**6ο Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας**
**Αθήνα, 13-14 Μαΐου 2016**

# ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΩΝ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΚΑΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΚΑΙ ΙΣΤΟΥΣ

**Παπαχριστοδούλου Α.[1*], Ασημομύτη Α.[1], Δάγλα Ι.[1], Μπενάκη Δ.[1], Τέντα Ρ.[2], Γκίκας Ε.[1] και Μικρός Ε.[1]**

**[1]Τομ. Φαρμακευτικής Χημείας, Ε.Κ.Π.Α., Πανεπιστημιόπολη Ζωγράφου 157 71, Αθήνα**

**[2]Τμ. Επ. Διαιτολογίας - Διατροφής, Χαροκόπειο Παν/μιο, Καλλιθέα 176 71, Αθήνα**

***e-mail: anpapac@pharm.uoa.gr**

## Περίληψη

Το μεταβολικό προφίλ ενός βιολογικού συστήματος προσφέρει μία ολιστική εικόνα της λειτουργίας του οργανισμού από τον οποίο προέρχεται. Οι μεταβολίτες είναι τα τελικά προϊόντα σειράς βιοχημικών αντιδράσεων, οι οποίες καθορίζονται από την έκφραση των γονιδίων, τη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών, αλλά και την επίδραση του περιβάλλοντος. Ο χημικός προσδιορισμός των μεταβολιτών καθορίζει την ποιότητα του συνόλου της συστηματικής μελέτης, καθώς και της επακόλουθης χημειομετρικής ανάλυσης. Παράγοντες που επηρεάζουν τον προσδιορισμό των μεταβολιτών αφορούν στο χειρισμό των βιολογικών δειγμάτων στα στάδια της συλλογής, της συντήρησης-φύλαξης (κύτταρα, ιστοί, βιολογικά υγρά), της ομογενοποίησης (ιστοί), της εκχύλισης του αρχικού βιολογικού υλικού και της επανασύστασης του δείγματος προς ανάλυση.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε σε δύο βιολογικά υλικά (κυτταρική καλλιέργεια και ιστός) η επίδραση διαφορετικών χειρισμών στην τελική αποτύπωση των μεταβολιτών. Ως πρότυπο σύστημα κυττάρων επιλέχθηκε η καρκινική κυτταρική σειρά προστάτη ανθρώπου, PC3 και σε επίπεδο ιστού επιλέχθηκε - για λόγους βιοηθικής - ήπαρ από φυσιολογικές όρνιθες. Στην περίπτωση της κυτταρικής καλλιέργειας διερευνήθηκαν δύο πρωτόκολλα αποκόλλησης και συλλογής: (α) η ενζυμική αποκόλληση με επίδραση θρυψίνης και (β) η μηχανική αποκόλληση μετά την καταστολή των κυτταρικών διεργασιών με παγωμένη μεθανόλη. Στην περίπτωση των ιστών δοκιμάστηκαν δύο πρωτόκολλα εκχύλισης των μεταβολιτών: στο πρωτόκολλο Α ο ομογενοποιημένος ιστός εκχυλίστηκε δύο φορές παρουσία όλων των διαλυτών (μεθανόλη/χλωροφόρμιο/νερό) και απομονώθηκαν η πολική και η λιπιδική φάση. Στο πρωτόκολλο Β ο ιστός εκχυλίστηκε δύο φορές με τους πολικούς διαλύτες (μεθανόλη και νερό), το υπερκείμενο συλλέχθηκε και ακολούθησαν δύο εκπλύσεις του πολικού κλάσματος με διχλωρομεθάνιο.

