

# Primjena NMR spektroskopije u metabolomici

---

Mihaljević, Martina

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:383975>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-09**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Martina Mihaljević**

7376/PT

**PRIMJENA NMR-SPEKTROSKOPIJE U METABOLOMICI**

ZAVRŠNI RAD

**Predmet:** Instrumentalna analiza

**Mentor:** Doc. dr. sc. Monika Kovačević

**Zagreb, 2019.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija**

**Zavod za kemiju i biokemiju**

**Laboratorij za organsku kemiju**

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

### PRIMJENA NMR-SPEKTROSKOPIJE U METABOLOMICI

*Martina Mihaljević, 0058210455*

**Sažetak:** Metabolomika je jedno od novih područja istraživanja koje omogućuje bolje razumijevanje bioloških sustava. Najčešća instrumentalna metoda koja se koristi u ovom području je nuklearna magnetska rezoancija (NMR). Metabolomske metode zasnovane na NMR pružaju informaciju o koncentraciji metabolita koja se mijenja pod utjecajem raznih čimbenika. Jedan od čimbenika je bolest, stoga je pomoću metabolomskih metoda moguće utvrditi mnoge biomarkere bolesti. Iz toga razloga predstavljaju potencijalno vrlo važan dijagnostički alat. Otkrivanje biomarkera je ključno i za shvaćanje patologije bolesti, te praćenje učinkovitosti liječenja. Zbog prisutnih nedostataka (slaba osjetljivost, veličina uređaja, otkriće biomarkera za mnoge bolesti je još uvijek veliki izazov...) primjena u kliničkoj medicini nije još moguća. Potreban je daljnji razvoj ovih metoda, a neke od potencijalnih primjena su prikazane u ovome radu.

**Ključne riječi:** bolest, instrumentalna analiza, metabolomika, nuklearna magnetska rezonanca

**Rad sadrži:** 28 stranica, 5 slika, 64 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Doc. dr. sc. Monika Kovačević

**Datum obrane:** 09. srpnja 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**University undergraduate study Food technology**

**Department of Chemistry and Biochemistry**

**Laboratory of Organic Chemistry**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### APPLICATION OF NMR SPECTROSCOPY IN METABOLOMICS

*Martina Mihaljević, 0058210455*

**Abstract:** Metabolomics is one of the new research fields that gives a better understanding of biological system. The most common instrumental tool used in this research is Nuclear Magnetic Resonance (NMR). NMR-based metabolomics provide information on the concentration of a metabolite under the influence of various factors. One of the factors is a disease, so metabolomics methods can be used to identify many biomarkers of the disease. Because of this, these methods are potentially very important diagnostic tools. Biomarker detection is also crucial for understanding pathology of disease and monitoring the effect of treatment interventions. Due to the present deficiencies (weak sensitivity, device size, the discovery of biomarkers for many diseases is still a big challenge...) application in clinic medicine is not possible yet. Further development of these methods is required, as well as some of the potential application are presented in this paper.

**Keywords:** disease, instrumental analysis, metabolomic, nuclear magnetic resonance

**Thesis contains:** 28 pages, 5 figures, 64 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Ph. D. Monika Kovačević, Assistant Professor

**Defence date:** July 9<sup>th</sup> 2019

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Metabolomika.....</b>	<b>2</b>
2.1.1. Primjena.....	4
<b>2.2. Nuklearna magnetska rezonancija (NMR).....</b>	<b>4</b>
2.2.1. Jednodimenzijske tehnike NMR spektroskopije.....	5
2.2.2. Dvodimenzijske tehnike NMR spektroskopije.....	6
2.2.3. NMR spektroskopija s visokom razlučivošću HRMAS (engl. <i>High- magic-angle spinning</i> ).....	6
2.2.4. <i>In vivo</i> MRS spektroskopija.....	7
<b>2.3. Prikupljanje i priprema uzoraka.....</b>	<b>7</b>
2.3.1. Status metabolita u organizmu.....	7
<b>2.4. Primjena metabolomskih tehnika zasnovanih na NMR spektroskopiji u detekciji bolesti kod ljudi.....</b>	<b>8</b>
2.4.1. Rak.....	8
2.4.2. Razina laktata kao biomarkera za rak.....	8
2.4.2.1. Epitelni rak jajnika.....	9
2.4.2.2. Rak pluća.....	10
2.4.2.3. Rak dojke.....	11
2.4.2.4. Rak debelog crijeva.....	11
2.4.2.5. Oralni karcinom ( rak usne šupljine).....	11
2.4.3. Neurološke bolesti.....	12
2.4.3.1. Amiotrofična lateralna skleroza.....	12

2.4.3.2. Huntingtonova bolest.....	13
2.4.3.3. Parkinsonova bolest.....	13
2.4.3.4. Alzheimerova bolest.....	14
2.4.3.5. Shizofrenija.....	14
2.4.4. Upalne bolesti (upale).....	14
2.4.4.1. Vitreoretinalni poremećaji (poremećaji staklastog tijela).....	15
2.4.4.2. Upalna bolest crijeva.....	15
2.4.5. Ostale bolesti.....	16
2.4.5.1. Urođene pogreške u metabolizmu.....	16
2.4.5.2. Koronarna ili ishemička bolest srca.....	17
2.4.5.3. Kronična bolest bubrega.....	17
2.4.5.4. Celijakija.....	17
2.4.5.5. Hepatitis C.....	18
2.4.5.6. Endometrioza.....	18
2.4.5.7. Dijabetes (šećerna bolest).....	18
<b>2.5. Nedostatci metabolomskih metoda zasnovanih na NMR.....</b>	<b>19</b>
<b>2.6. Budućnost NMR spektroskopije u metabolomici.....</b>	<b>19</b>
<b>3. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>21</b>
<b>4. LITERATURI IZVORI.....</b>	<b>22</b>

# 1. UVOD

Metabolomika se bavi mjerenjem koncentracije malih molekula, metabolita, čija se koncentracija može značajno mijenjati uslijed različitih uvjeta. To je relativno novo područje istraživanja. U posljednjih nekoliko godina pronašla je primjenu u mnogim područjima kao što su medicina, farmacija (istraživanje novih lijekova), poljoprivreda, prehrambena tehnologija i itd. Posebno se istražuje uloga metabolomskih tehnika u medicini gdje imaju veliki potencijal kao mogući dijagnostički alati za mnoge bolesti. Metabolomskim tehnikama mjere se koncentracije mnogih metabolita koje se značajno mogu mijenjati tijekom bolesti ili tretmana liječenja. Bolesti dovode do patoloških i fizioloških promjena koje utječu na promjenu koncentracije metabolita u tjelesnim tekućinama i tkivima. Samim time metabolomske tehnike omogućuju dijagnozu mnogih bolesti (čak i u ranim fazama bolesti, što često drugim metoda nije moguće), ali i praćenje odgovora organizma na tretman liječenja.

Najčešće instrumentalne metoda koja se koristi u metabolomici jest nuklearna magnetska rezonancija (NMR). NMR predstavlja najsnažniju metoda za određivanje organskih i anorganskih spojeva. Za određivanje sastava metabolita tjelesnih tekućina kao što su urin i krvna plazma najčešće se koriste metabolomske tehnike bazirane na NMR. Primjenu NMR u metabolomici pogoduju mnoge prednosti toga postupka: neinvazivan i nedestruktivan je (omogućuje i *in vivo* studije) te brz postupak, omogućuje određivanje metabolita u tjelesnim tekućinama bez prethodne velike pripreme uzroka, te ima visoku reproducibilnost. Pomoću NMR spektroskopije istraživači mogu koristiti izotopski označene jezgre kao što su  $^{13}\text{C}$  i  $^{15}\text{N}$  i dobiti korisne informacije o protoku materijala kroz metaboličke putove.

Primjenom metabolomskih metoda zasnovanih na NMR u biološkim tekućinama je moguće detektirati i kvantificirati sve NMR signale koje proizlaze iz stotine malih prisutnih metabolita i tako dobiti potpunu sliku metaboličkog statusa organizma. Iz toga razloga metabolomske metode zasnovane na NMR oslanjaju se najčešće na usporedbu metaboličkog statusa uzorka pacijenata s metaboličkim statusom uzorka zdravih pojedinaca. Zajedno s kemometrijskim tehnikama predstavljaju najmoćniju tehniku za razlikovanje bolesnika od zdravih pojedinaca na osnovu metaboličkih statusa njihovih uzoraka.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Metabolomika

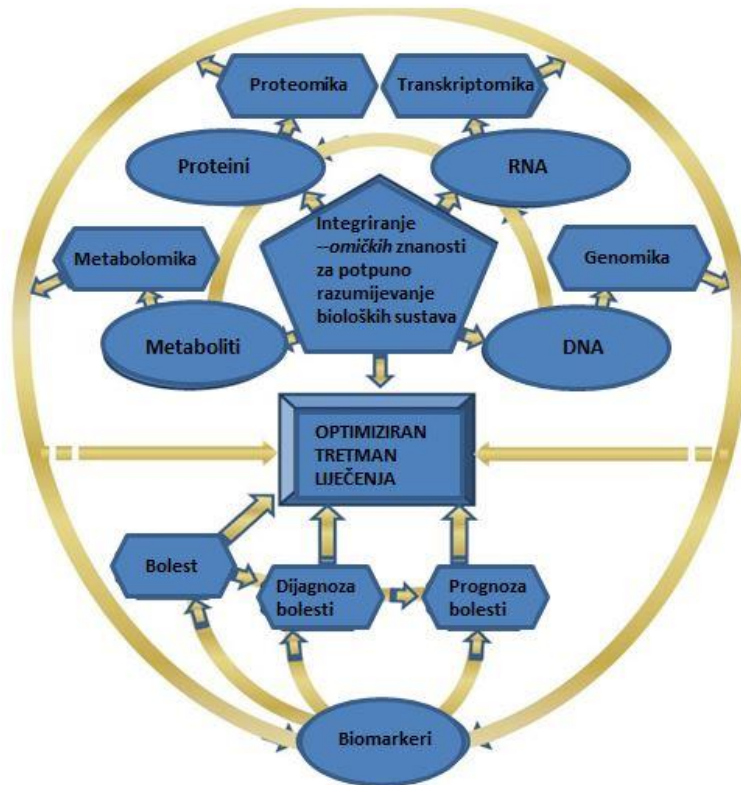
Metabolomika se bavi mjerenjem koncentracije metabolita, praćenjem njihovih tokova i njihovog izlučivanja u stanice i tkiva u kojima postoji direktna veza između genetičke aktivnosti, aktivnosti proteina i same metaboličke aktivnosti [1]. Metaboliti su male molekule koje su krajnji produkt ekspresije gena i sinteze proteina, kao i stanični odgovor na stresore iz okoline. Mogu se podijeliti na *endogene* metabolite koji se sintetiziraju i troše unutar biološkog sustava i *egzogene* metabolite koji se unose u sustav preko hrane ili lijekova [2]. Koncentracija metabolita varira ovisno o fiziološkom, razvojnom i patološkom stanju stanice, tkiva, organa ili organizma.

