Anna Jurczyk

Znaczenie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego w ocenie zaburzeń metabolizmu fosfolipidów w chorobach rozrostowych krwi.

ROZPRAWA DOKTORSKA

Promotor: Dr hab. mgr fiz. Małgorzata Kuliszkiewicz - Janus

Wrocław 2003

Mojej Promotor - Wielce Szanownej Pani

Dr hab. mgr fiz.

Małgorzacie Kuliszkiewicz – Janus

składam serdeczne podziękowania za życzliwość, pomoc i cenne wskazówki udzielone mi podczas tworzenia tej pracy oraz za naukę życia i hematologii.

Wielce Szanownym Państwu

Mgr fiz. Stanisławowi Baczyńskiemu

i Mgr anal. Iwonie Prajs

serdecznie dziękuję za pomoc w wykonaniu części doświadczalnej pracy.

Wielce Szanownemu Panu

Dyrektorowi i Ordynatorowi Oddziału Kardiologii

Szpitala Im. Dr A. Sokołowskiego w Wałbrzychu

Dr nauk med.

Romanowi Szełemejowi

serdecznie dziękuję za umożliwienie przeprowadzenia przewodu doktorskiego.

Autorka

Spis treści

1. Wstęp 5
1.1. Fosfolipidy 5
1.2. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego 16
1.3. Fosfolipidy w chorobach nowotworowych 22

2. Cel pracy..... 27

3. Materiał i metody 28
3.1. Materiał 28
3.2. Metody 29
3.2.1. Ekstrakty fosfolipidów z komórek i osocza 29
3.2.2. Spektroskopia NMR 30
3.2.3. Substancja wzorcowa 31
3.2.4. Wyznaczanie stężeń fosfolipidów na podstawie widma fosforowego 32
3.2.5. Identyfikacja linii rezonansowych pochodzących od fosfolipidów uzyskanych w widmach ^{31}P NMR z ekstraktów komórek jednojądrzastych i z ekstraktów osocza 34
3.2.6. Metody statystyczne 44

4. Wyniki 46
4.1. Widma ^{31}P NMR fosfolipidów z ekstraktów komórek jednojądrzastych 46
4.1.1. Sfingomielina 48
4.1.2. Plazmalogen fosfatydylocholiny 51
4.1.3. Fosfatydylocholina 52

4.1.4. Fosfatydyloinozytol i fosfatydyloetanolamina 54
4.1.5. Lizofosfatydylocholina 55
4.1.6. Fosfatydyloseryna 56
4.1.7.Kardiolipina 57
4.2. Porównanie widm ^{31}P NMR fosfolipidów z ekstraktów komórek jednojądrzastych z ekstraktami z osocza 58
4.2.1. Porównanie widm ^{31}P NMR fosfolipidów z ekstraktów komórek jednojądrzastych z ekstraktami z osocza grupy kontrolnej 58
4.2.2. Porównanie widm ^{31}P NMR fosfolipidów z ekstraktów komórek jednojądrzastych z ekstraktami z osocza osób z rozpoznaniem ostrej białaczki 60
4.2.3. Sfingomielina 67
4.2.4. Plazmalogen fosfatydylocholiny 68
4.2.5. Lizofosfatydylocholina 69
4.2.6. Fosfatydylocholina 71
4.2.7. Fosfatydyloinozytol i fosfatydyloetanolamina 72
4.2.8. Fosfatydyloseryna 74
4.2.9. Kardiolipina 75

5. Dyskusja 76

6. Wnioski 86

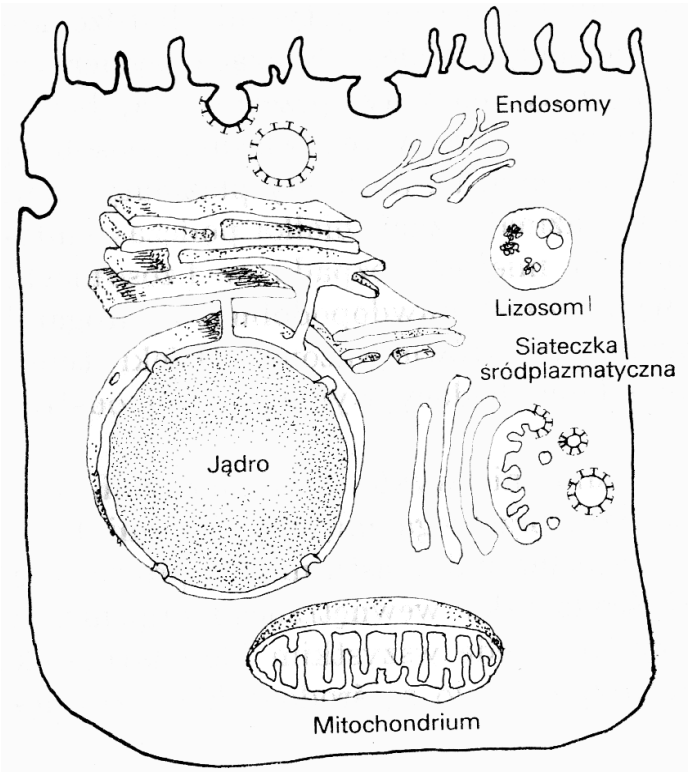
7. Skróty użyte w tekście 89

8. Piśmiennictwo 91

1. Wstęp.

1.1. Fosfolipidy.

Fosfolipidy stanowią istotny składnik błon biologicznych. Błony otaczają komórkową cytoplazmę oraz występują wewnątrzkomórkowo w tworach subkomórkowych takich jak: mitochondria, siateczka śródplazmatyczna, aparat Golgiego, lizosomy, ziarnistości wydzielnicze, jądro komórkowe (Ryc. 1).



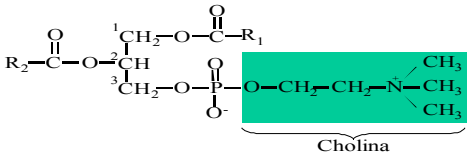
Ryc. 1. Schemat budowy komórki.

Fosfolipidy występują we wszystkich komórkach ustroju, determinują przepuszczalność i płynność błon, a przez wiązanie rybosomów ze strukturami membranowymi wywierają wpływ na replikację DNA, biorąc udział w syntezie białka. Są one również istotnym składnikiem kompleksów lipoproteinowych. Występując na powierzchni cząsteczek lipoprotein, stabilizują je w środowisku wodnym, jakim jest osocze [63, 35].

Fosfolipidy, ze względu na występujący w ich składzie alkohol, można podzielić na glicerofosfolipidy (fosfoglicerydy), w których alkoholem jest glicerol oraz sfingofosfolipidy (sfingomieliny), gdzie alkoholem jest sfingozyna. Fosfoglicerydy są estrami glicerolu i kwasu fosforowego, w skład których wchodzą ponadto kwasy tłuszczowe oraz zasady organiczne zawierające azot [63, 64]. Większość fosfolipidów zawiera dwa łańcuchy kwasów tłuszczowych, najczęściej jeden łańcuch kwasu tłuszczowego nasyconego i jeden kwasu tłuszczowego nienasyconego. Wśród kwasów tłuszczowych nasyconych przeważają kwas palmitynowy i stearynowy, a wśród nienasyconych - kwasy: oleinowy, linolowy i α - linolenowy. Najczęściej fosfolipidy mają nasycony rodnik acylowy przy węglu C1, a rodnik nienasycony przy węglu C2 glicerolu.

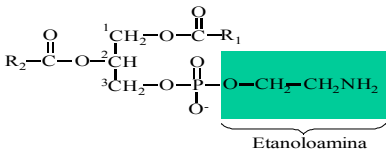
Fosfolipidy posiadają dwa bieguny: hydrofilny i hydrofobowy. Zasada organiczna zawierająca azot w cząsteczce fosfolipidu tworzy jego biegun hydrofilny, który decyduje o powinowactwie do wody. Natomiast dwa łańcuchy kwasów tłuszczowych tworzą biegun hydrofobowy, decydujący o płynności cząsteczki fosfolipidu. W dwuwarstwowych błonach komórkowych bieguny hydrofilne skierowane są na zewnątrz, zaś łańcuchy kwasów tłuszczowych skierowane są ku sobie [63].

Fosfatydylocholina (PC, lecytyna). Fosfogliceryd zawierający cholinę, który stanowi ilościowo główny składnik błon komórkowych (Ryc. 2). Cholina stanowi czwartorzędową zasadę amoniową i w związku z tym ma dodatni ładunek elektryczny. W zależności od pH, na grupie fosforanowej może występować ładunek ujemny i dlatego PC może tworzyć jon obojnaczy (dipol). Wiązania estrowe kwasów tłuszczowych w cząsteczce lecytyny są słabe, natomiast wiązanie estrowe kwasu glicerofosforowego jest bardzo mocne [63, 64, 66].

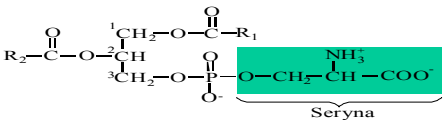


Ryc. 2. Fosfatydylocholina.

Fosfatydyloetanolamina (PE) i fosfatydyloseryna (PS) [kefaliny]. Różnią się one od PC składnikiem azotowym. W fosfatydyloetanolaminie zamiast choliny występuje aminoalkohol – etanolamina (kolamina) (Ryc. 3), w fosfatydyloserynie – aminokwas seryna (Ryc. 4) [63, 64, 66]. PE stanowi około 30-40% fosfolipidów błon komórek zwierzęcych. W odróżnieniu od PC, charakteryzuje się zdolnością tworzenia struktur heksagonalnych w dwuwarstwach lipidowych. Cecha ta ma znaczenie w regulacji aktywności integralnych białek błonowych.[66].



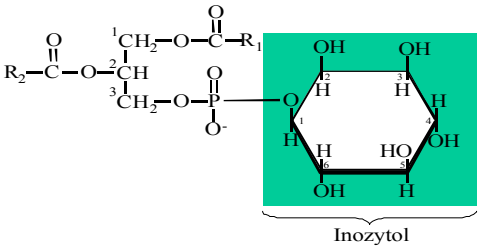
Ryc. 3. Fosfatydyloetanolamina.



Ryc. 4. Fostatydyloseryna.

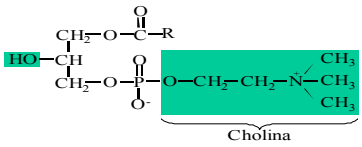
Fosfatydyloinozytol (PI). Fosfolipidy inozytolowe stanowią około 5% wszystkich fosfolipidów błon komórki. Wśród nich głównym związkiem jest fosfatydyloinozytol (90%). Pozostałe stanowią niewielki procent wszystkich fosfolipidów błonowych. Cechą charakterystyczną PI jest występowanie w jego cząsteczce kwasu arachidonowego (Ryc. 5). Największą część PI stanowią związki zawierające kwas stearynowy w pozycji 1, a arachidonowy w pozycji 2 szkieletu glicerolowego. Z fosfatydyloinozytolu pod wpływem kinaz może być wytworzony poprzez fosforylację fosfatydyloinozytolofosforan i fosfatydyloinozytolodwufosforan [6]. Ten ostatni pod

wpływem substancji sygnałowych jest hydrolizowany do dwuacyloglicerolu (DG) oraz trójfosfoinozytolu – dwóch wtórnych przekaźników informacji [6, 64].



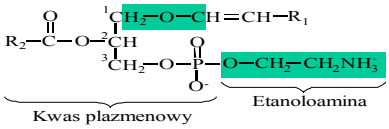
Ryc. 5. Fosfatydyloinozytol.

Lizofosfatydylocholina (LPC) i lizofosfatydyloetanolamina (LPE) [lizofosfolipidy]. Fosfolipidy te to produkty rozpadu PC i PE, zawierające tylko jedną resztę kwasu tłuszczowego w pozycji C1 (Ryc. 6) [63, 64].



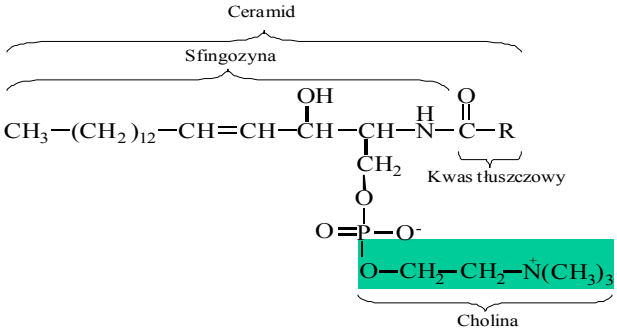
Ryc.6. Lizofosfatydylocholina.

Plazmalogeny. Różnią się one od PC czy PE tym, że w miejscu jednego kwasu tłuszczowego znajduje się aldehyd związany eterowo z węglem w pozycji C1 (eter alkylowy lub alkenylowy). Plazmalogeny mogą zawierać w swej cząsteczce cholinę (CPLAS), etanolaminę (EPLAS, Ryc.7) lub serynę [63, 64]. Wiązania eterowe w plazmalogenach nie są łatwo rozbijane przez lipazy, dlatego fosfolipidy eterowe mogą gwarantować stabilność błon komórkowych [11, 23, 55, 65, 83].



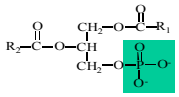
Ryc. 7. Plazmalogen fosfatydyloetanolaminy /1-alkenyl, 2-acetylofosfatydyloetanolamina/ [EPLAS].

Sfingomielina (SM). Jest to jeden z głównych fosfolipidów tworzących dwuwarstwę lipidową błon. Ma ona zdolność usztywniania błon. Cząsteczka SM nie zawiera glicerolu, zbudowana jest z ceramidu i fosforylocholiny. Ceramid składa się ze sfingozyny (aminoalkoholu) i kwasu tłuszczowego (Ryc. 8). Cząsteczki sfingomieliny charakteryzują się obecnością długołańcuchowych kwasów tłuszczowych nasyconych lub mononienasyconych, o długości łańcucha od 16 do 24 atomów węgla [64, 71].

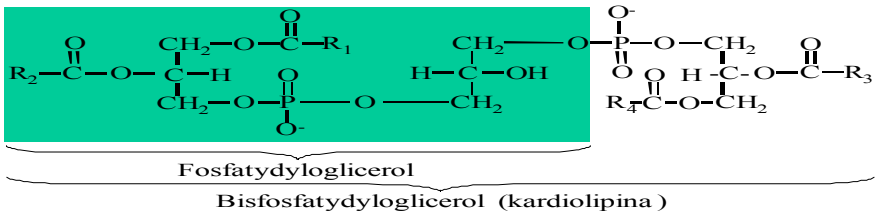


Ryc. 8. Sfingomielina.

Kwas fosfatydowy (PA) (Ryc. 9) jest prekursorem fosfatydyloglicerolu, który w mitochondriach ulega przekształceniu w **kardiolipinę (CL)** (Ryc. 10), będącą istotnym składnikiem błon mitochondrialnych [64].

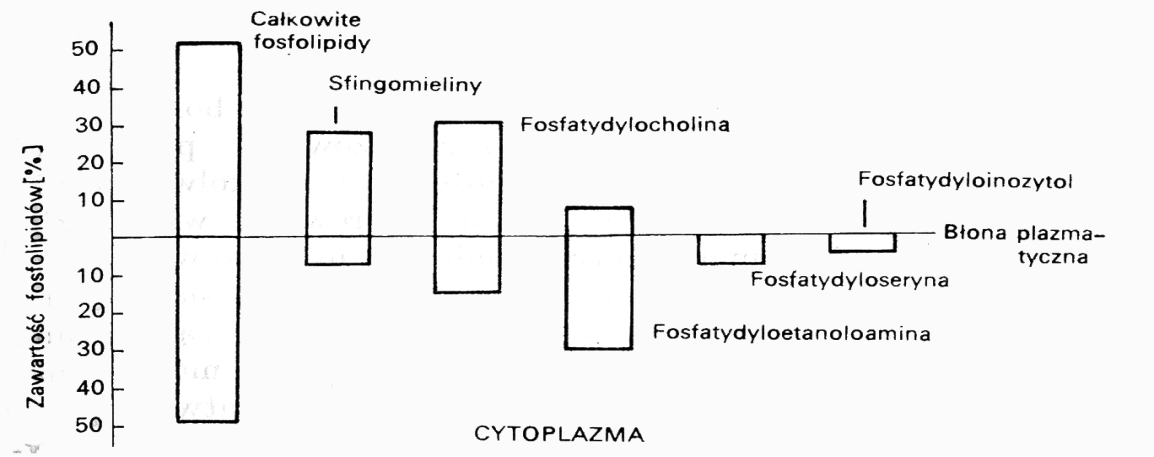


Ryc. 9. Kwas fosfatydowy.



Ryc. 10. Kardiolipina.

W błonach komórkowych istnieje asymetria poprzeczna w rozmieszczeniu fosfolipidów. Fosfolipidy zawierające cholinę (PC i SM) wystepują głównie w warstwie zewnętrznej, natomiast aminofosfolipidy (PE, PS i PI) występują w warstwie wewnętrznej błon komórkowych (Ryc. 11). PC stanowi około 50% wszystkich fosfolipidów błon [63].



Ryc.11. Rozmieszczenie fosfolipidów w monowarstwie zewnętrznej i wewnętrznej błony krwinki czerwonej.

W osoczu zdrowego człowieka największy procentowy udział ma PC, następnie SM, LPC i PE (Tab.1) [63].

Fosfatydyloinozytol oraz plazmalogeny występują w osoczu w znikomych ilościach. Fosfatydyloseryna występuje głównie w tkankach, a CL jest istotnym składnikiem błon mitochondrialnych.

EPLAS występuje głównie w mielinie, a CPLAS w mięśniu sercowym, w nasieniu, a także w ukladzie nerwowym, płytkach krwi oraz erytrocytach. 1-alkyl, 2-acetylfosfatydylocholina jest czynnikiem aktywującym płytki (PAF = platelet activating factor), odgrywającym istotną rolę w procesach zapalnych, odpornościowych oraz w agregacji płytek [8, 23, 65].

Istnieją też doniesienia, że LPC jest silnym czynnikiem chemotaktycznym dla monocytów [69].

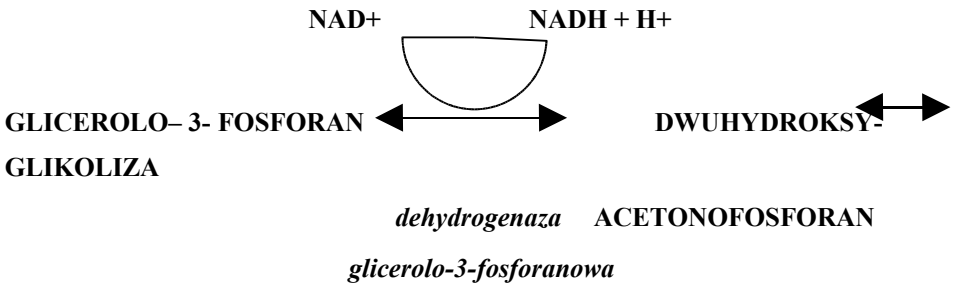
Tab.1. Stężenie poszczególnych fosfolipidów w osoczu zdrowego człowieka.
(za Michalik A. i wsp. „ Lipidy i lipoproteiny osocza", 1999).

Rodzaj fosfolipidu	**Stężenie w osoczu [mg/100ml]**	**Procentowy udział w puli fosfolipidow osocza [%]**
Fosfatydylocholina (lecytyna) **PC**	132±38	66±9
Sfingomielina **SM**	43±12	22±5
Lizofosfatydylocholina (lizolecytyna) **LPC**	19±12	9±7
Fosfatydyloetanolamina (kefalina) **PE**	6±2	3±1

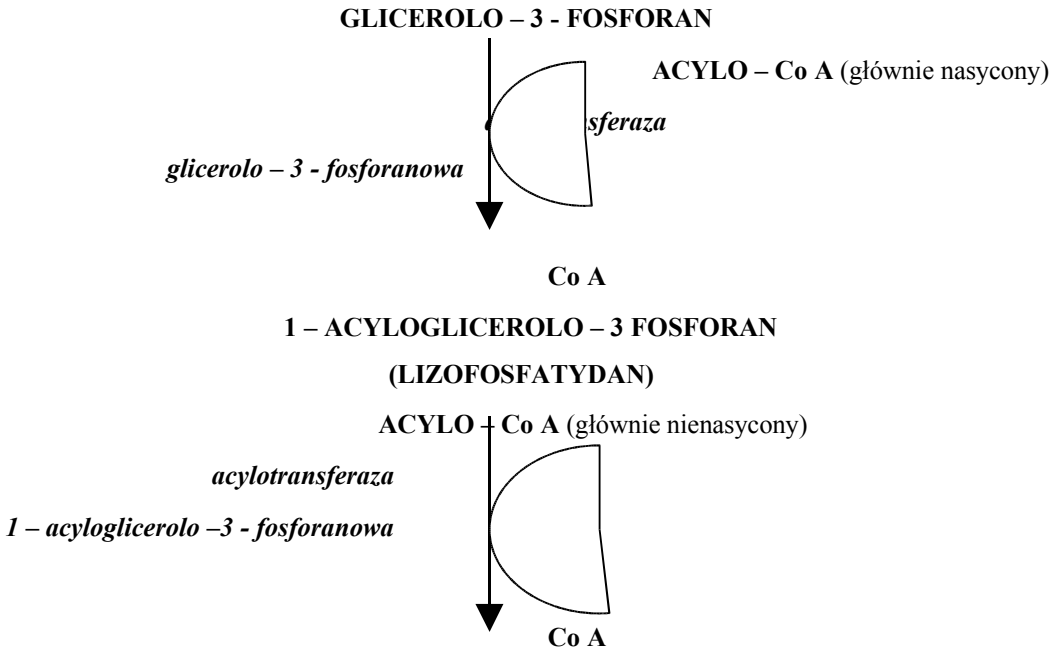
Fosfolipidy są integralną częścią struktur błonowych. Wszystkie więc komórki mają zdolność do ich syntetyzowania. Dla potrzeb całego ustroju fosfolipidy są wytwarzane w wątrobie i w mniejszym stopniu – w nabłonku jelitowym.

Biosynteza fosfolipidów odbywa się przy udziale trójfosfonukleotydów (ATP i CTP). Materiałem wyjściowym w syntezie fosfolipidów jest 3- glicerofosforan. Powstaje on przez przeniesienie grupy fosforanowej na glicerol:

albo przez redukcję dwuhydroksyacetonofosforanu:



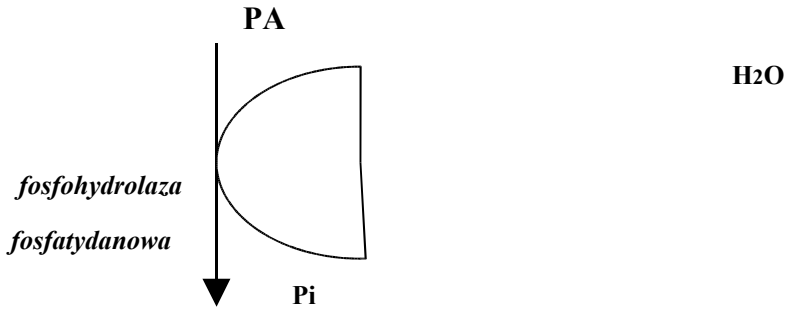
Następnie dochodzi do estryfikacji glicerolofosforanu przez zaktywowane, to znaczy połączone z acylo – CoA, długołańcuchowe kwasy tłuszczowe celem wytworzenia kwasu fosfatydowego (PA).



1,2 - DWUACYLOGLICEROLOFOSFORAN

[FOSFATYDAN, KWAS FOSFATYDOWY (PA)]

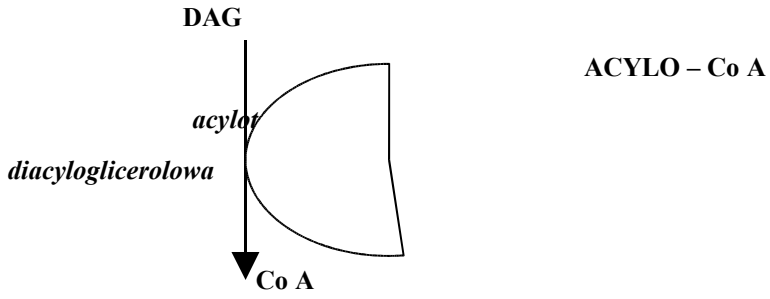
Dalszym etapem jest defosforylacja kwasu fosfatydowego:



1,2 - DWUACYLOGLICEROL

(DAG; DG)

Powstały dwugliceryd może przyłączyć trzecią grupę acylową do węgla w pozycji 3, w wyniku czego powstaje trójacyloglicerol:



TAG

(TRÓJACYLOGLICEROL)

lub z udziałem transferazy może być wprowadzona do węgla w pozycji 3 fosforylowana zasada – cholina lub etanolamina z wytworzeniem fosfatydylocholiny (PC) lub fosfatydyloetanolaminy (PE):

DAG

CYTYDYNODWUFOSFORYLOCHOLINA
CDP – CHOLINA
/CDP - ETANOLAMINA/

diacyloglicerolotransferaza

fosforylocholinowa

(fosforyloetanolaminowa)

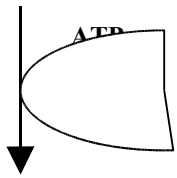
CMP

PC lub PE

FOSFATYDYLOCHOLINA / FOSFATYDYLOETANOLAMINA

Synteza fosfolipidów może przebiegać z aktywacją choliny lub etanolaminy. Ten mechanizm ma na celu wykorzystanie zasad azotowych, które powstają w czasie degradacji fosfolipidów [63, 64].

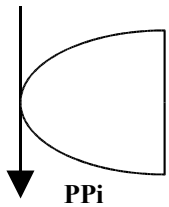
CHOLINA / ETANOLAMINA



ADP

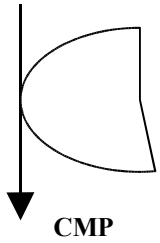
FOSFORYLOCHOLINA (PCho) / FOSFORYLOETANOLAMINA (PEtn)/

CTP



CYTYDYNODWUFOSFORYLOCHOLINA/CYTYDYNODWUFOSFORYLOETANOLAMINA/

(CDP –CHOLINA/ CDP – ETANOLAMINA)



(FOSFATYDYLOCHOLINA/FOSFATYDYLOETANOLAMINA)

(PC / PE)

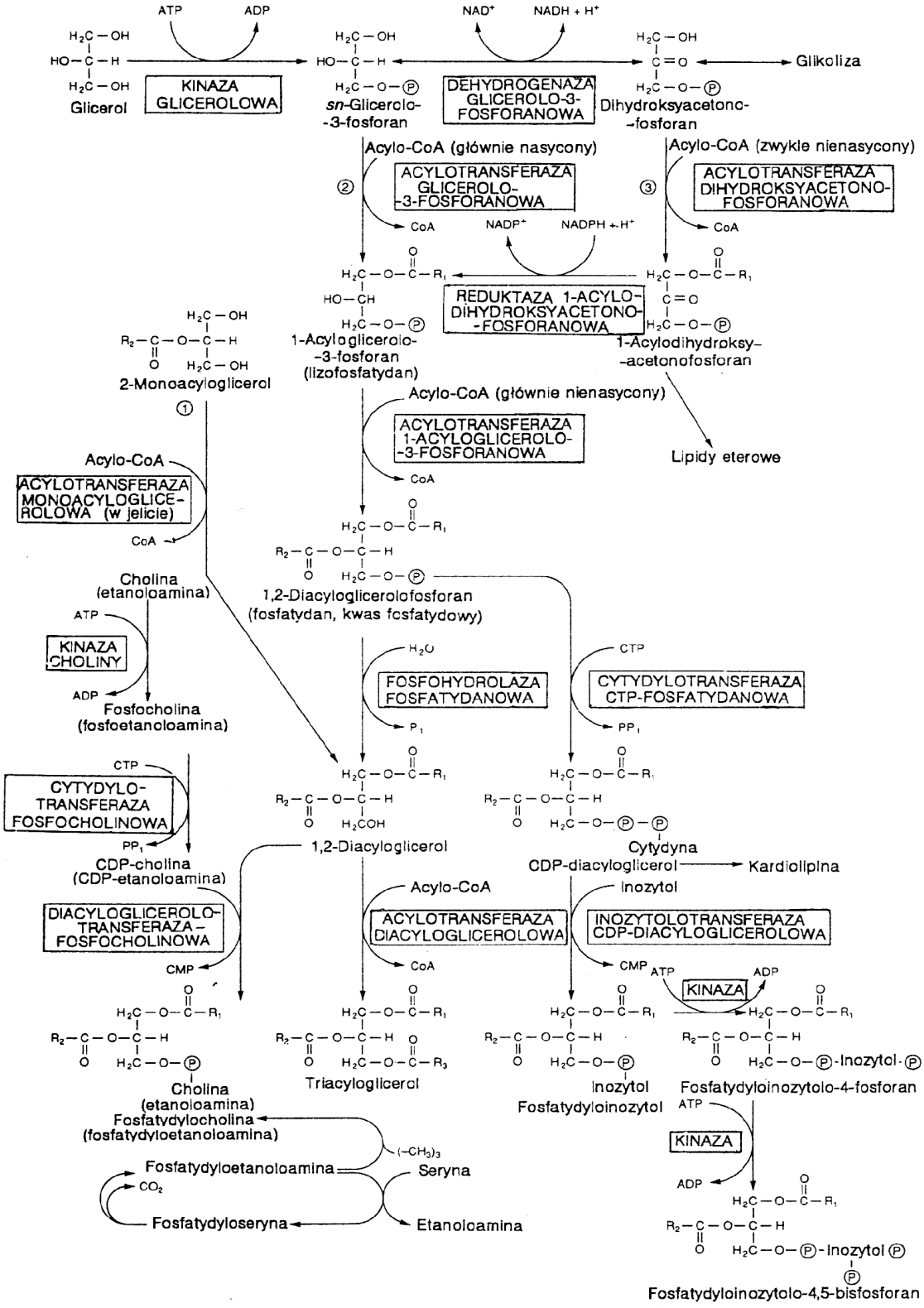
Uważa się, że najwięcej PE powstaje z przemian:

etanolamina → fosforyloetanolamina → CDP-etanolamina → PE.

Mniejsza pula (10%), różniąca się od poprzedniej składem kwasów tłuszczowych, powstaje w wyniku reakcji wymiany seryny lub choliny na etanolaminę w polarnej części fosfolipidów retikulum endoplazmatycznego. Trzecia pula PE jest syntetyzowana w błonach mitochondriów w reakcji dekarboksylacji PS. PS jest syntetyzowana w retikulum endoplazmatycznym wyłącznie w reakcji wymiany zasad, skąd jest transportowana z powrotem do błon mitochondrialnych. Pule PE powstające

w siateczce śródplazmatycznej stanowią substrat do resyntezy cząsteczek PS, a pula mitochondrialna jest transportowana do retikulum endoplazmatycznego, gdzie ulega metylacjido PC [66].

Ogólny schemat biosyntezy fosfolipidów przedstawiono na rycinie 12



Ryc.12. Biosynteza triacyloglicerolu i fosfolipidów (za Murray R.K. i wsp. „Biochemia Harpera”, 1995).

1.2. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego.

