



**T.C.
BATMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Kanserli Hastaların Kan ve İdrar Metabolitlerinin Yüksek Alan NMR ile
İncelenmesi**

Sibel TARHAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Fizik Anabilim Dalı**

**MAYIS-2021
BATMAN
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all materials and results that are not original to this work.

İmza

Sibel TARHAN

Tarih: 07/05/2021

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Kanserli Hastaların Kan ve İdrar Metabolitlerinin Yüksek Alan NMR ile İncelenmesi

Sibel TARHAN

Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Fizik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ali YILMAZ

2021, 55 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Mehmet Zafer KÖYLÜ

Prof. Dr. Ali YILMAZ

Prof. Dr. Ömer GÜLLÜ

ÖZET

Vücut sıvılarının yüksek alan NMR metabolit profilleri, sağlıklı ve hastalıklı vakalara ait spektrumların karşılaştırılması amacıyla, uzun süredir araştırılmaktadır. Bu incelemeler doğal biyolojik sıvı ile yapılırken karşılaşılan en büyük sorun, yüksek su sinyali şiddetinin neden olduğu radyasyon sönmüleme olgusudur. Bu olguyu önlemek için suyu baskılamaya yarayan pre-saturasyon puls teknikleri kullanılmaktadır. Ancak bu teknikler NMR rölaksasyon zamanlarının ölçümlerine izin vermemekte ve çok örnek ölçüldüğünde zaman kaybına yol açmaktadır. Bu nedenle daha pratik tekniklerin araştırılması önemini korumaktadır.

Bu çalışmada 29 kanserli kan ve idrar örneği ve 28 Normal kan ve idrar örneği toplandı. Her bir örnekten alınan 0.02mL kan 0.98 mL D₂O'a ve 0.06mL idrar da 0.94 mL D₂O'a ilave edilerek karışımlar hazırlandı. Bu karışımların NMR ölçümleri 400 MHz NMR spektrometresi ile gerçekleştirildi. Ölçümler tek puls adımı kullanılarak oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

Kan metabolitlerinin yüksek alan NMR spektrumu, birtakım pikleri taşıyan geniş bir zarf şeklinde iken; idrar örneklerinin NMR profili, daha iyi çözünmüş pikler şeklindedir. Normal ve hastalıklı durumların metabolit profilleri birbirinden farklı olmaktadır. Mevcut Tez çalışması, NMR metabolit profillerinin, su baskılaması yapılmadan elde edilebileceğini göstermiştir. Ayrıca yüksek D₂O ve Düşük sıvı miktarı ile hazırlanan karışımın, idrar metabolit profilini elde etmek için basit bir yöntemle yol açtığını da ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Metabolit, 400 MHz NMR, kan, idrar, kanser, D₂O içeren karışımlar

ABSTRACT

MS THESIS

Investigation of Blood and Urine Metabolites of Cancer Patients with High Field NMR

Sibel TARHAN

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
BATMAN UNIVERSITY

Advisor: Prof. Dr. Ali YILMAZ
2021, 55 Pages

Jury
Prof. Dr. Mehmet Zafer KÖYLÜ
Prof. Dr. Ali YILMAZ
Prof. Dr. Ömer GÜLLÜ

ABSTRACT

High field NMR metabolite profiles of body fluids have been studied for a long time in order to compare the spectra of healthy and sick cases. The biggest problem encountered when conducting these examinations with natural biological fluid is the phenomenon of radiation damping caused by high water signal intensity. Pre-saturation pulse techniques that suppress water are used to prevent this phenomenon. However, these techniques do not allow the measurement of NMR relaxation times and cause time loss when measuring too many samples. For this reason, it remains important to search for more practical techniques.

In this study, 29 cancerous blood and urine samples and 28 normal blood and urine samples were collected. Mixtures were prepared by adding 0.02 mL of blood taken from each patient to 0.98 mL of D₂O and 0.06 mL of urine to 0.94 mL of D₂O. NMR measurements of these mixtures were carried out with a 400 MHz NMR spectrometer. Measurements were carried out at room temperature using a single pulse step.

While the high field NMR spectrum of blood metabolites is in the form of a large envelope carrying some peaks; The NMR profile of the urine samples is in the form of better resolved peaks. The metabolite profiles of normal and diseased conditions differ from each other. The current Thesis work has shown that NMR metabolite profiles can be obtained without water suppression. It also reveals that the mixture prepared with high D₂O and low liquid amount leads to a simple method to obtain the urine metabolite profile.

Keywords: Metabolites, 400MHz NMR, Blood, Urine, cancer, Mixtures with D₂O and fluids.

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında **yüksek miktarda D₂O sulandırılmış örnekler kullanılarak, Kanserli Hastaların Kan ve İdrar Metabolitlerinin Yüksek Alan NMR ile incelenmesi** amaçlandı. Karşılaştırmalı amaçlar için sağlıklı örneklerin metabolit profilleri de elde edildi. Bu çalışma, Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fizik Anabilim Dalı'nda "Yüksek Lisans Tezi" olarak hazırlanmıştır.

Tez çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen, bilgi ve birikimlerinden yararlandığım danışman hocam Prof. Dr. Ali YILMAZ 'a desteğinden dolayı saygı ve şükranlarımı sunarım. Örnek toplamada bize yardımcı olan Memorial Hastanesinden Doç.Dr. Mehmet Nafi SAKAR'a ve NMR ölçümlerine yardımcı olan Dicle Üniversitesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. M. Zafer KÖYLÜ'ye ve hiçbir zaman desteğini benden esirgemeyen değerli eşime teşekkürlerimi arz ederim.

Sibel TARHAN
BATMAN-2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET	IV
ABSTRACT	V
ÖNSÖZ	VI
İÇİNDEKİLER.....	VII
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	1
TABLolar LİSTESİ.....	2
1. GİRİŞ.....	3
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	23
2.2. TEMEL NMR TEORİSİ.....	23
2.2.1. Çekirdeğinin (protonun) manyetik özellikleri	23
2.2.2. Dış manyetik alanın tek spine etkisi.....	24
2.2.3. Dış Manyetik Alanın Spin Topluluğuna Etkisi ve Boltzmann Dengesi	25
2.4. KİMYASAL KAYMA	27
2.4.1. Sıvılarda kimyasal kaymanın nitel anlatımı.....	27
2.4.2. Sıvılarda kimyasal kaymanın nicel anlatımı	29
3. MATERYAL VE YÖNTEM	31
3.1. ÖRNEKLERİN HAZIRLANMASI.....	31
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	32
4.1. KANSERLİ KAN ÖRNEKLERİNİN SONUÇLARI.....	47
4.2. Sağlıklı Kan Örneklerinin Sonuçları.....	48
4.3. Kanserli ve Sağlıklı İdrar örneklerinin Sonuçları.....	48
4.4. TARTIŞMA	48
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	49
5.1. SONUÇLAR.....	49
5.2. ÖNERİLER.....	49
KAYNAKLAR.....	50

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 (a) I spininin kurduğu yerel alan (b) Çubuk mıknatısın kurduğu yerel alan	23
Şekil 2.1. $I=1/2$ spinli bir çekirdeğin H_0 dış manyetik alan içerisindeki farklı iki yönelimi ve bu yönelimlere karşılık gelen enerji seviyeleri.....	24
Şekil 2.3. Bir spinin enerji soğurma mekanizmaları.....	25
Şekil 2.4. Dış manyetik alanın yokluğundaki spin topluluğunun manyetik momentlerinin yönelimi.....	26
Şekil 2.5 Dış manyetik alan içerisinde bulunan spin topluluğu ve Boltzmann dengesi.....	26
Şekil 2.6. Farklı kimyasal çevrelerin kurduğu yerel alanlar ve bileşke alan.....	28
Şekil 2.7. Bir örnekteki bileşke alanlara göre enerji seviyelerine dağılımı ve oluşan manyetizasyonlar.....	28
Şekil 2.8. Bir CH_3CH_2OH molekülündeki farklı çevrelerin kimyasal kayması.....	29
Şekil 2.9. Küresel bir molekülün kimyasal kaymasına yol açan yerel manyetik alanın dış H_0 alanına eklenmesi.....	30
Şekil 4.1. D_2O ile hazırlanan kanserli kan örneğinin 400 MHz NMR spekturmu.....	32
Şekil 4.2. D_2O ile hazırlanan kanserli kan örneğinin 400 MHz NMR spekturmu.....	33
Şekil 4.3. D_2O ile hazırlanan kanserli kan örneğinin 400 MHz NMR spekturmu.....	34
Şekil 4.4. D_2O ile hazırlanan kanserli kan örneğinin 400 MHz NMR spekturmu.....	35
Şekil 4.5. D_2O ile hazırlanan kanserli kan örneğinin 400 MHz NMR spekturmu.....	36
Şekil 4.6. D_2O ile hazırlanan sağlıklı kan örneğinin 400 MHz NMR spekturmu.....	37
Şekil 4.7. D_2O ile hazırlanan kanserli idrar örneğinin 400 MHz NMR spekturmu.....	38
Şekil 4.8. D_2O ile hazırlanan kanserli idrar örneğinin 400 MHz NMR spekturmu.....	39
Şekil 4.9. D_2O ile hazırlanan kanserli idrar örneğinin 400 MHz NMR spekturmu.....	40
Şekil 4.10. D_2O ile hazırlanan kanserli idrar örneğinin 400 MHz NMR spekturmu.....	41
Şekil 4.11. D_2O ile hazırlanan kanserli idrar örneğinin 400 MHz NMR spekturmu.....	42
Şekil 4.12. D_2O ile hazırlanan kanserli idrar örneğinin 400 MHz NMR spekturmu.....	43
Şekil 4.13. D_2O ile hazırlanan sağlıklı idrar örneğinin 400 MHz NMR spekturmu.....	44
Şekil 4.14. D_2O ile hazırlanan sağlıklı idrar örneğinin 400 MHz NMR spekturmu.....	45
Şekil 4.15. D_2O ile hazırlanan diabetli idrar örneğinin 400 MHz NMR spekturmu.....	46

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 4.1 Ölçülen kanserli kan ve kanserli idrar örneklerinin spektrumdaki bazı biyokimyasal

Parametreleri.....47



1. GİRİŞ

Vücut sıvılarının metabolitleri, NMR profilini tespit etmek, metabolit piklerini belirlemek, sağlıklı ve hastalıklı vakaları karşılaştırmak için uzun süredir araştırılmaktadır [London ve ark, 2000; Beckonert ve ark, 2007; Emwas ve ark, 2013; Monleon ve ark, 2013]. Çeşitli hastalıkların ve özellikle kanser vakalarının teşhisi, metabolitlerin ana hedefi olmuştur [Holmes ve ark, 2008, Spratlin ve ark, 2009, Zamani ve ark, 2014, Emwas ve ark, 2015, Chan ve ark, 2016, Hao ve ark, 2016, Louis ve ark, Vahabi 2017]. Metabolitler ayrıca, tanı için biyobelirteçler olarak kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. [Liu ve ark, 2014, Puchades-Carrasco ve ark, 2016, Lin ve ark, 2017, Min ve ark., 2017]. Bu çalışmalar sonucunda metabolitler tanı amaçlı kullanılmaya başlanmıştır.

Yüksek alan NMR spektrometreleri ile proton spektrumlarını alırken karşılaşılan en büyük sorun, yüksek sinyal şiddetinin neden olduğu radyasyon sönümleme olgusudur. (Zengin ve ark, 2000). Yüksek su sinyali, metabolit sinyallerini bastırarak onları görünmez hale getirir. Bu problem çoğunlukla su bastırma için pre-saturation puls tekniği kullanılarak aşılar (Foxell ve ark, 1992). Bazı çalışmalarda sorun %50 veya daha az D₂O ve %50 veya daha fazla numune karışımı kullanılarak çözülmüştür. [Reglinski ve ark, 1996; Messana ve ark, 1198]. Bu gibi durumlarda, sinyal şiddetini azaltmak için 90 derece yerine daha küçük RF sinyalleri uygulanır. [Foxall ve ark, 1992] Doygunluk öncesi darbe tekniğini gerektirmeyen ve 90 derece atım kullanımına dayalı bir ölçümün daha doğrudan ve daha doğal bir ölçüm olacağı açıktır.

Çok yüksek D₂O (%94 0r %98) ve çok düşük oranda kist veya apse (%6 veya %2) karışımının NMR radyasyon damping etkisini bastırmada başarılı olduğu gösterilmiştir. [Yılmaz ve ark, 2020]. Bu yeni yaklaşım, numuneye dayalı manyetik alan homojenliğini en aza indirir ve T₂ gevşemesinin ölçümünün hassasiyetini artırır. Bu yöntem aynı zamanda T₁ ve T₂ durulmalarının doğrudan ölçülmesine izin verir. Ek olarak, yüksek D₂O varlığında, çeşitli hastalık gruplarını ayırt etme potansiyeli, herhangi bir hastalık grubunun herhangi bir pik durulma dağılım aralığı daraldıkça önemli ölçüde artar. [Yılmaz ve ark, 2020].

NMR metabolitleri genellikle serum, idrar ve tükürük gibi vücut sıvılarının ölçümlerinden elde edilir. Bununla birlikte, kan metabolitlerinin diğer vücut sıvısı metabolitlerine daha fazla bilgi ekleyebildiği görüldüğünden, NMR kan metabolitleri ile

ilgili çalışmalar son yıllarda artmıştır. [Graaf ve Behar 2003, Gowda ve Raftery 2017, Song ve ark, 2019) Bu ilgi, kanın insan vücudundaki her canlı hücre ile yakın ilişkisi ve kanın kolay elde edilmesi ile ilgilidir.

Bu çalışmanın temel amacı, %98 D₂O ve %2 tam kan ve, %94 D₂O ve %6 idrar içeren karışımları kullanarak, sağlıklı ve kanserli kanın yüksek alan NMR kan metabolit profillerini elde etmek ve karşılaştırmaktır. Bu amaç için, kanserli hastalardan ve sağlıklı gönüllülerden kan ve idrar örnekleri alındı. Solvent olarak D₂O kullanılarak hazırlanan kan ve idrar örneklerinin metabolit profilleri yüksek alan NMR ile elde edildi. Elde edilen profiller daha sonra bu çalışmanın amaçları doğrultusunda değerlendirildi.

2.KAYNAK ARAŞTIRMASI VE NMR TEORİSİ

2.1 KAYNAK ARAŞTIRMASI

Beckonert O. ve arkadaşları İdrar, plazma, serum ve doku özütlerinin NMR spektroskopisi için metabolik profillem, metabolomik ve metabonomik prosedürler adlı çalışmalarında; Metabolik profillem, metabolomik ve metabonomik çalışmalar esas olarak biyolojik sıvıların, doku ve hücre özütlerinin NMR spektroskopisi ve / veya kütle spektrometrisi (MS) kullanılarak çok bileşenli analizini yapmıştır. Modern metabolik araştırmalardaki ana NMR spektroskopik uygulamalarını özetlenmiş ve dokulardan polar ve lipofilik metabolitlerin ekstraksiyonu dahil olmak üzere biyoakışkan (idrar, serum / plazma) ve doku örneği toplama ve hazırlama için ayrıntılı protokoller sağlanmıştır. Standart 1D spektroskopisi, gevşeme düzenlenmiş, difüzyonla düzenlenmiş ve 2D J çözümü darbe dizileri gibi 1H NMR spektroskopik teknikler, farklı metabolit gruplarını izlemek için analiz aşamasında yaygın olarak kullanılmış ve burada açıklanmıştır. Bunları genellikle daha ayrıntılı istatistiksel analiz veya biyobelirteç keşfi için ek 2D NMR analizi ile desteklemiştir (Beckonert ve ark., 2003).

Chan AW ve arkadaşları Mide kanseri tanısı için 1H-NMR üriner metabolomik profillem adlı çalışmalarında: GC'nin iyi huylu mide hastalığı (BN) ve sağlıklı (HE) hastalara kıyasla benzersiz bir üriner metabolomik profile sahip olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır.43 GC, 40 BN ve 40 eşleşen HE hastasından alınan idrar, (1) H nükleer manyetik rezonans ((1) H-NMR) spektroskopisi kullanılarak analiz edilmiş ve 77 tekrarlanabilir metabolit (QC-RSD <%25) oluşturulmuştur. Tek değişkenli ve çok değişkenli (MVA) istatistikler kullanılmıştır. GC ve HE'nin cimri bir biyobelirteç profili,

LASSO düzenlenmiş lojistik regresyon (LASSO-LR) kullanılarak araştırılmıştır. Model performansı, Alıcı İşletim Karakteristiği (ROC) eğrileri kullanılarak değerlendirilmiştir. Araştırmada: GC net bir ayırmacı biyobelirteç profili gösterdi; BN profili GC ve HE ile örtüşüyordu. LASSO-LR, üç ayırt edici metabolit tanımladı: 2-hidroksiizobütirat, 3-indoksilsülfat ve alanin, 0.95'lik bir ROC altında bir alan ile ayırt edici bir model üretildi. GC hastalarının farklı bir üriner metabolit profili olduğu bulundu. Bu çalışma, erken GC teşhisi için metabolik profillemeye için klinik potansiyeli göstermektedir (Chan ve ark., 2016).

Craig A ve arkadaşları, NMR spektroskopik metabonomik veri setlerinde ölçekleme ve normalizasyon etkileri adlı çalışmalarında, Bu çalışmada, genellikle normalizasyon (bir tablo satırı işlemi) ve ölçekleme (bir tablo sütun işlemi) olarak adlandırılan operasyonlar için tanımlar önerilmiş ve tartışılmış ve bunların ihtiyaçlarını idrardan türetilen ¹H NMR spektroskopik veri setlerinde gösterilmiştir. "Bölünmüş" verilerle ilişkili sorunlar (ör. ayırık spektral bölgeler üzerinde entegre edilmiş değerler) de tartışılmış ve idrarla ilgili analitik verilerin belirli biyolojik bağlam problemleri vurgulanmıştır. Sabit bir toplama normalleştirilmenin kullanıldığı veri kümeleri için korelasyon katsayılarının hesaplanmasında özen gösterilmesi gerektiği gösterilmiştir. Diğer biyo-akışkanlar, diğer analitik yaklaşımlar (örneğin, HPLC-MS) ve aslında diğer "omik" teknikler (yani, transkriptomikler veya proteomikler) ve "kaynaşmış" veri setleriyle entegre çalışmalar için benzer değerlendirmelere ihtiyaç duyulmuştur. Veri ön işlemenin bağlama bağlı olduğu ve genel kullanım için tek bir yöntemin olamayacağı sonucuna varılmıştır (Craig A ve ark., 2006).

Deja S ve arkadaşları, Metabolomikler, akciğer kanseri evrelemesi ve kronik obstrüktif akciğer hastalığından ayırt etme konusunda yeni bilgiler sağlar adlı çalışmalarında şunlara vurgu yapmıştı, Akciğer kanseri, dünya çapında kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedeni olmaya devam ediyor. Erken teşhis, hayatta kalma süresini uzatmak için gerekli olduğu kanıtlanmıştır. Genomik ve proteomik gelişmeler, hastalığı daha erken bir aşamada tespit etme ve teşhis etme çabasına ivme kazandırmıştır. Son zamanlarda, tümör oluşumu ve ilerlemesi ile ilişkili metabolitlerin incelenmesi, bu çabaya yardımcı olmak için kanser metabolomikleri çağını başlatmıştır. (Deja S ve ark., 2014)

Dona AC ve arkadaşları, Büyük ölçekli metabolik fenotipleme için insan idrarı, kanı ve plazmasının hassas yüksek verimli proton NMR spektroskopisinde

incelenmesi adlı çalışmalarında, Bu çalışmada, numune hazırlama, spektrometre parametreleri, NMR darbe dizileri, iş hacmi, tekrar üretilebilirlik, kalite kontrol ve çözünürlük dahil olmak üzere büyük deneysel koşulları dikkatlice değerlendiren ayrıntılı bir dizi güncellenmiş protokol sunulmuştur. Bu sonuçlar, NMR spektroskopisi kullanımını farklı büyük biyoakışkan örnekleri kohortlarında kolaylaştıran deneysel bir platform sağlar ve kişiselleştirilmiş sağlık bakımı için bir ön koşul olan global metabolik profillemenin entegrasyonunu temin eder (Dona AC ve ark., 2014)

Emwas A-H ve arkadaşları, NMR tabanlı metabolomik çalışmalarda idrarı kullanmak için deneysel koşulların, tanısal çalışmalara özel bir odaklanma ile standart hale getirilmesi adlı çalışmalarında, Bu çalışmada, metabolomik çalışmaların sonuçlarını etkileyebilecek anahtar değişkenleri belirlemek amacıyla NMR tabanlı idrar metabolik profili üzerine yayınlanmış çok sayıda çalışma gözden geçirilmiştir. Bu anketten, deneysel tasarımda standardizasyon veya dikkatli muhasebe gerektiren bir dizi sorunu tespit edilmiş ve idrar toplama için bazı öneriler sunulmuştur (Emwas A-H ve ark., 2015).

