

Primjena spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije u metabolomičkim istraživanjima

Paradžik, Katarina

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:156273>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

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



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Prijediplomski studij Biotehnologija**

**Katarina Paradžik
0058217638**

**PRIMJENA SPEKTROSKOPIJE NUKLEARNE
MAGNETSKE REZONANCIJE U
METABOLOMIČKIM ISTRAŽIVANJIMA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Instrumentalna analiza

Mentor: prof. dr. sc. Lidija Barišić

Zagreb, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Prijediplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Primjena spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije u metabolomičkim istraživanjima
Katarina Paradžik, 0058217638

Sažetak:

Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR), metoda koja se zasniva na magnetskim svojstvima jezgara s neparnim atomskim brojem, ima sve veću primjenu u analizi sastava bioloških uzoraka poput urina i krvi. Metabolomika se bavi biokemijskom karakterizacijom metaboloma i njegovih promjena uzrokovanih upotrebom lijekova te genetičkim, nutritivnim i okolišnim faktorima. Promjene u sastavu metabolita indikator su općeg stanja organizma te je identifikacija i kvantifikacija metabolita ključna za predviđanje bolesti, praćenje učinkovitosti terapije te istraživanje utjecaja okolišnih uvjeta na organizam. Visoka reproducibilnost, mogućnost kvantitativne analize te neinvazivnost čine NMR pogodnom metodom za određivanje sastava metaboloma.

Ključne riječi: metabolomika, NMR, MS, izotopi

Rad sadrži: 25 stranica, 8 slika, 1 tablicu, 28 literaturnih navoda, 0 priloga

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: prof. dr. sc. Lidija Barišić

Komentor: /

Pomoć pri izradi: /

Datum obrane:

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University Undergraduate Study Biotechnology

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Organic Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy in metabolomic research

Katarina Paradžik, 0058217638

Abstract:

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy, a method based on the magnetic properties of odd-atomic-number nuclei, is increasingly being used to analyse the composition of biological samples such as urine and blood. Metabolomics involves the biochemical characterization of the metabolome and its changes caused by drug usage, genetic, nutritional, and environmental factors. Changes in metabolite composition are indicative of the overall health of an organism, and identification and quantification of metabolites is critical for predicting disease, monitoring the effectiveness of therapy, and studying the effects of environmental conditions on the body. High reproducibility, the ability to perform quantitative analysis and a non-invasive approach make NMR a suitable method for determining the composition of the metabolome.

Keywords: metabolomics, NMR, MS, isotopes

Thesis contains: 25 pages, 8 figures, 1 table, 28 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: prof. dr. sc. Lidija Barišić

Co-mentor: /

Technical support and assistance: /

Sadržaj

1.UVOD	1
2.TEORIJSKI DIO.....	2
2.1..SPEKTROSKOPIJA NUKLEARNE MAGNETSKE REZONANCIJE	2
2.2..METABOLOMIKA.....	2
2.3..BIOLOŠKI UZORCI	6
2.4..PREDNOSTI PRIMJENE NMR SPEKTROSKOPIJE	8
2.5..1D NMR	10
2.6..2D NMR SPEKTROKOPIJA.....	13
2.7..OBILJEŽAVANJE IZOTOPIMA	14
2.7.1. <i>IN VIVO</i> OBILJEŽAVANJE	14
2.7.2. <i>EX VIVO</i> OBILJEŽAVANJE	16
2.8..USPOREDBA NMR I MS	17
2.9..KEMOMETRIJSKA I KVANTITATIVNA ANALIZA.....	20
2.10..KOMBINIRANI PRISTUP ZA DETEKCIJU METABOLITA.....	21
3.ZAKLJUČAK	22
4.POPIS LITERATURE	23

1. UVOD

Metabolom predstavlja skup metabolita (tvari koji se metaboličkim procesima stvaraju u organizmu) u biološkom uzorku, a raznovrsnost i brojnost metabolita u biološkim uzorcima (lipidi, ugljikohidrati, aminokiseline, steroidi) otežava izbor odgovarajuće metode za njihovu analizu. Metabolomika proučava metaboličko stanje određenog organizma pomoću identifikacije i kvantifikacije njegovih metabolita u stanicama ili biološkim tekućinama poput krvi i urina (Europska agencija za sigurnost hrane, 2023). Analitičke metode koje se u tu svrhu najčešće koriste su spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR) i masena spektrometrija (MS).

Iako NMR ima manju osjetljivost u odnosu na MS, njegova svojstva visoke reproducibilnosti, mogućnost kvantitativne analize kao i neinvazivnosti čine NMR pogodnom metodom za upotrebu u metabolomičkim istraživanjima s ciljem prevencije i dijagnoze bolesti. Novije NMR metode koje poboljšavaju selektivnost, osjetljivost i rezoluciju bit će opisane u ovom radu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije

Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR) metoda je koja se zasniva na magnetskim svojstvima jezgara s neparnim atomskim brojem. Takve jezgre vrtnjom oko svoje osi (nuklearni spin) generiraju magnetsko polje koje se nakon izlaganja djelovanju vanjskog magnetskog polja orijentira u njegovom smjeru (stabilnije stanje α -spina) ili suprotno u odnosu na smjer vanjskog magnetskog polja (nestabilnije stanje β -spina). Kada se jezgra koja je u stanju α -spina, izloži radio-zračenju čija je frekvencija jednaka energetskej razlici između α - i β -spina, dolazi do izvrtanja jezgre iz α - u β -spin nakon čega slijedi relaksacija i ponovno usmjeravanje jezgre u smjeru djelovanja vanjskog magnetskog polja. Opisana pojava naziva se rezonancijom. Pri tome se emitira elektromagnetski signal koji se bilježi detektorom u NMR-spektrofotometru. Elektroni svojim gibanjem induciraju mala lokalna magnetska polja orijentirana suprotno u odnosu na smjer vanjskog magnetskog polja čime zasjenjuju jezgru odnosno zaklanjaju je od djelovanja vanjskog polja. Zbog toga su protoni u različitom kemijskom (elektronskom) okruženju različito zaklonjeni odnosno rezoniraju pri različitim jakostima polja i imaju različite kemijske pomake (Barišić, 2021.)

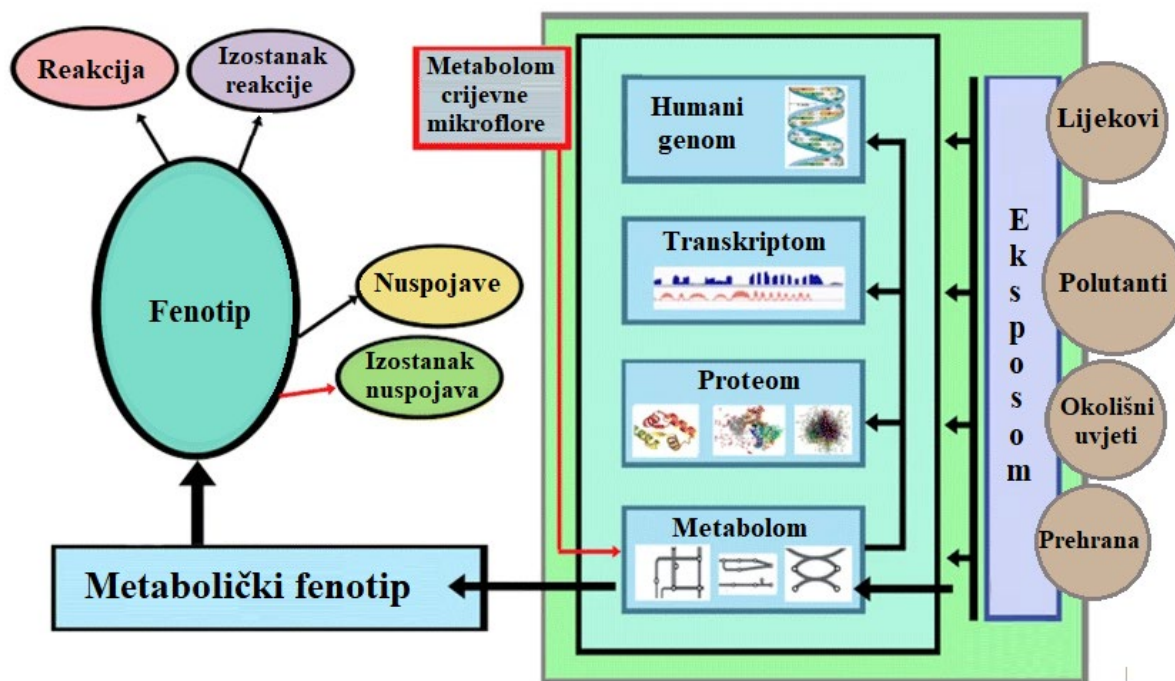
NMR spektroskopija se u metabolomičkim istraživanjima često koristi samostalno, bez potrebe za separacijskim tehnikama te daje rezultate sukladne onima dobivenim masenom spektrometrijom. Signali u NMR spektru pripisuju se specifičnim metabolitima, a njihova visina proporcionalna je broju molekula koje mu doprinose, pa NMR paralelno omogućuje identifikaciju i kvantifikaciju različitih metabolita u uzorku.

2.2. Metabolomika

Cilj metabolomike je biokemijska karakterizacija metaboloma kao i njegovih promjena uzrokovanih upotrebom lijekova te genetičkim, nutritivnim i okolišnim faktorima koji se zajednički nazivaju izloženost (eng. *exposome*). Taj pojam obuhvaća sve fizikalne, kemijske, biološke i socijalne čimbenike okoliša, kojima je čovjek izložen tijekom života i na koje prilagođava odgovarajućim fenotipom (Sertić, 2021.)

