



Badania surowicy krwi techniką ^1H NMR – podstawowe procedury pomiarowe

Mateusz Ciszek, Łukasz Boguszewicz, Maria Sokół

Zakład Fizyki Medycznej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie oddział w Gliwicach, ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice, tel. +48 32 278 80 16, e-mail: mateusz.ciszek@io.gliwice.pl

Wprowadzenie

Metabolom – zestaw wszystkich związków niskocząsteczkowych (o masie cząsteczkowej poniżej 1,5 kDa) organizmu ludzkiego, takich jak lipidy, kwasy organiczne, węglowodany, aminokwasy, nukleotydy, Metabolom – zestaw wszystkich związków niskocząsteczkowych (o masie cząsteczkowej poniżej 1,5 kDa) organizmu ludzkiego, takich jak lipidy, kwasy organiczne, węglowodany, aminokwasy, nukleotydy, sterydy czy hormony – jest tworzony przez kilka tysięcy metabolitów [1, 2]. Występują one w bardzo szerokim zakresie stężeń i wykazują znaczną różnorodność chemiczną, w związku z czym wyznaczenie profilu metabolicznego nie jest możliwe przy zastosowaniu jednego urządzenia i jednego pomiaru.

120

Streszczenie

Zaburzenie homeostazy organizmu znajduje odzwierciedlenie w zmianach funkcjonalnych, morfologicznych i molekularnych, które z kolei można wykrywać w płynach ustrojowych, na przykład w surowicy krwi. Analizowaniem procesów metabolicznych, identyfikacją zmian profilu metabolicznego zajmuje się metabolomika, a jednym z jej podstawowych narzędzi badawczych jest spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego wysokiej rozdzielczości HR NMR (*High Resolution Nuclear Magnetic Resonance*). Techniki HR NMR i metabolomiczna analiza danych coraz częściej znajdują zastosowanie w diagnostyce medycznej i monitoringu leczenia. W tej pracy przedstawiono procedury przygotowania próbek surowicy do pomiarów spektroskopowych, opisano podstawowe sekwencje impulsowe NMR użyteczne w badaniach metabolomicznych oraz wskazano najważniejsze czynniki wpływające na jakość pomiarów.

Abstract

Disturbances of homeostasis of the organism are reflected in functional, morphological and molecular changes. These systemic alternations can be detected in systemic body fluids, such as blood serum. Metabolomics is emerging as a powerful tool for studying metabolic processes and identifying crucial biomarkers responsible for metabolic characteristics. One of its most commonly used technology is high resolution nuclear magnetic resonance (HR NMR) spectroscopy. HR NMR techniques and metabolomics are increasingly being used in medical diagnostics and treatment monitoring. This paper presents the procedures of preparation of serum samples for spectroscopic measurements, and describes the basic NMR pulse sequences useful in such metabolomics studies; the main factors affecting the quality of the measurement were identified.

Słowa kluczowe: surowica, NMR, metabolity, podstawowe protokoły pomiarowe

Key words: serum, NMR, metabolites, basic measurement protocols

otrzymano / received:

09.02.2017

poprawiono / corrected:

22.02.2017

zaakceptowano / accepted:

28.02.2017



Wśród narzędzi badawczych metabolomiki, dziedziny biologii systemowej zajmującej się analizą jakościową i ilościową metabolitów obecnych w danym układzie biologicznym, centralną pozycję zajmują spektrometria masowa MS (*Mass Spectrometry*), zazwyczaj skojarzona z technikami chromatograficznymi, oraz spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego wysokiej rozdzielczości HR NMR (*High Resolution Nuclear Magnetic Resonance*). Techniki NMR są szczególnie skuteczne w detekcji i identyfikacji związków chemicznych występujących w stężeniach milimolowych [3, 4]. Chociaż spektrometria masowa przewyższa techniki NMR pod względem liczby zidentyfikowanych związków, to jednak zalety metabolomiki wspartej na technikach NMR są ogromne. Wśród nich należy wymienić prostotę przygotowania próbki, możliwość jednoczesnego pomiaru wielu związków chemicznych oraz ich identyfikacji ilościowej i jakościowej, niedestrukcyjny dla próbki pomiar, możliwość automatyzacji rejestracji widm, szybkość, powtarzalność i niski koszt pomiarów [5, 6]. Zalety te sprawiają, że HR NMR może już wkrótce znaleźć swoje stałe miejsce wśród technik analitycznych stosowanych w medycynie.