Emwas A-HM ve arkadaşları, İnsan hastalıkları tanısında NMR tabanlı metabolomikler: uygulamalar, sınırlamalar ve öneriler adlı çalışmalarında, Son zamanlarda, nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR) tabanlı metabolomik analiz ve çok değişkenli istatistiksel teknikler, insan hastalıklarının başlangıcı ve ilerlemesi ile ilişkili küçük moleküllerdeki değişiklikleri profilelemek için çok disiplinli bir yaklaşıma dahil edilmiştir. Bu çabaların amacı, (1) farklı hastalık aşamalarını ayırmak da dahil olmak üzere hastalıkları doğru bir şekilde tahmin etmek ve teşhis etmek; (2) hastalığın patogenezinde ve ilerlemesinde altta yatan yollara ilişkin içgörüler sağlamak ve (3) hastalığın tedavisine yardımcı olmak ve ilaçların etkinliğini değerlendirmektir. Bu derlemede, son 5 yılda insan kan örneklerinde hastalık biyobelirteçlerinin araştırılmasında NMR bazlı metabolomiklerin uygulamasındaki son gelişmeler tartışılmıştır. (Emwas A-HM ve ark., 2013)

Gowda ve arkadaşları; ¹H NMR Spektroskopisi ile Tam Kan Metabolomikleri, Koenzimleri ve Antioksidanları Değerlendirmek İçin Yeni Bir Fırsat Sağlıyor adlı çalışmalarında, Redoks reaksiyonlarının koenzimleri: oksitlenmiş/indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺ ve NADH) ve

nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP + ve NADPH); adenosin trifosfat (ATP), adenosin difosfat (ADP) ve adenosin monofosfat (AMP) dahil enerji koenzimleri; ve antioksidanlar, oksitlenmiş ve indirgenmiş glutatyonun (GSSG ve GSH) toplamı, esasen hiçbir ek çaba olmaksızın ölçülebilmektedir. Bu kararsız türlerin çoğunu diğer kan/kan plazma metabolitlerini etkilemeden tespit etmek için yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Kandaki NMR spektrumlarındaki koenzimlerin ve antioksidanların kimlikleri, 1D/2D NMR tekniklerini, kimyasal kayma veri tabanlarını, pH ölçümlerini ve son olarak otantik bileşiklerle spike yaparak oluşturulmuştur. Bu, ana koenzimlerin ve antioksidanların tanımlanmasını bildiren ve bunları NMR spektroskopisi kullanılarak insan kanındaki diğer metabolitlerin büyük havuzuyla eşzamanlı olarak ölçen ilk çalışmadır. Koenzim ve antioksidan düzeylerinin sağlıkta ve çeşitli hastalıklarda hücresel işlevlerin hassas bir ölçüsünü temsil ettiği düşünüldüğünde, burada sunulan NMR yöntemi, kan metabolomiklerinin incelenmesine yeni bir alan açar (Gowda ve ark., 2017)

Falegan OS ve arkadaşları, İdrar ve kan metabolomik analizleri renal hücreli karsinomun evrelerini ayırt edebilir adlı çalışmalarında, Renal hücreli karsinom (RCC), hastalığın geç dönemlerine kadar genellikle asemptomatik olan heterojen bir hastalıktır. Tanı ve prognostik amaçlar için klinik olarak yararlanılabilecek RCC'ye özgü biyobelirteçlere acil ihtiyaç vardır. Ameliyat öncesi açlık idrar ve serum numuneleri klinik böbrek kitlesi olan hastalardan toplanan ile değerlendirilmiştir. 1 H NMR ve GCMS (Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi) göre ölçümler yapılmıştır. Metabolitler incelenerek ve çok değişkenli istatistiksel analizler yapılarak, iyi huylu kitlelere göre SSB'de glikolitik ve trikarboksilik asit (TCA) döngüsü ara maddelerinin düzeylerinde değişiklikler tespit edilmiştir. Bu pilot çalışma, idrar ve serum metabolomiklerinin iyi huylu böbrek tümörlerini RCC'den ayırt etmede ve RCC'nin evrelendirilmesinde yararlı olabileceği önerilmiştir (Falegan OS ve ark., 2017)

Fan TWM ve arkadaşları, NMR ile metabolitlerin ve izotopomerlerin yapı bazlı profili adlı çalışmalarında, NMR, biyoyakıtlar veya ham hücre/doku özütleri gibi fraksiyone olmayan bir karışımdaki metabolitleri tanımlamak ve ölçmek için kullanılabildiğinden özellikle güçlüdür, aynı zamanda ¹³C gibi kararlı izotoplarda zenginleştirilmiş bir öncüden türetilen metabolitlerin konumsal izotopomer dağılımlarını da belirleyebilir. Bu makalede, ya [U- ¹³C] -glukozda ya da [Kaynak izleyicileri olarak U- ¹³C, ¹⁵N] -glutamin ile deneyler yapılmıştır. Bu tür deneyler tarafından

sağlanan bilgiler, daha fazla metabolik akı modellemesinin temeli olan metabolik yolların açık bir şekilde yeniden inşasını mümkün kılmıştır. (Fan TWM ve ark., 2008)

Fonville JM ve arkadaşları, Biyolojik sıvıların tam çözünürlüklü J çözümü 1H NMR projeksiyonlarının metabonomi bilgilerinin alınması ve biyobelirteç tanımlama için değerlendirilmesi çalışmalarında vurgulanan hususlar, Biyolojik numunelerin spektroskopik profili, metabolik olarak yönlendirilen yukarıdan aşağı sistem biyolojisinin ayrılmaz bir parçasıdır ve toksisite ve hastalık biyobelirteçlerini tanımlamak için kullanılabilir. Bununla birlikte, optimal biyobelirteç bilgisinin geri kazanımı ve rezonans ataması, NMR tabanlı karmaşık karışım analizinde hala önemli zorluklar oluşturmaktadır. İki boyutlu (2D) J-çözülmüş (JRES) NMR spektrumları projelendirilirken elde edilen azaltılmış sinyal örtüşmesi, bu sorunu azaltmak için kullanılabilir ve burada tam çözünürlüklü (1) H JRES projeksiyonları, metabolik bir araç olarak değerlendirilmiştir. Tarama ve biyobelirteç tanımlama. JRES projeksiyonlarındaki kurtarılabılır bilgi içeriğinin, geleneksel tek boyutlu (1D) ve Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) spektrumlarından doğal olarak farklı olduğu gösterilmiştir, yüksek oranda bölünmüş çoklu tepe noktalarının aşırı temsiline azaltılmasının ve gevşetme düzenlemesinin birleşik sonucu nedeniyle. Tam çözünürlüklü JRES spektral verilerinin temel bileşen ve korelasyon analizleri, tepe hizalamasının gerekli olduğunu göstermiştir. JRES projeksiyonlarına istatistiksel toplam korelasyon spektroskopisinin (STOCSY) uygulanması, geleneksel 1D ve CPMG spektrumlarına kıyasla JRES (1) H NMR spektrumlarında önceden örtüşen küçük molekül rezonanslarının tanımlanmasını geliştirmiştir. Bu yaklaşımlar, sıçanlarda galaktozamin ile indüklenen bir hepatotoksisite çalışması kullanılarak gösterilmiştir ve JRES projeksiyonlarının, gelişmiş biyobelirteç tanımlaması için karmaşık karışım analizinde standart tek boyutlu deneylere faydalı ve tamamlayıcı bir role sahip olduğunu göstermiştir. Tam çözünürlüklü JRES spektral verilerinin temel bileşen ve korelasyon analizleri, tepe hizalamasının gerekli olduğunu göstermiştir (Fonville JM ve ark., 2010).

Giskeodegard GF ve arkadaşları, Kandaki metabolik belirteçler prostat kanserini iyi huylu prostat hiperplazisinden ayırabilir adlı çalışmalarında, 29 PCa hastasından ve BPH'li 21 kontrolden alınan kan plazması ve serum örnekleri, manyetik rezonans spektroskopisi, kütle spektrometrisi ve gaz kromatografisi kullanılarak metabolomik analiz ile analiz etmişlerdir. Kan metabolik paternlerindeki farklılıklar çok değişkenli ve tek değişkenli istatistiklerle incelenmiştir. Farklı metodolojik

platformlardan alınan sonuçların birleştirilmesiyle, PCa hastaları ve kontroller sırasıyla %81,5 ve %75,2 duyarlılık ve özgüllük ile ayrılmıştır. Serum ve plazma örneklerinin farklı metabolomik ölçüm teknikleriyle kombine analizi, PCa ve kontrollerin başarılı bir şekilde ayrılmasını sağlamış ve PCa'nın karakteristik süreçlerine ilişkin metabolik belirteçler ve içgörü sağlamıştır. Sonuçlar, BPH ile karşılaştırıldığında PCa için belirteçler olarak yağ asidi (açilkarnitinler), kolin (gliserofosfolipidler) ve amino asit metabolizmasında (arginin) değişiklikler gösterdiği saptanmıştır (Giskeodegard GF ve ark., 2013).

Holmes E ve arkadaşları, Sağlıkta ve hastalıkta metabolik fenotipleme çalışmalarında, Çeşitli spektroskopik yöntemler kullanılarak idrar ve plazma gibi vücut sıvılarındaki metabolitlerin (küçük moleküller <1 kDa) analiz edilmesi, bireylerin veya popülasyonların metabotipi (metabolik fenotip) hakkında bilgi, kişiselleştirilmiş tıp veya halk sağlığı hizmetlerine uygulanabilecek bilgiler sağlanmıştır. (Holmes E ve ark., 2008)

Izquierdo-Garcia JL ve arkadaşları, Mevcut NMR tabanlı metabolomik veri analizi paketlerinin açıklayıcı incelemesi çalışmalarında, Bu çalışma, tek tip olmayan örneklenmiş spektrumların çok boyutlu ayrışım (MDD) ile analiz edilmesinin zorluklarını ele almak için geliştirilen yaklaşımlardan birini açıklamak için yapılmıştır. MDD, önemli bir süre paralel faktör analizi (PARAFAC), kanonik ayrıştırma ve üç yollu ayrıştırma gibi yöntemlerdir. Bu yöntem psikometride ilk kez uygulanmıştır ve fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme (fMRI), elektro ensefalografi (EEG) ve diğer alanlarda sinyal işleme ve veri analizi için başarıyla kullanılmıştır. İnceleme, deneysel veri setindeki eksik verilerin büyük bir kısmını verimli bir şekilde ele alabilen bir algoritmaya odaklanılmıştır (Izquierdo-Garcia JL ve ark., 2011).

Jacob D ve arkadaşları, H-1-NMR metabolomik verilerinden metabolit tanımlaması için etkili bir spektrum işleme yöntemi çalışmalarında, Kovalar adı verilen ilgili değişkenleri üreten yeni bir veri azaltma algoritması kullanarak bileşik tanımlama için yararlı destek sağlayan verimli bir spektra işleme yöntemi önerilmiştir. Bu kovalar, karmaşık karışım spektrumlarında bulunan ilgili tüm piklerin, önemli olmayan herhangi bir sinyalden arındırılmasının sonucudur. Bir dizi numunedeki her bileşiğin konsantrasyon değişkenliğinden yararlanan ve bu kovaları kümeler halinde birbirine bağlayan önemli korelasyonlara dayanan yöntem, ayrıca bu kümeleri İnsan Metabolom Veritabanındaki referans bileşiklerin spektrumları ile eşleştirerek metabolitlerin otomatik

olarak atanmasını önermiştir veya ev yapımı bir veritabanı. Bu yeni yöntem, bazı işleme parametrelerinin etkisini belirlemek için bir dizi simüle edilmiş (1) H-NMR spektrumuna ve kavramın bir kanıtı olarak, bir domates 1H-NMR veri kümesine uygulanmıştır. Hem kümeleme hem de eşleştirme adımları için uygulama kodu, ilgili yazara istek üzerine sağlanır. Yöntem ayrıca bu kümeleri İnsan Metabolom Veritabanından veya ev yapımı bir veritabanından alınan referans bileşiklerin spektrumları ile eşleştirerek metabolitlerin otomatik olarak atanmasını önermektedir (Jacob D ve ark., 2013).

Jobard E ve arkadaşları, Gelişmiş metastatik insan meme kanserinin serum nükleer manyetik rezonans temelli metabolomik imzası çalışmalarında, Meme kanseri (BC), histolojiden prognoza, metastatik evrime ve tedavi yanıtlarına kadar yüksek bir heterojenite sergiler. Burada, lokalize erken hastalık (EBC) ile karşılaştırıldığında ileri metastatik meme kanseri (MBC) ile ilişkili koordineli metabolik serum değişikliklerini tanımlamayı amaçlayan bir 1H NMR bazlı metabolik fenotipleme çalışması sunulmuştur. EBC ve MBC hastalarını ayırt eden bir model elde edilir (n = 85: 46 EBC ve 39 MBC) ve bağımsız bir kohortla doğrulanmıştır (n = 112: 61 EBC ve 51 MBC; %89,8 duyarlılık, %79,3 özgüllük). Bu ayırmada yer alan istatistiksel olarak önemli 9 metabolit tanımlanmıştır: histidin, asetoasetat, gliserol, piruvat, glikoproteinler (N-asetil), mannoz, glutamat ve fenilalanin. Bu çalışma, NMR metabolik fenotiplemesinin tanı, prognoz ve prognoz için güçlü potansiyelini göstermiştir (Jobard E ve ark., 2014).

Kertesz TM ve arkadaşları Kütle spektrometrisine dayalı metabonomi için karmaşık biyoakışkanlardaki metabolitlerin yapısal tanımlanması için veritabanı araştırması çalışmalarında, Metabonomi/metabolomik, biyolojik sistemlerin anlaşılması ve metabolitlerin profili yoluyla davranışlarının tahmin edilmesi için önemli bir bilimdir. Biyolojik sıvılardaki metabolit profillerini analiz etmek için rutin olarak iki teknoloji kullanılır: Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopisi ve kütle spektrometresi (MS), ikincisi tipik olarak sıvı kromatografi (LC) gibi bir kromatografi sistemine heceleme ile bilinen bir konfigürasyonda LC – MS olarak. Hem NMR hem de MS tabanlı tespit teknolojileri ile, biyolojik numunedeki metabolitlerin tanımlanması önemli bir engel ve darboğaz olmaya devam etmektedir. Bu makale, NMR spektroskopisi kullanılarak biyolojik sıvılarda metabolit tanımlama yöntemlerine rehberlik etmekte ve fareler üzerinde yapılan son çalışmalardan örneklerle açıklanmıştır. (Kertesz TM ve ark.,2009)

Kumar D ve arkadaşları, Süzölmüş prostat kanseri serumunun NMR spektroskopisi: metabolomikte yeni bir sınır isimli çalışmalarında, Çalışma, şüpheli PC, BPH ve sağlıklı denek kohortundan (HC) 210 filtrelenmiş serumdan oluşmaktadır. Filtrelenmiş serum yaklaşımı, (1) H NMR spektroskopisini kullanarak 52 metabolitin tanımlanmasını ve ölçülmesini betimler. Tüm denekler klinik değerlendirmelere (DRE, PSA ve TRUS) ve ardından gerekirse Gleason skoru için biyopsi geçirmiştir. NMR ile ölçülen metabolitler ve klinik değerlendirme verileri, her kohort için imza tanımlayıcılarını araştırmak için doğrusal çok değişkenli ayırıcı fonksiyon analizi (DFA) kullanılarak ayrı ayrı incelenmiştir. DFA, glisin, sarkozin, alanin, kreatin, ksantin ve hipoksantin anormal prostatı (BPH + PC) belirleyebildiğini gösterdi. DFA tabanlı sınıflandırma, HC'yi BPH + PC'den ayırt etmede yüksek hassasiyet (NMR ile %86,2 ve klinik laboratuvar yöntemiyle %68,1) göstermiştir. DFA, alanin, sarkozin, kreatinin, glisin ve sitratın PC'yi BPH'den ayırt edebildiğini ortaya koymaktadır. DFA tabanlı kategorizasyon, PC'yi BPH'den ayırmak için yüksek doğruluk (NMR ile %88,3 ve klinik laboratuvar yöntemiyle %75,2) gösterilmiştir. Filtrelenmiş serum numunesinin H NMR tabanlı metabolik profili, kendine özgü metabolik profili ile PC ve BPH'nin araştırılması ve öngörülmesi için güven verici, hızlı ve en az invazif görülmüştür. Bu yeni teknik, sadece PC tayininin histopatolojik değerlendirmesiyle aynı seviyede değil, aynı zamanda metabolitleri tanımlamak için sıvı kromatografiye dayalı kütle spektrometresiyle de karşılaştırılmıştır (Kumar D ve ark., 2016).

Liang Q ve arkadaşları, Optimize edilmiş bir metabolomik yöntem kullanılarak hafif bilişsel bozukluğun Alzheimer hastalığına ilerlemesinin teşhisi için serum metabolitlerinin keşfi çalışmalarında, Hafif bilişsel bozukluğun (MCI) erken AD'yi temsil ettiği düşünülmektedir. Şu anda, MCI'nin AD'ye ilerlemesini izlemek için hassas araçlara büyük bir ihtiyaç vardır. Bu çalışmada, MCI deneklerinden ve yaşa uygun AD deneklerinden alınan serum örneklerindeki metabolik farklılıkları incelemek için hedeflenmemiş bir metabolomik yaklaşım geliştirilmiştir. Temel bileşen analizine dayalı olarak, AD ve MCI denekleri arasındaki metabolik farklılıklar belirlenmiştir. AD deneklerinin serumundaki dokuz metabolit, MCI deneklerinden önemli ölçüde farklıydı. Aday biyobelirteçler olarak iki metabolit seçilmiş ve ayrı ve bağımsız hasta kohortlarında doğrulanmıştır. Öngörü modeline en büyük katkıda bulunanlar, tatmin edici duyarlılık ve özgüllük sağlayan yukarı regüle edilmiş sfinganın-1-fosfat ve 7-ketokolesterol idi. MCI'nın olası AD'ye dönüşümünü tahmin etmek için potansiyel değeri

gösterir. Bu çalışma, MCI'nin AD'ye ilerlemesini izlemek için bir tanı aracı sağlayabilmiştir (Liang Q ve ark., 2016).

Li Y ve arkadaşları, Metabolomiklere dayalı olarak kardiyotoksitenin erken tahmini için biyobelirteçlerin taranması, doğrulanması ve optimizasyonu çalışmalarında, Doksorubisin (20 mg/ kg), izoproterenol (5 mg/ kg) ve 5-florourasil(125mg/kg) gibi bileşiklerin neden olduğu sıçan kardiyotoksiste modelleri oluşturulmuştur. Ultra performanslı sıvı kromatografi dört kutuplu uçuş zamanı kütle spektrometresi kullanarak metabolomiklere dayalı sıçan plazma örneklerinden veri toplanmıştır. Çok değişkenli istatistiksel ve entegrasyon analizlerinin ardından, kardiyotoksitenin biyokimyasal analiz ve histopatolojik değerlendirmeden daha önce öngören 39 biyobelirteç kardiyotoksiste iyonu seçilmiştir. Farklı toksisitelere sahip ilaçlar, diğer kardiyotoksik olmayan modellere (hepatotoksik ve nefrotoksik modeller) kıyasla benzer metabolik değişikliklere neden olabileceğinden, kardiyotoksitenin yüksek düzeyde spesifik 10 biyobelirteci elde edilmiştir. Daha sonra, özel biyobelirteçleri doğrulamak ve optimize etmek için öngörücü bir model geliştirmek için bir destek vektör makinesi (SVM) kullanılmıştır. Bu çalışmaya göre: l-Karnitin, 19-hidroksideoksikortikosteron, LPC (14: 0) ve LPC (20: 2), en güçlü özellikleri sergilenmiştir. SVM modelinin tahmin oranı %90.0' a kadar çıkmaktadır. Bu araştırma, ilaç güvenliği değerlendirmelerinde ve ikincil geliştirmede ilaca bağlı kardiyotoksitenin daha iyi anlaşılmasını sağlamış ve metabolomik yoluyla biyobelirteçlerin doğrulanması ve optimizasyonu için yeni fikirler ortaya koymuştur (Li Y ve ark., 2015).

Lin W ve arkadaşları, Metabolomikler ve hipokampal proteomikler yoluyla Alzheimer hastalığının tanısal biyobelirteçleri ve terapötik mekanizması üzerine çalışmalarında vurgulanan hususlar, Alzheimer hastalığı (AD), bunamanın ana nedenidir, ancak kesin teşhis ve tedavi şu ana kadar yeterli değildir. Bu çalışmanın amacı, AD'nin teşhisi ve daha iyi anlaşılması için biyobelirteçler ve terapötik hedefler geliştirilmiştir. Sonuç olarak, lizofosfatidilkolin ve plazmadaki sfinganın-1-fosfat, sfingosin-1-fosfat, sfingomiyelin ve sfingozin dahil olmak üzere sfingolipid metabolizmasının ara maddeleri, UPLC-Q-TOF-MS ve UHPLC-Q-Exactive-HANIM. Ayrıca, GstA3, Gstm1, Gstm5, Gstm3, Gstk1 ve Gstp1 dahil olmak üzere glutatyon S-transferazları (GST'ler) etiketsiz nano-LC-MS / MS kullanılarak AD hipokampusunda önemli ölçüde artmıştır. Böylelikle AD patogenezi, kolinin artması, ACh'nin azalması, GST'lerin artması ve glutamatın artması oksidatif strese ve

eksitotoksititeye yol açmıştır. Donepezil ve doğal bir ilacın etkileri metabolomik ve proteomiklerle değerlendirilmiştir. Özetle, yapılandırılmış AD sıçan modeli üzerinde proteomik ve metabolomik analizler, aday biyobelirteçleri ortaya çıkarmak için hızlı, duyarlı ve yüksek çözünürlüklü LC-MS yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir. Veriler, GST'lerin terapötik hedefler olarak büyük bir değere sahip olduğunu ileri sürmüştür. Bu çalışma, AD'nin tanı mekanizması ve ilaç keşfi için değerli bilgiler sağlanmıştır. (Lin W ve ark., 2017)

Lindon JC ve arkadaşları, Metabonomi ve Metabolomik El Kitabı isimli çalışmalarında, Metabolik profillemeye, metabolomik ve metabonomik çalışmalar esas olarak biyolojik sıvıların, doku ve hücre özütlerinin NMR spektroskopisi ve / veya kütle spektrometrisi (MS) kullanılarak çok bileşenli analizini içerir. Modern metabolik araştırmalardaki ana NMR spektroskopik uygulamalarını özetlenmiş ve dokulardan polar ve lipofilik metabolitlerin ekstraksiyonu dahil olmak üzere biyoakışkan (idrar, serum/plazma) ve doku örneği toplama ve hazırlama için ayrıntılı protokoller sağlanmıştır. Standart 1D spektroskopi, gevşeme düzenlenmiş, difüzyonla düzenlenmiş ve 2D J çözülmüş darbe dizileri gibi H NMR spektroskopik teknikleri, farklı metabolit gruplarını izlemek için analiz aşamasında yaygın olarak kullanılmış ve burada açıklanmıştır. Bunları genellikle daha ayrıntılı istatistiksel analiz veya biyobelirteç keşfi için ek 2D NMR analizi izler. Örnek başına standart edinme süresi, basit bir boyutlu spektrum için 4-5 dakikadır ve hem hazırlık hem de analiz, klinik tanı ve toksikolojik çalışmaların yanı sıra moleküler fenotipleme ve fonksiyonel genomik için yüksek verimli taramaya uygulamaya izin verecek şekilde otomatikleştirilebilmiştir (Lindon JC ve ark., 2007).

Liu Y ve arkadaşları, Hepatoselüler karsinomu karaciğer sirozundan ayıran serum biyobelirteçlerini tanımlamak için NMR ve LC/MS tabanlı global metabolomikler adlı çalışmalarında, Hepatoselüler karsinom (HCC) dünyadaki en yaygın kötü huylu tümörlerden biridir. Bununla birlikte, HCC'yi karaciğer sirozundan (LC) ayıran mevcut biyobelirteçler önemlidir, ancak sınırlıdır. Bu nedenle, HCC teşhisi için daha güvenilir biyobelirteçlere ihtiyaç vardır. HCC hastalarından, LC hastalarından ve sağlıklı gönüllülerden alınan serum, serum metabolik profillerini ayırt etmek için rastgele orman (RF) analizi ile birlikte NMR ve LC/MS tabanlı yaklaşım kullanılarak analiz edilmiştir. Otuz iki potansiyel biyobelirteç belirlendi ve bu biyobelirteçleri HCC tanısı için kullanmanın fizibilitesi değerlendirilmiştir, burada AFP değerleri 20 ng/

mL'den düşük olsa bile HCC hastalarının tespitinde %100 hassasiyet sağlanmıştır. HCC'nin neden olduğu metabolik değişiklikler, keton cisimciklerinin sentezinde, sitrat döngüsünde, fosfolipid metabolizmasında bozulmalar gösterilmiştir. HCC hastalarında sfingolipid metabolizması, yağ asidi oksidasyonu, amino asit katabolizması ve safra asidi metabolizması değişiklikler gösteriyor. Sonuçlarımız, tanımlanan bu potansiyel biyobelirteçlerin, HCC için daha fazla araştırılmayı hak eden tanısal ve/veya prognostik değerlere sahip olduğunu gösterilmiştir. Ek olarak, RF'nin metabolomiklerde biyolojik olarak ilgili özelliklerin seçimi için çok uygun bir sınıflandırma algoritması olmaktadır. (Liu Y ve ark., 2014)

Louis E ve arkadaşları, Kan plazmasında ölçülen metabolik değişiklikler yoluyla akciğer kanserinin tespitinde adlı çalışmalarında, Akciğer kanseri taramasında şu anda kullanılan araç olan düşük doz bilgisayarlı tomografi, yüksek oranda yanlış pozitif sonuçlarla karakterize edilmiştir. Biriken kanıtlar, kanser hücresi metabolizmasının normal hücrelerden farklı olduğunu göstermiştir. Bu nedenle bu çalışma, kan plazmasının metabolik fenotipinin akciğer kanserinin saptanmasına izin verip vermediğini değerlendirmeyi amaçlamıştır (Louis E ve ark., 2016).