Κριτήρια για την αξιολόγηση των διαφορετικών πρωτοκόλλων αποτέλεσαν το πλήθος των μεταβολιτών, η συγκέντρωσή τους και η παρουσία λιπιδικών αποτυπωμάτων στο πολικό κλάσμα της εκχύλισης. Για την αξιολόγηση ελήφθησαν φάσματα NMR πρωτονίου μίας διάστασης με παραμέτρους που χρησιμοποιούνται σε μελέτες μεταβονομικής στα διαλύματα επανασύστασης των πολικών εκχυλισμάτων των κυττάρων και των ιστών. Στην περίπτωση του κυτταρικού εκχυλίσματος η ενζυμική αποκόλληση μειονεκτεί έναντι της μηχανικής, εκτός της προσθήκης επιπλέον παραγόντων (θρυψίνη), λόγω σημαντικής μείωσης της

συγκέντρωσης των μεταβολιτών. Στην περίπτωση των ιστών η διπλή εκχύλιση του ομογενοποιημένου ιστού με το σύνολο των διαλυτών (πρωτόκολλο Α) πλεονεκτεί έναντι του πρωτοκόλλου Β ως προς την υψηλή συγκέντρωση των μεταβολιτών, αλλά και λόγω της παράλληλης παραλαβής πολικών και λιπιδικών μεταβολιτών.

*Λέξεις-Κλειδιά: μεταβολικό προφίλ, θρυψίνη, πρωτόκολλο εκχύλισης, φασματοσκοπία NMR*

# CELL HARVESTING AND TISSUE EXTRACTION PROTOCOLS ASSESSMENT FOR THE OPTIMAL METABOLOMICS STUDIES SAMPLE PREPARATION

## Abstract

The metabolic profile of a biological system offers a holistic picture of the function of the a living organism. The metabolites are the end products of a series of biochemical reactions, determined from the expression of the genes, the functionality of the proteins, as well as the environmental influence. The chemical identification of the metabolites defines the quality of the systematic study and the chemometric analysis. Factors that affect the metabolites' identification are defined by the manipulations of the biological samples at the stages of collection, storage (cells, tissues, biological fluids), homogenization (tissues), extraction of the initial biological matrices and reconstitution of the samples to be analyzed.

At the present work, we examined the impact of pre-analysis manipulations on two biological samples of different origin (cell culture and tissues) at the final mapping of the metabolome. As a cell model system the human prostate cancer cell line was chosen, PC3, while for tissue model system, liver from normal hens was used for bioethical reasons. In the case of cell culture two protocols of harvesting and collection were assessed: a) enzymatic harvesting with trypsin (trypsinization), commonly used in laboratory practice, and b) direct mechanical harvesting after processes quenching with ice cold methanol. For the tissue samples, two different extraction protocols were examined: a) the metabolites were extracted twice by the simultaneous presence of three solvents (methanol/chloroform/water) and the lipid and polar fractions were collected (protocol A), and b) metabolites were extracted twice by polar solvents (methanol and water), the supernatants were collected and washed-out twice with dichloromethane (protocol B).

Criteria for the assessment of the different protocols were the plethora of the metabolites, their concentration and the presence of lipid fingerprints at the polar fraction of the extraction. $^{1}$H 1D NMR spectra of the reconstituted polar extracts were recorded using the appropriate parameters for metabolomics studies. For the cell extracts, the enzymatic harvesting, besides the addition of extra factors (trypsin), results in intracellular metabolite leakage, as can be judged by the very poor NMR profile, compared to the mechanical harvesting. Concerning the tissue metabolome profiling, the double extraction procedure followed by the parallel collection of polar and lipid metabolites (protocol A) proved to be more efficient compared to the protocol B, which was characterized by reduced metabolites concentration in the recorded NMR spectra.

*Keywords: metabolic profile, trypsin, extraction protocol, NMR spectroscopy*

## 1. Εισαγωγή

Το μεταβολικό προφίλ ενός βιολογικού συστήματος προσφέρει μία ολιστική εικόνα της λειτουργίας του οργανισμού από τον οποίο προέρχεται. Οι μεταβολίτες είναι τα τελικά προϊόντα σειράς βιοχημικών αντιδράσεων, οι οποίες καθορίζονται από την έκφραση των γονιδίων, τη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών, αλλά και την επίδραση του περιβάλλοντος. Ο χημικός προσδιορισμός των μεταβολιτών καθορίζει την ποιότητα του συνόλου της συστηματικής μελέτης, καθώς και της επακόλουθης χημειομετρικής ανάλυσης.

