

Osnove metabolomike temeljene na spektrometriji masa i njezina primjena

Bilić, Lovro

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:159:699393>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-06**



Repository / Repozitorij:

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



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

Lovro Bilić
0058215425

**Osnove metabolomike temeljene na spektrometriji masa i
njezina primjena**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Fizikalna kemija

Mentor: doc. dr. sc. Anita Horvatić

Zagreb, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Prijediplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za fizikalnu kemiju i koroziju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Osnove metabolomike temeljene na spektrometriji masa i njezina primjena

Lovro Bilić, 0058215425

Sažetak:

Metabolomika, definirana kao sveobuhvatna analiza malih molekula ili metabolita u biološkom uzorku, tehnologija je u nastajanju koja omogućuje karakterizaciju metaboličkih fenotipa. Različita fizikalna svojstva metabolita zahtijevaju kompleksne analitičke pristupe kao i primjenu različitih analitičkih platformi poput spektrometrije masa, kromatografije i nuklearne magnetske rezonancije ne bi li se nedvojbeno identificirali i kvantificirali metaboliti. U ovom radu opisane su osnove metabolomike, kao i suvremene analitičke tehnike temeljene na spektrometriji masa koje se primjenjuju u analizi humanog metaboloma dajući uvid u metaboličke promjene povezane s bolestima te prehranom. Nadalje, naglašeno je značenje metabolomike kao alata za otkrivanje novih lijekova.

Ključne riječi: metabolomika, spektrometrija masa, nutricionizam, medicina, farmaceutika

Rad sadrži: 27 stranica, 9 slika, 2 tablice, 35 literaturnih navoda, 1 prilog

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. Anita Horvatić

Datum obrane: 05. srpnja 2023

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology or Biotechnology or Nutrition

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Physical Chemistry and Corrosion

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology or Biotechnology or Nutrition

Mass spectrometry-based metabolomics: fundamentals and its application

Lovro Bilić, 0058215425

Abstract:

Metabolomics, defined as a comprehensive analysis of small molecules or metabolites in a biological sample, is an emerging technology that enables the characterization of metabolic phenotypes. The different physical properties of metabolites require complex analytical strategies and the application of various analytical platforms such as mass spectrometry, chromatographic techniques, and nuclear magnetic resonance to unambiguously identify and quantify metabolites. This thesis describes the basics of metabolomics, as well as modern mass spectrometry-based analytical approaches, used in the analysis of the human metabolome, providing insight into metabolic changes associated with diseases, nutrition, as well as the discovery of new drugs.

Keywords: metabolomics, mass spectrometry, medicine, nutrition, pharmaceutical industry

Thesis contains: 27 pages, 9 figures, 2 tables, 35 references, 1 supplement

Original in: Croatian

This 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: Anita Horvatić, Assistant Professor

Thesis defended: July 5th, 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. .METABOLOMIKA.....	2
2.1.1. STRATEGIJE ANALIZE METABOLOMA	3
2.1.2. ANALITIČKE METODE	3
2.1.3. METABOLOM	5
2.2. .SPEKTROMETRIJA MASA U METABOLOMICI	6
2.2.1. DIREKTNJA SPEKTROMETRIJA MASA	9
2.2.2. SPEKTROMETRIJA MASA TEMELJENA NA SEPARACIJI	11
2.2.3. ALATI I BAZE PODATAKA	16
2.3. .METABOLITI	16
2.3.1. PRIMARNI METABOLITI	17
2.3.2. SEKUNDARNI METABOLITI	17
2.4. .PRIMJENA METABOLOMIKE	18
2.4.1. PRIMJENA U MEDICINI	18
2.4.2. PRIMJENA U FARMACEUTICI	19
2.4.3. PRIMJENA U NUTRICIONIZMU	20
3. ZAKLJUČAK	21
4. POPIS LITERATURE	22
 PRILOZI	

1. UVOD

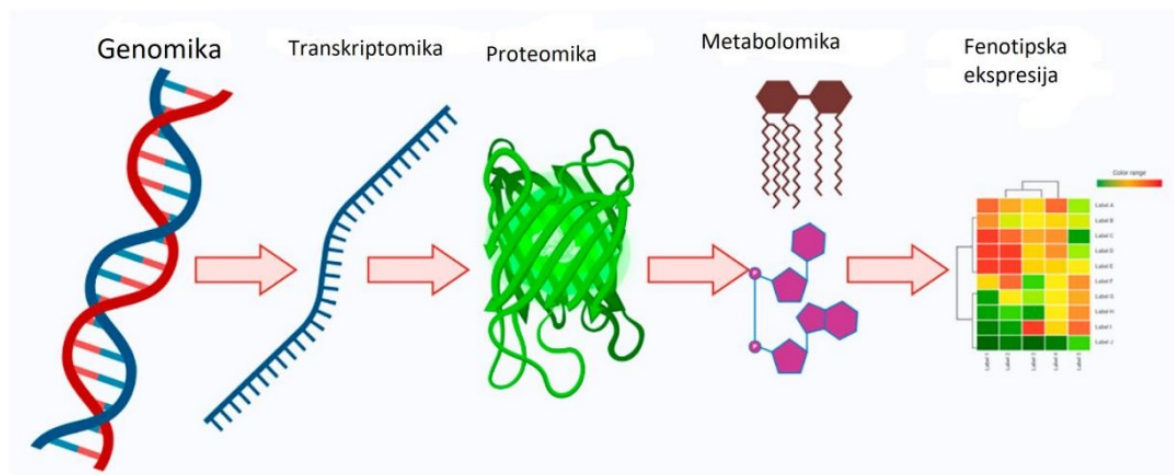
Potpuno razumijevanje procesa i mehanizama koji se odvijaju u živim organizmima utječući na njihov životni vijek još je uvijek zagonetka. Razvojem i napretkom znanosti i tehnologije razvijaju se metode koje omogućuju nove spoznaje o kompleksnim biološkim procesima u živim organizmima te raznim čimbenicima koji na njih utječu. Značajan doprinos u navedenom području donio je razvoj molekularne genetike i genetičkog inženjerstva koji su omogućili sekvenciranje cjelokupnog genoma velikog broja živih organizama. Međutim, s obzirom da nije poznata uloga svih gena, ne može se sa sigurnošću utvrditi njihova funkcija i regulacija te se znanost okrenula razvoju novih metoda koje o navedenom pružaju detaljnije informacije (Hollywood i sur. 2006). Razvijene su tehnike u području systemske biologije i biomedicine koje mogu pobliže odrediti opće stanje organizma. Utvrđeno je da se analitičkim metodama mogu analizirati različite molekule prisutne u stanici – od najjednostavnijih molekula (metabolita) do makromolekula (nukleinskih kiselina i proteina). Uložen je veliki trud u razvoj metoda koje se koriste za analizu proteina, ribonukleinskih kiselina (transkriptata) i metabolita što je rezultiralo nastajanjem različitih „omika“ pristupa koji proučavaju život na više razina, tj. na sistemski način (Tarazona i sur., 2018). Integrativna analiza molekula i njihovih interakcija na razini proteoma, metaboloma i transkriptoma omogućuje bolje razumijevanje biokemijskih i bioloških mehanizama u složenim sustavima (Dettmer i sur., 2007).

Metabolomika je jedna od „omika“ tehnika i iako je relativno nova, pokazuje nevjerojatan potencijal u proučavanju procesa koji se odvijaju u ljudskom organizmu pod utjecajem vanjskih ili unutarnjih čimbenika. Kako se u zadnjih nekoliko godina podiže svijest o zdravlju (npr. inicijativa „Jedno zdravlje“, engl. „*One Health*“), metabolomika se većinom primjenjuje u svrhu očuvanja ili poboljšanja zdravlja čovjeka. Najčešće se primjenjuje u farmaceutskoj industriji za razvoj novih lijekova, u nutricionizmu proučavajući utjecaj hrane na ljudsko tijelo te u dijagnostici (npr. dopinška kontrola, metaboličke bolesti). S obzirom na raznolikost dostupne metodologije i baza podataka, metabolomika može imati i širu primjenu u proučavanju metaboloma biljaka, životinja i drugih organizama. U ovom radu je stavljen naglasak na primjenu metabolomike u medicini, farmaceutici i nutricionizmu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Metabolomika

Glavna dogma „multi-omika“ tehnologija je tok informacija u organizmu. Prema centralnoj dogmi, informacije teku od genoma do fenotipa te su „omika“ tehnologije svrstane sukladno navedenom (Hasin i sur., 2017). U osnovnom slijedu „omika“ tehnologija, metabolomika se nalazi na samom kraju slijeda iza genomike, transkriptomike i proteomike (Slika 1). Smatra se završnom točkom „multi-omika“ niza jer je najbliža fenotipu (Dettmer i sur., 2007). Iako se može definirati na više načina, metabolomika se najčešće definira kao sistemska identifikacija i kvantitativno određivanje metabolita u organizmu ili biološkom uzorku (Idle i Gonzalez, 2007). Iako se koncept metabolita i njihove analize spominje još u prvoj polovici 20. stoljeća, razvoj metabolomike započeo je tek u 70-im godinama prošlog stoljeća zbog nedostatka dovoljno osjetljivih i specifičnih instrumentalnih metoda. Instrumentalni dio metabolomike najčešće uključuje kromatografiju, spektrometriju masa (MS) i spektroskopiju nuklearne magnetske rezonancije (NMR) od kojih svaka metoda ima svoje prednosti i nedostatke. Spektroskopija NMR se smatra zlatnim standardom zbog svoje visoke selektivnosti (mogućnosti identifikacije spojeva) i nedestruktivnosti prema analiziranom uzorku, no glavni nedostatak je smanjena osjetljivost u usporedbi s metodama temeljenim na spektrometriji masa (Lei i sur., 2011).