Ludwig C ve arkadaşları, İki boyutlu J çözümü NMR Spektroskopisi: metabolomik araç kutusundaki önemli bir metodolojinin gözden geçirilmesi adlı çalışmalarında, Tek boyutlu (1D) (1) H NMR spektroskopisi, metabolomikte lider bir analitik teknoloji olmaya devam etmektedir. Bu yaklaşımın avantajları, nispeten hızlı spektral edinimi ve tek bir dahili standarda dayalı olarak metabolit konsantrasyonunun doğrudan bir ölçüsünü sağlayan NMR rezonanslarını içerir. Bununla birlikte, şiddetli spektral tıkanıklık, hem metabolit tanımlamasını hem de miktar tayini önemli ölçüde engelleyebilir. İki boyutlu (1) HJ-çözümü (JRES) NMR spektroskopisi, 1D NMR'nin pek çok faydasını korur, ancak ek olarak üst üste binen rezonansları ikinci bir boyuta dağıtır, tıkanıklığı azaltır ve metabolit özgüllüğünü artırır. Metabolomiklere bu yaklaşımın faydası ilk olarak altı yıl önce gerçekleştirildi ve o zamandan beri bitki ve hayvanların biyolojik, tıbbi ve çevresel çalışmalarında kullanılmıştır. Burada, 2D JRES NMR deneyine temel bir giriş sağlanmış ve ardından, metabolomik uygulamalar bağlamında spektral edinim ve işleme stratejilerini tartışılmış ve bazı önemli önerilerle sonlandırılmıştır: uyarım şekillendirme ile çift spin-eko dizisi kullanarak elde etme; SEM pencere işlevini kullanarak işleme, eğme ve simetrikleştirme, isteğe bağlı olarak bir ufuk çizgisi projeksiyonu gibi. JRES spektroskopisini metabolomik araç kutusuna uygulamak

için stratejiler, metabolik parmak izi, metabolit tanımlama ve metabolit kantifikasyonundaki rolleri dahil olmak üzere daha sonra değerlendirilmiştir. JRES metabolomikleri için kamu kaynakları ve veri standartları gözden geçirilmiştir (Ludwing C ve ark., 2010).

MacKinnon N ve arkadaşları, İdrarın NMR Tabanlı Metabolomik Profili: Prostat Kanseri Tespitinde Uygulama için Değerlendirme adlı çalışmalarında, Prostat kanserinin (PCa) saptanması ve hastalığın agresif formlarına karşı ağrısız formlarının ayırt edilmesi kritik bir klinik zorluktur. Mevcut klinik test, 4 ila 10 ng/mL aralığında kanser teşhisinde belirli zorluklarla karşılaşan, dolaşımdaki prostata özgü antijen seviyeleridir. Böylece, invazif olmayan bir biyobelirteç paneli oluşturmaya yönelik uyumlu bir çaba gelişmiştir. Bu raporda, biyopsi negatif bireylere karşı biyopsi pozitif bireylerin idrarında ölçülen nükleer manyetik rezonans (NMR) kaynaklı metabolomik profillerin, potansiyel biyobelirteç sinyallerinin bir seçimini belirleyeceği hipotezi araştırılmıştır. 317 kişiden (111 biyopsi-negatif, 206 biyopsi-pozitif) alınan idrar örneklerinin ¹H NMR spektrumları analiz edilmiştir. İki sınıfı ayırt edebilen sinyalleri aday göstermek için çift çapraz doğrulama kısmi en küçük kareler ayırt edici analiz modelleme tekniği kullanılmıştır. Değişken seçim protokolleri uygulandıktan sonra, lojistik regresyon analizinden sonra 29 değişkenli bir alt kümenin eğri (AUC) değeri altında 0.94 değerinde bir alan ürettiği, 18 değişkenden oluşan bir "ana listenin" bir alıcı çalışma karakteristiği ROC) AUC ürettiği gözlemlenmiştir (MacKinnon N ve ark., 2019).

Messana I ve arkadaşları, Tip II diyabetik hastalarda idrarın proton nükleer manyetik rezonans spektral profilleri adlı çalışmalarında, 33 tip II diyabetik hasta ve 20 kontrol deneginin seri idrar örnekleri ¹H nükleer manyetik rezonans (NMR) ile incelenmiştir. Diyabetik hastalarda daha yüksek konsantrasyonlarda olmakla birlikte tüm deneklerde laktat, sitrat, glisin, alanin, hippurat, trimetilamin-N-oksit ve dimetilamin gibi metabolitler tespit edilmiştir. Kreatin, asetat, betain ve keton cisimleri gibi diğer analitler, diyabetiklerde kontrollere göre daha sık ve daha yüksek konsantrasyonlarda bulunmuştur. Ek olarak, artan glikozüri ve glikohemoglobin ile laktat, sitrat, alanin ve hippurat konsantrasyonları artmasına rağmen, trimetilamin-N-oksit ve dimetilamin, iyi metabolik kontrolü olan diyabetiklerde bile yüksek konsantrasyonlarda bulunmuştur. ¹H NMR spektroskopisi, idrar örneklerinde bulunan metabolitler arasındaki ilişkilerin keşfedilmesini ve tip II diyabetik hastalarda hastalık durumu hakkında bilgi edinilmesine izin vermiştir (Messana I ve ark., 1998).

Mikkonen JJ ve arkadaşları, Ağız kanseri ve periodontal hastalıkların tanısında tükürük metabolomikleri çalışmalarında, Metabolomik, metabolizma süreci tarafından üretilen küçük moleküller olan metabolitlerin sistemik bir çalışmasıdır. Tükürüğün metabolik profili, ağız kanseri ve periodontal hastalıklar dahil çok çeşitli hastalıklarla ilişkili değişikliklerin erken bir görünümünü sağlayabilir. Bu çalışmada sunulan farklı yöntemler kullanılarak hastalığa özgü metabolitlerin düzeylerini ölçmek mümkündür. Bununla birlikte, farklı ağız hastalıklarının karmaşık metabolik yollarının tam olarak anlaşılınmaması da dahil olmak üzere birçok zorluk mevcuttur. İnceleme, bir klinisyenin bakış açısından tükürük metabolomiklerinin gelecekteki perspektifleri hakkındaki tartışmayla sona ermektedir. Tükürük metabolomikleri, lokal ve sistemik bozuklukları tanımlamak için yeni bir araştırma yolu sağlayabilir, aynı zamanda tedavilerin tasarımına ve modifikasyonuna yardımcı olabilir. "Tükürük metabolomikleri" anahtar kelimelerini kullanan bir MEDLINE araştırması, toplamda 23 sonuç vermiştir, bunların yedisi gözden geçirme veya editöre mektup olduğu için çıkarılmıştır. Geri kalan makaleler derlemenin hazırlanmasında kullanılmış, bunlardan 13 tanesi son 5 yıl içinde yayınlanmıştır (Mikkonen JJ ve ark., 2016).

McConnell YJ ve arkadaşları, ¹H-NMR spektroskopisi ve gaz kromatografisi-kütle spektrometrisinin kombine kullanımı kullanılarak iyi huylu pankreas ve periampuller lezyonlardan ayırt etmesi çalışmalarında, Kötü huylu ve iyi huylu pankreas ve periampuller lezyonları olan 157 hastadan alınan serumlar, proton nükleer manyetik rezonans (¹H-NMR) spektroskopisi ve gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) kullanılarak analiz edilmiştir. Eğitim veri kümelerinde SIMCA-P + yazılımını kullanan çok değişkenli projeksiyon modelleme ($n = 80$) hastalık durumlarını ayırt etmek için en iyi modelleri oluşturmak için kullanılmıştır. Modeller, test veri kümelerinde doğrulanmıştır ($n = 77$). Nihai ¹H-NMR spektroskopisi ve GC-MS metabolomic profilleri sırasıyla AUROC 0.74 değerleri (SE 0.06) ve 0.62 (SE 0.08) ile, 14 ve 18, bileşikler oluşmuştur. Kombinasyonu ¹H-NMR spektroskopisi ve GC-MS metabolitleri, bu performansı önemli ölçüde iyileştirmemiştir. Adenokarsinomlu hastalarda, glutamat seviyeleri sürekli olarak daha yüksekken, glutamin ve alanin seviyeleri sürekli olarak daha düşüktü. Pankreas ve periampuller adenokarsinomlar benign lezyonlardan ayırt edilebilir. Bu ortamda metabolomiklerin ayırt edici gücünü daha da artırmak için, bu heterojen kanser grubunun her bir alt sınıfını karakterize eden metabolomik değişiklikleri tanımlamak önemli olacaktır (McConnell YJ ve ark., 2017).

Monleon D ve arkadaşları, ¹H NMR tabanlı spektroskopi ile serum ve idrarın metabonomik profili, kronik obstrüktif pulmoner hastaları ayırt eder adlı çalışmalarında, Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), bireylerin ve toplumların sağlığını ciddi şekilde etkilemiştir. Bu çalışmada, nükleer manyetik rezonans (proton ¹ H NMR) değişkenli görüntü tanıma analizi KOAH hastalarının metabolik profilini araştırmak için uygulanmıştır. Serum ve idrar örnekleri sırasıyla KOAH hastalarından (n = 32) ve sağlıklı kontrollerden (n = 21) toplanmıştır. Örnekler yüksek çözünürlüklü ¹H NMR (600 MHz) ile analiz edilmiştir ve elde edilen spektral profiller daha sonra çok değişkenli veri analizine tabi tutulmuştur. KOAH hastalarından ve sağlıklı kontrollerden alınan idrar örneklerinin yanı sıra serumda da tutarlı metabolik farklılıklar bulunmuştur. Sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında, KOAH hastaları, serumda dallı zincirli amino asitler (BCAA'lar) dahil olmak üzere lipoprotein ve amino asitlerde azalma ve gliserolfosfokolin artışı sergilenmiştir. Dahası, idrardaki metabolik farklılıklar serumdakinden daha önemlidir. KOAH hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla azalmış idrar 1-metilnikotinamid, kreatinin ve laktat keşfedilmiştir. Tersine, asetat, keton cisimleri, karnosin, m-hidroksifenilasetat, fenilasetilglisin, piruvat ve a-ketoglutarat, sağlıklı deneklere göre KOAH hastalarında artmış ekspresyon seviyeleri sergilenmiştir (Monleon D ve ark., 2013).

Pearce JTM ve arkadaşları, Kan serumunun 1D ¹H NMR spektrumlarının otomatik kimyasal kayma kalibrasyonu için sağlam algoritmalar adlı çalışmalarında, Biyo-akışkan NMR spektroskopisinde, her rezonansın frekansı tipik olarak numuneye 3- (trimetilsilil) -propiyonik asit-d₄ (TSP) gibi bir referans bileşiği eklenerek kalibre edilmiştir. Bununla birlikte, solüsyondaki makromoleküllere bağlanmanın neden olduğu rezonans kayması nedeniyle, serum gibi biyoakışkanlar TSP'ye atıfta bulunulamaz. Bu sınırlamanın üstesinden gelmek için, (1) H NMR spektrumlarını alfa-glikoz anomerik çiftine yerleştirmek ve kalibre etmek için türev spektrumlarının analizine dayalı algoritmalar geliştirilmiştir. Bu algoritmaları, 77 serum (1) H NMR spektrumunu kalibre etmek için başarıyla kullanılmış ve hesaplanan kimyasal kayma düzeltmelerinin (r = 0.97) manuel hizalama ile oluşturulanlardan (r = 0.8-0.88) daha yüksek tekrarlanabilirliği gösterilmiştir. Bu nedenle, bu algoritmaların, serum, plazma veya glikozun bol olduğu herhangi bir biyo-sıvının (1) H NMR'sini kalibre etmek için sağlam ve tekrarlanabilir yöntemler sağladığı gösterilmiştir. Karmaşık biyoakışkan NMR spektrumlarının hassas otomatik kalibrasyonu, yüzlerce veya hatta binlerce

spektrumun örüntü tanıma analizi ile yüksek çözünürlükte analiz edilebildiği büyük ölçekli metabonomik veya metabolomik çalışmalarda önemli bir araçtır (Pearce JTM ve ark., 2008).

Pinto J ve arkadaşları, Taşıma ve saklama sırasında insan plazma stabilitesi: NMR metabolomiklerine etkisi adlı çalışmalarda, Bu çalışma, Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) metabolomiklerinde en önemli sorun olan işleme ve depolama sırasında insan plazmasının parçalanabilirliğine ilişkin bilgilerdeki bazı mevcut boşlukların doldurulmasına katkıda bulunmuştur. Heparin ve EDTA antikoagülan toplama tüpleri arasındaki karşılaştırmayla ilgili olarak, ilki, tam spektral bilgiyi korurken polisakkaritin hiçbir etkileşimi göstermemiştir. Zaman/sıcaklık koşullarına göre, oda sıcaklığının 2.5 saatten itibaren lipoproteinler ve kolin bileşikleri üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca -20 ° C'de kısa süreli saklama 7 güne kadar uygun bulunmuş ancak 1 aya kadar olan sürelerde -80°C tavsiye edilmiştir. Ayrıca, plazma örneklerinin yeniden kullanılması durumunda, arka arkaya 3'ten fazla dondurma-çözme döngüsü tavsiye edilmemiştir (Pinto J ve ark., 2014).

Posma JM ve arkadaşları, Referans Eşleştirmeye Alt Küme Optimizasyonu (STORM): biyo sıvıların H-1 NMR spektrumlarından metabolik biyobelirteç yapısal bilgilerinin kurtarılması için optimize edilmiş istatistiksel bir yaklaşım adlı çalışmalarda, Referans eşleştirme (STORM), alt küme optimizasyonu sağlamak için geliştirilmiştir. STORM, değişken sayısından daha az sayıda örnek içeren bu azaltılmış spektral alt kümeleri kullanarak spektroskopik verilerdeki yapısal korelasyonların görselleştirilmesini geliştirmeyi amaçlamaktadır. ($n \ll p$). Yanlış pozitif ilişkilerin sayısını sınırlamak ve otokorelasyon matrisinin genel yorumunu basitleştirmek için istatistiksel küçülme kullanılmıştır. STORM yaklaşımı, popülasyonun bir alt kümesinde bulunan bir biyobelirteç metabolitini tanımlamak için vücut kitle indeksi üzerine devam eden bir insan metabolomu çapında ilişki çalışmasının bulgularına uygulanmıştır. Dahası, STORM'un daha önce yayınlanmış bir yöntemle (istatistiksel toplam korelasyon spektroskopisi, STOCYSY) kıyasla daha bol NMR piklerinin görselleştirilmesini nasıl geliştirdiğini gösterilmiştir. STORM, yaygın uygulanabilirliği olan "omik" bilimlerde biyobelirteç keşfi için yararlı yeni bir araçtır. Değişkenler arasında yorumlanabilir bir korelasyon olması koşuluyla her türlü veriye uygulanabilir ve birden fazla boyutlu verilere de uygulanabilir (örn. 2D NMR spektrumları), (Posma JM ve ark., 2012;).

Puchades-Carrasco L ve arkadaşları, Serum metabolomik profili, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin başlangıcı ve ilerlemesi ile ilişkili metabolik biyobelirteçlerin invazif olmayan tanımlanmasını kolaylaştırır adlı çalışmalarında, Akciğer kanseri (LC), kanser ölümlerinin çoğundan sorumludur. Bu hastalığın öldürücülüğüne katkıda bulunan ana faktörlerden biri, klinik bir müdahalenin başarılı olma ihtimalinin düşük olduğu ileri evrelerde hastaların büyük bir kısmının teşhis edilmesidir. Bu çalışmada, küçük hücreli dışı akciğer kanserinin (KHDAK) erken tanı ve prognozunu desteklemek için doğru ve güvenilir biyobelirteçlerin tanımlanmasını kolaylaştırmak için ¹H-NMR ile metabolomiklerin potansiyeli değerlendirilmiştir. KHDAK hastalarının metabolik profilleri bulunmuş, sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında, farklı amino asitleri, organik asitleri ve alkoller ve ayrıca lipid metabolizmasında yer alan farklı lipidleri ve molekülleri temsil eden 18 metabolitin konsantrasyonunda istatistiksel olarak önemli değişiklikler ile karakterize edilmiştir (Puchades- Carrasco L ve ark., 2016).

Prakash ve arkadaşları, Odontojenik kist sıvılarının bileşenlerinin karşılaştırılması adlı çalışmalarında, Ağız ve çene yüz bölgesini etkileyen kistik lezyonlar ağırlıklı olarak köken olarak odontojenik. Odontojenik hücre, çene dokusuna dolanmıştır. Malassez hücre dayanakları, serre hücre dayanakları ve mine organı gibi oluşumlara yol açar. Bu çene kistlerinin büyümesine neden olan faktörler geçirgenliği artırır. kist duvarı, kist sıvısının protein içeriğini artırdığında ve intrakistik sıvı olduğunda çene kemiği üzerindeki baskı artar. Bu çalışmada: Albümin, prealbumin, globulin ve toplam protein gibi kistik sıvıların bileşenleri çeşitli odontojenik kistler için verilmiştir (Prakash ve ark.,2016).

Reglinski J ve arkadaşları, NMR spektroskopisinin analitik bir perspektifi olarak biyolojik sıvıların ve hücrelerin incelenmesi adlı çalışmalarında, Konsantre edilmiş örnekleri, 0.50 mL D₂O ya katarak biyolojik sıvıların NMR spektrumunu bulmuştur. Konsantrasyonu arttırmanın pik sayısını arttırdığını göstermiştir (Reglinski ve ark., 1996).

Richard V ve arkadaşları, ¹H-NMR plazma metabolomu, insan meme kanserindeki konak-tümör etkileşimlerini yansıtıyor mu? Sorusuna cevap olarak yapmış oldukları çalışmalarında, Meme kanseri (BC), dünya çapında kadınlarda en sık teşhis edilen kanser ve kanserden ölümlerin önde gelen nedenidir. BC biyolojisinin daha

iyi anlaşılmasına bariz bir ihtiyaç vardır. BC hastalarının serum metabolomundaki değişiklikler tanımlanmıştır, ancak bunların klinik önemi belirsizliğini korumaktadır. 50 erken (EBC) ve 15 metastatik BC (MBC) hastasının filtrelenmiş plazma metabolomu, ¹H-Nükleer Manyetik Rezonans (¹H-NMR) spektroskopisi ile incelenmiştir. Ana Bileşen Analizi, Kısmi En Küçük Kareler Ayırım Analizi ve Hiyerarşik Kümeleme kullanarak, plazma glikoz, laktat, piruvat, alanin, lösin, izolösin, glutamat, glutamin, valin, lizin, glisin, treonin, tirozin, fenilalanin, asetat seviyelerinin plazma seviyeleri gösterilmiştir. Asetoasetat, β -hidroksi-butirat, üre, kreatin ve kreatinin, hasta kümeleri arasında modüle edilir. Özellikle laktat seviyeleri, EBC kohortundaki tümör boyutu ile ters orantılıdır (Pearson korelasyonu $r = -0.309$; $p = 0.044$). BC hastalarında tümör hücrelerinin, erken aşamalarda bile tüm hastanın metabolizmasının modülasyonunu indükleyebileceği öne sürülmüştür. Daha büyük bir çalışmada doğrulanırsa, bu gözlemler klinik öneme sahip olabileceği belirtilmiştir (Richard V ve ark., 2017).

Saleh, MA, ve arkadaşları, Çene Kistik Lezyonlarının Sıvısında Proteinler ve Kolesterol Düzeylerinin adlı çalışmalarında, Bu çalışma ile çene kistik lezyonlarındaki protein ve kolesterol düzeyi araştırılmıştır. Çene kistik lezyonlarındaki proteinler ve kolesterol seviyeleri ameliyat öncesi tanıya yardımcı olacak basit bir yöntem olarak kullanılmıştır (Saleh MA ve ark., 2017).

Santonea C ve arkadaşları, Tükürük Metabolomiği: Tanısal Biyomarker Keşfinden Biyolojik Fonksiyonuna dair bir araştırma adlı çalışmalarında, Bu derleme tükürük bazlı metabolomiklerin tarihçesini araştırmakta ve tükürük metabolomiklerine ilişkin mevcut bilgileri özetlemektedir. Tükürük metabolomiklerinin mevcut uygulamaları büyük ölçüde tanısal biyobelirteç keşfine odaklanmıştır ve mevcut literatür tabanının tanısal değeri araştırılmıştır. Atletik performansın izlenmesinde tükürük metabolomiklerinin kullanımına ilişkin küçük, umut verici olsa da bir literatür tabanı da vardır. Tükürük metabolitlerinin fonksiyonel rolleri büyük ölçüde keşfedilmemiştir. Ortaya çıkan bilgi alanları, tükürük metabolit profilini şekillendirmede oral konak-mikrobiyom etkileşimlerinin rolü ve tükürük metabolitlerinin ağız fizyolojisindeki potansiyel rollerini, örneğin tat algılamasını içerir. Gelecekteki araştırma yönlerinin tartışılması, bağırsak metabolomu alanında güncel bir araştırma yönü olan tükürük metabolitlerinin işlevi hakkında daha fazla bilgi edinmeye başlama ihtiyacını açıklamıştır. Bağırsak metabolomunun araştırılmasında diğer gastrointestinal sıvıları

tamamlayabilen, kolayca elde edilebilen, bilgi açısından zengin bir sıvı olarak tükürüğün rolü vurgulanmıştır (Santonea ve ark., 2014).

Spratlin JL ve arkadaşları, Onkolojide metabolomiklerin klinik uygulamaları çalışmalarında, Metabolomun, kanserin erken teşhisi ve teşhisi dahil olmak üzere ve ilaç etkisinin hem prediktif hem de farmakodinamik belirteci olarak onkolojide çok sayıda kullanıma sahip olma potansiyeli vardır. Buna rağmen onkoloji camiasında metabolomiklerle ilgili bilgi eksikliği ve metodolojik süreçleri, teknik zorlukları ve klinik uygulamaları hakkında kafa karışıklığı vardır. Metabolomik, araştırma aracı olarak kullanıldığında, laboratuvar ve klinik arasında bir bağlantı sağlayabilir. Özellikle pozitron emisyon tomografisi ve manyetik rezonans spektroskopik görüntüleme gibi metabolik ve moleküler görüntüleme teknolojileri, metabolik belirteçlerin in vivo olarak noninvaziv olarak ayırt edilmesini sağlamıştır. Burada, kanser teşhisi, prognozu ve terapötik değerlendirme için bir biyolojik belirteç olarak kullanımına odaklanarak, metabolomiklerin mevcut ve potansiyel uygulamaları gözden geçirilmiştir (Spratlin JL ve ark., 2009).