Παράγοντες που επηρεάζουν τον προσδιορισμό των μεταβολιτών αφορούν στο χειρισμό των βιολογικών δειγμάτων στα στάδια της συλλογής, της συντήρησης-φύλαξης (κύτταρα, ιστοί, βιολογικά υγρά), της ομογενοποίησης (ιστοί), της εκχύλισης του αρχικού βιολογικού υλικού και της επανασύστασης του δείγματος για την περαιτέρω ανάλυση.

## 2. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης διαφορετικών χειρισμών σε δύο βιολογικά υλικά (κυτταρική καλλιέργεια και ιστός) στην τελική αποτύπωση των μεταβολιτών μέσω της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Ως πρότυπο σύστημα κυττάρων επιλέχθηκε η καρκινική κυτταρική σειρά προστάτη ανθρώπου, PC3[1] και σε επίπεδο ιστού επιλέχθηκε - για λόγους βιοηθικής - ήπαρ από φυσιολογικές όρνιθες.

## 3. Υλικά και Μέθοδοι

### 3.1 Κύτταρα

Για την κυτταρική καλλιέργεια διερευνήθηκαν δύο πρωτόκολλα αποκόλλησης και συλλογής: (α) η ενζυμική αποκόλληση με την επίδραση θρυψίνης (θρυψινοποίηση) και (β) η μηχανική αποκόλληση μετά την καταστολή των κυτταρικών διεργασιών με παγωμένη μεθανόλη με απόξεση των κυττάρων (cell scraper).

Η κυτταρική σειρά PC-3 (American Type Cell Culture, ATCC) καλλιεργήθηκε σε φλάσκες κυτταροκαλλιεργειών επιφάνειας 75 $cm^2$. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν Dulbecco's modified Eagle's medium F/12 HEPES (DMEM/F12) εμπλουτισμένο με γλουταμίνη 2 mM, στρεπτομυκίνη 100 μg/mL, πενικιλλίνη 100 U/mL, καθώς και εμβρυϊκό βόειο ορό 10% (FBS). Οι κυτταρικές καλλιέργειες επωάστηκαν σε κλίβανο (37 °C, ατμόσφαιρα 5% $CO_2$), με αλλαγή του θρεπτικού μέσου και ανακαλλιέργεια των ζωντανών κυττάρων ανά 2 ημέρες. Τα υλικά κυτταροκαλλιέργειας για την παρασκευή του θρεπτικού υλικού και για τη διαδικασία αποκόλλησης (θρεπτικό υλικό, θρυψίνη EDTA, γλουταμίνη, εμβρυϊκός βόειος ορός, αντιβιοτικά πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη) προμηθεύτηκαν από την εταιρία Gibco. Το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.4 (PBS), που χρησιμοποιήθηκε για την έκπλυση του θρεπτικού υλικού πριν την ανακαλλιέργεια των κυττάρων και πριν τη συλλογή τους, παρασκευάστηκε στο εργαστήριο με τη χρήση κατάλληλων ποσοτήτων φωσφορικού καλίου και φωσφορικού νατρίου.

