Lucie JORGE*, Ruben 't KINDT, Frank DAVID, Pat SANDRA, Koen SANDRA

Etude du profil métabolomique de sérum sanguin dans le cas d'insuffisance rénale chronique par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse

RÉSUMÉ

L'article présent décrit l'application de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Gas Chromatography-Mass Spectrometry ou GC-MS) à l'étude du profil métabolomique d'échantillons de sérum sanguin dans le cas d'insuffisance rénale chronique (Chronic Kidney Disease ou CKD). Des échantillons de sérum sanguin provenant de patients sains (n = 20), de patients atteints au stade 3 (CKD-3 ; n = 20) et au stade 5 (CKD-5 ; n = 20) d'insuffisance rénale chronique ont été analysés dans le but de révéler des métabolites pouvant discriminer les différents stades de la maladie. Plusieurs biomarqueurs déjà connus, tels que la créatinine, ou encore méconnus ont pu être identifiés par une analyse non ciblée.

MOTS-CLÉS

Métabolomique, chromatographie en phase gazeuse, spectrométrie de masse, insuffisance rénale chronique

GC-MS based blood serum metabolite profiling in the study of chronic kidney disease

SUMMARY

The present paper describes the application of GC-MS based metabolite profiling in the study of chronic kidney disease (CKD). Blood serum samples of a healthy (n=20), a CKD stage 3 (n=20) and a CKD stage 5 (n=20) population were subjected to the methodology with the aim to reveal metabolites discriminative for the different stages of the disease. Several known biomarkers, including creatinine, and unknown differential metabolites could be revealed in a non-targeted manner.

KEYWORDS

Metabolomics, metabolite profiling, GC-MS, chronic kidney disease

néphrologie

I - Introduction

Une nouvelle tendance des sciences de la vie est l'analyse globale non ciblée de biomolécules, ayant mené à des disciplines telles que la génomique, la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique. La génomique a indiscutablement initié la « cascade omique » et le concept d'analyse objective attire un nombre important de chercheurs vers ce domaine. Le potentiel de ces disciplines relativement nouvelles est important puisqu'elles peuvent mener notamment à la découverte de biomarqueurs, à la découverte et au développement de médicaments et à la compréhension du fonctionnement d'un système métabolomique complet (1-4). La métabolomique a pour but la mesure exhaustive des métabolites (lipides, acides aminés, nucléotides, sucres, etc.) présents dans une matrice biologique (cellule, tissu, fluide, etc.) et la réponse de ces métabolites correspondant à des stimuli variés tels qu'une maladie, un traitement pharmaceutique, une modification génétique, etc. Cette approche holistique, qui mesure simultanément des centaines de composés, est révolutionnaire puisqu'elle permet de révéler des différences entre plusieurs conditions sans connaissances préalables. En conséquence, on peut espérer qu'elle mène à la compréhension du rôle de chaque métabolite dans une maladie.

L'article présent rapporte l'exemple d'insuffisance rénale chronique. Il a été choisi pour illustrer et évaluer le workflow utilisé lors d'une étude métabolomique réalisée par GC-MS. Durant la dernière décennie, cette maladie est devenue un problème de santé publique global (5-6). Les marqueurs biologiques utilisés actuellement dans la détection d'insuffisance rénale, tels que la créatinine du sérum ou l'albumine

* Metablys, Research Institute for Chromatography, President Kennedypark 26, 8500 Kortrijk, Belgium

urinaire, ne présentent pas une sensitivité suffisante pour établir un diagnostique précoce, ce qui est primordial pour la prise en charge de la maladie (5-6). Nous pouvons citer comme exemple la créatinine du sérum sanguin qui conserve une concentration similaire à un patient sain, même si un tiers voire la moitié des fonctions rénales sont perdues. Afin de contribuer à la découverte de marqueurs de la maladie qui seraient détectés relativement tôt et seraient ainsi des marqueurs à valeur pronostique, l'article présent décrit une étude métabolomique par GC-MS d'échantillons de sérum sanguin provenant de 20 patients sains, de 20 patients atteints d'insuffisance rénale au stade 3 et de 20 patients atteints de la maladie au stade 5. La méthodologie employée cible simultanément une variété de classes de composés parmi lesquelles les acides aminés, les acides gras, les acides organiques, les amines, les sucres, les stérols, etc. et fournit ainsi une vue d'ensemble du métabolisme.