Fizyczną podstawę spektroskopii NMR (Nuclear Magnetic Resonance) stanowi zjawisko magnetyzmu jądrowego wynikające z faktu, iż jądra atomowe większości pierwiastków posiadają różny od zera moment magnetyczny związany z kolei z ich ruchem obrotowym wokół własnej osi zwany spinem (momentem pędu). Zależność wiążąca te dwie wielkości fizyczne przyjmuje postać

$$\mu = \gamma \hbar \mathbf{I} \qquad \text{(A)}$$

gdzie oczywiście:

μ - to moment magnetyczny jądra

I – to moment pędu (spin)

$\hbar = h/2\pi$ - jednostka którą wyraża się wielkość spinu

γ - to definiowany tą zależnością współczynnik giromagnetyczny, który właśnie jest wielkością charakterystyczną dla danego rodzaju jądra.

h – to stała Plancka

W polu magnetycznym o wartości indukcji magnetycznej **B** na jądro obdarzone momentem magnetycznym μ działa moment siły $\mathbf{M}_s$ (bo wielkości **B** i μ są wielkościami wektorowymi), natomiast energia oddziaływania momentu μ z polem magnetycznym dana jest przez zależność

$$E = -\mu \mathbf{B} \qquad \text{(B)}$$

Na podstawie, tymczasem, znanej w dynamice ruchu obrotowego zależności stwierdzającej, że zmiana momentu pędu ciała równa jest działającemu na to ciało momentowi siły ($\mathbf{M}_s = d\mathbf{I}/dt$). Z zależności (A) i (B) otrzymuje się równanie opisujące ruch wektora jądrowego momentu magnetycznego w polu magnetycznym.

$$d\mu/dt = \gamma\mu \times \mathbf{B}$$

(C)

Wówczas gdy pole B jest jednorodne i stałe, wektor jądrowego momentu magnetycznego μ wykonuje precesję wokół kierunku wyznaczonego przez wektor **B** z tzw. prędkością kątową ω daną przez wyrażenie, że

$$\omega = -\gamma\mathbf{B}$$

[rad/s]

(D)

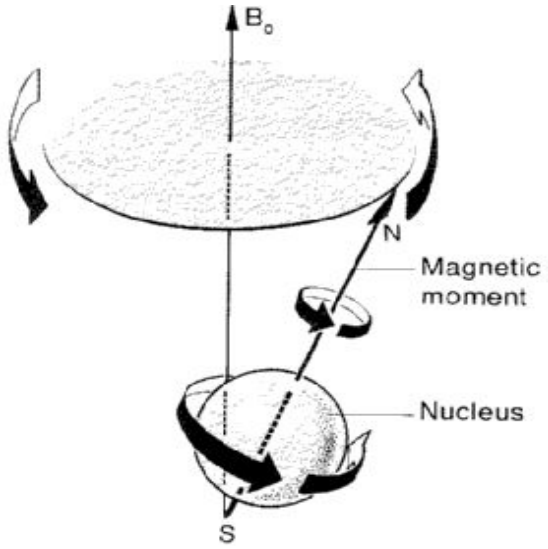
albo w jednostkach częstotliwości

/

$$\nu = \gamma\mathbf{B}/2\pi = \gamma\mathbf{B}$$

(E)

Precesja ta nosi nazwę precesji Larmora, a równanie (D) opisuje kierunek i zwrot wektora prędkości kątowej precesji (Ryc. 13).



Ryc.13. Precesja momentu magnetycznego jądra atomowego wokół kierunku stałego pola magnetycznego o indukcji B_0 (za Rinck P.A. „An introduction to Magnetic resonance in Medicine", 1990).

Samo zjawisko ruchu precesyjnego wynika ze znanego w fizyce prawa zachowania momentu pędu I - tzn., że ilekroć obiekt (jądro w całości, elektron czy inna cząstka) posiadające moment magnetyczny μ (związany oczywiście z momentem pędu – spinem)

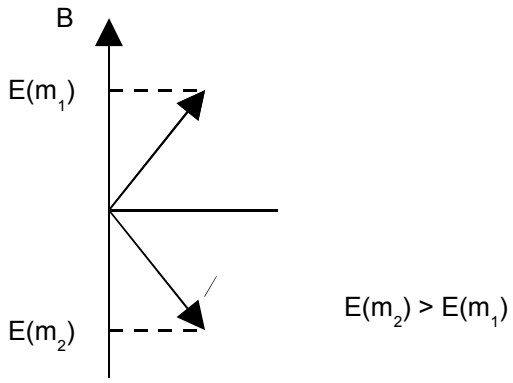
umieścimy w zewnętrznym polu magnetycznym B, to tylekroć moment magnetyczny będzie wykonywał ruch precesyjny o określonej częstości.

Dowolne jądro atomowe (dowolnego pierwiastka) posiadające różny od zera moment pędu (wypadkowy) spin I może przyjmować w polu magnetycznym jedynie 2I + 1 dozwolonych orientacji (zgodnie z regułami kwantowo – mechanicznymi), a rzut spinu na kierunek wektora B ma wartość I= mh, gdzie kwantowa liczba magnetyczna przybiera wartość m = { -I, -I+1, ... , I – 1, I}.

Każdej orientacji jądra odpowiada określona wartość energii oddziaływania z polem magnetycznym wyrażająca się zależnością

$$E_m = -\gamma hBm \qquad (F)$$

np. zbiór jąder (jądra) o spinach I = ½ ma dwa poziomy energetyczne (Ryc. 14).



Ryc. 14. Układ poziomów energetycznych dla układu ze spinem I= ½.

Reguły kwantowo – mechaniczne określają dyskretność poziomów energetycznych i z tym związaną skokową ich zmianę, ale wartość samej energii zależy i od charakteru czynnika zewnętrznego, tzn. pola magnetycznego B jak i bezpośredniego otoczenia jądra atomowego np. w postaci określonego miejsca w strukturze związku ze wspomnianą już zależnością, że

$$E = -\mu \mathbf{B}$$

Ta „wrażliwość" energii momentów magnetycznych na wielkość pola magnetycznego B i związana z nim zmiana wartości kątowej Larmora

$$\omega = \gamma \mathbf{B}$$

jest właśnie wykorzystana w metodzie spektroskopowej magnetycznego rezonansu jądrowego. Skoro bowiem częstość ω zależy od pola B i współczynnika γ, to modyfikując stałe pole przez dodanie czynnika dodatkowego np. B_1 możemy tworząc efektywne pole

$$\mathbf{B}_{ef} = \mathbf{B} + \mathbf{B}_1$$

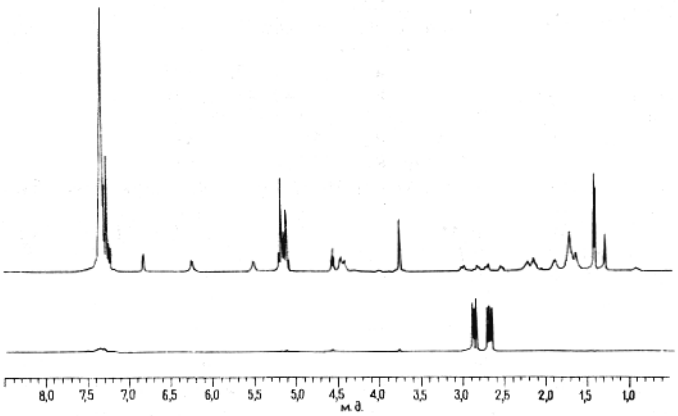
dopasowywać odpowiadające mu częstotliwości ω do częstotliwości własnej poszczególnych układów momentów magnetycznych badanych jąder – zwanych częstotliwościami rezonansowymi.

Na ową częstotliwość rezonansową

$$\nu = \gamma B_{ef}/2\pi$$

ma również istotny wpływ otoczenie w jakim znajduje się badane jądro atomowe w konkretnym układzie związku chemicznego określone ważnym parametrem spektroskopowym, a mianowicie przesunięciem chemicznym σ [24, 33, 36, 72].

Przesunięcie chemiczne w sposób istotny określa częstotliwość rezonansową określonego typu jądra atomowego np. ^{1}H, ^{13}C stwarzając w ten sposób mozliwość rozróżniania tzw. linii rezonansowych pojawiających się w różnych miejscach na skali częstotliwości, pochodzących od tego samego typu jąder np. wodoru ^{1}H czy fosforu ^{31}P znajdujących się w różnych miejscach struktury związku chemicznego (Ryc. 15).



Ryc. 15. Przykład widma protonowego trójpeptydu

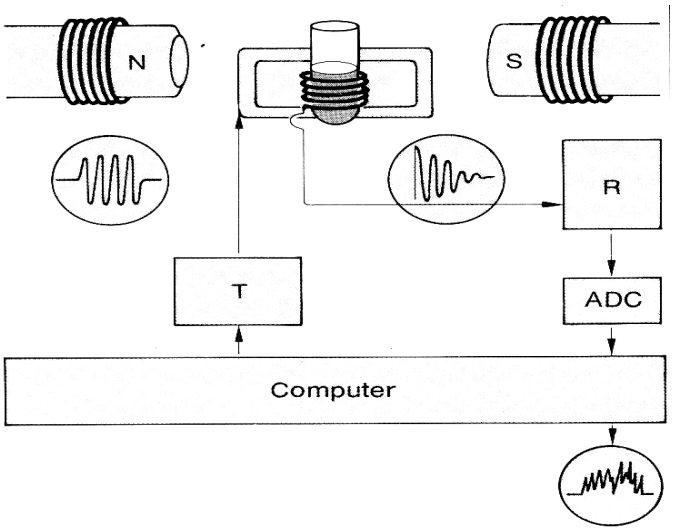
Ogólnie parametr przesunięcia σ zawiera w sobie (reprezentuje) bardzo wiele czynników, stąd jego użyteczność w rozpoznawaniu elementów mających istotny

wpływ na strukturę i zachowanie się związków chemicznych w różnych układach i oddziaływaniach.

Jeszcze innym bardzo ważnym parametrem – wielkością spektroskopową – jest intensywność linii rezonansowej zwanej sygnałem. Proporcjonalna jest ona przede wszystkim do ilości jąder atomowych, czyli ilości substancji, od której pochodzą. Pozwala to oczywiście na wykonywanie badań ilościowych [28, 33, 72].

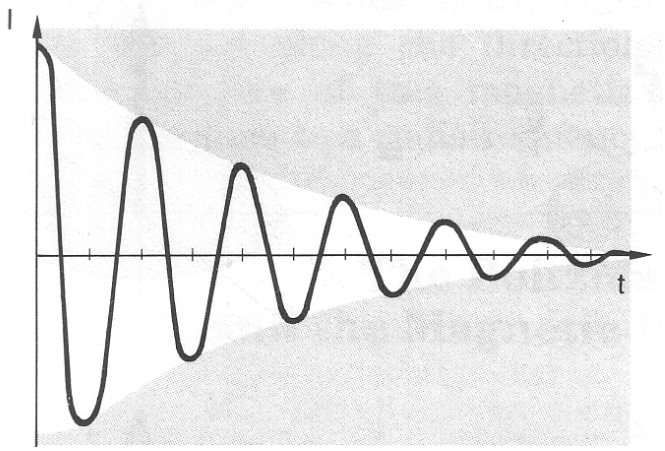
Praktyczna realizacja spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) odbywa się poprzez wykorzystanie do tego celu urządzenia zwanego spektrometrem NMR.

Rycina 16A przedstawia schemat budowy spektrometru.



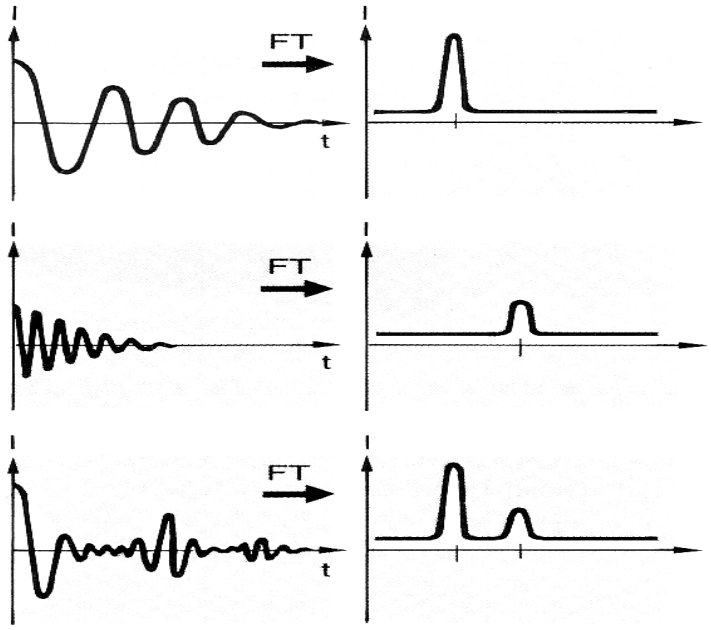
Ryc.16A. Schemat budowy spektrometru. Sygnał swobodnego zaniku indukcji (FID) z odbiornika jest przekazywany przez konwerter analogowo-cyfrowy (ADC) do komputera. Po zastosowaniu transformacji Fouriera komputer przekazuje sygnał NMR w postaci cyfrowej do konwertera cyfrowo – analogowego, a następnie do rejestratora. Tak powstaje widmo. (za Rinck P.A. „An Introduction to Magnetic Resonance in medicine", 1990).

Na znajdujący się w probówce pomiarowej roztwór badany a umieszczony w stałym polu magnetycznym B działa dodatkowe pole zmienne B_1 powodując powstanie przejść rezonansowych układu ze stanu podstawowego w wyższy. Zewnętrznym skutkiem tego procesu jest powstanie w cewce układu detekcyjnego tzw. sygnału swobodnej precesji FID będącego funkcją czasu FID = f(t) (Ryc. 16B).



Ryc. 16B. Funkcja swobodnego zaniku indukcji (FID) (za Rinck P.A. „An Introduction to Magnetic Resonance in Medicine", 1990).

Sygnał ten po przejściu przez układ detekcji, jest przetwarzany za pomocą układu przetwornika analogowo – cyfrowego na postać cyfrową. Postać zaś cyfrowa funkcji czasu f(t) jest w procesie szybkiej transformacji Fouriera (FFT) przekształcania w postać widmową zwaną dziedziną częstotliwościową albo widmem (Ryc 16C).



Ryc.16C. Uproszczony schemat przekształcenia FID za pomocą szybkiej trasformacji Fouriera (FFT) (za Rinck P.A. „An Introduction to Magnetic Resonance in Medicine", 1990).

Postać częstotliwościowa czyli widmo NMR jest właśnie podstawą – źródłem – wszelkich czynności zwanych analizą bądź badaniem spektroskopowym substancji w zależności od celu i potrzeb zamierzonych badań [24, 72].

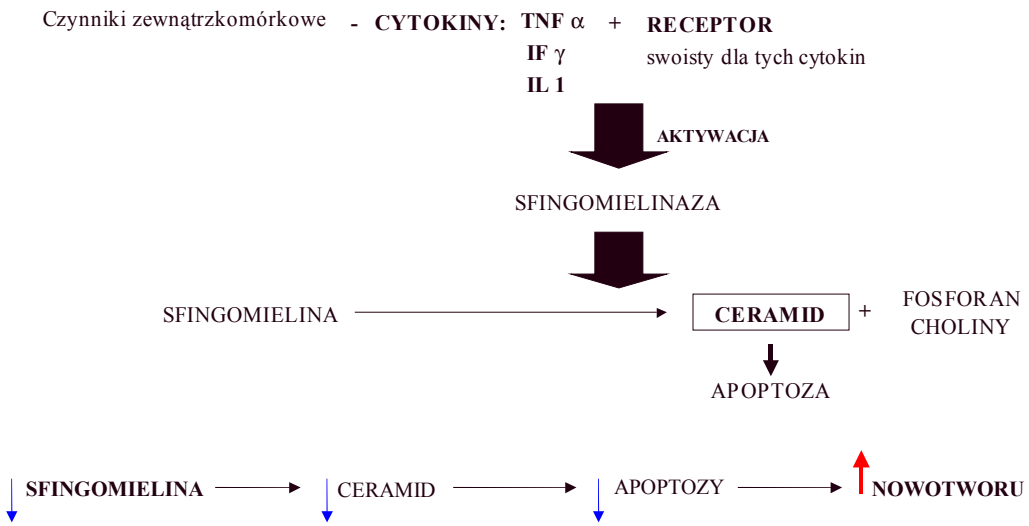
Spektroskopia fosforowa ^{31}P NMR dzięki otrzymaniu widm z materiału biologicznego zawierającego jądra ^{31}P jest nieinwazyjną metodą pozwalającą na badanie metabolizmu fosforanów, nukleotydów, fosfoestrów oraz fosfolipidów. W uzupełnieniu do obrazowania MR (MRI), które daje obraz anatomiczny badanego narządu, spektroskopia odzwierciedla zmiany biochemiczne zachodzące w tym narządzie. Metoda ta znalazla zastosowanie w obserwacji zmian metabolizmu fosfolipidów między innymi w chorobach nowotworowych w momencie ich rozpoznania i podczas leczenia cytostatycznego [1, 25, 27, 40, 49, 54, 67, 73, 74, 80, 87, 89].

1.3. Fosfolipidy w chorobach nowotworowych.

Wady genetyczne, onkowirusy, substancje toksyczne, infekcje bakteryjne, stres oksydacyjny, a także nieprawidłowa dieta mają swój udział w powstaniu nowotworów. Istnieją też doniesienia o związku między zmianą składu lipidowego błon biologicznych, ich struktury oraz funkcji a wczesnym etapem kancerogenezy [2, 66]. Niektórzy autorzy uważają, że w komórkach nowotworowych wskutek zmian w metabolizmie lipidów, procesy przekazywania informacji za pośrednictwem cząsteczek pochodzących z przemian lipidów są zaburzone [3, 66].

Najdokładniej przebadano zmiany zachodzące w metabolizmie SM. Stwierdzono, że choć w przeważającej części występuje ona w zewnętrznej monowarstwie błony komórkowej, to w przekaźnictwie sygnałów w komórce odgrywa rolę sfingomielina znajdująca się w monowarstwie wewnętrznej błony. Kontakt czynników zewnątrzkomórkowych takich jak: TNF - α (tumor necrosis factor, czynnik nekrozy nowotworów), interferon - γ, czy interleukina - 1 ze swoistymi dlań receptorami (m.in. rodzina receptorów TNF - TNFR1, receptory Fas) powoduje aktywację sfingomielinazy, która rozszczepia błonową sfingomielinę na ceramid i fosforan choliny. Ceramid jest natomiast wewnątrzkomórkowym przekaźnikiem sygnału pośredniczącym w apoptozie. Mechanizm udziału ceramidu w apoptozie nie jest jeszcze do końca wyjaśniony. Komórki białaczkowe charakteryzują się zmniejszoną zawartością sfingomieliny w wewnętrznej monowarstwie błony w porównaniu z komórkami prawidłowymi, jak również zmniejszoną liczbą receptorów między innymi dla TNF i innych cytokin. Zaburza to prawidłową apoptozę i w konsekwencji prowadzi do rozwoju nowotworu (Ryc. 17) [7, 12, 22, 26, 29, 48, 52, 53, 68, 71, 76, 84-86, 92]. Zmiany w metabolizmie SM w procesach nowotworowych przedstawiono na rycinie 17.

ZMIANY W METABOLIZMIE SM



Ryc. 17. Rola sfingomieliny w procesach nowotworowych.

Uproszczony model wpływu PI na proliferację nowotworową zasugerowano na podstawie badań Merchanta i wsp. (Ryc. 18). Badając ekstrakty tkanek guza przełyku i piersi za pomocą spektroskopii ^{31}P NMR wykazali oni zwiększony poziom PI, wynikający z utrudnienia wbudowania PI w komórkach nowotworowych do glikolipidowej składowej błony komórkowej niezbędnej do zakotwiczenia białkowej części receptora dla czynników zewnątrzkomórkowych. Konsekwencją tego zjawiska mogłoby być zmniejszenie liczby receptorów, które prowadzi do zmniejszonej wrażliwości komórek nowotworowych na kontrolę pozakomórkową [57].

Ryc. 18. Rola fosfatydyloinozytolu w nowotworach.

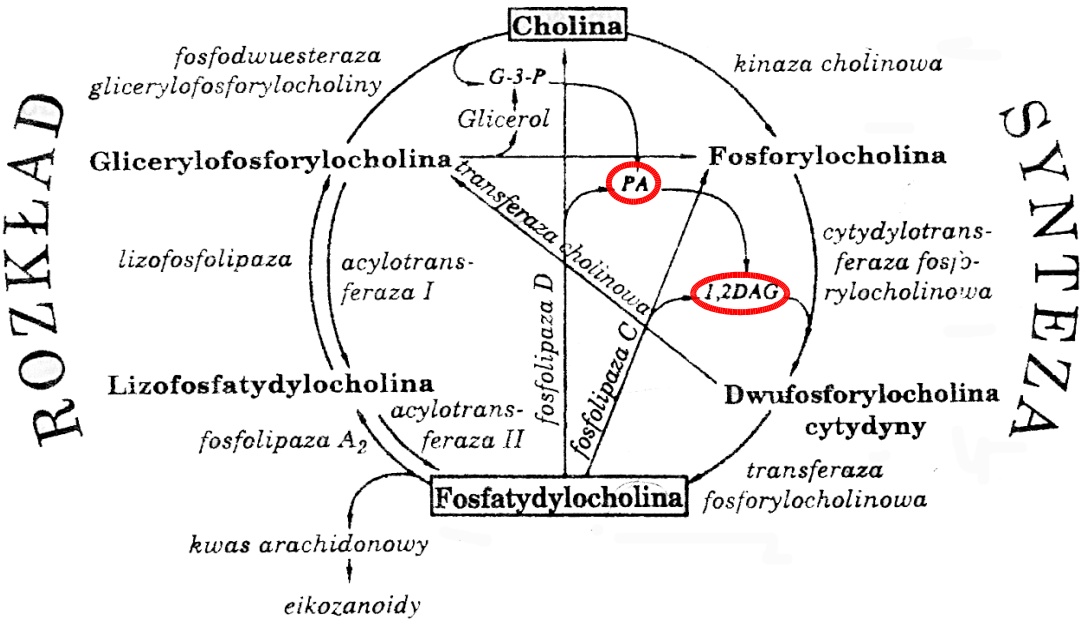
Ważną rolę w procesie proliferacji komórek nowotworowych ma między innymi kinaza białkowa zależna od DG, zwana kinazą białkową C. Proces proliferacji nowotworowej wymaga przedłużonego działania tej kinazy, które prawdopodobnie jest

związane z hydrolizą PC i PE [6, 34]. DG jest efektem końcowym procesu hydrolizy PC i jest włączony w układ przetwarzania informacji związany z hydrolizą fosfolipidów inozytolowych. Pod wpływem substancji sygnałowych wiążących się ze swoistym receptorem, dochodzi do rozpadu błonowego fosfatydyloinozytolodwufosforanu poprzez aktywację fosfolipazy C. Powstają wówczas dwa wtórne przekaźniki informacji: DG i trójfosfoinozytol. DG pozostaje w błonie plazmatycznej i aktywuje białkową kinazę C. Kinaza ta z kolei aktywuje fosfolipazę D powodującą hydrolizę PC do PA i choliny. Następnie reakcja defosforylacji przekształca PA w DG (jest to reakcja odwracalna). Najważniejszą funkcją PA wydaje się być właśnie produkcja DG w reakcji PC→ PA→ DG. Uwolnienie DG z fosfatydyloinozytolodwufosforanu ma charakter przemijający, natomiast DG powstały z PC poprzez PA, utrzymuje się dłuższy czas na wyższym poziomie. Prawdopodobnie różne rodzaje molekularne DG wywierają inne działania na różne formy izomeryczne kinazy białkowej C. Jeśli tak jest, to DG pochodzący z hydrolizy PC może powodować inne następstwa niż DG powstały z fosfatydyloinozytolodwufosforanu. Istnieją doniesienia, że egzogenny PA działa na komórki mitogennie. Tłumaczyć to zatem mógłby fakt powstawania z niego DG i jego wpływ na kinazę białkową C [6].

Przypuszczalnym inhibitorem kinazy białkowej C jest sfingozyna, będąca produktem rozpadu ceramidu [71].

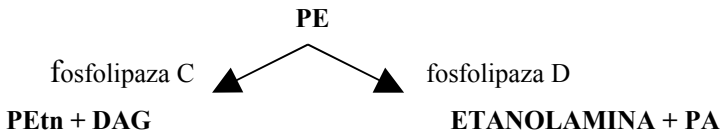
Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego umożliwia nieinwazyjne badanie metabolizmu nowotworów poprzez otrzymanie widm z substancji zawierających jądra ^{31}P, ^{13}C, ^{1}H, ^{23}Na, ^{19}F. Spektroskopia fosforowa może być jedną z metod służących do analizy metabolizmu fosfolipidów w chorobach nowotworowych.

Poprzez śledzenie linii rezonansowych pochodzących od fosfokreatyny (PCr), nieorganicznych fosforanów (P_i) oraz ATP, możliwe jest określenie stanu energetycznego komórek, a metabolizm fosfolipidów można określić przez analizę intensywności integralnych pochodzących od fosfomonoestrów (PME) i fosfodwuestrów (PDE). W widmach ^{31}P NMR sygnał rezonansowy pochodzący od PME składa się z fosforylocholiny (PCho) i fosforyloetanolaminy (PEtn), a PDE – z glicerylofosforylocholiny (GPCho) i glicerylofosforyloetanolaminy (GPEtn). PME są to substancje na drodze syntezy, a PDE na drodze rozkładu PC oraz PE (Ryc. 19) [41, 75].



Ryc. 19. Drogi syntezy i rozkładu fosfatydylocholiny (za Ruiz – Cabello J. I wsp, NMR biomed, 1992).

Wiadomo, że widma ^{31}P NMR pochodzące z komórek nowotworowych charakteryzują się wysoką intensywnością integralną linii rezonansowych pochodzących od PME i PDE, a niską od PCr w porównaniu do prawidłowej tkanki. Prawdopodobnie wysoki poziom PME w guzach wynika ze zwiększonego zapotrzebowania fosfolipidów koniecznych do budowy nowo proliferujących komórek oraz może wynikać z hydrolizy fosfolipidów celem przekazywania sygnałów stymulujących podział komórki. Zwiększone stężenie PME związane jest z progresją choroby nowotworowej, a spadek z odpowiedzią na stosowane leczenie. Na podstawie badań ^{31}P NMR in vivo i in vitro zaobserwowano, że za wzrost poziomu PME w guzach nowotworowych odpowiada głównie PEtn (stosunek PEtn/PCho >1). Zawartość PCho jest natomiast tym wyższa im bardziej zaawansowana jest choroba nowotworowa [4, 5, 9, 13, 16, 30-32, 37-39, 41, 50, 51, 67, 74, 81]. Zwiększone stężenie PEtn prawdopodobnie wynika z rozkładu PE przez fosfolipazę C (do PEtn i DG) lub przez fosfolipazę D (do etanolaminy i PA), w ten sposób będąc również źródłem przekaźników sygnałów w komórce.



Za powstanie PE odpowiada prawdopodobnie proces dekarboksylacji PS, w ten sposób dostarczając źródła PEtn (przez produkcję etanolaminy). Etanolamina może być również produkowana przez wymianę wolnej seryny z biegunową grupą PE z wytworzeniem PS [16, 20, 30, 79, 90, 91].

W badaniach tkanki nowotworowej okrężnicy na poziomie molekularnym wykryto zwiększoną aktywność cytydylotransterazy fosforylocholiny, przy obniżonej aktywności fosfolipaz C i D. Przypuszczano, że wysokie stężenie PC w guzie okrężnicy wynika ze spadku w obrocie metabolicznym PC i wzrostu jej ekspresji w guzie [17].

Poznanie zmiany metabolizmu fosfolipidów w komórkach nowotworowych przyczyniło się do powstania leków przeciwnowotworowych działających na poziomie błon komórkowych. Są to syntetyczne eterowe lipidy takie jak np. Miltefozyna (Hexadecylphosphocholina), cytotoksyczne wobec komórek guza in vitro i in vivo. Mogą one również indukować proces różnicowania w komórkach nowotworowych, a także są zdolne do indukcji apoptozy. Efekty działania tych preparatów to między innymi hamowanie białkowej kinazy C oraz ingerowanie w mitogenne sygnałowe przekaźnictwo w komórkach przez drogi zależne od PI oraz wewnątrzkomórkowego wapnia [14, 15, 18, 93].

Za pomocą spektroskopii fosforowej badano również oporność komórkowej linii białaczkowej (CEM–C1-15) na deksametazon, wskazując na obecność w niej zwiększonego metabolizmu fosfolipidów w przeciwieństwie do linii komórkowej wrażliwej na działanie deksametazonu (CEM-C7-14), gdzie obserwowano zmniejszenie metabolizmu fosfolipidów [1].

2. Cel pracy.

Mechanizmy molekularne zachodzące w procesach nowotworowych nie są jeszcze wciąż wyjaśnione. Poszukuje się więc metod, które mogłyby się przyczynić do ich lepszego poznania, prognozowania oraz monitorowania leczenia.

Celem pracy jest ocena znaczenia spektroskopii fosforowej (^{31}P) magnetycznego rezonansu jądrowego w poznaniu zaburzeń metabolizmu fosfolipidów w chorobach rozrostowych krwi. Posłużyła temu analiza danych uzyskanych z widm fosforowych NMR, na podstawie której można było ocenić zachowanie się poszczególnych fosfolipidów w ekstraktach komórek blastycznych pochodzących od pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych. Dokładniejsza analiza metabolizmu fosfolipidów mogła być możliwa dzięki ocenie danych pochodzących z widm ^{31}P uzyskanych z ekstraktów komórek jednojądrzastych i osocza pobranego od tej samej osoby z tej samej próbki krwi.

3. Materiał i metody.

3.1. Materiał.

Materiałem badań były ekstrakty fosfolipidów z komórek jednojądrzastych oraz ekstrakty fosfolipidów z osocza pochodzące od pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki oraz osób zdrowych. Łącznie wykonano 190 widm z ekstraktów komórkowych oraz 20 widm z ekstraktów osocza. U chorych wykonane one były w momencie rozpoznania choroby przed wdrożeniem leczenia cytostatycznego.

Spektra uzyskiwano początkowo z próbek zawierających 5, 10 15, 20, 30, 40, 50, 60, 120 i $240 \cdot 10^6$ komórek/ml, poszukując najmniejszej, a jednocześnie wystarczającej liczby komórek, która pozwoliłaby na otrzymanie widm o odpowiedniej intensywności linii rezonansowych. Nie udało się wykorzystać technik statystycznych dla ustalenia korelacji między powierzchnią sygnału rezonansowego (s) a liczbą komórek (n) [zależność funkcyjna typu s = f (n)]. Podczas wyznaczania zależności typu s = ax + b, okazało się, że wartości współczynnika „a" były różne zarówno dla każdego fosfolipidu, jak i każdego badanego. Dlatego celem ujednolicenia danych do analizy wybrano tylko widma pochodzące z próbek zawierających $6 \cdot 10^7$ komórek/ml, ze względu na dobry obraz tych widm oraz ilość wykonanych z tej liczby komórek badań.

Analizie zostało zatem poddanych 41 pacjentów w wieku od 18 do 76 lat, mediana 51 lat oraz 9 osób zdrowych stanowiących grupę kontrolną w wieku od 24 do 58 lat, mediana 39 lat.

Celem oceny wartości prognostycznej wykonanych badań, pacjentów podzielono na reagujących na leczenie (n = 14) i nie reagujących (n = 27), biorąc pod uwagę retrospektywną analizę ich przebiegu choroby.