### 3.2 Ιστοί

Για τις εκχυλίσεις των δειγμάτων ιστού (ήπαρ από φυσιολογικές όρνιθες) χρησιμοποιήθηκαν διαλύτες $CHCl_3$, $CH_2Cl_2$ (DCM) και MeOH, οι οποίοι ήταν βαθμού καθαρότητας HPLC. Πριν την εκχύλιση, οι ιστοί αποθηκεύθηκαν στους -80 °C και οι διαλύτες στους -20 °C, εκτός από το δις απιονισμένο $H_2O$ ($ddH_2O$, +4 °C). Για την ομογενοποίηση των ιστών χρησιμοποιήθηκε ιγδίο και ύπερος κατάλληλου μεγέθους, τα οποία είχαν επίσης φυλαχθεί στους -20 °C. Κατά τη διαδικασία το ιγδίο ήταν τοποθετημένο σε ξηρό πάγο και η

ομογενοποίηση του ιστού έγινε σε κατάλληλη ποσότητα υγρού αζώτου ώστε να αποφευχθούν ενζυμικές αντιδράσεις και αλλοίωση του δείγματος. Η πούδρα του ιστού ζυγίστηκε (~100 mg) και αποθηκεύτηκε στους -80 °C μέχρι τη διαδικασία της εκχύλισης. Για τις εκχυλίσεις χρησιμοποιήθηκαν λουτρό υπερήχων Sonicator Transsonic 460 Elma, αναδευτήρας (vortex) Heidolph REAX 2000 και φυγόκεντρος Hettich zentrifugen universal 32R.

Η εξάτμιση των διαλυτών της εκχύλισης έγινε σε περιστρεφόμενο σύστημα χαμηλής πίεσης (ανάλογα με το διαλύτη) (HT-4X Genevac). Το στερεό υπόλειμμα αποθηκεύτηκε στους -80 °C μέχρι την παρασκευή των δειγμάτων NMR.

### 3.3 Φασματοσκοπία Μαγνητικού Πυρηνικού Συντονισμού (NMR)

Η επανασύσταση των ξηρών πολικών εκχυλισμάτων έγινε σε 600 μL $D_2O$, 10% ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.4 (1.5 M $KH_2PO4/D_2O$, 2 mM $NaN_3$ ως αντιμικροβιακό παράγοντα και 0.1% 1,1,2,2-tetradeutero-3-trimethylsilylpropionic acid, TSP, ως εσωτερικό πρότυπο). 550 μL του ανασυσταμένου διαλύματος μεταφέρθηκαν σε ειδικά σωληνάρια χαλαζία διαμέτρου 5 mm για τη λήψη των φασμάτων NMR.

Τα φάσματα NMR $^1$H μίας διάστασης (1D) ελήφθησαν σε όργανο Avance III 600 MHz (Bruker GmbH, Germany), το οποίο είναι εξοπλισμένο με αυτόματο δειγματολήπτη 60 θέσεων (B-ACS 60) και με ανιχνευτή 5 mm PABBI 1H/D-BB σε θερμοκρασία 27 °C. Για τον έλεγχο και τη σταθεροποίηση της θερμοκρασίας χρησιμοποιήθηκε ψηφιακός ρυθμιστής BVT-3000 με ρυθμό ροής $N_2$ 535 L/h. Για τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε η παλμική αλληλουχία noesygppr 1d (βιβλιοθήκη Bruker), αριθμός σαρώσεων 192 (για τις κυτταρικές καλλιέργειες) και 32 (για τους ομογενοποιημένους ιστούς), RG 90.5, χρόνος μίξης 0.010 sec, χρόνος αποκατάστασης (relaxation time) 4 sec (για τις κυτταρικές καλλιέργειες) και 8 sec (για τους ομογενοποιημένους ιστούς) και με ανάλυση 65536 σημεία. Ακολούθησε μετασχηματισμός Fourier, διόρθωση φάσης, γραμμής βάσης και βαθμονόμηση του άξονα τοποθετώντας την κορυφή συντονισμού των μεθυλίων του εσωτερικού προτύπου TSP στα 0.0 ppm. Η επεξεργασία των φασμάτων έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού TOPSPIN v. 3.1 (Bruker BioSpin).