Patološke i fiziološke promjene do kojih dolazi tijekom bolesti u organizmu dovode do promjene u koncentraciji metabolita i proteina u biološkim tekućinama i tkivima. Stoga je mjerenjem koncentracije metabolita i proteina moguće pratiti i zdravstveni status pojedinca, ali i otkriti biomarkere pojedinih bolesti [2]. Još uvijek nije poznat točan broj metabolita u ljudskom metabolomu, ali se smatra da je manji broj metabolita nego gena. Do danas je identificirano i kvantificirano 309 metabolita u cerebrospinalnoj tekućini (CSF), 4.229 metabolita u serumu, 458 metabolita u urinu i oko 300 metabolita u drugim tkivima i biološkim tekućinama [3]. Budući da je broj metabolita koji se mogu detektirati manji od ukupnog broja svih staničnih proteina i gena, njihovu je koncentraciju puno lakše izmjeriti te se stoga metabolička analiza može napraviti relativno brzo.

Metabolomika je područje koje je još uvijek u nastajanju, ali s obzirom da omogućuje profiliranje većeg broja metabolita nego što je to trenutno moguće s drugim laboratorijskim tehnikama, sigurno je da će u budućnosti imati veliku primjenu, posebice u medicini.

To je jedno od nekoliko novih područja istraživanja, uz genomiku, proteomiku i transkriptomiku, koja se smatraju korisnima za bolje razumijevanje biologije organizma kao i njegove interakcije s okolinom i genetskim sustavom (slika 1.) [4]. Integracijom informacija dobivenih iz ovih *–omičkih* znanosti dobiva se potpunija slika ljudskog zdravlja, proces bolesti uključujući status bolesti kao i odgovarajuću terapiju.





Slika 1. Integriranje -omskih znanosti za potpuno razumijevanje bioloških sustava [4].

Postoje različiti analitički postupci koji se mogu koristiti u metabolomici kako bi se dobile informacije o prisutnim metabolitima, kao i o njihovim karakteristikama. Najznačajniji analitički postupci su: plinska kromatografija, masena spektrometrija, elektronska ionizacija, elektrosprej ionizacija (ESI), kapilarna elektroforeza, HPLC i nuklearna magnetska rezonancija (NMR). Najčešće se koriste nuklearna magnetska rezonancija i masena spektrometrija. Masena spektroskopija često zahtjeva prethodnu separaciju uzorka plinskom ili tekućinskom kromatografijom. Ima veću osjetljivost od NMR, ali je NMR brži, reproducibilniji postupak koji zahtjeva minimalnu pripremu uzorka prije mjerenja [5].

Tehnike analize metabolita obuhvaćaju:

- uzimanje tzv. "otisaka prsta" (engl. *fingerprinting*) (dijagnostički obrasci bolesti),
- profiliranje (kvantitativna analiza velikog broja metabolita),
- analiza bazena (ciljano kvantitativno određivanje manjeg broja metabolita) i
- analiza toka (praćenje sudbine metabolita i izračun stope metaboličkih procesa) [5].

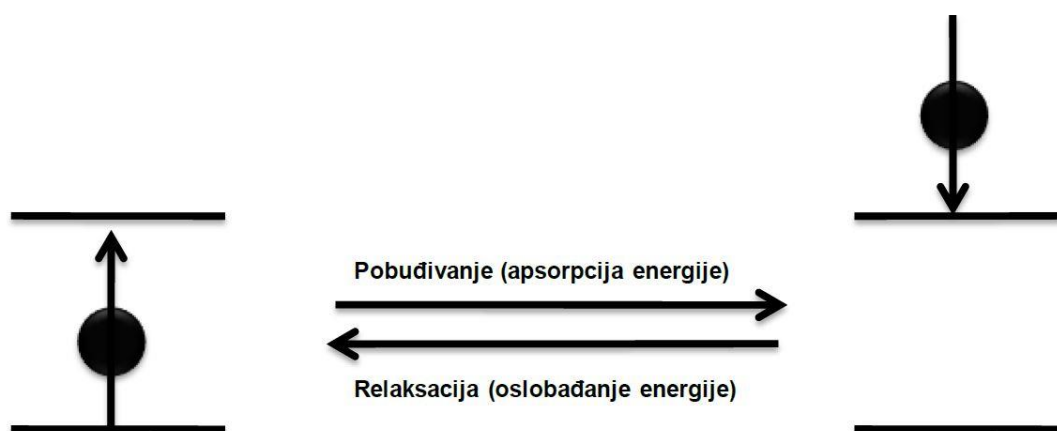
### 2.1.1. Primjena

Metabolomika ima izrazito veliki potencijal za primjenu u različitim područjima istraživanja, te je vrlo važna metoda za pronalaženje novih lijekova i dijagnostičkih alata i postupaka. Neka od najznačajnijih područja u kojima je metabolomika već pronašla primjenu ili će ju pronaći u bliskoj budućnosti su [6]:

- medicina
- sintetička biologija
- očuvanje okoliša
- toksikologija
- nutrigenomika
- poljoprivreda
- funkcionalna genomika
- prehrambena tehnologija
- veterinarstvo.

### 2.2. Nuklearna magnetska rezonancija (NMR)

Nuklearna magnetska rezonancija (NMR) je najmoćnija metoda za određivanje strukture organskih i anorganskih spojeva. Temelji se na apsorpciji elektromagnetskog zračenja jezgri atoma analiziranog uzorka smještenih u snažnom vanjskom magnetnom polju pri čemu jezgre izvrću svoj spin, a apsorbirana se energija mjeri NMR spektrometrom (slika 2) [7].



Slika 2. Promjena stanja jezgrinog spina – rezonancija [7].

NMR spektroskopija je iznimno bitna analitička metoda u raznim područjima istraživanja kao što su organska kemija, anorganska kemija, biokemija, fizika, biologija,

kemija polimera, pri razvoju novih lijekova, ali i u raznim područjima moderne medicine [8-12].

Primjena NMR spektroskopije u metabolomici daje izvrsne rezultate u dijagnozi mnogih ljudskih bolesti. Najveći nedostatak te metode jest niska osjetljivosti s obzirom da su veličine uzorka jako male, te veličina samog uređaja kao i cijena uređaja. Međutim, otkrićem dinamičke nuklearna polarizacije (DNP), kriogenih hladjenih sondi, mikro sondi i uporabom jačeg magnetskog polja u posljednjim istraživanjima značajno se povećala osjetljivost same metode [13].

Prednost ovakve metode u području metabolomike jest u tome da je neinvazivna i nedestruktivna, te da ima visoku reproducibilnost uz velik broj metabolita koji se mogu detektirati istovremeno. Pomoću NMR spektroskopije moguće je identificirati veliki broj spojeva prisutnih u biološkim tekućinama, staničnim ekstraktima i tkivima bez prethodne značajne pripreme uzoraka. Neke biološke tekućine poput cerebrospinalne tekućine zahtijevaju malu ili nikakvu pripremu uzorka za NMR. Druge biološke tekućine, poput plazme koja sadrži proteine i lipide koji ometaju NMR spektralnu analizu, je potrebno prethodno pripremiti i ukloniti prisutne proteine i lipide [14]. Još neke od prednosti NMR-a su [14]:

- pruža informaciju o strukturi
- može se koristiti za apsolutnu kvantifikaciju
- neovisna je o polarnosti analita
- može se smatrati univezalnim detektorom
- brza metoda

### **2.2.1. Jednodimenzijske tehnike NMR spektroskopije**

U jednodimenzijske tehnike NMR spadaju  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR. Spektri jednodimenzijskih tehnika NMR,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  pokazuju signale neekvivalentnih protona, odnosno ugljikovih atoma u spoju. U jednodimenzijskoj NMR spektroskopiji prisutni signali su funkcija jednog parametra, najčešće kemijskog pomaka [7].

Do danas se velika većina metabolomskih studija zasnovanih na NMR spektralnoj analizi provodi pomoću jednodimenzijskih tehnika.  $^1\text{H}$  NMR spektroskopija predstavlja najkorisniju tehniku pri dijagnozi bolesti. Nedostatak ove tehnike je u tome što dolazi do preklapanja signala u spektru zbog uskog raspona kemijskog pomaka, što može dovesti do nepouzdana raspodjele signala za različite metabolite. Druge jezgre imaju šire raspone kemijskog pomaka, ali imaju neka druga ograničenja. Na primjer, spektralna disperzija jednodimezijske  $^{13}\text{C}$  NMR je značajno šira u odnosu na  $^1\text{H}$  NMR, ali niska osjetljivost te tehnike ograničava

njenu primjenu u ovome području.  $^{15}\text{N}$  NMR spektroskopija veliku primjenu ima u istraživanju DNA i RNA strukture, ali također joj je nedostatak što ima vrlo malu osjetljivost [14].

### **2.2.2. Dvodimenzijske tehnike NMR spektroskopije**

Kako bi se riješio problem rezonancijskih preklapanja prisutan kod jednodimenzijskih tehnika NMR spektroskopije koriste se dvodimenzijske tehnike koje se temelje na skalarnom sprezanju jezgra kroz kovalentne veze. Sprezanja mogu biti između istovrsnih jezgara i tada se nazivaju homonuklearnim sprezanjima ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) ili među raznovrsnim jezgrama koje se onda nazivaju heteronuklearnim sprezanjima (npr.  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ ) [7].

Primjenom dvodimenzijskih tehnika moguće je otkrivanje i identifikacija većeg broja metabolita nego primjenom jednodimenzijskih tehnika. U metabolomici se najčešće koriste homonuklearne tehnike COSY (engl. *Correlation Spectroscopy*) i TOSCY (engl. *Total Correlation Spectroscopy*), te heteronuklearne tehnike HSQC (engl. *Single quantum coherence*), HMQC (engl. *Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*) i HMBC (engl. *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) [14].