Wszystkie osoby z grupy pacjentów dobrze reagujących na chemioterapię osiągnęły w trakcie leczenia remisję całkowitą lub częściową choroby. Czas uzyskania remisji wynosił od 1 do 3 miesięcy od rozpoczęcia leczenia. Dwie osoby zostały poddane transplantacji szpiku kostnego, a u pozostałych osób czas przeżycia wynosił od 1 miesiąca do 3 lat, mediana 7 miesięcy. Trzy osoby z krótkim czasem przezycia (do trzech miesięcy) zmarły w przebiegu powikłań choroby podstawowej. Dwie – z powodu wstrząsu septycznego w okresie granulocytopenii w czasie kolejnej chemioterapii po uzyskaniu remisji, a trzecia z powodu zawału mięśnia sercowego. W grupie reagującej na chemioterapię dwie osoby miały rozpoznaną ostrą białaczkę limfoblastyczną (jedna

typu T/B, a druga typu common), sześć osób - ostrą białaczkę szpikową M_2, pięć - M_4 i jedna – M_{5a}.

Wśród osób z grupy źle reagującej na leczenie pięć osób uzyskało remisję częściową choroby w czasie od 2 do 3 miesięcy od rozpoczęcia chemioterapii. Jednak wkrótce po jej uzyskaniu wystąpił szybki nawrót choroby i zgon. U pozostałych dwudziestu dwóch chorych nie udało się uzykać remisji choroby podstawowej. Chorzy nie reagujący na leczenie, charakteryzowali się krótszym okresem przeżycia niż grupa reagujących (od 2 tygodni do 1,5 roku, mediana 3 miesiące, siedem osób miało czas przeżycia od 2 tygodni do 1 miesiąca i 2 tygodni). U dwóch osób z tej grupy występowały dwa nowotwory równocześnie. U jednej - ostra białaczka i nawracający brodawczak pęcherza moczowego, u drugiej – ostra białaczka oraz chłoniak nieziarniczy. W grupie nie reagujących u dziewięciu osób rozpoznano białaczkę limfoblastyczną (u jednej typu pre-B, jednej typu B, a u pozostałych siedmiu typu common). Jedna osoba miała rozpoznaną ostrą białaczkę bifenotypową (limfo-mieloblastyczną), pozostałe ostrą białaczkę szpikową (dziewięć - M_4, trzy - M_2, pojedyncze osoby - M_0, M_0/M_1, M_1, M_3, M_6).

U 12 pacjentów i 8 osób zdrowych wykonano widma z ekstraktów komórkowych i ekstraktów osocza uzyskanych z tej samej próbki krwi. W tej grupie chorych dziewięć osób miało rozpoznaną ostrą białaczkę szpikową (sześć – M_4, pojedyncze osoby – M_0, M_2 i M_3), a trzy osoby ostrą bialaczkę limfoblastyczną (dwie typu common i jedna typu T/B).

3.2. Metody.

3.2.1.Ekstrakty fosfolipidów z komórek i osocza.

Ekstrakcję fosfolipidów z komórek jednojądrzastych i z osocza wykonywano metodą Folcha [19, 21, 56]. Do badań pobierano na heparynę (20j./1 cm^3 krwi) na czczo minimum 10 cm^3 krwi (w zależności od liczby leukocytów). Krew rozcieńczano w stosunku 1:1 solą fizjologiczną buforowaną fosforanem (PBS), a następnie nawarstwiano na gradient ficollu – uropoliny o gęstości 1,077 g/ml. Komórki odwirowywano, zbierano warstwę między fikolem a osoczem, lizowano i płukano. Gęstość otrzymanej populacji komórek jednojądrzastych oznaczano w komorze Bürkera. Do 4 ml zawiesiny komórek ($15 \cdot 10^6$ w ml) w PBS dodawano 4 ml metanolu i 4 ml chloroformu. W celu usunięcia fosfolipidów ze struktur komórkowych mieszaninę

umieszczano w lodzie i rozbijano ultradźwiękami przez około 5 minut (amplituda 210 μm, moc akustyczna 460 W/cm^2), a następnie odwirowywano przez około 15 minut.

Aby uzyskać ekstrakt fosfolipidów z osocza, do 4 ml osocza dodawano 4 ml chloroformu i 4 ml metanolu, następnie 30 minut mieszano używając mieszadła magnetycznego i odwirowywano przez 15 minut z szybkością 3000 obrotów/min. Górną warstwę metanolowo – wodną zawierającą metabolity komórkowe rozpuszczalne w wodzie odlewano. Pod warstwą zdenaturowanego białka znajdowała się frakcja dolna – chloroformowa, zawierająca fosfolipidy. Zbierano ją uważnie i odparowywano.

Celem przygotowania materiału do badania w spektrometrze NMR fosfolipidy uzyskane z komórek oraz frakcję zawierającą lipidy z osocza rozpuszczano w 0,3 ml metanolu i 0,6 chloroformu oraz 0,05 ml 0,1 M EDTA (kwasie etylenodiaminotetraoctowym).

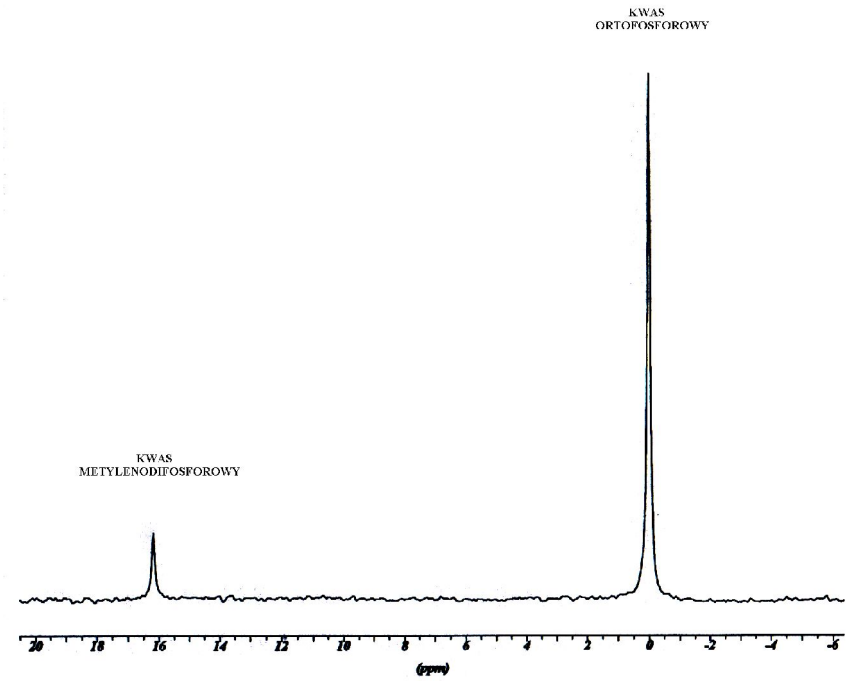
3.2.2 Spektroskopia NMR.

Pomiary widm fosforowych ^{31}P wykonywano na spektrometrze AMX 300 firmy Bruker (7,05 T), w probówkach pomiarowych (NMR sample tube) o średnicy 5 mm. Temperatura próbki w trakcie pomiaru wynosi 296±1 K. Liczba zliczeń (NS – number of scans) zawiera się w granicach 2500-4000. Czas zbierania danych (AQ – acquisition time) jest równy 5.013 s. Widma pozyskano stosując czas powtórzenia (repetition time) równy 9s (5 T1 dla fosfolipidów), szerokość impulsu 90° wynosi 8,9 μs. Liczba punktów (data points per acquisitions) w domenie czasowej TD (time domain) = 32768, domena częstotliwości SI (frequency domain) = 16384, szerokość widma (sweep width) = 3267,946 Hz = 26,8975 ppm. Przesunięcia chemiczne mierzono względem MDPA (kwasu metylenodwufosforowego) [16,726 ppm względem 85% kwasu ortofosforowego]. Przetwarzanie danych obejmowało mnożenie wykładnicze, szybką transformację fourierowską FFt (fast Fourier transformation), manualną korekcję fazy oraz liniowe wyrównywanie Lorentza (line Lorentian deconvolution), przeprowadzane przy użyciu programu WIN-NMR 1D, wersja 950901 Bruker. WIN - NMR 1D jest zestawem oprogramowania przygotowanym do przetwarzania danych NMR jedno- i dwuwymiarowych na komputerach typu PC, a opracowanym przez Bruker Spectrospin AG. To oprogramowanie pozwala na przenoszenie i przetwarzanie danych spektroskopowych pochodzących ze spektrometrów NMR firmy Bruker. Intensywność wygładzonych sygnałów używano do wyznaczenia proporcji metabolitów. Nie

stosowano procedury dopełniania zerami (zero - filling) przed wykonaniem transformacji. Stosowano w mnożeniu wykładniczym stałą szerokość linii (LB – line broadening), która wynosiła 0,5 Hz. Przeprowadzano dodatkową korekcję linii podstawowej. Intensywność linii rezonansowych pochodzącą od fosfolipidów obliczano względem linii wzorcowej pochodzącej od MDPA, która służyła jako intensywność wzorcowa. Powierzchnie sygnałów pochodzących od fosfolipidów całkowano za pomocą procedury, stanowiącej część wspomnianego oprogramowania WIN–NMR 1D.

3.2.3. Substancja wzorcowa.

Do badań ^{31}P NMR ekstraktów fosfolipidów jako zewnętrznej substancji wzorcowej użyto kwasu metylenodwufosforowego (MDPA). MDPA umiejscowiony był w cienkiej kapilarze wprowadzonej do probówki z badaną substancją. Wybór MDPA jako substancji wzorcowej w realizowanych pomiarach został uwarunkowany położeniem sygnału rezonansowego tej substancji względem sygnałów rezonansowych pochodzących od fosfolipidów. MDPA posiada w swojej strukturze dwa jądra fosforu. Dlatego intensywność integralna sygnału rezonansowego MDPA jest dwukrotnie większa od odpowiadającej jednemu jądru fosforu. Fosfolipidy posiadają jedno jądro fosforu. Położenie sygnału rezonansowego MDPA względem 85% H_3PO_4 wynosi 16,726 ppm (Ryc. 20). Taki zewnętrzny rodzaj wzorca wybrano, aby uniknąć wystąpienia w widmie dodatkowych efektów, które mogłyby się pojawić w wyniku wzajemnego oddziaływania fosfolipidów z MDPA zastosowanym jako wzorzec wewnętrzny.



Ryc. 20. Widmo fosforowe MDPA względem H_3PO_4

3.2.4. Wyznaczanie stężeń fosfolipidów na podstawie widma fosforowego.

Intensywność integralna sygnału rezonansowego w spektroskopii ^{31}P NMR jest miarą względnej liczby jąder fosforu odpowiedzialnych za pojawienie się tego sygnału. Pole powierzchni pod konturem sygnału jest więc proporcjonalne do stężenia związku chemicznego, którego jądra wywołują rezonans jądrowy. Aby wyznaczyć wartość stężenia badanej substancji, należy znać stężenie substancji wzorcowej. Wyznaczenie wartości stężenia określonego fosfolipidu C_{PHL}, który jest odpowiedzialny za pojawienie się sygnału rezonansowego o intensywności integralnej I_{PHL} umożliwia równanie:

$$\frac{C_{PHL}}{C_{MDPA}} = f \cdot \frac{I_{PHL}}{I_{MDPA}}$$

gdzie: f – stała proporcjonalności, określana przez S. Bradamante i wsp. [10] jako stała komórkowa (cell constant), którą można też określić jako współczynnik kształtu.

Współczynnik proporcjonalności f wynika z umiejscowienia substancji wzorcowej w cienkiej kapilarze, co sprawia, że na wzorzec (zewnętrzny) i badaną substancję działa zewnętrzne pole magnetyczne o różnym natężeniu.

W celu wyznaczenia współczynnika proporcjonalności f, uzyskano widma ^{31}P NMR na próbkach zawierających kwas ortofosforowy (H_3PO_4) z MDPA umiejscowionym w oddzielnej cienkościennej kapilarze (stanowiącym wzorzec zewnętrzny). Stężenie MDPA i H_3PO_4 było takie samo i wynosiło:

$1{,}114 \cdot 10^{-2}$ [mol/litr].

Stałą *f* wyznaczono ze wzoru :

$$\frac{C_{H_3PO_4}}{C_{MDPA}} = f \cdot \frac{I_{H_3PO_4}}{\frac{1}{2} I_{MDPA}}$$

Intensywność integralną MDPA pomnożono przez ½ ze względu na obecność dwóch jąder fosforu w strukturze MDPA.

Po przekształceniu wzoru otrzymano wyrażenie na współczynnik proporcjonalności *f*:

$$f = \frac{1}{2} \cdot \frac{I_{MDPA}}{I_{H_3PO_4}}$$

Przeprowadzono sześć pomiarów, a otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Wyniki badań ^{31}P NMR z próbek zawierajacych kwas fosforowy w odniesieniu do MDPA jako wzorca zewnętrznego.

NUMER POMIARU	INTENSYWNOŚĆ INTEGRALNA MDPA [$\cdot 10^7$]	INTENSYWNOŚĆ INTEGRALNA H_3PO_4 [$\cdot 10^7$]	STAŁA f
1	0,541	3,937	0,069
2	0,542	4,087	0,066
3	0,502	3,789	0,066
4	0,370	2,624	0,070
5	0,455	3,000	0,076
6	0,332	2,130	0,078

Wartość średnia współczynnika kapilarnego i odchylenie standardowe wynoszą:

$$\overline{f} = (7{,}1 \pm 0{,}5) \cdot 10^{-2}$$

Ostateczne wyrażenie na stężenie wybranego fosfolipidu przedstawia się w sposób następujący:

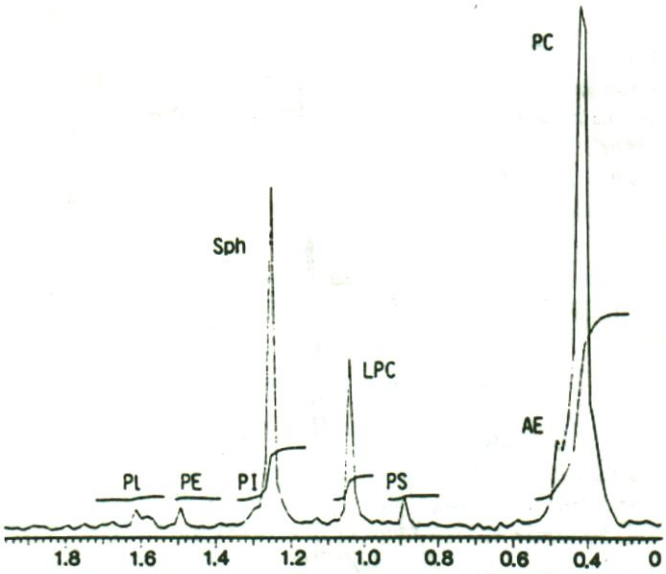
$$C_{PHL} = C_{MDPA}\overline{f} \cdot 2 \cdot \frac{I_{PHL}}{I_{MDPA}}$$

$$C_{PHL} = 1{,}114 \cdot 10^{-2} \cdot 0{,}071 \cdot 2 \cdot \frac{I_{PHL}}{I_{MDPA}} \text{ [mol/litr]}$$

$$C_{PHL} = 1{,}58 \cdot 10^{-3} \frac{I_{PHL}}{I_{MDPA}} \text{ [mol/litr]}$$

3.2.5. Identyfikacja linii rezonansowych pochodzących od fosfolipidów uzyskanych w widmach ^{31}P NMR z ekstraktów komórek jednojądrzastych i z ekstraktów osocza.

Celem identyfikacji sygnałów rezonansowych pochodzących od poszczególnych fosfolipidów w widmie fosforowym z ekstraktów komórek jednojądrzastych oraz z ekstraktów osocza wykorzystano procedurę wprowadzoną przez Bradamante i wsp. dotyczącą identyfikacji fosfolipidów w osoczu osób zdrowych. [10]. Identyfikację tych linii przedstawiono na rycinie 21.



Ryc. 21. Widmo ^{31}P NMR ekstraktu fosfolipidów: PC – L - α - fosfatydylocholina,

AE - β - acetylo - γ - O - alkilo L - α - fosfatydylocholina,

PS – L - α - fosfatydyloseryna, LPC - lizofosfatydylocholina, SPH - sfingomielina,

PI – L - α - fosfatydyloinozytol, PE – L - α - fosfatydyloetanolamina, PL – plazmalogen (za Bradamante S. i wsp., Analytical Biochemistry, 1990).

Opierając się na wynikach przedstawionych powyżej, zakupiono związki fosfolipidowe firmy SIGMA: L - α - fosfatydylocholinę (P3556);

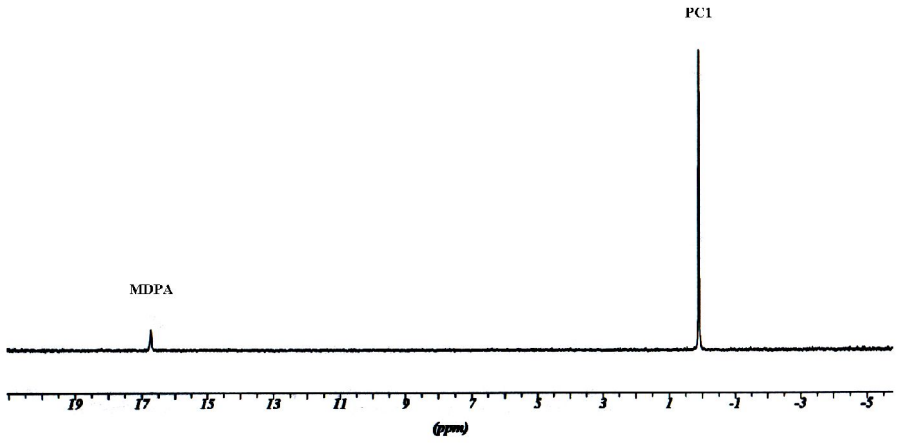
β - Acetylo - γ - O – alkilo – L - α - fosfatydylocholinę (P7568);

L - α - lizofosfatydylocholinę (L4129); sfingomielinę (S7004);

L - α - fosfatydyloinozytol (P0639) i L - α - fosfatydyloetanolaminę (P6386).

Następnie wykonano pomiary ^{31}P NMR dla każdego związku fosfolipidu oddzielnie.

Na rycinie 22 przedstawiono widmo uzyskane z L – α – FOSFATYDYLOCHOLINY (P3556) – PC1.



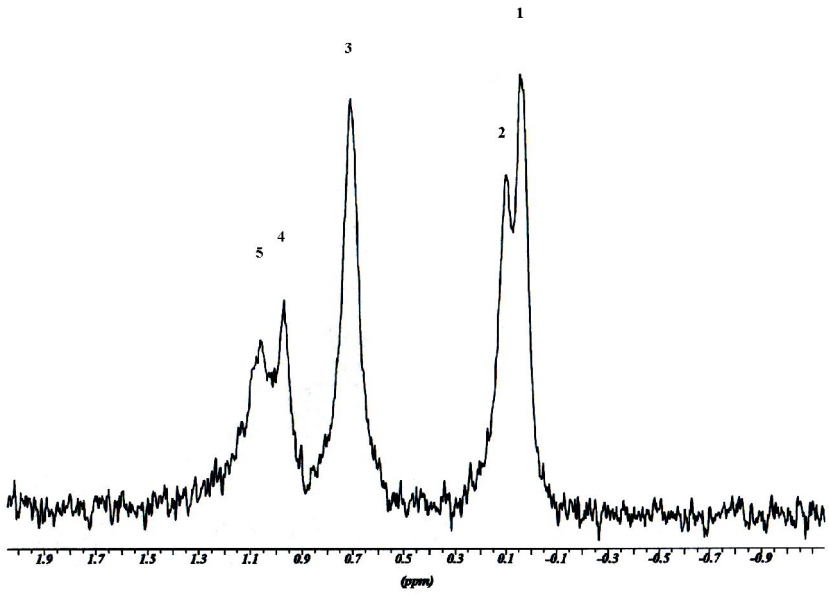
Ryc. 22. Widmo ^{31}P NMR PC1. Położenie w widmie ^{31}P NMR: 0,112 ppm względem 85% kwasu ortofosforowego; stężenie: 0,35 mol/litr.

Widma otrzymane z pozostałych substancji prezentowały się podobnie, w związku z czym wyniki stężeń poszczególnych fosfolipidów i ich przesunięcia chemiczne przedstawiono w tabeli 3.

Tab. 3. Przesunięcia chemiczne poszczególnych związków fosfolipidów firmy SIGMA względem 85% kwasu ortofosforowego.

FOSFOLIPID FIRMY SIGMA		STĘŻENIE [mol/litr]	ppm względem 85% H_3PO_4
pełna nazwa	skrót		
L-α-fosfatydylocholina (P3556)	PC1	0,35	0,112
β-acetylo-γ-O-alkilo-L-α-fosfatydylocholina (P7568)	PC2	0,25	0,061
L-α-lizofosfatydylocholina (L4129)	LPC	0,70	0,762
sfingomielina (S7004)	SM	0,20	1,010
L-α-fosfatydyloetanolamina (P6386)	PE	0,10	1,160

Kolejnym etapem pracy było wykonanie mieszaniny kilku folipidów firmy SIGMA: PC1 (0,1 mol/litr), PC2 (0,1 mol/litr), LPC (0,15 mol/litr), SM (0,05 mol/litr) i PE (0,1 mol/litr), i uzyskanie z niej widma ^{31}P NMR, które przedstawiono na rycinie 23.



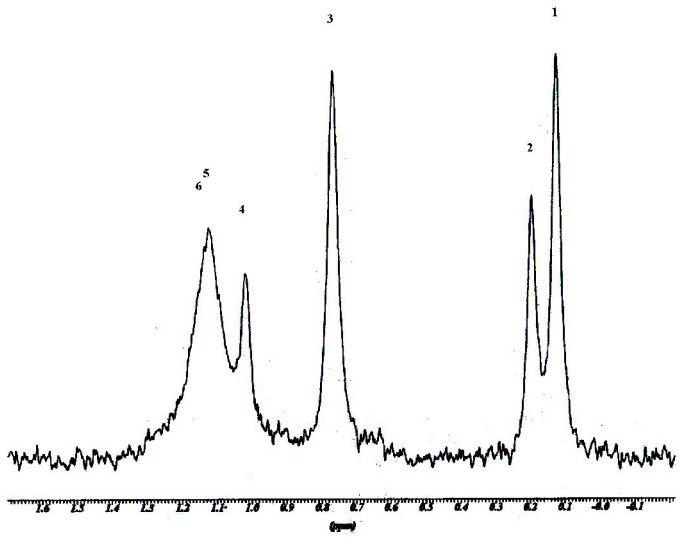
Ryc. 23. Widmo ^{31}P NMR mieszaniny pięciu fosfolipidów firmy SIGMA (linie rezonansowe pochodzące kolejno od: 1- PC2, 2-PC1, 3-LPC, 4-SM, 5-PE).

Na podstawie informacji o położeniach linii rezonansowych uzyskanych z widm poszczególnych fosfolipidów SIGMA możliwe było przyporządkowanie określonemu fosfolipidowi z mieszaniny odpowiadającej mu linii rezonansowej ^{31}P NMR w sposób przedstawiony w tabeli 4.

Tab. 4. Przyporządkowanie liniom rezonansowym w widmie ^{31}P NMR określonych związków fosfolipidowych.

Linia rezonansowa (numer od strony prawej)	**Przesunięcie chemiczne [ppm]**	**Związek Fosfolipidowy**
1	0,04	PC2
2	0,10	PC1
3	0,71	LPC
4	0,97	SM
5	1,06	PE

Drugie badanie ^{31}P NMR zostało wykonane na próbce zawierającej mieszaninę fosfolipidów firmy SIGMA: PC1 (0,05 mol/litr), PC2 (0,1 mol/litr), LPC (0,1 mol/litr), SM (0,04 mol/litr), PE (0,1 mol/litr), do której dodano także PI (0,05 mol/litr). Otrzymano wówczas widmo ^{31}P NMR przedstawione na rycinie 24.



Ryc. 24. Widmo ^{31}P NMR mieszaniny sześciu fosfolipidów firmy SIGMA (linie rezonansowe pochodzące kolejno od:1-PC1, 2-PC2, 3-LPC, 4-SM, 5-PE i 6-PI).

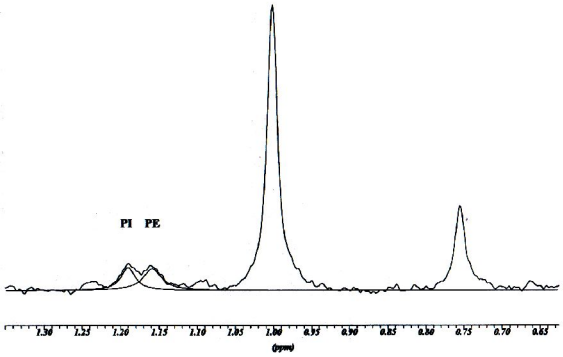
Przyporządkowanie określonych fosfolipidów stanowiących skład badanej mieszaniny do odpowiednich linii rezonansowych podano w tabeli 5.

Tab. 5. Przyporządkowanie liniom rezonansowym w widmie ^{31}P NMR określonych związków fosfolipidowych.

Linia rezonansowa (numer od strony prawej)	**Przesunięcie chemiczne [ppm]**	**Związek fosfolipidowy**
1	0,123	PC2
2	0,196	PC1
3	0,769	LPC
4	1,020	SM
5 i 6	1,125	PE i PI

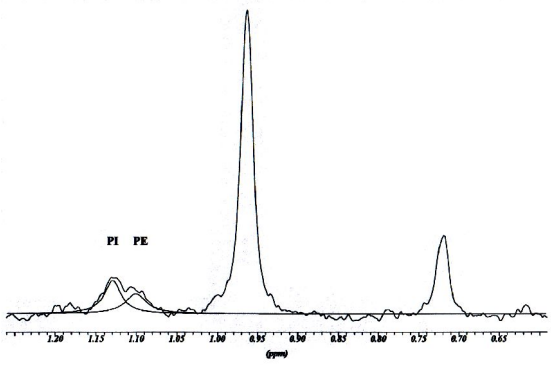
Ze względu na nakładanie się sygnałów rezonansowych pochodzących od PE i PI celem ich identyfikacji wykonano cztery kolejne pomiary.

Pierwszy eksperyment polegał na wykonaniu widma ^{31}P NMR z próbki zawierającej ekstrakt fosfolipidów z osocza krwi (Ryc. 25).



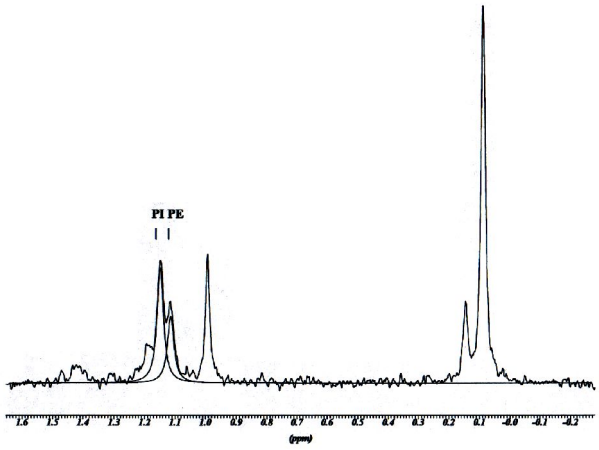
Ryc. 25. Widmo ^{31}P NMR ekstraktu fosfolipidów z osocza osoby zdrowej.

Drugie badanie polegało na wykonaniu widma ^{31}P NMR po dodaniu PI do ekstraktu fosfolipidów z osocza krwi. W otrzymanym w ten sposób widmie zaobserwowano zwiększenie pola powierzchni pod lewą częścią badanej linii rezonansowej o około 0,0545 co oznacza, że stężenie PI w badanej próbce wzrosło o około 0,004 mol/litr (Ryc. 26).



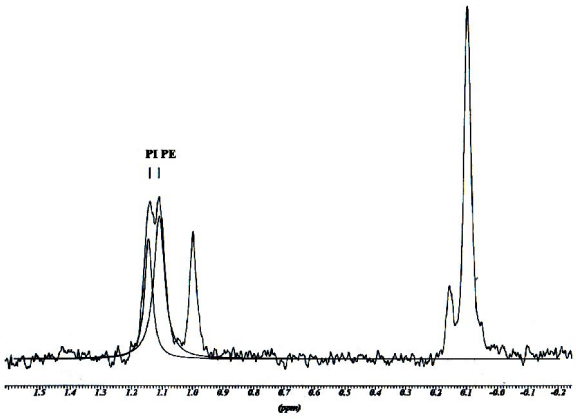
Ryc.26. Widmo ^{31}P NMR ekstraktu fosfolipidów z osocza po dodaniu do próbki fosfoinozytolu (PI).

Ponieważ w widmie z ekstraktu komórek jednojądrzastych lepiej uwidocznione są linie rezonansowe pochodzące od PE i PI w porównaniu do ekstraktów fosfolipidów z osocza, w trzecim eksperymencie uzyskano widmo ^{31}P NMR z próbki zawierającej ekstrakt fosfolipidów z komórek jednojądrzastych krwi (Ryc. 27).



Ryc. 27. Widmo ^{31}P NMR z ekstraktu fosfolipidów z komórek jednojądrzastych osoby zdrowej.

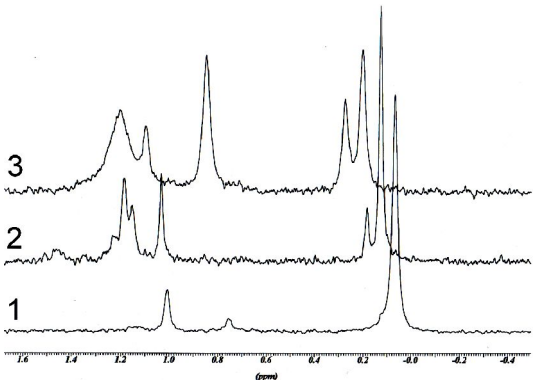
W kolejnym czwartym eksperymencie dodano PE do ekstraktu fosfolipidów komórek krwi. W otrzymanym tak widmie zaobserwowano zwiększenie pola powierzchni pod prawą częścią badanej linii o około 0,5, co oznacza, że stężenie PE w badanej próbce wzrosło o 0,035 mol/litr (Ryc. 28). Badanie to potwierdziło obserwacje pomiarów uzyskanych z ekstraktów osocza.



Ryc. 28. Widmo ^{31}P NMR z ekstraktu fosfolipidów z komórek jednojądrzstych po dodaniu fosfatydyloetanolaminy (PE).

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów przyporządkowano więc 5 linię rezonansową fosfolipidowi PE oraz 6 linię rezonansową fosfolipidowi PI (ryciny: 28 i 26).

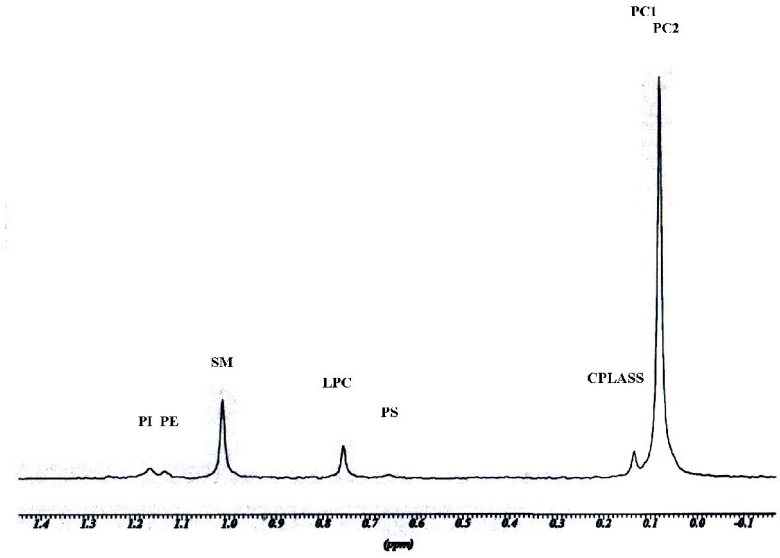
Widmo uzyskane z mieszaniny 6 fosfolipidów firmy SIGMA porównano z widmami: z ekstraktu fosfolipidów z osocza i z ekstraktu fosfolipidów z komórek jednojądrzastych (Ryc. 29).