II - *Workflow* d'une étude métabolomique par GC-MS

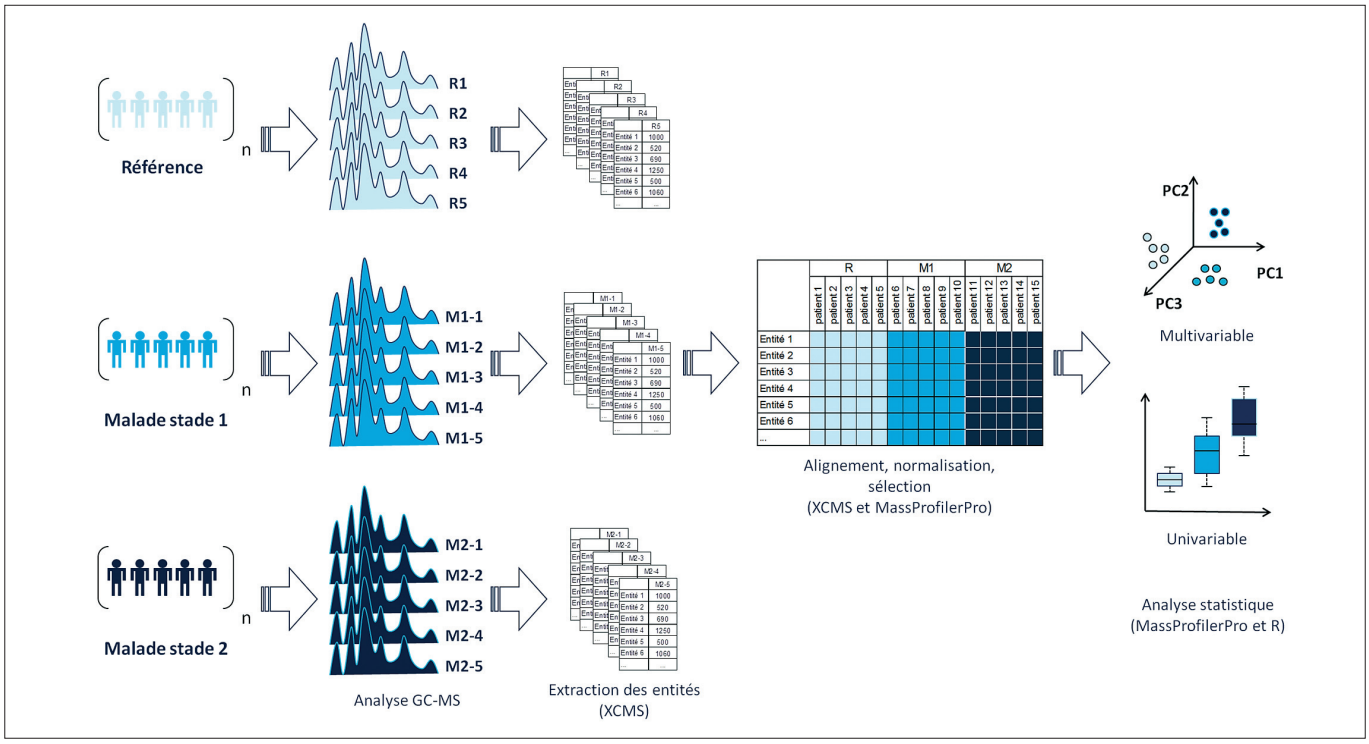
Une vue d'ensemble des différentes étapes (*workflow*) appliquées lors d'une étude métabolomique par GC-MS est illustrée dans la Figure 1. Les différentes étapes seront décrites ultérieurement.

1. Préparation d'échantillon

L'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) est possible à certaines conditions. En effet, la plupart des métabolites ne sont pas adaptés à une séparation par GC. Il est possible d'étendre cette technique de séparation à ces composés en appliquant une dérivation en deux étapes incluant une methoximation et une triméthylsilylation. La première réaction va inhiber les cyclisations non contrôlées des carbohydrates (menant à des pics multiples). La seconde réaction va bloquer les hydrogènes actifs de la molécule et ainsi réduire le point d'ébullition des composés et augmenter leur stabilité thermique. Leur séparation chromatographie sera alors optimisée.
En fonction du type d'échantillon, différentes étapes de pré-dérivation peuvent être requises. Pour le sérum sanguin, il est nécessaire de précipiter les protéines présentes par l'ajout de méthanol glacé (-20°C) aux échantillons, car elles peuvent perturber la dérivation et endommager la colonne analytique. L'ajout de méthanol va également avoir pour effet le blocage du métabolisme dans l'échantillon.

Figure 1

Workflow d'une étude métabolomique par GC-MS. Après précipitation des protéines et dérivation des métabolites (II-1), les données sont acquises par GC-MS pour tous les échantillons de l'expérience (II-2). Un algorithme d'extraction d'entité localise ensuite les pics parmi les données acquises par GC-MS (II-3). Une entité, en théorie représentative d'un métabolite, est composée d'un temps de rétention, d'une masse et d'une intensité. Les listes des entités extraites pour les différents échantillons sont ensuite alignées en fonction de leurs temps de rétention et masse, avant d'appliquer une éventuelle normalisation et une filtration des entités non intéressantes. Les données matricielles ainsi générées sont ensuite analysées par des modèles statistiques uni et multi variables dans le but de classer les échantillons et de révéler la tendance des métabolites dans les différents groupes (II-4). Les métabolites significativement différents peuvent ensuite être identifiés par recherche dans des bibliothèques ou à partir de la mesure de la masse exacte.



Dans notre laboratoire, la préparation d'échantillon que nous utilisons est basée sur la méthode décrite par Fiehn *et al.* (7). Brièvement, 50 µL de sérum sanguin sont utilisés, auxquels on ajoute 30 µg d'étalon interne (acide myristique d27 - C14:0-d27). Ensuite, 500µL de méthanol glacé sont ajoutés pour la précipitation des protéines. Après homogénéisation et conservation à - 20 °C pendant 20 minutes, les échantillons sont centrifugés. La phase supérieure est collectée et séchée sous flux d'azote. La dérivation en deux étapes est ensuite appliquée. Premièrement, 100 µL d'une solution de méthoxyamine à 20 mg/mL dans la pyridine sont ajoutés aux échantillons qui sont incubés à 30 °C pendant 90 minutes. La seconde étape de la dérivation est faite par l'ajout de 100 µL de N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide avec 1% trimethylchlorosilane (MSTFA + 1% TMCS). Les échantillons sont incubés à 37 °C pendant 60 minutes. Les échantillons dérivés sont stables pour une durée de 20 heures à température ambiante, et nécessitent donc d'être analysés rapidement (7).

