

MONITOROWANIE METABOLIZMU KOMÓRKOWEGO ZA POMOCĄ METODY SPEKTROSKOPII NMR

MONITORING OF CELLULAR METABOLISM BY NMR SPECTROSCOPY

**Natalia Pudelko-Malik*, Monika Sapeta,
Piotr Młynarz**

*Katedra Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Wydział Chemiczny,
Politechnika Wroclawska, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław
e-mail: natalia.pudelko-malik@pwr.edu.pl

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Metabolomika – ujęcie ogólne

2. Zastosowanie spektroskopii NMR w metabolomice

3. Linie komórkowe w ujęciu metabolomicznym

3.1. Przykłady zastosowania metabolomiki na liniach komórkowych

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

Mgr inż. Natalia Pudelko-Malik - doktorantka Szkoły Doktorskiej Politechniki Wrocławskiej od 2020 roku. Doktorat realizuje w Katedrze Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii pod opieką prof. dr hab. Piotra Młynarza oraz w Zakładzie Fizjologii i Neurobiologii Molekularnej, Uniwersytetu Wrocławskiego pod opieką dr. Dominik Drulis-Fajdasz. Od 2015 roku związana z Politechniką Wrocławską, gdzie w 2020 roku zdobyła tytuł zawodowy magistra w dziedzinie biotechnologii. Tematyka Jej doktoratu obejmuje wykorzystanie narzędzi metabolomicznych do analizy procesów neuropatyczności w mózgu. Zainteresowania obejmują metabolomikę oraz neurofizjologię..



<https://orcid.org/0000-0002-0250-3029>

Mgr inż. Monika Sapeta - doktorantka Szkoły Doktorskiej Politechniki Wrocławskiej od 2021 roku. Doktorat realizuje w Katedrze Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii na Politechnice Wrocławskiej pod opieką prof. dr hab. Piotra Młynarza oraz na Uniwersytecie Medycznym w Zakładzie Podstawowych Nauk Medycznych pod kierunkiem dr. Katarzyny Gębczak. W 2021 roku zdobyła tytuł zawodowy magistra w dziedzinie biotechnologii. Tematyka doktoratu obejmuje wykorzystanie narzędzi metabolomicznych do badania stresu oksydacyjnego spowodowanego działaniem różnych związków, w tym związków metali ciężkich. Badania obejmują również testy aktywności biologicznej związków wywołujących stres oksydacyjny.



<https://orcid.org/0000-0002-4177-3398>

Prof. dr hab. Piotr Młynarz – pracownik Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej Katedry Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii od 2002 roku. Pracę doktorską obronił w 2001 roku pod kierunkiem prof. Henryka Kozłowskiego na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, a następnie kontynuował swoją ścieżkę naukową w Zakładzie Chemii Bioorganicznej pod kierownictwem prof. Pawła Kafarskiego na Politechnice Wrocławskiej (stopień doktora habilitowanego 2012, tytuł naukowy profesora 2021). Zainteresowania prof. Piotra Młynarza są związane z szeroko pojętą bioanalityką, w tym wykorzystania komórek nowotworowych jako modelowych układów procesów nowotworzenia, zastosowanie badań metabolomicznych w diagnostyce medycznej, badanie lekooporności bakterii i grzybów strzępkowych za pomocą monitorowania metabolizmu mikroorganizmów.



<https://orcid.org/0000-0002-8502-4022>

ABSTRACT

Metabolomics approaches allow systematic identification and quantitation of all metabolites in biological samples analyzes. As already known metabolism is directly or indirectly related to every aspect of cell function, therefore a careful observation of every changes taking place in metabolism, for example endogenous biochemical reaction products, reflects the phenotype of any living cell. Monitoring the metabolite profiles using metabolomics technologies, especially nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy based on cell culture, allows us to evaluate drug efficiency and outcome of experimental therapy, and most importantly, it allows us to monitor the reaction of the model cell lines to a given treatment. The continued development of metabolomic approaches, e.g. analytical technique, or chemometric software, will accelerate the widespread use of metabolomics not only in the clinical field but also in different biological fields. This work presents a use of nuclear magnetic resonance to characterize and understand the cellular metabolome in a wide range of pathophysiological and clinical contexts.