Ryc. 29. Widma ^{31}P NMR z: ekstraktu fosfolipidów z osocza (1), ekstraktu fosfolipidów z komórek jednojądrzstych (2) oraz z mieszaniny sześciu fosfolipidów firmy SIGMA (3) [za Tuz M. – Praca magisterska, 2003].

W wyniku porównania tych widm stwierdzono, że widma z ekstraktu fosfolipidów osocza i z komórek jednojądrzastych różnią się intensywnością integralną linii rezonansowych pochodzących od poszczególnych fosfolipidów.

Kolejnym krokiem pracy było przyporządkowanie linii rezonansowych uzyskanych z ekstraktu osocza (Ryc. 30) poszczególnym fosfolipidom w sposób przedstawiony w tabeli 6.



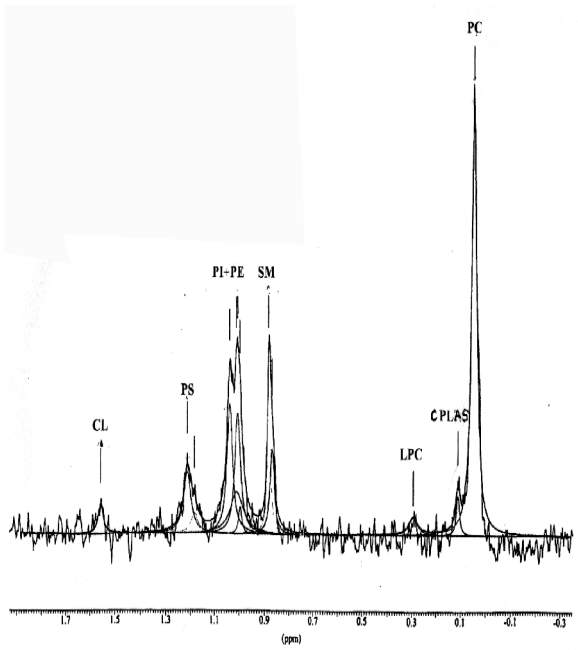
Ryc. 30. Widmo ^{31}P NMR z ekstraktu fosfolipidów osocza.

Tab. 6. Przyporządkowanie poszczególnym liniom rezonansowym w widmie ^{31}P NMR z ekstraktu fosfolipidów z osocza odpowiednich fosfolipidów (kolejno od strony prawej).

Linia rezonansowa	**Przesunięcie chemiczne względem 85% kwasu ortofosforowego [ppm]**	**Związek fosfolipidowy**
1	0,079	PC2
2	0,079	PC1
3	0,135	CPLAS
4	0,659	PS
5	0,757	LPC
6	1.014	SM
7	1.136	PE
8	1.168	PI

Linia rezonansowa pochodząca od PS w ekstraktach fosfolipidów z osocza nie została potwierdzona eksperymentalnie, a jej położenie przyjęto zgodnie z literaturą [Bradamante]. Uznano, że typowe przesunięcie chemiczne dla linii rezonansowej pochodzącej od PS w widmach ^{31} P NMR z ekstraktów fosfolipidów z osocza

uzyskanych w tym badaniu to 0,659 ppm względem 85% kwasu ortofosforowego. Nie obserwowano jednak sygnału rezonansowego o takim położeniu w widmach z komórek jednojądrzastych, dlatego wykonano kolejny eksperyment, który polegał na dodaniu do próbki z ektraktem z komórek jednojądrzastych fosfatydyloseryny [PS, numer i nazwa związku firmy SIGMA to P7769 (L - α - phosphatidyl - α - serine)]. Na podstawie przeprowadzonych pomiarów stwierdzono, że typowe położenie PS w ekstraktach z komórek jednojądrzastych to 1,208 ppm względem 85% kwasu ortofosforowego. W dalszej kolejności przypisano więc linie rezonansowe uzyskane z ekstraktu komórek jednojądrzastych (Ryc. 31) poszczególnym fosfolipidom w sposób przedstawiony w tabeli 7.



Ryc. 31. Widmo 31P NMR z ekstraktu komórek jednojądrzastych osoby zdrowej.

Tab. 7. Przyporządkowanie poszczególnym liniom rezonansowym w widmie ^{31}P NMR z ekstraktu fosfolipidów z komórek jednojądrzastych odpowiednich fosfolipidów (kolejno odstrony prawej).

Linia rezonansowa	**Przesunięcie chemiczne względem 85% kwasu ortofosforowego [ppm]**	**Związek fosfolipidowy**
1	0,050	PC2
2	0,035	PC1
3	0,110	CPLAS
4	0,300	LPC
5	0,880	SM
6	1.007	PE
7	1.042	PI
8	1.208	PS
9	1.557	CL

Dodatkową dziewiątą linię rezonansową pojawiającą się w ekstraktach z komórek jednojądrzastych przyjęto na podstawie literatury jako pochodzącą od CL [57]. Analiza przeprowadzonych obecnie widm ^{31}P NMR pozwolila określić typowe dla CL przesunięcie chemiczne względem 85% kwasu ortofosforowego przedstawione w tabeli 7.

Linia rezonansowa pochodząca od LPC pojawiała się w widmach z ekstraktów komórek jednojądrzastych sporadycznie i była trudna do odróżnienia z szumami występującymi w widmie. Linię tę i jej położenie przyjęto hipotetycznie w odniesieniu do ekstraktów fosfolipidów z osocza.

Warto zwrócić uwagę na fakt, że położenia sygnałów rezonansowych ulegają niewielkim przesunięciom w zależności od stężenia poszczególnych fosfolipidów. Dzieje się tak ze względu na wzrost intensywności integralnej linii rezonansowej przy zwiększaniu stężenia odpowiadającego jej fosfolipidu oraz ze względu na oddziaływania molekularne między poszczególnymi fosfolipidami w próbce makroskopowej.

Pierwsza i druga linia rezonansowa (zarówno i w ekstraktach z osocza, i w ekstraktach z komórek jednojądrzastych) zlewają się ze sobą ze względu na małe stężenie PC1 w stosunku do stężenia PC2. W celu potwierdzenia takiej interpretacji położeń w PC2 i PC1 w widmie wykonano eksperymenty ^{31}P NMR, które polegały na wykonaniu pomiaru próbek zawierających ekstrakt fosfolipidów z osocza z dodanymi fosfolipidami PC1 i PC2. Analiza otrzymanego w ten sposób widma wykazała zwiększenie intensywności pierwszej linii rezonansowej. Intensywność integralna trzeciej linii rezonansowej nie uległa zmianie, co oznacza, że sygnał ten nie może pochodzić od fosfolipidów: PC1 lub PC2 i odpowiada najprawdopodobniej plazmalogenowi fosfatydylocholiny (CPLAS). Nie została ona jednak potwierdzona eksperymentalnie, a jej położenie przyjęto na podstawie literatury [57] i założono,że jest to przypuszczalnie 1-alkenyl, 2- acetylofosfatydylocholina.

3.2.6. Metody statystyczne.

Wyniki w tabelach przedstawione są w postaci średnich, median i odchyleń standardowych.

Nie u wszystkich badanych osób w widmach ^{31}P NMR z ekstraktów komórek jednojądrzastych i z ekstraktów osocza zaobserwowano linie rezonansowe pochodzące od poszczególnych fosfolipidów. Rozkłady większości badanych cech odbiegały więc od rozkładów normalnych, dlatego użyto testów nieparametrycznych.

Porównania cech między dwiema różnymi grupami dokonano przy pomocy testu Manna-Whitneya. Porównania cechy w dwóch różnych środowiskach (komórki, osocze)

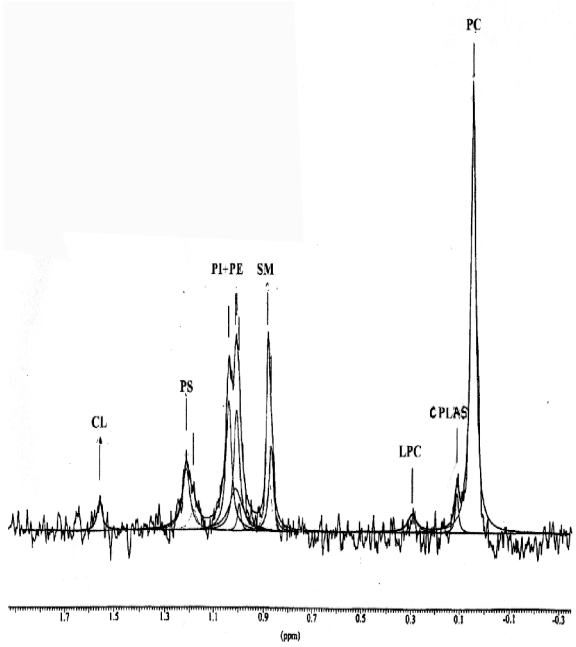
u tych samych pacjentów dokonano przy pomocy testu Wilcoxona dla par. Wszystkie hipotezy weryfikowano na poziomie istotności p = 0,05.

4. Wyniki.

Analizie poddano widma ^{31}P NMR fosfolipidów z ekstraktów komórek jednojądrzastych i ekstraktów osocza u osób z rozpoznaniem ostrej białaczki oraz u osób zdrowych stanowiących grupę kontrolną.

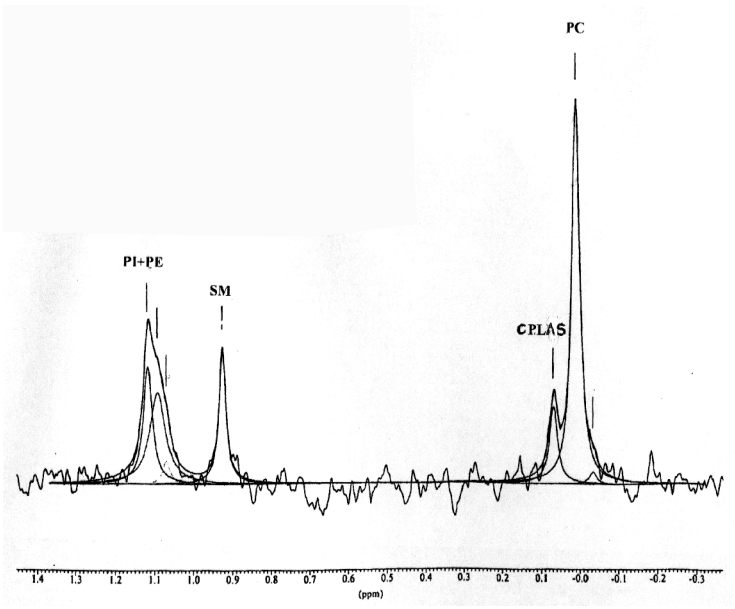
4.1. Widma ^{31}P NMR fosfolipidów z ekstraktów komórek jednojądrzastych.

Widmo ^{31}P NMR fosfolipidów z ekstraktu komórek jednojądrzastych osoby zdrowej przedstawiono na rycinie 32. Składa się ono z linii rezonansowych pochodzących od następujących fosfolipidów: PC, CPLAS, LPC, SM, PI+PE, PS, CL (Ryc.32).

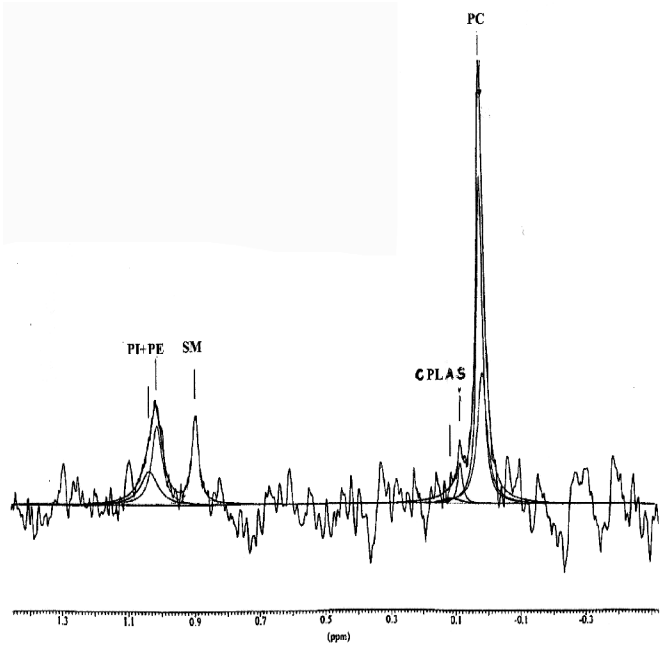


Ryc. 32. Widmo ^{31}P NMR z ekstraktu komórek jednojądrzastych osoby zdrowej (od strony prawej linie rezonansowe pochodzące od: PC, CPLAS, LPC, SM, PI+PE, PS, CL).

Widmo ^{31}P NMR uzyskane z ekstraktu komórek blastycznych osoby z rozpoznaniem ostrej białaczki przedstawiono na rycinie 33 i 34.



Ryc. 33. Widmo ^{31}P NMR fosfolipidów z ekstraktu komórek blastycznych osoby z rozpoznaniem ostrej białaczki (od strony prawej linie rezonansowe pochodzące od: PC, CPLAS, SM, PI+PE).



Ryc. 34. Widmo 31P NMR fosfolipidów z ekstraktu komórek blastycznych osoby z rozpoznaniem ostrej białaczki (od strony prawej linie rezonansowe pochodzące od: PC, CPLAS, SM, PI+PE).

Widma te róznią się między sobą intensywnością integralną linii rezonansowej pochodzącej od CPLAS.

Pola powierzchni sygnałów rezonansowych pochodzących od poszczególnych fosfolipidów przeliczano na stężenia według wzoru podanego w metodach, a następnie porównywano uzyskane wyniki między poszczególnymi grupami badanych

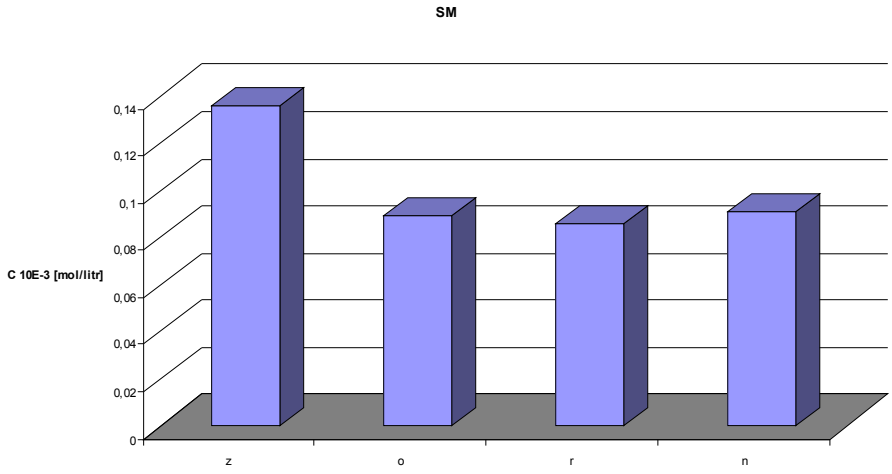
Wyniki przedstawiono w tabeli 8.

4.1.1. Sfingomielina.

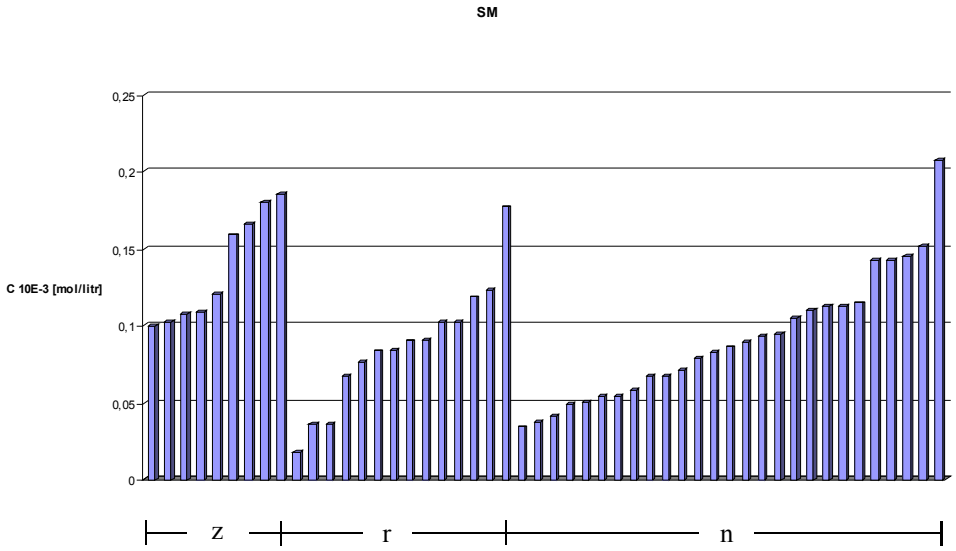
U wszystkich chorych wykazanono statystycznie istotne ($p<0,01$) obniżenie stężenia SM w ekstraktach komórek jednojądrzastych w porównaniu z grupą kontrolną (odpowiednio 0,089 mol/litr·10^{-3}, 0,136 mol/litr·10^{-3}). W grupie pacjentów reagujących na leczenie wartość stężenia SM wynosiła 0,086 mol/litr·10^{-3}, a w grupie nie reagujących 0,090 mol/litr·10^{-3}. Wartości te były istotnie różne od wartości typowych dla osób zdrowych ($p<0,01$ zarówno dla grupy reagujących jak i nie reagujących).

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między stężeniem SM w ekstraktach komórek jednojądrzastych u chorych reagujących i nie reagujących na leczenie.

Wyniki przedstawiono w tabeli 8 i rycinach 35 i 36.



Ryc. 35. Średnie stężenia SM w ekstraktach z komórek jednojądrzastych: w grupie kontrolnej (z) i u pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki: ogółem (o), reagujących (r) oraz nie reagujących (n) na leczenie.



Ryc. 36. Stężenia SM w ekstraktach komórek jednojądrzastych u poszczególnych osób: w grupie kontrolnej (z) i u pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki: reagujących (r) oraz nie reagujących (n) na leczenie, uszeregowane według wartości wzrastającej w danej grupie badanych.

Mimo, że średnie stężenia SM w grupach pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki były niższe niż u osób zdrowych, zaobserwowano pojedynczych pacjentów, u których wartości te były wysokie. Na przykład wśród osób nie reagujących na chemioterapię, najwyższe stężenie SM (wyższe niż obserwowane u osób zdrowych) miała 46-letnia chora z ostrą białaczką dwufenotypową mielo- i limfoblastyczną (ryc. 36), u której w momencie pobrania materiału do badania wystepowało rozsiane krzepnięcie wewnątrznaczyniowe (DIC). Dwa dni po rozpoznaniu choroby podstawowej pacjentka ta zmarła wśród objawów DIC.

Wśród czterech pozostałych osób w grupie nie reagujących z wyższym od średniej stężeniem SM trzy osoby miały rozpoznanie ostrej białaczki mielomonocytowej MLA M_4, a jedna erytroleukemię (MLA M_6).

W grupie osób dobrze reagujących na leczenie najwyższe stężenie SM zaobserwowano u pacjenta również z rozpoznaniem ostrej białaczki M_4.

Tabela. 8. Stężenia poszczególnych fosfolipidów w ekstraktach komórek jednojądrzastych ($6 \cdot 10^7$ komórek/ml) wyrażone w mol/litr $\cdot 10^{-3}$ w grupie kontrolnej (z) i w grupach pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki: ogółem (o), reagującej (r) i nie reagującej (n) na leczenie.

Parametr	ZDROWI (z) n = 9			OSTRA BIAŁACZKA									Poziom istotności			
				OGÓŁEM (o) n = 41			REAGUJĄCY (r) n = 14			NIE REAGUJĄCY (n) n = 27						
	$\overline{X}$	mediana	SD	$\overline{X}$	mediana	SD	$\overline{X}$	mediana	SD	$\overline{X}$	mediana	SD	z : o	z : r	z : n	r : n
CL	0,005	0,000	0,011	0,005	0,000	0,018	0,005	0,000	0,018	0,006	0,000	0,018	NS	NS	NS	NS
PS	0,032	0,000	0,048	0,020	0,000	0,040	0,010	0,000	0,027	0,026	0,000	0,045	NS	NS	NS	NS
PI+PE	0,282	0,301	0,088	0,262	0,246	0,132	0,298	0,284	0,136	0,243	0,237	0,129	NS	NS	NS	NS
SM	0,136	0,120	0,035	0,089	0,086	0,041	0,086	0,087	0,040	0,091	0,086	0,042	<0,01	<0,01	<0,01	NS
LPC	0,004	0,000	0,011	0,001	0,000	0,004	0,001	0,000	0,005	0,001	0,000	0,003	NS	NS	NS	NS
CPLAS	0,033	0,028	0,043	0,067	0,052	0,054	0,069	0,069	0,048	0,065	0,044	0,057	<0,05	0,07	0,06	NS
PC	0,374	0,330	0,096	0,372	0,347	0,153	0,393	0,336	0,172	0,361	0,347	0,144	NS	NS	NS	NS

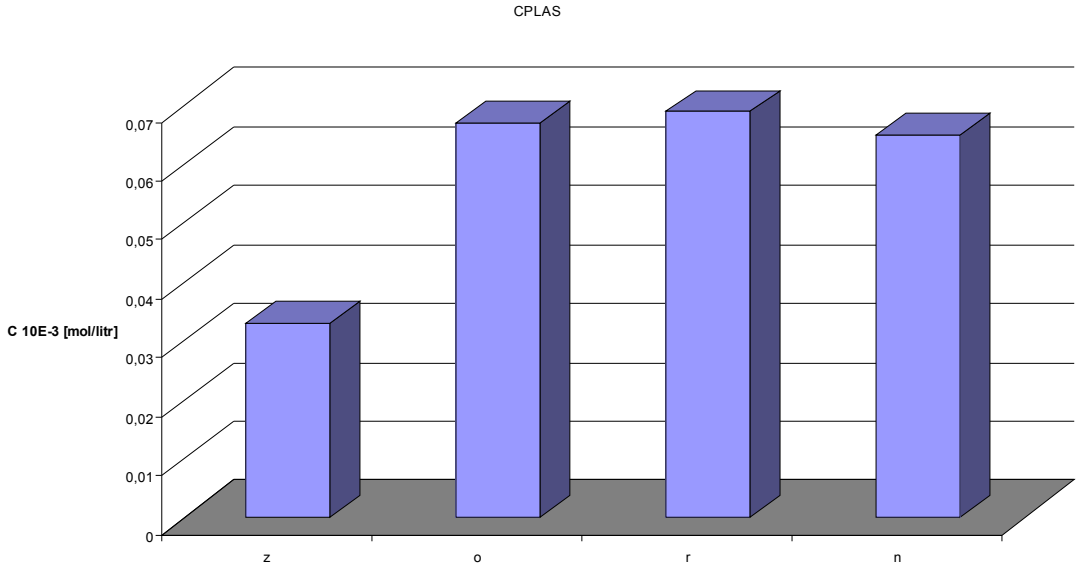
4.1.2. Plazmalogen fosfatydylocholiny.

Otrzymane wyniki miały duże odchylenia standardowe zarówno w grupie osób zdrowych jak i osób z rozpoznaniem ostrej białaczki.

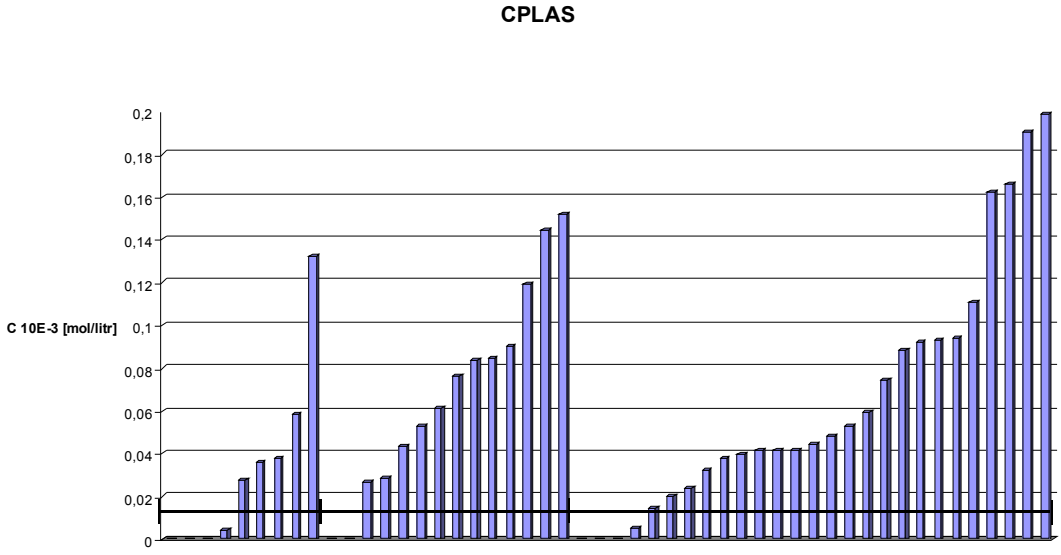
U wszystkich chorych zaobserwowano statystycznie istotne ($p<0,05$) wyższe stężenie CPLAS w ekstraktach z komórek jednojądrzastych w porównaniu z grupą kontrolną (odpowiednio - 0,067 mol/litr·10^{-3} mol/litr i 0,033 mol/litr·10^{-3}). W grupie pacjentów dobrze reagujących na leczenie wartość stężenia CPLAS wynosiła 0,069 mol/litr·10^{-3}, a w grupie nie reagujących 0,065 mol/litr·10^{-3}. Wartości te w poszczególnych grupach chorych były prawie istotnie różne od wartości typowych dla osób zdrowych ($p = 0,07$ dla grupy reagujących i $p = 0,06$ dla grupy nie reagujących).

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między stężeniem CPLAS w ekstraktach komórek blastycznych u chorych reagujących i nie reagujących na leczenie.

Wyniki przedstawiono w tabeli 8 i na rycinach 37 i 38.



Ryc. 37. Średnie stężenia CPLAS w ekstraktach komórek jednojądrzastych: w grupie kontrolnej (z) i u pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki: ogółem (o), reagujących (r) oraz nie reagujących (n) na leczenie.



Ryc. 38. Stężenia CPLAS w ekstraktach komórek jednojądrzastych poszczególnych osób: w grupie kontrolnej (z) i u pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki: reagujących (r) i nie reagujących (n) na leczenie, uszeregowane według wartości wzrastającej w danej grupie badanych.

Najwyższe stężenia CPLAS w grupie nie reagujących miały trzy osoby z rozpoznaniem MLA M_4 (jedna ze współistniejącym nawracającym brodawczakiem pęcherza moczowego) oraz jedna z ostrą białaczką LLA typu common, która zmarła w miesiąc po rozpoznaniu choroby wśród objawów krwawienia i prawdopodobnie zmian naciekowych w centralnym układzie nerwowym.

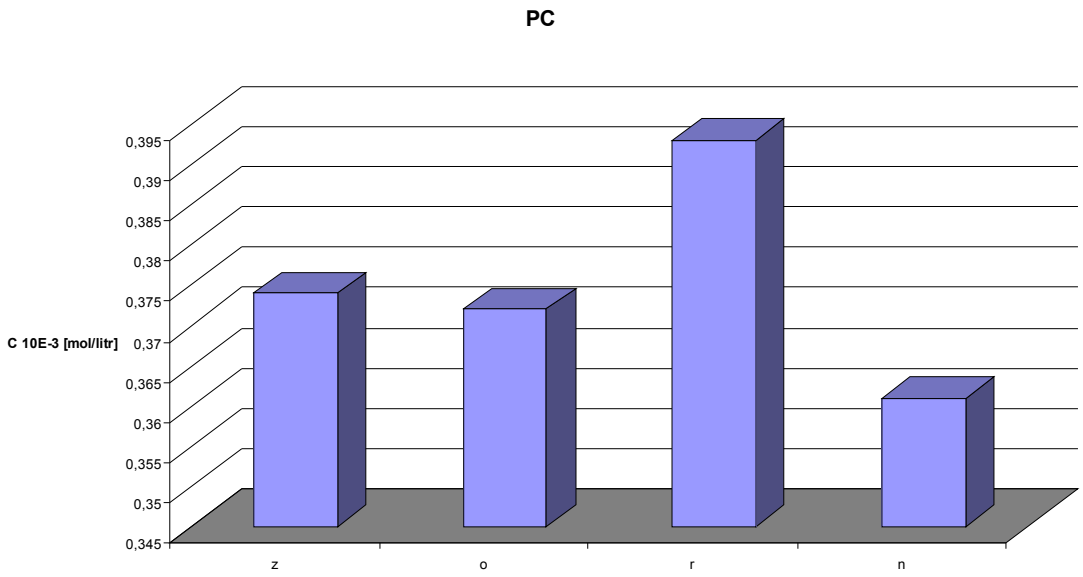
4.1.3 Fosfatydylocholina.

U chorych średnie stężenie PC w ekstraktach komórek jednojądrzastych wynosiło 0,372 mol/litr·10^{-3}, a w grupie kontrolnej odpowiednio 0,374 mol/litr·10^{-3}. Nie stwierdzono zatem istotnych statystycznie różnic w stężeniu PC między grupą osób chorych i zdrowych.

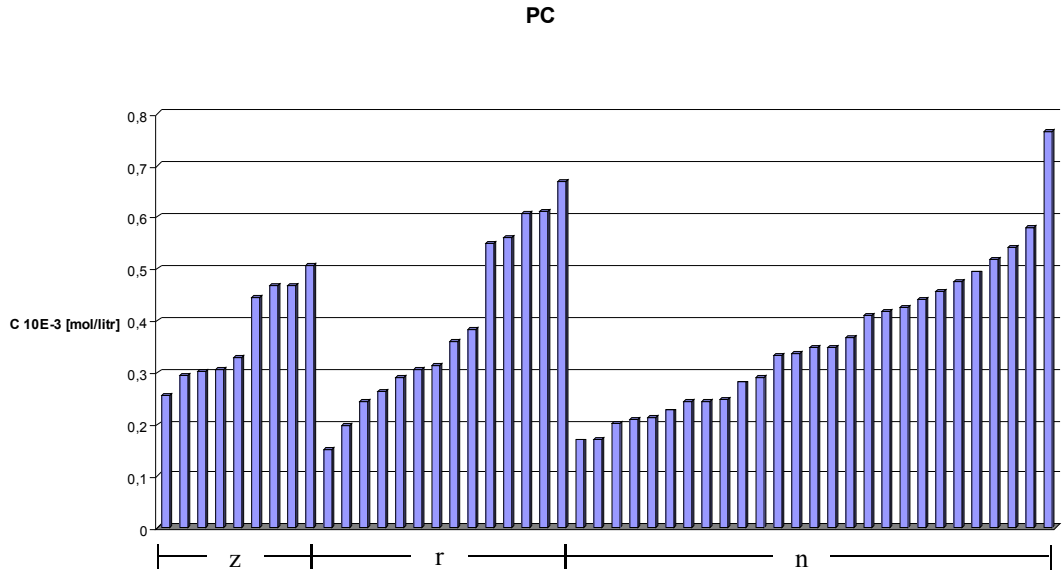
W grupie pacjentów reagujących na leczenie wartość stężenia PC wynosiła 0,393 mol/litr·10^{-3}, a w grupie nie reagujących 0,361 mol/litr·10^{-3}. Wartości te nie były istotnie różne od wartości typowych dla osób zdrowych (zarówno dla grupy reagujących, jak i nie reagujących).