Materiał biologiczny wykorzystywany w pomiarach NMR to ekstrakty komórkowe i tkankowe oraz płyny ustrojowe (np. krew pełna, osocze, surowica, mocz, ślina, płyn mózgowo-rdzeniowy) – do ich badania stosowane są techniki cieczowe [7-10], ale także wycinki tkankowe i materiały biopsyjne – w tym przypadku użyteczna jest technika NMR z rotacją pod kątem magicznym, MAS NMR (*Magic Angle Spinning NMR*) [11].

Osocze krwi i jej surowica to najczęściej stosowane w badaniach biologicznych i klinicznych płyny ustrojowe. Są one dostępne praktycznie nieinwazyjnie, a ich skład metaboliczny odzwierciedla reakcje systemowe organizmu na czynniki środowiskowe [12], chorobę oraz terapię [13-15]. Tym samym, umożliwiając wgląd w stan metaboliczny ustroju w momencie pobierania próbek, spektroskopia NMR pozwala identyfikować biomarkery – konkretne metabolity lub ich zestaw – badanych procesów.

Ludzki metabolom surowicy krwi jest dostępny w postaci otwartej bazy danych (<http://www.serummetabolome.ca/>) [1, 2]. Aktualnie zawiera ona kilka tysięcy związków, które kiedykolwiek zostały wykryte i określone ilościowo z wykorzystaniem różnych technik analitycznych, w tym także technik NMR [2].

Coraz częściej metabolomika wsparta na technikach HR NMR znajduje zastosowanie w onkologii [16-22] oraz w innych dziedzinach medycyny [23-29]. Włączenie jej do procesu diagnostycznego i monitorowania terapii stanowi niewątpliwie krok w kierunku personalizacji leczenia [16].

Celem tej pracy jest przedstawienie specyfiki przygotowania próbek surowicy krwi do metabolomicznych pomiarów spektroskopowych. Opisano tu także podstawowe sekwencje impulsowe NMR, które są użyteczne w badaniach metabolomicznych.

Składniki krwi

Krew jest płynną mieszaniną osocza i elementów upostaciowionych (erytrocyty, trombocyty, leukocyty itp.). Osocze stanowi

ok. 55% objętości krwi, a w jego skład wchodzi woda (ok. 90%), białka (albuminy, globuliny – ok. 7%) oraz związki organiczne i nieorganiczne (m.in. kwasy tłuszczowe, cholesterol, triglicerydy, hormony, glukoza, witaminy rozpuszczalne w tłuszczach (A, D, E, K), dwutlenek węgla, produkty metabolizmu białek (mocznik, aminokwasy), produkty metabolizmu hemu (bilirubina oraz urobilinogen), sole mineralne (ok. 3%). Osocze, płyn słomkowej barwy, uzyskuje się przez wirowanie próbki krwi. Surowica krwi (łac. *serum*) to część osocza krwi pozbawiona fibrynogenu, która w przeciwieństwie do osocza nie krzepnie [2].

Przygotowanie surowicy krwi do badań metabolomicznych

Podstawowym celem metabolomicznej analizy płynów ustrojowych i tkanek technikami NMR jest identyfikacja potencjalnych biomarkerów – nowych elementów profilu metabolicznego lub zmian w profilu metabolicznym charakterystycznych dla procesu patologicznego lub mających związek z procesem leczenia. Zaobserwowane różnice powinny być biologicznie i statystycznie istotne. To wyzwanie nakłada wysokie wymagania na cały proces pomiarowy, w tym na oba etapy przygotowania próbek: bankowanie surowicy i przygotowanie jej do badań NMR muszą odbywać się zgodnie z jednolitym dla wszystkich próbek protokołem laboratoryjnym.

Etap I – Bankowanie surowicy

Prawidłowe pozyskanie i przechowywanie surowicy krwi ma kluczowe znaczenie dla jakości pomiaru NMR i analizy metabolomicznej. Brak respektowania ujednoliconych dla wszystkich próbek procedur pobierania, przetwarzania czy przechowywania próbek może generować błąd systematyczny, który z kolei obniży wartość informacyjną uzyskanych danych spektroskopowych [30].

