Metaboličko profiliranje za detekciju bolesti temeljeno na masenoj spektrometriji

Živalj, Patricia

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:263153

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

METABOLIČKO PROFILIRANJE ZA DETEKCIJU BOLESTI TEMELJENO NA MASENOJ SPEKTROMETRIJI

ZAVRŠNI RAD

PATRICIA ŽIVALJ

Matični broj: 359

Split, rujan, 2021.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

METABOLIČKO PROFILIRANJE ZA DETEKCIJU BOLESTI TEMELJENO NA MASENOJ SPEKTROMETRIJI

ZAVRŠNI RAD

PATRICIA ŽIVALJ

Matični broj: 359

Split, rujan, 2021.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

MASS SPECTROMETRY-BASED METABOLIC PROFILING FOR DISEASE DETECTION

BACHELOR THESIS

PATRICIA ŽIVALJ

Parent number: 359

Split, September, 2021

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Studij kemije

Znanstveno područje: biomedicina
Znanstveno polje: biokemija
Tema rada je prihvaćena na 6. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta
Mentor: Izv. prof. dr. sc. Mila Radan
Pomoć pri izradi:

METABOLIČKO PROFILIRANJE ZA DETEKCIJU BOLESTI TEMELJENO NA MASENOJ SPEKTROMETRIJI

Patricia Živalj, 359

Sažetak:

Masena spektrometrija igra važnu ulogu u pronalaženju biomarkera za detekciju bolesti. Visokokvalitetni kvantitativni podaci potrebni su za preciznu analizu metaboličkih smetnji kod pacijenata. Ovaj rad opisuje nedavne napretke u istraživanju metabolizma temeljenom na masenoj spektrometriji s primjenom u detekciji nekoliko najzastupljenijih ljudskih bolesti, s fokusom na istraživanje kohorta, korištene maseno spektrometrijske platforme, statističke analize i identifikaciju razlikovnih metabolita. Sumirani su potencijalni nedavno otkriveni biomarkeri za dijabetes tipa 2, kardiovaskularne bolesti, hepatocelularni karcinom te su raspravljena ograničenja i mogućnosti.

Ključne riječi: biomarkeri, neciljana metabolomika, masena spektrometrija, analiza podataka
Rad sadrži: 38 stranica, 5 slika, 1 tablica, 11 literaturnih referenci
Jezik izvornika: hrvatski
Sastav Povjerenstva za obranu:
1. prof. dr sc. Mladen Miloš, predsjednik
2. prof. dr. sc. Tea Bilušić, član
3. izv. prof. dr. sc. Mila Radan, mentor
Datum obrane: 28.09.2021.
Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD
BACHELOR THESIS
University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Study
Scientific area: biomedicine**Scientific field:** biochemistry
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 6.
Mentor: Assoc prof.Mila Radan
Technical assistance:

MASS SPECTROMETRY-BASED METABOLIC PROFILING FOR DISEASE DETECTION

Patricia Živalj, 359

Abstract:

Mass spectrometry plays an important role in seeking biomarkers for disease detection. High-quality quantitative data is needed for accurate analysis of metabolic perturbations in patients. This thesis describes recent developments in mass spectrommetry-based metabolomics research with applications to the detection of several major common human diseases, focusing on study cohorts, mass spectrometry platforms utilized, statistical analyses and discriminant metabolite identification. Potential disease biomarkers recently discovered for type 2 diabetes, cardiovascular diseases,hepatocellular carcinoma are summarized and limitations and possibilities are discussed.

Keywords: disease biomarkers, non-targeted metabolomics, mass spectrometry, data analysis
Thesis contains: 38 pages, 5 figures, 1 table, 11 references
Original in: Croatian
Defence committee:
1. Mladen Miloš- PhD, full prof., chair person
2. Tea Bilušić - PhD, full prof., member
3. Mila Radan – PhD, associate prof., supervisor
Defence date: September 28th, 2021
Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Završni rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Mile Radan u razdoblju od lipnja do rujna 2021. godine.

Zahvaljujem svim profesorima koji su sudjelovali u izgrađivanju mog znanja tijekom cjelokupnog obrazovanja.
Posebno zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Mili Radan na divnom pristupu, predanosti, trudu i strpljenju koje je iskazala i inače i tijekom pisanja ovog završnog rada.

Hvala i mojoj obitelji i prijateljima na podršci i razumijevanju tijekom studija.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak ovog završnog rada bio je upoznati se s osnovama metabolomike i istražiti literaturu vezano za najnovije mogućnosti primjene različitih tehnika detekcije metabolita u dijagnostici raznih bolesti. U ovom radu pruža se pregled istraživanja neciljane metabolomike (sveobuhvatno analizira sve mjerljive analite u uzorku) temeljenih na masenoj spektrometriji. Također, bit će objašnjene općenite procedure za tijek rada neciljane metabolomike te će biti pružene smjernice za provođenje tog tipa istraživanja.

SAŽETAK:

Masena spektrometrija igra važnu ulogu u pronalaženju biomarkera za detekciju bolesti. Visokokvalitetni kvantitativni podaci potrebni su za preciznu analizu metaboličkih smetnji kod pacijenata. Ovaj rad opisuje nedavne napretke u metabolomičkom istraživanju temeljenom na masenoj spektrometriji s primjenom u detekciji nekoliko najzastupljenijih ljudskih bolesti, s fokusom na istraživanje kohorta, korištene maseno-spektrometrijske platforme, statističke analize i identifikaciju razlikovnih metabolita. Sumirani su potencijalni nedavno otkriveni biomarkeri za dijabetes tipa 2, kardiovaskularne bolesti, hepatocelularni karcinom te su raspravljena ograničenja i mogućnosti [1].