U interakciji nasljednih i stečenih osobina sa stalno promjenjivom izloženošću vanjskim čimbenicima mijenja se metabolički fenotip (izgled nekog organizma kao rezultat međudjelovanja između genotipa i okoline (Hrvatska enciklopedija, 2021). Budući da metaboličko stanje organizma izravno korelira s općim zdravljem osobe, metabolomikom se može dobiti uvid u stanje organizma, te kroz farmakometabolomiku koja analizira metabolički

fenotip osobe na temelju utjecaja gena, okoline i crijevne mikroflore predviđati reakcija na terapijsku intervenciju i eventualne nuspojave (Slika 1). Danas se kroz farmakometabolomičke alate dobiva uvid u odgovore organizma na farmakoterapiju često propisivanim lijekovima kao što su antipsihotici i antidepresivi, antihipertenzivi i statini (Beger i sur., 2016).



Slika 1. Shematski prikaz faktora koji utječu na metabolički fenotip (preuzeto i prilagođeno iz Beger i sur., 2016).

Ideja da su promjene u tkivima i biološkim tekućinama indikator poremećaja u organizmu razvila se još u antičkoj Grčkoj pojavom grafikona koji su povezivali boju, miris i okus urina sa karakterističnim bolestima. Upravo prisutnost različitih metabolita uzrok je promjena navedenih svojstava (Nicholson i sur., 2018).

Metabolomička istraživanja pridonijela su boljem poznavanju bioloških procesa čije razumijevanje je nužno za unaprjeđenje metoda usmjerenih na poboljšanje ljudskog zdravlja. Značajna je primjena u istraživanju interakcija između lijekova u svrhu određivanja njihove optimalne kombinacije ili otkrivanja utjecaja ciljanog lijeka na metaboličke puteve. Campos i Zampieri (2019.) profilirali su metabolički odgovor mutiranih sojeva *Escherichie coli* na 1279 različitih vrsta lijekova. Usporedbom metabolomičkih profila sojeva mutanata sa delecijom određenog gena i sojeva tretiranih ciljanim lijekom pronađene su značajne sličnosti koje ukazuju na inhibiciju funkcije gena uzrokovanu primjenom lijeka. Takva asocijacija uočena je

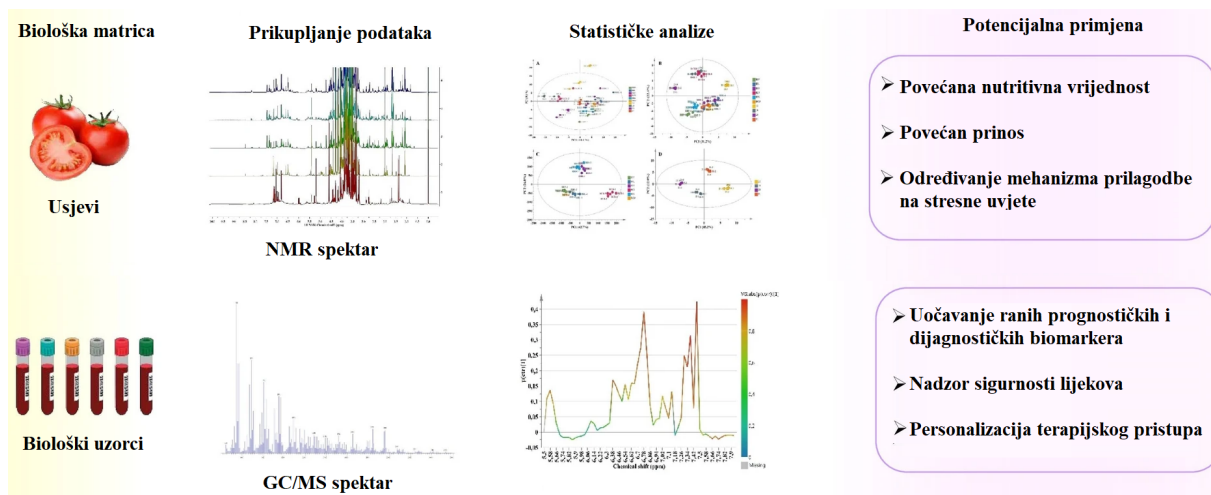
kod disulframa, lijeka koji se koristi za liječenje alkoholizma inhibicijom enzima acetaldehid-dehidrogenaze. Metaboličke promjene uzrokovane disulframom pokazale su najveću sličnost onima u soju s delecijom gena za izocitrat-dehidrogenazu (Δicd). *In vitro* testiranjima disulframa kao izravnog inhibitora izocitrat-dehidrogenaze otkriven je blagi inhibitorski učinak (25%) što ukazuje na prisutnost drugih mehanizama inhibicije.

Iako se klasična istraživanja fokusiraju na antibiotike, molekule poput antifungicida pentamidina međusobnim djelovanjem s antibioticima također mogu pokazivati antimikrobna svojstva. U kombinaciji s antibioticima uskog spektra usmjerenog na gram-pozitivne bakterije, pentamidin pokazao je sinergijski učinak te je *in vitro* antimikrobni učinak kombiniranog agensa antibiotik/pentamidin proširen na gram-negativne patogene (Stokes i sur., 2017).

Jedna od najčešćih primjena metabolomičkih istraživanja u dijagnozi i liječenju bolesti jest identifikacija biomarkera koji pomažu u detekciji bolesti poput raka te nadziranje učinkovitosti tretmana koji se primjenjuje. Biomarkeri mogu biti prediktivni, dijagnostički i prognostički. Prediktivni biomarkeri predviđaju rizik od razvoja raka, dijagnostički indiciraju ranu fazu oboljenja, dok prognostički pokazuju rizik od napredovanja bolesti ili prognoziraju moguću reakciju organizma na primijenjenu terapiju (Chang i Ladame, 2020).

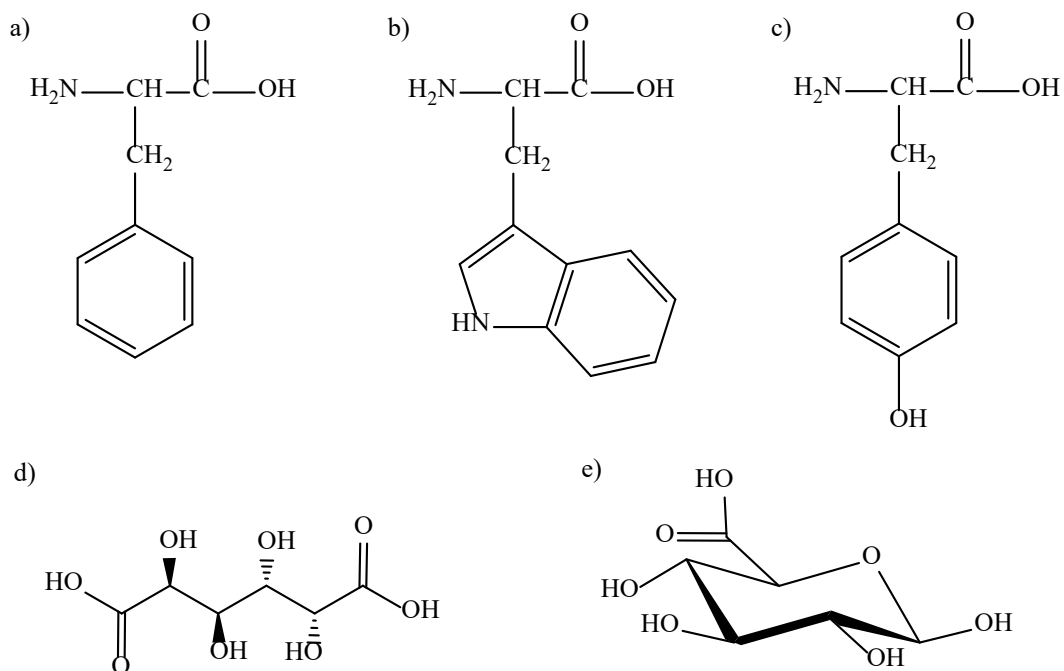
Dokazano je da su metaboličke karakteristike uzrok individualnih razlika u nutritivnim potrebama te različitih odgovora organizma na lijekove i prehranu (O'Donovan i sur., 2015), a metabolomika je koristan alat u definiranju metaboličkih fenotipova koji se mogu koristiti za prilagođavanje personaliziranog pristupa u nutritivnim preporukama (eng. *personalized nutrition*) i personaliziranoj terapiji (eng. *personalized medicine*) koji će omogućiti optimalni učinak na organizam pojedinca (Tebani i Bekri, 2019). Velik broj studija proveden je s ciljem otkrivanja utjecaja polutanata kao što su teški metali, mikroplastika i pesticidi na metaboličke puteve te identificiranje biomarkera koji pokazuju izloženost polutantima a metabolomika se u kombinaciji s drugim tehnikama pokazala korisnom u toksikološkoj evaluaciji polutanata (Liu i sur., 2022).

Osim u nadzoru sigurnosti lijekova te detekciji biomarkera različitih bolesti, metabolomika se u biologiji koristi za proučavanje metaboličkih profila različitih usjeva za prehranu ljudi i životinja te biljaka korištenih u medicinske svrhe, a s ciljem povećanja prinosa i nutritivne vrijednosti biljaka (Slika 2.) Statističkom analizom podataka dobivenih rezultatima spregnute metode GC/MS (eng. *Gas Chromatography–Mass Spectrometry*) i NMR spektroskopije mogu se karakterizirati biokemijske razlike istih biljnih vrsta uzgojenih u različitim ekosustavima te razlike između divljih i kultiviranih ili transgenih biljaka (Marchev i sur., 2021).



Slika 2. Ključni koraci i tijek postupaka u metabolomičkoj analizi te potencijalni ishodi analize (preuzeto i prilagođeno iz Marchev i sur., 2021).