Keywords: metabolomics, nuclear magnetic resonance (NMR), cell lines

Słowa kluczowe: metabolomika, NMR, linie komórkowe

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

NMR	– jądrowy rezonans magnetyczny (ang. Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy)
1D NMR	– jednowymiarowa analiza jądrowego rezonansu magnetycznego (ang. One-dimensional Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy)
2D NMR	– dwuwymiarowa analiza jądrowego rezonansu magnetycznego (ang. Two-dimensional Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy)
MS	– spektrometria mas (ang. Mass Spectrometry)
LC-MS	– chromatografia cieczowa sprzężona z spektrometrią mas (ang. Liquid chromatography – mass spectrometry)
GC-MS	– chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (ang. Gas chromatography – mass spectrometry)
Cr	– kreatynina (ang. Creatine)
PCr	– fosfokreatynina (ang. Phosphocreatine)
CA19-9	– biomarker, antygen węglowodanowy 19-9 (ang. Cancer antigen 19-9, Carcinoma antigen 19-9)
KG1a, K562, HL-60	– linie komórkowe ostrej białaczki szpikowej
BEZ	– bezafibrat (ang. Bezafibrate)
MPA	– octan medroksyprogesteronu (ang. Medroxyprogesterone acetate)
APAP	– acetaminophen (ang. Acetaminophen)
APAP-NAC	– N-acetylo-L-cysteiny acetaminofenu (ang. N-acetyl-L-cysteine acetaminophen)
PDAC	– gruczolakorak przewodowy trzustki (ang. Pancreatic ductal adenocarcinoma)
EOC	– linii nabłonkowego raka jajnika (ang. Epithelial ovarian cancer)
AML	– ostrą białaczkę szpikową (ang. Acute myeloid leukaemia)
ROS	– reaktywne formy tlenu (ang. Reactive oxygen species)
GSH	– glutation (ang. Glutathione)
GPC	– glicerofosfocholina (ang. Glycerophosphocholine)
OPLS – DA	– ortogonalna analiza cząstkowych najmniejszych kwadratów z analizą dyskryminacyjną (ang. Orthogonal partial least squares discriminant analysis)

WPROWADZENIE

Atrakcyjność wykonywania analiz metabolomicznych w aspekcie próbek biologicznych opiera się przede wszystkim na możliwości uzyskania indywidualnego metabolomicznego obrazu zmian w poszczególnych szlakach biochemicznych. Takie podejście pozwala na zaobserwowanie relacji pomiędzy poszczególnymi metabolitami, ale również korelacji w odniesieniu do całego metabolomu analizowanego materiału biologicznego. Szczególnie interesującym aspektem jest coraz częstsze wykorzystywanie technik metabolomicznych w oparciu o linie komórkowe, co zostało przedstawione w niniejszej pracy.

1. METABOLOMIKA – UJĘCIE OGÓLNE

Metabolity będące naturalnymi niskocząsteczkowymi związkami o małej masie cząsteczkowej poniżej 1.5 kDa do których można zaliczyć np.: aminy, aminokwasy, kwasy organiczne, etc., stanowią szeroki zbiór związków chemicznych pełniących istotne role w funkcjonowaniu systemów biologicznych. Ogół tych niskocząsteczkowych związków występujących w danym układzie biologicznym nazywany jest metabolomem. Termin ten został po raz pierwszy użyty przez S. G. Olivera podczas analizy składu metabolitów w komórkach drożdży [1]. Z kolei monitorowanie zmian metabolitów we wszelakiego rodzaju organizmach żywych odbywa się w celu porównania ich poziomów w badanych układach względem układu odniesienia. Dla przykładu takie porównanie pozwala na określenie aktualnego stanu fizjologicznego, monitorowanie wpływu czynników zewnętrznych na dany układ biologiczny, czy porównywanie układów biologicznych względem siebie. Badaniem systemów biologicznych poprzez analizę związków niskocząsteczkowych - metabolitów zajmuje się nauką zwaną metabolomiką [2]. W porównaniu do nauk omiczonych takich jak genomika, transkryptomika czy proteomika, metabolomika dostarcza informacji na temat aktualnego stanu fizjologicznego badanego modelu biologicznego, pozwalając na skonstruowanie unikatowego „chemicznego odcisku palca” zależnego od indywidualnych oraz środowiskowych uwarunkowań [3]. Jest to nauka porównawcza, w której za pomocy analizy celowanej lub niecelowanej można analizować zmiany w różnych szlakach metabolicznych wywołanych różnego rodzaju bodźcami. Z tego względu znalazła ona szerokie zastosowanie w naukach biologicznych, środowiskowych, medycznych oraz toksykologicznych. Szczególnie interesującym aspektem jest wykorzystanie podejścia metodycznego jakim jest mapowanie metaboliczne w celu odkrywania potencjalnych biomarkerów chorobotwórczych [4]. Obiecującym zatem podejściem pozwalającym na szybką identyfikację metabolizmu organizmów jest monitorowanie poziomów stężeń metabolitów występujących w danym materiale biologicznym,