KLJUČNE RIJEČI: biomarkeri za bolesti, neciljana metabolomika, masena spektrometrija, analiza podataka

SUMMARY:

Mass spectrometry plays an important role in seeking biomarkers for disease detection. High-quality quantitative data is needed for accurate analysis of metabolic perturbations in patients. This thesis describes recent developments in mass spectrommetry-based metabolomics research with applications to the detection of several major common human diseases, focusing on study cohorts, mass spectrometry platforms utilized, statistical analyses and discriminant metabolite identification. Potential disease biomarkers recently discovered for type 2 diabetes, cardiovascular diseases,hepatocellular carcinoma are summarized and limitations and possibilities are discussed. [1]

KEYWORDS: disease biomarkers, non-targeted metabolomics, mass spectrometry, data analysis

Sadržaj

UVOD **1**

1. METABOLOMIKA **3**

1.1. Metaboliti **5**

1.2. Biomarkeri **6**

1.3. Tijek studija metabolomičkog profiliranja **8**

2. PROCEDURA NECILJANOG METABOLIČKOG ISTRAŽIVANJA **9**

2.1. Priprema uzoraka **11**

2.2. Platforme za metaboličko profiliranje temeljeno na masenoj spektrometriji **14**

2.3. Analiza podataka **16**

2.4. Identifikacija metabolita **18**

2.5. Interpretacija dobivenih podataka **19**

3. OGRANIČENJA I MOGUĆNOSTI **21**

4. PRIMJERI PRIMJENE NECILJANE METABOLOMIKE U OTKRIVANJU BOLESTI POMOĆU BIOMARKERA **22**

5. ZAKLJUČAK **24**

6. LITERATURA **25**

UVOD

Metabolon stanice,tkiva,organa ili organizma je kompletni skup malih molekularnih metabolita koji su krajnji produkti staničnih procesa. Metaboliti su supstrati, male molekule čija je relativna molekulska masa manja od 1000 daltona. Promjene metabolona reflektiraju međudjelovanje promjena na molekulama poput gena i proteina s čimbenicima iz okoliša. [4]

Metabolomika je tehnika visoko protočnog analitičkog profiliranja koja podrazumijeva kvantifikaciju i identifikaciju velikog broja malih organskih molekula, metabolita, koji su prisutni u kompleksnim biološkim uzorcima, s naglaskom na metabolite koji diskriminiraju patološka od zdravih stanja. Kombinirajući visoko-protočnu analitičku tehnologiju i multivarijatne analize podataka, metabolomika nudi pregled metaboličkih mehanizama. [3]

Svaka vrsta stanica i tkiva ima jedinstveni metabolički "otisak prsta" koji može rasvijetliti informacije specifične za organ ili tkivo. Metaboličko profiliranje daje trenutni snimak fiziologije stanice tj. kvantitativnu analizu serije metabolita koji pripadaju nekoj skupini spojeva ili sudjeluju u određenim metaboličkim putevima. Budući da je svaka bolest jedinstvena, te određene grupe metabolita mogu dovesti do otkrića karakterističnog "potpisa bolesti" po kojem bolest možemo prepoznati. Taj "potpis" može se mijenjati kako se proces u stanicama razvija te tako reflektirati zdravstveno stanje pacijenta kroz prikaz fenotipa. Tijekom proteklog desetljeća, klinička metabolomika je doživjela procvat no razvoj nije došao odjednom ni brzo. Kroz povijest, slatkoća urina koristila se za dijagnosticiranje dijabetesa. U kasnim 1940-im i ranim 1950-im, Roger Williams i kolege predstavili su ideju "metaboličkog uzorka" da bi objasnili rezultate njihovih istraživanja kromatografije na papiru. Taj uzorak razlikovao je spojeve iz sline i iz urina među različitim jedinkama. Međutim, ta ideja nije bila šire prihvaćena sve do 1960-ih kad je plinska kromatografija uspješno iskorištena za profiliranje složenih bioloških matrica. [3]

U 1960-im i 1970-im, plinska kromatografija te plinska kromatografija spregnuta s masenom spektrometrijom bile su uspješno korištene tehnike za

dijagnosticiranje metaboličkih poremećaja uključujući i bolest urina mirisa javorovog sirupa i fenilketonuriju.

U 1970-im, izraz "metabolomičko profiliranje" je osmislila Marjorie Horning da bi opisala kromatografski uzorak združen s analizom biofluida.

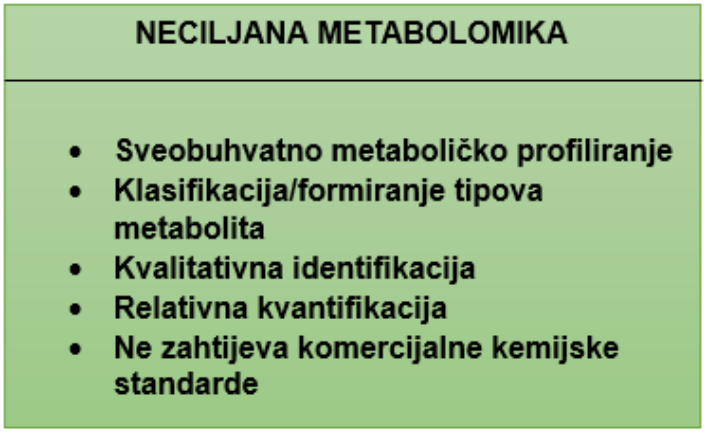
S razvojem osjetljivosti instrumenata i alata za statističku analizu, metabolomičko područje se posljedično tome razvilo pred kraj 20. stoljeća i od prošlog desetljeća se široko primjenjuje. [3]

Kao analitički alati u metabolomici se, osim plinske kromatografije s masenom spektrometrijom, koristi i tekućinska kromatografija i kapilarna elektroforeza spregnute s masenom spektrometrijom te nuklearna magnetska rezonanca. U usporedbi s ostalim nabrojanim analitičkim metodama, plinska kromatografija je jedna od najučinkovitijih, najosjetljivijih i najpouzdanijih alata za metabolička istraživanja. Ona proizvodi reproducibilne uzorke molekularne fragmentacije što je čini cjelovitim alatom za identifikaciju metabolita.

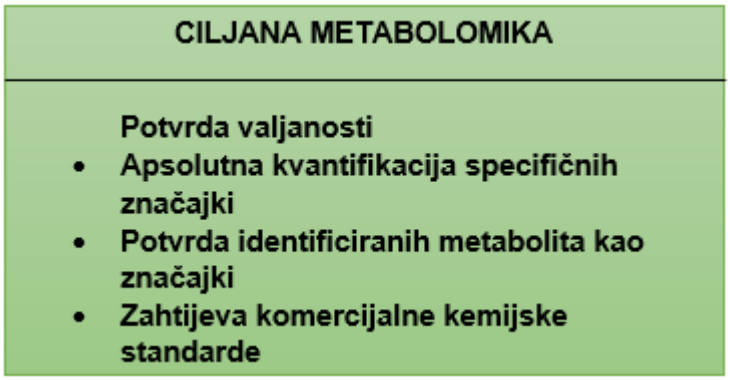
Iako je primjena plinske kromatografije ograničena na hlapljive spojeve, metaboliti se mogu analizirati ovom tehnikom na način da se podvrgnu procesu derivatizacije čime se prevode u hlapljive spojeve. Najčešća reakcija za derivatizaciju uzoraka je sililacija što predstavlja uvođenje silil grupe s cijem povećanja hlapljivosti spoja. [3]