Dobiveni podaci ključni su u kontroli kvalitete i određivanju biološke aktivnosti biljaka s ljekovitim djelovanjem te su koristan alat za određivanje perioda žetve koji omogućuje optimalan prinos. Velik broj biljkama svojstvenih metabolita ima važnu ulogu u prinosu usjeva te nutritivnoj vrijednosti konačnog proizvoda. Zbog toga metabolomika analizira utjecaj tolerancije na abiotičke stresove poput suše i visokog saliniteta, rezistencije na patogene te metaboličkog inženjerstva na rast i razvoj biljke koji definiraju sintezu metabolita. Ovaj tip istraživanja pojašnjava vezu između biljke i njezinog okoliša s ciljem otkrivanja učinka identificiranog metabolita na adaptaciju biljke. S obzirom na to da biotički i abiotički stresovi značajno smanjuju produktivnost i prinos usjeva, jasne su prednosti u otkrivanju mehanizama koje biljke koriste za adaptaciju. GC/MS profiliranjem transgene riže soja *Oryza sativa* L. utvrđeno je da je povišena količina disaharaida trehaloze u listovima biljke odgovorna za povećanu toleranciju usjeva na sušu i salinitet, dok je istom metodom kod ječma soja *Hordeum vulgare* L. utvrđena povećana tolerancija na salinitet zbog prisutnosti aminokiselina (fenilalanina, triptofana i tirozina) te galaktarne i glukuronske kiseline (Slika 3). Lignin, celuloza i hemiceluloza u riži kvantificirani su NMR analizom za koju nije potreban kemijski ili enzimski predtretman uzorka te je u mutiranom soju utvrđena pojačana biosinteza celuloze i ksilana (Marchev i sur., 2021).



Slika 3. Molekulske strukture a) fenilalanina, b) tirozina, c) triptofana, d) galaktarne i e) glukuronske kiseline.

2.3. Biološki uzorci

Predmet analize mogu biti lako dostupni biološki uzorci poput urina, krvi i fecesa ili se mogu analizirati tkiva, organi i stanice. Prikupljanje i skladištenje uzoraka ključni su koraci pri kojima je nužno pratiti stroge procedure kako bi se spriječila degradacija metabolita te interferencija s mjernim instrumentima. Usporedbom krvne plazme i seruma zaključeno je da su obje matrice prikladne za metabolomička istraživanja uz nekoliko naglašenih razlika. Metabolomička analiza seruma omogućuje veću osjetljivost zbog izostanka većih čestica, ali zbog dužeg vremena procesiranja dolazi do varijacija u rezultatima uslijed enzimskih procesa konverzije i degradacije kojima se mijenja sastav metabolita. Reproducibilnost rezultata također je niža zato što pri sakupljanju i procesiranju uzorka može doći do hemolize i tvorbe slobodnog hemoglobina koji utječe na metabolički profil uzorka. Krvna plazma omogućuje veću reproducibilnost zbog izostanka zgrušavanja, a manja količina proteina u uzroku te nedostatak trombocita korisni su kod analize manjih molekula zbog smanjene kompeticije. Izbor antikoagulansa za krvnu plazmu pokazao se ključnim pa je tako za NMR analizu preporučljivo koristiti heparin jer ostali stabilizatori, poput etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) i citrata, daju dodatne signale u NMR spektru.

Ako se radi s uzorcima fecesa koji se prikupljaju prije kolonoskopije treba obratiti

pozornost na prikupljanje uzorka prije nego što pacijent krene s uzimanjem pripravaka za pripremu za pregled jer ih većina sadrži polietilen-glikol koji uzrokuje jake interferirajuće signale u ^1H NMR spektru (Smith i sur., 2020).

Za analizu urina nije potrebna prethodna obrada uzorka zbog odsutnosti makromolekula, ali je važno napomenuti da pH vrijednost normalnog ljudskog urina značajno varira u rasponu 5–8. Položaj signala u NMR spektru može ovisiti o pH vrijednosti; u kiselim uvjetima funkcijske će skupine biti protonirane što će utjecati na njihov kemijski pomak u NMR spektru. Zbog toga položaji signala u NMR spektrima uzorka urina mogu varirati ovisno o pH vrijednosti uzorka pa se urin obično miješa s otopinom fosfatnog pufera u deuteriranoj vodi u omjeru 1:1 (v/v) (Nagana Gowda i Raftery, 2021).

Kod analize tkiva bitno je osigurati homogenost uzorkovanja tako što će se prikupljanje uzoraka obavljati sa istog područja kako bi se izbjegla pristranost zbog biološke varijabilnosti. Također je poželjno da uzorke tijekom eksperimenta prikuplja ista osoba kako bi se smanjila varijabilnost. Uzorke je nakon prikupljanja moguće isprati hladnom deioniziranom vodom ili fosfatno puferiranom fiziološkom otopinom da bi se spriječila kontaminacija metabolitima iz krvi. Dodatni signali također se mogu javiti zbog anestetika koji se koristi tijekom eksperimenta ili zbog otopina korištenih za čišćenje kirurških instrumenata, primjerice etanola zato što se signali metilne, metilenske i hidroksilne skupine u ^1H NMR spektrima prekrivaju sa signalima endogenih metabolita (Smith i sur., 2020). Glavna prednost korištenja tkiva za analizu ogleda se u činjenici da su biomarkeri bolesti prisutni u visokoj koncentraciji u tkivu zbog bliske povezanosti s patološkim izvorima poput tumora. Biomarkeri identificirani u tkivu mogu pomoći kod detekcije biomarkera u lako dostupnim biološkim tekućinama kao što su krv i urin koje se mogu prikupiti neinvazivnim metodama (Nagana Gowda i Raftery, 2021).

Metabolomičke analize kultiviranih stanica provedene su na širokom rasponu broja stanica, od 10^4 do 4×10^7 . Ovisno o stanicama i tehnologiji koja se koristi za njihovu obradu broj se mora optimizirati kako bi se dobio signal u NMR i/ili MS spektru, i to tako da se i dalje mogu detektirati metaboliti prisutni u niskoj koncentraciji koji imaju važnu biološku ulogu. Bitno je prilagoditi i sastav medija za kultivaciju tako da ne sadrži interferirajuće anione poput Cl^- , SO_4^{2-} i PO_4^- te anione organskih kiselina i aminokiselina jer mogu uzrokovati dodatne signale u ^1H NMR spektrima. Prije NMR spektroskopije stanica uzgojenih u mediju koji sadrži HEPES pufer ((4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etansulfonska kiselina) potrebno je stanice potpuno izdvojiti iz medija kako bi se uklonile sve ekstracelularne komponente koje mogu uzrokovati široke interferirajuće signale. Još jedna ključna točka za smanjenje varijabilnosti i poboljšanje

kvalitete uzoraka je zaustavljanje metaboličkih procesa u stanicama prije ekstrakcije. Ovaj postupak ima za cilj zaustaviti stanični metabolizam kako bi se spriječila promjena metabolita te njihova koncentracija zadržala na fiziološkoj razini. Postupak bi trebao odmah zaustaviti sve stanične enzimske aktivnosti i promjene koncentracije metabolita bez mijenjanja staničnog okruženja jer su metaboliti vrlo osjetljivi promjene u okolini (Smith i sur., 2020).

2.4. Prednosti primjene NMR spektroskopije

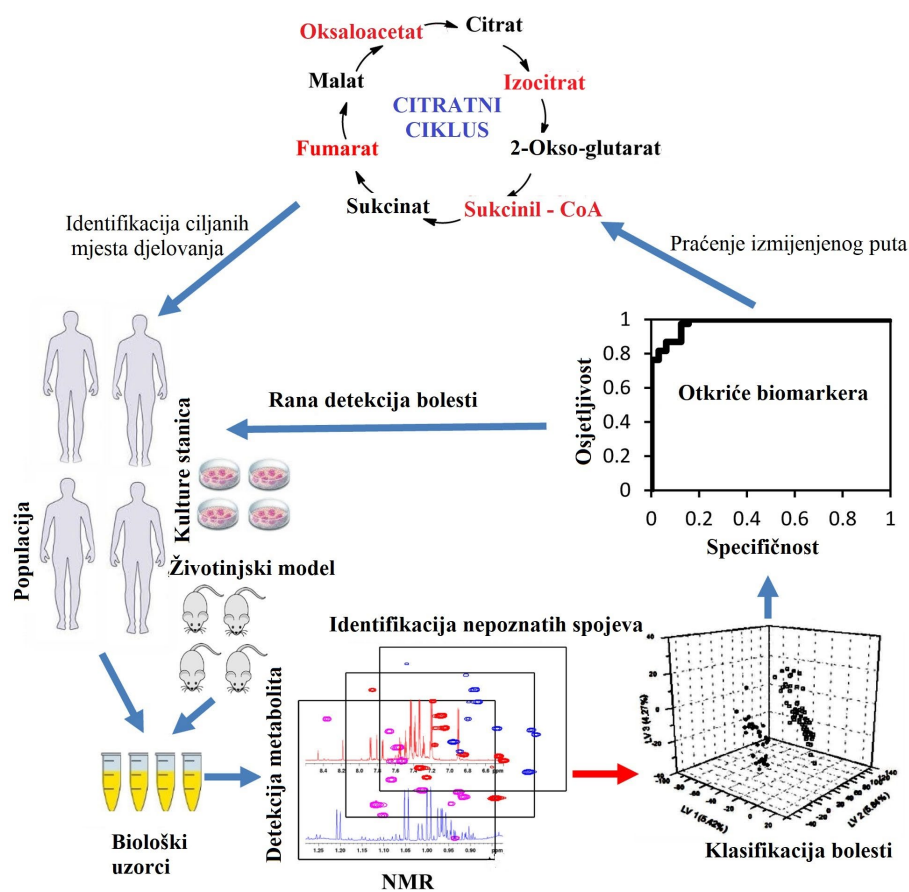
Primjena NMR spektroskopije u metabolomičkim istraživanjima ima nekoliko prednosti. Jedna od njih je sposobnost analize uzoraka bez potrebe za predobradom. Uzorci urina i krvnog seruma ili plazme najčešće su korišteni biološki uzorci zato što se mogu prikupiti neinvazivnim metodama te obiluju biomarkerima bolesti. NMR spektroskopija omogućuje analizu metabolita u uzorcima bez potrebe za destruktivnom obradom pa se uzorci mogu analizirati bez promjene njihove strukture čime se omogućuje ponovljiva analiza. Uzorak ostaje nepromijenjen nakon analize i može se ponovno koristiti za daljnju analizu NMR-om u ili drugim metodama kao što je masena spektrometrija. Ovo je povoljno kod analize osjetljivih metabolita poput glutamina i koenzima koji su osjetljivi na napon ionizacije koji se koristi u analizi MS-om.