2. Analyse par GC-MS

Les métabolites sont séparés par chromatographie en phase gazeuse (Agilent Technologies 7890A GC System) sur une colonne DB-5MS (30 m × 0,25 mm × 0, 25 µm) avec une colonne de garde Duraguard de 10 m (8). 1 µL d'extrait est injecté en mode *splitless*. La température du four analytique est programmée à 60 °C pendant une minute, puis élevée à 325 °C à une vitesse de 10°C/ minutes et maintenue constante pendant 10 minutes, résultant à une durée d'analyse de 37.5 minutes. L'hélium est utilisé comme gaz porteur en débit constant avec une vélocité linéaire d'environ 35 cm/s (0,92 mL/min, soit environ 46 kPa à 60 °C). La détection est faite par spectrométrie de masse (Agilent Technologies 5975C *inert XL MSD with Triple-Axis Detector*), avec une ionisation par impact électronique (Electron Impact ou EI) et avec un quadripôle utilisé en mode scan (m/z entre 50 et 600 amu).

La méthode utilisée est « *retention time locked* ». Le Retention Time Locking (RTL) est un procédé d'analyse qui fixe le temps de rétention de chaque composé. En général, le temps de rétention d'un composé dépend des dimensions de la colonne analytique (longueur), du programme de température du four du chromatographe et de la pression appliquée à l'injection. Avant chaque séquence d'analyse, on calibre l'instrument de manière à déterminer la pression exacte à appliquer à l'injection afin que l'acide myristique d27 élue à précisément 16,727 minutes. L'instrument est alors « locked ». Des bibliothèques RTL sont disponibles, et il existe une bibliothèque associée à la méthode présentée ici, contenant près d'un millier d'entrées métabolique (8-9). Ceci confère un avantage indiscutable à la méthode d'analyse, essentiellement pour l'identification des composés. En effet, les métabolites seront alors identifiés à partir de leur spectre de masse, mais également grâce à leur temps de rétention. Ceci est particulièrement utile pour l'identification de composés similaires tels que les sucres, qui présentent des spectres de masse semblables mais des temps de rétention différents.

3. Traitement des données

Le but d'une étude métabolomique est de comparer des échantillons issus de groupes différents afin de révéler quels métabolites sont le plus responsables des différences entre les groupes. Ceci implique une analyse non ciblée des résultats. Les données sont collectées sous la forme d'entités composées de trois paramètres : un temps de rétention, une masse, et l'intensité de cette masse à ce temps de rétention. Par exemple, pour un pic éluant à un certain temps de rétention, nous obtiendrons un groupe d'entités, correspondants aux masses présentes dans le spectre EI de masse avec leur intensité.

L'extraction des entités est faite avec le logiciel XCMS (10) et donne en général plusieurs centaines d'entités pour l'analyse d'un échantillon de sérum. En plus de l'extraction des entités, XCMS procède à leur alignement en fonction du temps de rétention et de leur masse pour tous les échantillons de l'expérience. En utilisant un outil informatique développé dans notre laboratoire, il est alors possible de réduire ce nombre afin de ne conserver pour chaque temps de rétention que l'entité ayant la plus forte intensité. Finalement, après traitement des données, nous obtenons une entité pour chaque pic du chromatogramme. La base de données obtenue peut alors être normalisée (III-3) afin de corriger la variabilité technique.

4. Analyse des données

L'analyse des données est faite à l'aide du logiciel métabolomique Mass Profiler Professional (Agilent Technologies). Ce logiciel permet l'étude statistique des données, en particulier l'analyse en composantes principales (Principal Component Analysis ou PCA) et le test t.

Le calcul PCA est appliqué sur les échantillons sans connaissance préalable de leur groupe d'appartenance. En effet, ce procédé va permettre de mettre en évidence les différences significatives entre les échantillons, si elles existent. Le tracé obtenu va représenter chaque échantillon de l'expérience dans un espace en 2 ou 3 dimensions. Ils seront placés dans cet espace selon leurs différences ou similarités par comparaison avec les autres échantillons : deux réplicats seront donc très proches tandis que deux échantillons très différents seront séparés sur le diagramme.

Le test t sera fait par comparaison de groupes deux par deux. Cette opération statistique va générer une liste de composés qui présentent les plus grandes différences entre les deux groupes comparés. Ces métabolites significativement différents peuvent

ensuite être identifiés par recherche dans les bibliothèques RTL décrites précédemment, ou à partir de la mesure de la masse exacte dans le cas d'analyses faites avec un système GC-Q-TOF (chromatographie en phase gazeuse, détection quadripôle temps de vol) utilisé en mode MS simple (Agilent Technologies 7200 Q-TOF).

III - Application à des échantillons de sérum sanguin de patients atteints d'insuffisance rénale chronique

1. Plan d'expérience

60 échantillons de sérum sanguin assortis ont été aimablement fournis par le Laboratoire de Néphrologie de l'Hôpital Universitaire de Gand (Belgique). Trois groupes d'échantillons ont été analysés, représentatifs de plusieurs stades de la maladie : des individus sains (*healthy*, H, n = 20), des individus atteints d'insuffisance rénale chronique (CKD) au stade 3 (CKD-3 ; n = 20) et au stade 5 (hémodialyse, CKD-5 ; n = 20).