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między stężeniem PC w ekstraktach komórek jednojądrzastych u chorych reagujących i nie reagujących na leczenie.

Wyniki przedstawiono w tabeli 8 i na rycinach 39 i 40.



Ryc. 39. Średnie stężenia PC w ekstraktach komórek jednojądrzastych: w grupie kontrolnej (z) i u pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki: ogółem (o), reagujących (r) oraz nie reagujących (n) na leczenie.



Ryc. 40. Stężenia PC w ekstraktach komórek jednojądrzastych u poszczególnych osób: w grupie kontrolnej (z) i u pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki: reagujących (r) i nie reagujących (n) na leczenie, uszeregowane według wartości wzrastającej w danej grupie badanych.

Najwyższe stężenie PC spośród wszyskich badanych miała pacjentka z rozpoznaniem ostrej białaczki limfoblastycznej typu common, należąca do grupy opornych na leczenie.

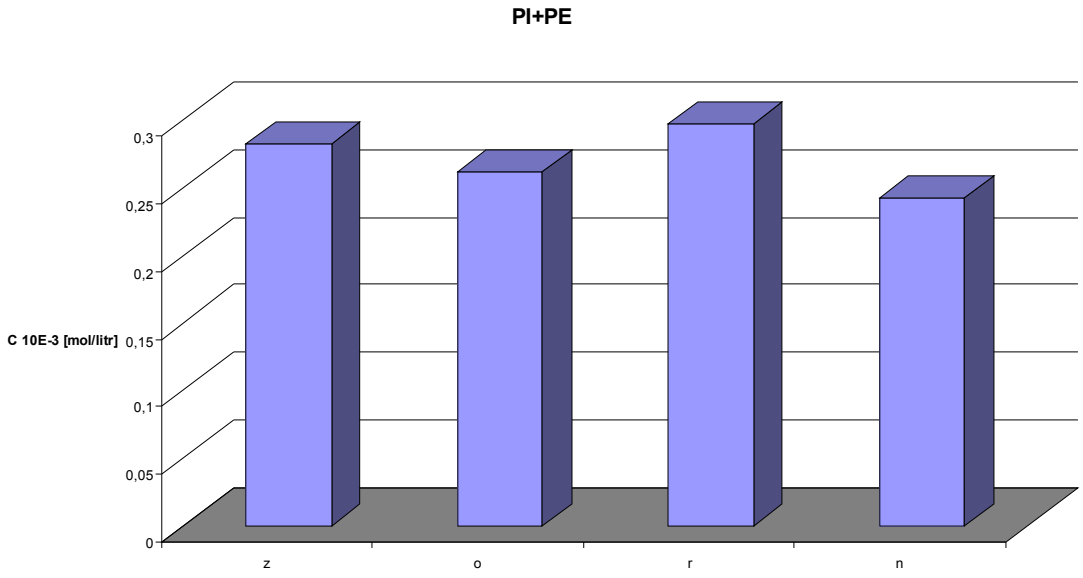
4.1.4. Fosfatydyloinozytol i fosfatydyloetanolamina.

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic między średnim stężeniem PI + PE w ekstraktach komórek jednojądrzastych osób chorych i zdrowych (odpowiednio - 0,262 mol/litr·10^{-3} i 0,282 mol/litr·10^{-3}).

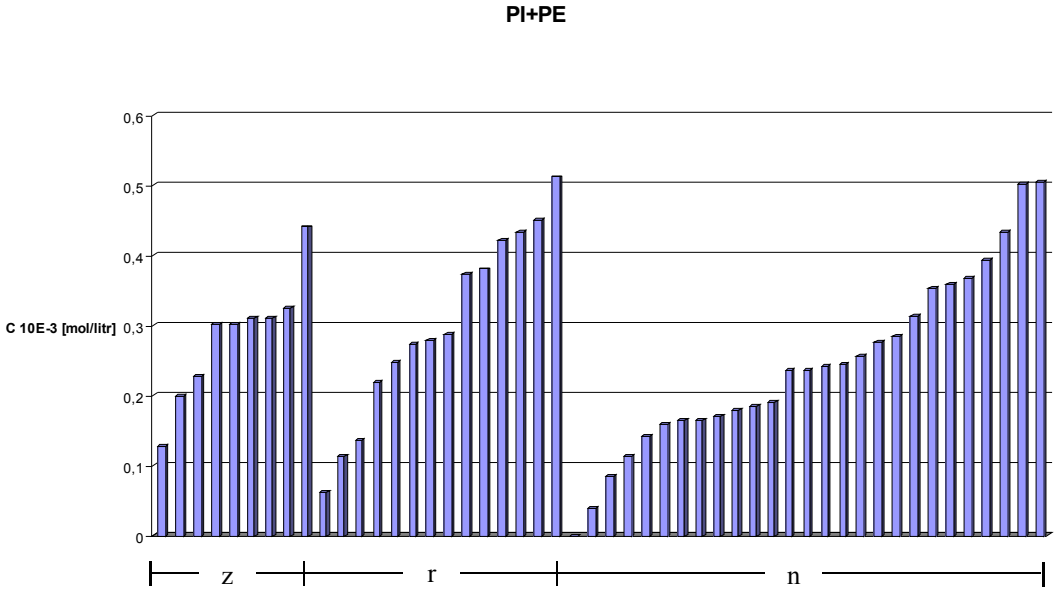
W grupie pacjentów reagujących na leczenie wartość stężenia PI+PE wynosiła 0,298 mol/litr·10^{-3}, a w grupie nie reagujących 0,243 mol/litr·10^{-3}. Wartości te nie były istotnie różne od wartości typowych dla osób zdrowych (zarówno dla grupy reagujących, jak i nie reagujących).

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między stężeniem PI+PE w ekstraktach komórek blastycznych u chorych reagujących i nie reagujących na leczenie.

Wyniki przedstawiono w tabeli 8 i na rycinach 41 i 42.



Ryc. 41. Średnie stężenia PI+PE w ekstraktach komórek jednojądrzastych: w grupie kontrolnej (z) i u pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki: ogółem (o), reagujących (r) oraz nie reagujących (n) na leczenie.



Ryc. 42. Stężenia PI+PE w ekstraktach komórek jednojądrzastych u poszczególnych osób w grupach: kontrolnej (z) i u pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki: reagującej (r) oraz nie reagującej (n) na leczenie, uszeregowane według wartości wzrastajacej w danej grupie badanych.

Wśród osób nie reagujących na chemioterapię najwyższe stężenie PI+PE miały dwie osoby z MLA M_4. Jedna z nich - ze współistniejącym nawracającym brodawczakiem pęcherza moczowego, miała również wysokie stężenie CPLAS.

4.1.5. Lizofosfatydylocholina.

Linię rezonansową pochodzącą od LPC zaobserwowano w ekstraktach komórek jednojądrzastych tylko u czterech spośród wszysktich pięćdziesięciu osób objętych badaniem (u jednej osoby z grupy kontrolnej oraz u trzech osób z rozpoznaniem ostrej białaczki - u jednej z grupy reagujących i u dwóch nie reagujących). Najwyższą wartość stężenia LPC obserwowano u osoby zdrowej.

U chorych średnia wartość stężenia LPC wynosiła 0,001 mol/litr$\cdot 10^{-3}$, a u osób zdrowych 0,004 mol/litr$\cdot 10^{-3}$. Zarówno w grupie pacjentów reagujących jak i nie reagujących na leczenie średnia wartość tego fosfolipidu wynosiła 0,001 mol/litr$\cdot 10^{-3}$.

Wyniki przedstawiono w tabeli 8. Ze względu na małą liczebność pacjentów, u których obserwowano linię rezonansową pochodzącą od LPC, nie przedstawiono tego parametru na rycinach średnich stężeń, ani stężeń w poszczególnych grupach badanych

osób w ekstraktach komórek jednojądrzastych. Z tego też powodu nie uwzględniono tutaj badania istotności statystycznych.

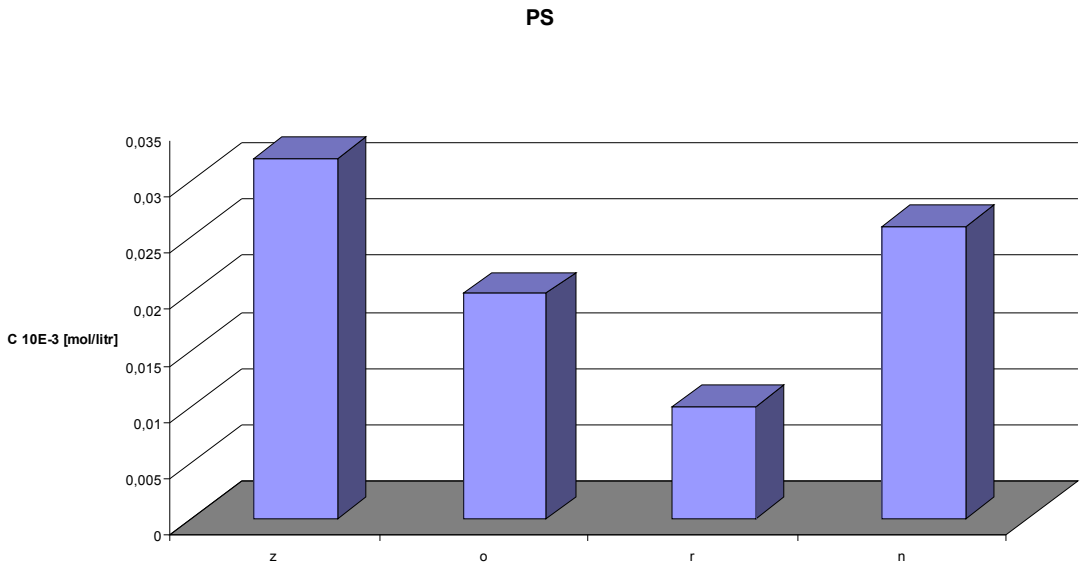
4.1.6. Fosfatydyloseryna.

Linię rezonansową pochodzącą od PS zaobserwowano tylko u czterech z dziewięciu osób grupy kontrolnej, u dwóch z czternastu grupy reagujących i u dziesięciu z dwudziestu siedmiu grupy nie reagujacych na leczenie.

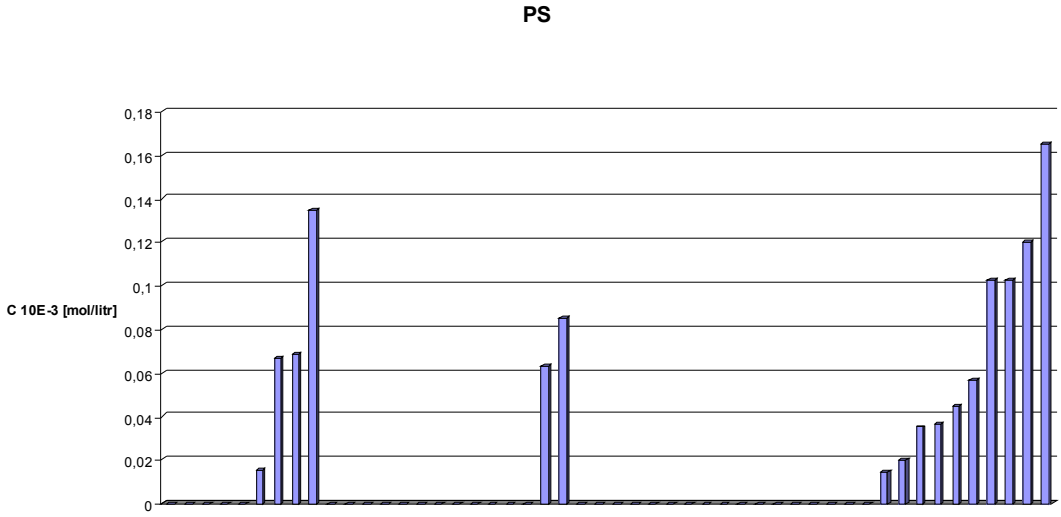
U chorych średnia wartość stężenia PS wynosiła 0,020 mol/ltr·10^{-3}, a u osób zdrowych 0,032 mol/litr·10^{-3}. W grupie pacjentów reagujących na leczenie średnia wartość stężenia PS wynosiła 0,01 mol/litr·10^{-3}, a w grupie nie reagujących 0,026 mol/litr·10^{-3}.

Ze względu na to, że sygnał rezonansowy pochodzący od PS zaobserwano u niewielu osób – nie można stwierdzić istotnych statystycznie różnic między grupami badanych osób.

Wyniki przedstawiono w tabeli 8 i na rycinach 43 i 44.



Ryc. 43. Średnie stężenia PS w ekstraktach komórek jednojadrzastych: w grupie: kontrolnej (z) i u pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki: ogółem (o), reagujących (r) i nie reagujących (n) na leczenie.



Ryc. 44. Stężenia PS w ekstraktach komórek jednojądrzastych u poszczególnych osób: w grupie kontrolnej (z) i u pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki: reagujących (r) oraz nie reagujących (n) na leczenie, uszeregowane według wartości wzrastającej w danej grupie badanych.

Najwyższe stężenia PS w grupie nie reagujących na leczenie wystąpiły u trzech osób z rozpoznaniem ostrej białaczki mielomonocytowej M_4. Dwie osoby z tych chorych miały współistniejący drugi nowotwór (chory z nawracającym brodawczakiem pęcherza moczowego, u którego obserwowano również wysokie stężenia CPLAS oraz PI+PE oraz pacjentka z chłoniakiem złośliwym z komórek B w okresie RC, u której stwierdzonono także wysokie stężenie SM).

4.1.7. Kardiolipina.

Linię rezonansową pochodzącą od CL zaobserwowano tylko u dwóch osób zdrowych i czterech pacjentów (jednego reagującego i trzech nie reagujących na leczenie).

Zarówno u chorych, jak i w grupie kontrolnej średnia wartość stężenia CL wynosiła 0,005 mol/litr·10^{-3}. W grupie pacjentów reagujących na leczenie średnia wartość tego fosfolipidu wynosila 0,005 mol/litr·10^{-3}, a w grupie nie reagujących 0,006 mol/litr·10^{-3}.

Sygnał rezonansowy pochodzący od CL zaobserwowano u niewielu osób, dlatego nie można stwierdzić istotnych statystycznie różnic między grupami badanych osób.

Wyniki przedstawiono w tabeli 8.

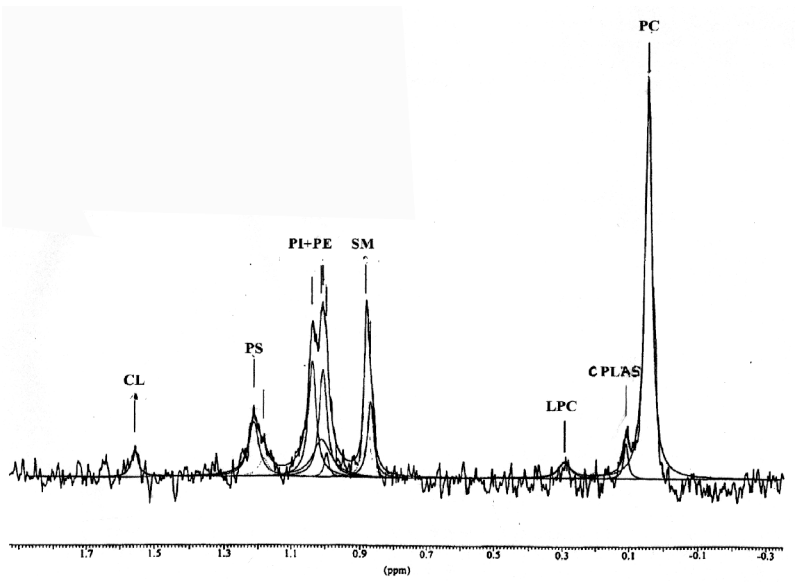
4.2. Porównanie widm ^{31}P NMR fosfolipidów z ekstraktów komórek jednojądrzastych z ekstraktami z osocza.

Analizie poddano widma ^{31}P NMR fosfolipidów uzyskane z ekstraktów komórek jednojądrzastych i ekstraktów osocza, pobranych od tej samej osoby z tej samej próbki krwi.

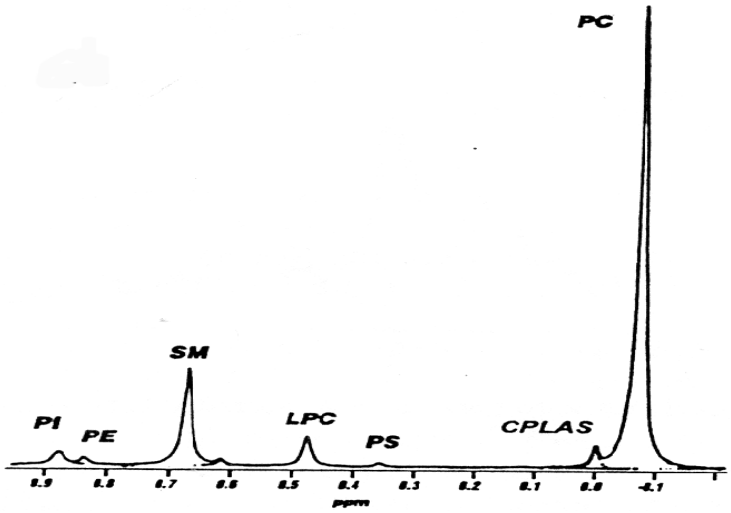
4.2.1. Porównanie widm ^{31}P NMR fosfolipidów z ekstraktów komórek jednojądrzastych z ekstraktami z osocza osób z grupy kontrolnej.

W widmach ^{31}P NMR z ekstraktów komórek jednojądrzastych u osób zdrowych uzyskano linie rezonansowe pochodzace od następujących fosfolipidów: PC, CPLAS, LPC, SM, PI+PE, PS i CL, co przedstawiono na rycinie 45.

W widmach ^{31}P NMR z ekstraktów osocza grupy kontrolnej linie rezonansowe pochodziły od: PC, CPLAS, PS, LPC, SM, PI+PE, co przedstawiono na rycinie 46.



Ryc. 45. Widmo ^{31}P NMR fosfolipidów z ekstraktów komórek jednojądrzastych osoby zdrowej (od strony prawej linie rezonansowe pochodzące od: PC, CPLAS, LPC, SM, PI+PE, PS, CL).



Ryc. 46. Widmo ^{31}P NMR fosfolipidów z ekstraktu osocza osoby zdrowej (od strony prawej linie rezonansowe pochodzące od: PC, CPLAS, PS, LPC, SM, PI+PE).

W widmach ^{31}P NMR zarówno z ekstraktów komórek jednojądrzastych jak i z ekstraktów osocza osób zdrowych zaobserwować można linie rezonansowe pochodzące od: PC, CPLAS, LPC, SM, PI+PE oraz PS.

CL jest fosfolipidem błon mitochondrialnych, w osoczu nie występuje, dlatego linię rezonansową pochodzącą od tego fosfolipidu zaobserwować można tylko w widmach

^{31}P NMR uzyskanych z ekstraktów komórek jednojądrzastych. Sygnału rezonansowego pochodzącego od CL nie obserwowano jednak u wszystkich osób zdrowych w widmach z ekstraktów komórek jednojądrzastych.

Widma ^{31}P NMR uzyskane z ekstraktów komórek jednojądrzastych różnią się od widm z ekstraktów osocza położeniem PS. PS w ekstraktach komórek jednojądrzastych występuje między PI+PE a CL (typowe przesunięcie chemiczne - 1,208 ppm), a w ekstraktach osocza między CPLAS a LPC (typowe przesunięcie chemiczne - 0,659 ppm). Sygnał rezonansowy pochodzący od PS zaobserwowano u niewielu osób z grupy kontrolnej w ekstraktach z komórek jednojądrzastych i u jednej osoby w ekstraktach z osocza.

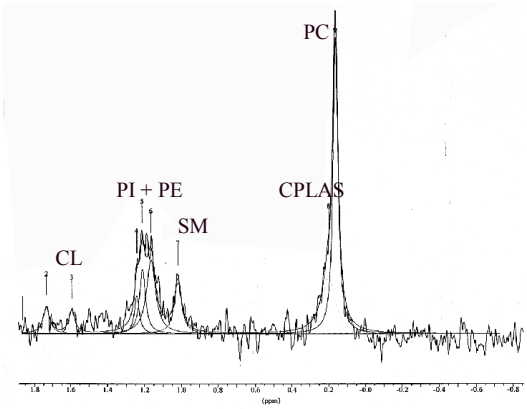
Widma ^{31}P NMR z ekstraktów komórek jednojądrzastych różnią się od widm z ekstraktów osocza odwrotnym stosunkiem SM/PI+PE.

W badanych widmach sygnał rezonansowy pochodzący od LPC obserwowano w ekstraktach osocza u wszystkich osób grupy kontrolnej, ale u tylko jednej z tych osób linię rezonansową pochodząca od LPC zaobserwowano w ekstraktach komórek jednojądrzastych.

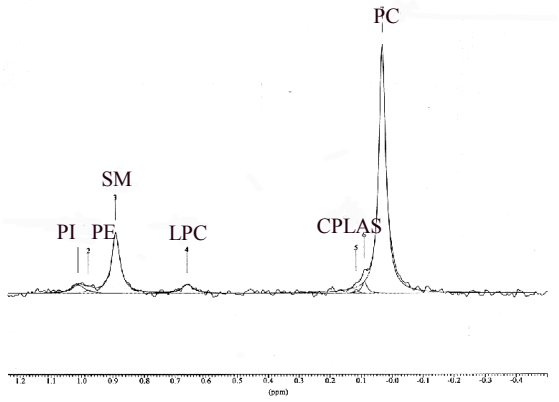
4.2.2. Porównanie widm ^{31}P NMR fosfolipidów z ekstraktów komórek jednojądrzastych z ekstraktami osocza osób z rozpoznaniem ostrej białaczki.

W widmach ^{31}P NMR z ekstraktów komórek blastycznych osób z rozpoznaniem ostrej białaczki obserwowano linie rezonansowe pochodzące od następujących fosfolipidów: PC, CPLAS, SM, PI+PE, CL, co przedstawiono na rycinach 47. A i 48. A.

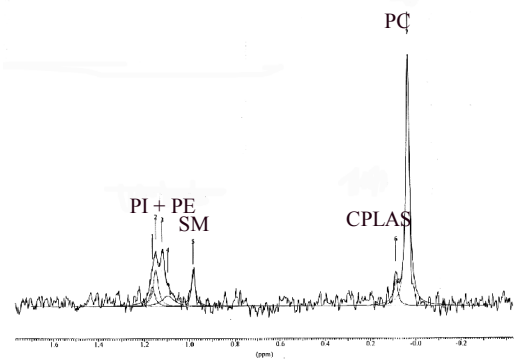
W widmach ^{31}P NMR z ekstraktów osocza osób z rozpoznaniem ostrej białaczki linie rezonansowe pochodziły od: PC, CPLAS, LPC, SM, PI+PE, co przedstawiono na rycinie 47. B i 48. B.



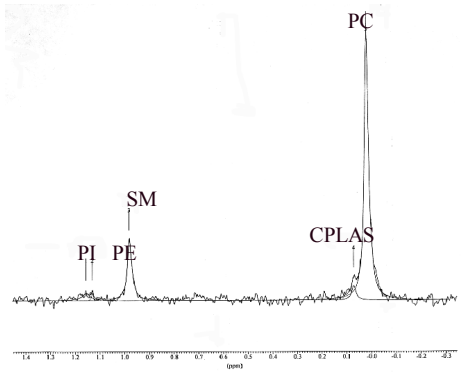
Ryc. 47. A. Widmo ^{31}P NMR fosfolipidów z ekstraktu komórek jednojądrzastych osoby z rozpoznaniem ostrej białaczki (od strony prawej linie rezonansowe pochodzące od: PC, CPLAS, SM, PI+PE, CL).



Ryc. 47. B. Widmo ^{31}P NMR fosfolipidów z ekstraktu osocza osoby z rozpoznaniem ostrej białaczki. Widmo pochodzi od tego samego chorego, co widmo z ekstraktu komórek blastycznych przedstawione na rycinie 52. A (z jednej próbki krwi). Od strony prawej linie rezonansowe pochodzące od: PC, CPLAS, LPC, SM, PI+PE.



Ryc. 48. A. Widmo ^{31} P NMR fosfolipidów z ekstraktu komórek jednojądrzastych osoby z rozpoznaniem ostrej białaczki (od strony prawej linie rezonansowe pochodzące od: PC, CPLAS, SM, PI+PE).



Ryc. 48. B. Widmo ^{31}P NMR fosfolipidów z ekstraktu osocza osoby z rozpoznaniem ostrej białaczki. Widmo pochodzi od tego samego chorego, co widmo z estraktu komórek blastycznych przedstawione na rycinie 53. A (z jednej próbki krwi). Od strony prawej linie rezonansowe pochodzące od: PC, CPLAS, SM, PI+PE.

W widmach ^{31}P NMR zarówno z ekstraktów komórek jednojądrzastych jak i z ekstraktów osocza osób z rozpoznaniem ostrej białaczki zaobserwować można linie rezonansowe pochodzące od: PC, CPLAS, SM, PI+PE.

CL jest fosfolipidem błon mitochondrialnych. Obserwowano go tylko u jednego chorego w widmach z ekstraktów komórek blastycznych, w osoczu nie występował.

PS zaobserwowano tylko u dwóch osób chorych w widmach z ekstraktu komórek blastycznych. W widmach z ekstraktu osocza chorych nie zaobserwowano sygnału rezonansowego pochodzącego od PS.

Nie zaobserwowano linii rezonansowej pochodzącej od LPC ani u jednej osoby z rozpoznaniem ostrej białaczki w ekstraktach komórek jednojądrzastych.

W ekstraktach z osocza sygnał rezonansowy pochodzący od LPC stwierdzono u ośmiu spośród dwunastu badanych chorych.

W widmach z ekstraktów komórek jednojądrzastych osób chorych również zauważalny jest odwrotny stosunek SM/PI+PE w porównaniu z widmami z ekstraktów osocza.

Z pięćdziesięciu osób objętych badaniem wybrano osiem osób zdrowych i dwanaście chorych, u których średnie stężenia poszczególnych fosfolipidów w ekstraktach z komórek jednojądrzastych przedstawiono w tabeli 9, a w ekstraktach z osocza – w tabeli 10.

Wyniki uzyskane z ekstraktów komórek jednojądrzastych w tej grupie badanych osób potwierdziły wyniki otrzymane w pięćdziesięcioosobowej grupie badanych, które zostały omówione w poprzednim rozdziale (4.2.).

Natomiast wyniki uzyskane z ekstraktów osocza przedstawiono w tabeli 10.
U wszystkich osób z rozpoznaniem ostrej białaczki wykazano statystycznie istotne ($p<0,001$) obniżenie stężenia SM w porównaniu z grupą kontrolną (odpowiednio - 0,485 mol/litr$\cdot 10^{-3}$ i 1,019 mol/ltr$\cdot 10^{-3}$). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniach CPLAS między osobami z rozpoznaniem ostrej białaczki a osobami zdrowymi. U wszystkich chorych wykazano statystycznie istotne ($p<0,01$) obniżenie stężenia LPC w porównaniu z grupą kontrolną (odpowiednio - 0, 092 mol/litr$\cdot 10^{-3}$ i 0,336 mol/litr$\cdot 10^{-3}$). U osób chorych wykazano statystycznie istotne ($p = 0,01$) zmniejszone stężenie PC w porównaniu do grupy kontrolnej (odpowiednio - 3,209 mol/litr$\cdot 10^{-3}$ i 4,474$\cdot 10^{-3}$). Linię rezonansową pochodzącą od PS stwierdzono tylko u jednej osoby zdrowej, dlatego nie uwzględniono tego parametru w tabeli. Nie stwierdzono obecności sygnału rezonansowego pochodzącego od CL w ekstraktach z osocza zarówno u osób z rozpoznaniem ostrej białaczki jak i u osób zdrowych, co również było powodem pominięcia tego parametru w tabeli.

Tab. 9. Średnie stężenia fosfolipidów z ekstraktów komórek jednojądrzastych ($6 \cdot 10^7$ komórek/ml) otrzymanych od osób zdrowych i pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki, wyrażone w mol/litr$\cdot 10^{-3}$.

EKSTRAKTY Z KOMÓREK JEDNOJĄDRZASTYCH							
Fosfolipidy z ekstraktów komórek jednojądrzastych (parametr)	ZDROWI (A) n=8			OSTRA BIAŁACZKA (B) n=12			Poziom istotności p
	$\overline{X}$	mediana	SD	$\overline{X}$	mediana	SD	A : B
PI+PE	0,277	0,300	0,093	0,232	0,242	0,139	NS
SM	0,130	0,114	0,032	0,082	0,081	0,036	<0,01
LPC	0,004	0,000	0,012	0,000	0,000	0,000	NS
CPLAS	0,037	0,032	0,044	0,087	0,087	0,060	<0,05
PC	0,363	0,317	0,095	0,311	0,311	0,116	NS

Tab. 10. Średnie stężenia fosfolipidów z ekstraktów osocza otrzymanych od tych samych osób zdrowych i tych samych pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki, wyrażone w mol/litr$\cdot 10^{-3}$.

EKSTRAKTY Z OSOCZA							
Fospfolipidy z ekstraktów osocza (parametr)	ZDROWI (A) n=8			OSTRA BIAŁACZKA (B) n=12			Poziom istotności p
	$\overline{X}$	mediana	SD	$\overline{X}$	mediana	SD	A : B
PI+PE	0,277	0,090	0,195	0,112	0,049	0,130	<0,05
SM	1,019	0,646	0,277	0,485	0,483	0,205	<0,001
LPC	0,336	0,095	0,206	0,092	0,086	0,085	<0,01
CPLAS	0,155	0,300	0,135	0,113	0,149	0,092	NS
PC	4,474	2,268	1,936	3,209	2,046	4,373	0,01

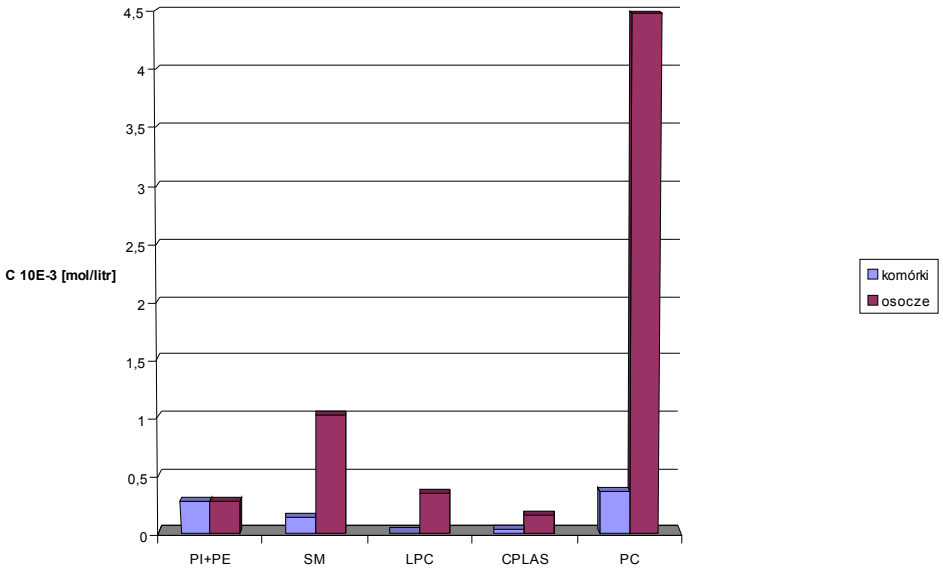
Następnie porównano otrzymane średnie wartości stężeń poszczególnych fosfolipidów w ekstraktach z komórek jednojądrzastych ze stężeniami w ekstraktach z osocza pochodzącymi od tych samych osób z jednej próbki krwi i przedstawiono je w tabeli 11 i 12 oraz na rycinach 49 i 50.