1. METABOLOMIKA

Kao što je već spomenuto u uvodu, metabolomika je tehnika za identifikaciju metabolita u svrhu dobivanja informacija o trenutnom stanju fiziologije stanice kako bismo na temelju očitanih promjena metabolita saznali postoje li znakovi bolesti u stanici, utvrdili dijagnozu i na vrijeme pristupili liječenju iste. Tijekom svog razvoja, metabolomika se podijelila u dva smjera, u ciljanu metabolomiku: koja teži kvantitativno odrediti koncentraciju prethodno definiranog seta kemijski označenih metabolita, i u neciljanu metabolomiku: koja sveobuhvatno analizira sve mjerljive analite u uzorku, uključujući i kemijske nepoznanice.[1]



Slika 1.1. *Karakteristike neciljane metabolomike*



Slika 1.2. *Karakteristike ciljane metabolomike*

Tijekom istraživanja, najčešće se prvo provodi neciljano metaboličko profiliranje, a potom ciljano. Karakteristike neciljane i ciljane analize prikazane su na slikama *slika 1.1.* i *slika 1.2.*. U ovom radu pruža se pregled istraživanja upravo neciljane metabolomike, temeljenih na masenoj spektrometriji. Ta istraživanja koriste se za otkriće biomarkera za ljudske bolesti. Također, bit će objašnjene općenite procedure za tijek rada neciljane metabolomike te će biti pružene smjernice za provođenje tog tipa istraživanja. [1] Kroz daljnji tekst često će se spominjati pojmovi masena spektrometrija (MS, eng. mass spectrometry), plinska kromatografija (GC, eng. gass chromatography) i tekućinska kromatografija (LC, eng. liquid chromatography).

.

1.1. Metaboliti

Trenutno dostupni pristupi metabolomičkoj analizi ne osvrću se na nekoliko općih važnih aspekata. [2]

- S biološke točke gledišta, neki metaboliti sudjeluju u mnogo puteva, oni se zovu opći metaboliti. Drugi metaboliti, koji sudjeluju u tek nekoliko metaboličkih puteva, zovu se specifični metaboliti. Oni su važniji jer više ukazuju na bolest o kojoj je riječ. Ako je metoda identifikacije bazirana uglavnom na opće metabolite, bit će više lažnih pozitivnih vrijednosti. Ako su metaboliti u identifikacijskom putu specifični, metoda je pouzdanija budući da su ti metaboliti tek djelomično uključeni u ovaj put.
- Disfunkcija metabolita može biti kompenzirana njihovim funkcionalnim partnerima u biološkoj mreži. Metaboliti uključeni u više puteva imaju više funkcionalnih partnera, dok oni koji sudjeluju u tek nekoliko puteva imaju tek nekoliko funkcionalnih partnera za kompenzaciju. Ako su metaboliti unutar puta specifični, njihovi deregulirani signali će najvjerojatnije biti pojačani na cijelom putu. Nasuprot tome, ako metaboliti na putu imaju mnogo funkcionalnih partnera u biološkoj mreži, deregulirani signal će najvjerojatnije biti stišan, zagušen. Stoga, nejednake uloge metabolita trebaju se uzeti u obzir za ispravnu identifikaciju puteva.
- S perspektive metabolomičke tehnologije, postoji odstupanje u identifikaciji metabolita. Većina trenutno korištenih metabolomičkih tehnologija primjenjuje samo analizu malih frakcija cijelog metaboloma, otprilike šest do deset posto te identifikacije metabolita nije nasumično odabrana. Metaboliti u tim dobivenim profilima trebaju biti dobro proučeni. Spomenuto odstupanje u identifikaciji metabolita je posljedica činjenice da identifikacija metabolita veoma ovisi o prethodnim saznanjima. [2] Upravo to spomenuto odstupanje u identifikaciji dovodi do sljedećih odstupanja u putu jer se ti dobro istraženi metaboliti obično natalože u temeljnim putevima, poput citratnog ciklusa. Temeljni putevi su onda podložni neprikladnoj identifikaciji kad su metaboliti tretirani jednako u različitim putevima.

1.2. Biomarkeri

Biomarkeri su mjerljivi pokazatelji nekih bioloških stanja, tj. indikatori normalnog biološkog procesa, patogenog procesa ili farmakološkog odgovora na terapeutsku intervenciju.[1] Parametri koji karakteriziraju izvedbu testa biomarkerima uključuju:

- Osjetljivost
- Specifičnost
- Pozitivnu predvidljivu vrijednost
- Negativnu predvidljivu vrijednost

U praksi nijedan test biomarkerima nema savršenu kliničku i analitičku osjetljivost i specifičnost. Kao primjer koji može poslužiti kao dokaz toj tvrdnji, uzeto je istraživanje uzorka krvi za dijagnozu hepatocelularnog karcinoma. Značajka te bolesti je povišena koncentracija prisutnog alfa-fetoproteina (AFP), u krvi. Ali ne može se sa sigurnošću reći da prisutnost tog spoja ukazuje na hepatocelularni karcinom jer je to ujedno i fetalni antigen i postoji i kod ciroze jetre i ostalih bolesti jetre. [1]

Drugi primjer koji ide u prilog tvrdnji o nesavršenoj specifičnosti biomarkera jest istraživanje uzorka krvi za dijagnozu raka prostate. Mjeri se koncentracija specifičnog antigena prostate (skraćeno PSA) u krvi. Budući da prisutnost visokih koncentracija PSA može biti rezultat ne samo raka prostate već i drugih upalnih procesa npr. benigne hiperplazije prostate, uočava se ograničena specifičnost i osjetljivost kod mjerenja. [1]

S obzirom na različite procese koji mogu dovesti do bolesti, za detekciju je stoga bolje koristiti panele biomarkera nego pojedinačne biomarkere. Paneli biomarkera se sastoje od različitih komponenti te pružaju točnije korelacije stanja bolesti s poboljšanom osjetljivošću i selektivnošću. Ipak, i danas unatoč razvijenosti metabolomike, postoje poteškoće u replikaciji biomarkera. Nekoliko faktora doprinosi tom problemu:

- Kao prvo, valja istaknuti da je teško obuhvatiti kohorte koje su dovoljno velike i različite po porijeklu, rodu i geografskoj regiji (kohorte su skupine

pojedinaca, ispitanika koji na početku imaju zajedničke značajke). Prilikom istraživanja, kohorte se dijele na pokusnu kohortu i kontrolnu kohortu koja služi kao "zlatni standard".

- Kao drugo, razlike u tehnikama utječu na detekciju metabolita, kao i različite metode obrade podataka poput normalizacije uzoraka.