Un mélange de contrôle qualité (QC) à été préparé en combinant tous les échantillons à parts égales, résultant ainsi en une réserve de sérum ayant une composition de métabolites représentative de tous les échantillons de l'étude. Ce mélange de contrôle a ensuite été préparé dans les mêmes conditions que les échantillons « réels » et analysés toutes les quatre injections. Cette étape est indispensable puisqu'elle permet le contrôle de la qualité de l'analyse mais aussi de montrer ou corriger une éventuelle perte de sensibilité due à l'analyse d'un grand nombre d'échantillons dans une matrice complexe qu'est le sérum sanguin.

Après dérivation, la stabilité des échantillons est assez réduite, ne permettant pas la préparation et l'analyse simultanée de l'intégralité des échantillons fournis. Ainsi, les échantillons ont été analysés par groupe de douze, répartis sur cinq jours consécutifs. En même temps, quatre échantillons de contrôle qualité (QC) ont été préparés par jour. Enfin, les échantillons ont été sélectionnés de manière aléatoire pour la préparation et l'analyse.

2. Résultats

La Figure 2 montre des chromatogrammes obtenus pour l'analyse d'un échantillon de chaque groupe : H, CKD-3 et CKD-5. Les chromatogrammes obtenus pour chaque groupe présentent un profile général similaire. Néanmoins, on peut noter que certains pics présentent des différences en fonction du groupe d'échantillon, spécialement dans le groupe CKD-5.

Dans un premier temps, la reproductibilité des échantillons QC a été calculée afin d'évaluer la qualité de l'analyse tout au long de l'expérience. Les 20 échantillons QC (quatre par jour pendant cinq jours) ont montré une reproductibilité assez faible, principalement causée par une baisse de la sensibilité de l'instrument tout au long de l'expérience. Afin de corriger cette baisse de sensibilité, également visible sur les échantillons réels (H, CKD-3, CKD-5), une normalisation des données s'est avérée nécessaire. L'injection régulière des 20 échantillons de contrôle a permis de quantifier cette baisse de sensibilité : la moyenne des intensités extraites présentant elle aussi une diminution de sa valeur. Ce chiffre moyen, calculé pour chacun des échantillons QC a donc été utilisé comme facteur de correction pour les 4 échantillons réels analysés dans la séquence avant l'échantillon de control en question. Cette méthode de normalisation s'est avérée efficace, comme montré dans la Figure 3. La reproductibilité de l'étalon interne (présent dans tous les échantillons à concentration constante) a été calculée pour les 78 analyses. Les déviations standard relatives obtenues sont de 22,36 % et 8,79 % respectivement avant et après normalisation.

Le traitement non ciblé des données des échantillons par XCMS a résulté en 2657 entités alignées. Après la sélection de l'entité par temps

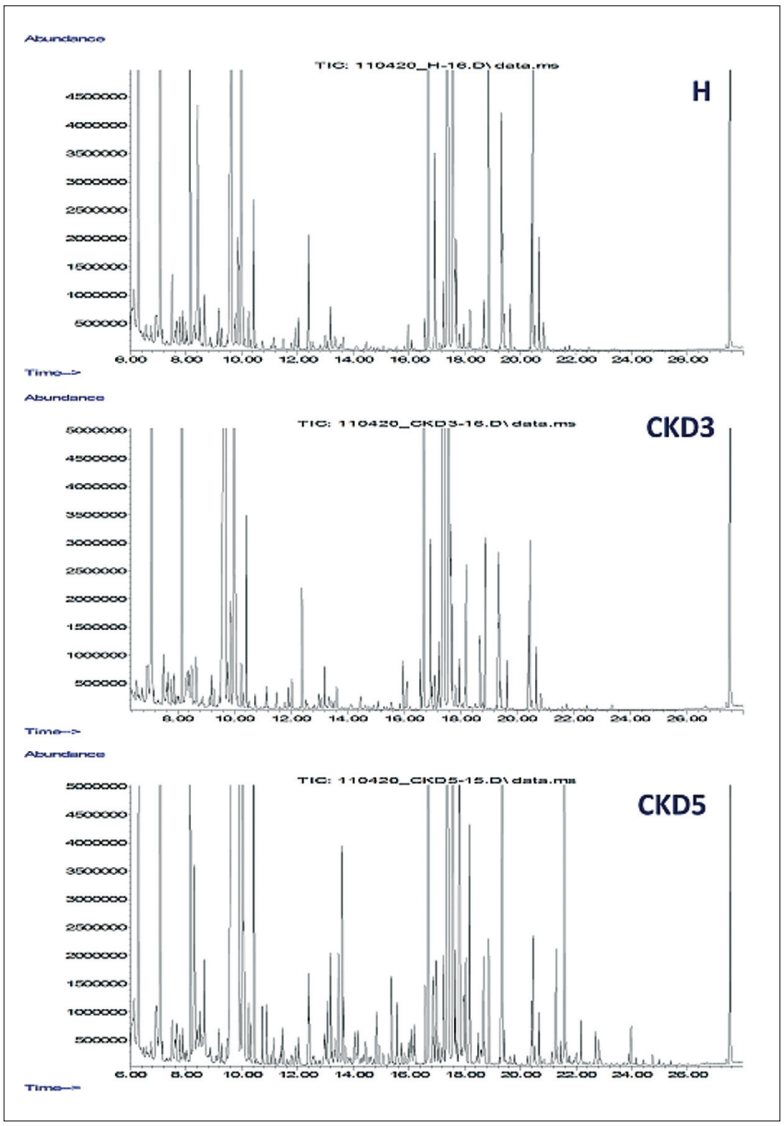


Figure 2
Chromatogrammes (Total ion current – TIC) représentatifs pour l'analyse des échantillons de chaque groupe : H (Healthy, sain), CKD-3 (insuffisance rénale chronique stade 3) et CKD-5 (insuffisance rénale chronique stade 5).