Tulpan D ve arkadaşları, MetaboHunter: karmaşık karışımların ^1H -NMR spektrumlarından metabolitlerin tanımlanması için otomatik bir yaklaşım adlı çalışmalarında, Metabolitlerin ^1H -NMR spektrumlarının otomatik olarak atanması için kullanılabilen MetaboHunter adlı bir web sunucusu uygulaması sunulmuştur. MetaboHunter, üç farklı arama yöntemi ve kullanıcı tanımlı bir spektral aralıkta tepe kayması olasılığı ile spektra veya tepe listelerine dayalı otomatik metabolit tanımlaması için yöntemler sağlamıştır. Atama, NMR metabolit standart ölçümlerinin (HMDB ve MMCD) halka açık iki büyük veri tabanından elle küratörlüğünü yapılan referans kitaplıkları olarak kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tekli ve çoklu metabolit karışımlarının çeşitli sentetik ve deneysel spektrumlarını kullanan testler, MetaboHunter'in ortalama olarak, sentetik karışımların spektrumlarından saptanabilir metabolitlerin %80'inden fazlasını ve deneysel karışımlara karşılık gelen spektrumlardan %50'den fazlasını belirleyebildiğini göstermektedir. MetaboHunter, sezgisel çizim ve bileşik tepe noktası aracılığıyla verimli veri girişi ve ön işleme, esnek parametre ayarları, hızlı ve otomatik metabolit parmak izi ve sonuç görselleştirme sağlayan, serbestçe erişilebilir, kullanımı kolay ve kullanıcı dostu ^1H -NMR tabanlı bir web sunucusu uygulamasıdır. Diğer yayınlanmış ve serbestçe erişilebilen metabolomik araçlarla karşılaştırıldığında, Metabo Hunter, iki referans kitaplığından manuel olarak derlenmiş

verilerde metabolitleri aramak için üç etkili yöntem uygulanmıştır (Tulpan D ve ark., 2011).

Ussher JR ve arkadaşları, Kardiyovasküler hastalıkların tanı ve prognozunda metabolomiklerin ortaya çıkan rolü adlı çalışmalarında, En gelişmiş metabolomik teknolojiler bize biyolojik sıvılardaki veya biyopsilerdeki binlerce metabolitin ölçülmesini sağlayarak, bize bireysel hastaların metabolik parmak izlerini sağlamıştır. Bu metabolik profiller, KVH yönetimini önemli ölçüde değiştirme potansiyeline sahip tanısal ve/veya prognostik araçlar olarak hizmet edebilir. Burada yazarlar, metabolomiklerin bozulmuş metabolik süreçlerin yorumlanmasına nasıl yardımcı olabileceğini gözden geçirmişlerdir. Bunun iskemik kalp hastalığı, ateroskleroz ve kalp yetmezliği patolojisini anlama becerimizi nasıl geliştirdiğini göstermiştir. Birlikte ele alındığında, metabolomiklerin diğer "omik" platformlarla entegrasyonu, kişiselleştirilmiş tıbbi geliştirirken metabolitlerin, proteinlerin, genlerin ve hastalık durumlarının patofizyolojik etkileşimleri hakkında fikir edinmemizi sağlayacaktır (Ussher JR ve ark., 2016).

Vahabi F ve arkadaşları, 1H-NMR Spektroskopisi ile serum metabolomikleri kullanarak kolorektal kanserin evrelendirilmesi çalışmalarında, Kolon kanserinin evrelerinin belirlenmesi genellikle ameliyattan sonra biyopsi ile yapılır. Metabolomik, tüm metabolitlerin LC-MS ve 1H-NMR spektroskopisi kullanılarak kemometrik tekniklerle incelenmesidir. 1H-NMR kullanılarak hastaların serumlarından kolon kanserinin evreleri tespit edilmiştir (Vahabi F ve ark., 2017).

Yılmaz UN ve arkadaşları, 1.5 T MRG ile ölçülen kist ve apselerde MR T₁ ve T₂ durulmaları adlı çalışmalarında, Bu çalışmada, kist ve apselerde NMR durulma oranlarının ($1/T_1$ ve $1/T_2$) karşılaştırılmasını yapılmış ve durulma oranlarının numunelerin susuz materyal içeriklerine bağımlılıklarını elde edilmiştir. İstatiksel karşılaştırma grupların birbirlerinden anlamca farklı olduğunu ortaya koymuştur. Kist ve abse içeriği ile durulma oranları arasında da anlamlı ilişki bulunmuştur (Yılmaz ve ark., 2012).

Zamani Z ve arkadaşları, Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi kullanılarak kolon kanseri üzerine metabolik bir çalışmalarında, Bu derlemenin amacı, CRC'nin bildirilen serum metabolomik profillerini karşılaştırmak ve bu çalışmalar arasında etkilenen yaygın metabolitleri belirlemektir. Mart 2018'e kadar yayınlanan

serum/plazma örnekleri kullanılarak CRC'nin global metabolomik profili üzerine deneysel çalışmaları dahil etmek için bir literatür taraması yapılmıştır. İncelenen çalışmaların kalitesini değerlendirmek için Tanısal Doğruluk Çalışmalarının Kalite Değerlendirmesi (QUADAS) aracı kullanılmıştır. Toplamda, dokuz çalışma dahil edilmiştir. Çalışmalar çeşitli analitik platformlar kullanılmış ve farklı popülasyonlar üzerinde gerçekleştirilmiştir. İncelenen tüm çalışmalardan elde edilen veriler kullanılarak bir yol zenginleştirme analizi gerçekleştirilmiştir. Tespit edilen en çok etkilenen yollar protein biyosentezi, üre döngüsü, amonyak geri dönüşümü, alanin metabolizması, glutatyon metabolizması ve sitrik asit döngüsüdür. Metabolomik analiz, glikoliz, trikarboksilik asit döngüsü, anaerobik solunum, protein, lipid ve glutatyon metabolizmasının metabolit düzeylerinin kanser ve kontrol örnekleri arasında önemli ölçüde farklı olduğunu ortaya koymuştur. Tanımlanan farklılaşan metabolitlerin çoğu farklı çalışmalarda farklı olsada, ortak olan birkaç metabolit vardı. Bu metabolitler arasında piruvik asit, glikoz, laktik asit, malik asit, fumarik asit, 3-hidroksibütirik asit, triptofan, fenilalanin, tirozin, kreatinin ve ornitin. Farklı çalışmalar arasında bu metabolitlerin tutarlı düzensizliği, CRC için ortak tanısal biyobelirteçlerin olasılığını ortaya koymaktadır (Zamani Z ve ark.,2014).

Zengin B ve arkadaşları, Protein ve İyon İçeren H₂O/D₂O Karışımlarının NMR Durulma Eğrilerinden Radyasyon Sönümlene Etkilerinin Ortadan Kaldırılması adlı çalışmalarında, Bu çalışma ile çeşitli, H₂/D₂O karışımlarında durulma zamanları ölçümleri yapılmıştır. Düşük miktarda suyun (<0.1mL) yüksek miktarda D₂O eklenmesinin ya da (2) çözeltiye albumin veya mangan ilavesinin RD'yi etkisizleştirdiği gösterilmiştir (Zengin B ve ark., 2013).

Zheng H ve arkadaşları, Nükleer manyetik rezonans temelli serum metabolomikleri ve kendi kendini düzenleyen haritalar kullanılarak renal hücreli karsinomun tahmini ve teşhisi çalışmalarında, Renal hücreli karsinomun (RCC) erken evrede teşhisi zordur, ancak tedavi için en iyi şansı sağlar. Erken evre RCC için nükleer manyetik rezonans (NMR) tabanlı serum metabolomiklerini ve kendi kendini organize eden haritaları (SOM) kullanan bir biyobelirteç kümesine dayalı bir öngörücü tanı yöntemi geliştirme amaçlanmıştır. Sağlıklı bireyler ve erken evre RCC hastaları dahil olmak üzere 104 katılımcıdan alınan serum metabolom verilerini kullanarak SOM modeli eğitilmiş ve doğrulanmıştır. Modelin tahmin kabiliyetini değerlendirmek için, 22 denekten oluşan bağımsız bir kohortu analiz edilmiştir. Daha sonra, nefrektomi öncesi ve

sonrası 23 RCC hastasının metabolik paternlerindeki değişiklikleri değerlendirmek için yöntemi kullanılmıştır. RCC'nin erken teşhisi için 7 metabolitin (alanin, kreatin, kolin, izolösin, laktat, lösin ve valin) bir biyobelirteç kümesi tanımlanmıştır. Bir biyobelirteç kümesi kullanan eğitimli SOM modeli, 22 test denegini uygun kategorilere sınıflandırabilinmiştir. Nefrektomiye takiben tüm RHK hastaları, metabolik iyileşmenin göstergesi olan sağlıklı olarak sınıflandırılmıştır. Ancak 0,80'lik bir tanı kriteri kullanıldığında, 23 denekten sadece 3'ü nefrektomi sonrası metabolik olarak iyileşmiş olarak güvenle değerlendirilememiştir. Nefrektomi sonrası 8 yıl boyunca 17 RCC hastasını başarıyla takip edilmiştir. Metabolik düzelme tanısı alan bu hastalardan 11'i 8 yıl sonra sağlıklı kalmıştır. Veriler, serum metabolomundan bir biyobelirteç kümesi kullanan bir SOM modelinin erken RCC tanısını doğru bir şekilde tahmin edebileceğini ve postoperatif metabolik iyileşmeyi değerlendirmek için kullanılabileceğini göstermiştir (Zheng H ve ark., 2016).

Wang Y ve arkadaşları, Nükleer manyetik rezonans temelli çalışma, nazofaringeal karsinomun metabolomik profilini ortaya koymaktadır adlı çalışmalarında, Serum örnekleri, 20 sağlıklı denek ve 20 NPC hastasından oluşan 40 kayıtlı katılımcıdan toplanmıştır. Örnekler, bir 600-MHz NMR spektrometresi kullanılarak analiz edilmiştir. ^1H -NMR spektrumları ayrıca, diferansiyel metabolitleri taramak için kısmi en küçük kareler-ayrıt edici analiz ile analiz edilmiştir. NMR spektroskopisi, NPC hastalarının serumları sağlıklı bireylerinkilerle karşılaştırıldığında farklı seviyelerde mevcut olan toplam sekiz metabolit tanımlamıştır. NPC hastalarının serumlarında metiyonin, taurin ($P < 0.05$) ve kolin benzeri metabolitler ($P < 0.05$) çoğunlukla yükselmiştir. Bunun aksine, lipidler ($P < 0.01$), izolösin ($P < 0.05$), doymamış lipidler ($P < 0.01$), trimetilamin oksidaz ($P < 0.05$) ve karbonhidratlar ($P < 0.05$) serumların serumlarında daha düşüktü (Wang Y ve ark., 2016).

Wen S ve arkadaşları, Karşılaştırmalı serum metabonomik profillemeye yoluyla pankreas kanserinin invaziv olmayan tipte tahmin edici farklılaşması çalışmalarında, Pankreas duktal adenokarsinomunun (PDAC) farklılaşması prognoz ile ilişkili olabilir ve klinik tedavi seçeneklerini etkileyebilir. Uygulanabilir hiçbir yöntem, ameliyat öncesi tümör farklılaşmasını güvenilir bir şekilde öngöremez. Bu nedenle, bu çalışma ile, pankreatik duktal adenokarsinomun metabonomik profilini farklı farklılaşmalarla karşılaştırılmış ve nükleer manyetik rezonans spektroskopisine dayalı

metabonomik strateji ile tümör farklılaşmalarını tahmin etmenin uygulanabilirliği değerlendirilmiştir (Wen S ve ark., 2017).

Wishart DS. Metabolit tanımlamadaki gelişmeler çalışmasında, Bu derlemede, metabolit tanımlamasını daha kolay ve daha sağlam hale getiren ve de metabolomiklerde yeni ortaya çıkan bazı teknikleri veya teknolojileri açıklayan bilgiler sunulmuştur. Özellikle, NMR, MS ve ayırma bilimine uygulanan teknolojiler, metodolojiler ve yazılımlarla ilgili olarak son 2 ila 3 yılda meydana gelen metabolit tanımlamasındaki ilerlemelere odaklanır. Bu yaklaşımlardan bazılarının güçlü yönleri ve sınırlamaları, metabolit tanımlamasındaki bazı önemli eğilimlerle birlikte tartışılmıştır (Wishart DS ve ark., 2011).

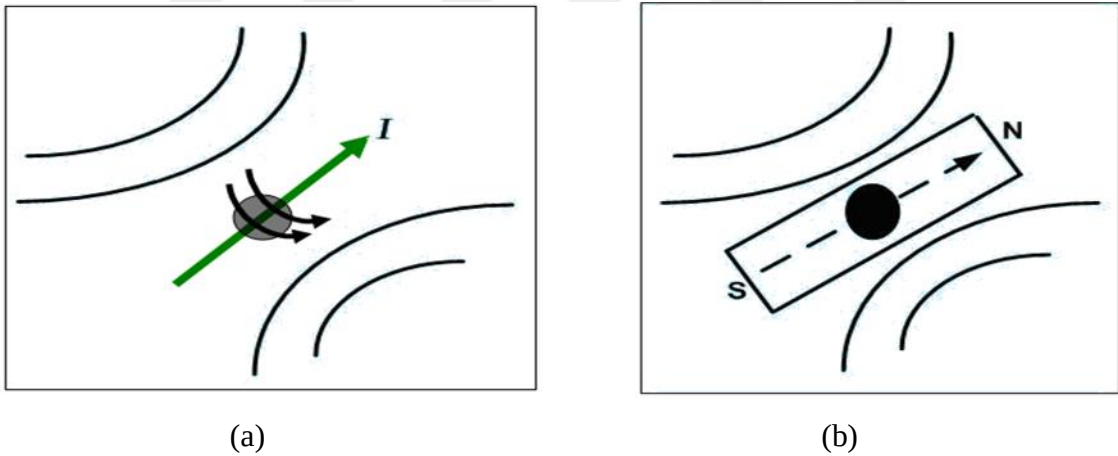
Wishart DS ve arkadaşları, HMDB 3.0 — İnsan metabolom veritabanı çalışmaları, İnsan Metabolom Veritabanı (HMDB), bilim insanlarına insan metabolomunun en güncel ve kapsamlı kapsamını sağlamaya adanmış bir kaynaktır. Bu makalede, daha önce 2009 NAR Veritabanı Sayısında yer alan HMDB'de yapılan bu geliştirmeler açıklanmıştır. Veri miktarındaki bu genişlemeye ek olarak, yeni veritabanı görselleştirme araçları ve yeni veri içeriği eklenmiş veya geliştirilmiştir. Bunlar, daha iyi spektral görüntüleme araçları, daha güçlü kimyasal alt yapı aramaları, geliştirilmiş bir kimyasal taksonomi ve daha iyi, daha etkileşimli yol haritalarını içermektedir (Wishart DS ve ark., 2013).

2.2. Temel NMR Teorisi

2.2.1. Çekirdeğin (Protonun) Manyetik Özellikleri

Her atom NMR'a uygun değildir. Nükleer Manyetik Rezonans olayı, çekirdeğinde çiftlenmemiş spini bulunan atomlarda gerçekleşen bir olaydır. I ile gösterilen bu tip spinlere sahip atomlara örnek olarak ^1H , ^{13}C , ^{17}O ve ^{31}P verilebilir. Bu tip çekirdeklerin her birinin NMR incelemeleri yapılabilir. Ancak bolluğundan dolayı NMR da en çok incelenen atom hidrojen atomudur. Hidrojen atomunun çekirdeği de tek proton içerir. Bu nedenle hidrojen atomu için proton veya çekirdek terimini kullanmak, NMR açısından eşdeğerdir (Yılmaz ve Korunur, 2012).

Spin, çekirdekteki protonun kendi eksenini etrafında dönmesinin yarattığı manyetik etkinin adıdır ve bir I vektörü ile gösterilir. Öte yandan proton bir yüke sahip olduğundan; proton döndükçe, yük de kendi eksenini etrafında dönme hareketi yapmaktadır. Klasik Fizikte dönme hareketi M manyetik momenti ile temsil edilir. Bu vektörün kuantum fiziğindeki karşılığı $\vec{\mu}$ vektörü olmaktadır. $\vec{\mu} = \gamma \vec{I}$ olarak tanımlanır. Dönen yükün kurduğu alan ile μ 'nün kurduğu alan tamamen aynıdır (Şekil 2.1a ve b).



Şekil 2.1. (a) I spinin kurduğu yerel alan (b) Çubuk mıknatısın kurduğu yerel alan (Yılmaz ve Korunur, 2012)

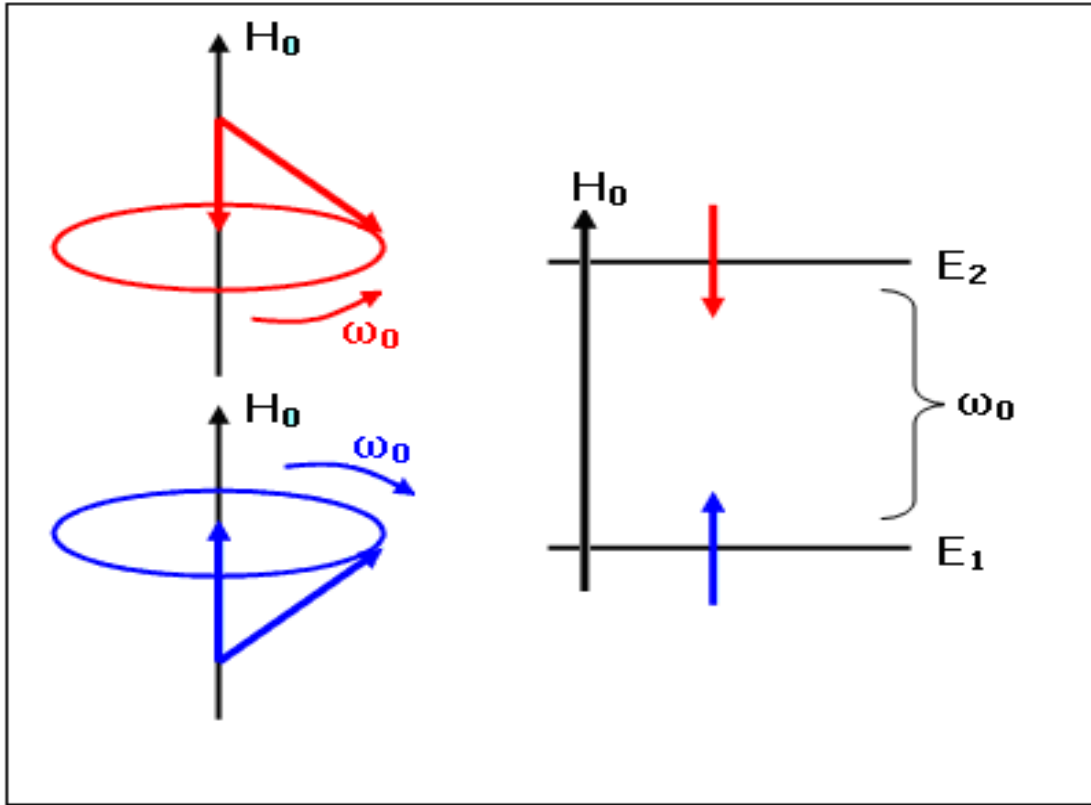
$\vec{\mu} = \gamma \vec{I}$ deki orantı katsayısı olan γ ' ya çekirdeğin jromanyetik oranı denir ve

$$\gamma = \frac{g_N \mu_N}{\hbar} \quad \mu_N = \frac{e \hbar}{2 m_p} \quad (2.1)$$

Burada g_N sabitine, çekirdeğin g-çarpanı denir ve μ_N ise çekirdek magnetonudur. e ile m_p protonun yükü ve kütlesi olmaktadır. Jiromanyetik oran bir çekirdek için ayırt edici bir özelliktir.

2.2.2. Dış Manyetik Alanın Tek Spine Etkisi

Çekirdeğinde spin bulunan bir atom, $\vec{H} = H_0 \hat{k}$ bir dış manyetik alanına konulduğunda, spin alan etrafında iki farklı yönelimde döner. Dönme hızı z-yönündeki alan şiddeti ile orantılıdır. Burada $\omega = \gamma H_0$ Larmor presesyon frekansıdır. Dış manyetik alan etrafındaki her dönme bir enerji seviyesine karşılık gelir. Dış alana paralel dönme E_1 alt enerji seviyesine ve dış alana antiparalel dönme ise E_2 üst enerji seviyesine karşılık gelir. Bu iki farklı yönelim ve bu yönelimlere karşılık gelen enerji seviyeleri Şekil 2.2' de gösterilmektedir. (Yılmaz ve Korunur, 2012).

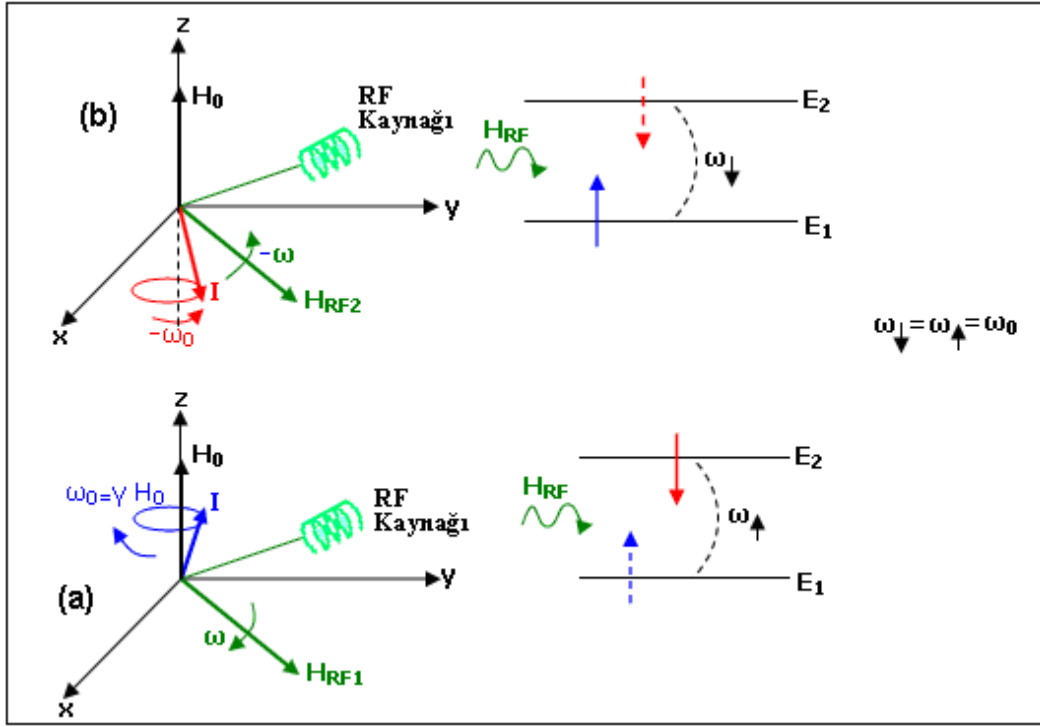


Şekil 2.2. $I=1/2$ spinli bir çekirdeğin H_0 dış manyetik alan içerisindeki farklı iki yönelimi ve bu yönelimlere karşılık gelen enerji seviyeleri (Yılmaz ve Korunur, 2012).

Radyo frekans (RF) alanı olarak isimlendirilen bir alanın dönme frekansı, spinin dönme frekansına eşit olunca rezonans meydana gelir. Spin enerji yutarak üst enerji

seviyesine geçiş yapar ya da üst enerji seviyesindeki bir spin de enerji salarak alt enerji seviyese geçiş yapar. Zamana bağlı pertürbasyon teorisine göre üst seviyeden bir spinin alt seviyeye geçiş olasılığı ile alt seviyeden üst seviyeye geçiş olasılıkları aynıdır.