Slika 1. Niz „multi-omika“ tehnologija i prikaz centralne dogme sistemske biologije (Raja i sur., 2021)

2.1.1. Strategije analize metaboloma

U analizi metabolita i određivanja metaboličkog profila, osim različitih metoda analize, primjenjuju se i različite analitičke strategije. Dvije komplementarne strategije koje se najčešće koriste su metoda metaboličkog otiska prsta i metaboličko profiliranje (Dettmer i Hammock, 2004). Metabolomičko profiliranje može biti neciljano i omogućuje identifikaciju i relativnu kvantifikaciju „svih“ metabolita (tj. metaboloma), dok je ciljani pristup usmjeren k apsolutnoj kvantifikaciji određenih metabolita primjenom komercijalno dostupnih standarda.

Glavna razlika između metoda metaboličkog otiska prsta i ciljanog metaboličkog profiliranja je način provođenja analize, uz činjenicu da je za metaboličko profiliranje potrebno poznavanje fizikalno-kemijskih svojstava molekula (npr. polarnost, hlapivost i sl.) za razliku od ciljanih istraživanja. Ciljano metaboličko profiliranje se smatra izravnijom metodom zato što se analizira specifična grupa metabolita od interesa vezana za određeni metabolički put (Dettmer i sur., 2007). Jednostavni primjer ciljanog metaboličkog profiliranja je kvantitativna analiza aminokiselina, određene skupine lipida ili adenzin trifosfata (ATP) u određenom uzorku. S obzirom na selektivnost metode i analize točno određenih molekula, većinom se primjenjuje u medicini kod istraživanja biomarkera, u farmaceutskoj industriji kod razvoja novih lijekova, te u svrhu analize toksičnih tvari u organizmu. Iako je preciznost i specifičnost ciljanih metoda pozitivna karakteristika ovog pristupa, glavni nedostatak je nemogućnost definiranja cjelokupnog metaboloma tj. ne postoje informacije o ostalim molekulama u uzorku. Metoda metaboličkog otiska prsta se temelji na usporedbi metaboloma uzoraka ili otiska prsta metabolita koji se mijenjaju kao odgovor na promjene u genomu, izloženost toksinima, bolesti i/ili okolišne promjene (Dettmer i sur., 2007). Metoda otiska prsta može se primjenjivati u analizi stanica, tjelesnih tekućina i tkiva. Iako su obje navedene strategije različite i mogu se samostalno primjenjivati, jedino simultanom primjenom obje strategije moguće je provesti potpunu metaboličku analizu kojom se mogu objasniti kompleksni biokemijski procesi koji utječu na razinu metabolita prisutnih u organizmu.

2.1.2. Analitičke metode

Velik je izbor instrumentalnih metoda analize koje se mogu primjenjivati u metabolomskim istraživanjima (Tablica 1), a potrebne su radi različitosti u fizikalno-kemijskim svojstvima

pojedinih skupina metabolita (npr. topljivost, hlapivosti, polarnosti i sl.).

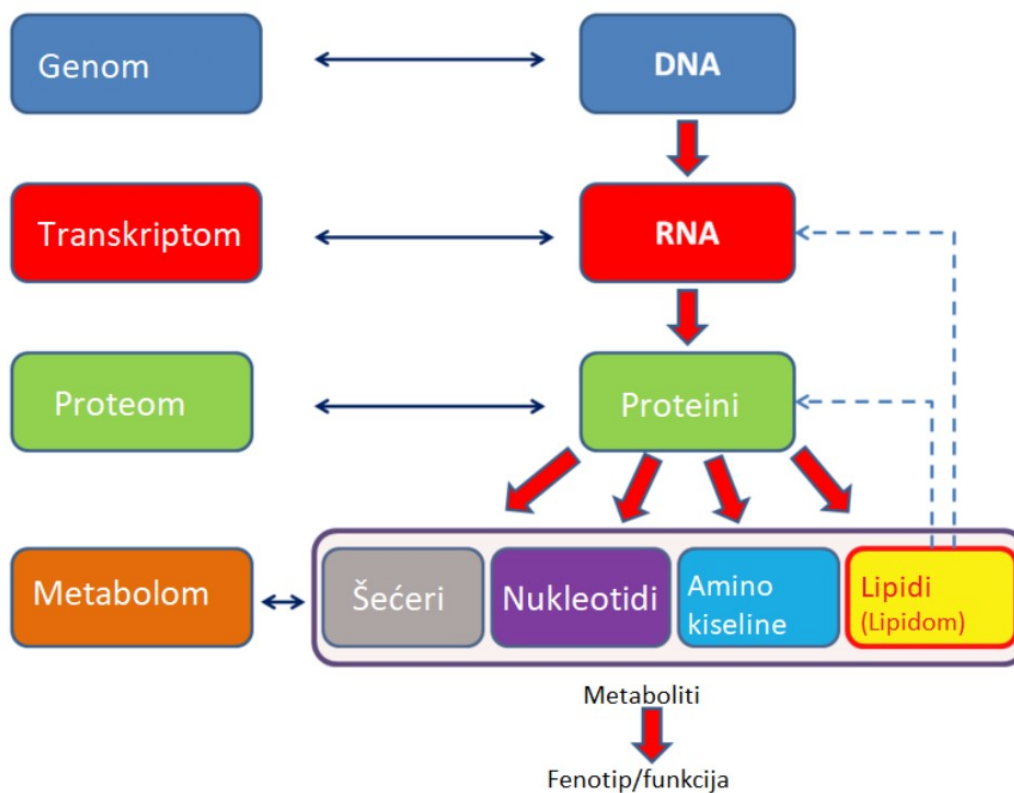
Tablica 1. Česte metode koje se primjenjuju u metabolomici (Hollywood i sur., 2006)

Kratice	Metoda
GC-MS (engl. <i>Gas chromatography – mass spectrometry</i>)	Plinska kromatografija - spektrometrija masa
GCxGC-MS (engl. <i>Two dimensional gas chromatography coupled to mass spectrometry</i>)	Dvodimenzionalna plinska kromatografija - spektrometrija masa
LC-EC (engl. <i>Liquid chromatography - electrochemical array</i>)	Tekućinska kromatografija s elektrokemijskom detekcijom
HPLC-MS (engl. <i>High performance liquid chromatography – mass spectrometry</i>)	Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti spregnuta sa spektrometrijom masa
UPLC-MS (engl. <i>Ultra performance liquid chromatography – mass spectrometry</i>)	Tekućinska kromatografija ultra visoke učinkovitosti spregnuta sa spektrometrijom masa
HILIC (engl. <i>Hydrophilic interaction chromatography</i>)	Tekućinska kromatografija temeljena na hidrofiličnim interakcijama
CE-MS (engl. <i>Capillary electrophoresis – mass spectrometry</i>)	Kapilarna elektroforeza - spektrometrija masa
NMR (engl. <i>Nuclear magnetic resonance</i>)	Nuklearna magnetska rezonancija
LC-NMR (engl. <i>Liquid chromatography – nuclear magnetic resonance</i>)	Tekućinska kromatografija spregnuta s nuklearnom magnetskom rezonancijom
FT-IR (engl. <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>)	Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom
DI-MS (engl. <i>Direct infusion mass spectrometry</i>)	Spektrometrija masa s izravnim unošenjem uzorka
LDI-MS (engl. <i>Laser desorption ionisation mass spectrometry</i>)	Spektrometrija masa temeljena na laserskoj desorpciji i ionizaciji
FT-ICR-MS (engl. <i>Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry</i>)	Fourier transformirana ionsko-ciklotronska rezonancijska spektrometrija masa
SIDMAP (engl. <i>Stable isotope - based dynamic metabolomic profiling</i>)	Metaboličko profiliranje primjenom stabilnih izotopa

Samostalna primjena pojedinih analitičkih metoda nije uvijek najbolji izbor jer ne omogućuje pouzdano određivanje i identifikaciju metabolita. Stoga se određene metode poput spektroskopije NMR mogu koristiti samostalno u analizi, dok se ostale metode poput spektrometrije masa često kombiniraju s kromatografskim metodama kako bi se postigli precizniji i kvalitetniji rezultati mjerenja. Kvaliteta rezultata nije jedini faktor koji se uzima u obzir prilikom odabira metode, već se razmatraju i faktori poput hipoteze istraživanja i brzine analize. Tako se npr. za veću pokrivenost metaboloma koristi kombinacija više analitičkih platformi kao što su plinska kromatografija (GC), tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (LC-MS) i spektroskopija NMR.

