T. Rasmuson, G.R. Bjork, L. Damber, *Acta Radiol. Oncol.* **23** (1984) 27.
- [66] C.W. Gehrke, K.C. Kuo, T.P. Waalkes, E. Borek, *Cancer Res.* **39** (1979) 1150.
- [67] K. Koshida, J. Harmenberg, U. Stendahl, *Urol. Res.* **13** (1985) 213.
- [68] K. Nakano, K. Shindo, T. Yasaka, *J. Chromatogr* **343** (1985) 21.
- [69] J.I. Langridge, T.D. McClure, S. Shakawi, A. Fielding, K.H. Schram, R.P. Newton, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **7** (1993) 427.
- [70] E. Borek, *Tumour Biol.* **5** (1984) 1.
- [71] K. Nakano, T. Nakao, K.H. Schram, W.M. Hammargren, *Nucl. Acids Symp. Ser.* **4** (1991) 125.
- [72] R.W. Zumwalt, T.P. Waalkes, K.C. Kuo, C.W. Gehrke, w pracy: C.W. Gehrke, K.C. Kuo, *Chromatography and modification of nucleosides, part C.* Amsterdam, Elsevier, 1990.
- [73] K.C. Kuo, D.T. Phan, N. Williams, C.W. Gehrke, w pracy: C.W. Gehrke, K.C. Kuo, *Chromatography and modification of nucleosides, part C.* Amsterdam, Elsevier, 1990.
- [74] K. Nakano, T. Yasaka, K.H. Schram, *J. Chromatogr.* **515** (1990) 537.
- [75] M.J. Markuszewski, E. Szymańska, R. Kaliszan, „Metabonomika i metabolomika”; w pracy „Miniaturyzacja w analityce” pod redakcją Z. Brzózki; Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2005, str. 219-235.