Spektroskopija NMR također pruža visoku rezoluciju, što omogućuje razlučivanje bliskih signala i identifikaciju različitih spojeva. Ovo je posebno značajno u složenim smjesama metabolita gdje se mogu pojaviti preklapajući signali.

Prednost je i mogućnost kvantitativne analize metabolita. Intenzitet signala može biti proporcionalan koncentraciji metabolita što omogućuje dobivanje kvantitativnih podataka o metabolitima. NMR spektroskopija odlikuje se širokim spektrom detekcije pa može detektirati različite vrste metabolita, uključujući male organske molekule, aminokiseline, šećere, lipide i nukleotide. Napretkom analitičkih tehnologija omogućeno je otkrivanje sve većeg broja signala u složenim biološkim uzorcima, a mnogi od njih nisu prethodno asignirani pa je širok spektar detekcije neophodan za relevantne rezultate analize. NMR spektroskopija također pruža informacije o kemijskoj strukturi metabolita. Kemijski pomaci, njihovo cijepanje i konstante sprege također se koriste za određivanje strukture i identifikaciju metabolita. Visoka reproducibilnost tehnike omogućuje usporedivost rezultata između različitih laboratorija i eksperimenata. NMR omogućuje i praćenje metaboličkih putova i mjerenje metaboličkih tokova uz pomoć različitih stabilnim izotopima obilježenih prekursora a ima i sposobnost detekcije metabolita putem različitih atomskih jezgara, poput ^1H , ^{13}C , ^{31}P ili ^{15}N .

Na slici 3. prikazan je shematski dijagram koji označava općeniti postupak uključen u

metabolomiku temeljenu na NMR. Prikazani su biološki uzorci poput krvne plazme i seruma, urina i tkiva ljudi, životinjskih modela ili stanica koji se koriste za metabolomička istraživanja. Važni koraci u ovom postupku uključuju detekciju signala metabolita, identifikaciju metabolita korištenjem kombinacije 1D i 2D NMR metoda, pretraživanje baza podataka, te na kraju kvantifikaciju identificiranih metabolita koristeći jedan unutrašnji standard. Određene koncentracije metabolita zatim se koriste za razlikovanje oboljelih od zdravih kontrolnih skupina; što se obično provodi na temelju univarijatne ili multivarijatne statističke analize, razvijanja i provjere valjanosti klasifikacijskih modela te testiranja osjetljivosti i specifičnosti modela na temelju površine ispod ROC-krivulje (eng. *Receiver Operating Characteristic*). Dobivene koncentracije metabolita koriste se za identifikaciju izmijenjenih metaboličkih puteva, što pomaže u razumijevanju funkcije stanica, uključujući informacije o metama lijekova za terapijski razvoj i mogućnostima za sprječavanje ili liječenje bolesti (Nagana Gowda i Raftery, 2021).



Slika 4. Tijek metabolomske analize temeljene na spektroskopiji NMR (preuzeto i prilagođeno iz Nagana Gowda i Raftery, 2021).

2.5.1D NMR

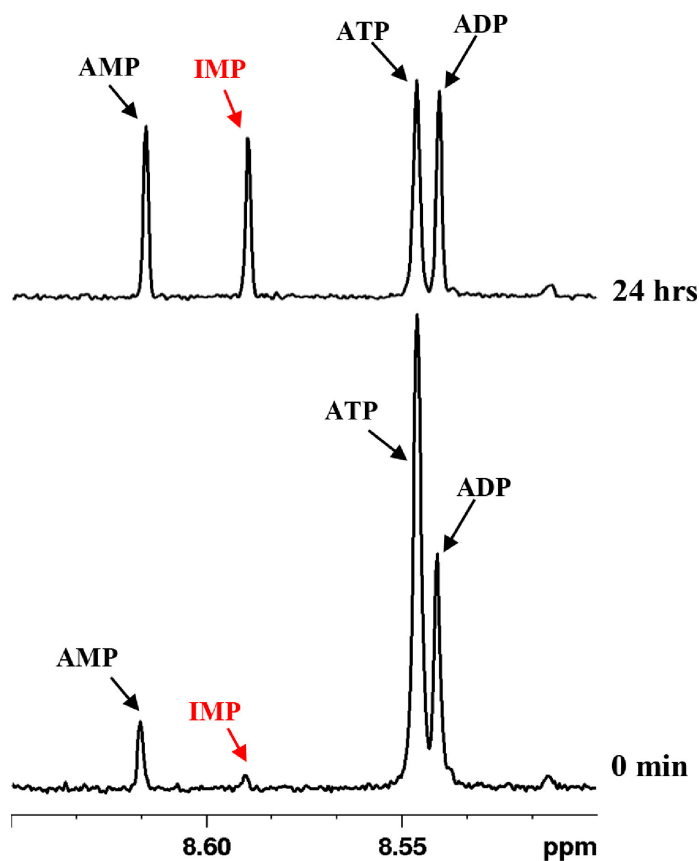
Jednodimenzijska (1D) spektroskopija NMR najčešće se koristi u području metabolomike zbog jednostavnosti uporabe i visoke propusnosti. 1D NOESY (eng. *Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*) i CPMG (eng. *Carr-Purcell-Meiboom-Gill*) najpopularnije su NMR metode i komplementarne su po svojoj prirodi. 1D NOESY koristi se za uzorke koji pružaju uske signale, poput urina, stanica i ekstrakata tkiva, zbog njihove niske makromolekularne koncentracije (Gowda i Raftery, 2021).

Princip rada 1D NOESY temelji se na fenomenu nuklearnog Overhauserovog pojačanja (NOE). NOE se javlja kada se dvije jezgre sličnog tipa nalaze u blizini, obično na udaljenosti od 0.2 do 0.8 nm. Kada se jedna jezgra zrači radiofrekvencijskim impulsom, a druga jezgra je u blizini, javlja se prijenos magnetizacije s jedne jezgre na drugu što rezultira pojačanim signalom na NMR spektru za drugu jezgru.

U 1D NOESY eksperimentu, uzorak se izlaže dvama sukcesivnim radiofrekvencijskim impulsima: prvi impuls se koristi za označavanje izabrane vrste jezgara, dok drugi impuls generira NOE signale između jezgara u blizini. Razlika u vremenu između ova dva impulsa omogućuje vremensku relaksaciju i generira NOE signale. Nakon toga se izvodi detekcija signala i bilježe se NOE signali u 1D NMR spektru. Intenziteti tih NOE signala daju informacije o udaljenostima između jezgara i mogu se koristiti za određivanje prostornog rasporeda u molekuli (Hu i sur., 2005).

1D NOESY eksperiment često se koristi za istraživanje međumolekulskih interakcija, kao što su vodikove veze, te za određivanje konformacija i trodimenzijskih struktura bioloških molekula, što je od velike važnosti u istraživanjima odnosa strukture i funkcije proteina (SAR, eng. *Structure-Activity Relationship*), a primjenjuje se i u metabolomičkim istraživanjima.

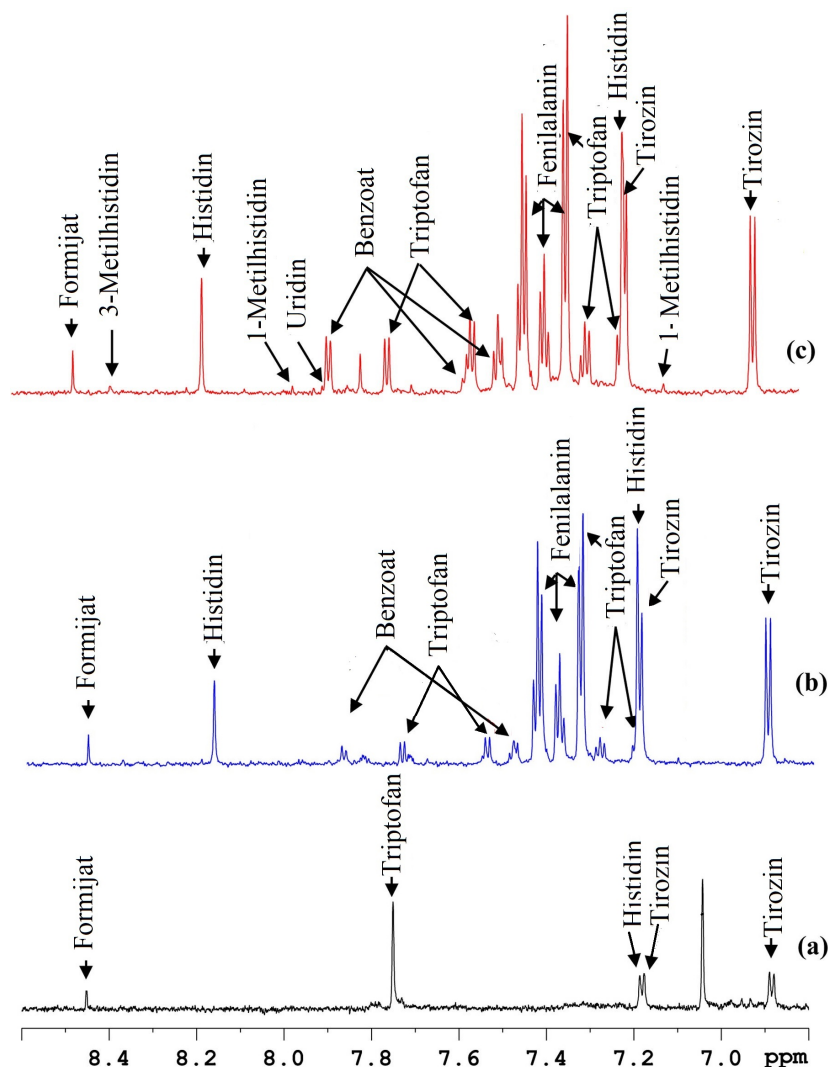
S druge strane, CPMG eksperiment koristan je za uzorke poput krvne plazme/seruma, koji sadrže makromolekule poput proteina i lipida. Signali makromolekula selektivno se potiskuju ovim eksperimentom jer ti signali nisu od interesa za metabolomička istraživanja. Na slici 4. prikazan je dio 1D CPMG ^1H NMR spektra cjelovitog uzorka krvi koji je analiziran neposredno nakon te 24 sata nakon ekstrakcije. Rezultati pokazuju da se s vremenom razina inozin-monofosfata (IMP) povećava dok razina ATP opada što potvrđuje da vrijeme od ekstrakcije uzorka do analize ima bitan utjecaj na sastav uzorka (Nagana Gowda i sur., 2022).