2.1.3. Metabolom

Identifikacija metabolita u organizmu omogućuje određivanje metaboloma. Metabolom se definira kao potpuni komplet svih molekula (metabolita) mase manje od 1500 Da koje se nalaze u određenoj stanici, tkivu, organu ili organizmu (Wishart i sur., 2006). Kako se “multi-omika” tehnologije mogu prikazati kaskadnim nizom od genomike do metabolomike, na sličan se način može prikazati slijed od genoma do proteoma te interakcija s metabolomom (Slika 2). Njihova međusobna povezanost jasno upućuje da su metabolom, transkriptom, proteom i genom međusobno komplementarni. Zbog same prirode genske ekspresije koja djeluje nizvodnim („*downstream*“) mehanizmom od genoma do proteoma, promjene koje se događaju u proteomu ili transkriptomu odražavaju se i na promjene u metabolomu (Hollywood i sur., 2006). Svaki organizam, odnosno svaka vrsta ima različit metabolom. Iako se općenita definicija metaboloma može primijeniti na sve organizme, metabolički procesi će biti karakteristični za pojedine vrste te metabolome različitih vrsta (poput čovjeka i biljke) uglavnom nema smisla uspoređivati. Manje organizacijske jedinice vezane za različite stanice, tkiva, organe i sustave organa unutar samog organizma čine veću cjelinu koja predstavlja metabolom cjelokupnog organizma. Na primjeru čovjeka moguće je definirati metabolom urina, krvne plazme, pluća i sl. koji zajedno čine jednu cjelinu - metabolom čovjeka. Analitički je informativnije proučavati manje jedinice radi dobivanja jasnije slike o biološkim procesima i utjecaju raznih faktora na organizam.



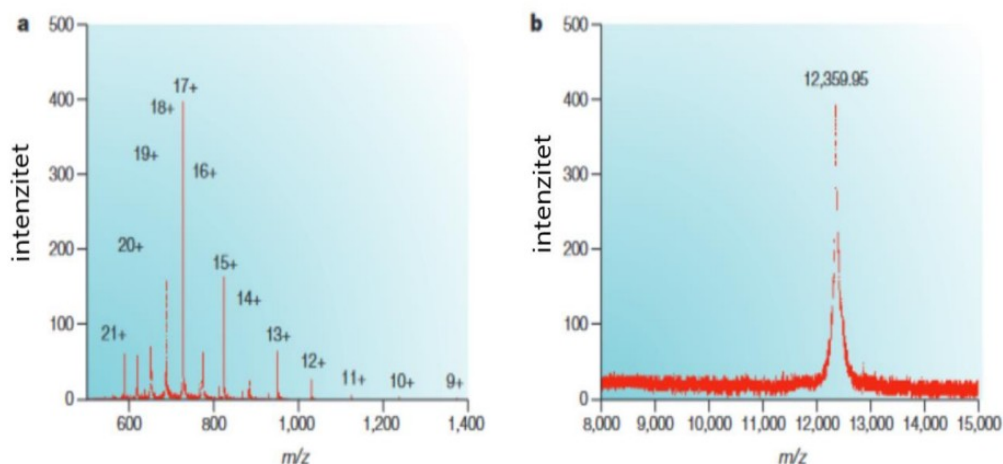
Slika 2. Prikaz kaskadnog niza „omika“ tehnologija od genoma do metaboloma

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/9/98/Metabolomics_schema.png

(Pristupljeno 28.7.2022)

2.1.4. Spektrometrija masa u metabolomici

Sir Joseph John Thomson je 1906. godine dobio Nobelovu nagradu za otkriće prototipa spektrometra masa mjereći odnos mase i naboja elektrona. Od svog začetka do danas, spektrometrija masa pokazala se jednom od najpouzdanijih i najboljih tehnika za kvalitativnu i kvantitativnu analizu uzoraka. Temelji se na stvaranju iona u plinovitom stanju (u izvoru iona) koji se mogu razdvojiti pod utjecajem električnog ili magnetskog polja (u analizatoru masa) na osnovi omjera mase i naboja (Banoub i sur., 2009). Rezultati se prikazuju na grafu (spektru masa) u kojem su na x-osi vrijednosti omjera mase i naboja (m/z), a na y-osi su predstavljene vrijednosti (relativnog) intenziteta iona (Slika 3).



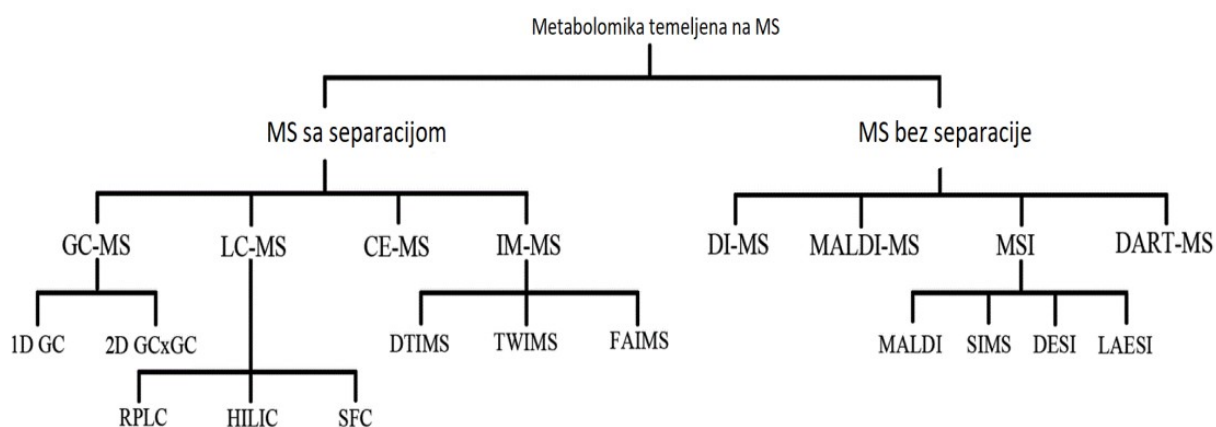
Slika 3. Usporedba spektra masa citokroma c primjenom ionizacije elektroraspršenjem (ESI) i matricom potpomognute ionizacije laserskom desorpcijom (MALDI); Spektar a) ESI; Spektar b) MALDI (Glish i Vachet, 2003)

Dvije platforme koje se najčešće primjenjuju u analizi metaboloma su spektroskopija NMR i spektrometrija masa. Spektroskopija NMR je korisna u karakterizaciji nepoznatih spojeva i primjenjuje se u analizi metabolita u otopinama - biološkim tekućinama i ekstraktima stanica (Shockor i sur., 1996). Međutim, nedovoljna osjetljivost i duljina trajanja analize te značajna cijena opreme onemogućili su širu primjenu ove tehnike u metabolomici te se spektrometrija masa profilirala kao pouzdana tehnika široke primjene. Bez obzira na njihove razlike u načinu mjerenja i općenitij primjeni, MS i NMR su međusobno komplementarne metode koje se vrlo često primjenjuju za analizu istih bioloških uzoraka radi dobivanja detaljnijih informacija o metabolomu. Glavne prednosti spektrometrije masa su visoka osjetljivost i reproducibilnost, u kombinaciji s mogućnošću identifikacije molekula prisutnih u kompleksnim biološkim uzorcima pretraživanjem dostupnih baza podataka (Villas-Bôas i sur., 2004). Tehnike metabolomike temeljene na spektrometriji masa pružaju sjajnu kombinaciju osjetljivosti i selektivnosti te su postale nezamjenjiva platforma u biologiji i medicini (Lei i sur., 2011). Metabolomika temeljena na spektrometriji masa se do danas primjenjuje u istraživanjima utjecaja droga i toksina na zdravlje, proučavanju metaboličkih bolesti i metaboličkih putova općenito te ne iznenađuje činjenica da se od početka stoljeća broj studija koje uključuju metabolomiku temeljenu na spektrometriji masa eksponencijalno povećao (Gowda i Djukovic, 2014).

Općenito, metabolomski eksperiment temeljen na spektrometriji masa čine sljedeći koraci (Dettmer i sur., 2007):

- uzorkovanje
- priprema uzoraka (ekstrakcija metabolita)
- analiza uzorka (najčešće uključuje kromatografsko razdvajanje metabolita i detekciju spektrometrijom masa)
- transformacija sirovih podataka
- analiza podataka (pretraživanje baza podataka, statistička i bioinformatička analiza)
- interpretacija rezultata (utvrđivanje biološke važnosti metabolita)
- validacija rezultata

Trenutno se primjenjuju različiti pristupi metabolomike temeljene na spektrometriji masa koje se svrstavaju u dvije skupine (Slika 3), a to su direktna analiza spektrometrijom masa (spektrometrija masa nije spregnuta s nekom od separacijskih tehnika) i tehnika MS koja je u sprezi sa separacijskim tehnikama.