COSY daje puno više informacija od jednodimenzijskih NMR spektra u vrlo kratkom vremenu [15], te je vrlo korisna NMR tehnika koja se koristi u širokom rasponu u metabolomici. Od heteronuklearnih tehnika koriste se HSQC i HMQC.  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektroskopija je jedna od najvažnijih tehnika koja se primjenjuje za određivanje signala proteina [16]. Dvodimenzijske tehnike povećavaju spektralnu disperziju, te omogućuju strukturalno određivanje metabolita koji su previše složeni za detekciju i razradu primjenom jednodimenzijskih tehnika NMR-a.

### **2.2.3. NMR spektroskopija s visokom razlučivošću HRMAS (engl. *High-resolution magic-angle spinning*)**

Metabolomika koja obuhvaća istraživanje metabolita iz tkiva primjenom NMR spektroskopije u otopini, susreće se s problemom vezanim za određivanje ispravne koncentracije određenog metabolita u tkivu. HRMAS spektroskopija je efikasna metoda za praćenje originalnih uzoraka metabolita bez predpripreme originalnog tkiva [17]. Tehnika je posebno primjenjiva za korelaciju između metabolomičkog profiliranja biofluida i histologije specifičnog tkiva, tako da  $^1\text{H}$ -NMR daje informacije o uzorcima koji se uzimaju neoštećujući tkiva iz kojih se uzorak uzima, poput bubrega [18], jetre [19] i mozga [20]. HRMAS se također može upotrijebiti za razlikovanje benignih od atipičnih meningioma prilikom biopsije [21].

#### **2.2.4. *In vivo* MRS spektroskopija**

NMR je neinvazivna metoda što je čini idealnom za *in vivo* istraživanja, koja se nazivaju spektroskopija magnetskom rezonancijom (MRS). U biomedicini se često koristi MRS koja pomaže u boljem postavljanju dijagnoza, a primjena MRS je raznolika, te obuhvaća studije izoliranih stanica, tkiva i tjelesnih tekućina pri visokim vrijednostima magnetskog polja u eksperimentalnim ili laboratorijskim uvjetima, ali i *in vivo* studije pomoću kliničkih MR sustava. Osobito je važna jer omogućuje mjerenje različitih biokemijskih tvari u tkivima, posebice u mozgu, te se iz toga razloga koristi za identifikaciju brojnih bolesti na mozgu [22].

### **2.3. Prikupljanje i priprema uzoraka**

Na koncentraciju metabolita utječu različiti čimbenici koji uključuju prehranu, lijekove, tjelesnu aktivnost, emocionalni status, stresore iz okoline i zdravstveno stanje. Iz toga razloga istraživanja u metabolomici se moraju provoditi u kontroliranim uvjetima kako bi se izbjegla neželjena interakcija s okolinom i dobili pogrešni zaključci. Na ljudske studije utječu broji vanjski podražaji koje je teško kontrolirati, stoga se prikupljanje uzoraka treba provesti prema standardiziranim operativnim protokolima (SOP). Za krvnu plazmu i urin, potrebno je uzorke prikupiti ujutro nakon najmanje 12 sati gladovanja i prije obavljanja bilo kakve fizičke aktivnosti. Pacijenti ne smiju bolovati od bolesti koje nisu u fokusu istraživanja, a uzorke kontrolne skupine je potrebno, ukoliko je moguće, prikupiti od osoba koje s pacijentom dijele slične etničke, životne, prehrambene, geografske i okolišne uvjete. Uzorci se mogu odmah koristiti ili propisno skladištiti za kasnije korištenje. Ukoliko je potrebno duže čuvanje uzoraka primjenjuje se smrzavanje na  $-80^{\circ}\text{C}$ . Prilikom korištenja uzoraka potrebno je postepeno odmrzavanje uzorka do sobne temperature kako bi se uzorak što manje razgradio. Ako su prisutni katalitički aktivni proteini, potrebno ih je ukloniti nekom od primjenjivih metoda, najčešće filtracijom. Potrebno je fiksirati odgovarajući pH svih uzoraka jer kemijski pomak nekih NMR rezonancija je jako ovisan o pH vrijednosti [23].

#### **2.3.1. Status metabolita u organizmu**

Svi metaboliti u organizmu nalaze se u određenim koncentracijama, a poznato je da tijekom bolesti dolazi do promjena u koncentraciji pojedinih metabolita u organizmu. Prateći status pojedinih metabolita moguće je utvrditi i status bolesti. Ukoliko koncentracija pojedinog metabolita pada kao rezultat statusa bolesti, smanjenje koncentracija u odnosu na normalnu može se povezati sa statusom same bolesti. Jako bitno za napomenuti je da do promjene u koncentraciji metabolita vrlo često dolazi i prije javljanja ostalih kliničkih

simptoma bolesti, stoga se upravo takve promjene mogu koristiti kao biomarkeri određenih bolesti. Isto tako, mjerenjem koncentracije metabolita tijekom liječenja možemo ustanoviti kakav je odgovor organizma na liječenje. Iz tog razloga vrlo je značajna uloga metabolomike tj. metabolomskih tehnika zasnovanih na NMR spektroskopiji u ovome području.

## **2.4. Primjena metabolomskih tehnika zasnovanih na NMR spektroskopiji u detekciji bolesti kod ljudi**

Već duži period se smatra kako primjena NMR spektroskopije u metabolomičkim tehnikama ima važnu ulogu u otkrivanju bolesti kod ljudi. Neke od bolesti koje se mogu dijagnosticirati pomoću navedenih tehnika će biti nabrojane u nastavku.

### **2.4.1. Rak**

Veliki izazov u medicini i farmaciji je rano otkrivanje raka, budući da se tada stopa smrtnosti značajno smanjuje. Pristup primjenom NMR metoda u ovom području može imati velike prednosti u ranoj detekciji jer u samom začetku bolesti dolazi do različitih promjena u metabolizmu zbog ekspresije proteina i mijenjanja signalnih putova [24]. Tijekom kancerogeneze stanice raka podliježu određenim biokemijskim promjenama što dovodi do promjene koncentracije metabolita. Na primjer, visoka koncentracija laktoze u aerobnim uvjetima kao i visoka potrošnja glukoze, elementarne su karakteristike stanica raka i koriste se kao biomarkeri njihovog prisustva [25].

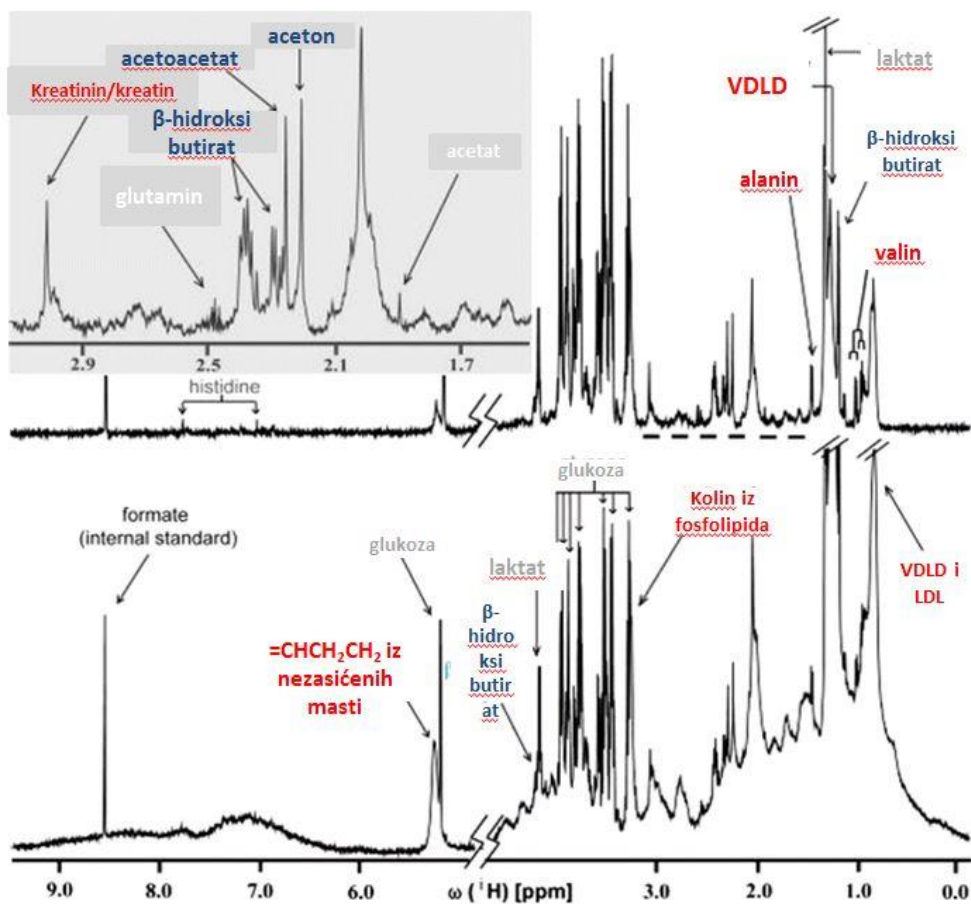
### **2.4.2. Razina laktata kao biomarkera za rak**

Laktat je osjetljivi pokazatelj tijeka glikolize, stanične oksigenacije i stanja energije u živim tkivima. Za kvantificiranje laktata koristi se najčešće magnetska rezonancijska spektroskopija. Promjene u koncentraciji laktata povezane su s različitim patološkim stanjima u tkivima te je laktat predložen kao važan biomarker za rak. Rezultati istraživanja pokazuju da je koncentracija laktata u uzorcima seruma osoba oboljelih od raka mokraćnog mjehura niža nego u uzorcima zdravih ispitanika što ukazuje na poremećaje u glikolizi [23]. Kod bolesnika s rakom pluća utvrđena je veća koncentracija laktata u uzorcima krvne plazme u odnosu na uzorke zdrave populacije [26]. Razina laktata je bila niža u uzorku seruma osoba oboljelih od oralnog raka u odnosu na zdravu populaciju [27]. Osim toga metabolomičke metode zasnovane na NMR spektroskopiji mogu se koristiti i za praćenje odgovora stanica raka na kemoterapiju i zračenja [28]. Ova izvješća potvrđuju potencijal ovih metoda kao dijagnostičkih alata i pokazuju da se mogu koristiti kako bi nadopunili postojeće standardizirane metode za dijagnozu raka.