Prawidłowo zabankowana próbka powinna zostać umieszczona w temperaturze - 80°C natychmiast po pobraniu i przetworzeniu. Zamrożenie surowicy krwi w tej temperaturze znacząco wydłuża czas jej przechowywania, nawet do kilku lat [31]. Liczba cykli zamrażania i rozmrażania powinna być zminimalizowana, bowiem wielokrotne powtarzanie tego cyklu ma mierzalny wpływ na stężenia metabolitów [32].

Ważne jest, aby rozmrażanie surowicy również odbywało się zawsze w ten sam sposób. W laboratoriach stosowane są różne metody rozmrażania, na przykład rozmrażanie w temperaturze pokojowej, na suchym lodzie czy rozmrażanie stopniowe (najpierw w temperaturze 4°C, a następnie w temperaturze pokojowej). Rozmrażanie stopniowe jest zalecane ze względu na stosunkowo krótki czas rozmrażania (w porównaniu z rozmrażaniem na suchym lodzie) oraz mniejszy wpływ na stabilność próbek surowicy niż rozmrażanie w temperaturze pokojowej, które jest często stosowane ze względu na oszczędność czasu [33].



Etap II – Przygotowanie próbek surowicy do pomiarów ^1H NMR

Przygotowanie próbek surowicy NMR wymaga – w najbardziej minimalistycznym zakresie – rozcieńczenia surowicy poprzez dodatek wody (H_2O) i wody deuterowanej (D_2O). Często stosowane jest również dostosowanie kwasowości poprzez dodanie buforu. Przygotowywanie rozpuszczalnika może odbywać się zgodnie z procedurą opisaną przez Beckonerta i współautorów [30] lub w oparciu o przepis rekomendowany przez firmę Bruker. Nasze testy porównawcze wykazały, że rozpuszczalnik zawierający bufor fosforanowy zwiększa stabilność próbek surowicy [16].

Aby uzyskać 500 ml rozpuszczalnika z buforem, w 380 ml wody rozpuszczane są następujące składniki:

- o 0,4 g wzorca wewnętrznego TSP- d_4 (TSP, sól sodowa kwasu 2,2,3,3-tetra-deutero-3-(trimetylosililo)propanowego),
- o 10,05 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (siedmiowodny hydrat wodorofosforan sodu)
- o 5 ml NaN_3 (4%) (azydek sodu).

Następnie pH roztworu doprowadzane jest do wartości 7,4 \pm 0,2 przy użyciu 1M NaOH (wodorotlenek sodu) lub HCl (kwas solny). Powstały roztwór jest uzupełniany dodatkiem H_2O do 400 ml i dodatkiem 100 ml D_2O .

Przed rozpoczęciem pomiarów surowicę należy rozmrozić, a następnie zworteksować, aby nie dochodziło do rozdzielania fazy wodnej.

Roztwór pomiarowy powstaje ze zmieszania 500 μl surowicy z 500 μl rozpuszczalnika. 600 μl przygotowanego roztworu jest przenoszone do próbki NMR. Przygotowane próbki są przechowywane w temperaturze 4°C aż do analizy NMR (w czasie nie dłuższym niż 8 godzin).

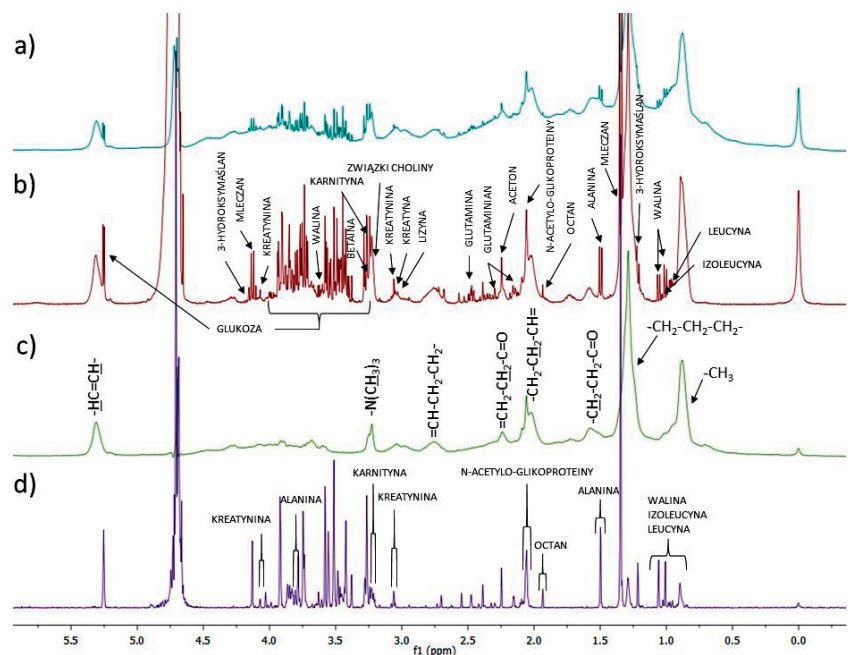
Dzięki zastosowaniu buforu, próbki surowicy mają niemal identyczne wartości pH – umożliwia to porównywanie wartości przesunięć chemicznych sygnałów w widmach protonowych ^1H NMR. Przygotowane próbki mają też identyczną objętość, aby zachować stałą jakość rejestracji widm, oraz identyczne stężenia, aby można było porównywać szerokości potówkowe sygnałów [34].