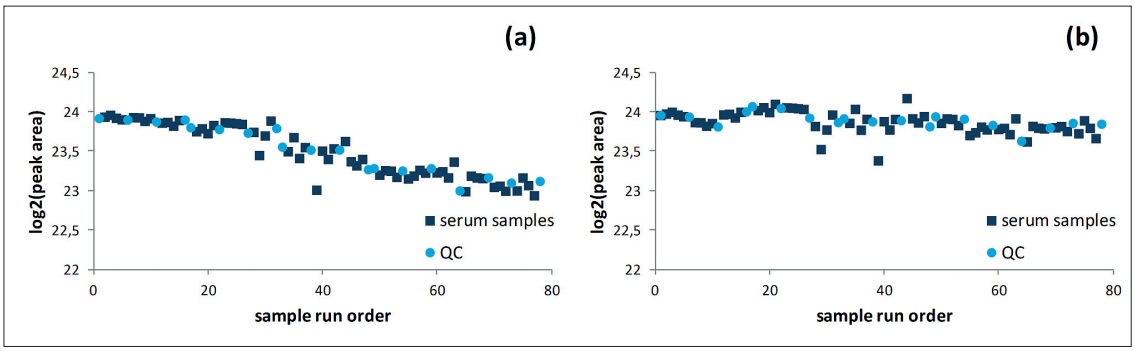


Figure 3
Log2 (aire) en fonction de l'ordre d'analyse pour l'étalon interne sans application de la normalisation (a) et avec normalisation (b)

de rétention présentant l'intensité la plus grande, ce nombre a été réduit à 206. On peut préciser que cette technique constitue une première approche pour l'étude des données, la sélection de l'intensité la plus grande n'étant pas toujours spécifique. Cependant, on notera qu'une analyse plus approfondie et ciblée, notamment par l'intégration manuelle d'un ou plusieurs ions spécifiques de certains métabolites, a été faite afin de confirmer ou d'infirmer les résultats obtenu dans un premier temps. Cette seconde partie de l'étude des données est décrite plus loin dans ce chapitre.

La Figure 4 montre les intensités (normalisées) de toutes les entités dans les échantillons.

Nous voyons que certaines entités présentent un profil différent en fonction du groupe d'échantillons, particulièrement dans le groupe CKD-5 où les intensités semblent très supérieures à celles dans les autres groupes.

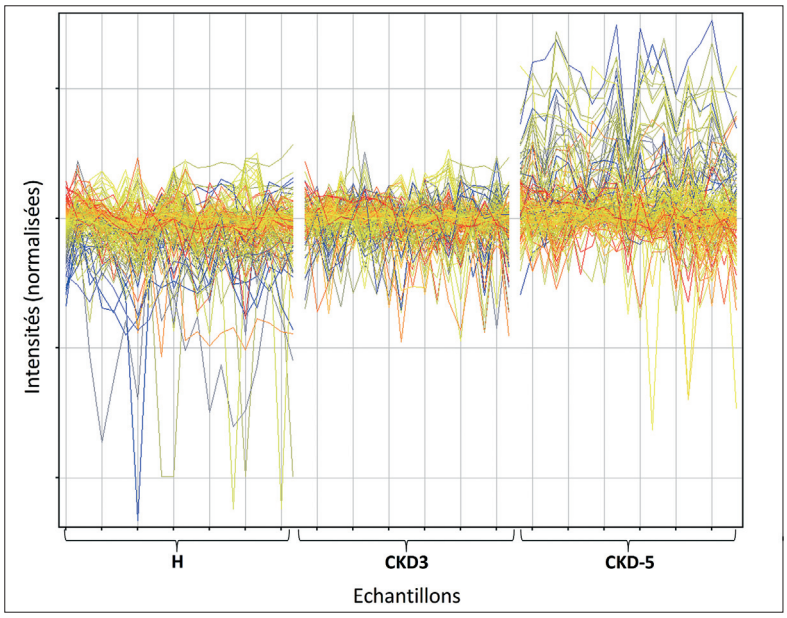
L'analyse en composantes principales a été appliquée à cette base de données, et le diagramme obtenu est présenté dans la Figure 5.

Nous voyons que les trois groupes d'échantillons symbolisés par des couleurs différentes sont clairement séparés. De plus, on note que les échantillons de contrôle (gris, QC) sont très regroupés. Cette dernière observation montre que la variabilité technique de l'analyse est plus faible que la variabilité biologique des échantillons.