Tab. 11. Porównanie średnich stężeń fosfolipidów z ekstraktów komórek jednojądrzastych ($6 \cdot 10^7$ komórek/ml) i ekstraktów z osocza otrzymanych od osób zdrowych z jednej próbki krwi (wartości wyrażono w mol/litr$\cdot 10^{-3}$).

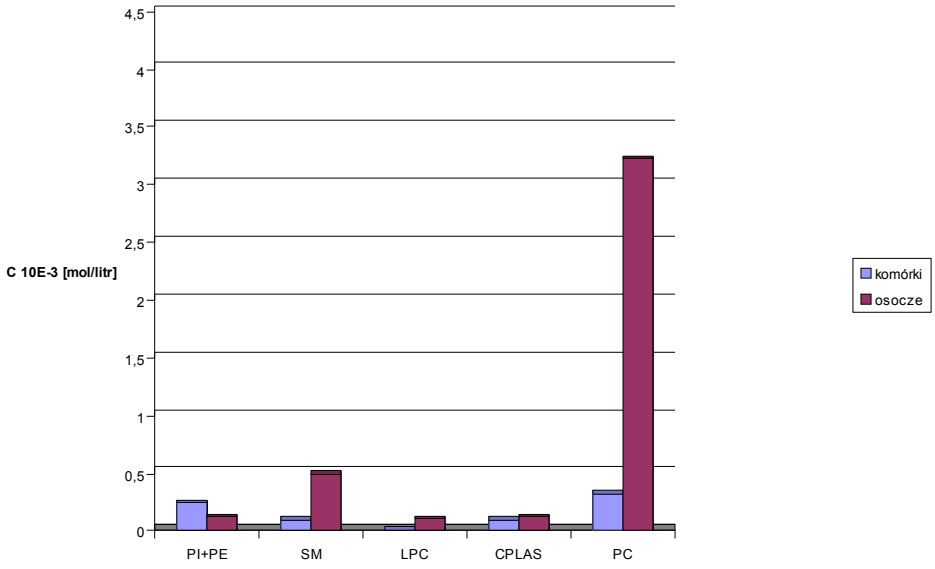
Parametr	ZDROWI (n=8)				Poziom istotności P
	KOMÓRKI (A)		OSOCZE (B)		
	$\overline{X}$	SD	$\overline{X}$	SD	A : B
PI+PE	0,277	0,093	0,277	0,195	NS
SM	0,130	0,032	1,019	0,277	<0,05
LPC	0,004	0,012	0,336	0,012	<0,05
CPLAS	0,037	0,044	0,155	0,135	<0,05
PC	0,363	0,095	4,474	1,936	<0,05

Tab. 12. Porównanie średnich stężeń fosfolipidów z ekstraktów komórek jednojądrzastych ($6 \cdot 10^7$ komórek/ml) i ekstraktów z osocza otrzymanych od pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki z tej samej próbki krwi (wartości wyrażono w mol/litr$\cdot 10^{-3}$).

Parametr	OSTRA BIAŁACZKA (n=12)				Poziom istotności p
	KOMÓRKI (A)		OSOCZE (B)		
	$\overline{X}$	SD	$\overline{X}$	SD	A : B
PI+PE	0,233	0,139	0,113	0,130	<0,05
SM	0,082	0,036	0,485	0,205	<0,01
LPC	0,000	0,000	0,092	0,085	<0,05
CPLAS	0,087	0,061	0,113	0,092	NS
PC	0,311	0,116	3,209	4,373	<0,01



Ryc. 49. Porównanie średnich stężeń fosfolipidów w ekstraktach z komórek jednojądrzastych ze stężeniami w ekstraktach z osocza otrzymanymi od osób zdrowych z jednej próbki krwi.

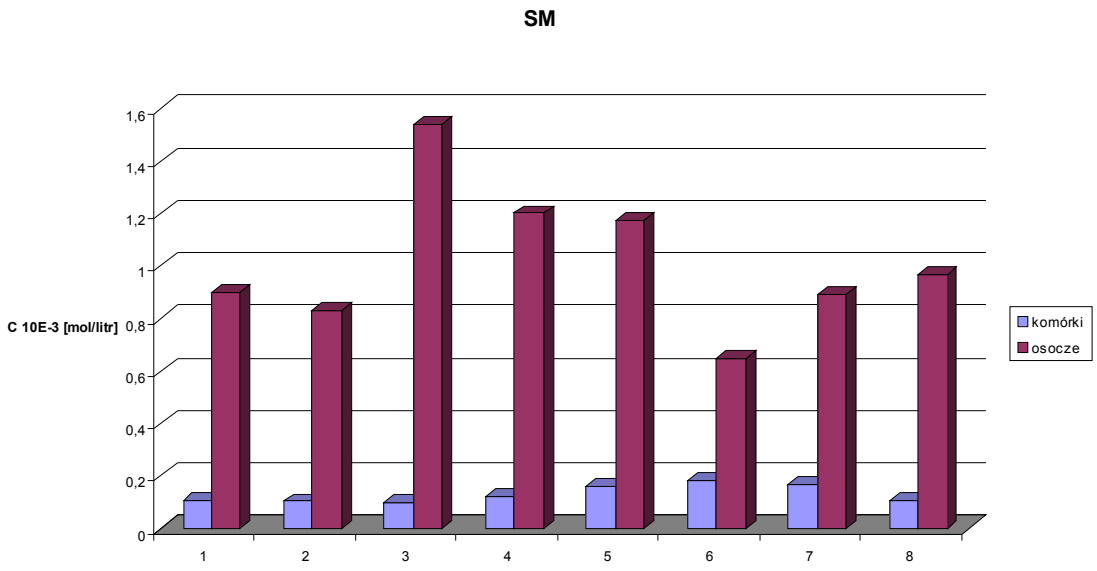


Ryc. 50. Porównanie średnich stężeń fosfolipidów w ekstraktach z komórek jednojądrzastych ze stężeniami w ekstraktach z osocza otrzymanymi od osób z rozpoznaniem ostrej białaczki z jednej próbki krwi.

4.2.3. Sfingomielina.

U wszystkich osób z grupy kontrolnej wykazano statystystycznie istotne ($p<0,05$) niższe stężenie SM w ekstraktach z komórek jednojądrzastych w porównaniu ze stężeniem SM w ekstraktach osocza (odpowiednio - 0,130 mol/litr·10^{-3} i 1,019 mol/litr·10^{-3}).

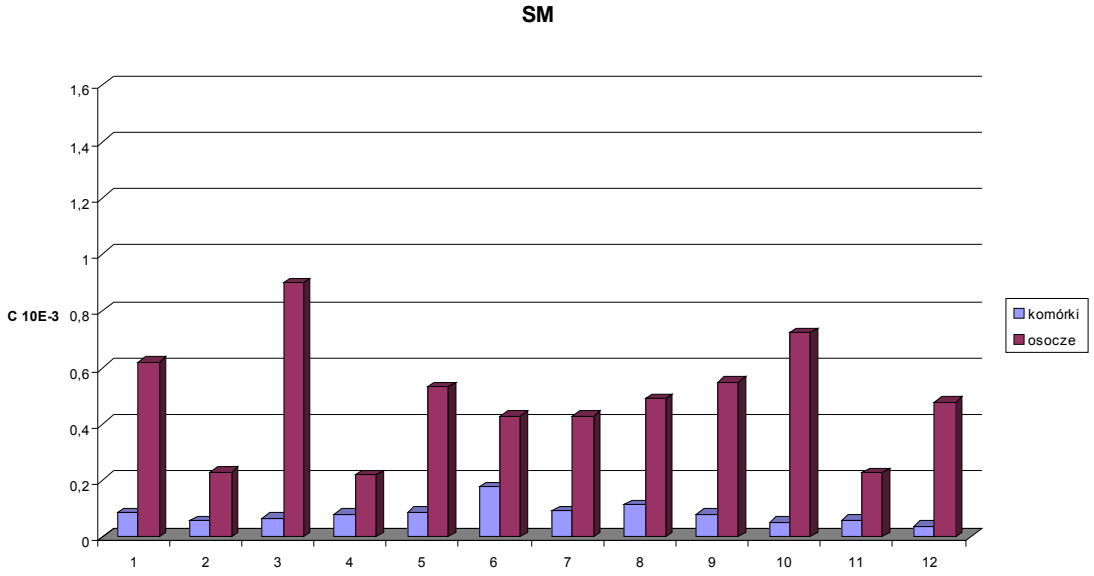
Wyniki przedstawiono w tabeli 11 oraz na rycinie 49 i 51.



Ryc. 51. Porównanie stężeń SM w ekstraktach z komórek jednojądrzastych ze stężeniami w ekstraktach z osocza u poszczególnych osób zdrowych.

U wszystkich osób z rozpoznaniem ostrej białaczki (podobnie jak w grupie kontrolnej) wykazano statystycznie istotne ($p<0,01$) niższe stężenie SM w ekstraktach z komórek jednojądrzastych w porównaniu ze stężeniem SM w ekstraktach z osocza (odpowiednio - 0,082 mol/litr·10^{-3} i 0,485 mol/litr·10^{-3}).

Wyniki przedstawiono w tabeli 12 oraz na rycinie 50 i 52.

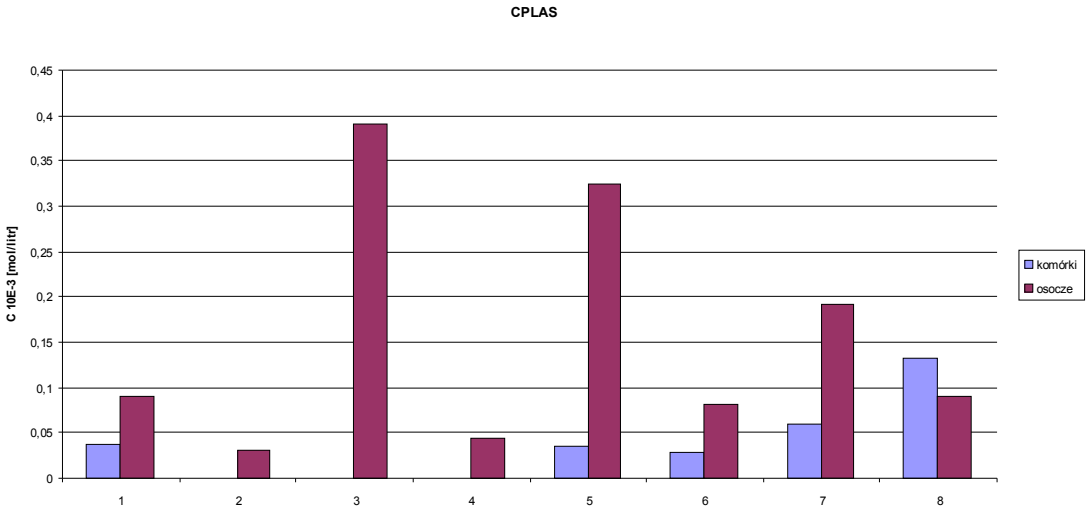


Ryc.52. Porównanie stężeń SM w ekstraktach z komórek jednojądrzastych ze stężeniami w ekstraktach z osocza u poszczególnych pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki.

4.2.4. Plazmalogen fosfatydylocholiny.

U prawie wszystkich osób zdrowych wykazano statystycznie istotne ($p<0,05$) niższe stężenie CPLAS w ekstraktach z komórek jednojądrzastych w porównaniu ze stężeniem CPLAS w ekstraktach z osocza (odpowiednio - 0,037 mol/litr$\cdot 10^{-3}$ i 0,155 mol/litr$\cdot 10^{-3}$).

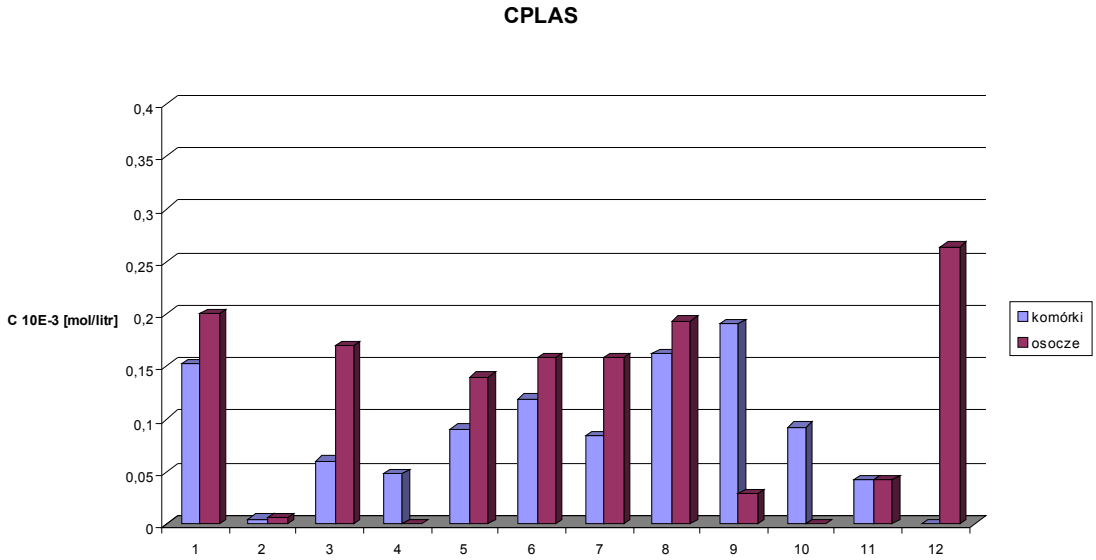
Wyniki przedstawiono w tabeli 11 oraz na rycinie 49 i 53.



Ryc. 53. Porównanie stężeń CPLAS w ekstraktach z komórek jednojądrzastych ze stężeniami w ekstraktach z osocza u poszczególnych osób zdrowych.

U pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w stężeniach CPLAS między ekstraktami z komórek jednojądrzastych a ekstraktami z osocza.

Wyniki przedstawiono w tabeli 12 oraz na rycinie 50 i 54.



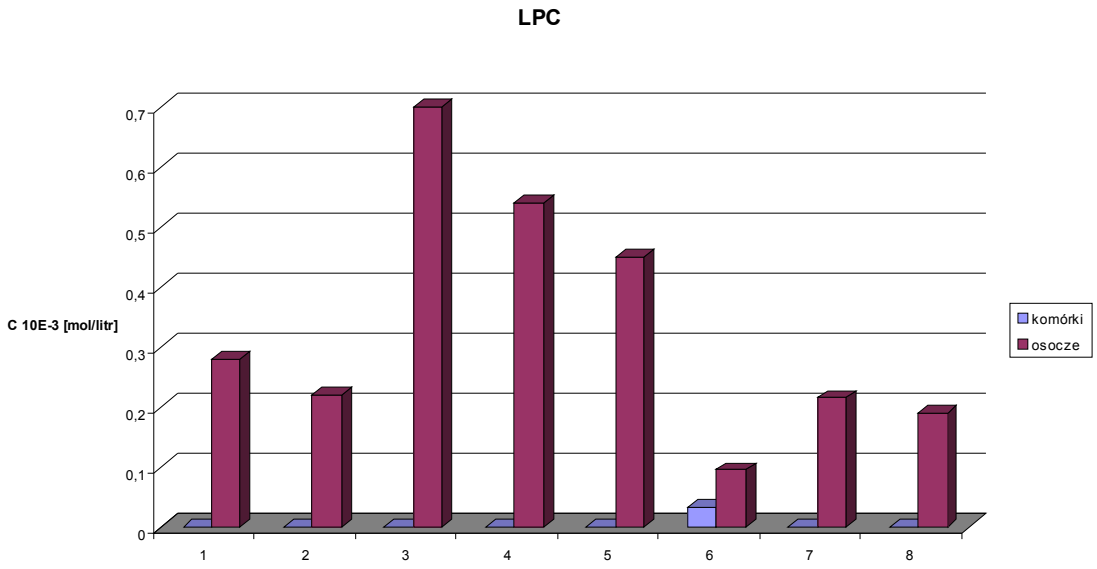
Ryc. 54. Porównanie stężeń CPLAS w ekstraktach z komórek jednojądrzastych ze stężeniami w ekstraktach z osocza u poszczegolnych pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki.

4.2.5. Lizofosfatydylocholina.

Linię rezonansową pochodzącą od LPC zaobserwowano w widmach ^{31}P NMR z ekstraktów komórek jednojądrzastych tylko u jednej osoby zdrowej. Natomiast w ekstraktach z osocza w badanej grupie kontrolnej u wszystkich osób zaobserwowano sygnał rezonansowy pochodzący od LPC.

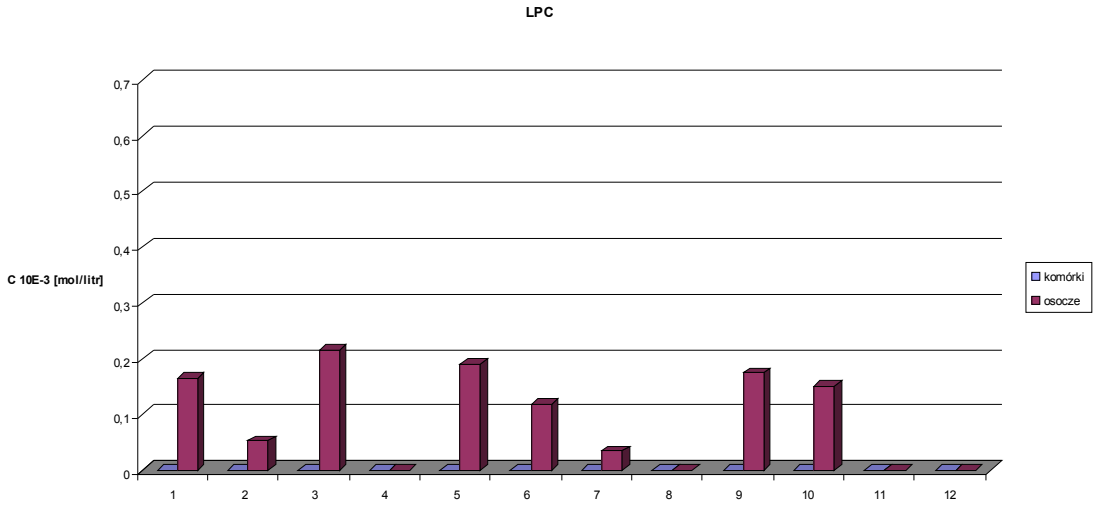
U wszystkich osób zdrowych wykazano statystycznie istotne ($p<0,05$) niższe średnie stężenie LPC w ekstraktach z komórek jednojądrzastych w porównaniu ze stężeniem LPC w ekstraktach z osocza (odpowiednio - 0,004 mol/litr·10^{-3} i 0,336 mol/litr·10^{-3}).

Wyniki przedstawiono w tabeli 11 oraz na rycinie 49 i 55.



Ryc. 55. Porównanie stężeń LPC w ekstraktach z komórek jednojądrzastych ze stężeniami w ekstraktach z osocza u poszczególnych osób zdrowych.

W widmach ^{31}P NMR z ekstraktów komórek blastycznych pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki nie stwierdzono ani u jednej osoby linii rezonansowej pochodzącej od LPC. U grupy osób chorych wykazano zatem statystycznie istotne ($p<0,05$) niższe stężenie LPC w ekstraktach z komórek jednojądrzastych w porównaniu ze stężeniem tego fosfolipidu w ekstraktach z osocza (odpowiednio - 0,000 mol/litr·10^{-3} i 0,092 mol/litr·10^{-3}). Wyniki przedstawiono w tabeli 12 oraz na rycinie 50 i 56.

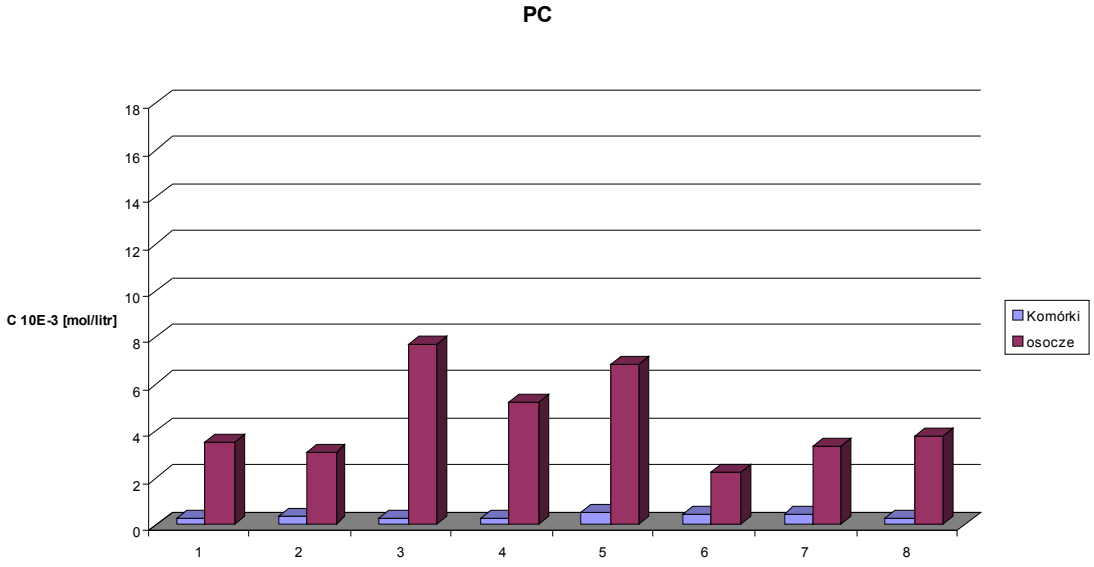


Ryc.56. Porównanie stężeń LPC w ekstraktach z komórek jednojądrzastych ze stężeniami w ekstraktach z osocza u poszczególnych pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki.

4.2.6. Fosfatydylocholina.

U wszystkich osób z grupy kontrolnej wykazano statystycznie istotne ($p<0,05$) niższe stężenie PC w ekstraktach z komórek jednojądrzastych w porównaniu ze stężeniem tego fosfolipidu w ekstraktach z osocza (odpowiednio - 0,363 mol/litr$\cdot 10^{-3}$ i 4,474 mol/litr$\cdot 10^{-3}$).

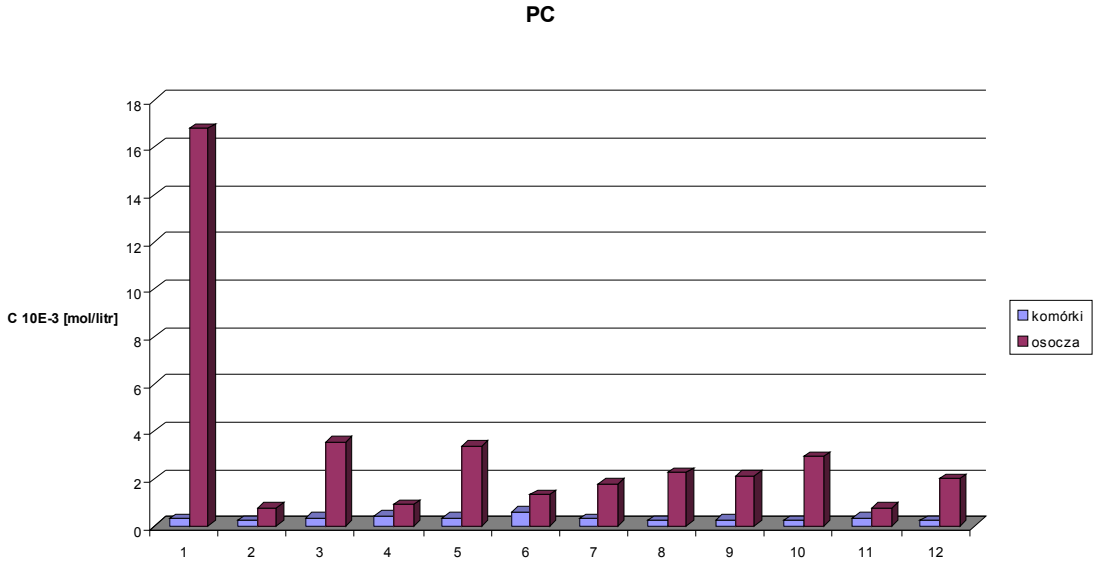
Wyniki przedstawiono w tabeli 11 oraz na rycinie 49 i 57.



Ryc. 57. Porównanie stężeń PC w ekstraktach z komórek jednojądrzastych ze stężeniami w ekstraktach z osocza u poszczególnych osób zdrowych.

U wszystkich osób z rozpoznaniem ostrej białaczki (analogicznie jak w grupie kontrolnej) wykazano statystycznie istotne ($p<0,01$) niższe stężenie PC w ekstraktach z komórek jednojądrzastych w porównaniu ze stężeniem PC w ekstraktach z osocza (odpowiednio - 0,311 mol/litr$\cdot 10^{-3}$ i 3,209 mol/litr$\cdot 10^{-3}$).

Wyniki przedstawiono w tabeli 12 oraz na rycinie 50 i 58.



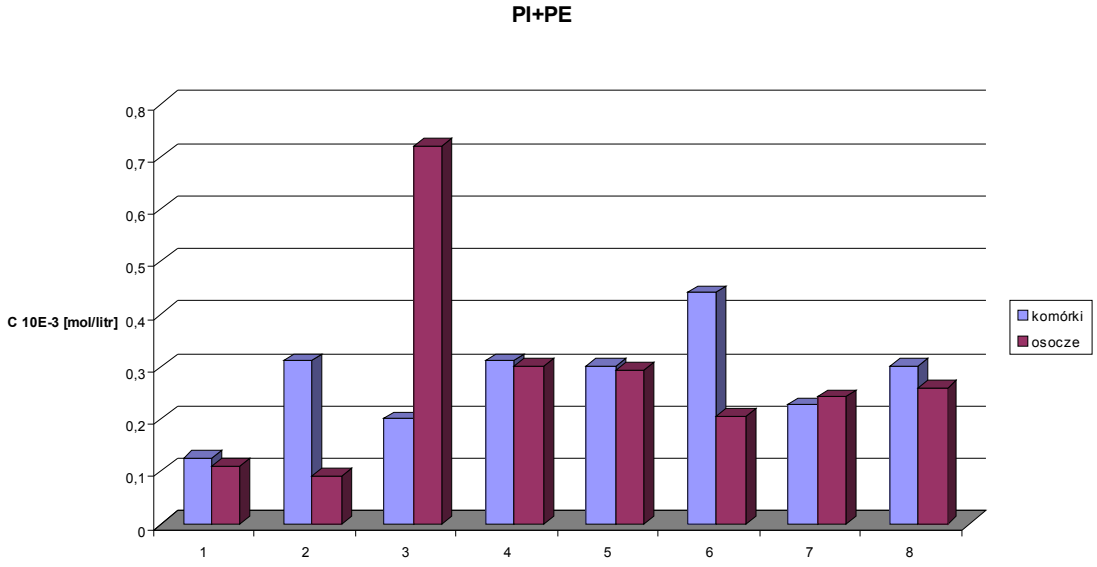
Ryc. 58. Porównanie stężeń PC w ekstraktach z komórek jednojądrzastych ze stężeniami w ekstraktach z osocza u poszczegolnych pacjentów z rozpoznanim ostrej białaczki.

U jednej osoby chorej zaobserwowano odbiegająco wyokie stężenie PC w ekstrakcie z osocza (Ryc. 58 – nr 1). Miała ona rozpoznaną MLA M_4.

4.2.7. Fosfatydyloinozytol i fosfatydyloetanolamina.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniu PI+PE między ekstraktami z komórek jednojądrzastych a ekstraktami z osocza u osób zdrowych (wartości średnich stężeń tych fosfolipidów w obu środowiskach – w komórkach i w osoczu były jednakowe i wynosiły 0,277 mol/litr·10^{-3}).

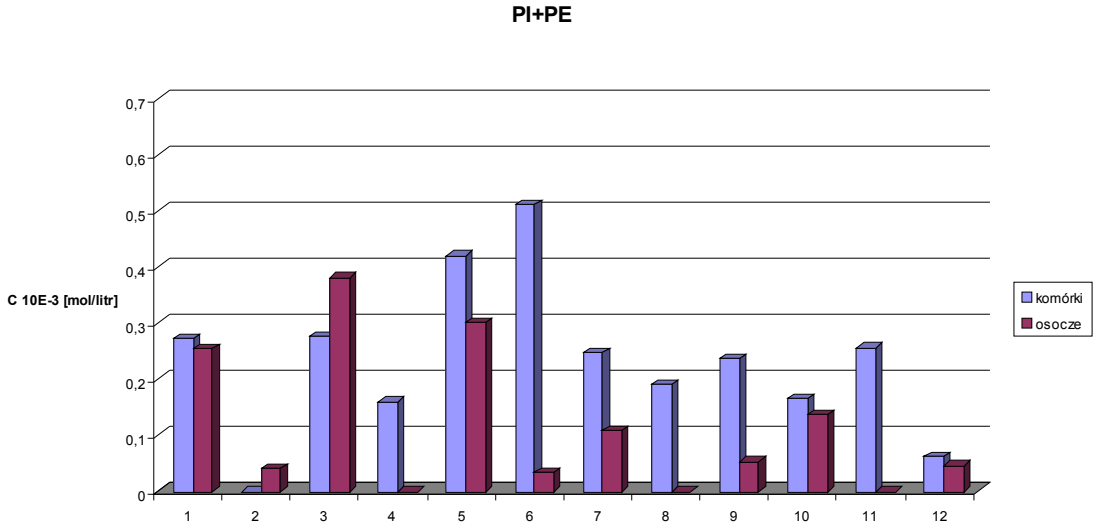
Wyniki przedstawiono w tabeli 11 i na rycinie 49 i 59.



Ryc. 59. Porównanie stężeń PI+PE w ekstraktach z komórek jednojądrzastych ze stężeniami w ekstraktach z osocza u poszczególnych osób zdrowych.

U osób z rozpoznaniem ostrej białaczki wykazano statystycznie istotne ($p<0,05$) wyższe stężenie PI+PE w ekstraktach z komórek jednojądrzastych w porównaniu ze stężeniem PI+PE w ekstraktach z osocza (odpowiednio - 0,233 mol/litr·10^{-3} i 0,113 mol/litr·10^{-3}).

Wyniki przedstawiono w tabeli 12 oraz na rycinie 50 i 60.



Ryc. 60. Porównanie stężeń PI+PE w ekstraktach z komórek jednojądrzastych ze stężeniami w ekstraktach z osocza u poszczególnych pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki.