takim jak biofluidy ludzkie i zwierzęce, ekstrakty tkankowe, ekstrakty bakteryjne oraz ekstrakty grzybów strzępkowych, za pomocą standardowych metod analitycznych (NMR, GC-MS, LC-MS). Metabolomiczna analiza składa się z czterech etapów do których zaliczamy: przygotowanie próbki, analizę w oparciu o metody NMR lub MS, analizę bioinformatyczną, a także identyfikację metabolitów stosując dostępne bazy danych, standardy wewnętrzne lub zewnętrzne. Analiza materiału biologicznego za pomocą wymienionych powyżej technik analitycznych polega na dostarczeniu wyników w postaci „panoramicznego obrazu metabolomu”, który jest ściśle związany z monitorowanymi szlakami metabolicznymi [5].

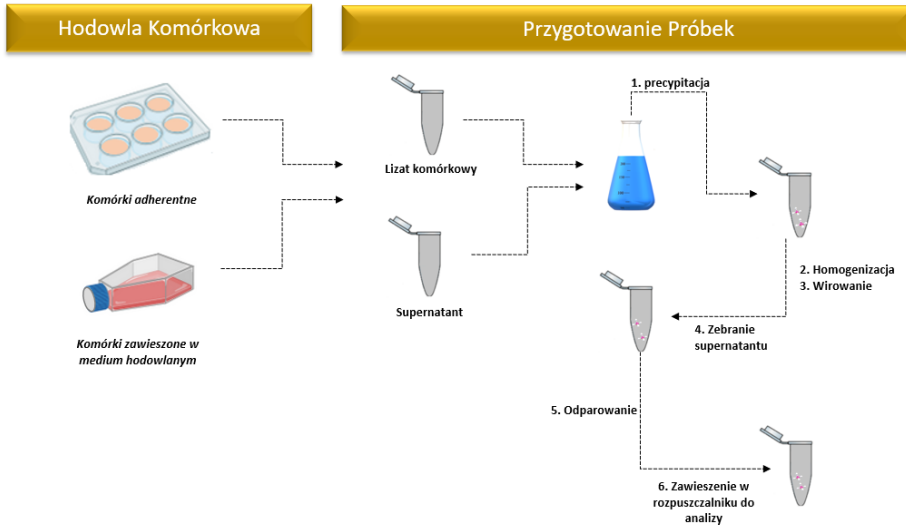
2. ZASTOSOWANIE SPEKTROSKOPII NMR W METABOLOMICE

Znaczący wzrost liczby publikacji na przełomie ostatnich dwudziestu lat, jednoznacznie wskazuje na coraz szersze zainteresowanie magnetycznym rezonansem jądrowym (NMR), jako potencjalnym narzędziem umożliwiającym profilowanie metabolomu. Wykorzystywanie metody NMR w ujęciu metabolomicznym, ma swój początek w połowie lat siedemdziesiątych, jednakże dopiero na początku lat osiemdziesiątych z powodzeniem zastosowano metodę ^1H NMR do analizy biofluidów oraz nienaruszonych tkanek [6]. Metoda spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego, jak każda technika analityczna posiada liczne zalety, ale również ograniczenia. W przypadku metody NMR główne zalety determinujące jej wykorzystywanie w analizie próbek pochodzenia biologicznego odnoszą się do wysokiej powtarzalności pomiarów, możliwości odzysku próbki oraz faktu, że jest to metoda zarówno jakościowa oraz ilościowa [7]. Podstawowe protokoły metabolomiczne przeznaczone dla metody NMR, nie wymagają przeprowadzenia derywatywacji. Opracowana metodologia przygotowania próbki pozwala na jej wielokrotne wykorzystanie podczas analiz metabolicznych opartych na różnych technikach (sekwencji pulsów) NMR. Fakt ten ma kluczowe znaczenie w przypadku materiałów biologicznych o charakterze unikatowym oraz pozwala na uzyskanie wiarygodnych danych [8]. Dodatkowo duża różnorodność eksperymentów jednowymiarowych (1D NMR) oraz dwuwymiarowych (2D NMR) w połączeniu z podejściem chemometrycznym umożliwia precyzyjne zidentyfikowanie licznych niskocząsteczkowych związków chemicznych uczestniczących w różnych szlakach biochemicznych [9]; [10]. Aktualnie dostępne są liczne protokoły przygotowania próbki oraz analizy danych [11]; [12]. Metoda NMR posiada jednak swoje ograniczenia odnoszące się przede wszystkim do minimalnego stężenia metabolitów oraz związanego z nim limitu detekcji związków niskocząsteczkowych w próbce.