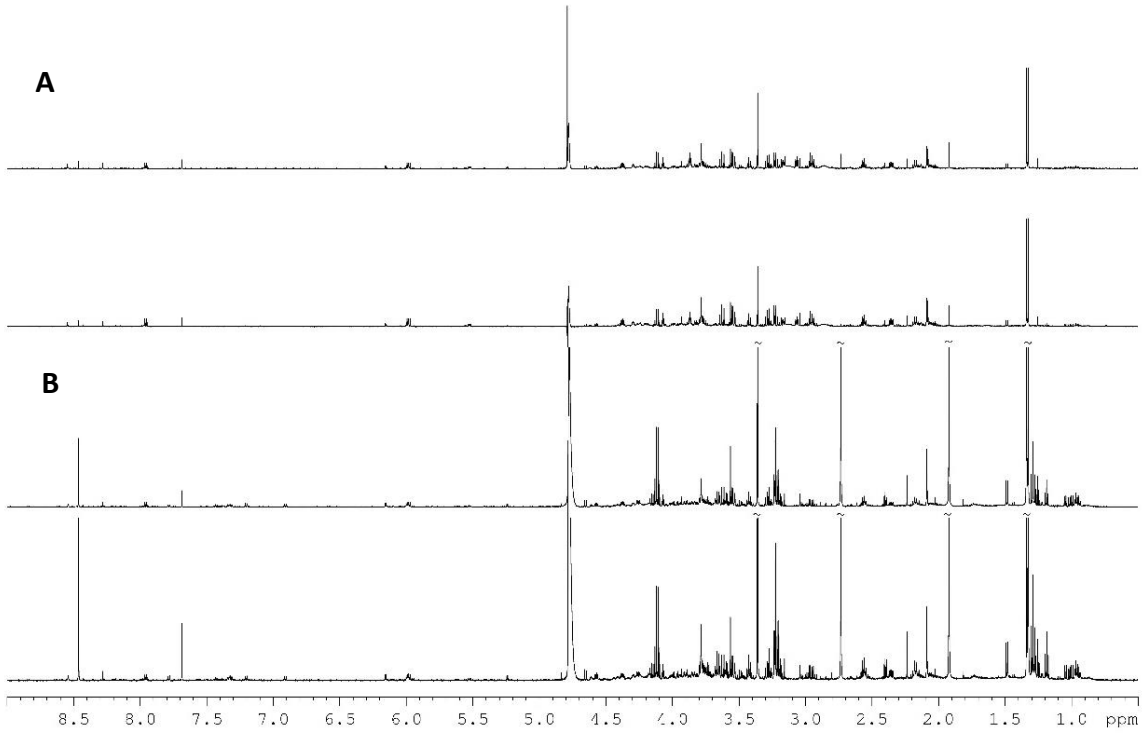
## 4. Αποτελέσματα-Συζήτηση

### 4.1 Κύτταρα

Το πρώτο βήμα στη διαδικασία συλλογής κυττάρων είναι η απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού και των ιχνών του με έκπλυση με διάλυμα φωσφορικών (PBS, pH 7.4) και απόχυση. Στην περίπτωση της ενζυμικής αποκόλλησης, ακολουθεί προσθήκη θρυψίνης (θρυψινοποίηση), αναμονή στον επωαστικό κλίβανο για 5 min, απενεργοποίηση της θρυψίνης με την προσθήκη τετραπλάσιας ποσότητας διαλύματος θρεπτικού με FBS και συλλογή σε σωληνάριο φυγοκέντρισης 15 mL. Το υλικό φυγοκεντρείται στα 1.500 rpm για 3 min στους +4 °C, το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα φυλάσσεται στους -80 °C, έως την εκχύλιση. Στην περίπτωση της μηχανικής αποκόλλησης, προστίθεται PBS, τα κύτταρα συλλέγονται με χρήση «ξύστρας» και το υλικό μεταφέρεται σε σωληνάριο φυγοκέντρισης 15 mL. Ακολουθεί η διαδικασία που περιγράφηκε για την περίπτωση της θρυψίνης.