Potreban je značajan trud pri stvaranju velikih biobankarskih sustava i standardiziranja tijeka rada metabolomike.[1]

1.3. Tijek studija metabolomičkog profiliranja

Tijek istraživanja metabolomike obuhvaća nekoliko ključnih koraka koji će u daljnjem radu biti razjašnjeni detaljnije i koji su vidljivi na *slici 1.3*. , a to su redom:

1.) Uzimanje uzoraka

Pri uzimanju uzoraka valja obratiti pažnju da se uzmu kontrolni uzorci i pokusni uzorci.

2.) Priprema uzoraka za analizu

Većina uzoraka ne može se direktno podvrgnuti analizi već se moraju prethodno obraditi da bi bili pogodni za analizu. Neki od postupaka obrade uzoraka su: deproteinizacija, derivatizacija dodatak internog standarda.

3.) Identifikacija metabolita

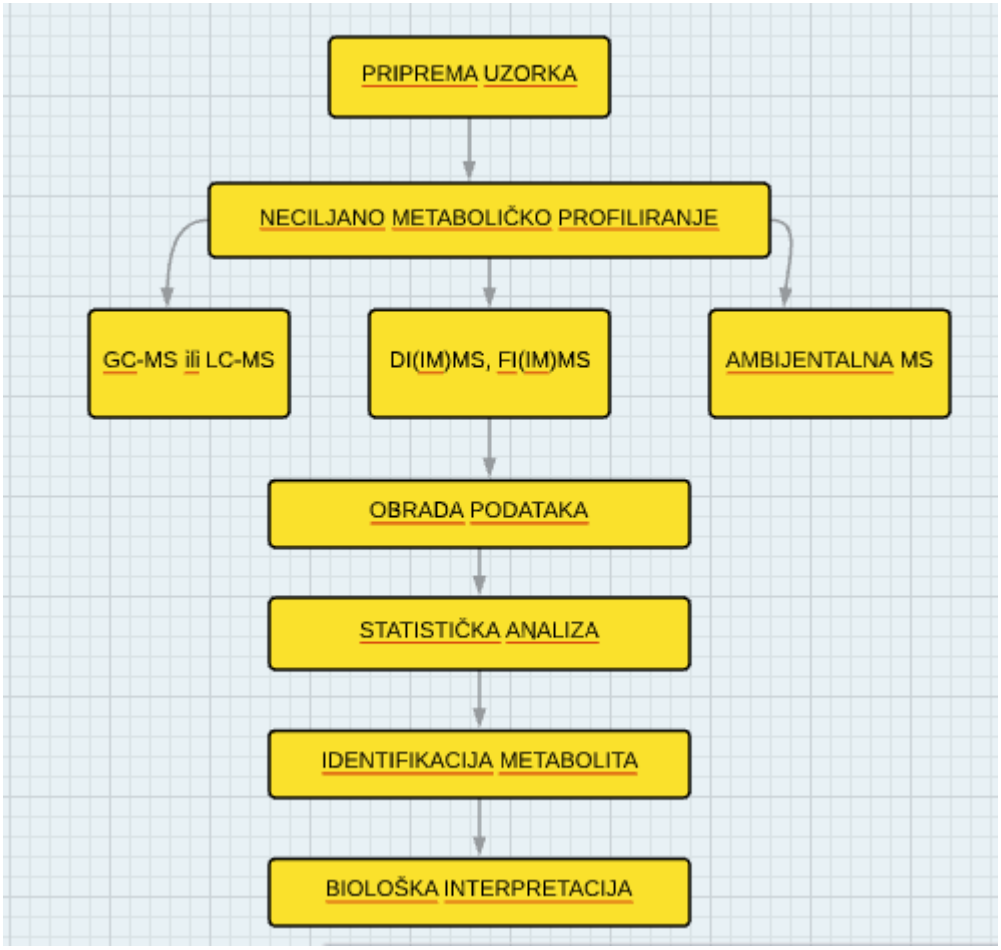
Kvantificiranje metabolita vrši se pomoću jedne ili više tehnika baziranih na masenoj spektrometriji: GC-MS, LC-MS, DI-MS (direktna infuzija), NMR (nuklearna magnetska rezonanca).

4.) Analiza podataka

Za analizu podataka koriste se statističke metode poput PCA (analiza glavnih komponenata, eng. principal component analysis) , PLS-DA (metoda parcijalnih projekcija najmanjih kvadrata, eng. partial least squares-discriminant analysis), i druge.

5.) Interpretacija podataka

Dostupni su mnogi bioinformatički alati i web bazirane aplikacije (Galaxy, MetaboAnalyst) za utvrđivanje povezanosti sa stanjima bolesti i ishodima.[4]



***Slika 1.3**. Dijagram toka studija metabolomike*

2. PROCEDURA NECILJANOG METABOLIČKOG ISTRAŽIVANJA

Najčešće korištene tehnike za metaboličko profiliranje su LC-MS i GC-MS. Većina istraživanja služi se i univarijatnom (jednosmjernom) i multivarijatnom (višesmjernom) metodom analize u ispitivanju značajno izmijenjenih metabolita između pokusnog i kontrolnog slučaja.[1] Univarijatna analiza predstavlja test-hipotezu u kojoj se razmatra samo jedna kategorijska varijabla odnosno jedan faktor. Najčešće korištene metode univarijatne analize su:

- T-test ili studentov test koristi se za normalno distribuirane varijable.

- ANOVA metoda koristi se za usporedbu nekoliko grupa istovremeno upotrebom varijance te služi za usporedbu nekoliko kohorta istovremeno na temelju samo jedne varijable.
- Welchov test ili test nejednake varijance koristi se kad se ne pretpostavlja da su dvije varijance kohorta iste pa se moraju procijeniti odvojeno. [1]

Multivarijatna analiza predstavlja test-hipotezu u kojoj se klasifikacija podatak temelji na više varijabli tj. faktora. Najčešće korištene metode multivarijatne analize su:

- Logistička regresija koristi se za analizu skupa podataka u kojem postoji jedna ili više nezavisnih varijabli koje određuju ishod tj. zavisnu varijablu.
- Coxova regresija koristi se za procjenu utjecaja nezavisnih varijabli na zavisnu koja uz informaciju je li se neki događaj uopće dogodio ima i informaciju kada se taj događaj dogodio. Razlika između logističke i Coxove regresije je u primjeni: logistička se koristi onda kada postoji samo informaciju da se nešto uopće dogodilo, a Coxovu kad postoji informacija i da se nešto dogodilo i kada se to dogodilo.
- PCA koristi se za ekstrakciju maksimalne varijance iz seta podataka sa svakom komponentom. Optimalno je rješenje za istraživača koji je prvenstveno zainteresiran za smanjenje velikog broja varijabli na manji broj komponenata.
- PLS-DA za cilj ima reducirati broj komponenti danih varijabli na manji skup komponenti koje nisu međusobno korelirane. Za razliku od PCA, PLS-DA maksimizira kovarijancu između zavisne i nezavisne varijable. PLS-DA se često koristi u kombinaciji s regresijskim metodama.