3. LINIE KOMÓRKOWE W UJĘCIU METABOLOMICZNYM

Jeszcze na początku lat 50 eksperymenty oparte na liniach komórkowych były problematyczne. Wiązało się to z licznymi aspektami do których śmiało można było zaliczyć np. problemy z utrzymaniem sterylnych warunków lub trudnościami w pozyskiwaniu odpowiednich mediów hodowlanych [12]. Aktualnie, zarówno techniki hodowli komórkowych jak i metody akwizycji danych oraz metody analizy w przeciągu ostatnich dekad odnotowały znaczny postęp, co miało bezpośrednie przełożenie na szerokie zastosowanie linii komórkowych począwszy do badań naukowych po perspektywy przemysłowe [13]. Szczególnie interesującym wydaje się być wykorzystywanie linii komórkowych w ujęciu metabolomicznym. Obecnie zastosowanie technik metabolomicznych w systemach adherentnych hodowli komórek ssaczych zostało udokumentowane wieloma pracami, dla przykładu na liniach ludzkich fibroblastów [14], komórek wątroby [15], komórek nowotworowych [16] etc. Drugim typem hodowli są linie komórkowe rosnącej w postaci zawiesiny w medium hodowlanym do których zaliczają się komórki jajnika chomika chińskiego czy mysich komórek szpiczaka NS0 [17]. Badania metabolomiczne na liniach komórkowych wymagają ścisłego przestrzegania opracowanych protokołów ze względu na zmienności, które mogą powstawać przy zastosowaniu różnego medium hodowlanego, dostępu tlenu czy chociażby różnej temperatury. Oprócz prowadzenia samej hodowli komórkowej uwagę skupia się również na sposobie zbierania komórek oraz metodach ekstrakcyjnych.

W przypadku komórek adherentnych standardowym podejściem pozwalającym na ich oddzielenie od podłoża była metoda trypsynizacji. Aktualnie liczne badania wykazały, że stosowanie trypsyny wskazuje na uszkodzenie błon komórkowych i utratę metabolitów [18], co w aspekcie badań metabolomicznych może stanowić problem. Z tego względu metabolity wewnątrzkomórkowe, uzyskuje się poprzez zdrapywanie komórek z powierzchni dołka, po uprzednim przemyciu z medium, przy użyciu odpowiednich rozpuszczalników ekstrakcyjnych [19]. Szczególnie istotnym krokiem jak wspomniano powyżej jest dobór odpowiedniej metody ekstrakcji w szczególności w odniesieniu do pozyskiwania wewnątrzkomórkowych metabolitów. Za „złote standardy” uważa się protokoły, w których rozpuszczalnikami ekstrakcyjnymi jest mieszanina acetonitrylu z wodą (1:1) lub metanolu z wodą (3:1) (Rysunek 1) [20].



Rysunek 1. Procedura przygotowania hodowli komórkowych do analiz metabolomicznych (źródło: opracowywanie własne)

Figure 1. Metabolomics protocol for cell culture (Source: own)