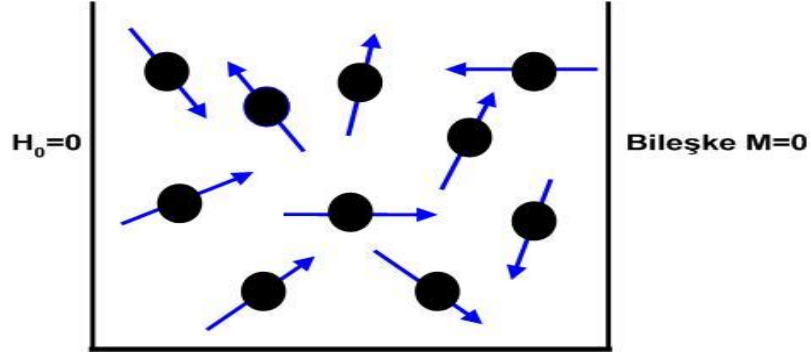
Bir spinin RF alanından enerji yutma ve salma mekanizmaları Şekil 2.3.' de gösterilmiştir. (Yılmaz ve Korunur, 2012).



Şekil 2.3. Bir spinin enerji soğurma ve salma mekanizmaları (Yılmaz ve Korunur, 2012)

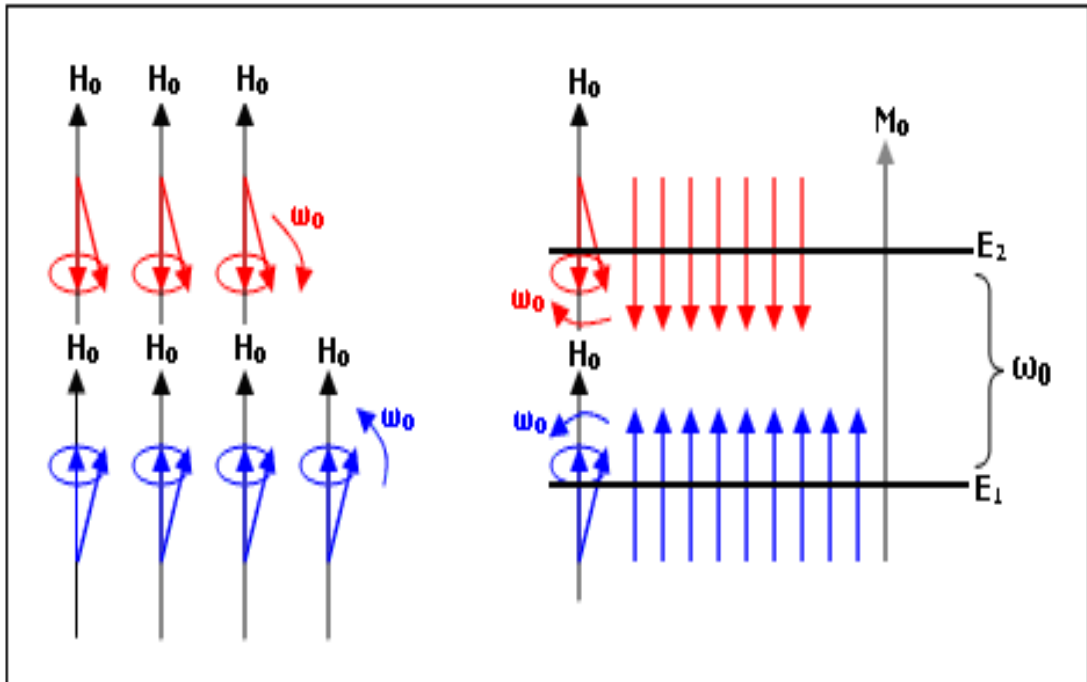
2.2.3. Dış Manyetik Alanın Spin Topluluğuna Etkisi ve Boltzmann Dengesi

Bir dış manyetik alanın olmadığı ($H_0=0$) durumdaki bir spin topluluğundaki spinler, uzayda tercihli bir yön olmadığı için, her yöne rastgele yönelirler. Bu rastgele yönelimler nedeniyle spin topluluğunun manyetik momentlerinin bileşkesi olan M mıknatıslanması sıfır olur (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Dış manyetik alanın yokluğundaki spin topluluğunun manyetik momentlerinin yönelimi (Yılmaz ve Korunur, 2012)

$\vec{H} = H_0 \hat{k}$ dış manyetik alan içerisinde bulunan bir spin topluluğu, her bir spin bu dış alan etrafında iki tür yönelim göstereceğinden; spinler enerji seviyelerine Boltzmann Dağılım kuralına göre yerleşirler. Buna göre alt seviyeye daha fazla spin yerleşir. Alt ile üst seviye arasındaki fark, bir bileşke manyetik momente yani $\vec{M} = M_0 \hat{k}$ mıknatıslanmasına neden olmaktadır (Şekil 2.5). NMR sinyali, enerji seviyelerindeki bu nüfus farkından ileri gelen mıknatıslanmadan üretilir (Yılmaz ve Korunur, 2012).



Şekil 2.5. Dış manyetik alan içerisinde bulunan spin topluluğu ve Boltzmann dengesi (Yılmaz ve Korunur, 2012).

Bir dış manyetik alan içinde bulunan spin topluluğunun enerji seviyelerine yerleşimi Denklem (2.2) de verilen Boltzmann Dağılım Kuralına göre olur. Bu kural;

$$N_1 = C e^{-E_1 / kT} \quad \text{ve} \quad N_2 = C e^{-E_2 / kT} \quad (2.2)$$

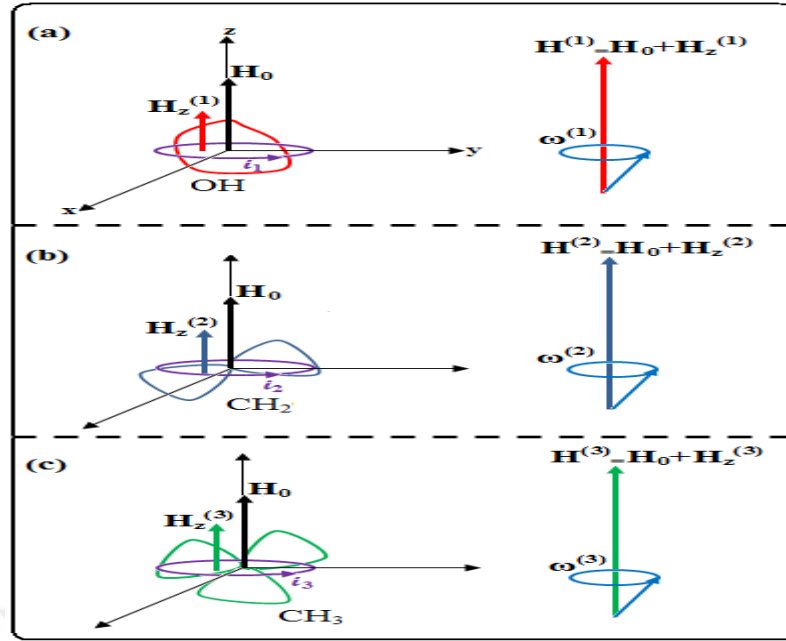
şeklinde yazılır. Denklem alt enerji seviyesine daha fazla ve üst enerji seviyesine daha az spin yerleşeceğini ortaya koyar (Yılmaz ve Korunur, 2012).

2.4. Kimyasal Kayma

2.4.1. Sıvılarda Kimyasal Kaymanın Nitel Anlatımı

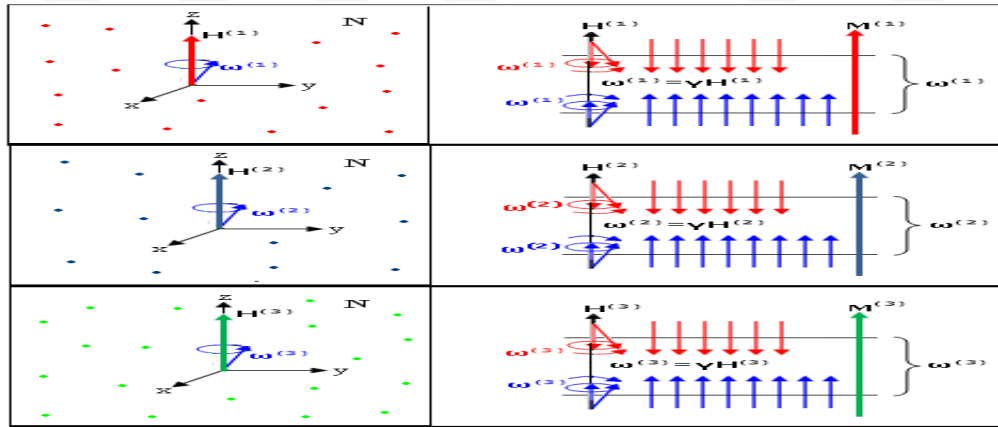
Daha önceleri söylendiği gibi; çevre dikkate alınmadığında yani yerel manyetik alanlar ihmal edildiğinde, tüm maddeler $\omega_0 = \gamma H_0$ frekansında ortaya çıkan tek bir sinyal verir. Tek bir çevre dikkate alındığında (Örneğin H_2O), bu sinyal $\omega = \gamma H$ frekansına kayar (Yılmaz ve Korunur, 2012).

Üç farklı çevreli CH_3CH_2OH molekülünü göz önüne alalım. Bu molekül CH_3 , CH_2 , OH gibi üç alt molekül içermektedir. CH_3CH_2OH moleküllerinin çözeltideki sayısı N olsun. Bu iri molekül çözeltide N tane CH_3 , N tane CH_2 ve N tane OH molekülüne ayrışır, Şekil 3.1 de görüldüğü gibi, her bir alt gruptan şimdilik bir molekül alalım. OH türü moleküllerin bir tanesini (a) daki görüntü, CH_2 türü moleküllerin bir tanesini (b) deki görüntü, CH_3 türü moleküllerin bir tanesini (c) deki görüntü temsil etsin. Her bir türün çevresi bir diğerinden farklıdır ve bu nedenle her molekülün taşıdığı (i) akımı da farklıdır. Bu akımların gözlem altındaki spinin bulunduğu yerde, kurdukları yerel alanların z-bileşeni; sırası ile $H_z^{(1)}$, $H_z^{(2)}$ ve $H_z^{(3)}$ olsun. $H_z^{(1)}$, $H_z^{(2)}$ ve $H_z^{(3)}$ alanlarının her biri H_0 a eklenir. Bu eklemenin sonucu olarak; OH moleküllerindeki spinler sadece bileşke $H^{(1)}$, CH_2 moleküllerindeki spinler sadece bileşke $H^{(2)}$ ve CH_3 moleküllerindeki spinler sadece bileşke $H^{(3)}$ alanından etkilenir. Söz konusu bileşke alanlar, ilgili moleküllerin sağ kısmında gösterilmiştir. Böylece birinci çevredeki spinler $w^{(1)} = \gamma H^{(1)}$, ikinci çevredeki spinler $w^{(2)} = \gamma H^{(2)}$ ve üçüncü çevredeki spinler $w^{(3)} = \gamma H^{(3)}$ hızları ile döner. Bu durum da Şekil 2.6 da görülüyor.



Şekil 2.6. Farklı kimyasal çevrelerin kurduğu yerel alanlar ve bileşke alan.

Bir NMR tüpünün içinde karışık olarak yer alan bu farklı türleri hayali olarak ayırıştıralım. En üstte OH grubu, ortada CH₂ grubu ve en altta is CH₃ grubu molekülleri temsilen bulunsun (Şekil 2.7)

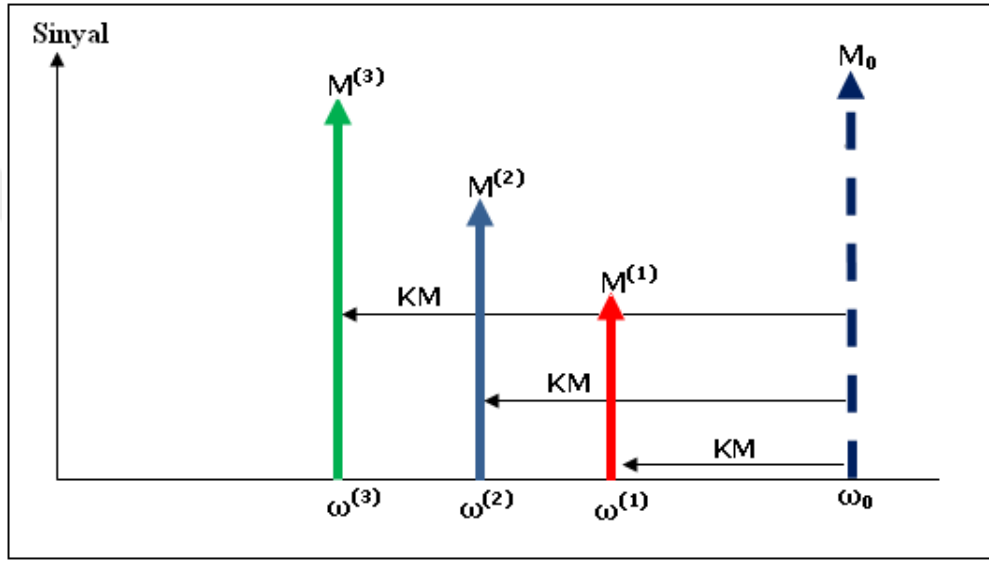


Şekil 2.7. Bir örnekteki spinlerin bileşke alanlara göre enerji seviyelerine dağılımı ve oluşan manyetizasyonlar.

Görüldüğü üzere Çözeltilde üç çevre bulunduğu için, tüpte de üç alt grup oluşmuştur. Her bir gruptaki spinler ya huni ya da ters huni yüzeyinde döner. Bu dönüşlerden enerji seviyeleri meydana gelir (sağ taraf). En üstte yer alan OH grubunun enerji seviyelerinde yer alan spinler ω^1 hızı ile dönüyor. Yani iki seviye ayrıklığı ω^1 ve oluşan manyetizasyon $M^{(1)}$ dir. Orta kısımda yer alan CH₂ grubunun enerji seviyelerinde

yer alan spinler ω^2 hızı ile dönüyor, seviye ayrıklığı ω^2 ve oluşan manyetizasyon M^2 dir. En altta yer alan CH_3 grubu için ise, seviye ayrıklığı ω^3 ve oluşan manyetizasyon M^3 olmaktadır.

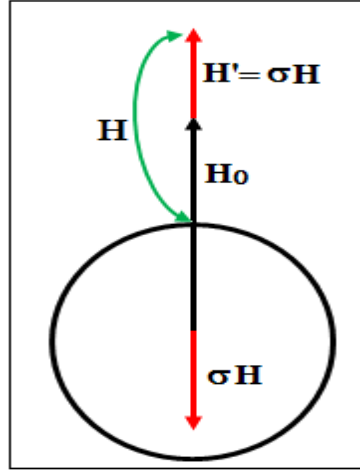
NMR ölçümlerinde, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ molekülünün üç farklı çevresi 3 farklı sinyal verir (Şekil.2.8). 5 farklı çevrede, 5 ayrı sinyal, n farklı çevrede ise n farklı sinyelimiz olur. Burada her sinyal bir çevreyi temsil eder. Dipolar yerel alanlar nedeniyle, her bir sinyalin dipolar genişlemeye maruz kaldığını da akılda tutmak gerekir.



Şekil 2.8. Bir $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ molekülündeki farklı çevrelerin kimyasal kayması.

2.4.2. Sıvılarda Kimyasal Kaymanın Nicel Anlatımı

Genelde NMR cihazlarının rezonans frekansı sabit tutulur ve kimyasal kaymayı telafi etmek için, dış alana bir H' alanı eklenir. Dolayısıyla kullanılan yeni dış alan, H olur. Bu yeni dış alanın yol açtığı kimyasal kayma $-\sigma H$ kadardır. Şimdi bunu Şekil 2.9'daki gibi resmedelim (Alan Carrington, 1967).



Şekil 2.9. Küresel bir molekülün kimyasal kaymasına yol açan yerel manyetik alanın dış H_0 alanına eklenmesi.

Rezonans frekansının sabit tutulabilmesi için, eklenen alan σH kadar olmalıdır. Bu durumda spinin etkilendiği dış alan $H = H_0 + \sigma H$ ya da $H_0 = H - \sigma H$ olacaktır. Çıplak spin durumundaki rezonansı tercih ettiğimizden, rezonans koşulu

$$h\nu_0 = -g_N\beta_N H_0 \quad 2.8$$

olmaktadır. Diğer taraftan H_0 uygulanan $H = H_0 + \sigma H$ dan çözülerek (2.8) denkleminde yerine konursa, rezonans koşulu

$$h\nu_0 = -g_N\beta_N (1 - \sigma)H \quad (2.9)$$

olacaktır. Bu ifadeden σ yı çözersek

$$\sigma = (H - H_0)/H \approx (H - H_0)/H_0 \quad (2.10)$$

denklemini elde ederiz. (2.10) denklemi bir tek çevre için türetilmiş bir denklemdir.

Şimdi iki farklı kimyasal çevrenin bulunduğunu düşünelim. Kimyasal kayma sabitlerini σ_1 ve σ_2 ile, uygulanan dış alanları H_1 ve H_2 ile gösterelim. Herbir çevrenin kimyasal kayması aşağıdaki gibi verilir.

$$\sigma_1 = (H_1 - H_0)/H_0 \quad (2.10a)$$

$$\sigma_2 = (H_2 - H_0)/H_0 \quad (2.10b)$$

yazılır. Şimdi de bu iki sabitin farkını alalım.

$$\sigma_1 - \sigma_2 = (H_1 - H_2)/H_0 \quad (2.11)$$

olarak yazılır. Manyetik alanlar cinsinden yazılan bu fark 1. çevredeki proton ile 2. çevredeki proton arasındaki bağıl kimyasal kaymayı ifade eder. Kimyasal kayma genellikle manyetik alan cinsinden değil, frekanslar cinsinden verilir. Bunun için denklem (2.11)'in içindeki alanları frekansa çevirmek gerekir. Bu denklemi düzenleyip her iki tarafını $g_N \beta_N / h$ ile çarparsak

$$g_N \beta_N / h H_0 (\sigma_1 - \sigma_2) = g_N \beta_N / h (H_1 - H_2)$$

$$\omega_0 (\sigma_1 - \sigma_2) = \omega_1 - \omega_2$$

$$\nu_0 (\sigma_1 - \sigma_2) = (\nu_1 - \nu_2) = \delta_1 - \delta_2$$

Bağıntıları elde edilir. Böylece alanlar frekansa çevrilmiş olur. Burada bağıl kayma $\delta_1 - \delta_2$ ile işaretlenmiştir. Diğer bir söyleyişle

$$\sigma_1 - \sigma_2 = (H_1 - H_2)/H_0 = (\nu_1 - \nu_2)/\nu_0 \quad (2.12)$$

olarak ifade edilebilir. Bu bağıntı bir pikin diğerine göre kimyasal kaymasını, frekans cinsinden verir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada kullanılan 29 kanserli kan, 29 kanserli idrar ve 28 er sağlıklı kan ve idrar örnekleri Diyarbakır Memorial Hastanesinin Onkoloji Birimin den temin edildi. Sağlıklı örnekler karşılaştırma amaçlı olarak kullanıldı. Örneklerin konulduğu tüpler parafilmle kapatıldı. Daha sonra plastik bir torbaya yerleştirildi. Sonrasında uygun kaplara konularak -20 derecede muhafaza edildi.

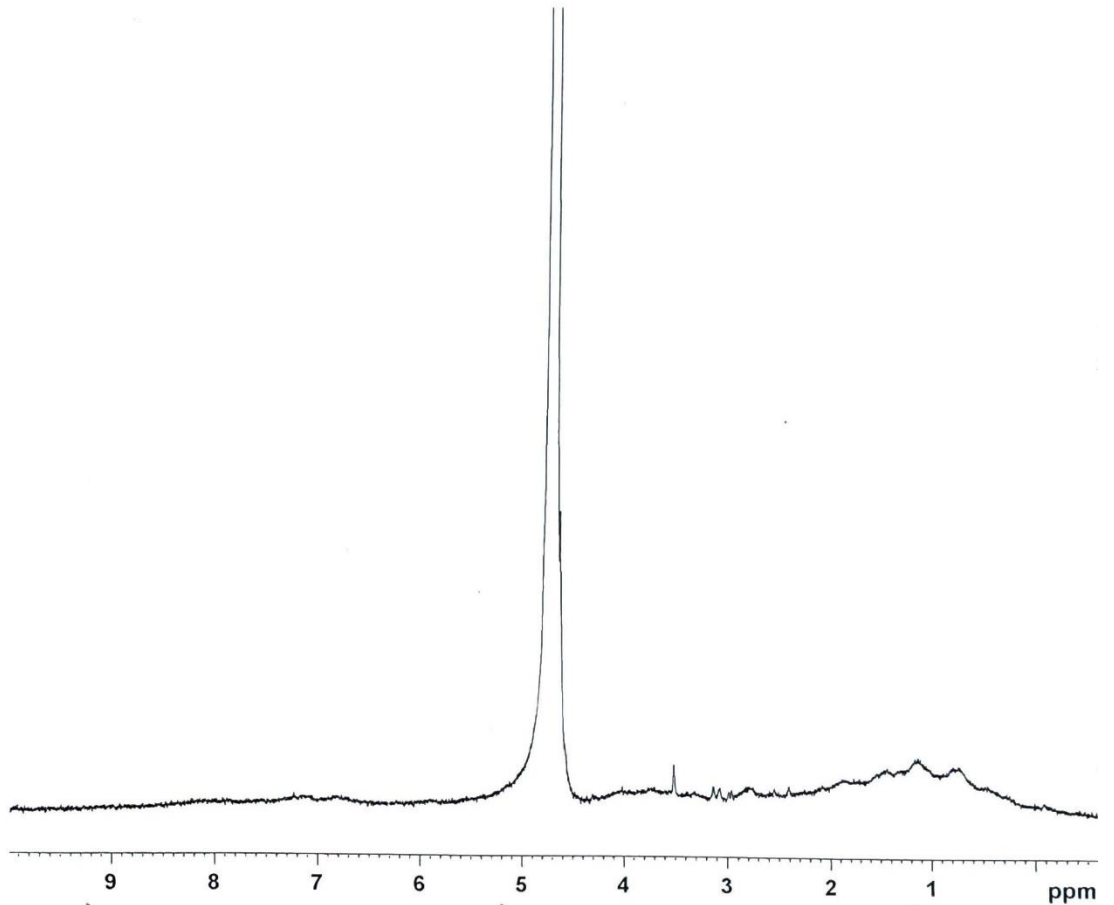
NMR ölçümlerinden önce herbir kan örneğinin 2 μ L (0.02 mL) sıvı, 0.98 mL D₂O'ya ve de herbir idrar örneğini 0.06mL si 0.94 mL D₂O'ya eklenerek karışım elde edildi. Her bir karışım 5 mm çapındaki NMR tüplerine aktarıldı.

NMR ölçümleri 400 MHz BRUKER AVENCE NMR spektrometresi ile gerçekleştirildi. Ölçümlerde tek puls adımı (90 derece puls uygulaması) ile gerçekleştirildi. Her bir ölçüm için 16 tarama seçildi. Ölçüm sıcaklığı (20 ± 1) °C de gerçekleştirildi. Cihazın prob sıcaklığı otomatik sıcaklık kontrol yardımı ile sağlandı.