Cette séparation en trois groupes distincts confirme la présence de métabolites discriminant les différents stades de la maladie. Nous avons appliqué le test t à tous les groupes par paires, afin d'identifier quelles entités sont significatives des différences entre les groupes pris 2 par 2. La Table I donne le nombre d'entités obtenues dans chaque cas.

Nous voyons ici que nous obtenons le plus de valeurs par comparaison des groupes H et CKD-5. Ceci est relativement attendu puisque ces deux groupes sont les plus différents de l'étude. Nous obtenons également un grand nombre d'entités par comparaison des groupes CKD-3 et CKD-5. Ceci peut également s'expliquer par le fait que certains métabolites ne sont marqueurs de la maladie qu'à un stade avancé de celle-ci. Enfin, nous voyons que nous obtenons le moins d'information lorsque les groupes H et CKD-3 sont comparés. Nous nous sommes néanmoins focalisés sur ces deux groupes puisque les différences détectées de façon précoce sont plus intéressantes pour l'étude de la maladie (diagnostique, compréhension des voies métaboliques, etc). En appliquant le test t à ces deux groupes, 50 entités ont été identifiées comme ayant une valeur p inférieure à 0,05, illustrant une différence significative. Parmi ces 50 entités, 17 présentent un « *fold change* » supérieur à 2 (avec une intensité au moins deux fois plus intense dans le groupe CKD-3 que dans le groupe H). A partir de ces résultats statistiques, les données ont été réanalysées de manière ciblée afin de confirmer ces observations. Les pics correspondants aux 50 entités montrant une valeur p inférieure à 0,05 ont été intégrés manuellement dans tous les chromatogrammes de ces deux groupes et les analyses statistiques ont été refaites à partir de ces nouvelles données acquises manuellement. Dans une grande majorité de cas, les résultats obtenus ont été confirmés, avec des valeurs de FC équivalentes à celles calculées précédemment. Ces composés ont été identifiés par recherche dans les bibliothèques de données (RTL). Leur identification a également été confirmée par mesure de la masse exacte par chromatographie en phase gazeuse avec détection par quadripôle couplé au temps de vol (GC-Q-TOF). La Figure 6 montre l'exemple d'un spectre de masse obtenu pour un métabolite identifié comme biomarqueur

Figure 4
Diagramme linéaire des entités de l'expérience dans tous les échantillons. Chaque ligne représente une entité, avec les intensités normalisées de celle-ci dans tous les échantillons. Les échantillons sont classés par groupes : H, CKD-3 et CKD-5.



Etude du profil métabolomique de sérum sanguin dans le cas d'insuffisance rénale chronique par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse

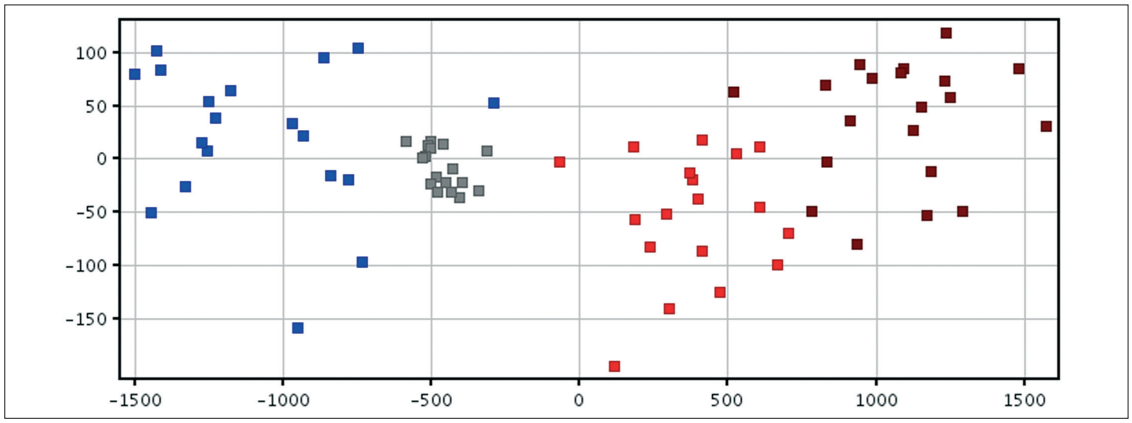


Figure 5

Diagramme obtenu après Analyse des Composantes Principales (PCA plot) en 2 dimensions de l'ensemble des échantillons de l'expérience. Les échantillons sont représentés en fonction de leur groupe : marron : échantillons sains H, rouge : échantillons issus de malades stade 3 CKD-3, bleu : échantillons issus de malades stade 5 CKD-5, gris : échantillons de contrôle QC.

	H versus CKD3	H versus CKD5	CKD3 versus CKD5
Total des entités	206	206	206
Entités avec p<0.05	50	129	93
Entités avec p<0.05 et FC>2	17	53	39

Table I

Nombre d'entités obtenues pour le test t appliqué aux groupes pris par paires. Par convention, une entité présente une différence significative entre 2 groupes quand sa valeur p est inférieure à 0.05. Le fold change (FC) représente le facteur de différence de l'intensité d'une entité d'un groupe à l'autre. Les entités avec un FC supérieur à 2 auront une intensité au moins 2 fois plus grande dans le second groupe par rapport au premier.