Slika 3. Tehnologije temeljene na MS koje se trenutno koriste u metabolomici (popis kratica objašnjen je u Prilogu 1). CE: kapilarna elektroforeza; DART: izravna analiza u stvarnom vremenu; DESI: desorpcija i ionizacija elektroraspršenjem; DI: izravna infuzija; DTIMS/TWIMS: spektrometrija masa ionske pokretljivosti; FAIMS: spektrometrija masa

ionske pokretljivosti pri atmosferskom tlaku; GC: plinska kromatografija; HILIC: tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama; IM-MS: spektrometrija masa ionske pokretljivosti; LAESI: laserska ablacija-ionizacija elektroraspršenjem; LC: tekućinska kromatografija; MALDI: matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom; MSI: slikovna spektrometrija masa; RPLC: tekućinska kromatografija obrnute faze; SFC: superkritična tekućinska kromatografija; SIMS: spektrometrija mase sekundarnih iona (Ren i sur., 2018)

2.1.5. Direktna spektrometrija masa

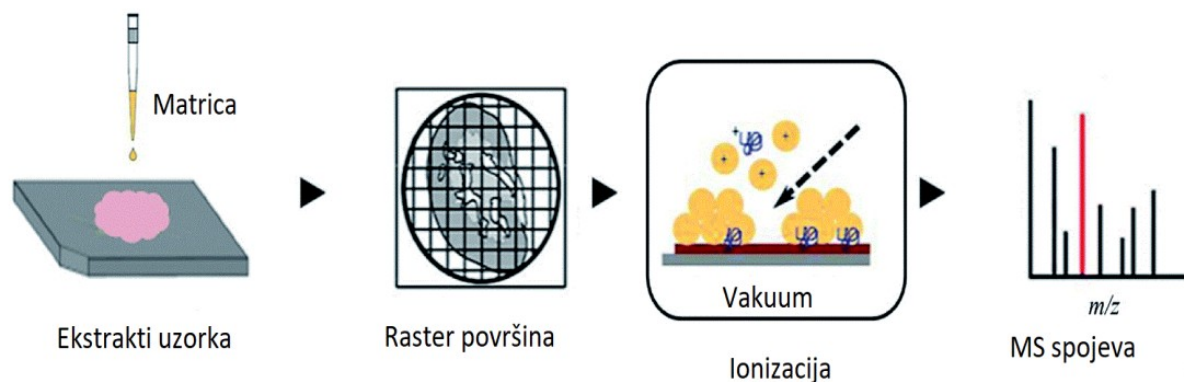
Direktna analiza MS je vrsta analize u kojoj se uzorak direktno podvrgava spektrometriji masa bez prethodnog razdvajanja sastojaka smjese. Dobiveni podaci pružaju najmanje informacija o uzorku, ali zbog brzine, tj. mogućnosti obrade velikog broja uzorka u kratkom vremenu, primjenjuje se kao alat za analizu velikog broja uzoraka prilikom kliničkog istraživanja ili istraživanja opće populacije. Primjerice, direktna analiza je uspješno primijenjena prilikom provjere metaboloma velike populacije mutiranih sojeva kvasaca kako bi se odredila funkcionalnost mutiranih gena (Castrillo i sur., 2003). Upotreba direktne analize MS sve je šira razvojem modernih instrumenata visokog razlučivanja i preciznog mjerenja mase. Tri osnovne tehnike koje se najčešće primjenjuju su:

- Spektrometrija masa s direktnim uvođenjem uzorka (DIMS, engl. *Direct injection mass spectrometry*)
- Matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom (MALDI, engl. *Matrix assisted laser desorption/ionization*)
- Slikovna spektrometrija masa (MSI, engl. *Mass spectrometry imaging*)

Vrsta direktne analize MS koja se najviše koristi je DIMS, odnosno spektrometrija masa s direktnim uvođenjem uzorka. Temelji se na izravnom injektiranju ili uvođenju uzoraka u MS, što je posebice primjenjivo kod instrumenata visoke razlučivosti (poput Fourier transformirane ionsko-ciklotronske rezonancijske spektrometrije masa i instrumenata temeljenih na tehnologiji orbitrap), bez prethodne kromatografske ili elektroforetske separacije (Zhang i sur., 2014). Direktno injektiranje omogućuje znatno brže vrijeme analize te se ubrzanjem cijelog postupka poboljšava efikasnost. Iako se lagano i brzo provodi, glavni nedostatak tehnike DIMS

je supresija iona koja nastaje kao rezultat nedostatka separacije prije detekcije spektrometrom masa.

Spektrometrija masa uz matricom potpomognutu ionizaciju laserskom desorpcijom (MALDI-MS) je druga metoda koja se do danas najčešće primjenjuje. Temelji se na ionizaciji koristeći matricu koja apsorbira lasersku energiju i ujedno protonira (ionizira) uzorak. Prosječna analiza MALDI-MS sadrži maksimalno tri ili četiri koraka (Slika 4). Pošto je matrica ključni dio cijele tehnike, o izboru matrice ovise rezultati eksperimenta kao i reproducibilnost podataka. Iako je postignut velik napredak u razvoju matrica kako bi se povećala efikasnost tehnike MALDI-MS, matrica je i dalje glavni ograničavajući faktor. MALDI se smatra esencijalnim alatom za analizu makromolekula kao što su proteini, peptidi i nukleinske kiseline, kao i njihovih metabolita (Ren i sur., 2018). Također se smatra nezamjenjivim alatom u analizi kompleksnih smjesa (Guinan i sur., 2015). Osim velike brzine provođenja analize, velika prednost tehnike MALDI-MS je vrlo mala količina uzorka potrebna za mjerenje.



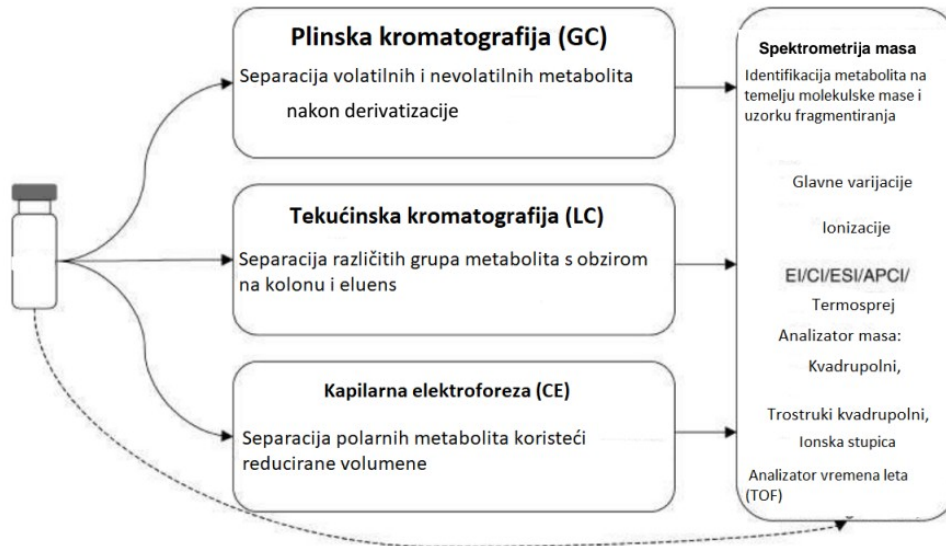
Slika 4. Prikaz osnovnog postupka MALDI-MS analize (Cleland i Schroeter, 2018)

MSI je moćan alat za određivanje metabolita *in situ*, koji može simultano odrediti više vrsta molekula, od metabolita i lijekova koji imaju malu molekulsku masu do proteina, pritom zadržavajući morfološki integritet ispitivanog tkiva (Ren i sur., 2018). Tkivo je najvažnija komponenta svake analize MSI, pa se umjesto smjese ili otopine uzorka tanki sloj tkiva izrezan mikrotomom podvrgava mjerenju. Razne ionizacijske tehnike se koriste za MSI, poput sekundarne ionske spektrometrije masa (SIMS), laserske ablacije i ionizacije

elektroaspršenjem (LAESI), desorpcijske ionizacije elektroaspršenjem (DESI) i MALDI. SIMS funkcioniše tako da se kroz uzorak tkiva propuštaju ionske zrake visoke energije pri čemu dolazi do ionizacije molekula. MALDI-MSI se provodi tako da se uzorak tkiva izlaže laserskim zrakama kojima se postiže ionizacija i skeniranje tkiva. DESI je relativno nova tehnika u kojoj se električno nabijene kapljice raspršuju na površinu uzorka za analizu te se ekstrahirane i ionizirane molekule analita uvode u spektrometar masa. LAESI je ionizacijska tehnika temeljena na ablaciji uzorka laserom srednjeg infracrvenog zračenja u kombinaciji s električno nabijenim kapljicama koje proizvodi izvor ESI (Nemes i Vertes, 2007). Iako informacije dobivene direktnom analizom metabolita primjenom spektrometrije masa mogu pružiti relativno detaljne informacije o metabolitima, čak i novi precizniji instrumenti ne omogućavaju potpunu pokrivenost metaboloma. Također, nemogućnost razlikovanja izomera (enantiomera) čini je neefikasnom u mnogim analizama.