Η διαδικασία εκχύλισης ήταν κοινή και στις δύο περιπτώσεις και στην **Εικόνα 1** παρουσιάζονται τα φάσματα 1D $^1$H NMR των διαλυμάτων επανασύστασης (Υλ. και Μεθ. 3.3) των πολικών μεταβολιτών που προήλθαν από τις δύο διαφορετικές διαδικασίες συλλογής των κυττάρων. Όπως είναι σαφές, η μηχανική αποκόλληση πλεονεκτεί έναντι της ενζυμικής, με διαφορά στη συγκέντρωση των μεταβολιτών τουλάχιστον μίας τάξης μεγέθους. Επίσης, η

προσθήκη επιπλέον παραγόντων (θρυψίνη), αποτελεί ένα πρόσθετο αρνητικό της ενζυμικής αποκόλλησης.




**Εικόνα 1.** *Φάσματα 1D $^1H$ NMR των πολικών εκχυλισμάτων της κυτταρικής σειράς PC3. Α) Η αποκόλληση των κυττάρων έγινε με τη χρήση θρυψίνης (θρυψινοποίηση) (δύο επαναλήψεις), Β) η αποκόλληση των κυττάρων έγινε με μηχανική απόξεση των κυττάρων (δύο επαναλήψεις).*

## 4.2 Ιστοί

Μελετήθηκαν δύο πρωτόκολλα εκχύλισης σε ομογενοποιημένο ιστό βάρους ~100 mg. Η ομογενοποίηση των ιστών έγινε με τη χρήση υγδίου και ύπερου σε ξηρό πάγο με τη βοήθεια κατάλληλης ποσότητας υγρού αζώτου. Τα δύο πρωτόκολλα που ελέγχονται έχουν προταθεί απο το ίδιο εργαστήριο.