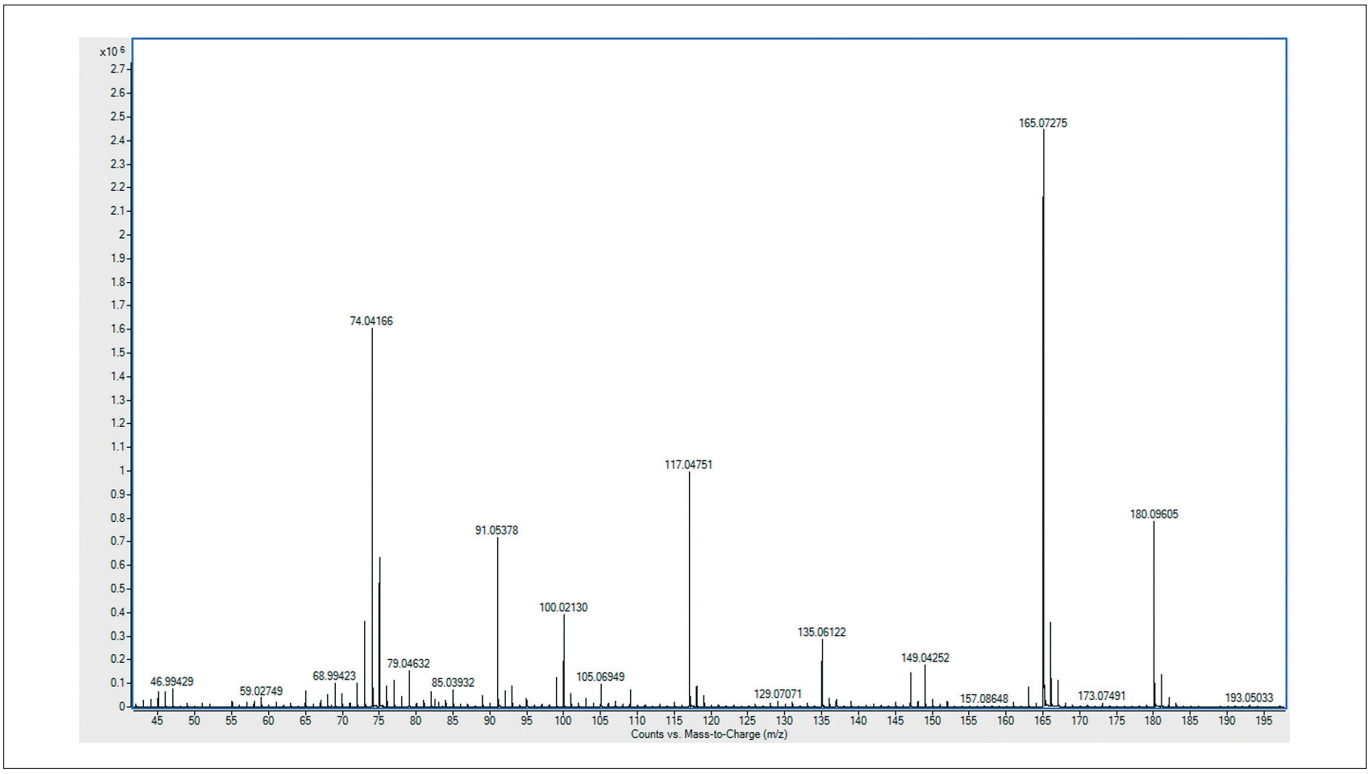


Figure 6

Spectre de masse obtenu par Q-TOF lors de l'analyse d'un échantillon du groupe CKD-3. Ce métabolite, identifié comme le dérivé silylé du p-crésol a précédemment été cité comme marqueur d'insuffisance rénale chronique (11).

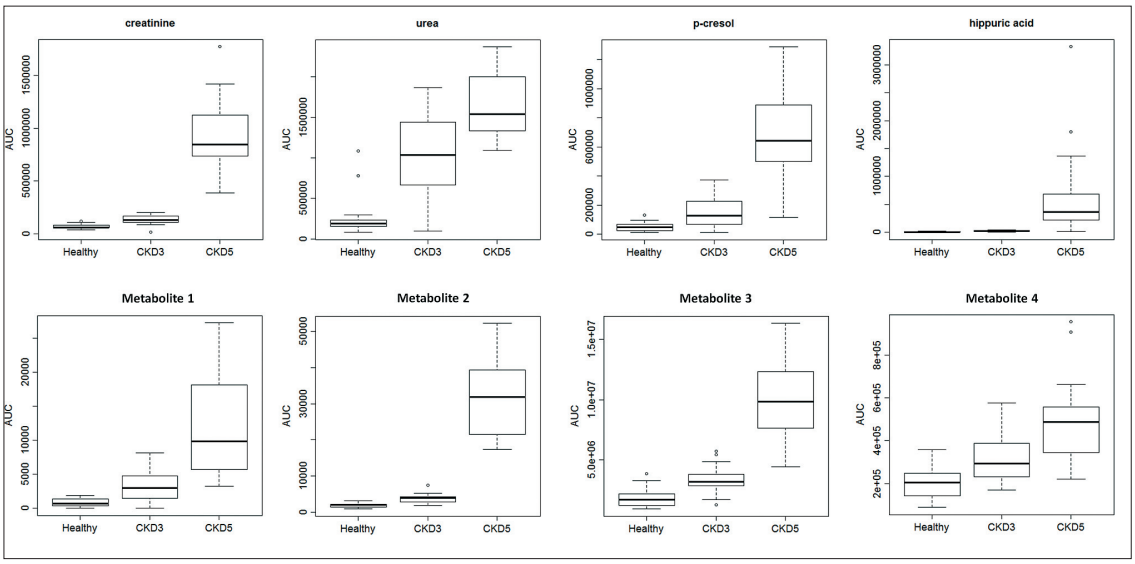


Figure 7
Diagramme en boite des composés présentant des différences significatives entre les différents groupes. Les boites (rectangles) englobent les valeurs situées entre le premier et le troisième quartile. La ligne représente la médiane des valeurs. Les segments représentent les valeurs extrêmes. Les éventuelles valeurs déviantes sont représentées par des points.