3.1. PRZYKŁADY ZASTOSOWANIA METABOLOMIKI W BADANIACH NA LINIACH KOMÓRKOWYCH

Przykładem zastosowania metody NMR w badaniach metabolomicznych na liniach komórkowych może być analiza wpływu kreatyniny (Cr), na mysią linię komórkową mioblastów C2C12. Genezą tych badań było powszechne stosowanie kreatyniny w sporcie w celu zwiększania tolerancji na wysiłek. Mysią linię komórkową traktowano Cr przez okres 24 godzin. Za pomocą metody OPLS-DA zidentyfikowano 13 statystycznie istotnych metabolitów różnicujących próbę badaną od kontrolnej. W porównaniu z kontrolną linią komórkową, linia poddana działaniu Cr wykazała znacząco podwyższone relatywne stężenia Cr, PCr, GSH i glukozy oraz wyraźnie obniżone poziomy innych metabolitów, w tym leucyny, waliny, izoleucyny, fenyloalaniny, metioniny, cholicy, PC, GPC i glicerolu. Uzyskane wyniki pozwoliły na stwierdzenie, iż suplementacja kreatyniną powoduje poprawę zdolności utrzymania systemu obronnego przed stresem oksydacyjnym oraz stabilizację błon lipidowych [21]; [22]. W kolejnej pracy były monitorowane zmiany metaboliczne komórek nowotworowych za pomocą spektroskopii ^1H HR-MAS NMR, które były traktowane związkiem rutenu, jako potencjalnym terapeutycznym. Badaniom zostały poddane trzy linie komórkowe A2780 (komórki ludzkiego raka jajnika), A2780cisR (komórki odporne na cisplatynę) i HEK-293 (ludzkie embrionalne komórki nerkowe). Linie komórkowe inkubowano z kompleksem rutenu przez 24 godziny i 72 godziny, a następnie porównywano z hodowlą

kontrolną. Najbardziej wyraźne zmiany stwierdzono w przypadku lipidów, związków zawierających cholinę, glutaminianu, glutationu, mleczanu oraz niektórych aminokwasów [23]. Przeprowadzone badania metabolomiczne z użyciem metody NMR oraz modelowych linii komórkowych wykazały duży potencjał w monitorowaniu zmian ilościowych metabolitów komórkowych indukowanych kompleksami metali jako potencjalnych metaloterapeutyków [23]. Jeszcze jednym przykładem mogą być badania metaboliczne wykonane na liniach komórkowych ostrej białaczki szpikowej (KG1a, K562, HL-60) z wykorzystaniem dwóch znanych leków bezafibratu (BEZ) oraz medroksyprogesteronu (MPA). Połączenie bezafibratu BEZ oraz MPA wykazywało działanie przeciwbiałaczkowe w przypadku ostrej białaczki szpikowej (AML), które było związane z generowaniem reaktywnych form tlenu (ROS) w komórkach nowotworowych. Zastosowanie leków spowodowało zmianę metaboliczną, która była zbliżona dla komórek linii KG1a i K562 oraz różna dla linii komórkowej HL-60. Badane leki przede wszystkim indukują różne procesy, apoptozę w obu liniach komórkowych (KG1a, K562), natomiast w komórkach HL-60 różnicowanie. W pracy tej wykazano, że zastosowanie profilowania metabolomicznego umożliwia fenotypowanie linii komórkowych, badanie wpływu leków na linie komórkowe oraz pozwala na określenie potencjalnego mechanizmu działania terapeutyków poprzez monitorowanie zmian w metabolomie [24]. Za pomocą metody badań metabolomicznych, z użyciem metody ^1H NMR, dokonano charakterystyki metabolicznej linii komórkowej MDA MB-468. Jest to linia komórkowa wywodząca się z tzw. potrójnie ujemnego rak piersi (TNBC) charakteryzującego się dużą śmiertelnością, złym rokowaniem oraz częstym nawrotem choroby. Założeniem pracy była analiza składu medium hodowlanego w czasie, poprzez określenie puli pobieranych i wydalanych metabolitów przez komórki nowotworowe. Eksperyment był prowadzony przez 72 godziny, a otrzymane wyniki były analizowane za pomocą metod jednowymiarowych i wielowymiarowych. Zidentyfikowano dziewięć metabolitów o różnych tendencjach zmian stężeń związków niskocząsteczkowych w czasie. Porównano profile metabolitów zewnątrzkomórkowych komórek *in vitro* MDA MB-468 (media) z profilami próbek krwi pacjentów. Badania wykazały, że zmiany składu metabolitów w mediach nie korelują ze zmianami w surowicy krwi. Wykryte różnice w profilach metabolitów są prawdopodobnie związane ze zmianami wynikającymi z odpowiedzi na chorobę, co świadczy o złożoności organizmu w porównaniu do modelowych hodowli komórkowych [25].