### 2.4.2.1. Epitelni rak jajnika

Dijagnoza epitelnog raka jajnika u ranoj fazi je još uvijek veliki izazov. Trenutne metode koje se koriste za dijagnozu ovog oblika raka, uključujući ultrazvuk i biokemijsko određivanje tumorskog markera (kao što je CA125), su vrlo malo osjetljive i koriste se za previđanje manje od 10% ovakvog oboljenja [29]. Kao i kod drugih oblika raka i u ovome slučaju rano otkrivanje značajno povećava mogućnost preživljavanja.

Metabolomski pristup temeljen na  $^1\text{H-NMR}$  se primjenjuje kako bi se ispitala sposobnost za detekciju epitelnog raka jajnika u ranoj fazi. Pokazalo se da ima 100% osjetljivost i specifičnost pri usporedbi uzoraka seruma pacijenata s ovom bolesti i uzoraka seruma zdravih žena u postmenopauzi (slika 3.). Ovakav rezultat je dao nadu da će se u budućnosti pomoću metabolomskih metoda zasnovanim na NMR moći detektirati epitelni rak jajnika u ranoj fazi [30].



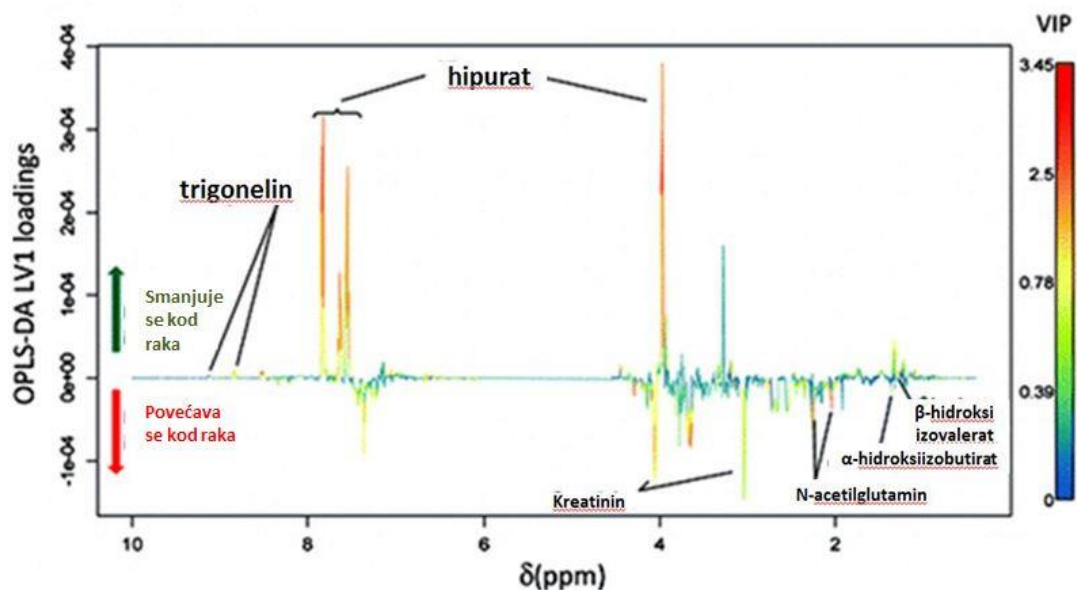
Slika 3. PMG (*gore*) and NOESY (*dolje*)  $^1\text{H-NMR}$  spektri [30]

[metaboliti u puno nižoj koncentraciji (crvena boja) i višoj koncentraciji (plava boja)]

### 2.4.2.2. Rak pluća

Metabolomski pristup temeljen na NMR-spektroskopiji također se primjenjuje pri ranom otkrivanju raka pluća, gdje je najveća stopa smrtnosti zbog uobičajenog otkrivanja bolesti kad je već u uznapredovanom stadiju.

Pomoću protonskog NMR i drugih metoda za obradu dobivenih podataka (PCA, PLS-DA, i OPLS-DA) provedena su istraživanja kojima je bio cilj pronalazak specifičnog metaboličkog otiska u urinu kod osoba s rakom pluća. Uspoređujući spektre uzoraka urina bolesnika s karcinomom pluća i spektre uzoraka urina zdravih pojedinaca uočene su značajne razlike u koncentraciji pojedinih metabolita (slika 3). Kod oboljelih osoba bile su veće koncentracije hidroksiizovalerata,  $\alpha$ -hidroksiizobutirata, *N*-acetilglutamata i kreatinina, dok su primjećene manje koncentracije hipurata i trigonelina [31].



Slika 3. Usporedba koncentracije metabolita u urinu osoba oboljelih od raka pluća i zdravih pojedinaca [26].

Slično istraživanje se provelo kako bi se uvidjele promjene u plazmi oboljelih osoba, gdje su pronađene veće količine lipoproteina vrlo niske gustoće (VLDL) i lipoproteina niske gustoće (LDL), a manje količine lipoproteina visoke gustoće (HDL) nego kod uzoraka zdravih osoba [26]. Također, uzorci oboljelih osoba su imali i niže koncentracije citarata, acetata, glukoze, alanina, tirozina i valina, a veće koncentracije laktata i piruvata.



### **2.4.2.3. Rak dojke**

Kod raka dojke stanice raka se nalaze u tkivu dojke. Kao i kod većine drugih oblika raka poželjno je što ranije otkrivanje bolesti, te se u to još uvijek ulažu veliki napori. Stanice raka se mogu odvojiti od raka u dojci i zatim putem krvi ili limfe stići do udaljenih dijelova tijela, gdje mogu započeti daljnji rast i razvoj, tj. dolazi do stvaranja novog raka. U tom slučaju se radi o metastazama, odnosno o metastatskom raku dojki. Do metastaza često dolazi ukoliko se rak dojke ne otkrije u ranoj fazi. Koristeći protonski NMR uspoređivani su metabolički otisci seruma osoba oboljelih od raka dojke u ranoj fazi i osoba koje su već u metastatskoj fazi. Rezultati su pokazali da se metabolički otisci seruma u ranoj fazi razlikuju od metaboličkih otisaka seruma u fazi s metastazama s 75% osjetljivosti, 69% specifičnosti i 72% točnosti predviđanja [32].

### **2.4.2.4. Rak debelog crijeva**

Rak debelog crijeva je jedan od vodećih uzročnika smrti povezanih s rakom u razvijenim zemljama. Otkrivanje ovog raka u ranoj fazi osim što smanjuje stopu smrtnosti također poboljšava način i mogućnosti liječenja. Provedeno je nekoliko istraživanja u kojima su se koristile metode temeljene na NMR za razlikovanje metaboličkih otisaka uzoraka oboljelih osoba i uzoraka zdravih osoba (kontrolna grupa). Rezultati su pokazali da se pomoću metaboličkih metoda temeljenih na NMR i kemometrijskih metoda mogu značajno razlikovati maligni uzroci od kontrolnih [33].

### **2.4.2.5. Oralni karcinom (rak usne šupljine)**

Karcinom usne šupljine je jedan od najčešćih karcinoma glave i vrata. Glavni čimbenici za razvoj ovog oblika karcinom su pušenje i alkohol. Iako je lokaliziran u području koje se može pregledati i golim okom, najčešće se otkrije tek u uznapređovalom stadiju. U ranom stadiju ovaj karcinom je najčešće asimptomatski, a prvi simptomi se pojavljuju tek u uznapređovalom stadiju. U tom stadiju terapijske mogućnosti su smanjene i sama prognoza je lošija. Liječenje ovisi o stadiju bolesti. U ranom stadiju liječi se uglavnom kirurški dok kasni stadiji kombinacijom kirurškog zahvata i radioterapije [34].

Metabolomske metode zasnovane na NMR spektroskopiji su korištene kako bi se usporedile koncentracije metabolita u tkivima oboljelih pojedinaca i u tkivima zdravih pojedinaca. U tkivima oboljelih pojedinaca primijećene su manje koncentracije laktata, a povišene koncentracije alanina, izoleucina, leucina, taurina, glutaminske kiseline i lipida u odnosu na koncentracije u tkivima zdravih pojedinaca [27]. Dobiveni rezultati pokazuju da

metabolomske metode zasnovane na NMR spektroskopiji bi se mogle koristiti kao učinkovit dijagnostički alat kod ovakvog tipa karcinoma.

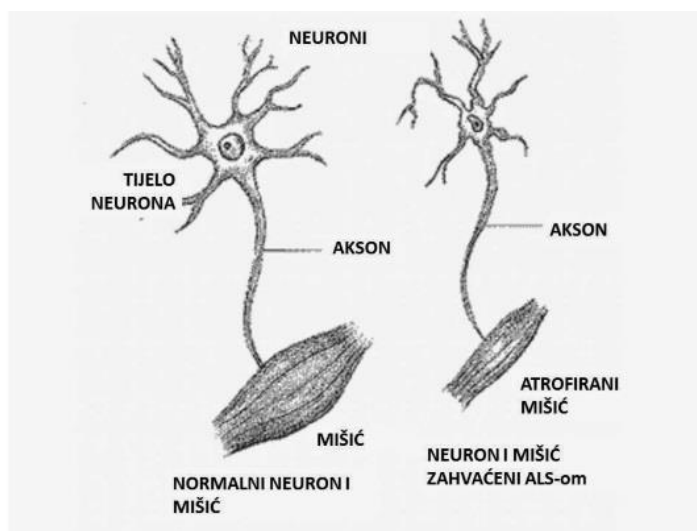
### 2.4.3. Neurološke bolesti

Središnji živčani sustav predstavlja veliki izazov prilikom istraživanja s obzirom da je pristup njemu vrlo nepraktičan. Od velike važnosti su nam novi dijagnostički pristupi koji olakšavaju proučavanje i uočavanje mogućih promjena u radu sustava koje dovode do razvoja različitih neuroloških bolesti.

Metoda  $^1\text{H-MRS}$  je vrlo djelotvorna i neinvazivna te omogućuje proučavanje patologije središnjeg živčanog sustava kao i *in vivo* praćenje brojnih značajnih metabolita mozga kao što su kolin, kreatin, mioinozitol, *N*-acetilaspartat, fosfokreatin i laktat. Pomoću ove metode moguće je praćenje između ostalog omjera *N*-acetilaspartata i kreatina koji je pokazatelj ispravnosti funkcije neurona (pad omjera ukazuje na oštećenje ili degeneraciju neurona) [35]. Samim time, metabolomske metode temeljene na NMR su pronašle veliku primjenu u dijagnostici neuroloških bolesti.