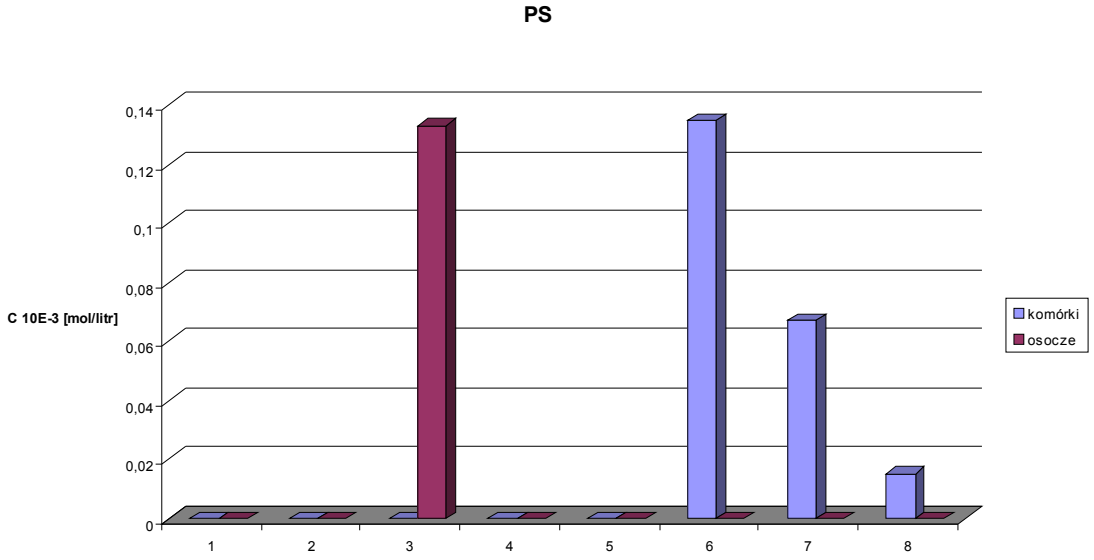
4.2.8.Fosfatydyloseryna.

W widmach ^{31}P NMR z ekstraktów komórek jednojądrzastych linię rezonansową pochodzącą od PS zaobserwowano u trzech osób zdrowych i dwóch chorych.

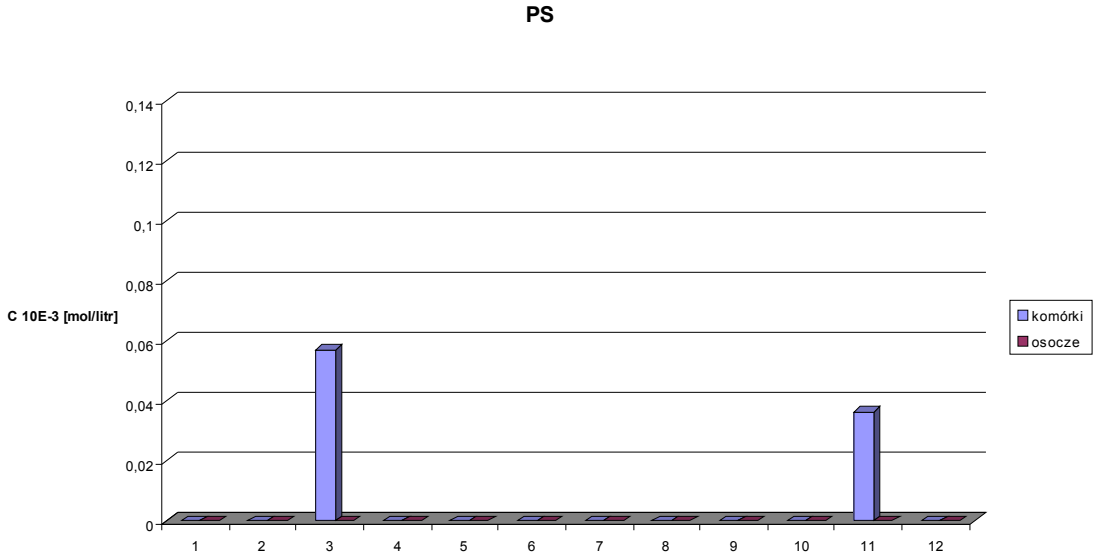
W widmach ^{31}P NMR z ekstraktów osocza stwierdzono obecność PS tylko u jednej osoby zdrowej. Wyniki przedstawiono na rycinach 61 i 62.

Ze względu na tak sporadycznie zaobserwowany sygnał rezonansowy pochodzący od PS w widmach, nie wykazano istotnych statystycznie różnic w stężeniach tego fosfolipidu między badanymi grupami osób w dwóch różnych środowiskach (komórki, osocze).

Należy zwocić uwagę, że w widmach ^{31}P NMR sygnał rezonansowy pochodzący od PS zarówno w ekstraktach z komórek jednojądrzastych, jak i w ekstraktach z osocza jest mały, dlatego trudno go dobrze zinterpretować i odróżnić od szumów występujących w widmie.



Ryc. 61. Porównanie stężeń PS w ekstraktach z komórek jednojądrzastych ze stężeniami w ekstraktach z osocza u poszczególnych osób zdrowych.



Ryc. 62. Porównanie stężeń PS w ekstraktach z komórek jednojądrzastych ze stężeniami w ekstraktach z osocza u poszczególnych pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki.

4.2.9. Kardiolipina.

Kardiolipina nie występuje w osoczu. Jest to fosfolipid występujący w błonach mitochondrialnych. Dlatego nie uwzględniono CL przy porównywaniu stężeń fosfolipidów w ekstraktach z komórek jednojądrzastych i w osoczu.

5. Dyskusja.

W literaturze istnieje niewiele publikacji dotyczących analizy linii rezonansowych pochodzących od fosfolipidów w widmach ^{31}P NMR z materiału pobranego od osób z nowotworami hematologicznymi.

W badaniach na surowicach pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki, chłoniaka złośliwego i szpiczaka mnogiego w widmach ^{31}P NMR stwierdzono obecność trzech linii rezonansowych pochodzących od: PC, LPC i PE+SM [42-46]. Natomiast w osoczu pacjentów z rozpoznaniem raka nerki i raka tarczycy uzyskano dodatkowo sygnał rezonansowy pochodzący od PI oraz wyróżniono dwie linie rezonansowe pochodzące od LPC: LPC1 i LPC2 (odpowiednio 1-acyl i 2-acyllizofosfatydylocholiny) [70, 82]. Wykazano również zmiany w intensywnościach integralnych linii rezonasowych i stężeniach poszczególnych fosfolipidów w surowicy bądź osoczu osób z rozpoznaniem nowotworu hematologicznego, raka nerki, czy tarczycy w porównaniu do osób zdrowych. Zmiany te obserwowano w momencie rozpoznania nowotworu, w trakcie i po zakończeniu leczenia. Stwierdzono ponadto zależność między stopniem zaawansowania choroby nowotworowej a obserwowanymi stężeniami fosfolipidów. Na podstawie analizy widm ^{31}P NMR wykazano też, że na poziom fosfolipidów w osoczu osób z guzem tarczycy ma wpływ aktualny poziom hormonów, a w przypadku guza nerki odnośnie stężenia PC prawdopodobnie i płeć [42-46, 70, 82].

W widmach ^{31} P NMR z ekstraktów tkanek ludzkich obserwuje się linie rezonansowe pochodzące od następujących fosfolipidów: PC, CPLAS, SM, PI, PE, EPLAS, PS i CL, a także w bardzo małych ilościach od LPC, PA oraz PG (fosfatydyloglicerolu). Tkanki zmienione nowotworowo różnią się od tkanek prawidłowych intensywnościami integralnymi i stężeniami poszczególnych fosfolipidów. Stężenia poszczegolnych fosfolipidów zarówno w różnych rodzajach tkanek prawidłowych jak i w różnych rodzajach guzów nowotworowych różnią się między sobą [57-62]. Analiza widm fosforowych ^{31}P NMR fosfolipidów z ekstraktów osocza ludzkiej krwi (ekstrakcja metodą Folcha) [10] oraz obserwacje takich ekstraktów w widmach ^{31}P NMR u osób z chorobami rozrostowymi krwi [88], pozwoliły na stwierdzenie w nich ośmiu linii rezonansowych pochodzących od: PC1, PC2, CPLAS, PS, LPC, SM, PE i PI. Można też było ocenić zmiany stężeń poszczególnych fosfolipidów podczas choroby.

Ze względu na fakt, że widma fosforowe uzyskane z ekstraktów fosfolipidów z osocza, komórek lub tkanek dają możliwość analizy zmian zachodzących w metabolizmie lipidowym, podjęto próbę identyfikacji i obserwacji zmian uzyskanych linii rezonansowych pochodzących od fosfolipidów z ekstraktów komórek jednojądrzastych.

W widmie ^{31}P NMR fosfolipidów z ekstraktu komórek jednojądrzastych osoby zdrowej zaobserwowano linie rezonansowe pochodzące od następujących fosfolipidów: PC, CPLAS, SM, PI+PE. Stwierdzono, że widma pacjentów wykonane w momencie rozpoznania ostrej białaczki różnią się od widm osób zdrowych intensywnością integralną linii rezonansowej pochodzącej od SM, a także u większości osób intensywnością integralną sygnału rezonansowego pochodzącego od CPLAS.

Zarówno u osób zdrowych jak i chorych w widmach ^{31}P NMR z ekstraktu komórek jednojądrzastych linie rezonansowe pochodzące od LPC, PS i CL obserwowano w pojedynczych przypadkach. Być może wpływ na to miał fakt, że intensywności integralne tych linii są małe i czasem sprawiają trudność w odróżnieniu ich od szumów występujących w widmie.

Na podstawie wykonanych widm z ekstraktów komórek jednojądrzastych próbowano ocenić czy istnieją różnice między pacjentami reagującymi i nie reagującymi na leczenie cytostatyczne. Czyli czy zmiany obserwowane w widmie wykonanym w momencie rozpoznania nowotworu mogą posłużyć jako wskaźnik prognostyczny choroby. Istnieją bowiem doniesienia w literaturze o możliwości takiego prognozowania na podstawie analizy widm fosforowych NMR. Stwierdzono, że zmiany obserwowane w widmach w czasie stosowanego leczenia mogą na kilka miesięcy wyprzedzać wystąpienie remisji lub nawrotu choroby niezależnie od aktualnego stanu klinicznego chorego. Obserwowano to na przykład w widmach ^{31}P śledzion pacjentów z rozpoznaniem przewlekłej białaczki limfatycznej [78]. W badaniach wykonanych na surowicach pacjentów z rozpoznaniem białaczki, chłoniaka i szpiczaka mnogiego wykazywały na zależność między zmianami w widmach a odpowiedzią pacjentów na stosowaną chemioterapię. U osób reagujących na leczenie wartości intensywności integralnych linii rezonansowych pochodzących od PC, LPC i PE+SM były zbliżone do występujących u osób zdrowych, a u nie reagujących na leczenie były zredukowane. Widma pacjentów z wieloletnią całkowitą remisją ostrej białaczki lub chłoniaka złośliwego nie różniły się od widm osób zdrowych. Możliwe jest też określenie skuteczności schematów leczniczych, na przykład DHAD i ARA – C [42-47].

SM jest najlepiej poznanym fosfolipidem w procesach nowotworowych. W literaturze istnieją doniesienia, że komórki białaczkowe charakteryzują się zmniejszoną zawartością SM w monowarstwie wewnętrznej błony komórkowej w porównaniu z komórkami prawidłowymi. Jest to powodem zmniejszonej produkcji ceramidu, co w konsekwencji prowadzi do zaburzonego procesu apoptozy i przyczynia się do proliferacji komórek nowotworowych. [7, 12, 22, 29, 48, 52, 76, 84, 86, 92].

W badaniu na ekstraktach komórek blastycznych zaobserwowano istotne statystycznie ($p<0,01$) obniżenie SM w porównaniu z komórkami jednojądrzastymi osób zdrowych. Nie stwierdzono natomiast znaczących róznic między grupami reagującą i nie reagującą na leczenie. Przeprowadzone badanie na ekstraktach komórek blastycznych znajduje swoje potwierdzenie w badaniach ^{31}P NMR Merchanta i wsp. na ekstraktach guzów nowotworowych przełyku i okrężnicy, w których poziom SM był także obniżony w porównaniu z tkanką prawidłową [57, 58].

U pojedynczych badanych pacjentów zaobserwowano wysoki poziom SM w komórkach blastycznych. Były to cztery osoby z rozpoznaniem MLA M_4 (u jednej z nich białaczka wystąpiła w 2 lata od rozpoznania chłoniaka złośliwego, aktualnie w okresie remisji) oraz chora z ostrą białaczką bifenotypową i towarzyszącym rozsianym krzepnięciem wewnątrznaczyniowym, jak również pacjent z MLA M_6 ze współistniejącym ostrym wirusowym zapaleniem wątroby typu B. Za przyczyny wysokich stężenień SM u tych chorych należy prawdopodobnie podejrzewać podtyp M_4 ostrej białaczki szpikowej oraz współistnienie dodatkowych procesów chorobowych - mianowicie takich, jak DIC, czy ostre WZW typu B. U pacjentki z MLA M_4, u której współistniał chłoniak, dodatkowym czynnikiem przyczyniającym się do stwierdzonego wysokiego stężenia SM może być fakt wcześniejszego dwuletniego leczenia cytostatycznego.

Analizując widma fosforowe pochodzące z ekstraktów komórek blastycznych zaobserwowano statystycznie istotne ($p<0,05$) zwiększone stężenie CPLAS w komórkach białaczkowych w porównaniu z komórkami jednojądrzastymi osób zdrowych. Nie stwierdzono znaczących różnic między grupami reagującą i nie reagującą na leczenie. Zaobserwowany wzrost intensywności linii rezonansowej pochodzącej od CPLAS w komórkach białaczkowych ma jedynie potwierdzenie w pracach dotyczących porównania tkanki nowotworowej i zdrowej przełyku, piersi i okrężnicy, przeprowadzonych również przy użyciu spektroskopii ^{31}P NMR, w których wyższy poziom CPLAS stwierdzono w komórkach guza. Podwyższone poziomy

plazmalogenów były obserwowane w różnych tkankach nowotworowych, ale mechanizm tego wzrostu nie został jeszcze wyjaśniony [17, 57, 58, 60, 61]. Katz – Brull i wsp. natomiast wykazali, że zmniejszona synteza eterowych fosfolipidów zawierających cholinę, do których należy CPLAS może służyć jako metaboliczny marker raka piersi [32]. Przytoczone dane świadczą o tym, że doniesienia dotyczące stężenia CPLAS w nowotworach nie są zgodne. Badania zachowania się plazmalogenów w sztucznych i biologicznych błonach komórkowych wskazują, że CPLAS mogą tworzyć nieprzepuszczalne regiony błon i nadawać stabilność tym błonom. Dzieje się to dzięki występowaniu w ich cząsteczce wiązania eterowego, które utrudnia rozbijanie CPLAS przez lipazy [55]. Fakt ten mógłby tłumaczyć zwiększenie stężenia CPLAS w szybko proliferujących, odpornych na działanie czynników zewnętrznych komórkach blastycznych.

Zwrócono uwagę na znaczne różnice w intensywnościach integralnych linii rezonansowych pochodzących od CPLAS u niektórych osób z rozpoznaniem ostrej białaczki. Postawiono więc pytanie, czy istnieją różnice w stężeniu tego fosfolipidu między grupą pacjentów reagujących a nie reagujących na leczenie? Mogłoby to okazać się czynnikiem prognostycznym ostrych białaczek. Wprawdzie średnie stężenie tego fosfolipidu było nieznancznie wyższe w grupie reagujących na leczenie, ale nie udało się wykazać istotnych statystycznie różnic między badanymi grupami chorych, być może z powodu znacznego odchylenia standardowego w grupie pacjentów nie reagujących na leczenie. Najwyższe stężenie CPLAS w przeprowadzonym badaniu obserwowano u trzech pacjentów z MLA M_4 (u jednego z nich współistniał nawracający brodawczak pęcherza moczowego).Wysokie wartości obserwowano również u chorego z ostrą białaczką LLA typu common, który zmarł 1 miesiąc po rozpoznaniu choroby wśród objawów krwawienia i zmian naciekowych w ośrodkowym układzie nerwowym.Tak samo jak w przypadku SM, nasuwa się podejrzenie, że podtyp ostrej białaczki M_4 ma wpływ na odbiegające znacznie od pozostałych osób wyniki badań, a być może również występujący równoczasowo drugi nowotwór. Badania na większych grupach pacjentów mogą zweryfikować dokonane obecnie spostrzeżenia.

Fosfatydylocholina występująca w błonach komórkowych jest fosfolipidem pośredniczącym w powstaniu wtórnych przekaźnikow informacji takich jak kwas fosfatydowy (PA) oraz dwuacyloglicerol (DG), którego główną funkcją jest aktywacja kinazy białkowej C. Procesy wymagające przedłużonego działania tej kinazy to między innymi procesy związane ze wzrostem i proliferacją komórek [6]. Podobnie zachowuje

się fosfatydyloetanolamina. Obserwacje widm fosforowych dotyczących tkanki nowotworowej przełyku i piersi przemawiają za wzrostem stężenia w nich PC i PE w porównaniu do tkanki zdrowej [57, 61]. W badaniu na ekstraktach komórek jednojądrzastych nie stwierdzono istotnie statystycznych różnic w stężeniu PC między pacjentami z rozpoznaniem ostrej białaczki a grupą kontrolną. Zarówno w przypadku pacjentów reagujących, jak i nie reagujących na leczenie średnie wartości stężenia PC w ekstraktach komórek jednojądrzastych były podobne do obserwowanych w grupie kontrolnej. Nie stwierdzono również istotnych różnic w stężeniu PC między poszczególnymi grupami chorych. Na podstawie przeprowadzonych badań nie potwierdzono więc zmian podanych przez Merchanta.

Badając stężenia fosfolipidów w ekstraktach komórek jednojądrzastych nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic dla stężenia PI + PE między grupą pacjentów a grupą kontrolną. Nie stwierdzono też istotnych różnic między grupą pacjentów reagujących i nie reagujących na leczenie. Nie pokrywa się to z danymi wykazanymi przez Merchanta na komórkach guza przełyku i piersi, w których wykazał on zwiększenie poziomu PI i PE w tych komórkach w porównaniu do tkanki zdrowej. Wg Merchanta zwiększony poziom PI wynika z ograniczenia użycia go do budowy glikolipidowej składowej błony komórkowej. Jest ona konieczna do zakotwiczenia białkowej części receptora. Zmniejszenie natomiast liczby receptorów, może prowadzić do zmniejszonej wrażliwości komórek nowotworowych na substancje sygnałowe, co w efekcie zaburza proces zaprogramowanej śmierci komórki [57]. Na podstawie obecnych badań nie zaobserwowano zwiększonego stężenia PI i PE w komórkach blastycznych w porównaniu z komórkami jednojądrzastymi osób zdrowych. Być może wynika to z tego, iż fosfolipidy te podobnie jak PC, ulegają szybkim przemianom w komórkach białaczkowych z wytworzeniem wtórnych przekaźników sygnału dla potrzeb ich proliferacji. Może PI jest w tych komórkach fosforylowany przez kinazy z wytworzeniem fosfatydyloinozytolodwufosforanu, którego rozkład jest połączony z hydrolizą PC, a efektem końcowym jest wytworzenie DG aktywującego białkową kinazę C.

Badania ^{31}P NMR wykonane na komórkach guzów nowotworowych (np. w raku piersi czy chłoniakach złośliwych) in vivo i in vitro wykazały wzrost stężenia w nich fosforyloetanolaminy w porównaniu z tkanką prawidłową. Zasugerowano, iż wysokie jej stężenie w proliferujących komórkach nowotworowych jest wynikiem intensywnego rozkładu PE pod wpływem fosfolipazy C lub D z wytworzeniem wtórnych

przekaźników sygnału w komórce (DG lub PA) [16, 30, 51]. Potwierdzenie dokonanych w obecnym badaniu przypuszczeń, że PC i PE ulegają przemianom dla wytworzenia przkazników sygnału w proliferujących komórkach będzie wymagało w przyszłości oceny stężenia PCh i PEtn w komórkach blastycznych.

Należy nadmienić, że największe stężenia PI+PE w grupie pacjentów nie reagujących na leczenie miały dwie osoby z MLA M4 (u jednego z nich współistniał nawracający brodawczak pęcherza moczowego i ten sam chory miał również wysokie stężenie CPLAS).

W ekstraktach komórek jednojądrzastych linię rezonansową pochodzącą od LPC zaobserwowano tylko u czterech spośród wszystkich pięćdziesięciu osób ujętych w badaniu. Najwyższe stężenie LPC zaobserwowano u osoby zdrowej. Ze względu na tak nielicznie obserwowany sygnał rezonansowy pochodzący od LPC, nie można zatem wysnuć istotnych wniosków co do znaczenia LPC w ekstraktach z komórek jednojądrzastych u osób z rozpoznaniem nowotworu i u osób zdrowych. Należy jednak wspomnieć, że Merchant i wsp. w swoich obserwacjach dotyczących ekstraktów tkankowych piersi, wykazali obniżoną zawartość LPC w tkankach nowotworowych złośliwych i w mniejszym stopniu w nowotworach łagodnych [61]. Natomiast w tkance nowotworowej okrężnicy wykazali wzrost stężenia LPC w prównaniu z tkanką zdrową. [58]. Różnorodnie zachowywały się również stężenia LPC obserwowane przy pomocy spektroskopii ^{31}P NMR w różnych typach wewnątrzczaszkowych oponiaków[77].

Fosfatydyloseryna jest prekursorem PC i PE i jej poziom obniża się wg Merchanta w tkance nowotworowej przełyku [57]. Wśród pięćdziesięciu badanych osób linię rezonansową pochodzącą od PS, zaobserwowano w ekstraktach komórek jednojądrzastych u czterech osób zdrowych oraz u dwunastu osób z rozpoznaniem ostrej białaczki. Ze względu na to, że sygnał rezonansowy pochodzący od PS obecny był u niewielu osób – nie można stwierdzić istotnych wniosków co do znaczenia tego fosfolipidu u pacjentów z nowotworem i osób zdrowych. Należy nadmienić, że najwyższe stężenia PS w ekstraktach komórek blastycznych zaobserwowano u trzech pacjentów z ostrą białaczką mielomonocytową M_4, przy czym dwóch z tych chorych miało współistniejący drugi nowotwór (chory z nawracającym brodawczakiem pęcherza moczowego, u którego zaobserwowano także wysokie stężenia CPLAS i PE+PE oraz pacjentka z chłoniakiem złośliwym z komórek B aktualnie w okresie remisji, która miała również wysokie stężenie SM).

Tylko u sześciu osób wśród pięćdziesięciu badanych zaobserwowano linię rezonansową pochodzącą od CL. U dwóch zdrowych i czterech chorych. Nie można więc wyciągnąć istotnych wniosków o zachowaniu się i znaczeniu CL u badanych osób. Z obserwacji Merchanta na podstawie badań ^{31}P NMR wynika, że poziom CL nie ma istotnego znaczenia w procesach nowotworowych, jest natomiast zależny od rodzaju prawidłowej tkanki. Przykładowo znacznie wyższy jest w komórkach żołądka w porównaniu z komórkami przełyku [57].

Do analizy danych nie brano pod uwagę wyników badań pochodzących od 74-letniego Hindusa z ostrą białaczką mieloblastyczną z cechami dojrzewania (MLA M_2) nie reagującą na leczenie, ze względu na odbiegające w stosunku do innych chorych wysokie stężenia fosfolipidów (wysokie stężenie SM, najwyższe spośród wszystkich badanych stężenie PC oraz PI+PE). Czyżby na wartość stężeń fosfolipidów miała mieć wpływ nacja?

W chwili obecnej można stwierdzić, że w komórkach blastycznych istotnie zmniejszone jest stężenie SM, a zwiększone stężenie CPLAS w porównaniu do komórek jednojądrzastych osób zdrowych. Zmiany obserwowane w metabolizmie fosfolipidów w momencie rozpoznania ostrej białaczki nie mogą być użyte jako wskaźnik prognostyczny odnośnie dalszego przebiegu choroby.

W przeprowadzonym badaniu postawiono sobie również za cel obserwację różnic zachodzących w zachowaniu się fosfolipidów w komórkach blastycznych i osoczu tego samego chorego. W literaturze nie było dotąd publikacji dotyczących porównania stężeń poszczególnych fosfolipidów między ekstraktami uzyskanymi z dwóch różnych środowisk – komórek i osocza pobranych z jednej próbki. Porównanie takie wykonano zaróno dla osób zdrowych jak i pacjntów z rozpoznaniem ostrej białaczki. Wyodrębniono więc dodatkowo grupę osób zdrowych i pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki, u których przeprowadzono analizę widm ^{31}P NMR fosfolipidów z ektraktów komórek jednojądrzastych i z ekstraktów osocza uzyskanych z tej samej próbki krwi.

Analiza widm z ekstraktów komórek jednojądrzastych w tej grupie osób potwierdziła obserwacje omówione już wcześniej w grupie pięćdziesięciu badanych. Zanim jednak porównano uzyskane wyniki z wynikami otrzymanymi z ekstraktów osocza przeanalizowano najpierw widma z ekstraktów osocza.

W widmie ^{31}P NMR fosfolipidów z ekstraktu osocza osoby zdrowej wykazano linie rezonansowe pochodzące od: PC, CPLAS, LPC, SM, PI+PE. Sygnał rezonansowy pochodzący od PS zaobserwowano tylko u jednej osoby zdrowej.

W widmach ^{31}P NMR fosfolipidów z ekstraktu osocza pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki zaobserwowano linie rezonansowe pochodzące od: PC, CPLAS, LPC, SM, PI+PE. Linii pochodzącej od PS nie stwierdzono ani u jednej osoby chorej.

Ekstrakty osocza chorych z rozpoznaniem ostrej białaczki wykazały istotne statystycznie ($p<0,001$) niższe stężenie SM w porównaniu z ekstraktami osocza grupy kontrolnej. Badania ^{31}P NMR na surowicach pacjentów z rozpoznaniem ostrej bialaczki, chłoniaka złośliwego i szpiczaka mnogiego oraz na osoczu chorych z rakiem tarczycy wykazały obniżone w nich stężenia PE+SM w momencie rozpoznania choroby nowotworowej w porównaniu do osocza osób zdrowych [42- 46, 70]. Zastosowana w aktualnym badaniu metoda ekstrakcji fosfolipidów z badanego materiału pozwoliła na oddzielenie linii rezonansowych pochodzących od PE i od SM, pozwalając na bezpośrednie stwierdzenie, że w przypadku rozpoznania ostrej białaczki istotnie spada stężenie SM w osoczu w porównaniu z ekstraktami z osocza osób zdrowych.

W aktualnym badaniu nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniu CPLAS między pacjentami z ostrą białaczką a osobami zdrowymi w widmach uzyskanych z ekstraktów osocza.

W ekstraktach z osocza wykazano natomiast istotnie ($p = 0,01$) obniżone stężenie PC u pacjentów z ostrą białaczką w porównaniu z grupą kontrolną. Tylko u jednej osoby chorej zaobserwowano odbiegająco wysokie od pozostałych stężenie PC w osoczu. Była to osoba z rozpoznaniem MLA M_4.Wykazane w przeporowadzonym badaniu obniżone stężenie PC w osoczu u osób z rozpoznaniem ostrej białaczki miało już swoje potwierdzenie w badaniach na surowicach pacjentów z nowotworami hematologicznymi, osoczu osób z rakiem tarczycy oraz u kobiet z rozpoznanym rakiem nerki. W badaniach tych wykazano ponadto, że obniżone stężenie PC normalizowalo się w okresie remisji choroby [42-46, 70, 82].

W ekstraktach z osocza osób z rozpoznaniem ostrej białaczki wykazano również istotnie ($p<0,05$) niższe stężenie PI+PE w porównaniu do grupy kontrolnej. Wykazane obniżone stężenie PI+PE w osoczu osób z ostrą białaczką ma jedynie swoje potwierdzenie w pracach na surowicach pacjentów z nowotworami hematologicznymi oraz z z rakiem tarczycy, z tą tylko róznicą, że w tych pracach oceniano zbiorczo SM+PE.

W ekstraktach z osocza osób z rozpoznaniem ostrej białaczki zaobserwowano ponadto istotnie ($p<0,01$) obniżony poziom LPC w porównaniu z osoczem grupy kontrolnej. Ma to swoje potwierdzenie we wcześniej wykonanych pracach na surowicach pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki, chłoniaka i szpiczaka mnogiego, a także w pracach dotyczących analizy widm fosforowych u pacjentów z rakiem nerki [42-45, 70].

W widmach ^{31}P NMR z ekstraktów osocza linię rezonansową pochodzącą od PS zaobserwowano tylko u jednej osoby zdrowej, dlatego nie można ocenić zachowania się i znaczenia tego fosfolipidu w przeprowadzonym badaniu.

Po wstępnej analizie widm z eksraktów komórek jednojądrzastych i z ekstraktów osocza w wyodrębnionej grupie osób, podjęto próbę porównania zachowania się poszczególnych fosfolipidów w tych dwóch różnych środowiskach z materiału uzyskanego z jednej próbki krwi.

U osób zdrowych zarówno w ekstraktach z komórek jednojądrzastych, jak i w ekstraktach z osocza, wykazano linie rezonansowe pochodzące od: PC, CPLAS, LPC, SM, PI+PE oraz PS. W ekstraktach z komórek jednojądrzastych sygnał rezonansowy pochodzący od PS stwierdzono u kilku osób, natomiast w ekstraktach z osocza tylko u jednej. Wykazano, że widma uzyskane z dwóch środowisk różniły się innym położeniem tej linii (typowe przesunięcie chemiczne to: 1,208 ppm w ekstraktach z komórek jednojądrzastych, a 0,659 ppm w ekstraktach z osocza). W widmach z ekstraktów komórek jednojądrzastych sygnał rezonansowy pochodzący od CL zaobserwowano u pojedynczych osób, natomiast nie zaobserwowano go w ekstraktach z osocza. Widma ^{31}P NMR fosfolipidów z ekstraktów komórek jednojądrzastych charakteryzowały się mniejszymi intensywnościami integralnymi linii rezonansowych pochodzących od: SM, LPC, CPLAS i PC w stosunku do widm uzyskanych z ekstraktów osocza.

U osób z rozpoznaniem ostrej białaczki, w widmach ^{31}P NMR zarówno z ekstraktów komórek jednojądrzastych jak i z ekstraktów osocza zaobserwowano linie rezonansowe pochodzące od: PC, CPLAS, SM i PI+PE. W komórkach blastycznych nie zaobserwowano linii rezonansowej pochodzącej od LPC w badanej grupie porównanwczej, a w całej grupie badanych osób – stwierdzano ją w pojedynczych przypadkach. Natomiast w osoczu występowała ona u większości chorych. Sygnał rezonansowy pochodzący od PS wprawdzie obserwowano u chorych w komórkach blastycznych, jednak nie stwierdzono go ani u jednej osoby w osoczu. Podobnie jak

u osób zdrowych, u pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki, linię rezonansową pochodzącą od CL stwierdzono u pojedynczych osób w ekstraktach komórkowych, a nie zaobserwowano jej w ekstraktach z osocza. Widma ^{31}P NMR fosfolipidów z ekstraktów komórek blastycznych różniły się od widm z ekstraktów osocza mniejszą intensywnością integralną linii rezonansowych pochodzących od: SM, LPC oraz PC, natomiast większą intensywnością integralną linii rezonansowej pochodzącej od PI+PE. Nie obserwowano istotnych zmian w zakresie CPLAS między ekstraktami z komórek blastycznych a ekstraktami z osocza pacjentów.

Zarówno u osób zdrowych jak i chorych w ekstraktach komórek jednojądrzastych obserwowano statystycznie istotne niższe stężenie SM w porównaniu do ekstraktów z osocza (odpowiednio w grupie kontrolnej $p<0,05$, u pacjentów $p<0,01$).