Slika 5. Proširena regija 800 MHz 1D CPMG ^1H NMR spektra krvi. Gornji spektar dobiven je 24 sata nakon ekstrakcije krvi, dok je donji spektar dobiven neposredno nakon ekstrakcije (Nagana Gowda i sur., 2022).

U metabolomičkim studijama fokus je na analizi malih molekula, metabolita koji su odgovorni za metaboličke procese u organizmu. Budući da makromolekulski signali ne sadrže informacije o metabolitima koji nas zanimaju, njihovo potiskivanje omogućuje bolje razlučivanje signala metabolita i poboljšava kvalitetu analize. Na taj način CPMG eksperiment pomaže u poboljšanju osjetljivosti i razlučivosti 1D NMR spektra, što olakšava identifikaciju i kvantifikaciju ciljanih metabolita u uzorku (Nagana Gowda i Raftery, 2021).

Na slici 5. uspoređeni su dijelovi ^1H NMR spektara istog uzorka ljudskog seruma krvi dobivenog na tri različita načina prigušivanja signala proteina: (a) T2 filtriranje korištenjem CPMG pulsne sekvence; (b) ultrafiltracija korištenjem filtera s membranom za rezanje molekulske mase 3 kDa; i (c) taloženje proteina korištenjem metanola (1:2 v/v). U (a) većina signala metabolita nedostaje ili je bitno oslabljena, dok su u (b) mnogi metaboliti, uključujući triptofan, benzoat i formijat, značajno oslabljeni u usporedbi s (c).



Slika 6. Usporedba ^1H NMR spektara uzorka ljudskog seruma: (a) T2 filtriranje korištenjem CPMG pulsne sekvence; (b) ultrafiltracija korištenjem filtera s membranom za rezanje molekulske mase 3 kDa; i (c) taloženje proteina korištenjem metanola (1:2 v/v) (preuzeto i prilagođeno iz Nagana Gowda i Raftery, 2021).

Koenzimi i antioksidansi detektirani su samo u uzorku krvi, a ne u serumu ili plazmi, što ukazuje da su endogeni za krvne stanice. Skoro polovica volumena krvi su stanice, a više od 99% njih su crvene krvne stanice (eritrociti), pa izmjerene razine koenzima u cjelovitoj krvi predstavljaju njihove razine u eritrocitima. Dodatna prednost mjerenja koenzima/antioksidansa putem NMR metode je dostupnost kvantitativnih podataka za veliki broj drugih metabolita uz malo dodatnog napora.

2.6. 2D NMR spektroskopija

Primjena dvodimenzijske (2D) spektroskopije NMR sve je više zastupljena u metabolomici. Dva glavna područja primjene 2D NMR u metabolomici su identifikacija nepoznatih metabolita i kvantifikacija metabolita. Identifikacija nepoznatih metabolita glavni je izazov u području metabolomike, a 2D NMR eksperimenti posebno su pogodni za identifikaciju nepoznatih spojeva. Osim toga, 2D NMR eksperimenti značajno poboljšavaju spektralnu razlučivost i ublažavaju problem preklapanja signala u složenim biološkim uzorcima čime se omogućuje i poboljšana preciznost kvantifikacije metabolita. Statistički relevantne promjene u niskim koncentracijama metabolita mogu se bolje karakterizirati pomoću 2D NMR u usporedbi s 1D NMR-om (Nagana Gowda i Raftery, 2021).

Dvodimenzijski (2D) eksperimenti uglavnom su korišteni za strukturnu karakterizaciju spojeva. Van i sur. (2008) primijenili su 2D spektroskopiju ukupne korelacije (eng. *Total Correlation Spectroscopy*) za usporedbu globalnih metaboličkih profila urina dobivenih od miševa divljeg tipa i miševa s otklonom gena *Abcc6*. 2D podaci uspoređeni su s poboljšanim 1D eksperimentom u kojem su doprinosi signala makromolekula i uree spektroskopski uklonjeni kako bi se preciznije kvantificirali metaboliti niske koncentracije. Iako su statistički modeli dobiveni iz 1D i 2D podataka mogli razlikovati uzorke dobivene od dviju skupina miševa, samo su 2D spektri omogućili karakterizaciju statistički relevantnih promjena u metabolitima niske koncentracije. Prikupljanje 2D podataka zahtijeva više vremena, no dobiveni podaci rezultirali su značajnijim i sveobuhvatnijim metaboličkim profilom, pomogli su u identifikaciji metabolita i smanjili nejasnoće u asignaciji signala.

Praćenje metabolita putem ^1H NMR česta je metoda zbog visoke prirodne zastupljenosti ovih jezgri (99,9%) te osjetljivosti i prevalencije u endogenim metabolitima u odnosu na druge jezgre, poput ^{13}C , ^{15}N i ^{31}P . Iako se 1D ^1H spektar može dobiti za manje od 5 minuta, dobivanje spektara s visokim omjerom signala prema šumu zahtijeva akumulaciju većeg broja skeniranja, što rezultira ukupnim prosječnim trajanjem eksperimenta od oko 30 minuta. Veliki raspon koncentracija metabolita u biološkim tekućinama i tkivima, uz činjenicu da svaki metabolit ima raspon koncentracija koji se smatra fiziološki normalnim, čini statističku analizu 1D NMR podataka pristranom prema otkrivanju promjena u obilnijim metabolitima. Često se manje prisutni metaboliti ne detektiraju zato što su skriveni ispod NMR signala metabolita prisutnih u većim koncentracijama (Van i sur. 2008).

Najčešće korišteni 2D NMR eksperimenti koji uključuju samo ^1H jezgre su korelacijska spektroskopija (COSY, eng. *Correlated Spectroscopy*) i ukupna korelacijska spektroskopija

(TOCSY, eng. *Total Correlated Spectroscopy*). 2D “*J-resolved*” spektroskopija je još jedna vrsta 2D eksperimenta koji se koristi u metabolomici; ne daje dodatne signale u usporedbi s 1D NMR-om, za razliku od COSY i TOCSY, ali značajno pojednostavljuje tumačenje NMR spektra. Važni 2D eksperimenti koji uključuju heteronuklide poput ^{13}C ili ^{15}N su HSQC (eng. *Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy*), HMQC (eng. *Heteronuclear Multiple Quantum Correlation Spectroscopy*) i HMBC (eng. *Heteronuclear Multiple Bond Correction Spectroscopy*). Poseban izazov pri mjerenju i tumačenju rezultata 2D eksperimenata koji uključuju heteronuklide je niska prirodna zastupljenost ^{13}C i ^{15}N . Dok 2D eksperimenti s prirodnom zastupljenijim ^{13}C zahtijevaju značajno duže vrijeme dobivanja podataka, oni koji uključuju prirodno zastupljeni ^{15}N neprikladni su za upotrebu u metabolomici zbog značajno niže osjetljivosti.

U usporedbi s 1D NMR, 2D NMR eksperimenti obično zahtijevaju dulje vrijeme dobivanja podataka, veću količinu podataka te kao posljedicu manju praktičnost za analizu podataka (Nagana Gowda i Raftery, 2021).

2.7. Obilježavanje izotopima

Nuklid je skup svih atoma obilježenih građom svoje jezgre, tj. određenim brojem u jezgri sadržanih protona i neutrona. Nuklidi istog atomskoga broja čine kemijski element (Hrvatska enciklopedija, 2021). Izotopi su nuklidi s jednakim brojem protona, a različitim brojem neutrona (Struna, 2011). Drugim riječima, izotopi su različiti nuklidi nekog elementa. NMR metode koje uključuju inkorporaciju izotopa *in vivo* ili *ex vivo* pružaju jedinstvene mogućnosti u području metabolomike. One kombiniraju selektivnost, osjetljivost i razlučivost, te rješavaju ključne izazove u NMR eksperimentima koji uključuju jezgre sa niskom prirodnom zastuplenošću. Dosad su provedene brojne studije obilježavanja izotopima kao što su ^{13}C , ^{15}N , ^2H i/ili ^{31}P .

2.7.1. *In vivo* obilježavanje

Obilježavanje izotopima *in vivo* omogućuje praćenje metaboličkih putova. Korištenjem ovog pristupa, isti metabolit koji se pojavljuje u više puteva može se identificirati s određenim fluksom (tokom), za razliku od tradicionalnog pristupa metaboličkom profiliranju koji mjeri ukupni intenzitet metabolita i nema takvu mogućnost. Primjer je laktat koji se može stvarati razgradnjom glukoze ili putevima koji nisu povezani s glikolizom. Piruvat koji nastaje iz

glikolize može se razlikovati od onoga koji nastaje iz nekoliko drugih puteva tretiranjem stanica s ^{13}C obilježenom glukozom i mjerenjem ^{13}C obilježenog piruvata. Brojni putovi, uključujući glikolizu i citratni ciklus mogu se istražiti pomoću NMR i izotopom obilježenih supstrata kao što su ^{13}C -glukoza i $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -glutamin (Nagana Gowda i Raftery, 2021).