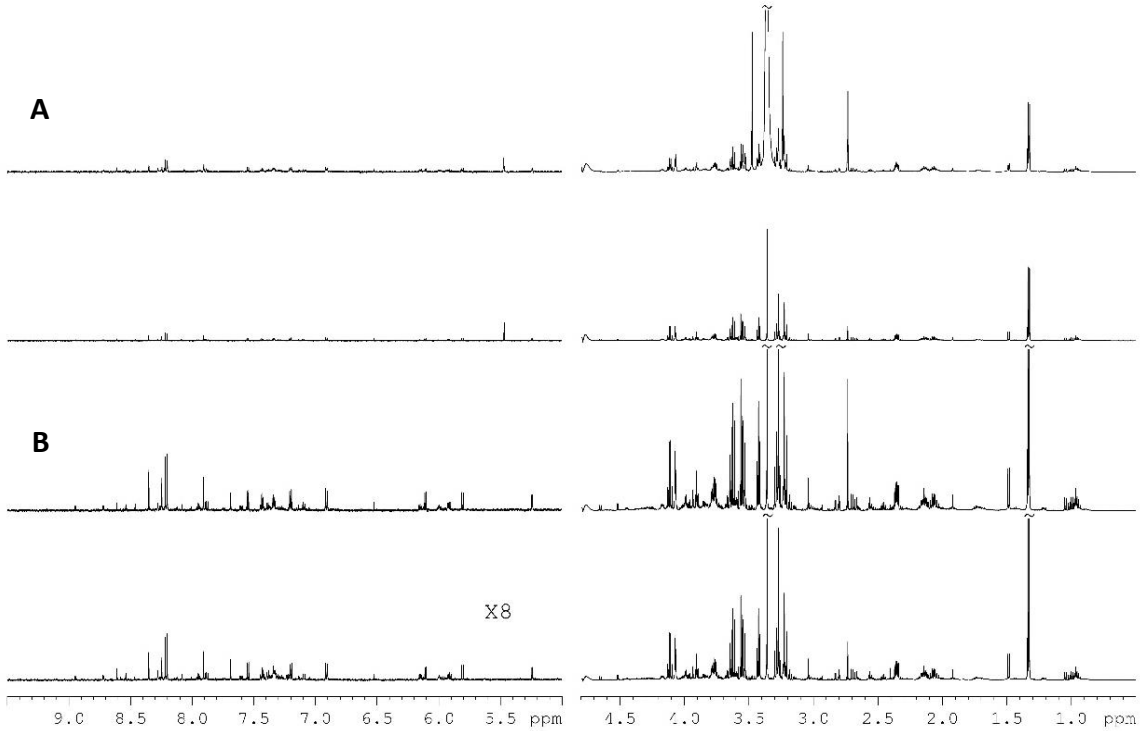
Βάσει του πρωτοκόλλου Α[2] η εκχύλιση επαναλαμβάνεται δύο φορές στο σύνολο του ιστού από σύστημα τριών διαλυτών ($CHCl_3$/MeOH/dd$H_2O$). Αναλυτικά, στον ομογενοποιημένο ιστό, προστίθεται διάλυμα $CHCl_3$/MeOH σε αναλογία 2:1 (1 mL/100 mg ιστού), παραμονή σε λουτρό υπερήχων για 5 min και προσθήκη ίσης - προς το άθροισμα των δύο διαλυτών - ποσότητας dd$H_2O$ βαθμού. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση (vortex) για 1 min ώστε να σχηματιστεί γαλάκτωμα και παραμονή στον πάγο για 15 min, βήμα που βοηθάει στο διαχωρισμό των δύο στιβάδων, φυγοκέντριση των δειγμάτων για 15 min στους 4500 rpm στους 4 °C και συλλογή των δύο στιβάδων (πολική και λιπιδική). Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και τα κλάσματα των δύο εκχυλίσεων ενώνονται, λυοφιλοποιούνται και φυλάσσονται σε ξηρή μορφή στους -80 °C.

Βάσει του πρωτοκόλλου Β, στους ομογενοποιημένους ιστούς (~100 mg) προστίθεται MeOH/dd$H_2O$ σε αναλογία 1:1 (1 mL/100 mg ιστού), παραμονή σε λουτρό υπερήχων για 5 min, φυγοκέντριση για 15 min στα 13500 rpm στους 4 °C και λήψη του υπερκείμενου. Στο υπόλειμμα του ιστού επαναλαμβάνεται η διαδικασία εκχύλισης και τα υπερκείμενα

διαλύματα των δύο επαναλήψεων ενώνονται. Για την έκπλυση του υπερκείμενου από λιπίδια, προστίθεται DCM (500 μL/100 mg ιστού), και το μείγμα αναδεύεται ισχυρά (vortex) για 1 min ώστε να δημιουργηθεί γαλάκτωμα. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 15 min στα 13500 rpm στους 4 °C και λαμβάνεται η ανώτερη στιβάδα (πολική) στην οποία προστίθεται εκ νέου DCM. Το πολικό εκχύλισμα συλλέγεται, λυοφιλοποιείται και φυλάσσεται στους -80 °C έως τη διαδικασία επανασύστασης και μελέτης με NMR. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να σημειωθεί ότι λόγω των μικρότερων όγκων που χρησιμοποιούνται στο πρωτόκολλο Β ήταν δυνατή η φυγοκέντρηση των δειγμάτων σε υψηλότερα rpm (πρωτόκολλο Α: 4500 rpm, πρωτόκολλο Β: 13500 rpm).