2.1. Priprema uzoraka

Biološki uzorci koji se koriste za metaboličke analize navedeni su u *Tablici 2.1.* zajedno s načinom sakupljanja i pripreme uzoraka za analizu.

TIP BIOUZORKA	SAKUPLJANJE I PRIPREMA UZORKA ZA ANALIZU
TKIVO	• Mehanička ili nemehanička homogenizacija • Pohrana na -80°C
STANICE	• Gašenje sa ledeno hladnim amonijevim bikarbonatom • Centrifugiranje 1 minutu pri -20°C • Odvajanje supernatanta • Brzo zaleđivanje u tekućem dušiku • Pohrana na -80°C
SERUM	• Uzorak se sakuplja u epruvetama za odvajanje seruma i inkubira najviše 60 minuta u ledu • Centrifugiranje • Odvajanje supernatanta • Pohrana na -80°C
PLAZMA	• Uzorak se sakuplja kod ispitanika natašte • Pohranjuje se u tube koje sadrže heparin, citrat ili EDTA koje djeluju kao koagulansi • Centrifugiranje 15 minuta na 4°C • Odvajanje supernatanta • Pohrana na -80°C
URIN	• Pri sakupljanju uzorka, u epruvetu se dodaje natrijev azid koji služi kao bakteriostatski agens tijekom pohrane uzroka • Filtracija • Centrifugiranje 5 minuta • Odvaja se supernatant • Pohrana na -80°C

Tablica 2.1. *Biološki uzorci za metaboličke analize te načini njihovog sakupljanja i pripreme za analizu.*

Priprema uzoraka u neciljanim metaboličkim istraživanjima trebala bi biti usmjerena prema konzervaciji i pripremi velikog broja metabolita za analizu, brza i veoma reproducibilna. Ne smije se podcjenjivati važnost ovog koraka jer osjetljivi instrumenti za metaboličko profiliranje lako mogu otkriti razliku u rukovanju i pripremi uzoraka, što postaje najveći izvor neželjene varijance. [1]

Izolacija metabolita iz kulture stanica započinje postupkom zaustavljanja metabolizma, uklanjanja medija i ekstrakcije metabolita. Gašenje (eng. quenching) je postupak izmjene naglog hlađenja i potom zagrijavanja, više puta uzastopno. Provodi se u svrhu zaustavljanja daljnjeg metabolizma u stanici kako bi razine metabolita u stanici, u trenutku uzimanja uzorka, ostale nepromijenjene i bile relevantne jer se stanje unutar stanice jako brzo može promijeniti. Provodi se neposredno prije ekstrakcije kako bi se enzimska aktivnost u stanici spriječila ili minimalizirala. Kao primjer na kojem je pokazana priprema uzorka uzeta je metoda pripreme uzorka za stanice leukemije. [9]

Tijek pripreme uzorka je sljedeći:

1.) U inkubatoru se uzgoji kultura stanica pri 37 ˚C i konstantno se vodi briga o tome da ima dovoljno tekućeg medija na raspolaganju sve do skupljanja stanica. [9]
2.) Slijedi žetva tj. skupljanje stanica. Stanice se skupljaju tijekom faze eksponencijalnog rasta i to metodom struganja, kao što se vidi na *slici 2.1.*. Mjeri se gustoća stanice hemocitometrom da se zna koliki volumen medija treba dodati po uzorku. Dodaje se ledeno hladni 0.9% NaCl ili metanol. Potom se uzorak centrifugira jednu minutu te se odvoji supernatant. U daljnjem postupku općenito supernatant u ovoj fazi može biti ili direktno analiziran, ili liofiliziran i pohranjen za daljnju analizu Uzorak se zatim podvrgne postupku derivatizacije zbog poboljšanja toplinske stabilnosti i hlapljivosti kako bi bio pogodan za GC-MS analizu. [9]



Slika 2.1. *Prikupljanje stanica uzorka metodom struganja [10]*

U ovom konkretnom primjeru sa stanicama leukemije, odvojenom supernatantu se doda hladno ekstrakcijsko otapalo, smjesa se prenese u sterilnu cijev te se brzinski zamrzne u tekućem dušiku. Potom se otopi na 37˚C, centrifugira opet pa se supernatant prenese u tubi na suhi led. [9] Važno je da se pri gašenju metabolizma koriste odgovarajuća otapala. Primjena hladnog metanola može dovesti do gubitka metabolita kroz membranu stanice, oštećenu organskim agensima. S druge strane, hladni 0.9% NaCl je najbolje otapalo za gašenje jer svrhu gašenja postiže kroz brzu promjenu temperature umjesto kroz kontakt s organskim agensima tako da ne stvara nikakvu štetu membrani stanice.

Upotreba ekstrakcijskih otapala procjenjuje se ovisno o tri kriterija:

- Broj detekritranih metabolita
- Relativni intenzitet svakog pojedinog metabolita
- Reproducibilnost svakog pojedinog otapala. [9]

2.2. Platforme za metaboličko profiliranje temeljeno na masenoj spektrometriji

U ovom paragrafu predočena je usporedba prednosti i nedostataka MS-platformi za neciljanu metabolomiku.

- tekućinska kromatografija s masenom spektrometrijom je najšire korištena tehnika zahvaljujući raznim čimbenicima, uključujući i ionizacijsku tehniku te stacionarnu i mobilnu fazu. Sve češće se koristi spregnuta tehnika reverzno fazna tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UPLS-MS, eng. ulta-performance liquid chromatography) zbog robusnosti stacionarne faze i sposobnosti da otapa nepolarne metabolite poput lipida. Također se među prednosti ove tehnike mogu uvrstiti i izvrsna rezolucija i preciznost mase. Međutim, ona također ima i svoje nedostatke. Podliježe fluktuaciji vremena zadržavanja i skretanju masenog spektra te pati od nedostatka opsežnih spektralnih knjižnica za identifikaciju metabolita. [1]
- plinska kromatografija s masenom spektrometrijom (GC-MS, eng. gass chromatography mass spectrometry) je najstarija tehnika spregnuta s MS i ima dosta prednosti pred LC-MS, poput reproducibilnijih vremena zadržavanja, većeg spektra masa, preciznije i učinkovitije identifikacije metabolita postignute podudaranjem s podacima iz spektralne knjižnice. S druge strane, u nedostatke ove tehnike spada njezina nemogućnost analize spojeva koji nisu hlapivi ili koji se ne mogu prevesti u hlapive spojeve. [1] Ako se razmatraju tehnike bez kromatografskog odvajanja, analizatori visoke razlučivosti poput QTOF (vezani kvadripol i analizator vremena leta, eng. quadrupole time-of-flight), Orbitrap i manje zastupljen zbog visoke cijene FTICR (Fourrierova transformacija ionske ciklotron rezonancije), esencijalni su za poboljšanje pouzdanosti opažanja metabolita i kapaciteta pikova.
- spektrometrija ionske pokretljivosti (IMS, eng. ion migration spectroscopy) je sve više korištena u kombinaciji s MS u svrhu pružanja dimenzije dodatnog odvajanja, pri čemu zadržava brzinu analize kao DI-MS (eng. direct infusion mass spectrometry) ili FI-MS (eng. flow injection mass spectrometry).
- Ambijetalna MS omogućuje reducirani postupak pripreme uzorka pomoću tehnika poput brzo isparljive ionizacijske masene spektrometrije (REIMS, eng.