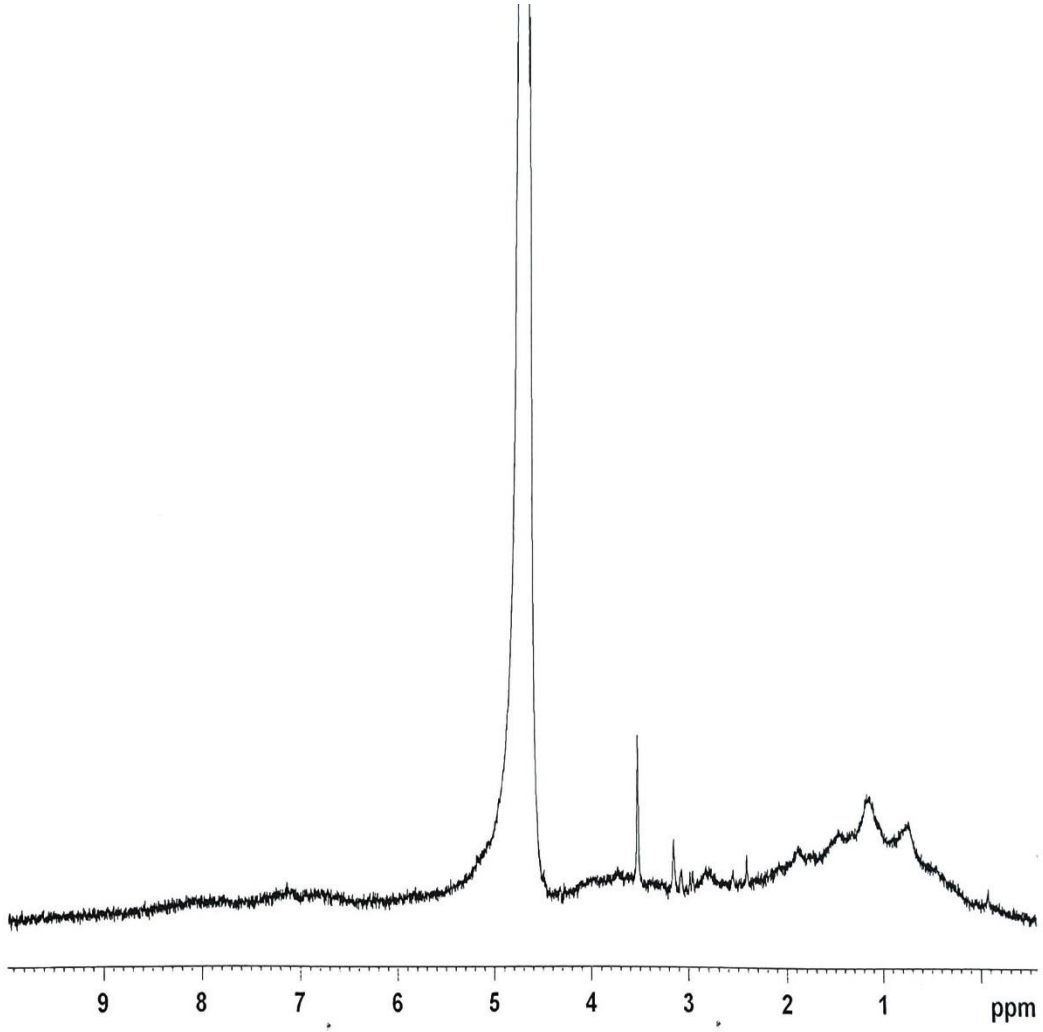
Kanserli kan ve idrar örneklerindeki bazı biyokimsal Blood Count Device (SYMEX XT2000I) and Clinical Chemistry Analyzer (Roche INTEGRA 400/PLUS and Roche COBAS C311) cihazlarıyla belirlendi.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

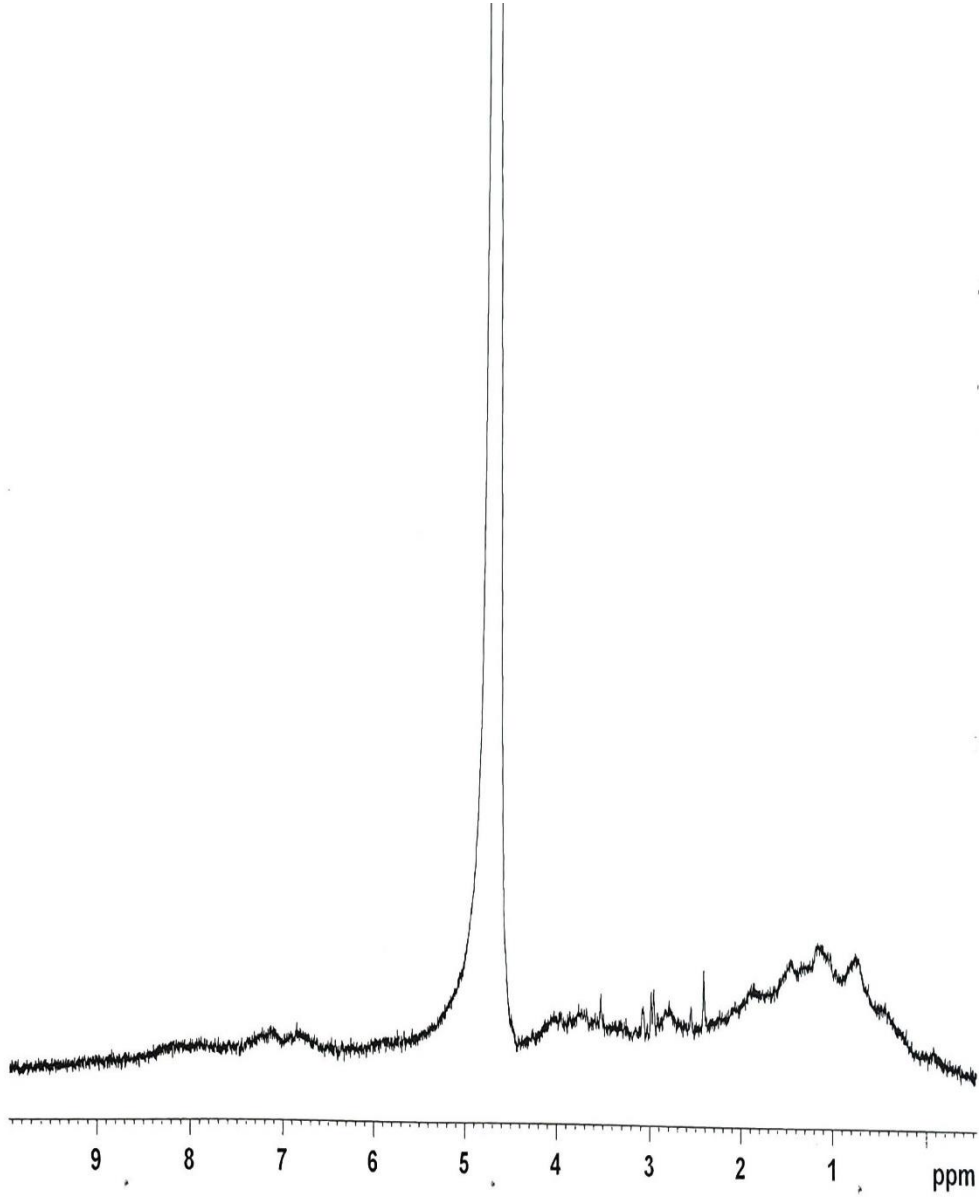
Kanserli ve Sağlıklı Kan Örneklerinin Yüksek Alan NMR Spektrumu şekil 4.1-4.6 da gösterilmiştir.



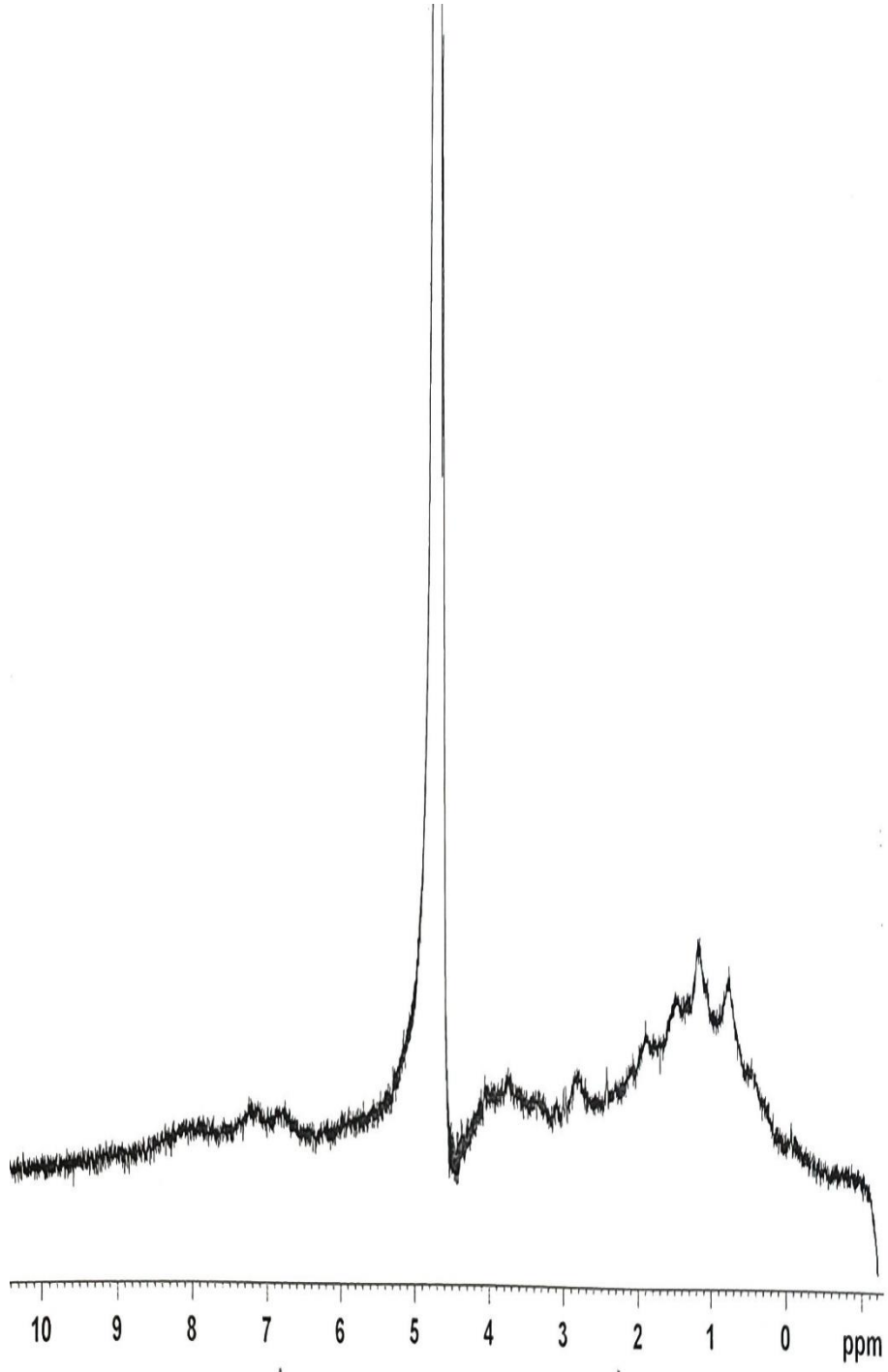
Şekil 4.1. D₂O ile hazırlanan kanserli kan örneğinin 400 MHz NMR spektrumu.



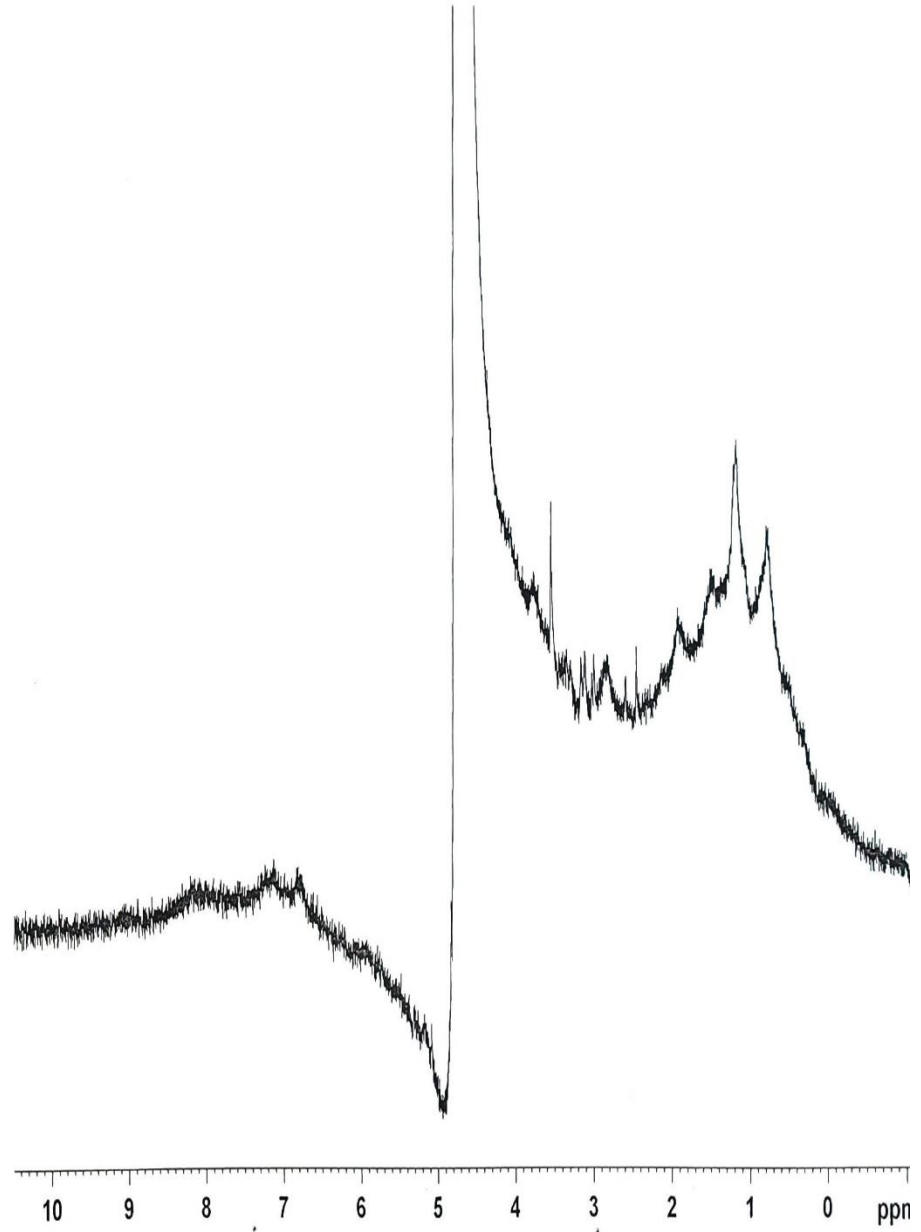
Şekil 4.2. D₂O ile hazırlanan kanserli kan örneğinin 400 MHz NMR spektrumu



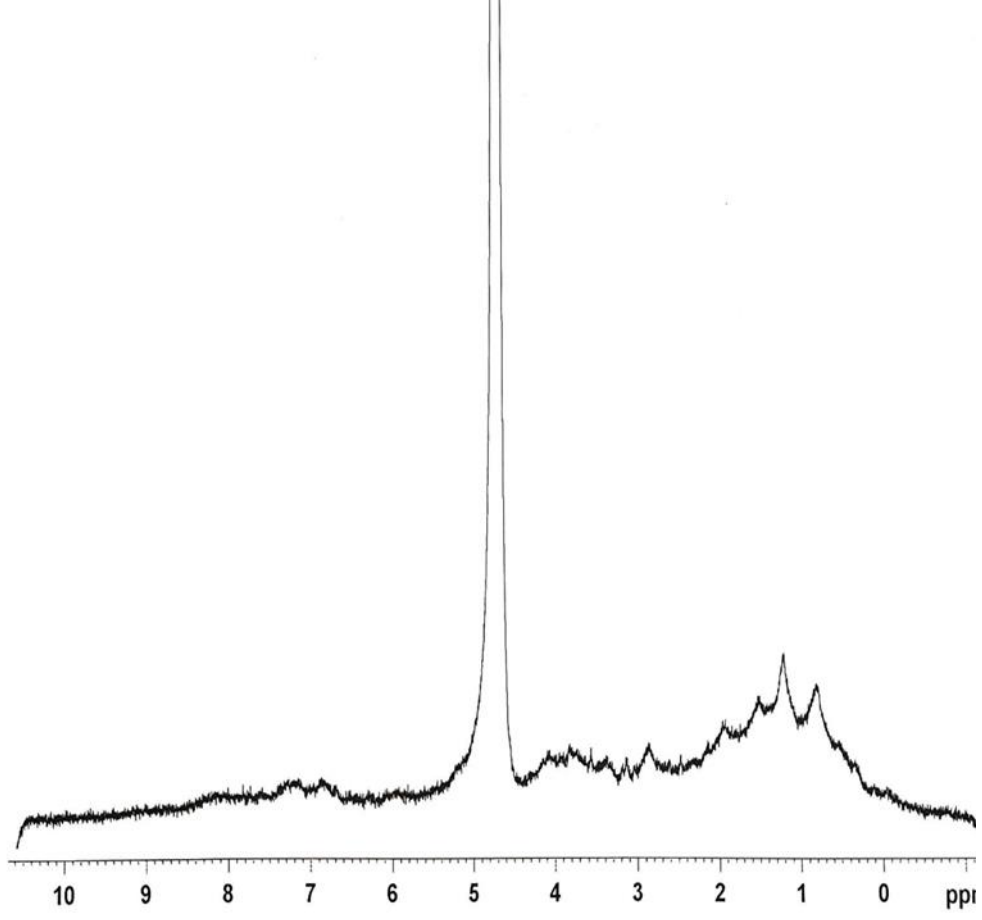
Şeki4.3. D₂O ile hazırlanan kanserli kan örneğinin 400 MHz NMR spektrumu.



Şekil 4.4. D₂O ile hazırlanan kanserli kan örneğinin 400 MHz NMR spektrumu.

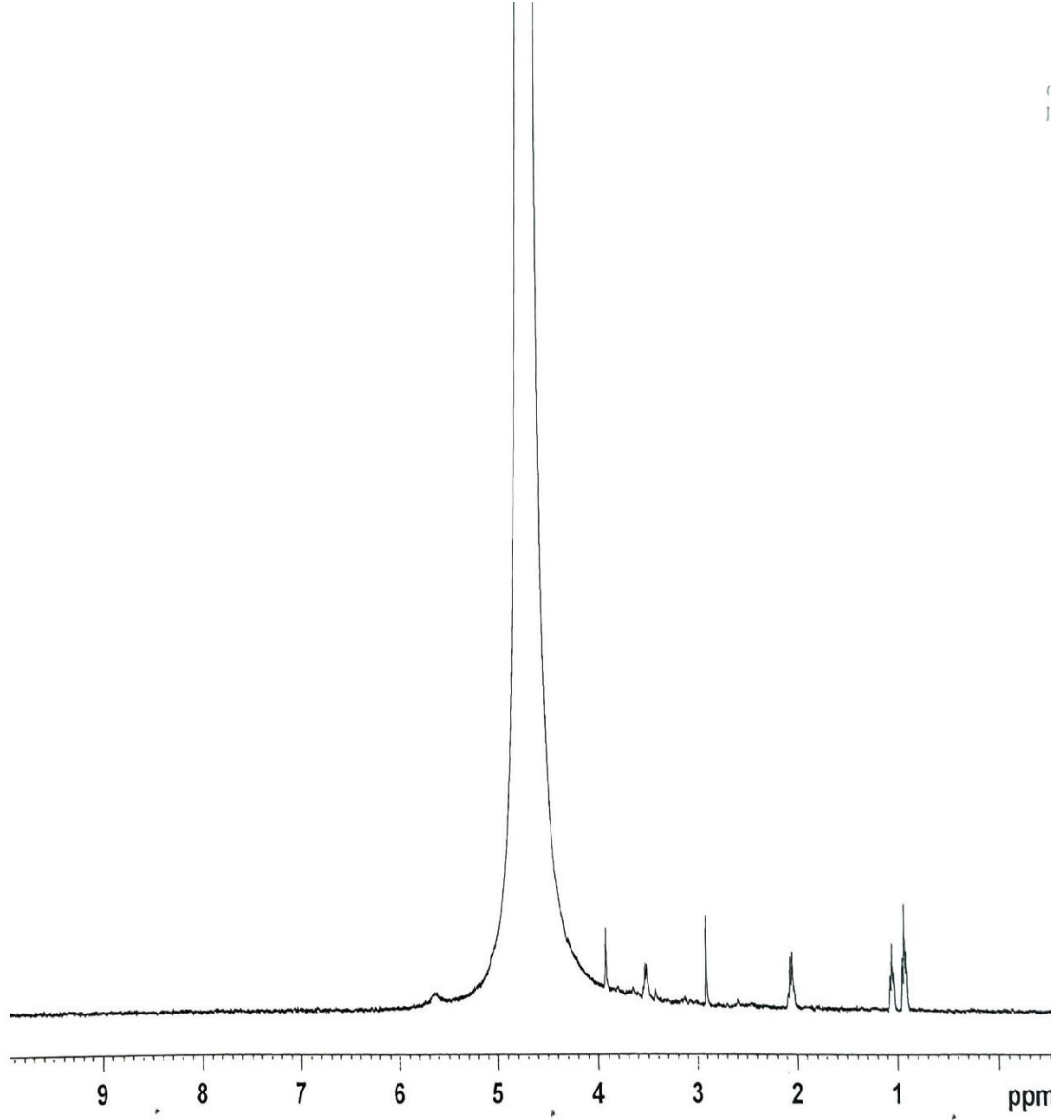


Şekil 4.5. D₂O ile hazırlanan kanserli kan örneğinin 400 MHz NMR spektrumu.