UWAGI KOŃCOWE

Zastosowanie spektroskopii NMR wraz z analizą jednowymiarową i wielowymiarową stwarzają narzędzia metabolomiczne do monitorowania metabolizmu hodowli komórkowych zachodzących pod wpływem potencjalnych terapeutyków lub zmiennych warunków hodowlanych. Obserwacja zmian w metabolitach wewnątrz oraz zewnątrzkomórkowych pozwala na fentopowanie linii komórkowych, badanie mechanizmów działania leków i suplementów diety, określania potencjału przeciwnowotworowego związków chemicznych oraz porównywanie zmian na poziomie komórkowym ze zmianami zachodzącymi w organizmach.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] S.G. Oliver, M.K. Winson, D.B. Kell, F. Baganz, *Trends Biotechnol.*, 1998, **16**, 373.
- [2] R. Goodacre, *J. Nutr.*, 2007, **137**, 259.
- [3] A. Zhang, H. Sun, P. Wang, Y. Han, X. Wang, *J. Proteomics*, 2012, **75**, 1079.
- [4] A.K. Arakaki, J. Skolnick, J.F. McDonald, *Nature*, 2008, **456**, 443.
- [5] K.A. Mielko, N. Pudełko-Malik, A. Tarczewska, M. Piotr, *Sustain. Chem. Pharm.*, 2021, **22**, 100474.
- [6] J.K. Nicholson, I.D. Wilson, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 1989, **21**, 449.
- [7] A.A. Crook, R. Powers, *Molecules*, 2020, **25**, 5128.
- [8] O. Beckonert, H.C. Keun, T.M.D. Ebbels, J. Bundy, E. Holmes, J.C. Lindon, J.K. Nicholson, *Nat. Protoc.*, 2007, **2**, 2692.
- [9] R. Ahmed, P.C. Varras, M.G. Siskos, H. Siddiqui, M.I. Choudhary, I.P. Gerotheranassis, *Molecules*, 2020, **25**, 4902.
- [10] E. Alexandri, R. Ahmed, H. Siddiqui, M.I. Choudhary, C.G. Tsiafoulis, I.P. Gerotheranassis, *Molecules*, 2017, **22**, 1663.
- [11] S. Deja, A. Litarski, K. A. Mielko, N. Pudełko-Malik, W. Wojtowicz, A. Zabek, T. Szydełko, P. Młynarz, "Gender-Specific Metabolomics Approach to Kidney Cancer," 2021, **11**, 767.
- [12] J.R. Masters, G.N. Stacey, *Nat. Protoc.*, 2007, **2**, 2276.
- [13] M. Ravi, V. Paramesh, S.R. Kaviya, E. Anuradha, F.D. Paul Solomon, *J. Cell. Physiol.*, 2015, **230**, 16.
- [14] B.D. Bennett, J. Yuan, E.H. Kimball, J.D. Rabinowitz, *Nat. Protoc.*, 2008, **3**, 1299.
- [15] U. Hofmann, K. Maier, A. Niebel, G. Vacun, M. Reuss, K. Mauch, *Biotechnol. Bioeng.*, 2008, **100**, 344.
- [16] Q. Teng, W. Huang, T.W. Collette, D.R. Ekman, C. Tan, *Metabolomics*, 2009, **5**, 199.
- [17] C.A. Sellick, R. Hansen, A.R. Maqsood, W.B. Dunn, G.M. Stephens, R. Goodacre, A.J. Dickson, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 174.
- [18] U. Batista, M. Garvas, M. Nemeč, M. Schara, P. Veranič, T. Koklic, *Cell Biol. Int.*, 2010, **34**, 663.
- [19] A. Artati, C. Prehn, J. Adamski, *Methods Mol. Biol.*, 2019, **1994**, 119.
- [20] S. Dietmair, N.E. Timmins, P.P. Gray, L.K. Nielsen, J.O. Krömer, *Methods Mol. Biol.*, 2010, **404**, 155.
- [21] J. Leenders, M. Frédéricich, P. De Tullio, *Drug Discov. Today Technol.*, 2015, **13**, 39.
- [22] W. Xu, D. Lin, C. Huang, *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, 2017, **7**, 617.
- [23] M. Vermathen, L.E.H. Paul, G. Diserens, P. Vermathen, J. Furrer, *1H HR-MAS NMR Based Metabolic Profiling of Cells in Response to Treatment with a Hexacationic Ruthenium*

- Metallaprism as Potential Anticancer Drug" PLoS One, [29.05.2015], <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26024484/>.
- [24] S. Tiziani, A. Lodi, F.L. Khanim, M.R. Viant, C.M. Bunce, and U.L. Günther, PLoS One, 2009, **4**, 1.
- [25] W. Wojtowicz, A. Wróbel, K. Puziak, R. Tarkowski, A. Balcerzak, M. Bębenek, P. Młynarz Metabolites, 2020, **10**, 1.

Praca wpłynęła do Redakcji 8 maja 2022 r.