U osób zdrowych w ekstraktach z komórek jednojądrzastych stwierdzono istotnie niższe ($p<0,05$) stężenie CPLAS niż w ekstraktach z osocza. U osób z rozpoznaniem ostrej białaczki nie wykazano natomiast istotnych różnic w stężeniu CPLAS między ekstraktami z komórek jednojądrzastych a ekstraktami osocza. Komórki blastyczne charakteryzowały się wysoką zawartością tego fosfolipidu w porównaniu do komórek jednojądrzastych osób zdrowych, przy jednoczesnym braku istotnych różnic w stężeniu CPLAS w osoczu między chorymi a grupą kontrolną.

Zarówno u osób zdrowych jak i chorych w ekstraktach z komórek jednojądrzastych stężenie PC jest istotnie niższe od stężenia tego fosfolipidu w osoczu (odpowiednio - u osób zdrowych $p<0,05$, u osób chorych $p<0,01$). Być może u osób z rozpoznaniem nowotworu spadek stężenia PC w osoczu koreluje ze wzrostem zapotrzebowania na ten fosfolipid proliferujących komórek nowotworowych. Wiadomo bowiem, że komórkach tych PC jest hydrolizowany dla potrzeb wytwarzania wtórnych przekaźników informacji.

U osób zdrowych w ekstraktach z komórek jednojądrzastych nie zaobserwowano istotnych różnic odnośnie stężenia PI+PE w porównaniu do ekstraktów z osocza. Ale u osób chorych ekstrakty komórek blastycznych zawierały istotnie większe ich stężenie w stosunku do osocza ($p<0,05$). Być może zaobserwowane u pacjentów z ostrą białaczką istotne obniżenie tych fosfolipidów w osoczu jest właśnie efektem dużego zapotrzebowania proliferujących komórek białaczkowych na PI i PE, które ulegają następnie intensywnym przemianom z wytworzeniem wtórnych przekaźników sygnału.

6. Wnioski

Ekstrakty fosfolipidów z komórek jednojądrzastych.

1. U osób zdrowych, w widmach ^{31}P NMR z ekstraktów komórek jednojądrzastych stwierdzono linie rezonansowe pochodzące od następujących fosfolipidów: PC, CPLAS, SM i PI+PE. Wyraźne sygnały rezonansowe pochodzące od LPC, PS i CL obserwowano tylko u pojedynczych osób.
2. U pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki, w widmach ^{31}P NMR z ekstraktów komórek jednojądrzastych podobnie jak u osób zdrowych stwierdzono linie rezonansowe pochodzące od następujących fosfolipidów: PC, CPLAS, SM i PI+PE. Wyraźne linie rezonansowe pochodzące od LPC, PS i CL również obserwowano u kilku osób.
3. Widma z ekstraktów komórek blastycznych różnią się od widm z ekstraktów komórek jednojądrzastych osób zdrowych intensywnością integralną linii rezonansowych pochodzących od SM i CPLAS.

   U chorych z rozpoznaniem ostrej białaczki wykazano statystycznie istotne obniżenie stężenia SM, natomiast zwiększenie stężenia CPLAS w ekstaktach z komórek jednojądrzastych w porównaniu z osobami zdrowymi
4. Nie wykazano istotnych zmian w zakresie stężeń PC i PI+PE między komórkami blastycznymi, a jednojądrzastymi osób zdrowych.
5. W momencie rozpoznania ostrej białaczki nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między stężeniami poszczególnych fosfolipidów w ekstraktach komórek jednojądrzastych w grupach chorych reagujących i nie reagujących na leczenie.
6. Wydaje się, że na poziom fosfolipidów w komórkach blastycznych ma wpływ rodzaj ostrej białaczki, w szczególności dotyczy to białaczki mielomonocytowej, jak również współistnienie dodatkowych procesów chorobowych oraz być może nacja ludzka.

Ekstrakty fosfolipidów z osocza.

7. W widmach ^{31} P NMR z ekstraktów osocza osób zdrowych stwierdzono linie rezonansowe pochodzące od: PC, CPLAS, LPC, SM i PI+PE. Takie same linie

rezonansowe obserwowano w widmach pochodzących z ekstraktów osocza pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki. Sygnał rezonansowy pochodzący od PS zaobserwowano tylko u jednej osoby zdrowej.

8. U osób z rozpoznaniem ostrej białaczki wykazano statystycznie istotne nizsze stężenia: SM, LPC, PC oraz PI+PE w porównaniu z ekstraktami z osocza osób zdrowych. Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic między stężeniem CPLAS w ekstraktach z osocza u osób chorych i zdrowych.

Porównanie ekstraktów fosfolipidów z komórek jednojądrzastych z ekstraktami fosfolipidów z osocza.

9. U osób zdrowych wykazano statystycznie istotne niższe stężenia SM, LPC, CPLAS i PC w ekstraktach komórek jednojądrzastych w porównaniu do ekstraktów osocza.
10. U osób zdrowych widma ^{31}P NMR z ekstraktów komórek jednojądrzastych różnią się od widm z ekstraktów osocza następującymi cechami:
    a) występowaniem linii rezonansowej pochodzącej od CL,
    b) różnym położeniem PS (w ekstraktach z komórek jednojądrzastych 1, 208 ppm, w ekstraktach z osocza 0, 659 ppm),
    c) odwrotnym stosunkiem SM/PI+PE,
    d) występowaniem sygnału rezonansowego pochodzącego od LPC tylko w pojedynczych przypadkach.
11. U pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki podobnie jak u osób zdrowych, zaobserwowano statystycznie istotne niższe stężenia SM, LPC i PC w ekstraktach z komórek jednojądrzastych w porównaniu do ekstraktów osocza. Nie zaobserwowano natomiast istotnej różnicy w stężeniu CPLAS w tych dwóch różnych środowiskach..
12. U pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki obserwowano statystycznie istotne wyższe stężenie PI+PE w ekstraktach komórek blastycznych w porównaniu do ekstraktów z osocza.

Podsumowanie.

13. Spektroskopia ^{31}P NMR pozwoliła wykazać zmianę stężeń fosfolipidów: SM i CPLAS w ekstraktach z komórek jednojądrzastych w momencie rozpoznanie ostrej białaczki.
    a) Zmniejszenie stężenia SM w komórkach białaczkowych prawdopodobnie prowadzi do zaburzenia procesu apoptozy.
    b) Zwiększenie stężenia CPLAS w komórkach blastycznych być może ułatwia ich proliferację i odporność na działanie czynników zewnętrznych. Dzieje się tak prawdopodobnie dzięki istnieniu w cząsteczce CPLAS odpornego na działanie lipaz wiązania eterowego oraz dzięki nadawaniu przez ten fosfolipid stabiności błonom komórek blastycznych

14. Spektroskopia ^{31}P NMR przeprowadzona celem porównania dwóch różnych środowisk (komórki i osocze) z tej samej próbki krwi, pozwoliła wykazać zmianę zachowania się w nich poszczególnych fosfolipidów zarówno u osób zdrowych jak i chorych.
    a) Zarówno u osób zdrowych i chorych w komórkach jednojądrzastych zmniejszone jest stężenie: SM, LPC i PC w porównaniu z osoczem. Prawdopodobnie wiąże się to z różną procentową zawartością tych fosfolipidów w tych dwóch środowiskach
    b) U osób zdrowych w komórkach dodatkowo obserwuje się niższe stężenie CPLAS niż w osoczu. W momencie rozpoznania ostrej białaczki nie oberwuje się tej różnicy, ponieważ komórki blastyczne zawierają zwiększone stężenie tego fosfolipidu w porównaniu do komórek jednojądrzaastych osób zdrowych.
    c) W momencie rozpoznania osrej białaczki w komórkach stwierdzono większe stężenie PI i PE niż w osoczu. Być może jest to spowodowane zapotrzebowaniem na te fosfolipidy intensywnie proliferujących komórek nowotworowych celem wytworzenia przekaźników sygnału.
15. Spektroskopia ^{31}P NMR wydaje się być metodą pomocną w ocenie zaburzeń metabolizmu fosfolipidów w ostrej białaczce oraz w zrozumieniu znaczenia ich udzialu w mechanizmie proliferacji nowotworowej.

7. Skróty użyte w tekście.

ADC – konwerter analogowo – cyfrowy,

ADP – adenozynodwufosforan,

ARA – C – cytarabina,

ATP – adenozynotrójfosforan,

AQ – czas zbierania danych,

B_0 – stałe pole magnetyczne,

CDP – Cholina – cytydynodwufosforylocholina (związek tożsamy z cytydynodwufosfocholiną),

CDP – Etanolamina – cytydynodwufosforyloetanolamina (związek tożsamy z cytydynodwufosfoetanolaminą),

CL – kardiolipina,

CMP – cytydynomonofosforan,

CoA – koenzym A,

CPLAS – plazmalogen fosfatydylocholiny,

CTP – cytydynodwufosforan,

DAG (DG) – dwuacyloglicerol,

DHAD – mitoksantron,

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy,

EPLAS – plazmalogen fosfatydyloetanolaminy,

FID – swobodny zanik indukcji,

FFT – szybka transformata Fouriera,

FT – transformata Fouriera,

GPCho – glicerylofosforylocholina (związek tożsamy z glicerylofosfocholiną),

GPEtn – glicerylofosforyloetanolamina (związek tożsamy z glicerylofosfoetanolaminą),

Il – interleukina,

IF – interferon,

LB – stała szerokość linii,

LPC – lizofosfatydylocholina,

LPE – lizofosfatydyloetanolamina,

MDPA – kwas metylenodwufosforowy,

MRI – obrazowanie za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego,

NMR – magnetyczny rezonans jądrowy,

NS – liczba zliczeń.

PA – kwas fosfatydowy,

PBS – sól fizjologiczna buforowana fosforanem,

PCho – fosforylocholina (związek tożsamy z fosfocholiną),

PCr – fosfokreatyna,

PDE – fosfodwuestry,

PE – fosfatydyloetanolamina,

PEtn – fosforyloetanolamina (związek tożsamy z fosfoetanolaminą,

PI – fosfatydyloinozytol,

PME – fosfomonoestry,

RC – remisja całkowita,

PS – fosfatydyloseryna,

SI – dziedzina częstotliwości,

SM (SPH) – sfingomielina,

SW – szerokość widma,

TAG – trójacyloglicerol,

TD – domena czasu,

TNF – czynnik nekrozy nowotworów.

8. Piśmiennictwo.

1. Adebodun F.: Phospholipid metabolism and resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in a human leukemic cell line: a ^{31}P-NMR study using a phosphonium analog of choline. Cancer Lett. 1999, 140(1-2), 189-194.
2. Albright C. D., Liu R., Mar M. H., Shin O. H., Vrablic A. S., Salganik R. I., Zeisel S. H.: Diet, apoptosis, and carcinogenesis. Adv. Exp. Med. Biol. 1997, 422, 97-107.
3. Anthony M. L., Zhao M., Brindle K. M.: Inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis following induction of apoptosis in HL-60 cells. J. Biol. Chem. 1999, 274, 19686-19692.
4. Ariaz-Mendoza F., Smith M. R., Brown T. R.: Treatment response in non-Hodgkin's lymphoma is predicted by pre-treatment levels phosphoethanolamine and phosphocholine measured by in vivo phosphorus MR spectroscopy. MR in Experimental and Clinical Cancer Research in the New Millenium. Abstract from ISMRM, Norway 2000, 27.
5. Arnold D. L., Emrich J. F., Shoubridge E. A., Villemure J., Feindel W.: Characterization of astrocytomas, meningiomas, and pituitary adenomas by phosphorous magnetic resonance spectroscopy. J. Neurosurg. 1991, 74, 447-453.
6. Barańska Jolanta: Rozpad fosfolipidów a przekazywanie informacji w komórce. Warszawa 1996.
7. Bettaieb A., Record M., Côme M. G., Bras A. C., Chap H., Laurent G., Jaffr'ezou J. P.: Opposite effects of tumor necrosis factor alpha on the sphingomyelin- ceramide pathway in two myeloid leukemia cell lines: role of transverse sphingomyelin distribution in the plasma membrane. Blood 1996, 88(4), 1465-1472.
8 Bichenkov E., Ellingson J. S.: Temporal and quantitative expression of the myelin-associated lipids, ethanolamine plasmalogen, galactocerebroside, and sulfatide, in the differentiating CG-4 glial cell line. Neurochem. Res. 1999, 24, 1549-1556.
9. Billah M. M., Anthes J. C.: The regulation and cellular functions of phosphatidylcholine hydrolysis. Biochem. J. 1990, 269, 281-291.
10. Bradamante S., Barchiesi E., Barenghi L., Zoppi F.: An Alternative Expeditious Analysis of Phospholipid composition in Human Blood Plasma by ^{31}P NMR Spectroscopy. Analytical Biochemistry 1990, 185, 299 – 303.

11. Brosche T., Platt D.: The biological significance of plasmalogens in defense against oxidative damage. Exp. Gerontol. 1998, 33, 363-369.
12. Bruno A. P., Laurent G., Averbeck D., Demur C., Bonnet J., Betaieb A., Levade T., Jafr'ezou J. P.: Lack of ceramide generation in TF-1 human myeloid leukemic cells resistant to ionizing radiation. Cell Death Differ. 1998, 5(2), 172-182.
13. De Certaines J. D., Larsen V. A., Podo F., Carpinelli G., Briot O., Henriksen O.: In Vivo ^{31}P MRS of Experimental Tumours. NMR in Biomedicine 1993, 6, 345-365.
14. Diomede L., Colotta F., Piovani B., Re F., Modest E. J., Salmona M.: Induction of apoptosis in human leukemic cells by the ether lipid 1-octadecyl-2-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine. A possible basis for its selective action. Int. J. Cancer 1993, 53, 124-130.
15. Diomede L., Piovani B., Re F., Principe P., Colotta F., Modest E. J., Salmona M.: The induction of apoptosis is a common feature of the cytotoxic action of ether-linked glycerophospholipids in human leukemic cells. Int. J. Cancer 1994, 57, 645-649.
16. Dixon R. M.: NMR studies of phospholipid metabolism in hepatic lymphoma. NMR in Biomed. 1998, 11, 370-379.
17. Dueck D. A., Chan M., Tran K., Wong J. T., Jay F. T., Littman C., Stimpson P. C.: The modulation of choline phosphoglyceride metabolism in human colon cancer. Mol. Cell Biochem. 1996, 162(2), 97 – 103.
18. Engelmann J., Henke J.,Willker W., Kutscher B., Nössner G., Engel J., Leibfritz D.: Early Stage Monitoring of Miltefosine Induced Apoptosis in KB Cells by Multinuclear NMR Spectroscopy. Aticancer Research 1996, 16, 1429-1440.
19. Folch J., Lees M., Sloan Stanley G. H.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 1957, 226, 497-509.
20. Gillies R. J., Barry J. A., Ross B. D.: In vitro and in vivo C-13 and P-31 NMR analyses of phosphocholine metabolism in rat glioma cells. Mag. Reson. Med. 1994, 32, 310-318.
21. Glonek T.: ^{31}P NMR in the Analysis of Extracted Tissue Phospholipids. Chap. 22 (w: Quin L. D., Verkade J. G.: Phosphorous-31 NMR Spectral Properties in Compound Characteization and Structure Analysis). VCH Publishers, Inc. New York 1994, 283-294.

22. Goldkorn T., Ding T.: The rise and fall of ceramide and 1,2-diacylglycerol (DAG): modulation by transforming growth factor-beta 1 (TGF beta 1) and by epidermal growth factor (EGF). Adv. Exp. Med. Biol. 1997, 400A, 461-472.
23. Gross R.W.: The self-assembly of drugs in plasmalogen membranes and targeted drug delivery to plasmalogen membranes (in research).
24. Günther H.: Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego. PWN. 1983.
25. Henke J., Willker W., Engelmann J., Leibfritz D.: Combined Extraction Techniques of Tumour Cells and Lipid/Phospholipid Assignment by Two Dimensional NMR Spectroscopy. Anticancer Research 1996, 16, 1417 – 1428.
26. Herr I., Wilhelm D., Bohler T., Angel P., Debatin K. M.: Activation of CD95 (APO-1/Fas) signaling by ceramide mediates cancer therapy-induced apoptosis. EMBO J. 1997, 16(20), 6200-6208.
27. Hubesch B., Sappey-Marinier D., Roth K. et al.: P-31 MR spectroscopy of normal human brain and brain tumors. Radiology 1990, 174, 401-409.
28. Ilczyszyn M.: Ćwiczenia laboratoryjne z fizyki chemicznej. Spektroskopia NMR. WUW. 1995.
29. Jarvis W. D., Fornari F. A., Traylor R. S., Martin H. A., Kramer L. B., Erukulla R. K., Bittman R., Grant S.: Induction of apoptosis and potentiation of ceramide-mediated cytotoxicity by sphingoid bases in human myeloid leukemia cells. J. Biol. Chem. 1996, 271(14), 8275-8284.
30. Kalra R., Wade K. E., Hands L., Styles P., Camplejohn R., Greenall M., Adams G. E., Harris A. L., Radda G. K.: Phosphomonoester is associated with proliferation in human breast cancer: a ^{31}P MRS study. Br. J. Cancer 1993, 67, 1145-1153.
31. Kasimos J. N., Merchant T. E., Gierke L. W., Glonek T.: 31P magnetic resonance spectroscopy of human colon cancer. Cancer Res. 1990, 50(3), 527-532.
32. Katz-Brull R., Seger D., Rivenson-Segal D., Rushkin E., Degani H.: Metabolic markers of breast cancer: enhanced choline metabolism and reduced choline-ether-phospholipid synthesis. Cancer Res. 2002, 62(7), 1966-1970.
33. Kęcki Z.: Podstawy spektroskopii molekularnej. PWN. 1992.
34. Kiss Z., Anderson W. B.: Phorbol ester stimulates the hydrolysis of phosphatidylethanolamine in leukemic HL-60, NIH 3T3, and baby hamster kidney cells. J. Biol. Chem. 1989, 264(3), 1483-1487.
35. Koronkiewicz S., Buszewski B.: Metody chromatograficzne w analizie lipidów wchodzących w skład błon biologicznych. Wiad. Chem. 1997, 51, 81 – 96.

36. Kuliszkiewicz-Janus M.: Możliwości zastosowania spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego w badaniu metabolizmu komórek w stanach fizjologiczych i patologicznych. Część I: Fizyczne podstawy magnetycznego rezonansu jądrowego. Pol. Arch. Med. Wewn. 1993, 90, 230-235.
37. Kuliszkiewicz-Janus M.: Możliwości zastosowania spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego w badaniu metabolizmu komórek w stanach fizjologicznych i patologicznych. Część II: mięsień sercowy, mięśnie szkieletowe. Pol. Arch. Med. Wew. 1993, 90, 291-299.
38. Kuliszkiewicz-Janus M.: Możliwości zastosowania spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego w badaniu metabolizmu komórek w stanach fizjologicznych i patologicznych. Część III: Wątroba, nerki, jądra. Pol. Arch. Med. Wew. 1993, 90, 300-305.
39. Kuliszkiewicz-Janus M.: Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (magnetic resonance spectroscopy – MRS) w badaniu fizjologii i patologii mózgu. Post. Med. Klin. Dośw. 1993, 2, 167-177.
40. Kuliszkiewicz-Janus M.: Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (MRS) – jej zastosowania kliniczne i znaczenie w metabolizmie chorób rozrostowych krwi. Acta Haematologica Polonica 2001, 32(1), 160 – 170.
41. Kuliszkiewicz-Janus M.: Zastosowanie spektroskopii magnetycznego rezonansu (Magnetic Resonance Spectroscopy - MRS) w diagnostyce i monitorowaniu leczenia nowotworów. Rez. Magn. Med. 1993, 1(1), 31 –37.
42. Kuliszkiewicz-Janus M., Baczyński S.: Application of ^{31}P NMR spectroscopy to monitor of chemiotherapy – associated changes of serum phospholipids in patients with malignant lymphomas. MRM 1996, 35, 449 – 456.
43. Kuliszkiewicz-Janus M., Baczyński S.: Chemiotherapy-associated changes in ^{31}P MRS spectra of sera from patients with multiple myeloma. NMR Biomed. 1995, 8, 127 – 132.
44. Kuliszkiewicz-Janus M., Baczyński S.: Treatment-induced changes in ^{31}P-MRS (magnetic resonance spectroscopy) spectra of sera from patients with acute leukemia. Biochimica et Biophysica Acta 1997, 1360, 71 – 83.
45. Kuliszkiewicz-Janus M., Janus W., Baczyński S.: Application of ^{31}P NMR Spectroscopy in Clinical Analysis of Changes of Serum Phospholipids in Leukemia, Lymphoma and some other Non-Haematological Cancers. Anticancer Research 1996, 16, 1587 – 1594.

46. Kuliszkiewicz-Janus M., Jurczyk A., Baczyński S.: Long term ^{31}P NMR sera analysis of patients after bone marrow transplantation in the course of heamatological malignancies. Scientific program and Books of Abstracts ESMRMB'00 17th Annual meeting, Paris 2000, 212-213.
47. Kuliszkiewicz-Janus M., Ratajczak H., Baczyński S.: ^{31}P MRS in Vitro Monitoring of Therapy Response of Heamatological Malignant Diseases. Procedings 12th Annual Scientific Meeting 1993, 1153.
48. Laethem R. M.; Hannun Y. A., Jayadev S., Sexton C. J., Strum J. C., Sundseth R., Smith G. K.: Increases in neutral, Mg2+-dependent and acidic, Mg2+-independent sphingomyelinase activities precede commitment to apoptosis and are not a consequence of caspase 3-like activity in Molt-4 cells in response to thymidylate synthase inhibition by GW1843. Blood 1998, 91(11), 4350-4360.
49. Leach M. O.: Introduction to in vivo MRS of cancer: new perspectives and open problems. Anticancer Res. 1996, 16(3B), 1503-1514.
50. Leach M. O.: Magnetic resonance spectroscopy applied to clinical oncology. Health Care Tech. 1994, 2, 235-246.
51. Leach M. O., Verrill M., Glaholm J., Smith T. A. D., Collins D. J., Payne G. S., Sharp J. C., Ronen S. M., McCready V. R., Powles T. J., Smith I. E.: Measurements of human breast cancer using magnetic resonance spectroscopy: a review of clinical measurements and a report of localized ^{31}P measurements of response to treatment. NMR in Biomed.. 1998, 11, 314 – 340.
52. Linardic C. M., Hannun Y. A.: Identification of a Distinct Pool of Sphingomyelin Involved in the Sphingomyelin Cycle. The Journal of Biological Chemistry 1994, 269(38), 23530-23537.
53. Linardic C. M., Jayadev S., Hannun Y. A.: Activation of the sphingomyelin cycle by brefeldin A: effects of brefeldin A on differentiation and implications for a role for ceramide in regulation of protein trafficking. Cell Growth Differ. 1996, 7(6), 765-74.
54. Maintz D., Heindel W., Kugel H., Jaeger R., Lackner K. J.: Phosphorus-31 MR spectroscopy of normal adult human brain and brain tumours. NMR in Biomed. 2002, 15, 18-27.
55. Martinez P., Morros A.: Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. Frontiers in Bioscience 1996, 1, 103-117.

56. Meneses P., Glonek T.: High resolution ^{31}P NMR of extracted phospholipids. Journal of Lipid Research 1988, 29, 679-689.
57. Merchant T. E., de Graaf P. W., Minsky B. D., Obertop H., Glonek T.: Esophageal Cancer Phospholipid Characterisation by ^{31}P NMR. NMR in Biomed. 1993, 6, 187-193.
58. Merchant T. E., Kasimos J. N., de Graaf P. W., Misnsky B. D., Gierke L. W., Glonek T.: Phospholipid profiles of human colon cancer using ^{31}P magnetic resonance spectroscopy. Int. J. Colorectal Dis. 1991, 6(12), 121-126.
59. Merchant T. E., Lass J. H., Roat M. I., Skelnik D. L., Glonek T.: P-31 NMR analysis of phospholipids from cultured human corneal epithelial, fibroblast and endothelial cells. Curr. Eye Res. 1990, 9(12), 1167-1176.
60. Merchant T. E., Minsky B. D., Lauwers G. Y., Diamantis P. M., Haida T., Glonek T.: Esophageal cancer phospholipids correlated with histopathologic findings: a ^{31}P NMR study. NMR Biomed. 1999, 12(4), 184-188.
61. Merchant T. E., Meneses P., Gierke L. W., Den Otter W., Glonek T.: ^{31}P magnetic resonance phospholipid profiles of neoplastic human breast tissues B. J. Cancer 1991, 63(5), 693-698.
62. Merchant T. E., van der Ven L. T., Minsky B. D., Diamantis P. M., Delapaz R., Galicich J., Glonek T.: ^{31}P NMR phospholipid characterisation of intracranial tumors. Brain Res. 1994, 649 (1-2), 1-6.
63. Michalik A., Bartnikowska E.: Lipidy i lipoproteiny osocza. PZWL. 1999.
64. Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W.: Biochemia Harpera. PZWL. 1995.
65. Nixon A. B., Greene D. G., Wykle R. L.: Comparison of acceptor and donor substrates in the CoA-independent transacylase reaction in human neutrophils. Biochim. Biophys. Acta 1996, 1300, 187-196.
66. Pikuła S.: Lipidy komórki nowotworowej – wybrane zagadnienia. Postępy biologii komórki 2000, 27(15), 57-77.
67. Podo F.: Tumour phospholipid metabolism. NMR Biomed. 1999, 12 (7), 413-439.
68. Pörn-Ares M. I., Chow S. C., Slotte J. P., Orrenius S.: Induction of apoptosis and potentiation of TNF- and Fas-mediated apoptosis in U937 cells by the xanthogenate compound D609. Exp. Cell Res. 1997, 235(1), 48 – 54.

69. Quinn M. T., Parthasarathy S., Steinberg D.: Lysophosphatydylocholine: a chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 85(8), 2805-2809.
70. Raffelt K., Moka D., Süllentrop F., Dietlein M., Hahn J., Schicha H.: Systemic alterations in phospholipid concentrations of blood plasma in patients with thyroid carcinoma: an in vitro ^{31} P high-resolution NMR study. NMR in Biomed. 2000, 13, 8-13.
71. Rakowska M., Zborowski J.: Sfingomielina – metabolizm, rola i znaczenie w błonach biologicznych. Postepy Biologii Komórki 1992, 19, 369-384.
72. Rinck P. A., Muller R. N., Petersen S. B.: An Introduction to Magnetic Resonance in Medicine. Georg Thieme Verlag Stuttgart. Thieme medical Publishers, Inc. New York 1990.
73. Ronen S. M., DiStefano F., McCoy C. L., Robertson D., Smith T. A., Al-Saffa N. M., Titley J., Cunningham D. C., Griffiths J. R., Leach M. O., Clarke P. A.: Magnetic resonance detects metabolic changes associated with chemotherapy-induced apoptosis. Br. J. Cancer 1999, 80 (7), 1035-1041.
74. Ronen S. M., Leach M. O.: Imaging biochemistry: applications to breast cancer. Breast Cancer Res. 2001, 3(1), 36-40.
75. Ruiz-Cabello J., Cohen S.: Phospholipid metabolites as indicators of cancer cell function. NMR Biomed. 1992, 5, 226-233.
76. Sawai H., Okazaki T., Domae N.: Ceramide: a lipid mediator of apoptotic signal transduction. Nippon Rinsho 1996, 54(7), 1803-1808.
77. Seijo L., Merchant T. E., van der Ven L. T., Minsky B. D., Glonek T.: Meningioma phospholipid profiles measured by ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy. Lipids 1994, 29(5), 359-364.
78. Schilling A., Knauf W., Bollow M., Wol K.J.f: ^{31}P MRS follow-up of the spleen in patients with chronic lymphatic leukemia during Fludarabin-Phosphat therapy. Book of Abstracts. 11th Annual Scientific Meeting of the Society of Magnetic Resonance in Medicine 1992, 490.
79. Shiao Y. J., Vance J. E.: Evidence for an ethanolamine cycle: differential recycling of the ethanolamine moiety of phosphatidylethanolamine derived from phosphatidylserine and ethanolamine. Biochem. J. 1995, 310, 673-679.

80. Sterin M., Cohen J. S., Mardor Y., Berman E., Ringel I.: Levels of phospholipid metabolites in breast cancer cells treate with antimitotic drugs: a ^{31}P-magnetic resonance spectroscopy study. Cancer Res. 2001, 61(20), 7536-7543.
81. Su B., Kappler F., Szwergold B. S., Brown T. R.: Identification of a Putative Tumor Marker in Breast and Colon Cancer. Cancer Research 1993, 53, 1751-1754.
82. Süllentrop F., Moka D., Neubauer S., Haupt G., Engelmann U., Hahn J., Schicha H.: ^{31}P NMR spectroscopy of blood plasma: determination and quantification of phospholipid classes in patients with renal cell carcinoma. NMR in Biomed. 2002, 15, 60-68.
83. Sweeney G., Nazir D., Clarke C., Goettsche G.: Ethanolamine and choline phospholipids in nascent very-low-density lipoprotein particles. Clin. Invest. Med. 1996, 19, 243-250.
84. Sweeney E. A., Sakakura C., Shirahama T., Masamune A., Ohta H., Hakomori S., Igarashi Y.: Sphingosine and its methylated derivative N,N-dimethylsphingosine (DMS) induce apoptosis in a variety of human cancer cell lines. Int. J. Cancer 1996, 66 (3), 358-366.
85. Szala S.: Swoista indukcja apoptozy w komórkach nowotworowych. Nowotwory 2000, 50, 111-121.
86. Takeda Y., Tashima M., Takahashi A., Uchiyama T., Okazaki T.: Ceramide generation in nitric oxide-induced apoptosis. Activation of magnesium-dependent neutral sphingomyelinase via caspase-3. J. Biol. Chem.1999, 274(15), 10654-10660.
87. Ting Y. L., Sherr D., Degani H.: Variations in energy and phospholipid metabolism in normal and cancer human mammary epithelial cells. Anticancer Res. 1996, 16, 1381-1388.
88. Tuz M.: Analiza widm ^{31}P magnetycznego rezonansu jądrowego ekstraktów fosfolipidów osocza osób zdrowych i pacjentów z rozpoznanymi chorobami nowotworowymi krwi. Praca magisterska. Wrocław, 2003.
89. Twelves C. J., Porter D. A., Lowry M., Dobbs N. A., Graves P. E., Smith M. A., Rubens R. D., Richards M. A.: Phosphorus-31 metabolism of post-menopausal breast cancer studied in vivo by magnetic resonance spectroscopy. Br. J. Cancer 1994, 69, 1151-1156.
90. Van Inderstine S. C., Byers D. M., Ridgway N. D., Cook H. W.: Phospholipase D hydrolysis of plasmalogen and diacyl ethanolamine phosphoglycerides by protein

kinase C dependent and independent mechanisms. J. Lipid Mediat. Cell Signal. 1997, 15(2), 175-192.

91. Xu Z., Byers D. M., Palmer F. B., Spence M. W., Cook H. W.: Limited metabolic interaction of serine with etanolamine and choline in turnover of phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine and plasmalogens in cultured glioma cells. Biochim. Biophys. Acta 1993, 1168 (2), 167-174.
92. Zhang J., Alter N., Reed J. C., Borner C., Obeid L. M. Hannun Y. A: Bcl-2 interrupts the ceramide-mediated pathway of cell death. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996, 93(11), 5325-5328.
93. Zheng B., Oishi K., Shoji M., Eibl H., Berdel W. E., Hajdu J., Vogler W. R., Kuo J. F.: Inhibition of protein kinase C, (sodium plus potassium)-activated adenosine triphosphatase, and sodium pump by synthetic phospholipid analogues. Cancer Res. 1990, 50, 3025-3031.