Rejestracja widm NMR

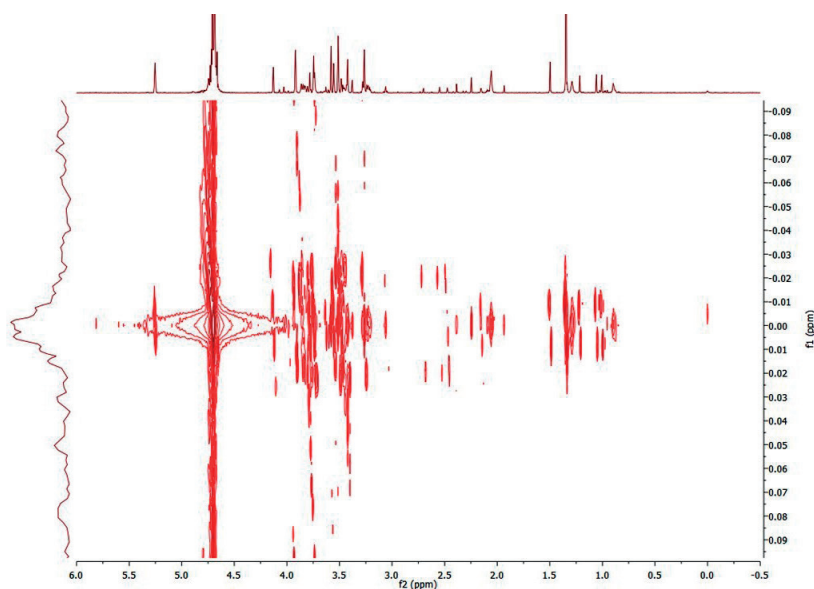
Utrzymanie rygorów jakościowych widm wymaga poprzedzenia pomiarów rutynowych codziennymi testami kontroli jakości. Testy prowadzone są w temperaturze 300 K przy użyciu próbki wzorcowej, zawierającej 2 mM sacharozy, 0,5 mM DSS (sól sodowa kwasu 2,2-dimetylo-2-silapentano-5-sulfonowego), 2 mM NaN_3 , 10% D_2O oraz 90% H_2O . Zgodnie z parametrami akceptacyjnymi, szerokość potówkowa sygnału przy 0 ppm – pochodzącego od atomów wodoru grup metylowych DSS – nie powinna przekraczać 0,7 Hz. Na tej samej próbce przeprowadza się także test tłumienia sygnału wody.

Aby poszerzyć zakres informacji spektralnych uzyskiwanych z badanej próbki, w pomiarach metabolomicznych stosuje się zazwyczaj kilka sekwencji impulsowych, stanowiących odrębne „okna spektralne” dla związków chemicznych istotnie różniących się pod względem fizykochemicznym (różne masy cząsteczkowe, różne czasy relaksacji). Dzięki takiej filtracji zachodzącej na poziomie rejestracji widm NMR możliwa jest osobna analiza związków niskocząsteczkowych oraz makrocząsteczek (głównie lipidów) [30], co jest szczególnie cenne w przypadku tak złożonych układów, jakimi są próbki biologiczne. W pomiarach metabolomicznych zalecane jest wykonanie minimum czterech eksperymentów z wykorzystaniem następujących sekwencji impulsowych:

- o 1D NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) – ta jednowymiarowa sekwencja impulsowa umożliwia zaprezentowanie na jednym widmie molekuł zarówno o niskiej, jak i wysokiej masie cząsteczkowej.
- o CPMG (*Carr–Purcell–Meiboom–Gill*) – na tego typu widmach pojawiają się tylko sygnały pochodzące od grup funkcyjnych metabolitów o niskiej masie cząsteczkowej.
- o DIFF (*Diffusion edited*) – ta sekwencja impulsowa służy do wykrywania sygnałów makrocząsteczek.
- o 2D JRES (*J-resolved*) – to dwuwymiarowa sekwencja, która wizualizuje stałe sprzężenia skalarne. W wersji 2D ułatwia ona identyfikowanie metabolitów, natomiast jednowymiarowa projekcja 1D widm JRES ułatwia detekcję zmian profilu metabolicznego. Widma 1D JRES zawierają sygnały pochodzące od metabolitów niskocząsteczkowych (podobnie jak CPMG), lecz ze względu na homood sprzężenie są one singletami, a nie multipletami, jak na widmach CPMG. Projekcja taka jest więc łatwiejsza do analizy i określania ilościowego metabolitów.



Rys. 1 Widma ^1H NMR surowicy krwi zarejestrowane na spektrometrze Bruker Avance III 400, 13 MHz w temperaturze 310 K przy użyciu następujących sekwencji impulsowych: (a) NOESY, (b) CPMG, (c) DIFF i (d) JRES (1D)
Źródło: Archiwum własne.



Rys. 2 Widmo ^1H NMR surowicy krwi zarejestrowane na spektrometrze Bruker Avance III 400,13 MHz w temperaturze 310 K przy użyciu sekwencji impulsowej JRES (2D). Skala f_1 prezentuje stałe sprzężenia, a skala f_2 jest skalą przesunięć chemicznych
Źródło: Archiwum własne.

Identyfikacja sygnałów na widmach NMR prowadzona jest zazwyczaj w oparciu o komercyjne bazy metabolitów, takie jak Chenomx (<http://www.chenomx.com/>), oraz bazy otwarte, jak np. baza dostępna pod adresem <http://www.hmdb.ca/>.

Przykładowe widma surowicy krwi zarejestrowane przy użyciu wymienionych wcześniej sekwencji impulsowych i zidentyfikowane przy użyciu baz Chenomx i HMDB przedstawione zostały na rysunkach 1 i 2.

Czynniki wpływające na jakość widm ^1H NMR

Podstawowym wyzwaniem w metabolomicznych ilościowych pomiarach NMR stanowią kwestie jakości danych spektralnych i powtarzalności pomiarowej. Nawet pozornie mało istotne operacje przeprowadzane przy rejestracji widm, jak na przykład sposób wprowadzania próbek do magnesu, stosowane protokoły optymalizacji pola magnetycznego, wybór stosowanych sekwencji impulsowych stanowią ważne źródła zmienności, które mogą utrudnić identyfikację metabolitów i oznaczenia ilościowe [35]. Także dobór parametrów akwizycji danych, parametrów obróbki widm oraz wybór metody tłumienia wody mogą również znacząco wpłynąć na jakość danych spektralnych [36].

Stosowane sekwencje impulsowe mogą być modyfikowane i dostosowywane do konkretnego problemu badawczego, jednak pomiary metabolomiczne wymagają stosowania się do identycznych reżimów pomiarowych przy przechodzeniu od próbki do próbek.

Pośród wielu parametrów sekwencji, które wpływają na jakość widm protonowych ^1H NMR [16, 30], niektóre wymagają szczególnej uwagi:

- Liczba punktów domeny czasowej – biorąc pod uwagę rozmiar okna widmowego i żądaną rozdzielczość badania, pomiar NMR, który ma zostać wykorzystany w analizie metabolomicznej powinien zawierać co najmniej 32 K punktów.

- Czas repetycji – jest to czas potrzebny na rejestrację pojedynczego skanu widma. Parametr ten wpływa na intensywności integralne sygnałów, a więc na oznaczenia ilościowe metabolitów. W pomiarach ilościowych czas repetycji powinien być pięć razy dłuższy niż najdłuższy z czasów relaksacji podłużnej T_1 jąder w próbce, co nie zawsze jest możliwe, szczególnie w próbkach wymagających stosowania dużej liczby powtórzeń przy rejestracji widm. W takim przypadku stosowana jest korekta relaksacyjna lub porównanie z widmem zarejestrowanym w warunkach pełnej relaksacji przy wykorzystaniu specjalistycznego oprogramowania, np. Chenomx lub AMIX.
- Liczba powtórzeń sekwencji (inaczej: liczba skanów lub akwizycji) – liczba ta wpływa na stosunek sygnału do szumu SNR (*Signal to Noise Ratio*). W analizie ilościowej znajdują zastosowanie tylko widma NMR o wysokiej wartości parametru SNR. SNR zależy od liczby powtórzeń, ale też od wielu innych czynników, między innymi: natężenia pola

magnetycznego, parametrów sprzętowych (np. typ głowicy pomiarowej), jakości i stężenia próbki, temperatury pomiaru, kąta odchylenia magnetyzacji (*Flip Angle*).