d'insuffisance rénale chronique lors de l'analyse d'un échantillon du groupe CKD-3. La formule C10H16OSi générée avec une précision de 4 ppm correspond au p-crésol silylé.
Pour les composés présentant des différences notables par comparaison du groupe H et du groupe CKD-3, les valeurs des intensités dans les échantillons du troisième groupe (CKD-5) ont également été extraites par XCMS et intégration manuelle, afin de pouvoir réaliser les diagrammes en boite de ces composés pour les trois stades de maladie.
La Figure 7 montre les diagrammes en boite obtenus pour quelques métabolites qui montrent des différences significatives entre les trois groupes. La ligne supérieure illustre des métabolites ayant déjà été cités dans la littérature comme marqueurs d'insuffisance rénale chronique (5, 6, 11, 12). La créatinine et l'urée sont des composés analysés systématiquement dans les laboratoires cliniques pour le contrôle d'insuffisance rénale (5-6). La ligne inférieure présente quatre métabolites n'ayant pas encore été cités dans la littérature comme étant des marqueurs de la maladie.

IV - Conclusion

Cette étude montre clairement l'efficacité de l'étude métabolomique par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse qui pourrait représenter une méthodologie importante pour des futures découvertes de biomarqueurs. Les mêmes échantillons ont été analysés par LC-Q-TOF MS (chromatographie en phase liquide, détection par quadripôle couplé au temps de vol spectrométrie de masse). Les résultats obtenus se sont avérés complémentaires à ceux décrits dans cet article et ont confirmé certaines conclusions. Le rapport ici présenté décrit une étude à petite échelle menée sur 20 échantillons par groupe provenant d'un seul hôpital. Évidemment, les conclusions faites nécessitent d'être validées avec un plus grand nombre d'échantillons provenant de sources multiples.

REMERCIEMENTS
Prof. Dr. R. Van Holder, Hôpital Universitaire de Gand, Belgique, pour avoir fourni les échantillons de sérum.

BIBLIOGRAPHIE

(1) HANASH S., Disease Proteomics. *Nature* 2003, 422, 226-232.

(2) VAN DER GREEF, J., MARTIN, S., JUHASZ, P., ADOURIAN, A., PLASTERER, T., VERHEIJ, E. R., MCBURNEY, R. N., The art and practice of systems biology in medicine: mapping patterns of relationships. *J. Proteome Res.*, 2007, 6, 1540-1559.

(3) SREEKUMAR, A., POISSON, L. M., RAJENDIRAN, T. M., KHAN, A. P., CAO, Q., YU., J., LAXMAN, B., MEHRA, R., LONIGRO, R. J., LI, Y., NYATI, M. K., AHSAN, A., KALYANA-SUNDARAM, S., HAN, B., CAO, X., BYUN, J., OMENN, G. S., GHOSH, D., PENNATHUR, S., ALEXANDER, D. C., BERGER, A., SHUSTER, J. R., WEI, J. T, VARAMBALLY, S., BEECHER, C., CHINNAIYAN, A. M., Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature*, 2009, 457, 910-914.

(4) WEISS R.H., KIM K., Metabolomics in the Study of Kidney Diseases. *Nat. Rev. Nephrol.*, 2012, 8, 22-33.

(5) WU I., PARIKH C.R., Screening for kidney diseases: older measures versus novel biomarkers. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2008, 3, 1895-1901.

(6) BONOMINI F., FOGLIO E., RODELLA L.F., REZZANI R., Clinical Biomarkers in Kidney Diseases, *Front. BioSci.* 2010, 1, 591-615.

(7) FIEHN O., KIND T., Metabolite Profiling in Blood Plasma. *Methods. Mol. Biol.* 2007, 358, 3-17.

(8) PALAZOGLU M., FIEHN O., Metabolite Identification in Blood Plasma using GC/MS and the Agilent Fiehn GC/MS Metabolomics RTL Library, *Agilent Technologies application note* 5990-3638EN, 2009.

(9) KIND T., WOHLGEMUTH G., LEE D.Y., LU Y., PALAZOGLU M., SHAHBAZ S., FIEHN O., FiehnLib: Mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry, *Anal. Chem.* 2009, 81, 10038-10048.

(10) SMITH C.A., WANT E.J., O'MAILLE G., ABAGYAN R., SIUZDAK G., XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal. Chem.*, 2006, 78(3), 779-87.

(11) VANHOLDER R., DE SMET R., GLORIEUX G. *et al* Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int.*, 2003, 63, 1934-1943.

(12) KIKUCHI K., ITOH Y., TATOEKA R., EZAWA A., MURAKAMI K., NIWA T., Metabolomic search for uremic toxins as indicators of the effect of an oral sorbent AST-120 by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.*, 2010, 878, 2997-3002.