#### 2.4.3.1. Amiotrofična lateralna skleroza

Amiotrofična lateralna skleroza (ALS) je bolest koja zahvaća gornje i donje motorne neurone. Uzrokovana je degeneracijom motornih neurona i najčešće završava smrću oboljele osobe (slika 4). Kako dolazi do razvoja ove bolesti nije još u potpunosti razjašnjeno i postoji više različitih teorija nastanka ove bolesti. Počinje sa slabošću u mišićima i grčevima, a zatim se progresivno razvija, onesposobljavajući govor, hod i na kraju disanje [36].



Slika 4. Usporedba normalnog neurona i mišića sa neuronom i mišićom zahvaćenim ALS-om [36].

Metabolomske metode bazirane na NMR koriste se za praćenje biomarkera koji su prisutni u ranoj fazi ove bolesti. Uspoređujući protonske spektre cerebroskinalne tekućine osoba oboljelih od ALS i osoba bez ikakvih neuroloških bolesti, primijećeno je da su kod osoba s ALS-om povećane koncentracije metabolita kao što su aceton, piruvat i askorbat [37].

#### **2.4.3.2. Huntingtonova bolest**

Huntingtonova bolest (HD) je nasljedna kronična i neurodegenerativna bolest prilikom koje dolazi do odumiranja živčanih stanica u mozgu. To je bolest ponavljanja tripleta CAG (citozin-adenin-gvanin). Bolest utječe na pokrete, ponašanje, razmišljanje, pamćenje i samu osobnost oboljele osobe. Javlja se kod osoba između 30 i 50 godina i najčešće završava smrću za 15-20 godina [38].

Dijagnosticiranje bolesti u ranoj fazi je vrlo teško, te je zato od velike važnosti pronalaženje biomarkera bolesti. Za postavljanje dijagnoze, prognoze i načina liječenja bolesti nije samo dovoljno laboratorijsko određivanje CAG-ponavljanja. Metabolomske studije su pokazale da određeni metaboliti poput glicerola i aminokiselina mogu biti korisni u praćenju progresije same bolesti. Protonskom NMR spektroskopijom došlo se do rezultata koji ukazuju da kod osoba s HD dolazi do gotovo trostrukog povećanja koncentracije laktata u okcipitalnom korteksu u odnosu na kontrolnu skupinu [39].

#### **2.4.3.3. Parkinsonova bolest**

Parkinsonova bolest je progresivno neurodegenerativno stanje okarakterizirano drhtanjem (tremorom), usporenošću pokreta (bradikinezijom) i ukočenošću. Do toga dolazi zbog smrti neurona koje luče dopamin, neurotransmitera u mozgu kojim kontroliramo pokrete. Dopamin je zadužen za dijelove mozga koji kontroliraju izvođenje pokreta i koordinaciju. Zašto dolazi do smrti neurona još uvijek nije razjašnjeno. Kao i drugih neuroloških bolesti otkrivanje Parkinsonove bolesti u ranoj fazi je poželjno, ali i teško. Najčešće do otkrivanja bolesti dolazi kad se već izgubi oko 50% neurona koji luče dopamin (za što je potrebno otprilike 5 godina) [40].

NMR spektroskopija zajedno s (PLS-DA) je korištena za procjenu koncentracije metabolita u plazmi bolesnika s Parkinsonovom bolesti i u plazmi zdravih pojedinaca kao kontrolne skupine. Uočeno je da je piruvat metabolit pomoću kojeg se oboljeli razlikuju od zdravih pojedinaca [41].

#### **2.4.3.4. Alzheimerova bolest**

Alzheimerova bolest je neizlječiva i degenerativna bolest mozga koja svojim napredovanjem dovodi do gubitka pamćenja, demencije, poremećaja mišljenja i raznih promjena u ponašanju i osobnosti bolesnika. Još uvijek nije poznat točan uzrok bolesti, ali se pretpostavlja da propadanje živčanih stanica u mozgu dolazi zbog nakupljanja bjelančevina u mozgu (beta-amiloida i tau proteina). Nakupljanjem dolazi do gubitka živčanih stanica koje proizvode neurotransmiter acetil-kolin [42].

Korištenjem  $^1\text{H}$  NMR spektroskopije dobiveni su spektri cerebrospinalne tekućine bolesnika s Alzheimerovom bolesti i spektri cerebrospinalne tekućine zdravih pojedinaca. Uspoređivajući te spektre uočeni su specifični multipleti na 2,15 ppm i 2,45 ppm kod oboljelih osoba, a koji nisu bili prisutni na spektrima zdravih pojedinaca [43].

#### **2.4.3.5. Shizofrenija**

Shizofrenija je psihička bolest koja podrazumijeva složeni poremećaj funkcije mozga koji se sastoji od skupa karakterističnih simptoma. Osim što dolazi do raznih fizičkih poteškoća, bolest se manifestira i preko mentalnih i emocionalnih problema. Bolesnici teško funkcioniraju, nesposobni su za samostalni život i dolazi do društvene izolacije. Međutim ukoliko se s liječenjem počne u ranoj fazi bolesti može doći do oporavka i normalnog funkcioniranja života [44].

Iz tog razloga je otkrivanje biomarkera za rano otkrivanje shizofrenije ključno. Metabolomske metode temeljene na NMR korištene su, u kombinaciji s transkriptomikom i proteomikom, za ispitivanje profila metabolita u uzorcima cerebrospinalne tekućine bolesnika sa shizofrenijom i u uzorcima zdravih pojedinaca. Rezultati su pokazali da u uzorcima oboljenih osoba došlo do raznih metaboličkih deficita kao i do povećanog glikolitičkog toka [45].

Osim ovih neuroloških bolesti primjena metabolomskih metoda temeljenih na NMR ispitana je i na drugim bolestima poput multiple skleroze, idiopatske intrakranijalne hipertenzije i cerebrovaskularnih bolesti. Rezultati su pokazali da se ove metabolomske metode mogu koristiti kao koristan dijagnostički alat u kliničkoj praksi [46].

#### **2.4.4. Upalne bolesti (upale)**

Upalne bolesti spadaju u najčešća oboljenja kod ljudi. Upala je dio imunološkog odgovora tijela. Ukoliko imunološki sustav prepozna patogene ili oštećene stanice, započinje proces ozdravljenja. Akutna upala je početni odgovor imunološkog sustava na štetan

čimbenik, obično traje nekoliko dana, ali može biti i duže. Akutna upala se može razviti u kroničnu koja predstavlja organizmu štetan proces jer može dovesti do razvoja bolesti poput tumora, ateroskleroze i sl [47].

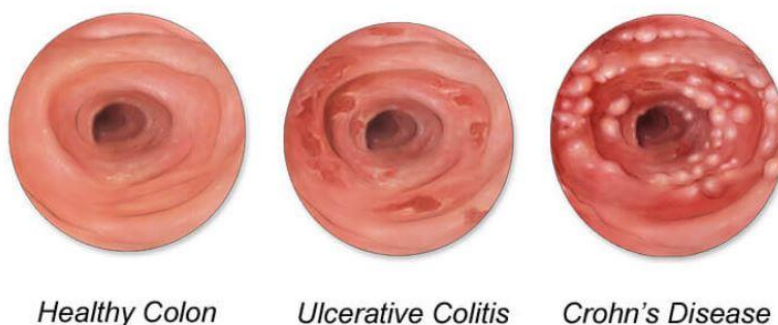
#### **2.4.4.1. Vitreoretinalni poremećaji (poremećaji staklastog tijela)**

Glavna karakteristika staklastog tijela (staklovine) jest prozirnost. Ukoliko bolesti zahvate susjedne strukture dolazi do zamućenja staklovine i samim time slabljenja vida [48]. Bolesti koje se pojavljuju imaju vrlo različite patogenetske mehanizme koji uključuju između ostalog različita upalna stanja, ali bez specifičnih biomarkera pomoću kojih bi se bolesti razlikovale. Najčešća je upala srednje ovojnice oka (uvea) poznata kao uveitis. Razlikujemo akutni uveitis i kronični uveitis. Akutni uveitis traje najviše 8 tjedana, ukoliko traje duže radi se o kroničnom uveitisu. Poželjno je što ranije otkrivanje bolesti kako ne bi došlo do većih komplikacija [49].

Pomoću protonske NMR spektroskopije analizirani su uzorci staklastog tijela bolesnika s nizom vitreoretinalnih poremećaja kako bi se odredila razlika između uveitisa (eng. LIU) i kroničnog uveitisa (CU). Rezultati koji su dobiveni pokazali su da se korištenjem NMR spektara ove dvije vrste bolesti mogu razlikovati s osjetljivošću od 78% i specifičnošću od 85% [49].

#### **2.4.4.2. Upalna bolest crijeva**

Upalna bolest crijeva (eng. Inflammatory bowel disease, IBD) je općenit naziv koji podrazumijeva ulcerozni kolitis (UC) i Crohnovu bolest (CD). Manifestira se teškim proljevom, umorom, boli i gubitkom kilograma, a predstavlja vrlo složenu bolest do koje dolazi pod utjecajem ekoloških, ali i raznih genetski čimbenika [50].



Slika 5. Razlike između izgleda zdravih crijeva, crijeva s ulceroznim kolitisom i crijeva kod Crohnove bolesti [51].

Ulcerozni kolitis i Crohnova bolest imaju zajedničke patološke i kliničke karakteristike, ali ipak zahtijevaju različite režime liječenja. Kako bi se smanjile neugodne nuspojave IBD poželjna je rana dijagnoza bolesti, ali i razlikovanje UC i CD. Trenutno se dijagnoze postavljaju uz pomoć raznih endoskopskih, radioloških i histopatoloških tehnika koje su invazivne i skupe [50].

U potrazi za jeftinijom i jednostavnijom metodom dijagnoze bolesti, korištena je protonska NMR spektroskopija kako bi se ispitala njezina moć za dijagnozu bolesti. Metabolomskim profiliranjem uzoraka seruma, urina i plazme bolesnika s IBD i zdravih osoba potvrđeno je da se protonska NMR može koristiti za razlikovanje kontrolnih uzoraka (zdravih ispitanika) i uzoraka s UC i CD [52].