- Czulość odbiornika RG (*Receiver Gain*) – parametr ten jest często wybierany w celu zmaksymalizowania stosunku sygnału do szumu. Pomiar NMR może przebiegać w dwóch trybach: przy stałym ustawieniu wzmocnienia odbiornika (zoptymalizowanym do standardowej próbki) lub z automatycznie optymalizowanym wzmocnieniem odbiornika dla każdej próbki. W pomiarach metabolomicznych zalecany jest tryb zoptymalizowany względem próbki wzorcowej, stały RG dla wszystkich badanych próbek – tryb ten pozwala na bezpośrednie porównywanie intensywności odpowiednich sygnałów różnych próbek.
- Tłumienie sygnału wody – wytłumienie sygnału wody (presaturacja) jest konieczne w przypadku próbek surowicy krwi, bowiem woda jest podstawowym składnikiem surowicy i zdominowałaby widmo. Sygnał wody (przy 4,7 ppm) powinien być wytłumiony do poziomu porównywalnego lub niewiele wyższego od najwyższych sygnałów metabolitów. W piśmiennictwie można spotkać się z zaleceniami, aby parametr wytłumienia sygnału wody ustawiać tylko dla pierwszej mierzonej próbki, a w pomiarach kolejnych próbek korzystać z uzyskanych ustawień [30]. Jednak z naszych doświadczeń wynika, że parametr presaturacji powinien być ustawiany indywidualnie dla każdej próbki, przed rozpoczęciem akwizycji jej widm ^1H NMR.
- Temperatura pomiaru – w pomiarach metabolomicznych konieczne jest utrzymywanie stałej temperatury we wszystkich pomiarach. Tylko przy spełnieniu tego warunku wartości przesunięć chemicznych sygnałów w widmach protonowych ^1H NMR są porównywalne. W przypadku surowicy zaleca się temperaturę 310 K [16], co odpowiada ludzkiej temperaturze ciała.



Widma NMR zarejestrowane przy wykorzystaniu ujednoczonych protokołów pomiarowych są następnie poddawane obróbce, w tym takim operacjom jak: fazowanie, uporządkowanie względem wzorca, ewentualnie binowanie. Tak przygotowane widma utworzą finalnie macierze danych spektroskopowych – to one staną się materiałem analiz chemometrycznych.

Podsumowanie

Identyfikacja jakościowa i ilościowa biomarkerów metabolicznych to podstawowe wymagania stawiane technice analitycznej, która ma znaleźć zastosowanie w praktyce klinicznej. Spektroskopia NMR umożliwia jakościowe i ilościowe oznaczenia metabolitów, których stężenia są rzędu milimolowego.

W pracy omówiono najistotniejsze kwestie dotyczące eksperymentalnych aspektów ilościowych pomiarów NMR surowicy krwi, które powinny być spełnione, jeśli zarejestrowane dane mają stanowić przedmiot analiz metabolomicznych. Przedstawione tu zalecenia dotyczą pobierania próbek, ich przetwarzania i przechowywania oraz akwizycji widm NMR. Wierzymy, że zalecenia te będą pomocne dla badaczy zainteresowanych poszukiwaniami biomarkerów w surowicy krwi.