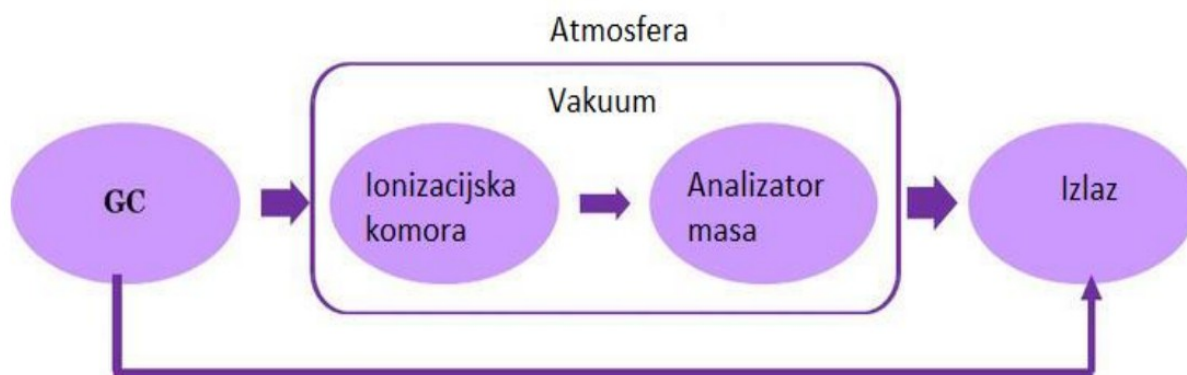
2.1.6. Spektrometrija masa temeljena na separaciji

Nedostaci direktne analize MS vezani uz nedovoljnu pokrivenosti metaboloma i nemogućnost razlikovanja odnosno odvajanja izomera doveli su do uvođenja separacijskih metoda u metabolomsku analizu. Cilj je postići što bolje odvajanje pojedinih sastojaka smjese i detekciju metabolita ublažavanjem ili potpunom eliminacijom nedostataka direktne analize MS. Najveći nedostatak direktne analize MS je supresija iona molekulama iz matrice. Dakle, povezivanje kromatografskih metoda s tehnikom MS znatno povećava pokrivenost metaboloma, dodajući dodatnu dimenziju u identifikaciji metabolita i poboljšava biološki kontekst kroz identifikaciju većeg broj metabolita (Bedair i Sumner, 2008). Metode koje se koriste za separaciju su kromatografske metode te kapilarna elektroforeza (Slika 5).



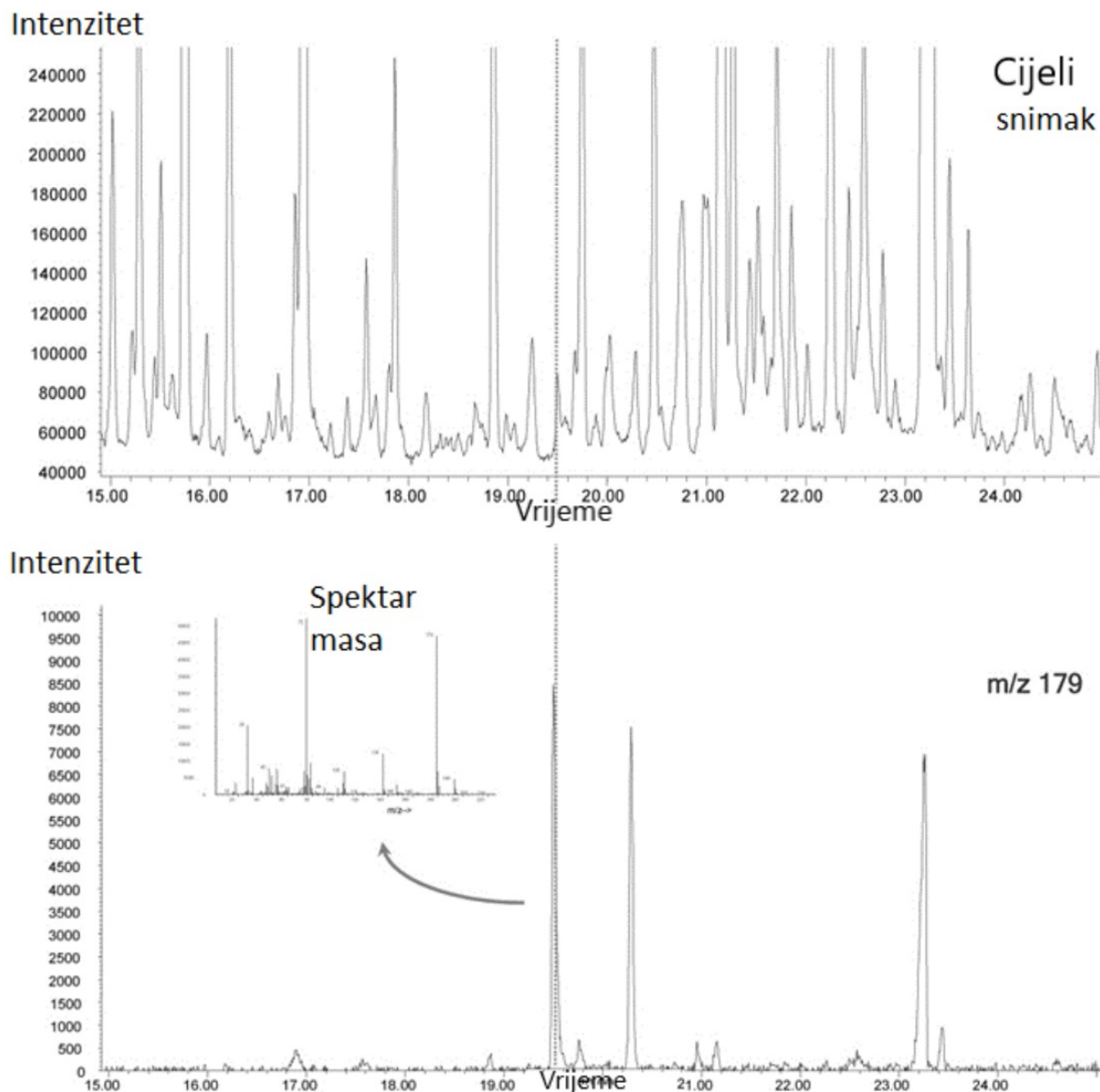
Slika 5. Shematski prikaz osnovnih separacijskih tehnika analize (Villas-Bôas i sur., 2004)

Vezane tehnike plinska kromatografija sa spektrometrijom masa (GC-MS) se ekstenzivno koriste u svrhu analize metaboloma. Plinska kromatografija pouzdan je i učinkovit način odvajanja hlapivih komponenti kompleksnih smjesa. Provođenjem plinske kromatografije prije spektrometrije masa omogućena je precizna i detaljna analiza kompleksnih smjesa. Separacija komponenti ovisi o njihovim svojstvima (temperatura vrelišta i selektivna apsorpcija na stacionarnoj fazi) i o njihovoj raspodjeli između stacionarne faze i mobilne faze (plin nosač) (Bouziani i Yahya, 2021). Spektrometrija masa se kao i plinska kromatografija provodi analizom uzoraka u plinovitom stanju i velika prednost ove metode je upravo lakoća povezivanja dviju tehnika. Jednostavnost izvedbe glavna je odlika sustava GC-MS. Efikasnost plinske kromatografije odnosno sposobnost razdvajanja komponenti iz smjesa ovisi o kromatografskim kolonama. Kolone imaju sposobnost razdvajanja preko 100 spojeva u jednoj analizi (Roessner i sur., 2000). Pravilnim izborom kolone postiže se najveće razlučivanje. Nakon plinske kromatografije, uzorak se uvodi u izvor ionizacije najčešće direktnim injehtiranjem. Shematski prikaz sustava GC-MS prikazan je na Slici 6.



Slika 6. Shematski prikazane komponente sustava GC-MS (Bouziani i Yahya, 2021)

Uzevši u obzir mnoštvo primjena koje uključuju analizu hlapivih i nehlapivih organskih molekula, GC-MS ima više poželjnih karakteristika od bilo koje druge metode (Maštovská i Lehotay, 2003). Kako bi se omogućila plinska kromatografija, molekule moraju biti hlapive pri temperaturi mjerenja što otežava rukovanje i pripremu uzoraka (Villas-Bôas i sur., 2004). Doduše, mnogi metaboliti sadrže polarne funkcionalne skupine koje su termolabilne na temperaturama separacije. Nehlapive molekule potrebno je prije analize plinskom kromatografijom derivatizirati (Koek i sur., 2006). Derivatizacija je prevođenje molekula u derivate prihvatljive za analizu kemijskim obilježavanjem. Unatoč potrebnoj derivatizaciji koja ograničava analizu GC-MS, ovom tehnikom moguće je određivati mnoge vrste metabolita poput aminokiselina, organskih kiselina, šećera, nukleozida, masnih kiselina i sl. Rezultati se prikazuju u obliku kromatograma (Slika 8).