rapid evaporative ionization mass spectrometry) i desorpcijske ionizacije elektrosprejem (DESI, eng. desorption electrospray ionization). Posebno je korisna za brzu dijagnozu raka i uklanjanje tumora tijekom operacije. [1]

2.3. Analiza podataka

Glavni koraci obrade podataka u neciljanoj metabolomici uključuju biranje pikova, korekciju vremena zadržavanja i usklađivanje. Ti koraci mogu biti optimizirani korištenjem dizajna eksperimenta za uklanjanje nepouzdanih pikova i poboljšanje kvalitete podataka. U daljnjem tekstu slijede opisi nekih načina analize podataka.

- optimizator liste značajki masenog spektra (MS-FLO, eng. mass spectral feature list optimizer) razvijen je za post-obradu podataka te automatski prepoznaje potencijalne lažne pozitivne vrijednosti poput duplih pikova, izotopskih pikova, i drugih. Da bi se smanjio efekt nedostajućih vrijednosti u odnosu između spektralnih značajki i naknadnih multivarijatnih analiza, na set podataka može se primijeniti filter prevalencije tj. učestalosti. Prevalencija je broj svih slučajeva pojedinih bolesti kod određenog stanovništva u određenom periodu. U tom filteru, svojstvo je zadržano ako ima vrijednost nejednaku nuli u određenom postotku (npr. 50%) uzoraka bilo koje skupine. [1]
- Normalizacija podataka je važna za smanjenje neželjenih odstupanja u pripremi uzoraka, matriks efekta te za stabilnost instrumenta. Postoje dvije glavne metode normalizacije: normalizacija ukupnog korisnog MS signala i normalizacija internog standarda (IS-normalizacija). Normalizacija ukupnog korisnog signala može biti primjetno pod utjecajem metabolita s visokim intenzitetom signala. IS-normalizacija može rezultirati suzbijanjem neželjenog signala, dovodeći do nepotpunog uklanjanja neželjenog odstupanja za sve metabolite. [1]
- kontrola kvalitete uzoraka (QC, eng. quality control) predstavlja i kvalitativni i kvantitativni sastav proučavanih uzoraka. Ova metoda analize podataka mora biti korištena za procjenu točnosti i preciznosti analitičkih metoda i za ispravak odstupanja signala.

Ekstrakcija informacija relevantnih za bolest iz višedimenzionalnih metaboličkih setova podataka težak je i zahtijevan posao. Multivarijatne metode analize (PCA, PLS-DA i dr.) koriste se za smanjenje višedimenzionalnih podataka

transformacijom originalnih varijabli u manji broj novih varijabli. Međutim, transformirane varijable može biti teško biološki interpretirati te sadrže interferirajuće varijable koje mogu ometati klasifikaciju. Zato su potrebne metode selekcije varijabli da bi se smanjio broj originalnih varijabli i poboljšala preciznost i točnost predviđanja. Univarijatne metode analize su najčešći pristup za odabir značajki no ipak, mana im je to što ne mogu uhvatiti odnose među značajkama ni mnoštvo suptilnih razlika na razini pojedinačne komponente, dok multivarijatne metode to sve mogu. No čak i multivarijatne metode imaju nedostatak, a to su prekomjerno podudaranje i nejedinstvenost rješenja. Dakle, univarijatne metode analize koje su od značaja za zastupljenost pojedinačnih metabolita primjenjuju se kontrolom stope lažnih otkrića za pojašnjenje višestrukih usporedbi. Često se kombiniraju s multivarijatnim metodama za selekciju značajnih metabolita. [1] Također, od kritične je važnosti s pouzdanošću utvrditi identitete odabranih metabolita kako bi se izbjegle lažne pozitivne vrijednosti poput artefakata, onečišćenja i egzogenih spojeva iz hrane i lijekova, koje lako mogu status bolesti učiniti nejasnim. U konačnici, najizgledniji biomarkeri moraju proći rigoroznu provjeru u međunarodnim kohortama, koja se provodi samo u relativno malom broju istraživanja. [1]

2.4. Identifikacija metabolita

Najšire korištena metoda identifikacije metabolita je precizno pretraživanje mase u bazi podataka spareno s ciljanom MS/MS tandemskom metodom za rasvjetljavanje strukture. Praćena je pretraživanjem u javnim i komercijalnim knjižnicama za spektar sličnih fragmenata. Interne knjižnice sa spektralnim i zadržanim informacijama razvijaju se od strane pojedinačnih laboratorija kao alternativa otvorenim knjižnicama, s unaprijeđenim bilješkama o specifikacijama instrumenata. Ipak, takve knjižnice imaju i ograničenje, a to je njihova slaba dostupnost. [1]