Metabolomskim metodama baziranim na NMR analizirani su fekalni ekstrakti dobiveni od bolesnika s UC-om i CD-om, te su uspoređeni s uzorcima zdravih ispitanika. Dobiveni NMR spektri su pokazali da ispitanici s CD-om imaju veće koncentracije glicerola od ispitanika s UC-om i zdravih ispitanika. Osim toga rezultati su pokazali da ispitanici s CD-om, ali i ispitanici s UC-om imaju niže koncentracije nekih metabolita kao što su butirac, acetat, metilamin i trimetilamin u usporedbi sa zdravim ispitanicima. Razlike u koncentracijama fekalnih metabolita su bile izraženije kod ispitanika s CD-om nego kod onih s UC-om i zdravih ispitanika, što potvrđuje sposobnost NMR spektroskopije da razlikuje bolesnike s UC-om i CD-om [53].

## **2.4.5. Ostale bolesti**

### **2.4.5.1 Urođene pogreške u metabolizmu**

Urođene pogreške u metabolizmu su nasljedne i vrlo rijetke pojave koje karakteriziraju poremećaji u metabolizmu kao što su poremećaj metabolizma ugljikohidrata (npr. bolest nakupljanja glikogena), poremećaj metabolizma aminokiselina (javorov sirup bolest urina) i sl. Kod ovakvih bolesti većinom dolazi do nakupljanja štetnih tvari koje utječu na normalne funkcije metabolizma ili smanjuju sposobnost sinteze esencijalnih spojeva. Za dijagnozu ovakvih bolesti korištene su metabolomske metode temeljne na NMR i rezultati su pokazali kako upravo takve metode predstavljaju neinvazivan, brz i jednostavan način za otkrivanje urođenih pogrešaka u metabolizmu. Pomoću NMR spektrometra od 250 MHz proučavani su uzorci urina od osoba koje su imale urođene pogreške u metabolizmu. Zaključeno je da je NMR spektrometrija odlična metoda za otkrivanje urođenih pogrešaka u metabolizmu, ali je važno koristiti instrumente visokog polja s najboljim specifikacijama [54].

#### **2.4.5.2. Koronarna ili ishemička bolest srca**

Koronarna ili ishemička bolest srca podrazumijeva nastajanje plakova (naslaga) i suženja unutar koronarnih (srčanih) arterija što dovodi do slabe prokrvljenosti ili potpunog prekida prokrvljenosti pojedinih dijelova srčanog mišića. Zajedno sa hipertenzijom to je jedno od najčešćih kardiovaskularnih oboljenja kod ljudi. Povišene koncentracije u krvi lipoproteina vrlo niske gustoće (VDLD) i lipoproteina niske gustoće (VLDL), te niske koncentracije lipoproteina visoke gustoće (HDL) povezane su s povećanim rizikom od koronarne bolesti srca. Kako bi se utvrdila prisutnost i sama ozbiljnost koronarne bolesti koristila se  $^1\text{H-NMR}$  spektroskopija. Dobiveni spektar je potvrdio da se metoda može koristiti kao učinkovit dijagnostički alat ove bolesti kao i za utvrđivanje ozbiljnosti same bolesti kod pojedinaca [55].

#### **2.4.5.3. Kronična bolest bubrega**

Kronična bolest bubrega podrazumijeva postepeni gubitak funkcije bubrega. Postoje pet stadije kronične bolesti bubrega, a peti stadij ujedno znači i potpuni prestanak rada bubrega. U tom slučaju potrebno je obaviti transplantaciju ili nadomjestiti bubrežnu funkciju dijalizom. Zbog navedenog poželjno je bolest otkriti u što ranijem stadiju kako bi se što prije krenulo s liječenjem iste. Metabolomski pristup zasnovan na  $^1\text{H-NMR}$  spektroskopije korišten je za analizu serumu pojedinaca oboljelih od kronične bolesti bubrega i zdravih pojedinaca. Upravo ta metoda se pokazala značajnom za razlikovanje zdravih pojedinaca od pojedinaca oboljelih od kronične upale bubrega već u ranoj fazi bolesti. Osim toga na osnovu različite koncentracije endogenih metabolita ovom metodom je moguće razlikovati i bolesnike ovisno u kojoj fazi bolesti se nalaze [56].

#### **2.4.5.4. Celijakija**

Celijakija ili glutenska enteropatija je nasljedni imunološko-posredovani poremećaj kojeg karakterizira trajna nepodnošljivost glutena, bjelančevine prisutne u brojnim žitaricama. Dosta oboljelih osoba nije ni svjesno da ima ovu bolest, a ukoliko se bolest ne liječi može doći do razvoja ozbiljnih i životno ugrožavajućih bolesti. U dijagnozi ove bolesti primijenjen je metabolomski pristup zasnovan na  $^1\text{H-NMR}$  spektroskopiji pomoću kojeg su uspoređivane koncentracije metabolita urina i seruma oboljelih pojedinaca i zdravih pojedinaca. U serumu bolesnika uočene su niže koncentracije nekih aminokiselina, lipida, kolina i piruvata, te veće koncentracije glukoze i 3-hidroksibutirične kiseline. U urinu bolesnika su također uočene promjene u koncentraciji pojedinih metabolita u odnosu na urin zdravih pojedinaca [57].

#### **2.4.5.5. Hepatitis C**

Hepatitis C je zarazna bolest jetre koju uzrokuje virus hepatitisa C (HCV). Do širenja bolesti dolazi kada krv inficirane osobe uđe u tijelo druge osoba (preko kontaminirane igle, transplantaciju organa, transfuzijom krvi...). Zaražena osoba većinom nema nikakvih simptoma, pa se stoga ova bolest često razvije u kronični oblik [58]. Metabolomski pristup zasnovan na <sup>1</sup>H-NMR spektroskopiji korišten je za analizu uzoraka urina pojedinaca oboljelih zaraženih HCV i zdravih pojedinaca. Time se pokazao kao dobra metoda za razlikovanje zaraženih pojedinaca od zdravih, te kao metoda koja bi se mogla koristiti u medicinskoj praksi u bliskoj budućnosti [59].

#### **2.4.5.6. Endometrioz**

Endometrioz je česta kronična upalna bolest pri kojoj tkiva, koja normalno oblažu unutrašnjost maternice, počinju rasti izvan maternice. Najčešća mjesta pogođena endometriozom su jajnici, jajovod, debelo i slijepo crijevo, mokraćni mjehur te vagina [60]. Dijagnosticiranje endometrioze je vrlo izazvno posebno jer metode koje se trenutno koriste su vrlo skupe i invazivne.

Korištenjem protonske NMR spektroskopije uspoređivani su metabolički profili pojedinaca s endometriozom i zdravih pojedinaca. Primjećeno je značajno povećanje koncentracije metabolita, kao što su 2-metoksiestradiol, 2-metoksiestron, androstedion i kolesterol, kod pojedinaca sa endometriozom u odnosu na zdrave pojedince [61]. Ovo saznanje otvara mogućnost metabolomskim metodama zasnovanim na NMR da se u budućnosti koriste kao neinvazivne metode za dijagnozu ove bolesti.

#### **2.4.5.7. Dijabetes (šećerna bolest)**

Dijabetes je stanje poremećaja metabolizma glukoze u organizmu. Uzroci za pojavu ove bolesti mogu biti različiti. U slučaju kada gušterača ne stvara dovoljne količine inzulina, radi se o šećernoj bolesti tip 1. Gušterača može lučiti inzulin, ali u nedovoljnim količinama za sve potrebe organizma ili u stanjima kada stanice mogu samo djelomično koristiti inzulin, iako se on stvara i izlučuje iz gušterače u dovoljnim količinama. Tada se radi o šećernoj bolesti tipa 2 [62].

Pomoću protonske NMR spektroskopije uspoređivani su uzorci urina djece s dijabetesom tipa 1 i uzorci urina zdrave djece. Uzorci su razlikovali u koncentracijama metabolita koji nastaju kao rezultat metabolizma crijevnih mikroorganizama (*p*-krezol sulfat i



fenilacilglicin). To ukazuje na to da se sastav mikrobiote crijeva može povezati s dijabetesom tipa 1 [63].

Protonskom NMR spektroskopijom uspoređivane su koncentracije metabolita u uzorcima plazme, seruma i urina pojedinaca sa šećernom bolesti i zdravih pojedinaca. Rezultati su pokazali da se protonska NMR može koristiti za praćenje nekoliko metabolita koji su izmijenjeni i povezani s metabolizmom glukoze u krvi i ketogenezom u bolesnika sa šećernom bolesti [64].

## **2.5. Nedostatci metabolomskih metoda zasnovanih na NMR**

NMR spektroskopija se pokazala kao odličan dijagnostički alat kod mnogih bolesti zahvaljujući raznim prednostima u odnosu na druge metode. Osim prednosti još uvijek su prisutni i neki nedostaci ove metode. Prije svega su to niska osjetljivost, te potrebno poboljšanje statističke analize podataka. Pomoću NMR spektroskopije mnoge biomarkere bolesti još uvijek nije moguće detektirati, jer detekcija je moguće samo za one koju su najobilniji u ljudskim uzorcima (manje od 100 metabolita u uzorku urina) [4].

Jedan od nedostatak je i to što se još uvijek najviše koristi jednodimenzijaska protonska NMR, koja ima vrlo malu spektralnu širinu. S obzirom da magnetske rezonancije većine metabolita padaju upravo u tom uskom području često dolazi do preklapanja signala što otežava detekciju nepoznatog metabolita. Korištenje dvodimenzijaskih tehnika je ograničeno zbog složenosti u analizi dobivenih podataka kao i zbog njihove veličine [5].

Osobe koje se koriste NMR spektroskopijom moraju biti obučene za korištenje tom opremom, a oprema je jako skupa i zauzima veliki skladišni prostor. Upravo zbog toga se NMR spektrometri ne nalaze u većini bolnica i samim time se ne koriste u kliničkim ispitivanjima.

## **2.6. Budućnost NMR spektroskopije u metabolomici**

Primjena NMR spektroskopije u metabolomici još uvijek je relativno nova tehnologija i nailazi na različita ograničenja. Primarni cilj u bliskoj budućnosti jest daljnji razvoj ove tehnologije.

Prije svega potrebno je povećanje osjetljivosti same metode. Visoka osjetljivost uključuje NMR spektrometre s magnetima ultra visokih polja koji rade na frekvencijama rezonancije  $^1\text{H}$  od 1,2 HHZ i više[14].