Literatura

- D.S. Wishart, D. Tzur, C. Knox, R. Eisner, A.C. Guo, N. Young, C. Fung: *HMDB: the human metabolome database*, *Nucleic Acids Res*, 35(1), 2007, D521-D526.
- N. Psychogios, D.D. Hau, J. Peng, A.C. Guo, R. Mandal, S. Bouatra, N. Young: *The human serum metabolome*, *Plos One*, 6(2), 2011, e16957.
- G. Birungi, S.M. Chen, B.P. Loy, M.L. Ng, S.F.Y. Li: *Metabolomics approach for investigation of effects of dengue virus infection using the EA. hy926 cell line*, *J Proteome Res*, 9(12), 2010, 6523-6534.
- P. Krishnan: *Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR*, *J Exp Bot*, 56(410), 2004, 255-265.
- P. Soinenen, A.J. Kangas, P. Würtz, T. Tukiainen, T. Tykkynen, R. Laatikainen, M. R. Järvelin, M. Kähönen, T. Lehtimäki, J. Viikari, O.T. Raitakari, M.J. Savolainen, M. Ala-Korpela: *High-throughput serum NMR metabolomics for cost-effective holistic studies on systemic metabolism*, *Analyst*, 134, 2009, 1781-1785.
- J. Kettunen, T. Tukiainen, A.P. Sarin, A. Ortega-Alonso, E. Tikkanen, L.P. Lyytikäinen, A.J. Kangas, P. Soinenen, P. Würtz, K. Silander, D.M. Dick, R.J. Rose, M.J. Savolainen, J. Viikari, M. Kähönen, T. Lehtimäki, K.H. Pietiläinen, M. Inouye, M.I. McCarthy, A. Jula, J. Eriksson, O.T. Raitakari, V. Salomaa, J. Kaprio, M.R. Järvelin, L. Peltonen, M. Perola, N.B. Freimer, M. Ala-Korpela, A. Palotie: *Genome-wide association study identifies multiple loci influencing human serum metabolite levels*, *Nat Genet*, 44, 2012, 269-276.
- J.L. Markle, R. Brüsweiler, A.S. Edison, H.R. Eghbalnia, R. Powers, D. Raftery, D.S. Wishart: *The future of NMR-based metabolomics*, *Curr Opin Biotechnol*, 43, 2017, 34-40.
- M. Ala-Korpela: *¹H NMR spectroscopy of human blood plasma*, *Prog Nucl Mag Res Sp*, 27(5-6), 1995, 475-554.
- J.D. Bell, J.C. Brown, P.J. Sadler: *NMR studies of body fluids*, *NMR Biomed*, 2(5-6), 1989, 246-256.
- R.A. Wevers, U. Engelke, A. Heerschap: *High-resolution ¹H-NMR spectroscopy of blood plasma for metabolic studies*, *Clin Chem*, 40(7), 1994, 1245-1250.
- L. Schenetti, A. Mucci, F. Parenti, R. Cagnoli, V. Righi, M.R. Tosi, V. Tugnoli: *HR-MAS NMR spectroscopy in the characterization of human tissues: Application to healthy gastric mucosa*, *Concept Magn Reson A*, 28(6), 2006, 430-443.
- A. Shrestha, E. Müllner, K. Poutanen, H. Mykkänen, A.A. Moazzami: *Metabolic changes in serum metabolome in response to a meal*, *Eur J Nutr*, 2015, 1-11.
- S.H. Shah, W.E. Kraus, C.B. Newgard: *Metabolomic profiling for the identification of novel biomarkers and mechanisms related to common cardiovascular diseases*, *Circulation*, 126(9), 2012, 1110-1120.
- T.W. Fan, A.N. Lane: *NMR-based stable isotope resolved metabolomics in systems biochemistry*, *J Biomol NMR*, 49(3-4), 2011, 267-280.
- I.F. Duarte, S.O. Diaz, A.M. Gil: *NMR metabolomics of human blood and urine in disease research*, *J Pharmaceut Biomed*, 93, 2014, 17-26.
- L. Boguszewicz, A. Hajduk, J. Mrochem-Kwarciak, A. Skorupa, M. Ciszek, A. Heyda, K. Składowski, M. Sokół: *¹H NMR based metabolomic approach to monitoring of the head and neck cancer treatment toxicity*, *Metabolomics*, 12(6), 2016, 1-15.
- M. Ala-Korpela: *Potential role of body fluid ¹H NMR metabolomics as a prognostic and diagnostic tool*, *Expert Rev Mol Diagn*, 7(6), 2007, 761-773.
- H. Gao, Q. Lu, X. Liu, H. Cong, L. Zhao, H. Wang, D. Lin: *Application of ¹H NMR based metabolomics in the study of metabolic profiling of human hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis*, *Cancer Sci*, 100(4), 2009, 782-785.