Συνοψίζοντας τις διαφορές των δύο πρωτοκόλλων, στο πρωτόκολλο Α η εκχύλιση του ιστού γίνεται παρουσία όλων των διαλυτών (πολικός, μεσαίας πολικότητας και μη πολικός), επαναλαμβάνεται δύο φορές και συλλέγεται τόσο η πολική, όσο και η λιπιδική φάση. Αντίθετα, στο πρωτόκολλο Β ο ομογενοποιημένος ιστός εκχυλίζεται δύο φορές μόνο από τον πολικό και τον μεσαίας πολικότητας διαλύτη (MeOH/dd$H_2O$) και ο μη πολικός διαλύτης (DCM) χρησιμοποιείται μόνο για τον καθαρισμό της πολικής φάσης από λιπιδια.

Στην **Εικόνα 2** παρουσιάζονται τα φάσματα 1D $^1$H NMR των διαλυμάτων επανασύστασης των πολικών μεταβολιτών που προέκυψαν από τα δύο πρωτόκολλα εκχύλισης. Η διπλή εκχύλιση του ομογενοποιημένου ιστού με το σύνολο των διαλυτών (πρωτόκολλο Α) πλεονεκτεί έναντι του πρωτοκόλλου Β ως προς την υψηλή συγκέντρωση των μεταβολιτών στα φάσματα, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 2**, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στον μεγαλύτερο όγκο των διαλυτών αλλά επιπροσθέτως και λόγω της παράλληλης παραλαβής πολικών και λιπιδικών μεταβολιτών για τη συλλογή επιπλέον πληροφοριών.




**Εικόνα 2.** *Φάσματα 1D $^1$H NMR των υδατικών εκχυλισμάτων ιστών ήπατος Α) χρήση του πρωτοκόλλου Β (δύο επαναλήψεις), και Β) χρήση του πρωτοκόλλου Α (δύο επαναλήψεις). Η ένταση των φασμάτων στην περιοχή 9.5-5.0 ppm έχει ένταση αυξημένη κατά έναν παράγοντα 8 σε σχέση με την αλειφατική περιοχή.*

## 5. Συμπεράσματα

Η μεταβονομική αποτελεί ένα μοναδικό εργαλείο για τη μελέτη της βιολογίας συστημάτων και η συμβολή της στη διάγνωση και πρόγνωση ασθενειών είναι εξαιρετικής σημασίας. Στην παρούσα εργασία συγκρίνονται χειρισμοί και πρωτόκολλα που αφορούν στην προετοιμασία δειγμάτων μεταβονομικών μελετών με στόχο την ανάκτηση της μέγιστης δυνατής πληροφορίας από τα υπό μελέτη συστήματα. Στην περίπτωση της κυτταρικής καλλιέργειας (PC3) η μηχανική αποκόλληση των κυττάρων πλεονεκτεί έναντι της ενζυμικής (θρυψίνη) ως προς τη συγκέντρωση των μεταβολιτών στο τελικό δείγμα αλλά και διότι αποφεύγεται η προσθήκη επιπλέον παραγόντων (θρυψίνη). Στην περίπτωση ιστών (ήπαρ) το πρωτόκολλο εκχύλισης με την ταυτόχρονη παρουσία πολικών και μη πολικών διαλυτών (μεθανόλη-νερό-χλωροφόρμιο) οδηγεί στην παρασκευή δειγμάτων υψηλότερης συγκέντρωσης μεταβολιτών σε σύγκριση με την εκχύλιση του ιστού από το διάλυμα μεθανόλης-νερού.

Η παρούσα συγκριτική μελέτη παρέχει σημαντικές πληροφορίες όσον αφορά στη συλλογή δειγμάτων κυτταρικών καλλιεργειών και εκχύλισης ιστών, για την παρασκευή δειγμάτων υψηλής ποιότητας για μεταβονομικές μελέτες.

## 6. Βιβλιογραφία

1. Kaighn M.E. *et al*. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3), *Invest. Urol*. **1979**, 17, 16-23

2. Keun, H.C. and Athersuch, T.J. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)-Based Metabolomics *in* Metabolic Profiling T.O. Metz (ed.), Methods in Molecular Biology **2011**, 708, 321-334