Lloyd i sur. (2004) dokazali su da ako su prekursori laktata poput piruvata i glukoze obilježeni s ^{13}C , ^1H NMR spektroskopija omogućuje kvantificiranje tvorbe laktata iz svakog izvora.

Razumijevanje promjena metaboličkih putova u različitim uvjetima i bolestima važno je s obzirom na činjenicu da je katabolizam glukoze i glutamina ključan za održavanje života i rasta stanica sisavaca. Pokazano je da se tumorske stanice oslanjaju na visoke stope unosa i metabolizma glukoze i/ili glutamina kako bi se održale na životu (Nagana Gowda i Raftery, 2021), a poznato je i da je potreban egzogeni izvor glutamina za optimalno uključivanje ^{14}C -obilježenih aminokiselina u proteinsko tkivo stanica karcinoma *in vitro*. Nekoliko istraživanja pokazalo je da se u tim stanicama nalazi vrlo malo ili ništa slobodnog glutamina te da je sadržaj glutamina u tumorima niži nego u stanicama normalnog tkiva. Nadalje, koncentracija slobodnog glutamina kod leukemije povećava se kako se tumor povlači. Slobodni glutamin u stanicama u fazi brzog razvoja leukemije nije nađen (Coles i sur., 1962).

Iako *in vivo* studije na stanicama omogućuju razumijevanje metaboličkih putova u kontroliranim uvjetima, korištenje životinjskih modela ili ljudi može testirati rezultate dobivene na stanicama na patogenezu u organima (Nagana Gowda i Raftery, 2021).

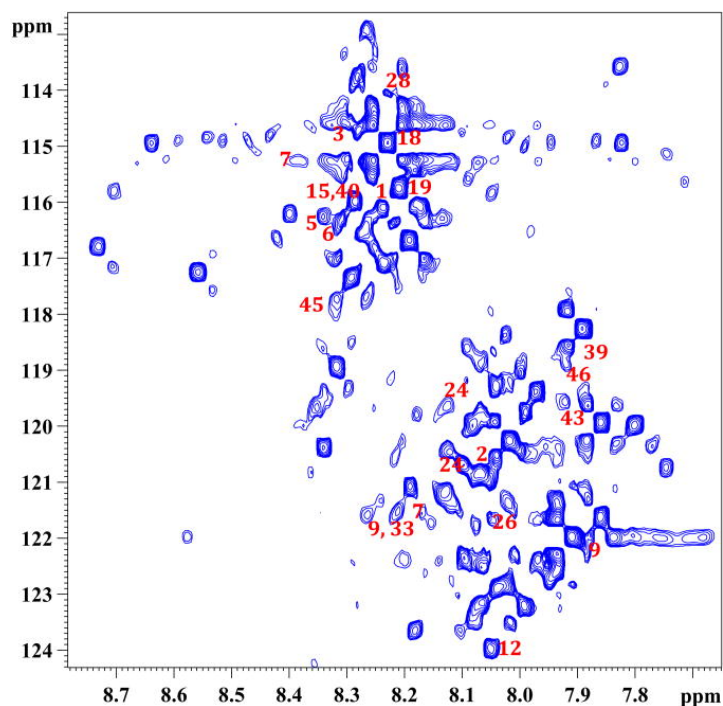
Obilježavanje izotopima primjenjuje se i u biljkama i mikroorganizmima. Općenito visoka razina biološke složenosti zahtijeva nove pristupe u istraživanju. NMR metode u kombinaciji s obilježavanjem izotopima *in vivo* u biljkama i mikroorganizmima poput bakterija i kvasaca pružaju značajno poboljšanje spektralne razlučivosti i osjetljivosti detekcije. Spektri staničnih kultura obilježenih s ^{13}C pogodni su za asignaciju kemijske strukture i molekulsku identifikaciju komponenti složenih smjesa (Zhang i sur., 2012).

In vivo obilježavanje omogućuje i sistematsku analizu velikog broja metabolita korištenjem konvencionalnih 2D NMR eksperimenata visoke razlučivosti kao što je HSQC. Osim toga, zahvaljujući uniformnom obilježavanju metabolita jezgrama kao što je ^{13}C , ovaj pristup omogućuje karakterizaciju metabolita na temelju homonuklearnih 2D ^{13}C NMR eksperimenata. Veze ugljik–ugljik indicirane homonuklearnim 2D ^{13}C eksperimentima pružaju dodatne mogućnosti za identifikaciju nepoznatih metabolita (Nagana Gowda i Raftery, 2021).

2.7.2. *Ex vivo* obilježavanje

Izvanstanično obilježavanje izotopima selektivno cilja različite klase metabolita na temelju određene funkcijske skupine. Korištenje supstrata koji sadrže izotopom obilježene jezgre, poput ^{13}C , ^{15}N i ^{31}P , nudi prednosti u smislu osjetljivosti i razlučivosti, zahvaljujući visokoj izotopnoj zastupljenosti i širokoj disperziji kemijskih pomaka označenih heteronuklida. 2D NMR eksperimenti koji uključuju heteronuklide općenito daju jedan signal za svaki obilježeni metabolit, što dodatno doprinosi osjetljivosti i razlučivosti. Dosad je korišteno puno supstrata za obilježavanje izotopima fokusirajući se na metabolite koji pripadaju aminima, karboksilnim kiselinama i spojevima s hidroksilnom skupinom.

"Pametna oznaka izotopa" ^{15}N -kolamin cilja metabolite koji sadrže karboksilne kiseline i može ih detektirati korištenjem NMR i MS metoda. Naime, pametna oznaka sadrži izotop koji se može detektirati pomoću NMR i trajni pozitivni naboj koji poboljšava osjetljivost MS. Pomoću ove oznake postignuta je detekcija metabolita s karboksilnom skupinom u uzorku ljudskog krvnog seruma i urina. Slika 7. prikazuje dio ^1H - ^{15}N HSQC spektra uzorka ljudskog urina te spojeve koji su identificirani. Upotreba ovog pristupa omogućuje izravnu usporedbu NMR i MS podataka za iste uzorke (Tayyari i sur., 2013).



Slika 7. Dio spektra ^1H - ^{15}N HSQC ljudskog urina označenog sa ^{15}N -kolaminom. 1: akonitinska kiselina; 2: adipinska kiselina; 3: alanin; 5: arginin; 6: asparagin; 7: asparaginska kiselina; 9: limunska kiselina; 12: mravlja kiselina; 15: glutaminska kiselina; 18: glikolna kiselina; 19:

hipurna kiselina; 24: limunska kiselina; 28: mliječna kiselina; 33: malonska kiselina; 39: propionska kiselina; 40: pirolgutaminska kiselina; 43: sukcijska kiselina; 45: treonin; 46: triptofan (Tayyari i sur., 2013).

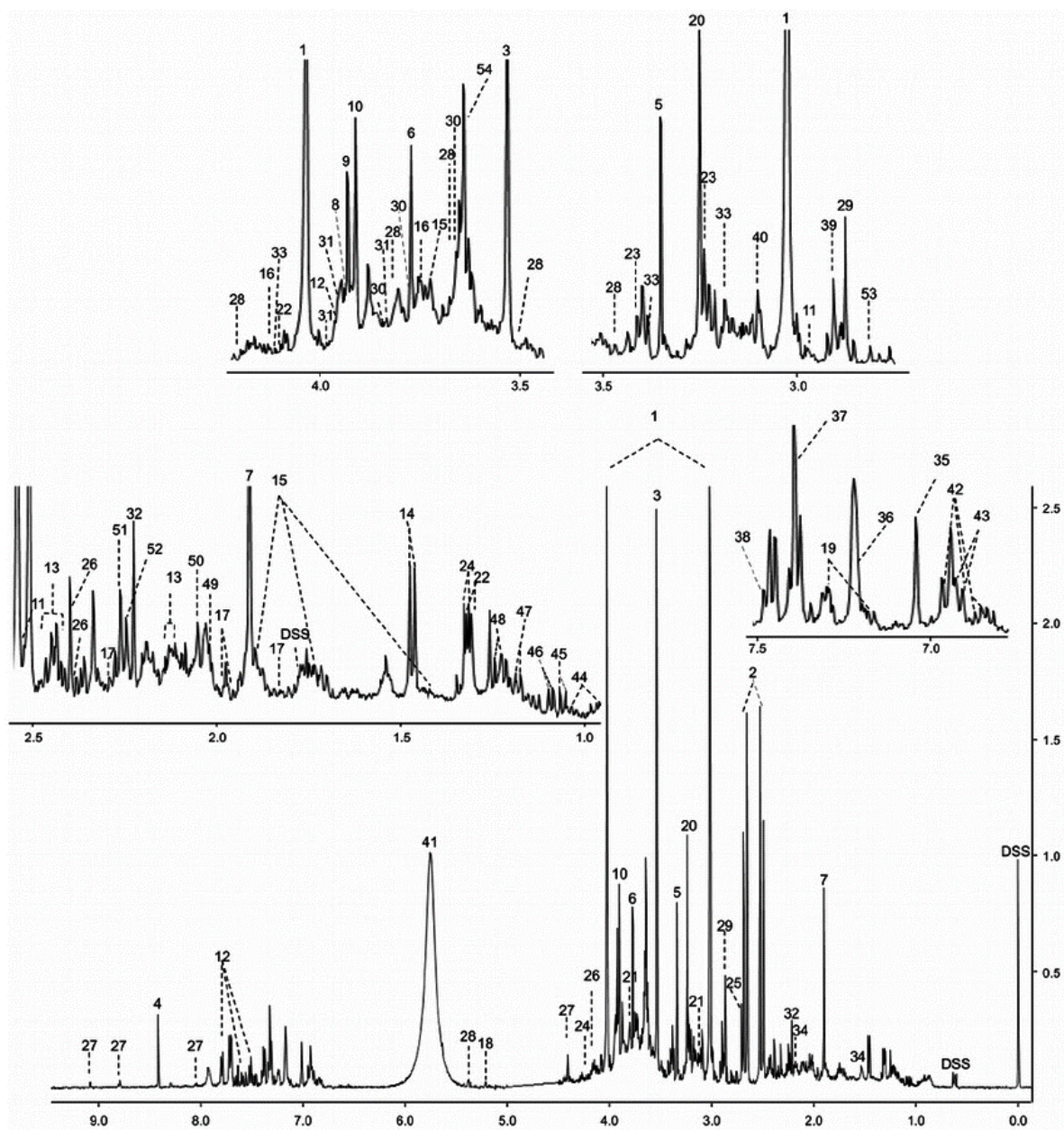
2.8.Usporedba NMR i MS

Visoka reproducibilnost spektroskopije NMR te visoka osjetljivost i selektivnost MS razlozi su najčešće primjene ovih metoda u metabolomičkim istraživanjima.