Slika 8. Ciljana detekcija metabolita nikotinamida tehnikama GC-MS u uzorcima *E. coli* pomoću ekstrahiranog ionskog kromatograma (m/z 179) iz cjelovitog kromatograma (Koek i sur., 2006)

Druga vrsta kromatografije koja se najčešće povezuje sa spektrometrijom masa je tekućinska kromatografija (LC) pri čemu nastaje vezani sustav tekućinska kromatografija-spektrometrija masa (LC-MS). Tekućinska kromatografija je metoda separacije u kojoj se komponente tekuće smjese razdvajaju između dvije faze, stacionarne i mobilne. Kao i plinska kromatografija, svrstava se u skupinu kolonskih kromatografija što znači da se provodi u koloni. Postoji više

vrsta tekućinske kromatografije, a one koje se najčešće upotrebljavaju u metabolomici su: tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UPLC), tekućinska kromatografija obrnutih faza (RP) i hidrofилна tekućinska kromatografija (HILIC). U usporedbi s plinskom kromatografijom, tekućinska kromatografija koristi tekuću mobilnu fazu čime se potpuno eliminira potreba za hlapivim metabolitima te se uzorci ne trebaju derivatizirati kako bi se analizirali. Detaljnija usporedba LC i GC predočena je u Tablici 2.

Tablica 2. Prednosti i nedostaci GC i LC za primjenu u metabolomici (Courant i sur., 2014)

	LC	GC
Prednosti	Pogodna za polarne i nepolarne spojeve	Pogodna za nepolarne i hlapive komponente
	Jednostavna priprema uzoraka	Strukturne informacije dobivene pomoću fragmentacije u izvoru
	Dostupnost molekulskog iona (intaktna molekula)	Postojanje univerzalne baze podataka
Nedostaci	Male i vrlo polarne molekule zahtijevaju korištenje specifičnih kolona	Zahtjeva složeniju pripremu uzoraka
	Reducirana fragmentacija (zahtjeva spektrometriju masa za identifikaciju struktura)	Polarni spojevi se moraju derivatizirati
	Podložna fenomenu supresije iona	Ekstenzivna fragmentacija

Unatoč nedostacima, tekućinska kromatografija se sve više primjenjuje u analizi metaboloma koristeći pristup metaboličkog otiska prsta. Zahvaljujući razvoju novih tehnologija poput

ionizacije elektroraspršenjem i pojavi modernijih instrumenata, uporaba sustava LC-MS je znatno porasla u zadnjih nekoliko godina te je u biokemijskim istraživanjima postala neizostavna (Pitt, 2009).

Elektroforeza je definirana kao migracija iona pod utjecajem električnog polja (Masuo i sur., 2009). Elektroforeza se uobičajeno provodi u gelu, no kod kapilarne elektroforeze se provodi u kapilari. Brojni nedostaci poput čestog začepjenja kapilare i loše stabilnosti sustava onemogućuju širu primjenu kapilarne elektroforeze. Smatra se relativno novom tehnikom i trenutno nema široku primjenu u analizi metabolita (Ren i sur., 2018).

2.1.7. Alati i baze podataka

Usporedba eksperimentalno dobivenih rezultata s već poznatim i postojećim podacima sadržanim u bazama podataka ključan je korak metabolomske analize kojim se provjerava uspješnost postupka i omogućuje određivanje strukture (identifikacija). Baze podataka su nužan alat u istraživanju metabolita. Dostupne su *online* (javno ili uz plaćanje) te zahtijevaju korištenje sofisticiranih računalnih programa. Baze podataka sadrže veliku količinu spektara masa kemijskih spojeva koji služe za određivanje struktura nepoznatih metabolita. Za tu svrhu se eksperimentalno dobiveni spektar uspoređuje s velikom količinom snimljenih spektara koji su pohranjeni u bazi podataka (Kind i Fiehn, 2010). Baze podataka koje se najčešće koriste za usporedbu spektara masa su: Golm Metabolome Database (GMD), METLIN, MassBank, ReSpec, The Global Natural Products Social Molecular Networking resource (GNPS) i Metfrag (Johnson i Lange, 2015).

2.2. Metaboliti

Metabolomika se temelji na proučavanju i analizi metabolita. Metaboliti su definirani kao međuprodukti i produkti metabolizma. Nalaze se u živim organizmima kao dio njihovog metaboloma. Metaboliti imaju različite uloge, uključujući gradivnu ulogu, ulogu signalnih molekula, koriste se kao izvor energije, mogu imati stimulativne i inhibitorne učinke na enzime ili imaju vlastitu aktivnost u obliku kofaktora enzima (Tiwari i Rana, 2015). Dijele se na primarne i sekundarne metabolite. Druga podjela je vezana za vrstu organizma u kojem se

nalaze. Tako se mogu dijeliti na biljne, fungalne, bakterijske i druge metabolite.

2.2.1. Primarni metaboliti

Primarni metaboliti su metaboliti koji su neophodni za rast organizma. To su produkti nastali tijekom eksponencijalne faze rasta čija je sinteza ključna za normalni proces rasta (Sanchez i Demain, 2008). Nedostatak primarnih metabolita ili njihova potpuna eliminacija iz organizma onemogućuje normalan rast, ali i život organizma. Bez primarnih metabolita nastupa smrt. Primarni metaboliti mogu biti produkti i međuprodukti kataboličkog i anaboličkog metabolizma. Komercijalno gledano, najvažniji primarni metaboliti su vitamini, aminokiseline, nukleotidi, organske kiseline i alkoholi. Budući da se mogu proizvesti i uz pomoć bakterija, našli su brojne primjene u farmaceutskoj, prehrambenoj i kemijskoj industriji (Sanchez i Demain, 2008). Citratna kiselina primjer je primarnog metabolita koji se često koristi u industrijskoj proizvodnji hrane, lijekova i kozmetike.

2.2.2. Sekundarni metaboliti

Sekundarni metaboliti za razliku od primarnih metabolita nisu vezani za rast i razvoj organizma te ne nastaju tijekom eksponencijalne faze rasta. Nedostatak sekundarnih metabolita neće rezultirati smrću organizma, nego će trajno narušiti stanje organizma i oštetiti njegove obrambene mehanizme. Organizmi sekundarne metabolite proizvode u najvećoj količini tijekom prelaska iz faze rasta u stacionarnu fazu. Kod biljaka je ustanovljeno da sekundarni metaboliti imaju veliku ulogu u adaptaciji biljaka na okoliš. Sekundarni metaboliti biljaka imaju važnu primjenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji te ih ljudi koriste kao lijekove (npr. antibiotike), sladila i dodatke prehrani. Klasificiraju se na temelju njihovih svojstava (kemijska struktura, topljivost, način sinteze), ali općenito se dijele na skupine: fenole, terpene, flavonoide, alkaloida i steroide. Razvoj industrijske proizvodnje i poboljšanje sinteze sekundarnih metabolita biljaka omogućio je njihovu značajnu primjenu u proizvodima za ljudsku potrošnju koji polako nadomještaju kemijske spojeve proizašle iz farmaceutske industrije.

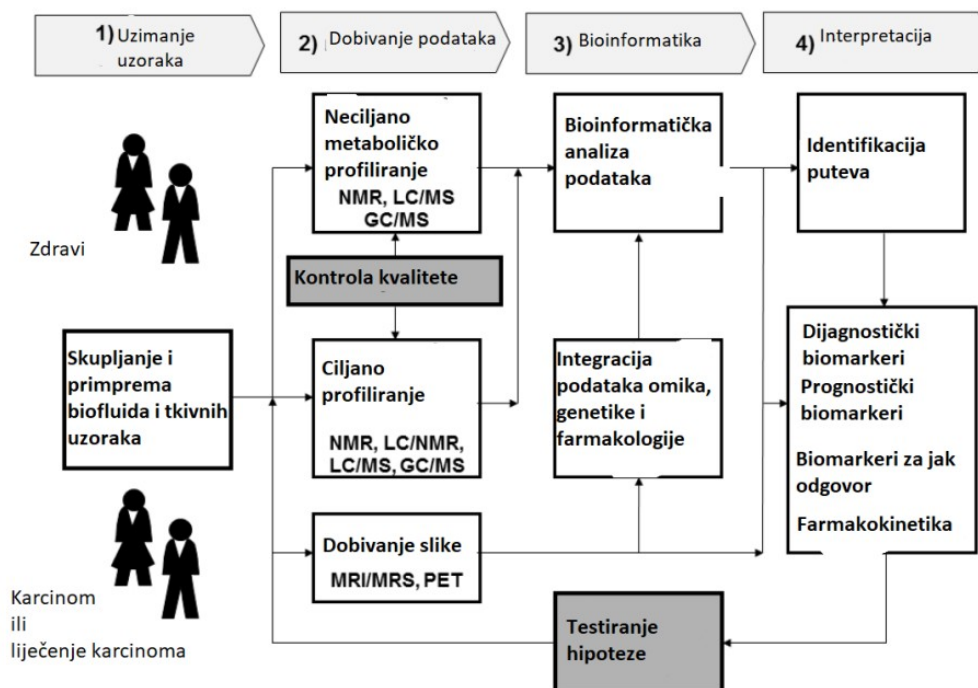
2.3. Primjena metabolomike

Utjecaj koji metaboliti imaju na tkiva i procese unutar organizma poznat je znanstvenicima od začetka metabolomike. Od mnogih uloga koje metaboliti posjeduju, najvažnija je njihova uloga signalnih molekula. Postojanje metabolita u nekom tkivu ili organu i promjena njihove koncentracije predstavlja „signal“ iz kojeg se može dobiti informacija o promjeni metaboličkih procesa. Pozitivna ili negativna promjena koncentracije odraz je vanjskih ili unutarnjih faktora. Bolesti poput karcinoma, prehrana, prevelika izloženost stresu i sl. jedni su od mnogobrojnih faktora koji utječu na zdravlje čovjeka i izazivaju promjene metaboloma. Metabolomika je tako svoju najveću primjenu našla u očuvanju zdravlja čovjeka te se najčešće primjenjuje u medicini, farmaceutskoj industriji i u nutricionističkoj analizi.