Identifikacije specifičnih metabolita i biomarkera bolesti su važne za dijagnozu same bolesti, za razumijevanje patologije bolesti, ali i praćenje tijeka liječenja bolesti tj. djelotvornosti primijenjene terapije liječenja. Dobiveni rezultati gore navedenih istraživanja

potvrđuju da su metabolomičke metode zasnovane na NMR spektroskopiji prilično korisne u tome području i da je njihova primjena u medicini ono čemu se teži u budućnosti. Uspješnost razlikovanja metaboličkog otiska pacijenata od metaboličkog otiska zdravih pojedinaca je prednost ove metode i to je čini značajnom u ovome području. Unatoč tome, biomarkeri mnogih bolesti još uvijek nisu otkriveni i njihovo otkrivanje još uvijek predstavlja veliki izazov. Također na koncentraciju metabolita mogu utjecati različiti čimbenici koji nisu povezani s bolesti, kao što su način života, prehrana, etnička pripadnost, način prikupljanja i skladištenja uzoraka za mjerenje, što može dovesti do krivih rezultata. Kako bi se ovakva tehnologija primijenila u kliničkoj medicini potrebno je imati standardizirane protokole (engl. Standard Operating Protocol, SOP) koji bi optimizirao i dokumentirao sve eksperimentalne uvjete (prikupljanje, skladištenje, pripremu uzoraka kao i parametre NMR spektroskopije) [14]. To bi olakšalo izradu usporedivih i pouzdanih podataka, povećavajući šanse za ponovljive rezultate.

S obzirom da je metabolomičkim metodama zasnovanim na NMR spektroskopiji moguće identificirati samo metabolite koji su najobilniji u uzorcima, poželjna je kombinacija ove metode s drugima više osjetljivim metodama (npr. masena spektroskopija) [14].

Važno je informacije dobivene ovom metodom integrirati zajedno s informacijama koje nam pružaju druge –*omičke* znanosti tj. proteomika, transkriptomika i genomika. Cilj ove integracije jest točnije postavljanje dijagnoza bolesti kao i načina liječenja [4].

U budućnosti se očekuje da će broj baza metabolomičkih podataka porasti, posebno onih koje sadrže eksperimentalne podatke. To će olakšati usporedbu dobivenih rezultata, pristup eksperimentalnim podacima, reanalizu bioinformatičkih informacija, te omogućiti više informacija o novootkrivenim metabolitima. Do danas postoje neke baze metabolomskih podataka kao što su Human Metabolome Database (HMDB), MetaboLights, NMR metabolomics database of Linköping (MDL), The Birmingham Metabolite Library (BML-NMR), Biochemical Pathways Map and Madison-Qingdao Metabolomics Consortium Database (MMCD). One sadržavaju informacije o kemijskim i biološkim svojstvima metabolita, o lokaciji metabolita, te NMR referentne spektre koji olakšavaju predviđanje kemijskog pomaka [4].

### 3. ZAKLJUČCI

Metabolomske metode zasnovane na NMR spektroskopiji su i dalje relativno nove u svim područjima primjene. Zbog svih prednosti koje su navedene, a posebno visoke ponovljivosti, one se sve više koriste u dijagnozi i prognozi bolesti. Većina provedenih studija se oslanja na uspoređivanje metaboličkog otiska uzoraka bolesnika i metaboličkog otiska uzoraka zdravih pojedinaca. Zajedno s kemometrijskim tehnikama smatraju se vrlo moćnom metodom za razlikovanje metaboličkog otiska bolesnika od metaboličkog otiska zdravog pojedinca. Iako se sve više priča o primjeni ovih metoda i njihovom uspjehu, brojni biomarkeri raznih bolesti još uvijek nisu otkriveni, a njihov pronalazak predstavlja i dalje veliki izazov. Pronalazak specifičnih biomarkera je važno, ne samo za dijagnozu i prognozu bolesti, nego i za praćenje odgovora organizma na primijenjeno liječenje tj. za praćenje učinkovitosti lijekova. Pronalazak biomarkera povećava šanse za korištenje ovakvih metoda u kliničkoj medicini. Nedostatak može biti velika varijabilnost koja može nastati kao rezultat vanjskih podražaja koji nisu povezani s bolesti. Stoga je važno provođenje u strogo kontroliranim uvjetima. Potrebno je daljnje proučavanje ovih metoda kako bi se uklonili postojeći nedostaci. Uz sve svoje nedostatke i prednosti, metabolomske metode zasnovane na NMR predstavljaju pristup koji ima potencijal za značajnu primjenu u budućnosti koji će olakšati provedbu raznih istraživanja u kliničkoj medicini.

## 4. LITERATURNI IZVORI

- [1] Nicholson J. K., Wilson I. D. (2003) Understanding 'global' systems biology: metabolomics and the continuum of metabolism. *Nature Reviews Drug Discovery* **2 (8)**: 668-76.
- [2] Clish C. B. (2015) Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine. *Molecular Case Studies* **1 (1)**: a000588.
- [3] Psychogios N., Hau D. D., Peng J., Guo A. C., Mandal R., Bouatra S., Sinelnikov I., Krishnamurthy R., Eisner R., Gautam B., Young N., Xia J., Knox C., Dong E., Huang P., Hollander Z., Pedersen T. L., Smith S. R., Bamforth F., Greiner R., McManus B., Newman J. W., Goodfriend T., Wishart D. S. (2011) The human serum metabolome. *PLoS One* **6**: e16957.
- [4] Emwas A.-H. M., Merzaban J. S., Serrai H. (2015) Applications of NMR Spectroscopy, 1. izd., str. 93-130.
- [5] Burgess K., Rankin N., Weidt S. (2014). Metabolomics. *Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine* : 181–205.
- [6] Putri S. P., Nakayama Y., Matsuda F., Uchikata T., Kobayashi S., Matsubara A., Fukusaki E. (2013) Current metabolomics: Practical applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **115 (6)**: 579–589.
- [7] Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T. A. (1997) *Principles of Instrumental Analysis* Forth Worth, Saunders.
- [8] Zhang B, Powers R. (2012) Analysis of bacterial biofilms using NMR-based metabolomics. *Future Medicinal Chemistry* **4 (10)**: 1273.-306.
- [9] Kinnun J. J., Leftin A., Brown M. F. (2013) Solid-State NMR Spectroscopy for the Physical Chemistry Laboratory. *Journal of Chemical Education* **90 (1)**: 123-8.
- [10] Linenberger K. J, Emwas A.-H., Peat I., Lorigan G. A, Bretz S. L. (2009) Using NMR to determine the structure of a peptide: An inquiry approach for an upper level undergraduate laboratory. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* : 237.
- [11] Shahid S. A., Bardiaux B., Franks W. T., Krabben L., Habeck M., van Rossum B. J., Linke D. (2012) Membrane-protein structure determination by solid-state NMR spectroscopy of microcrystals. *Nature Methods* **9 (12)**: 1212-U119.

- [12] Wilson M. A., Jones A. J., Williamson B. (1978) Nuclear magnetic-resonance spectroscopy of humic materials. *Nature* **276 (5687)**: 487-9.
- [13] Ardenkjær-Larsen J. H., Fridlund B., Gram A., Hansson G., Hansson L., Lerche M. H., Servin R., Thaning M., Golman K. (2003) Increase in signal-to-noise ratio of > 10,000 times in liquid-state NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100 (18)**: 10158-63.
- [14] Markley J. L., Brüschweiler R., Edison A. S., Eghbalnia H. R., Powers R., Raftery D., Wishart D. S. (2017) The future of NMR-based metabolomics. *Current Opinion in Biotechnology* **43**: 34–40.
- [15] Kim H. K., Choi Y. H., Verpoorte R. (2010) NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols* **5 (3)**: 536-49.
- [16] Robertson I. M., Boyko R. F., Sykes B. D. (2011) Visualizing the principal component of H-1,N-15- HSQC NMR spectral changes that reflect protein structural or functional properties: application to troponin C. *Journal of Biomolecular NMR* **51 (1-2)**: 115-22.
- [17] Garrod S., Humpfer E., Spraul M., Connor S., Polley S., Connelly J., Lindon C. J., Nicholson J. K., Holmes E. (1999) High-resolution magic angle spinning 1H NMR spectroscopic studies on intact rat renal cortex and medulla. *Magnetic resonance in medicine* **41 (6)**: 1108-18.
- [18] Griffin J., Walker L., Garrod S., Holmes E., Shore R., Nicholson J. (2000) NMR spectroscopy based metabolomic studies on the comparative biochemistry of the kidney and urine of the bank vole (*Clethrionomys glareolus*), wood mouse (*Apodemus sylvaticus*), white toothed shrew (*Crocidura suaveolens*) and the laboratory rat. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **127 (3)**: 357-67.
- [19] Yang J., Xu G., Zheng Y., Kong H., Pang T., Lv S., Yang Q. (2004) Diagnosis of liver cancer using HPLC-based metabolomics avoiding false-positive result from hepatitis and hepatocirrhosis diseases. *Journal of Chromatography B*. **813 (1-2)**: 59-65.
- [20] Ratai E. M., Pilkenton S., Lentz M. R., Greco J. B., Fuller R. A., Kim J. P., He J., Cheng L. L., Gonzalez R. G. (2005) Comparisons of brain metabolites observed by HRMAS 1H NMR of intact tissue and solution 1H NMR of tissue extracts in SIV-infected macaques. *NMR in Biomedicine* **18 (4)**: 242-51.
- [21] Monleon D., Morales J. M., Gonzalez-Darder J., Talamantes F., Cortes O., Gil-Benso R., López-Ginés C., Cerdá-Nicolás M., Celda B. (2008) Benign and atypical meningioma

metabolic signatures by high-resolution magic-angle spinning molecular profiling. *Journal of proteome research* **7(7)**: 2882-8.

[22] Hetherington H. P., Kim J. H., Pan J. W., Spencer D. D. (2004) H-1 and P-31 spectroscopic imaging of epilepsy: Spectroscopic and histologic correlations. *Epilepsia* **45**: 17-23.

[23] Lauridsen M., Hansen S. H., Jaroszewski J. W., Cornett C. (2007) Human urine as test material in <sup>1</sup>H NMR-based metabonomics: Recommendations for sample preparation and storage. *Analytical Chemistry* **79**: 1181–1186.

[24] Jordan K. W., Cheng L. L. (2007) NMR-based metabolomics approach to target biomarkers for human prostate cancer. *Expert Review of Proteomics* **4 (3)**: 389-400.

[25] Warburg O. (1956) On the origin of cancer cells. *Science*, **123 (3191)**: 309-14.