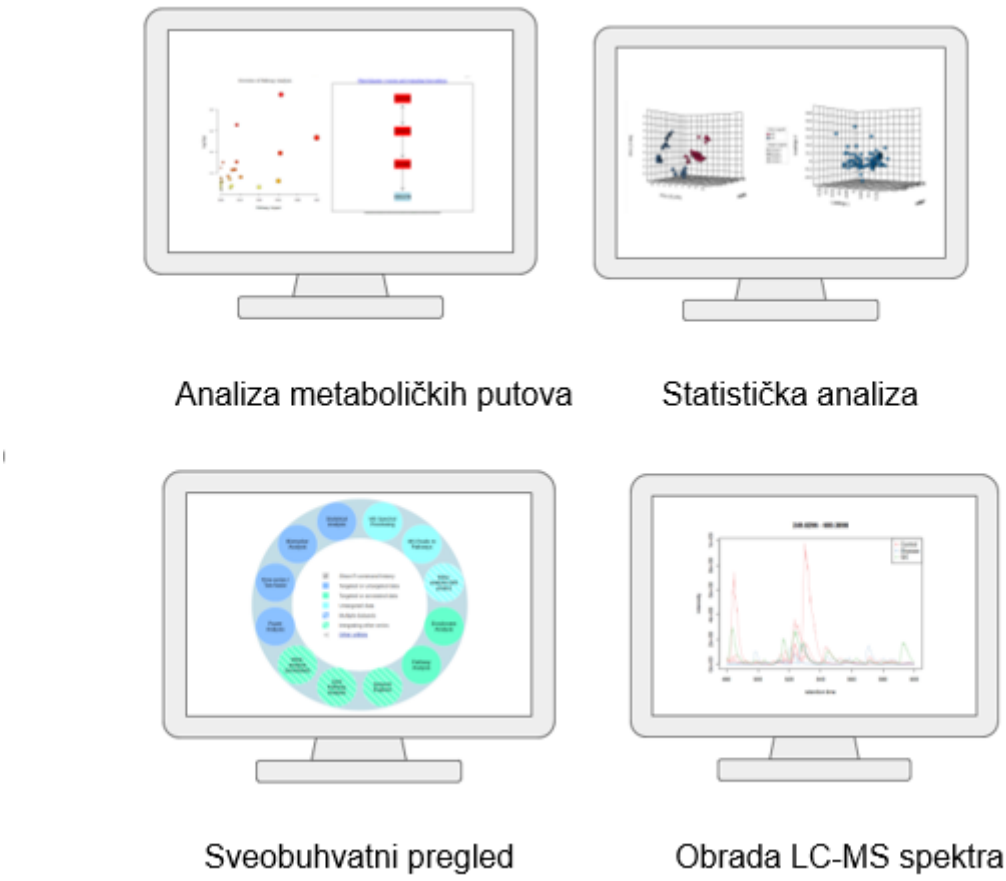
Identifikacija spojeva s GC-MS je jednostavnija i preciznija u usporedbi s drugim MS-metodama zahvaljujući reproducibilnosti masenog spektra elektronske ionizacije (EI-MS) te vremenima zadržavanja GC-MS. Suprotno tome, LC-MS/MS baze podataka su općenito manje po opsegu i njihove su značajke slijedeće:

- Spektri dobiveni disocijacijom izazvanom sudarima (CID, eng. collision induced dissociation)
- Spektri dobiveni disocijacijom izazvanom sudarima veće energije (HCD, eng. higher-energy collisional dissociation)

Njihova mana je to što im nedostaje podataka o vremenu zadržavanja. Daljnja potvrda identiteta metabolita uvijek bi trebala biti izvršena, ako je moguće, usporedbom spektara sa spektrom autentičnih standarda. U posljednje vrijeme, stvorena je nova baza podataka: MINE-DB (Metabolic *In silico* Network Expansions database). Ona sadrži metaboličke produkte poznatih spojeva predviđene korištenjem općih enzimskih transformacijskih reakcija, čime se povećava šansa identifikacije nepoznatih metabolita koji nisu uključeni u trenutnu, postojeću bazu podataka. [1]

2.5. Interpretacija dobivenih podataka

MetaboAnalyst i KEGG baze podataka su široko korištene za vizualizaciju i interpretaciju poveznica temeljnog metaboličkog puta koje se preslikavaju na identificirane molekule. MetaboAnalyst je sveobuhvatna platforma posvećena analizi metabolomičkih podataka. Ima pregledno sučelje za brzo i jednostavno korištenje. Posljednje ažurirana verzija ove platforme ima novo svojstvo da sjedinjuje metabolomičke, metagenomičke i transkriptomičke podatke za mrežnu analizu. [8] Neke od mogućnosti koje pruža MetaboAnalyst prikazane su na *slici 2.2*..



Slika 2.2. Odabrane mogućnosti koje pruža MetaboAnalyst [11]

Većina dostupnih alata za analizu puteva zahtijeva da su sirovi podaci iz LC-MS ili GC-MS prethodno obrađeni nekim drugim software paketom, što bespotrebno pridonosi složenosti postupka i produžuje vrijeme potrebno za cijeli metabolomički niz procesa. U novije vrijeme osmišljen je online XCMS tijek rada koji obuhvaća sve korake potrebne za LC-MS baziranu globalnu analizu metabolomičkih podataka, uključujući i predobradu sirovih podataka, diferencijalnu analizu, dereguliranu analizu puta i fuziju proteomičkih i transkriptomičkih podataka u svrhu pružanja dubljeg uvida u metaboličke mehanizme što značajno poboljšava učinkovitost analize. [8]

3. OGRANIČENJA I MOGUĆNOSTI

Brzi napreci u strategijama neciljanog metaboličkog profiliranja temeljenog na MS uvelike su unaprijedili otkriće biomarkera za bolesti u kliničkoj metabolomici. Međutim, replikacija biomarkera i dalje ostaje značajan problem i veliki napori će morati biti uloženi u narednom vremenu u svrhu standardizacije neciljanog metabolomičkog tijeka rada i standardizacije pristupa provjere valjanosti biomarkera u vanjskim kohortama i ciljanim analizama. Budući da se većina metabolomičkih istraživanja primjenjuje na samo jednu analitičku tehniku, što može dovesti do uzorkovanja sub-metaboloma, predlaže se da buduća istraživanja kombiniraju više tehnika poput GC-MS, LC-MS i NMR s različitim postupcima ekstrakcije kako bi se popravila pokrivenost metabolita i kvaliteta predloženih panela biomarkera. Velike nepodudarnosti trenutno postoje u literaturi, pri čemu se misli prvenstveno na najbolje panele metabolita korištene u dijagnosticiranju bolesti. Razlog tih nepodudarnosti su nedostatak usklađivanja i male kohorte. Nadalje, više interdisciplinarnih nastojanja treba biti poduzeto da bi se standardizirali protokoli za sjedinjenje genomičkih i proteomičkih istraživanja s metabolomičkim istraživanjima. [1]

U današnje doba, neciljana metabolomika je i dalje u fazi otkrivanja i puno rada je potrebno da bi se pretvorila u klinički uspješnu. Preostaje vjerovati da će se, uz kontinuirana nastojanja i suradnju znanstvenika iz metabolomičkog kruga djelovanja dočekati svijetla budućnost ovog brzo razvijajućeg područja. [1]

4. PRIMJERI PRIMJENE NECILJANE METABOLOMIKE U OTKRIVANJU BOLESTI POMOĆU BIOMARKERA

Kao što je već istaknuto u radu, metabolomička istraživanja se primjenjuju prvenstveno u svrhu dijagnosticiranja bolesti. Budući da je svaka bolest jedinstvena to nije lak posao. U nastavku su opisane primjene metabolomičkih testova biomarkerima kako bi se dobile informacije o potpisu bolesti. [1]