2.3.1. Primjena u medicini

Jedna od osnovnih ljudskih težnji je zdravlje i dug život. Napredak tehnologije, kao i brz razvoj znanosti, otvara sve više mogućnosti za produljenje životnog vijeka. U skladu s navedenim, sve je više novih tehnika uvedeno i u medicinu. Budući da je poznata poveznica između metabolita i zdravlja ili bolesti, brza integracija metabolomike u medicinu bila je očekivana. Zbog neinvazivnog postupka i lakoće uzorkovanja, glavni predmet analize su ljudske tjelesne tekućine. Prve analize metabolita su provedene na ljudskim uzorcima mokraće i krvne plazme. Ljudska mokraća se najčešće analizira u medicini jer odstupanja od referentnih vrijednosti ukazuju na pojedine bolesti i kronična stanja. Metabolomika se također koristi u onkološkoj medicini za rano otkrivanje raka te u trudničkoj skrbi. Metaboličko profiliranje biofluida može dovesti do poboljšanja trudničke skrbi i do eliminiranja bolesti koje su specifične za trudnice i fetus (Fanos i sur., 2013). Metabolomika se u trudnica primjenjuje u analizi posteljice, mokraće, fetusa, maternice i pupčane vrpce. Kod onkoloških pacijenata se metabolomskim pristupom analiziraju tkiva organa koje pogađa karcinom, ali i tjelesne tekućine vezane uz zahvaćene organe. Karcinom kao bolest uzrokuje promjenu metaboličkog profila stanice te se primjenom metabolomike može postići bolje razumijevanje promjena unutar stanica raka, ali i promjena koje iste uzrokuju u zdravom tkivu. Ciljani i neciljani metabolomski pristup, zajedno s funkcionalnim tehnikama snimanja (npr. magnetskom rezonancom - MRI, pozitronskom emisijskom tomografijom – PET scan), mogu se koristiti za

praćenje metabolizma tumora, kao i otkrivanje dijagnostičkih i prognostičkih biomarkera (Beger, 2013). Navedeni biomarkeri se mogu koristiti za rano otkrivanje karcinoma, kao i za kreiranje terapije odnosno načina liječenja koji bi najbolje odgovarao pacijentu (Slika 9) – personalizirani pristup liječenju.



Slika 9. Shematski prikaz tipičnog metabolomskog eksperimenta u tumorskim ispitivanjima (Beger, 2013)

2.3.2. Primjena u farmaceutici

Razvoj lijekova i njihovo stavljanje na tržište dugotrajan je proces koji zahtijeva značajno ulaganje sredstava te veliki trud i napor. Uključuje mnoštvo znanstvenih disciplina, od biologije do farmakologije. Pojednostavnjeno rečeno, to je proces kojim se identificiraju spojevi koji se mogu koristiti kao lijekovi. Tradicionalno, proces uključuje pregled molekularnih biblioteka i optimizaciju pogodaka te zahtijeva utvrđene ciljane molekule (mete) i biblioteke molekula za odabir pogodaka kako za unutarstanične, tako i za izvanstanične mete (Tolstikov, 2016). Lijekovi većinom imaju ciljano djelovanje i primjenom metabolomike mogu se definirati

molekule na koje lijekovi ciljano djeluju, kao i analizirati razgradni produkti lijekova. Osim u identifikaciji metabolita, metabolomika je korisna i u otkrivanju biokemijskih putova unutar organizma što može olakšati distribuciju lijeka. Ako su poznati metabolički putovi i odgovor stanice na različite vrste spojeva, može se stvoriti optimalni lijek koji će doći do mjesta djelovanja bez gubitka aktivnosti. Iako se ne može koristiti za proizvodnju svih lijekova, metabolomikom možemo dobiti povratnu informaciju o efikasnosti i sigurnosti lijekova.

2.3.3. Primjena u nutricionizmu

Hrana je ključan dio ljudskog života. Osim prolaznih učinaka, hrana i dugoročno utječe na ljudski život, kao i na zdravlje čovjeka. Pravilnom prehranom može se produljiti život i osigurati bolja kvaliteta života. Sve učestalijom pojavom debljine u razvijenim zemljama od sredine prošlog stoljeća, veća su ulaganja u nove metode nutritivne terapije. Za utvrđivanje učinaka specifičnih prehrambenih komponenti i/ili navika na zdravlje, potrebno je detaljno poznavanje učinaka hrane koja se uobičajeno konzumira (Primrose i sur., 2011). Budući da se većina nutricionističkih ispitivanja temeljila na subjektivnim izvještajima sudionika, njihova pouzdanost nije bila zadovoljavajuća. Iako se većina hranjivih tvari apsorbira u tijelu i potom kemijski mijenja, u mokraći i krvnoj plazmi se nalaze određeni metaboliti u svojem nepromijenjenom stanju. Metabolomskom analizom mokraće, krvne plazme i drugih biofluida ispitanika moguće je dobiti pouzdane rezultate o učincima prehrane na organizam. Analiza biofluida se u tom slučaju temelji na nutritivnim biomarkerima. Biomarkeri se vežu za metabolite povezane s određenom prehrambenom namirnicom te se kasnijom identifikacijom određuje unos namirnice u tijelo, kao i njena količina. Na primjer, metabolit vinske kiseline bio je prvobitno identificiran kao potencijalni biomarker unosa grožđa u intervencijskoj studiji ispitivanja utjecaja unosa grožđa koristeći spektroskopiju NMR (González-Peña i Brennan, 2019). Tako se pomoću biomarkera vinske kiseline može odrediti koliko je grožđa prisutno u dijeti ispitanika. Nadalje, metabolomska analiza izvrstan je pokazatelj odgovora metabolizma na dijetu što omogućuje lakše i pozdanije osmišljavanje najboljeg personaliziranog plan prehrane.

3. ZAKLJUČAK

Razumijevanje i poznavanje metabolizma i njegove regulacije povezane s bolestima, vanjskim faktorima i genetikom ključno je za poboljšanje života ljudi, ali i drugih organizama. Razvoj tehnologije i otkriće metoda kao što je spektrometrija masa omogućili su korištenje metabolomike za proučavanje kompleksnih metaboličkih putova u organizmu, ali i ciljanih metabolita. Budući da je metabolomika disciplina najbliža fenotipu, njena primjena omogućuje dublju spoznaju o fenotipskim promjenama koje nastaju kao odgovor na bolest ili genetske, nutricionističke i toksikološke utjecaje. Iako se smatra relativno mladom disciplinom, metabolomika je do sada ostavila neizbrisiv trag u znanosti, medicini i drugim područjima te je trajno promijenila aspekt proučavanja organizama. Mogućnosti koje pruža su nevjerovatne i budućnost analize u područjima biologije, biomedicinskih znanosti i nutricionizma je nezamisliva bez metabolomike.

Iako nijedna analitička tehnika nije savršena, spektrometrija masa se može smatrati idealnim alatom u metabolomici. Mogućnost povezivanja s različitim separacijskim tehnikama, visoka selektivnost i razlučivanje te relativno jednostavna primjena odlike su koje čine spektrometriju masa najboljim izborom. Konstantan razvoj i napredak spektrometrije masa samo povećavaju njene mogućnosti i očekuje se da će u skoroj budućnosti predvoditi znanstvena istraživanja metabolizma.

Metabolomika temeljena na spektrometriji masa je svoju veliku moć pokazala u medicini, farmaceutici i nutricionizmu, ali može se primjenjivati i šire. Razvojem biomarkera i personaliziranog pristupa liječenju u medicini i nutricionizmu, metabolomika temeljena na spektrometriji masa već je neizmjereno poboljšala kvalitetu života ljudi i pruža mogućnost daljnjeg poboljšanja.

4. POPIS LITERATURE

Bedair M., Sumner L. W. (2008) Current and emerging mass-spectrometry technologies for metabolomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **27(3)**, 238-250. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.01.006>

Beger R. D. (2013) A review of applications of metabolomics in cancer. *Metabolites*, **3(3)**, 552-574. <https://doi.org/10.3390/metabo3030552>

Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E. (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science*, **161(5)**, 839-851. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00490-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3)

Bouziani A., Yahya M. (2021) Mass Spectrometry Coupled with Chromatography toward Separation and Identification of Organic Mixtures. *Biodegradation Technology of Organic and Inorganic Pollutants*. IntechOpen.