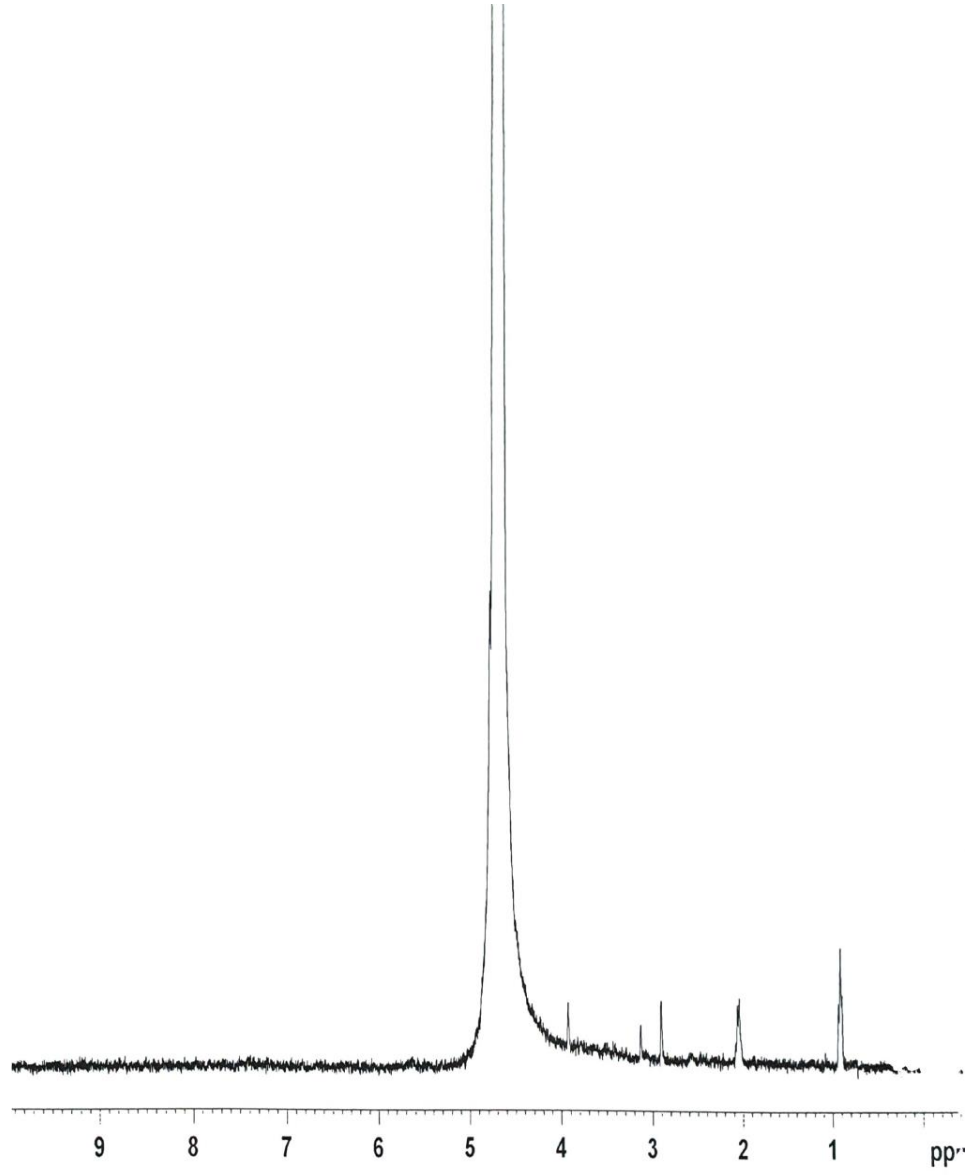


Şekil 4.6. D₂O ile sağlıklı kan örneğinin 400 MHz NMR spektrumu.

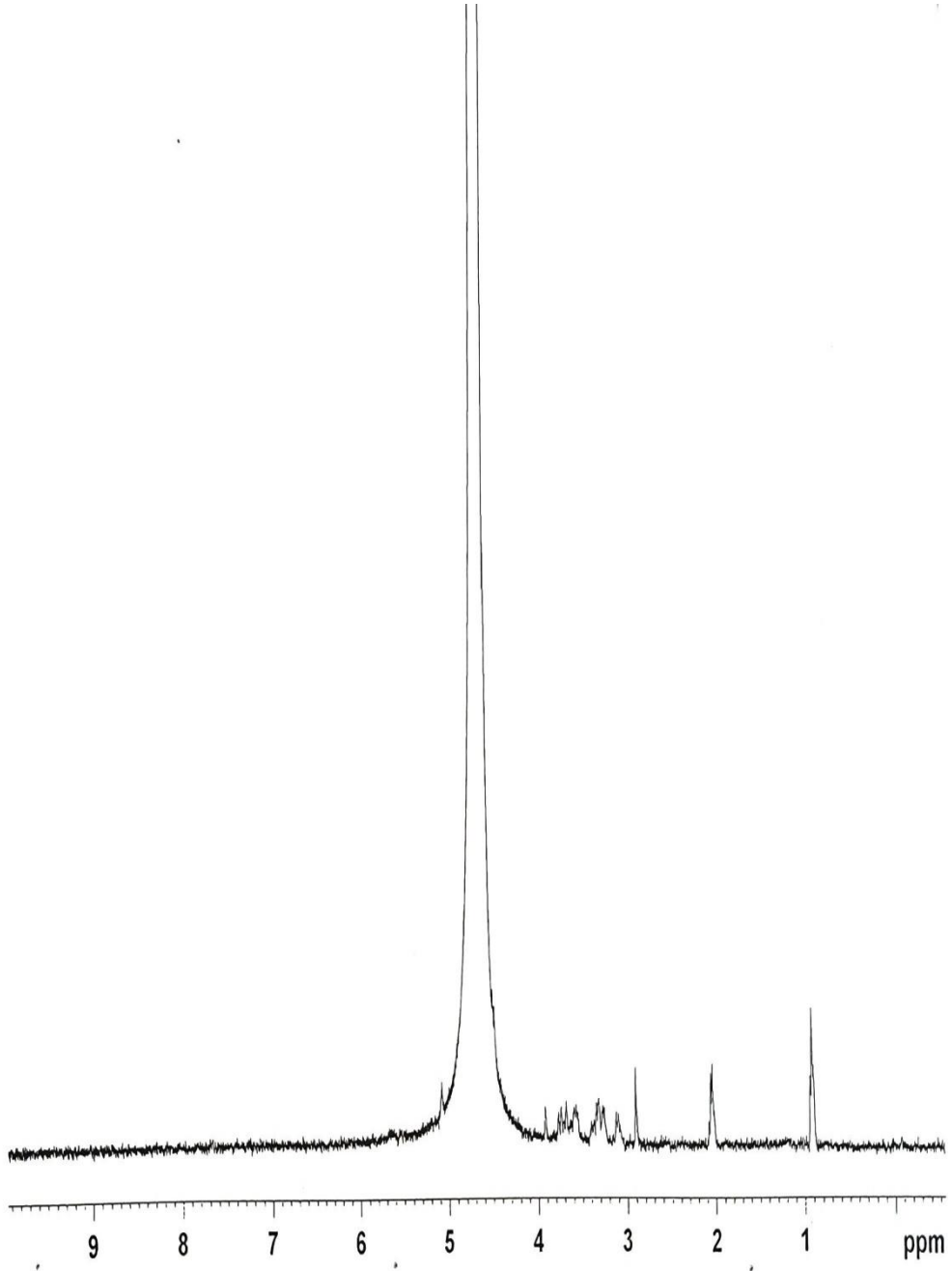
Kanserli, sağlıklı ve diabetli İdrar Örneklerinin Yüksek Alan NMR Spektrumu Şekil 4.7-4.15 de gösterilmiştir.



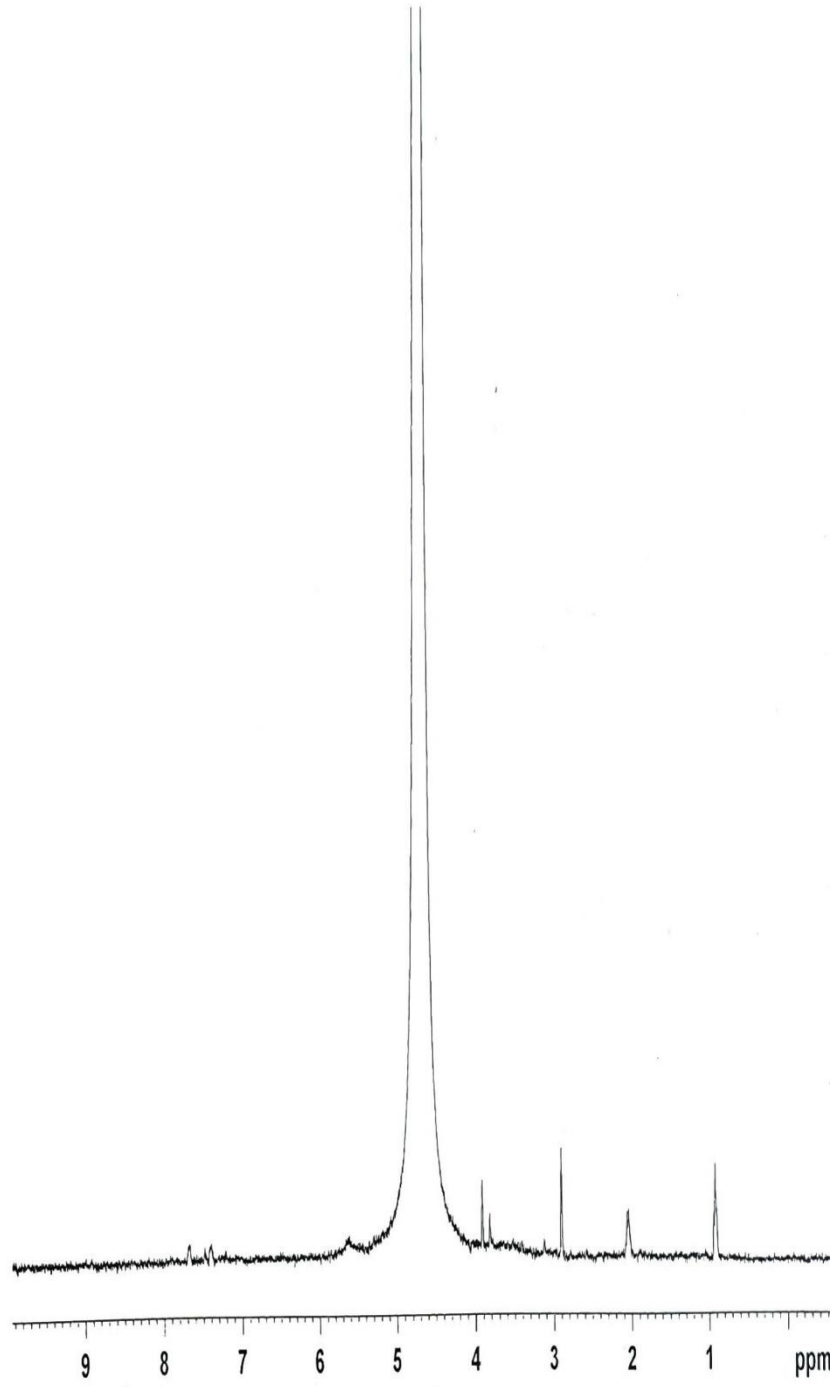
Şekil 4.7. D₂O ile hazırlanan kanserli idrar örneğinin 400 MHz NMR spektrumu.



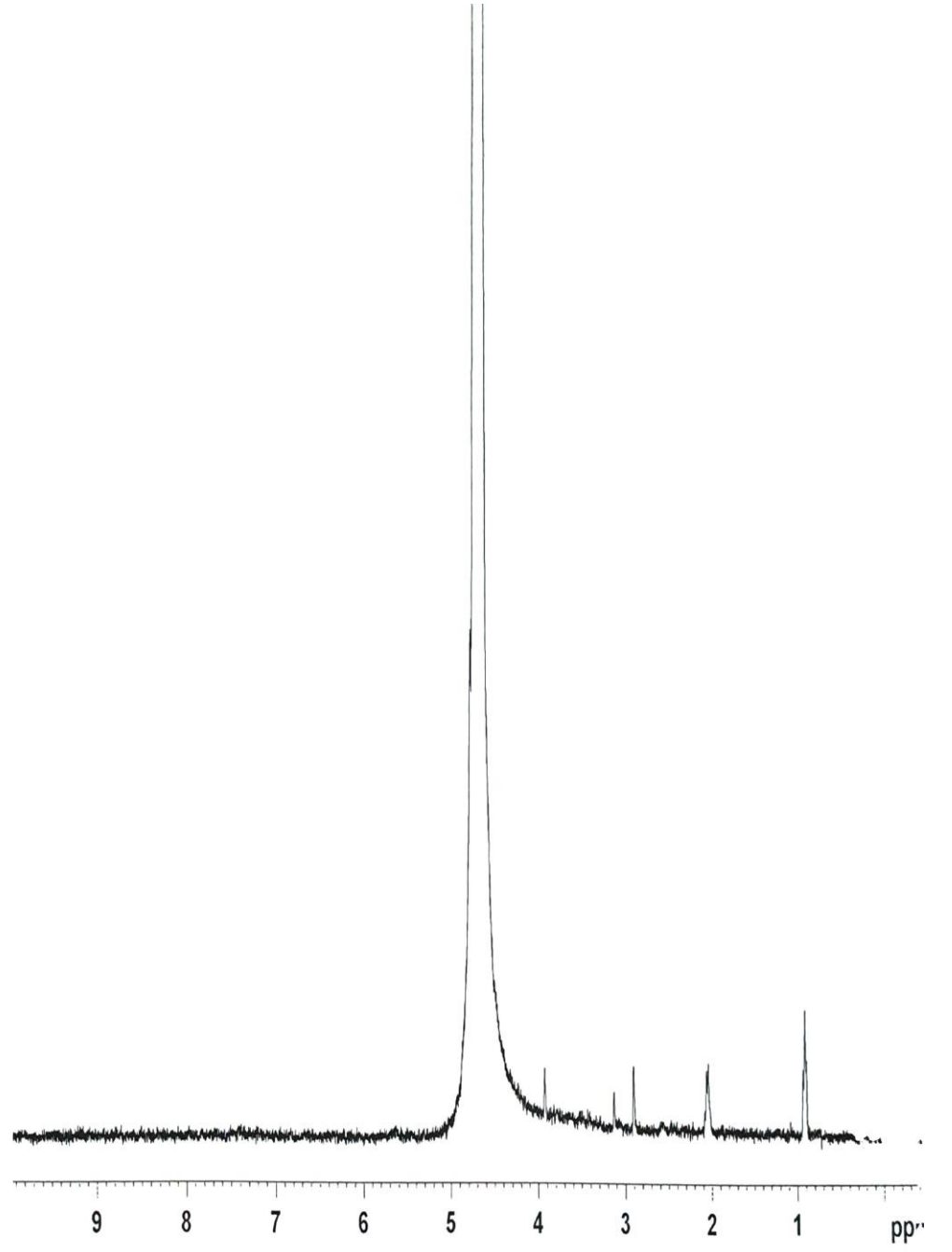
Şekil 4.8. D₂O ile hazırlanan kanserli idrar örneğinin 400 MHz NMR spektrumu.



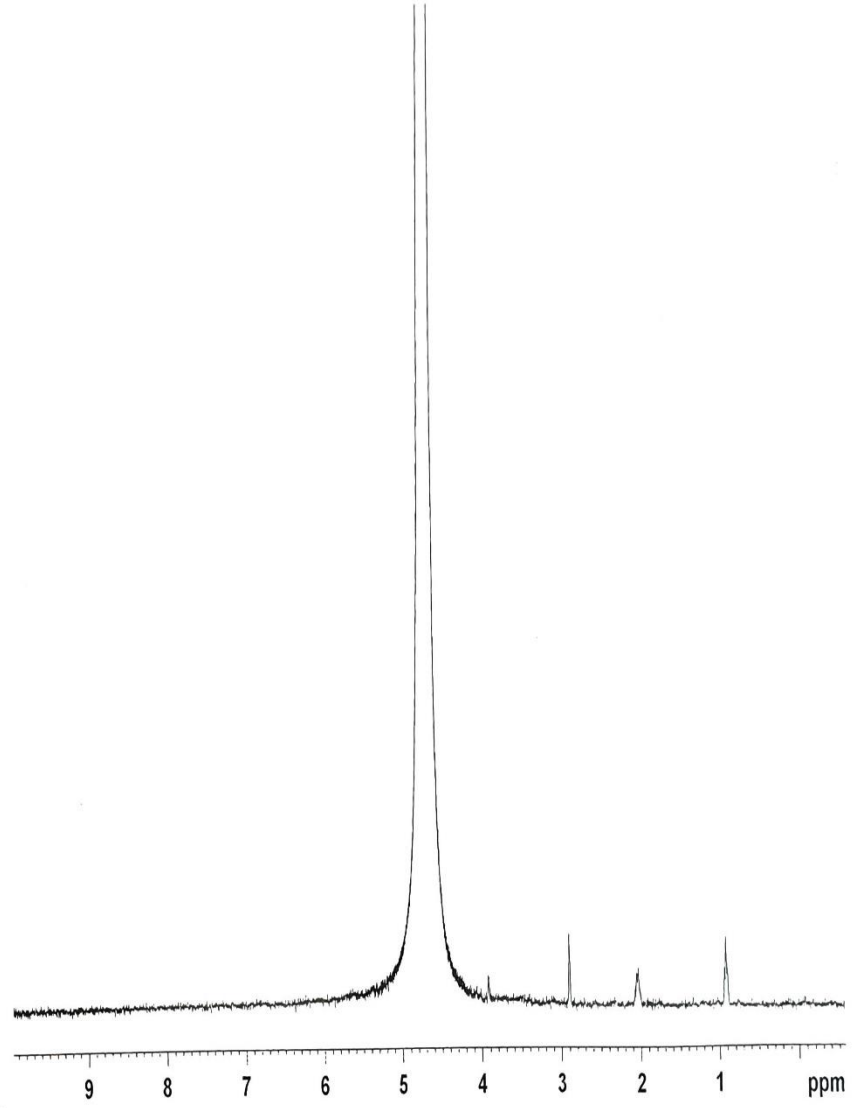
Şekil. 4.9. D₂O ile hazırlanan kanserli idrar örneğinin 400 MHz NMR spektrumu.



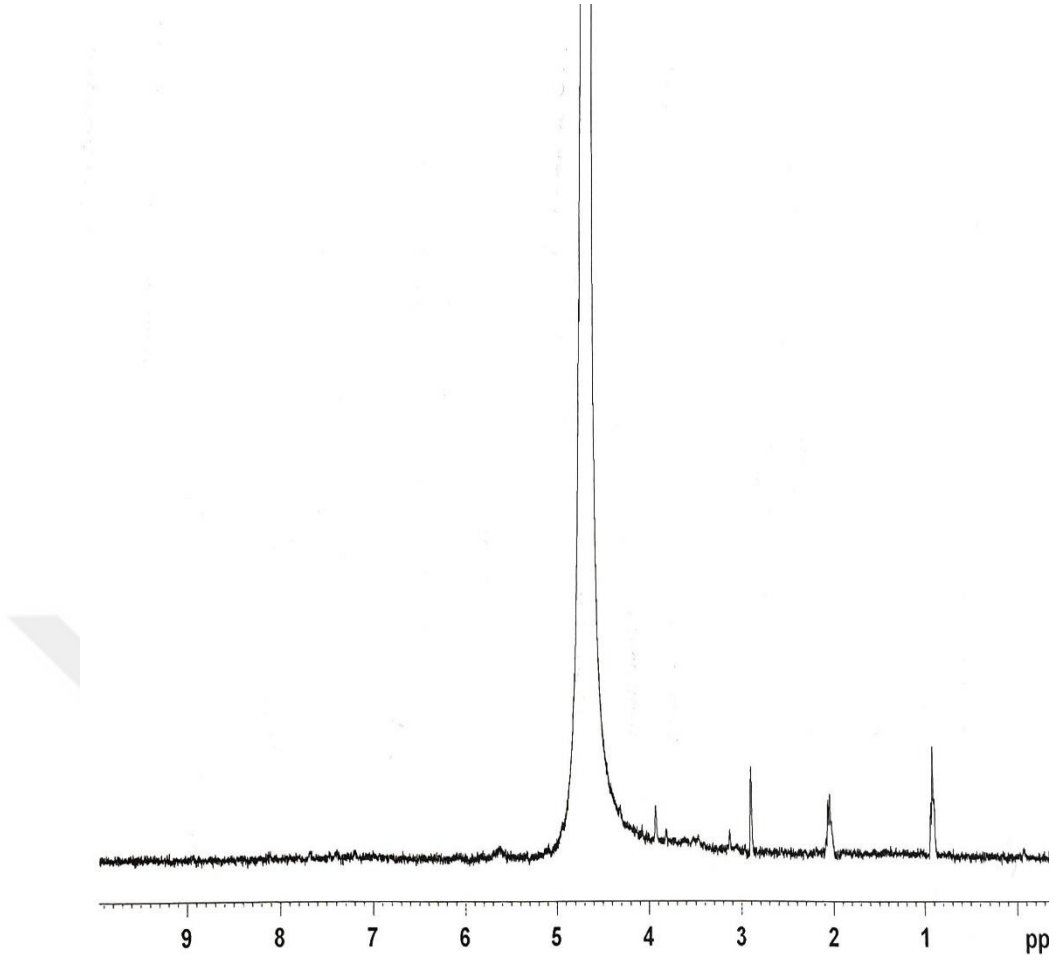
Şekil 4.10. D₂O ile hazırlanan kanserli idrar örneğinin 400 MHz NMR spektrumu.



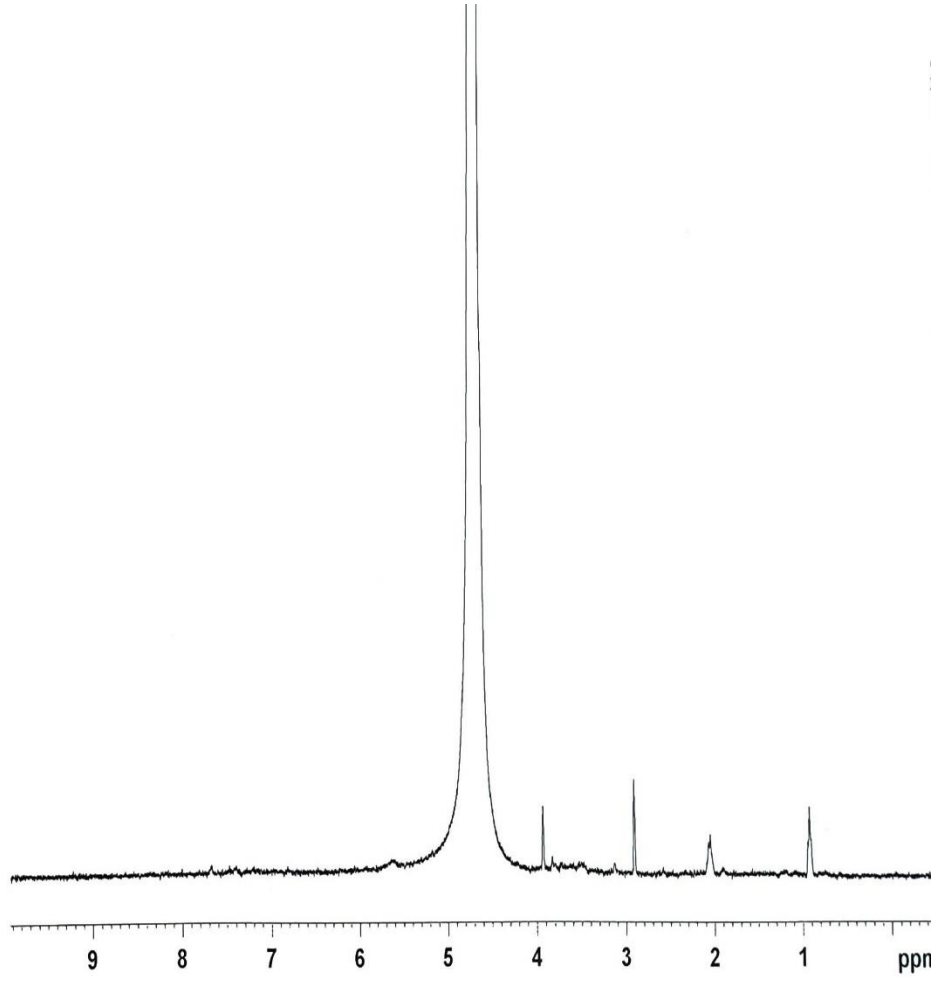
Şekil 4.11. D₂O ile hazırlanan kanserli idrar örneğinin 400 MHz NMR spektrumu.