- E. Garcia, C. Andrews, J. Hua, H.L. Kim, D.K. Sukumaran, T. Szyperki, K. Odunsi: *Diagnosis of early stage ovarian cancer by ¹H NMR metabolomics of serum explored by use of a microflow NMR probe*, *J Proteome Res*, 10(4), 2011, 1765-1771.
- K. Sonkar, A. Behari, V. K. Kapoor, N. Sinha: *¹H NMR metabolic profiling of human serum associated with benign and malignant gallstone diseases*, *Metabolomics*, 9(2), 2013, 515-528.
- W. Chen, S. Lu, J. Ou, G. Wang, Y. Zu, F. Chen, C. Bai: *Metabonomic characteristics and biomarker research of human lung cancer tissues by HR¹H NMR spectroscopy*, *Cancer Biomark*, 16(4), 2016, 653-664.
- E. Louis, P. Adriaenssens, W. Guedens, T. Bigirumurame, K. Baten, K. Vanhove, Z. Shkedy: *Detection of lung cancer through metabolic changes measured in blood plasma*, *J Thorac Oncol*, 11(4), 2016, 516-523.
- L.J. Sitole, A.A. Williams, D. Meyer: *Metabonomic analysis of HIV-infected biofluids*, *Mol Biosyst*, 9(1), 2013, 18-28.
- R.H. Weiss, K. Kim: *Metabolomics in the study of kidney diseases*, *Nat Rev Nephrol*, 8(1), 2012, 22-33.
- V. Fanos, R. Antonucci, L. Barberini, A. Noto, L. Atzori: *Clinical application of metabolomics in neonatology*, *J Matern-Fetal Neo M*, 25(1), 2012, 104-109.
- N.W. Lutz, P.J. Cozzone: *Metabolic profiling in multiple sclerosis and other disorders by quantitative analysis of cerebrospinal fluid using nuclear magnetic resonance spectroscopy*, *Curr Pharm Biotechnol*, 12(7), 2011, 1016-1025.
- G. Hassan-Smith, G.R. Wallace, M.R. Douglas, A.J. Sinclair: *The role of metabolomics in neurological disease*, *J Neuroimmunol*, 248(1), 2012, 48-52.
- A. Atzei, L. Atzori, C. Moretti, L. Barberini, A. Noto, G. Ottonello, V. Fanos: *Metabolomics in paediatric respiratory diseases and bronchiolitis*, *J Matern-Fetal Neo M*, 24(2), 2011, 59-62.
- M. Sofia, M. Maniscalco, G. de Laurentiis, D. Paris, D. Melch, A. Motta: *Exploring airway diseases by NMR-based metabolomics: a review of application to exhaled breath condensate*, *BioMed Research International*, 2011.
- O. Beckonert, H.C. Keun, T.M. Ebbels, J. Bundy, E. Holmes, J.C. Lindon, J.K. Nicholson: *Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts*, *Nat Protoc*, 2(11), 2007, 2692-2703.
- T. Männistö, H.M. Surcel, A. Bloigu, A. Ruokonen, A.L. Hartikainen, M.R. Järvelin, E. Suvanto-Luukkonen: *The effect of freezing, thawing, and short- and long-term storage on serum thyrotropin, thyroid hormones, and thyroid autoantibodies: implications for analyzing samples stored in serum banks*, *Clin Chem*, 53(11), 2007, 1986-1987.
- O. Teahan, S. Gamble, E. Holmes, J. Waxman, J.K. Nicholson, C. Bevan, H.C. Keun: *Impact of analytical bias in metabonomic studies of human blood serum and plasma*, *Anal Chem*, 78(13), 2006, 4307-4318.
- P. Yin, R. Lehmann, G. Xu: *Effects of pre-analytical processes on blood samples used in metabolomics studies*, *Anal Bioanal Chem*, 407(17), 2015, 4879-4892.
- P. Krishnan, N.J. Kruger, R.G. Ratcliffe: *Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR*, *J Exp Bot*, 56(410), 2005, 255-265.
- S. Sokolenko, R. McKay, M.J.L. Blondeel, M.J. Lewis, D. Chang, B. George, M.G. Aucoin: *Understanding the variability of compound quantification from targeted profiling metabolomics of 1D-¹H-NMR spectra in synthetic mixtures and urine with additional insights on choice of pulse sequences and robotic sampling*, *Metabolomics*, 9(4), 2013, 887-903.
- S.K. Bharti, R. Roy: *Quantitative H-1 NMR spectroscopy*, *Trend Anal Chem*, 2012, 35, 5-26.