[26] Carrola J., Rocha C., Barros A. S., Gil A. M., Goodfellow B. J., Carreira I., Bernardo J., Gomes A., Sousa V., Carvalho L., Duarte I. F. (2011) Metabolic signatures of lung cancer in biofluids: NMR-based metabonomics of blood plasma. *Journal of proteome research* **10 (9)**: 4314-24.

[27] Tiziani S., Lopes V., Gunther U. L. (2009) Early Stage Diagnosis of Oral Cancer Using H-1 NMRBased Metabolomics. *Neoplasia* **11 (3)**: 269-U69.

[28] Aboagye E. O., Bhujwalla Z. M., He Q. H., Glickson J. D. (1998) Evaluation of lactate as a H-1 nuclear magnetic resonance spectroscopy index for noninvasive prediction and early detection of tumor response to radiation therapy in EMT6 tumors. *Radiation Research* **150 (1)**: 38-42.

[29] Odunsi K., Wollman R. M., Ambrosone C. B., Hutson A., McCann S. E., Tammela J., Geisler J. P., Miller G., Sellers T. , Cliby W. , Qian F. , Keitz B., Intengan M., Lele S., Alderfer J. L. (2005) Detection of epithelial ovarian cancer using <sup>1</sup>H-NMR-based metabonomics. *International journal of cancer* **113 (5)**: 782-8.

[30] Garcia E. Andrews C., Hua J., Kim H. L., Sukumaran D. K., Szyperski T., Odunsi K.(2011) Diagnosis of early stage ovaria cacer by <sup>1</sup>H NMR metabonomics of serum explored by use of a microflow NME probe. *Journal of Proteome Research* **10**: 1765-1771.

[31] Carrola J., Rocha C., Barros A. S., Gil A. M., Goodfellow B. J., Carreira I., Bernardo J., Gomes A., Sousa V., Carvalho L., Duarte I. F.. (2011) Metabolic signatures of lung cancer in biofluids: NMR-based metabonomics of urine. *Journal of proteome research* **10**: 221-30.

- [32] Oakman C., Tenori L., Claudino W., Cappadona S., Nepi S., Battaglia A. Bernini P., Zafarana E., Saccenti E., Fornier M., Morris P. G., Biganzoli L., Luchinat C., Bertini I., Di Leo A. (2011) Identification of a serum-detectable metabolomic fingerprint potentially correlated with the presence of micrometastatic disease in early breast cancer patients at varying risks of disease relapse by traditional prognostic methods. *Annals of Oncology* **22 (6)**: 1295-301.
- [33] Bezabeh T., Somorjai R., Dolenko B., Bryskina N., Levin B., Bernstein C., Jeyarajah E., Steinhart A. H., Rubin D. T. (2009) Detecting colorectal cancer by <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopy of fecal extracts. *NMR in Biomedicine* **22 (6)**: 593-600.
- [34] Rivera C. (2015) Essentials of oral cancer. *International journal of clinical and experimental pathology* **8 (9)**: 11884–11894.
- [35] Lin A., Ross B. D., Harris K., Wong W. (2005). Efficacy of proton magnetic resonance spectroscopy in neurological diagnosis and neurotherapeutic decision making. *NeuroRX* **2 (2)**: 197–214.
- [36] <<https://www.sddh.hr/distrofija-oblici-bolesti-detaljno/amiotroficna-lateralna-skleroza-als>> Pristupljeno 15. Svibnja 2019.
- [37] Gabrielson E., Berg K., Anbazhagan R. (2001) Functional genomics, gene arrays, and the future of pathology. *Modern pathology* **14 (12)**: 1294-9.
- [38] <<https://ghr.nlm.nih.gov/condition/huntington-disease>> Pristupljeno 15.svibnja 2019.
- [39] Jenkins B., Rosas H., Chen Y. C. I., Makabe T., Myers R., MacDonald M., Rosen B. R., Beal M. F., Koroshetz W. J. (1998) <sup>1</sup>H NMR spectroscopy studies of Huntington's disease Correlations with CAG repeat numbers. *Neurology* **50 (5)**: 1357-65.
- [40] Ochiishi T., Shimura H., Sharon R., Hattori N., Langston J. W., Mizuno Y., Hyman B. T., Selkoe D. J., Kosik K. S. (2002) Parkin localizes to the Lewy bodies of Parkinson disease and dementia with Lewy bodies. *The American journal of pathology* **160 (5)**: 1655-67.
- [41] Ahmed S. S., Santosh W., Kumar S., Christlet H. T. (2009) Metabolic profiling of Parkinson's disease: evidence of biomarker from gene expression analysis and rapid neural network detection. *Journal of Biomedical Science* **16 (63)**: 1-12.
- [42] <<https://www.zzjzdnz.hr/hr/zdravlje/zdravlje-starijih-osoba/198>> Pristupljeno 16. svibnja 2019.
- [43] Kork F., Holthues J., Hellweg R., Jankowski V., Tepel M., Öhring R., Heuser I., Bierbrauer J., Peters O., Schlattmann P., Zidek W., Jankowski J. (2009) A Possible New

Diagnostic Biomarker in Early Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research* **6(6)**: 519-24.

[44] <<https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/31178/Kako-prepoznati-shizofreniju.html>> Pristupljeno 16. svibnja 2019.

[45] Holmes E., Tsang T. M., Jeffrey T. J. H., Leweke F. M., Koethe D., Gerth C. W., Nolden B. M., Gross S., Schreiber D., Nicholson J. K., Bahn S. (2006) Metabolic profiling of CSF: evidence that early intervention may impact on disease progression and outcome in schizophrenia. *PLoS medicine* **3 (8)**: e327.

[46] Sinclair A. J., Viant M. R., Ball A. K., Burdon M. A., Walker E. A., Stewart P. M., Rauz S., Young S. P. (2010) NMR-based metabolomic analysis of cerebrospinal fluid and serum in neurological diseases-a diagnostic tool. *NMR in Biomedicine* **23 (2)**: 123-32.

[47] <<https://www.medicalnewstoday.com/articles/248423.php>> Pristupljeno 19. svibnja 2019.

[48] <<http://wwwi.vef.hr/org/kirurgija/wp-content/uploads/2014/12/23.-Bolesti-mre%C5%BEicestaklastog-tijelao%C4%8Dnog-%C5%BEivca-i-orbite.pdf>> Pristupljeno 19. Svibnja 2019.

[49] Young S. P., Nessim M., Falciani F., Trevino V., Banerjee S. P., Scott R. A. H., Murray P. I., Wallace G. R. (2009) Metabolomic analysis of human vitreous humor differentiates ocular inflammatory disease. *Molecular vision* **15**: 1210-7.

[50] Wijmenga C. (2005) Expressing the Differences between Crohn Disease and Ulcerative Colitis. *PLoS Medicine* **2 (8)**: e230.

[51] <<https://www.krenizdravo.rtl.hr/zdravlje/bolesti-zdravlje/upalna-bolest-crijeva-uzroci-simptomi-i-lijecenje>> Pristupljeno 27. svibnja 2019.

[52] Schicho R., Shaykhutdinov R., Ngo J., Nazyrova A., Schneider C., Panaccione R., Kaplan G. G., Vogel H. J., Storr M. (2012) Quantitative Metabolomic Profiling of Serum, Plasma, and Urine by 1H NMR Spectroscopy Discriminates between Patients with Inflammatory Bowel Disease and Healthy Individuals. *Journal of proteome research* **11 (6)**: 3344-57.

[53] Marchesi J. R., Holmes E., Khan F., Kochhar S., Scanlan P., Shanahan F., Wilson I. D., Wang Y. (2007) Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. *Journal of proteome research* **6 (2)**: 546-51.



- [54] Lehnert W., Hunkler D. (1986) Possibilities of selective screening for inborn errors of metabolism using high-resolution  $^1\text{H}$ -FT-NMR spectrometry. *European journal of pediatrics* **145 (4)**: 260-6.
- [55] Brindle J. T., Antti H., Holmes E., Tranter G., Nicholson J. K., Bethell H. W. L., Bethell H. W. L., Clarke S., Schofield P. M., McKilligin E., Mosedale D. E., Grainger D. J. (2002) Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using  $^1\text{H}$ NMR- based metabonomics. *Nature Medicine* **8 (12)**: 1439-45.
- [56] Qi S., Ouyang X., Wang L., Peng W., Wen J., Dai Y. (2012) A Pilot Metabolic Profiling Study in Serum of Patients with Chronic Kidney Disease Based on  $^1\text{H}$ -NMR-Spectroscopy. *Clinical and Translational Science* **5 (5)**: 379-85.
- [57] Bertini I., Calabrò A., De Carli V., Luchinat C., Nepi S., Porfirio B., Renzi D., Saccenti E., Tenori L. (2008) The metabonomic signature of celiac disease. *Journal of proteome research* **8 (1)**: 170-7.
- [58] Lauer G. M., Walker B. D. (2001) Medical progress: hepatitis C virus infection. *The New England Journal of Medicine* **345**: 41-52.
- [59] Godoy M., Lopes E., Silva R., Hallwass F., Koury L., Moura I.M., Simas A. M. (2010) Hepatitis C virus infection diagnosis using metabonomics. *Journal of viral hepatitis* **17 (12)**: 854-8.
- [60] Giudice L. C., Kao L. C. (2004) Endometriosis. *The Lancet* **364**: 1789–1799.
- [61] Ghazi N., Arjmand M., Akbari Z., Mellati A. O., Saheb-Kashaf H., Zamani Z. (2016)  $^1\text{H}$  NMR- based metabolomics approaches as non- invasive tools for diagnosis of endometriosis. *International Journal of Reproductive BioMedicine* **14 (1)**: 1-8.
- [62] <[https://care.diabetesjournals.org/content/33/Supplement\\_1/S62.full](https://care.diabetesjournals.org/content/33/Supplement_1/S62.full)> Pristupljeno 29. svibnja 2019.
- [63] Culeddu N., Chesaa M., Porcu M. C., Fresu P., Tonolo G., Virgilio G., Migaletto V. (2012) NMR metabolomics study of type 1 diabetes. *Metabolomics* : 1162-1169.
- [64] Nicholson J. K., O'Flynn M. P., Sadler P. J., Macleod A. F., Juul S.M., Sonksen P. H. (1984) Proton-nuclear-magnetic-resonance studies of serum, plasma and urine fasting normal and diabetic subjects. *Biochemical Journal* **217**: 365-375.

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

Martina Mihajević

ime i prezime studenta