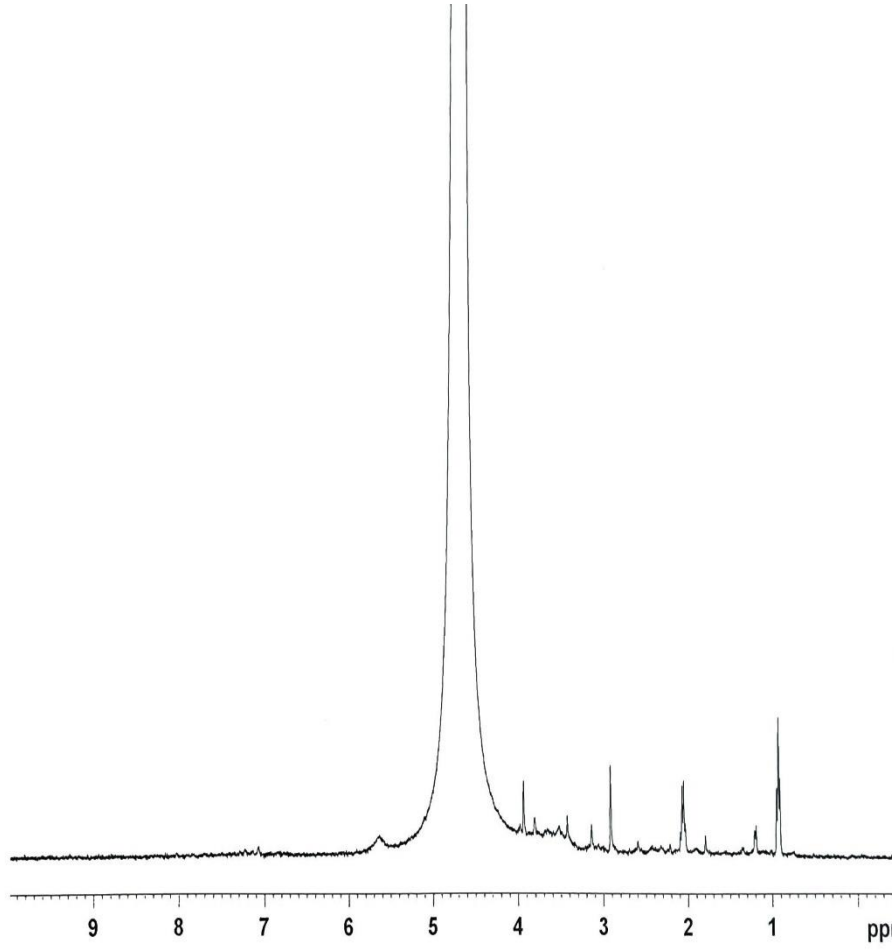
Şekil.4.12. D₂O ile hazırlanan kanserli idrar örneğinin 400 MHz NMR spektrumu



Şekil 4.13. D₂O ile hazırlanan sağlıklı idrar örneğinin 400 MHz NMR spektrumu



Şekil 4.14. D₂O ile hazırlanan sağlıklı idrar örneğinin 400 MHz NMR spektrumu



Şekil 4.15. D₂O ile hazırlanan diabetli idrar örneğinin 400 MHz NMR spektrumu

Ölçülen kan ve idrar örneklerindeki bazı biyokimsal parametereler Tablo 1 verilmiştir.

Tablo 4.1. Ölçülen kanserli kan ve idrar örneklerindeki bazı biyokimsal parametereler

	ORT	STANDART HATA
Hg	12,99	1,63
Alb	44,32	2,73
TP	71,55	5,02
Glukoz	117,55	27,39
Üre	27,67	8,98
Na	136,9	6,89
K	4,32	0,41
İdrar	6,22	0,67
Kalsiyum	9,51	0,42
Fosfor	3,6	0,95
Ürikasit	23,68	7,016

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Kanserli Kan Örneklerinin Sonuçları:

Şekil 4.1- 4.5’ da görüldüğü gibi kanserli kan örneklerinin yüksek alan NMR spektrumu iyi çözülmemiş geniş bir zarftan ibarettir. Bu zarf 0 ppm ile 8 ppm arasında değişmektedir. Kan örneğinin su (HOD) piki 4.71 ppm de çıkmakta olup, spektrumdaki en yüksek piktir. Bu pik çok yüksek olduğundan metabolit piklerini baskılamaktadır. Normal ve kanserli kan örneklerinin spektrumları arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

Şekil 4.1- 4.5’ te verdiğimiz geniş zarfın özellikle 0 ppm-4 ppm bölgesinde bazı metabolit pikleri de görülmektedir. Ancak bunların şiddeti zayıf olup, sayıları da örnekten örneğe değişmektedir. Bunun bir nedeni, örnekteki yüksek su sinyalinin metabolit sinyallerini baskılamasıdır. Diğer bir neden de kan serumundaki proteinlerdir. Proteinlerin yüksek olduğu durumlarda metabolit sinyalleri iyi çözilememektedir (Foxall ve ark 1992, Prakash ve ark 2016, Saleh ve ark 2017). Bu sonuçlar, Tablo 4.1.’de verilen yüksek Hg, albumin ve total protein miktarları ile tutarlıdır.

4.2. Sağlıklı Kan Örneklerinin Sonuçları

Şekil 4.6' da gösterilen sağlıklı kan örneği spektrumunda metabolit pikleri görülmektedir. Bu metabolitlerin spektrumdaki şiddeti zayıftır. Sayıları da örnekten örneğe değişmektedir. Bunun sebebi ise; örnekteki yüksek su sinyallerinin metabolitteki sinyalleri baskılamasıdır. Diğer bir sebebi ise; kandaki protein miktarından kaynaklanmaktadır. Proteinlerin yüksek olduğu durumlarda metabolit sinyalleri iyi çözilememektedir (Foxall ve ark 1992, Prakash ve ark 2016, Saleh ve ark 2017). Yukarıda yazıldığı üzere, sağlıklı ve kanserli kanların metabolitleri arasında bir fark bulunmamaktadır. Bu sonuçlar da, sağlıklı kandaki yüksek Hg, albumin ve total protein miktarları ile tutarlıdır.

4.3. Kanserli ve Sağlıklı İdrar Örneklerinin Sonuçları:

Şekil 4.7- 4.12' de gösterilen kanserli idrar örneklerinin spektrumlarında metabolit pikleri açık olarak görülmektedir. Bu durumda bu örneklerdeki Total Protein azlığı ile alakalıdır. Nitekim idrardaki Total protein μmol mertebesinde olup, serum veya plazma total protein miktarından çok azdır.

Şekil 4.13-4.14 de sağlıklı idrar örneğinin metabolit profili ve Şekil 4.15 de, karşılaştırma için, diabetli idrar örneğinin metabolite profili verilmiştir. Her üç profil tipi birbirinden farklıdır.

Şekil 4.7- 4.15' de verilen spektrumlar daha düşük NMR alanlarında yapılan ölçümlerle uyumludur (Messana 1998). Ancak yüksek alan NMR spektrumları çok daha fazla miktarda pik vermektedir (Santone ve ark, 2014, MacKinnon ve ark, 2019).

4.4. TARTIŞMA

Bilindiği üzere, yüksek alan NMR spektrumlarında su (HOD) piki daha şiddetli olup radyasyon dampingi yol açmaktadır (Zengin ve ark, 2013). Radyasyon dampingi yok etmek için su baskılama yöntemleri kullanılmaktadır (Foxall ve ark, 1992). Bu teknikler suyu yok etmekte ve metabolit piklerinin ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Ancak, su rölaksasyon zamanının direk ölçülmesine mani olmaktadır. Ayrıca bu tekniklerde bir ölçüm için 64 veya 128 tarama kullanılmaktadır. Bu kadar fazla tarama, özellikle fazla örnek ölçüldüğünde, deneysel zaman kaybına yol açmaktadır.

Bu çalışmada kullanılan sıvı miktarı, radyasyon damping'in üstesinden gelmek, sinyal şeklini düzgün tutmak ve doğru T_1 ve T_2 ölçüm konsantrasyonunda kalmak için kanlarda 0,02 mL ve idrar da 0.06 mL olarak tutulmuştur (Yılmaz ve ark, 2020). Bu düşük numune miktarı, tükürük ve idrarda bazı düşük konsantrasyonlu metabolit tepe noktalarının kaybına neden olabilir. Dondurarak kurutma ile elde edilen önceden konsantre numuneyi 0,98 mL döteryum okside eklemek, idrardaki metabolit tepe sayısını artırabilir (Reglinski ve ark, 1996). NMR durulma sürelerinin ölçümleri imkansız olsa bile, daha büyük miktarlarda numune kullanmak, idrar ve tükürük mevcut profillerindeki metabolit zirvelerinin sayısını da artırabilir (Messana ve ark, 1998). Ayrıca 64 veya 128 gibi daha yüksek tarama sayılarının kullanılmasının daha fazla metabolit tepe noktası göstereceği açıktır. Bu nedenle, mevcut yöntem, daha fazla metabolit tepe noktası ortaya çıkarmak için gelişmeye açıktır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

1. Çok az mikatarda kan veya idrar örneği, çok yüksek miktarda D_2O içinde seyreltilerek, metabolite profilleri elde edilmiştir.
2. Bu profilleri elde etmek için su baskılamaya yarayan pr-saturasyon puls teknikleri kullanılmamıştır.
3. Kullanılan teknik yeni ve basit bir tekniktir. İdrar örnekleri için başarılı metabolite profillerini ortaya koymuştur.
4. Kullanılan teknik örnekteki su sinyalinin T_1 ve T_2 durulma zamanlarının direkt ölçümüne izin vermektedir.
5. Kullanılan teknik, nispeten daha düşük frekansta (400 MHz) ve su baskılamasız, idrar metabolitlerini ortaya koymuştur.
6. Kan metabolitleri birbirine benzese de, kanserli ve sağlıklı idrar metabolitleri farklıdır. Bu farklılık teşhis amaçlı kullanılabilir.

5.2.Öneriler

Bu çalışmada, radyasyon damping alanının dışında kalmak ve durulma zamanı ölçümlerine olanak tanımak için çok düşük örnek miktarı kullanılmıştır.

- Metabolit pik sayısını arttırmak için, daha yüksek numune miktarı ile daha düşük D_2O içeren karışımların metabolite profilleri incelenmelidir.

- Bu deneylerde kullanılan 16 tarama yerine, 64 ve 128 tarama ile de deney yapılmalıdır.
- Kan ve idrar örneklerinin ^{13}C ve ^{31}P metabolite profilleri de elde edilmelidir.

KAYNAKLAR

- Beckonert O, Keun HC, Ebbels TMD, 2007. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc*, 2(11):2692–703
- Bilgin Zengin, Mehmet Zafer Koylu, Sibel Korunur and Ali Yilmaz, 2012. Elimination of Radiation Damping Effects from the NMR Relaxation Curves of $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ Mixtures Containing Protein and Ions, 2013 THE PHYSICAL SOCIETY OF THE REPUBLIC OF CHINA (Received August 7,)
- Carrington A and McLachlan AD, Introduction to Magnetic Resonance, 1967. With Applications to Chemistry and Chemical Physics (Harper and Row, London,).
- Chan AW, Mercier P, Schiller D, Bailey R, Robbins S, Eurich DT, 2016. (1)H-NMR urinary metabolomic profiling for diagnosis of gastric cancer. *Br J Cancer*, 114:59–62
- Craig A, Cloarec O, Holmes E, Nicholson JK, Lindon JC 2006. Scaling and normalization effects in NMR spectroscopic metabonomic data sets. *Anal Chem*, 78(7):2262–7.
- Deja S, Porebska I, Kowal A, Zabek A, Barg W, Pawelczyk K, et al 2014. Metabolomics provide new insights on lung cancer staging and discrimination from chronic obstructive pulmonary disease. *J Pharm Biomed Anal*, 100:369–80.
- Dona AC, Jimenez B, Schaefer H et al, 2014. Precision high-throughput proton NMR spectroscopy of human urine, serum, and plasma for large-scale metabolic phenotyping. *Anal Chem*, 86(19):9887–94.
- Emwas A-H, Luchinat C, Turano P et al, 2015. Standardizing the experimental conditions for using urine in NMR-based metabolomic studies with a particular focus on diagnostic studies: a review. *Metabolomics*, 11(4):872–94.

- Emwas A-HM, Salek RM, Griffin JL, Merzaban J 2013. NMR-based metabolomics in human disease diagnosis: applications, limitations, and recommendations. *Metabolomics*, 9(5):1048–72.
- Falegan OS, Ball MW, Shaykhutdinov RA, Pierorazio PM, Farshidfar F, Vogel HJ, et al 2017. Urine and serum metabolomics analyses may distinguish between stages of renal cell carcinoma. *Metabolites*, 7: 6.
- Fan TWM, Lane AN 2008. Structure-based profiling of metabolites and isotopomers by NMR. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 52(2–3):69–117.
- Fonville JM, Maher AD, Coen M, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK 2010. Evaluation of full resolution J-resolved ^1H NMR projections of biofluids for metabolomics information retrieval and biomarker identification. *Anal Chem*, 82(5):1811–21
- Foxall PJ, Price RG, Jones JK et al 1992. High- resolution proton magnetic resonance spectroscopy of cyst fluids from patients with polycystic kidney disease. *Biochim Biophys Acta*, 1138 (4): 305-314.
- G.A. Nagana Gowda and Daniel Raftery 2017. Whole Blood Metabolomics by ^1H NMR Spectroscopy Provides a New Opportunity To Evaluate Coenzymes and Antioxidants (*Anal Chem*, 89,8,4620-4627)
- Graaf and Kevin L 2003. Behar Quantitative ^1H NMR Spectroscopy of Blood Plasma Metabolites, (*Anal Chem*, 75, 9, 2100–2104)
- Hao D, Sarfaraz MO, Farshidfar F, Bebb DG, Lee CY, Card CM, et al 2016. Temporal characterization of serum metabolite signatures in lung cancer patients undergoing treatment. *Metabolomics*, 12:58.
- Holmes E, Wilson ID, Nicholson JK 2008. Metabolic phenotyping in health and disease. *Cell*, 134:714.
- Izquierdo-Garcia JL, Villa P, Kyriazis A, et al 2011. Descriptive review of current NMRbased metabolomic data analysis packages. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 59(3):263–70.
- In vivo ^1H - ^{13}C - (2003).NMR spectroscopy of cerebral metabolism

- Jacob D, Deborde C, Moing A 2013. An efficient spectra processing method for metabolite identification from H-1-NMR metabolomics data. *Anal Bioanal Chem*, 405(15):
- Jobard E, Pontoizeau C, Blaise BJ, Bachelot T, Elena-Herrmann B, Tredan O 2014. A serum nuclear magnetic resonance-based metabolomic signature of advanced metastatic human breast cancer. *Cancer Lett*, 343:33–41.
- Kertesz TM, Hill DW, Albaugh DR, Hall LH, Hall LM, Grant DF 2009. Database searching for structural identification of metabolites in complex biofluids for mass spectrometrybased metabonomics. *Bioanalysis*, 1(9).2011;30(5):884–906.
- Kumar D, Gupta A, Mandhani A, Sankhwar SN 2016. NMR spectroscopy of filtered serum of prostate cancer: a new frontier in metabolomics. *Prostate*, 76:1106–19.
- Liang Q, Liu H, Zhang T, Jiang Y, Xing H, Zhang A-H 2016. Discovery of serum metabolites for diagnosis of progression of mild cognitive impairment to Alzheimer's disease using an optimized metabolomics method. *RSC Adv*, 6:3586–9
- Li Y, Ju L, Hou Z, Deng H, Zhang Z, Wang L, et al 2015. Screening, verification, and optimization of biomarkers for early prediction of cardiotoxicity based on metabolomics. *J Proteome Res*, 14:2437–45.
- Lin W, Zhang J, Liu Y, Wu R, Yang H, Hu X, et al 2017. Studies on diagnostic biomarkers and therapeutic mechanism of Alzheimer's disease through metabolomics and hippocampal proteomics. *Eur J Pharm Sci*, 105:119–26.
- Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E 2007. *The Handbook of Metabonomics and Metabolomics*. Amsterdam, Oxford: Elsevier.
- Liu Y, Hong Z, Tan G, Dong X, Yang G, Zhao L, et al 2014. NMR and LC/MS-based global metabolomics to identify serum biomarkers differentiating hepatocellular carcinoma from liver cirrhosis. *Int J Cancer*, 135:658–68.

- London, M Ernst, S Grant, K Bonson, A Weinstein, 2000. Orbitofrontal cortex and human drug abuse: functional imaging Mar;10(3):334-42. doi: 10.1093/cercor/10.3.334
- Louis E, Adriaenssens P, Guedens W, Bigirimurame T, Baeten K, Vanhove K, et al 2016. Detection of lung cancer through metabolic changes measured in blood plasma. *J Thorac Oncol*, 11:516–23
- Ludwig C, Viant MR 2010. Two-dimensional J-resolved NMR Spectroscopy: review of a key methodology in the metabolomics toolbox. *Phytochem Anal*, 21(1).
- MacKinnon N, Ge W, Han P et al 2019. NMR-Based Metabolomic Profiling of Urine: Evaluation for Application in Prostate Cancer Detection. *Nat Prod Commun*, 14(5): 1–13
- Messana I, Fomi F, Ferrari F et al 1998. Proton nuclear magnetic resonance spectral profiles of urine in type II diabetic patients. *Clin Chem*, 44(7): 1529–1534.
- Mikkonen JJ, Singh SP, Herrala M, Lappalainen R, Myllymaa S, Kullaa AM 2016. Salivary metabolomics in the diagnosis of oral cancer and periodontal diseases. *J Periodontal Res*, 51:431–7.
- McConnell YJ, Farshidfar F, Weljie AM, Kopciuk KA, Dixon E, Ball CG, et al 2017. Distinguishing benign from malignant pancreatic and periampullary lesions using combined use of (1)H-NMR spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry. *Metabolites*, 7:3.
- Monleon D, Wang L, Tang Y, Liu S, Mao S, Ling Y, et al 2013. Metabonomic profiling of serum and urine by 1H NMR-based spectroscopy discriminates patients with chronic obstructive pulmonary PLoS One, 8: e65675.
- Pearce JTM, Athersuch TJ, Ebbels TMD, Lindon JC, Nicholson JK, Keun HC 2008. Robust algorithms for automated chemical shift calibration of 1D H-1 NMR spectra of blood serum. *Anal Chem*, 80(18):7158–62.
- Pinto J, Domingues MRM, Galhano E, et al 2014. Human plasma stability during handling and storage: impact on NMR metabolomics. *Analyst*, 139(5):1168–77.

- Posma JM, Garcia-Perez I, De Iorio M, et al 2012. Subset Optimization by Reference Matching (STORM): an optimized statistical approach for recovery of metabolic biomarker structural information from H-1 NMR spectra of biofluids. *Anal Chem*
- Puchades-Carrasco L, Jantus-Lewintre E, Perez-Rambla C, Garcia-Garcia F, Lucas R, Calabuig S, et al 2016. Serum metabolomic profiling facilitates the non-invasive identification of metabolic biomarkers associated with the onset and progression of non- small cell lung cancer. *Oncotarget*, 7:12904–16.
- Prakash R, Shyamala K, Girish HC, et al 2016. Comparison of components of odontogenic cyst fluids: A review. *J Med Radiol pathol surg*, 2: 15–17.
- Reglinski J, Watson ID 1996. An analytical perspective of NMR spectroscopy of biological fluids and cells. *Ann Clin Biochem*, 33 :290-307.
- Richard V, Conotte R, Mayne D, Colet JM 2017. Does the 1H-NMR plasma metabolome reflect the host-tumor interactions in human breast cancer? *Oncotarget*, 8:49915–30.
- Saleh, MA, Mohamed EA 2017. Determination of proteins and cholesterol levels in the fluid of jaw cystic lesions in patients attending Khartoum Teaching Dental Hospital. *Adv Dent & Oral Health*, 7(1): 0034-0038, DOI: 10.19080/ ADOH. 2017. 07. 555709.
- Santonea C, Dinallode V, Pacib M et al 2014. Saliva metabolomics by NMR for the evaluation of sport performance, *J Pharm Biomed Anal*, 88: 441–44
- Seonwoo Min, Byunghan Lee 2017. Sungroh Yoon Deep learning in bioinformatics PMID: 27473064, DOI: 10.1093/bib/bbw068, *Brief Bioinform*, Sep, 1;18(5):851-86 doi: 10.1093/bib/bbw068.
- Song L, et al. (2019). Regulating the Golgi apparatus sorting of proteinase A to decrease its excretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 46(5):601-6

- Snytnikova OA, Khlichkina AA, Sagdeev, RZ, Tsentalovich, Y. (2019). Evaluation of sample preparation protocols for quantitative NMR-based metabolomics. *Metabolomics*, 15. 10.1007/s11306-019-1545-y.
- Spratlin JL, Serkova NJ, Eckhardt SG 2009. Clinical applications of metabolomics in oncology: a review. *Clin Cancer Res*, 15:431–40.
- Tulpan D, Leger S, Belliveau L, Culf A, Cuperlovic-Culf M 2011. MetaboHunter: an automatic approach for identification of metabolites from ^1H -NMR spectra of complex mixtures. *BMC Bioinforma*, 12.
- Ussher JR, Elmariah S, Gerszten RE, Dyck JR 2016. The emerging role of metabolomics in the diagnosis and prognosis of cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*, 68: 2850–70.
- Vahabi F, Sadeghi S, Arjmand M, Mirkhani F, Hosseini E, Mehrabanfar M, et al 2017. Staging of colorectal cancer using serum metabolomics with (^1H) NMR Spectroscopy. *Iran J Basic Med Sci*, 20:835–40.
- Yılmaz UN, Yılmaz BD (2020): Shortening of NMR $1/T_1$ and $1/T_2$ relaxation rate distribution intervals in D_2O containing jaw cysts or abscesses: separation of cysts from abscesses. *J Appl Spectrosc*, 87(5): 946-950. DOI 10.1007/s10812-020-01093-0
- Zamani Z, Arjmand M, Vahabi F, Eshaq Hosseini SM, Fazeli SM, Iravani A, et al 2014. A metabolic study on colon cancer using (^1H) nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochem Res Int*, 348712.
- Zheng H, Ji J, Zhao L, Chen M, Shi A, Pan L, et al 2016. Prediction and diagnosis of renal cell carcinoma using nuclear magnetic resonance-based serum metabolomics and self-organizing Maps. *Oncotarget*, 7:59189–98.
- Wang Y, Luo X, Zhang GH, Li SL 2016. Nuclear magnetic resonance based study reveals the metabolomics profile of nasopharyngeal carcinoma. *Genet Mol Res*, 15:1–9.

Wen S, Zhan B, Feng J, Hu W, Lin X, Bai J, et al 2017. Non-invasively predicting differentiation of pancreatic cancer through comparative serum metabolomic profiling. *BMC Cancer*, 17:708.

Wishart DS 2011. Advances in metabolite identification. *Bioanalysis*, 3(15):1769–82.

Wishart DS, Jewison T, Guo AC, et al 2013. HMDB 3.0—the human metabolome database in 2013. *Nucleic Acids Res*, 41(D1): D801–7