Za razliku od MS, NMR spektroskopija je kvantitativna i ne zahtijeva dodatne korake za pripremu uzoraka. Iako je osjetljivost spektroskopije NMR znatno povećana i dalje zaostaje u osjetljivosti u odnosu na MS. Metabolomička istraživanja bazirana na MS kombiniraju osjetljivost i selektivnost za istraživanje metaboloma. MS omogućava analizu metabolita vrlo niskih koncentracija (Nagana Gowda i Raftery, 2021).

Analize metaboloma mogu se podijeliti na ciljane i neciljane analize. Neciljana analiza usredotočuje se na metaboličko profiliranje ukupnog skupa metabolita ("otisak") u uzorku. NMR se često koristi u neciljanim studijama metabolomičkog profiliranja. Ciljani pristup usredotočuje se na kvantifikaciju i identifikaciju odabranih metabolita, kao što su oni uključeni u određeni metabolički put ili kao direktni produkt primjene lijeka. U ciljanoj analizi metabolita obično su poznati metaboliti koji se istražuju, te se priprema uzoraka može prilagoditi kako bi se smanjili učinci ometanja od povezanih metabolita. Pristup baziran na MS obično je optimalna metoda za ciljanu analizu.

S druge strane visoka reproducibilnost i neinvazivnost značajne su prednosti primjene NMR-a. NMR se može koristiti i za *in vivo* studije, i to kao magnetska rezonancijska spektroskopija (MRS); svako *in vitro* istraživanje metabolita putem NMR spektroskopije može se nastaviti *in vivo* studijama koristeći MRS. Već opisani NMR-baziran pristup metabolomici koji uključuje izotopima označene jezgre kao što su ^{13}C i ^{15}N može se koristiti za dobivanje korisnih informacija o ravnoteži metabolita u biološkom sustavu i praćenje protoka spojeva kroz metaboličke putove. Prednost je i visoki broj metabolita koji se mogu detektirati istovremeno u kratkom vremenskom periodu. Kako je prikazano na slici 8., jedan ^1H NMR spektar može kvantificirati oko 100 metabolita u uzorku urina, pružajući sveobuhvatan prikaz metaboličkog statusa osobe u određenom trenutku. Osim toga, spektroskopija NMR visoke razlučivosti pri rotaciji pod "magičnim kutom" od 54.74° (HRMAS, eng. *High-Resolution Magic-Angle Spinning*) može se koristiti u proučavanju uzoraka netaknutih tkiva, pri čemu se metaboliti u tkivu mogu detektirati bez potrebe za predobradom.



Slika 8. Tipični ^1H NMR-spektar ljudskog urina. Brojevi označavaju sljedeće metabolite: 1: kreatinin; 2: limunska kiselina; 3: glicin; 4: mravlja kiselina; 5: metanol; 6: gvanidoocetna kiselina; 7: octena kiselina; 8: L-cistein; 9: glikolna kiselina; 10: kreatin; 11: limunska kiselina; 12: hipurna kiselina; 13: L-glutamin; 14: L-alanin; 15: L-lizin; 16: glukonska kiselina; 17: 2-hidroksiglutarina kiselina; 18: D-glukoza; 19: indoksil sulfat; 20: trimetil-*N*-oksid; 21: etanolamin; 22: L-mliječna kiselina; 23: taurin; 24: L-treonin; 25: dimetilamin; 26: piroglutaminska kiselina; 27: trigonelin; 28: saharoza; 29: trimetilamin; 30: manitol; 31: L-serin; 32: acetoin; 33: L-cistein; 34: adipinska kiselina; 35: L-histidin; 36: L-tirozin; 37: imidazol; 38: bademova kiselina; 39: dimetilglicin; 40: akonitna kiselina; 41: urea; 42: 3-(3-hidroksifenil)-3-hidroksipropionska kiselina (HPHPA); 43: fenol; 45: izomaslačna kiselina; 46:

metilsukcininska kiselina; 47: 3-aminoizomaslačna kiselina; 48: L-fukoza; 49: N-acetilparaginska kiselina; 50: N-acetilneuraminska kiselina; 51: acetoctena kiselina; 52: α -aminoadipinska kiselina; 53: metilgvandin; 54: fenilacetilglutamin (Bouatra i sur., 2013).

NMR spektrometrija zahtijeva operatere koji su visoko osposobljeni za rad s NMR spektrometrima, a sami instrumenti su skupi, zauzimaju više prostora i zahtjevniji su za održavanje od uređaja za MS. U Tablici 1. prikazan je pregled razlika NMR i MS.

Tablica 1. Usporedba NMR i MS (Emwas 2015.).

	NMR	MS
Osjetljivost	Niska.	Visoka.
Selektivnost	Uglavnom za neselektivnu analizu.	Primjena i za selektivnu i neselektivnu analizu.
Mjerenje uzorka	Svi metaboliti iznad granice detekcije mogu se detektirati jednim mjerenjem.	Obično su potrebne različite kromatografske tehnike za različite klase metabolita.
Obnovljivost uzorka	Nedestruktivna, uzorci se mogu ponovno analizirati.	Destruktivna ali je dovoljna mala količina uzorka.
Reproducibilnost	Visoka.	Umjerena.
Priprema uzorka	Minimalna.	Zahtjevnija.
Uzorci tkiva	Moguća direktna analiza.	Zahtijeva ekstrakciju tkiva.
Broj metabolita koji se mogu detektirati u urinu	40-200.	Moguće i preko 500.
<i>In vivo</i> istraživanja	Da.	Ne.

MS je važna metoda kod profiliranja metabolita u mješovitim biološkim uzorcima ali također može detektirati ione koji ne sadrže protone ili ugljik kao što su metalni ioni. Međutim, nijedna metoda MS nije pogodna za detekciju svih klasa metabolita pa je za sveobuhvatno profiliranje potrebno koristiti kombinaciju metoda. Osim toga, različite tehnologije MS pružaju niz operativnih principa poput primjerice ionizacije, čime se povećava broj potencijalno detektiranih metabolita. Broj i klasa metabolita koji mogu biti identificirani pomoću MS ovisi o izboru metode ionizacije. Na primjer, pozitivna ionizacija raspršivanjem (ESI, eng.

Electrospray Ionization) uspješna je kod ionizacije polarnih molekula srednje veličine. Analiti se tako pretvaraju u pozitivno nabijene ione prije analize u masenom spektrometru, dok se za metabolite poput ugljikohidrata i organskih kiselina koristi ionizacija u negativno nabijene ione (Emwas 2015.).

2.9. Kemometrijska i kvantitativna analiza

Kemometrijska analiza je metoda u neselektivnoj metabolomici u kojoj se metaboliti ne identificiraju na početku. Umjesto toga, kompleksni podaci se izravno koriste za statističku analizu. Prije analize, podaci se podvrgavaju predprocesiranju kao što su korekcija bazne linije, poravnanje vrhova i uklanjanje signala otapala a na kraju se podaci podvrgavaju multivarijantnoj analizi. Multivarijantna analiza nije fokusirana na analizu pojedinačnih varijabli nego proučava kako su one međusobno povezane i kako zajedno doprinose razlikama između uzoraka (Nagana Gowda i Raftery, 2021).

Izazov kod kemometrijskog pristupa je činjenica da se različite vrste uzoraka često razlikuju na temelju manjih spektralnih obilježja, što zahtijeva odgovarajuće skaliranje ili filtriranje podataka, a moguće je i nepotpuno poravnanje signala i spektralne bazne linije. Nepotpuno poravnanje signala posebno je izraženo za uzorke urina, čiji su položaji vrhova osjetljivi na uvjete kao što su pH, ionska snaga, temperatura i koncentracija makromolekula (Lauridsen i sur. 2007).

Multivarijantni statistički pristupi se općenito dijele na dvije kategorije: nenadgledana (eng. *unsupervised*) i nadgledana (eng. *supervised*) analiza. U nenadgledanoj analizi, klasa uzorka nije poznata, dok je u nadgledanim metodama informacija o klasi uzorka (na primjer, bolest ili kontrola) poznata prije analize.

S druge strane kvantitativna analiza uključuje identifikaciju i kvantifikaciju metabolita, što može biti praćeno multivarijantnom statističkom analizom. Kod kvantitativne analize se metaboliti prvo identificiraju na temelju baza podataka standardnih spojeva ili literaturnih podataka, a identificirani signali metabolita zatim se kvantificiraju koristeći unutarnje ili vanjske standarde. Dobiveni podaci ulazne su varijable za multivarijantnu statističku analizu. Glavna prednost pristupa kvantitativnoj analizi u odnosu na globalnu kemometrijsku analizu je da može smanjiti potencijalne pogreške koje nastaju zbog iskrivljenja bazne linije i snažnih signala.

Nedavna otkrića proširila su i skupinu metabolita koji se mogu kvantificirati spektroskopijom NMR u različitim biološkim uzorcima, uključujući krvni serum/plazmu,

cjelovitu krv, tkiva i stanice, te stoga nude nove mogućnosti u području kvantitativne metabolomike. (Nagana Gowda i Raftery, 2021). Kod uzoraka krvi fizičko uklanjanje proteina prije analize znatno povećava rezoluciju i osjetljivost te poboljšava kvantifikaciju metabolita. Proteini se mogu ukloniti ultrafiltracijom ili taloženjem pomoću metanola, acetonitrila ili trikloroctene kiseline. Taloženje pomoću metanola pokazalo se kao dobra alternativa ultrafiltraciji te pouzdana metoda za rutinsku metabolomiku ljudskog krvnog seruma ili plazme (Nagana Gowda i Raftery, 2014).