Castrillo J. I., Hayes A., Mohammed S., Gaskell S. J., Oliver S. G. (2003) An optimized protocol for metabolome analysis in yeast using direct infusion electrospray mass spectrometry. *Phytochemistry*, **62(6)**, 929-937. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00713-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00713-6)

Cleland T. P., Schroeter E. R. (2018) A comparison of common mass spectrometry approaches for paleoproteomics. *Journal of Proteome Research*, **17(3)**, 936-945. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00703>

Courant F., Antignac J. P., Dervilly-Pinel G., Le Bizec B. (2014) Basics of mass spectrometry based metabolomics. *Proteomics*, **14(21-22)**, 2369-2388. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400255>

Dettmer K., Aronov P. A., & Hammock B. D. (2007) Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass spectrometry reviews*, **26(1)**, 51-78. <https://doi.org/10.1002/mas.20108>

Fanos V., Atzori L., Makarenko K., Melis G. B., Ferrazzi E. (2013) Metabolomics application in maternal-fetal medicine. *BioMed research international*, 2013.

Fiehn O. (2016) Metabolomics by gas chromatography–mass spectrometry: Combined targeted and untargeted profiling. *Current protocols in molecular biology*, **114(1)**, 30-4. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3004s114>

Glish G. L., Vachet R. W. (2003) The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nature reviews drug discovery*, **2(2)**, 140-150. <https://doi.org/10.1038/nrd1011>

González-Peña D., Brennan L. (2019) Recent advances in the application of metabolomics for nutrition and health. *Annual review of food science and technology*, **10**, 479-519. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121715>

Gowda G. A., Djukovic D. (2014) Overview of mass spectrometry-based metabolomics: opportunities and challenges. *Mass Spectrometry in Metabolomics*, 3-12. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1258-2_1

Guinan T., Kirkbride P., Pigou P. E., Ronci M., Kobus H., Voelcker N. H. (2015) Surface-assisted laser desorption ionization mass spectrometry techniques for application in forensics. *Mass spectrometry reviews*, **34(6)**, 627-640. <https://doi.org/10.1002/mas.21431>

Hasin Y., Seldin M., Lusic A. (2017) Multi-omics approaches to disease. *Genome biology*, **18(1)**, 1-15. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1215-1>

Hollywood K., Brison D. R., Goodacre R. (2006) Metabolomics: current technologies and future trends. *Proteomics*, **6(17)**, 4716-4723. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600106>

Idle J. R., & Gonzalez F. J. (2007) Metabolomics. *Cell metabolism*, **6(5)**, 348-351.

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.005>

Johnson S. R., Lange B. M. (2015) Open-access metabolomics databases for natural product research: present capabilities and future potential. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, **3**, 22. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00022>

Kind T., Fiehn O. (2010) Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. *Bioanalytical reviews*, **2(1)**, 23-60.

Koek M. M., Muilwijk B., van der Werf M. J., Hankemeier T. (2006). Microbial metabolomics with gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical chemistry*, **78(4)**, 1272-1281. <https://doi.org/10.1021/ac051683+>

Lei Z., Huhman D. V., & Sumner L. W. (2011) Mass spectrometry strategies in metabolomics. *Journal of Biological Chemistry*, **286(29)**, 25435-25442.

<https://doi.org/10.1074/jbc.R111.238691>

Masuo Y., Imai T., Shibato J., Hirano M., Jones O. A., Maguire M. L. i sur. (2009) Omic analyses unravels global molecular changes in the brain and liver of a rat model for chronic Sake (Japanese alcoholic beverage) intake. *Electrophoresis*, **30(8)**, 1259-1275.

<https://doi.org/10.1002/elps.200900045>

Maštovská K., Lehotay S. J. (2003) Practical approaches to fast gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1000(1-2)**, 153-180.

[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00448-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00448-5)

Nemes P., Vertes A. (2007) Laser ablation electrospray ionization for atmospheric pressure, in vivo, and imaging mass spectrometry. *Analytical chemistry*, **79(21)**, 8098-8106.

<https://doi.org/10.1021/ac071181r>

Pitt, J. J. (2009) Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews*, **30(1)**, 19.

Primrose S., Draper J., Elsom R., Kirkpatrick V., Mathers J. C., Seal C. i sur. (2011) Metabolomics and human nutrition. *British Journal of Nutrition*, **105(8)**, 1277-1283. <https://doi.org/10.1017/S0007114510004812>

Ren J. L., Zhang A. H., Kong L., Wang X. J. (2018) Advances in mass spectrometry-based metabolomics for investigation of metabolites. *RSC advances*, **8(40)**, 22335-22350. <https://doi.org/10.1039/C8RA01574K>

Roessner U., Bowne J. (2009) What is metabolomics all about?. *Biotechniques*, **46(5)**, 363-365. <https://doi.org/10.2144/000113133>

Roessner U., Wagner C., Kopka J., Trethewey R. N., Willmitzer L. (2000) Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography–mass spectrometry. *the plant journal*, **23(1)**, 131-142. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00774.x>

Sanchez S., Demain A. L. (2008) Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. *Microbial biotechnology*, **1(4)**, 283-319. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2007.00015.x>

Shockcor J. P., Unger S. E., Wilson I. D., Foxall P. J., Nicholson J. K., Lindon J. C. (1996) Combined HPLC, NMR spectroscopy, and ion-trap mass spectrometry with application to the detection and characterization of xenobiotic and endogenous metabolites in human urine. *Analytical Chemistry*, **68(24)**, 4431-4435. <https://doi.org/10.1021/ac9606463>

Tiwari R., Rana C. S. (2015) Plant secondary metabolites: a review. *International Journal of Engineering Research and General Science*, **3(5)**, 661-670.

Tolstikov V. (2016) Metabolomics: bridging the gap between pharmaceutical development and population health. *Metabolites*, **6(3)**, 20. <https://doi.org/10.3390/metabo6030020>

Villas-Bôas S. G., Mas S., Åkesson M., Smedsgaard J., Nielsen J. (2005) Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass spectrometry reviews*, **24(5)**, 613-646. <https://doi.org/10.1002/mas.20032>

Wishart D. S., Tzur D., Knox C., Eisner R., Guo A. C., Young N. i sur. (2007) HMDB: the human metabolome database. *Nucleic acids research*, **35**, 521-526.

Zhang A., Sun H., Wang X. (2014) Urinary metabolic profiling of rat models revealed protective function of scoparone against alcohol induced hepatotoxicity. *Scientific reports*, **4(1)**, 1-8. <https://doi.org/10.1038/srep0676>

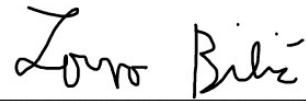
PRILOZI

Prilog 1. Popis kratica

Kratica	Engleski naziv	Hrvatski naziv
CE	Capillary electrophoresis	Kapilarna elektroforeza
CE-MS	Capillary electrophoresis – mass spectrometry	Kapilarna elektroforeza - spektrometrija masa
DART	Direct Analysis in Real Time	Izravna analiza u stvarnom vremenu
DESI	Desorption electrospray ionization	Desorpcija i ionizacija elektroraspršenjem
DI-MS	Direct infusion mass spectrometry	Spektrometrija masa s izravnim unošenjem uzorka
DTIMS/TWIMS	Drift tube ion mobility spectrometry/traveling wave ion mobility spectrometry	Spektrometrija masa ionske pokretljivosti
FAIMS	High field asymmetric waveform ion mobility spectrometry	Spektrometrija masa ionske pokretljivosti pri atmosferskom tlaku
FT-ICR-MS	Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry	Fourier transformirana ionsko-ciklotronska rezonancijska spektrometrija masa
FT-IR	Fourier transform infrared spectroscopy	Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom
GC-MS	Gas chromatography – mass spectrometry	Plinska kromatografija - spektrometrija masa
GCxGC-MS	Two dimensional gas chromatography coupled to mass spectrometry	Dvodimenzionalna plinska kromatografija - spektrometrija masa
HILIC	Hydrophilic interaction chromatography	Tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama
HPLC-MS	High performance liquid chromatography – mass spectrometry	Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti spregnuta sa spektrometrijom masa
LAESI	Laser-ablation electrospray ionization	Laserska ablacija- ionizacija elektroraspršenjem
LC	Liquid chromatography	Tekućinska kromatografija spregnuta s nuklearnom magnetskom rezonancijom
LC-EC	Liquid chromatography - electrochemical array	Tekućinska kromatografija s elektrokemijskom detekcijom
LDI-MS	Laser desorption ionisation mass spectrometry	Spektrometrija masa temeljena na laserskoj desorpciji i ionizaciji
MALDI	Matrix assisted laser desorption/ionization	Matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom
MSI	Mass spectrometry imaging	Slikovna spektrometrija masa
NMR	Nuclear magnetic resonance	Nuklearna magnetska rezonancija
RPLC	Reverse phase liquid chromatography	Tekućinska kromatografija obrnute faze
SFC	Supercritical fluid chromatography	Superkrična tekućinska kromatografija
SIDMAP	Stable isotope - based dynamic metabolomic profiling	Metaboličko profiliranje primjenom stabilnih izotopa
SIMS	Secondary-ion mass spectrometry	Spektrometrija mase sekundarnih iona
UPLC-MS	Ultra performance liquid chromatography – mass spectrometry	Tekućinska kromatografija ultra visoke učinkovitosti spregnuta sa spektrometrijom masa

Izjava o izvornosti

Ja Lovro Bilić 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