NMR analiza proširena je i na mjerenje koenzima poput koenzima A, antioksidansa u krvi te koenzima staničnih redoks reakcija: NAD^+ (oksidirani nikotinamid-adenin-dinukleotid), NADH (reducirani nikotinamid-adenin-dinukleotid), NADP^+ (oksidirani-nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfat) i NADPH (reducirani nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat); glavni energetske koenzimi ATP (adenozin-trifosfat), ADP (adenozin-difosfat) i AMP (adenozin-monofosfat). Koenzimi i antioksidansi ključni su za funkciju svih živih stanica pa se povećava interes za razvoj metoda za njihovu analizu u jednom koraku (Nagana Gowda i Raftery, 2021).

2.10. Kombinirani pristup za detekciju metabolita

NMR i MS rutinski se odvojeno koriste za karakterizaciju uzoraka ali se točnost analize poboljšava primjenom više analitičkih tehnika. Njihovim kombiniranjem u metabolomičkim istraživanjima može se postići poboljšana detekcija te karakterizacija metabolita. Rezultat toga su različiti skupovi metabolita koji se mogu detektirati pomoću NMR, odnosno MS. NMR detektira metabolite prisutne u većim količinama, dok MS detektira metabolite koji se lakše ioniziraju pa njihova kombinacija obuhvaća veći broj spojeva.

Trenutna procjena je da ljudski metabolom čini oko 150000 metabolita, ali samo nekoliko stotina metabolita moguće je identificirati u tipičnoj metabolomičkoj analizi pa je kombiniranje navedenih tehnika nužno za unaprjeđenje analize (Bhinderwala i sur., 2018).

3. ZAKLJUČAK

Metaboliti su ključni pokazatelji stanja organizma te njihova identifikacija i kvantifikacija pomaže u razumijevanju bolesti i bioloških procesa u tijelu. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije metoda je koja ima značajnu ulogu u razvoju metabolomičkih istraživanja, boljem razumijevanju biologije čovjeka te prenošenju laboratorijskih spoznaja na kliničke primjene. Posebno je značajna njezina primjena u identifikaciji biomarkera koji ukazuju na prisutnost bolesti ili daju informaciju o reakciji organizma na terapiju.

Iako u odnosu na masenu spektrometriju pokazuje manju osjetljivost i razlučivost, visoka reproducibilnost i neinvazivnost svojstva su koja pridonose točnijim i opsežnijim analizama metaboloma. Metode poput obilježavanja izotopima omogućuju praćenje toka metabolita te povećanu selektivnost a korištenjem oznake izotopa ^{15}N -kolamin spojevi se mogu detektirati korištenjem i NMR i MS metoda.

Kombinacijom više analitičkih tehnika kao što su NMR i MS dobiva se širi skup informacija o metabolomu. Tako je moguće otkrivanje metabolita koji se ne mogu detektirati samo jednom tehnikom pa je stoga integriranje podataka dobivenih pomoću NMR i MS nužno za unaprjeđenje metabolomičkih istraživanja.

4. POPIS LITERATURE

Beger RD, Dunn W, Schmidt MA, Gross SS, Kirwan JA, Cascante M i sur. (2016) Metabolomics enables precision medicine: “A White Paper, Community Perspective”. *Metabolomics* **12(10)**: 149-164. <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1094-6>

Bhinderwala F, Wase N, DiRusso C, Powers R (2018) Combining Mass Spectrometry and NMR Improves Metabolite Detection and Annotation. *J Proteome Res* **17(11)**: 4017-4022. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00567>

Bouatra S, Aziat F, Mandal R, Guo A, Wilson MR, Knox C i sur. (2013) The human urine metabolome. *PloS One* **8(9)**: e73076-e73104. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073076>

Campos AI, Zampieri M (2019) Metabolomics-Driven Exploration of the Chemical Drug Space to Predict Combination Antimicrobial Therapies. *Mol Cell* **74(6)**: 1291-1303. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.04.001>

Chang JYH, Ladame S (2020) Diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers for cancer. *Bioengineering Innovative Solutions for Cancer*, 2. izd., Academic Press, Cambridge, str. 3-21.

Coles NW, Johnstone RM (1962) Glutamine metabolism in Ehrlich ascites-carcinoma cells. *Biochem J* **83(2)**: 284-291. <https://doi.org/10.1042/bj0830284>

Emwas AH (2015) The strengths and weaknesses of NMR spectroscopy and mass spectrometry with particular focus on metabolomics research. *Methods Mol Biol* **1277**: 161-193. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2377-9_13

Europska agencija za sigurnost hrane (2023) Metabolomika. EFSA - The European Food Safety Authority, <https://www.efsa.europa.eu/hr/glossary/metabolomics>. Pristupljeno 14. kolovoza 2023.

Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje (2021) Leksikografski zavod Miroslav Krleža, <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=44399>. Pristupljeno 14. kolovoza 2023.

Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje (2021) Leksikografski zavod Miroslav Krleža, <https://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=19243>. Pristupljeno 14. kolovoza 2023.

Hu H, Bradley SA, Krishnamurthy K (2005) Extending the limits of the selective 1D NOESY experiment with an improved selective TOCSY edited preparation function. *J Magn Reson* **171(2)**: 201-206. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2004.08.018>

Lauridsen M, Hansen SH, Jaroszewski JW, Cornett C (2007) Human urine as test material in ¹H NMR-based metabolomics: recommendations for sample preparation and storage. *Anal Chem* **79(3)**: 1181-1186. <https://doi.org/10.1021/ac061354x>

Lloyd SG, Zeng H, Wang P i Chatham JC (2004) Lactate isotopomer analysis by ¹H NMR spectroscopy: consideration of long-range nuclear spin-spin interactions, *Magn Reson Med* **51(6)**: 1279-1282. <https://doi.org/10.1002/mrm.20075>

Marchev AS, Vasileva LV, Amirova KM, Savova MS, Balcheva-Sivenova ZP, Georgiev MI (2021) Metabolomics and health: from nutritional crops and plant-based pharmaceuticals to profiling of human biofluids. *Cell Mol Life Sci* **78**: 6487-6503. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03918-3>

Nagana Gowda GA, Pascua V, Raftery D (2022) A new limit for blood metabolite analysis using ¹H NMR spectroscopy. *J Magn Reson Open* **12(13)**: 100082-100091. <https://doi.org/10.1016/j.jmro.2022.100082>

Nagana Gowda GA, Raftery D (2014) Quantitating metabolites in protein precipitated serum using NMR spectroscopy. *Anal Chem* **86(11)**: 5433-5440. <https://doi.org/10.1021/ac5005103>

Nagana Gowda GA, Raftery D (2021) NMR-Based Metabolomics. *Adv Exp Med Biol* **280**: 19-37. https://doi.org/10.1007/978-3-030-51652-9_2

Nicholson JK, Lindon JC (2008) Metabonomics. *Nature* **455**: 1054-1056. <https://doi.org/10.1038/4551054a>

O'Donovan CB, Walsh MC, Gibney MJ, Gibney ER, Brennan L (2016) Can metabotyping help deliver the promise of personalised nutrition? *Proc Nutr Soc* **75**: 106-14. <https://doi.org/10.1017/S0029665115002347>

Sertić J (2021) Ekspozom – kemijski čimbenici – Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti. <https://www.info.hazu.hr/wp-content/uploads/2021/02/Jadranka-Sertic%CC%81.pdf>

Pristupljeno 14. kolovoza 2023.

Smith L, Villaret-Cazadamont J, Claus SP, Canlet C, Guillou H, Cabaton NJ i sur. (2020) Important Considerations for Sample Collection in Metabolomics Studies with a Special Focus on Applications to Liver Functions. *Metabolites* **10(3)**: 104-121. <https://doi.org/10.3390/metabo10030104>

Stokes JM, MacNair CR, Ilyas B, French S, Côté JP, Bouwman C i sur. (2017) Pentamidine sensitizes Gram-negative pathogens to antibiotics and overcomes acquired colistin resistance. *Nat Microbiol* **2**: 17028-17049. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.28>

Struna (2011) Izotopi. Institut za hrvatski jezik i jezikoslovlje, <https://struna.ihjj.hr/search-do/?q=izotopi&naziv=1&polje=0#container>. Pristupljeno 14. kolovoza 2023.

Tayyari F, Gowda GA, Gu H, Raftery D (2013) ¹⁵N-cholamine--a smart isotope tag for combining NMR- and MS-based metabolite profiling. *Anal Chem* **85(18)**: 8715-8721. <https://doi.org/10.1021/ac401712a>

Tebani A, Abily-Donval L, Afonso C, Marret S, Bekri S (2016) Clinical Metabolomics: The New Metabolic Window for Inborn Errors of Metabolism Investigations in the Post-Genomic Era. *Int J Mol Sci* **17(7)**: 1167-1192. <https://doi.org/10.3390/ijms17071167>

Tebani A, Bekri S (2019) Paving the Way to Precision Nutrition Through Metabolomics. *Front Nutr* **6**: 41-51. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00041>

Van QN, Issaq HJ, Jiang Q, Li Q, Muschik GM, Waybright TJ. i sur. (2008) Comparison of 1D and 2D NMR spectroscopy for metabolic profiling. *J Proteome Res* **7(2)**: 630-639. <https://doi.org/10.1021/pr700594s>

Zhang F, Bruschweiler-Li L, Brüschweiler R (2012) High-Resolution Homonuclear 2D NMR of Carbon-13 Enriched Metabolites and their Mixtures. *J Magn Reson* **225**: 10-13. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2012.09.006>

Izjava o izvornosti

Ja Katarina Paradžik izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Vlastoručni potpis