- Dijabetes tipa 2 je najčešće proučavana bolest korištenjem metabolomike temeljene na MS. U ovom primjeru uzeti su uzorci iz dviju kohorti: uzorak seruma na tašte iz finske kohorte te uzorak plazme iz francuske kohorte. Primijenjene su i neciljana i ciljana metabolička profiliranja, ciljano profiliranje provodilo se u svrhu apsolutne kvantifikacije metabolita. Neciljano profiliranje vršilo se upotrebom UPLC-MS i GC-MS. Ciljano profiliranje odvijalo se upotrebom ID-LC-MS (razrjeđenje izotopa s tekućinskom kromatografijom i masenom spektrometrijom). Za rezultat, dobiven je set od 34 razlikovna metabolita povezana s razvojem dijabetesa tipa 2 te panel sastavljen od 7 metabolita (glukoza, manoza, alfa-HB, alfa-tokoferol, [Hyp3]-BK i još dva nepoznata spoja). Također je primijećena povišena razina aminokiselina valina i izoleucina, a snižena razina, histidina, glutamina i glicina. [1] Prednost ovakvog profiliranja je to što je razvijen robusni model. Ograničenja ovakvog profiliranja: su biološka interpretacija potencijalnih biomarkera na temelju razine pouzdanosti identifikacije za te spojeve.
- Kardiovaskularne bolesti (CVD, eng. cardiovascular diseases) su vodeći uzrok smrtnosti u većini razvijenih zemalja. I genetički i okolišni čimbenici su povezani s CVD patogenezom, najpoznatiji čimbenik okoliša je prehrana bogata lipidima. Uzet je uzorak plazme te je provedeno neciljano metaboličko profiliranje izvedbom LC-MS. Ispostavilo se da su triacilgliceroli (eng.skraćeno TAGs) i esteri kolesterola (eng. skraćeno CEs) glavni pokazatelji rizika od kardiovaskularnih bolesti, kao i fosfatidiletanolamini (eng.skraćeno PE), sfingomijelini (eng. skraćeno SMs) i drugi. Te rezultate potvrdilo je i ciljano proteomičko istraživanje: od ukupno 13 kvantificiranih apoproteina, tri apoproteina su najznačajnije povezana s pojavom kardiovaskularnih bolesti. To su : apoC-II, apoC-III i apoE. Apoproteini su

proteini koji vežu lipide te ih prenose u krv, cerebrospinalnu tekućinu i limfu. [6]

- Za hepatocelularni karcinom (eng. skraćeno HCC) U posljednje vrijeme, provode se neciljana metabolička istraživanja u serumu, plazmi i tkivu u svrhu otkrića novih biomarkera za hepatocalularni karcinom. Analizirani su uzorci seruma pacijenata oboljelih od HCC i HBV-CIRR (hebatitis B ciroza) te su potom uspoređeni sa zdravim, kontrolnim uzorkom. Izvedba je GC-MS, LC-MS. Najprije je provedeno neciljano metaboličko istraživanje koje je ukazalo na prisutnost 22 eikozanoida. Eikozanoidi su derivati arahidonske kiseline, to su masne kiseline slične hormonima koje sudjeluju i u imunološkom sustavu. Potom je provedena ciljana analiza tih 22 eikozanoida i potvrđeno je 14 razlikovnih metabolita koji su veoma izmijenjeni kod HBV-CIRR i kod HCC. U tih 14 metabolita spadaju: malat, citrat, sukcinat, lizin, karnitin, prolin, serin, fenilalanin, tirozin, arahidonska kiselina, njima je koncentracija porasla. S druge strane, uočen je pad koncentracije arabinoze, galaktoze i mokraćne kiseline. [1]

5. ZAKLJUČAK

Za većinu dosad opisanih bolesti, glavni paneli metabolita identificirani u pojedinim istraživanjima se općenito ne mogu replicirati na druga istraživanja. Upravo ta poteškoća replikacije predstavlja najveću prepreku na ovom polju i može se pripisati razlikama u eksperimentalnim metodama i metodama analize podataka te malom obujmu ispitivane kohorte.

Predlaže se da se u budućim istraživanjima prihvati hibridni metabolički pristup u kojem se prethodno pronađeni biomarkeri podvrgnu ciljanoj analizi dok se istovremeno sakupljaju neciljano dobiveni podaci za pretraživanje. Moderna instrumentacija lako može prikupljati npr. LC-MS podatke kombiniranjem praćenja paralelnih reakcija i nadziranja očitanih funkcija. Takav hibridni pristup bio bi vrlo koristan jer bi omogućio robusniju usporedbu bogatstva biomarkera sakupljenih iz proučavanih kohorta s izvješćima iz literature, usmjerujući metaboličko područje u puno produktivniji smjer.

Ostali aspekti metabolomičkog tijeka rada koji zahtijeva daljnju standardizaciju uključuju:

- Procese obrade korištene u predobradi podataka
- Metode normalizacije korištene u obradi podataka
- Standardnu praksu u odabiru kohorte (podudaranje dobi, spola, indeksa tjelesne mase, itd.)

Također, ako je moguće, poželjne su velike kohorte s razlikama u narodnosti, spolu, geografskoj regiji kako za kontrolnu tako i za pokusnu kohortu, da bi se poboljšala dugovječnost i utjecaj metabolomičkih nastojanja. Ipak, za pojedinačnog istraživača sastavljanje velike kohorte iziskuje previše vremena i novca. Više truda trebalo bi biti posvećeno izgradnj i većeg biobankarskog sustava da bi se olakšala istraživanja. [1]

6. LITERATURA

[1] Xiaoling Zang, Maria Eugenia Monge, Facundo M. Fernandez: "Mass spectrometry-based non -targeted metabolomic profiling for disease detection: Recent development.". Trends in Analytical Chemistry, 118 (2019) 158-169

doi: https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.030

[2] Feng Li, Yanjun Xu, Desi Shang, Haixiu Yang, Wei Liu, Junwei Han, Zeguo Sun, Quianlan Yao, Chunlong Zhang, Jiquan Ma, Fei Su, Li Feng, Yinrui Shi, Yunpeng Zhang, Jing Li, Qi Gu, Xia Li, Chunquan Li: "MPINet: Metabolite Pathway Identification via Coupling of Global Metabolite Network Structure and Metabolomic Profile". Research article ID: 325687, BioMed Research International.

doi: https://dx.doi.org/10.1155/2014/325697

[3] Yunping Qiu and Deborah Reed: " Gas Chromatography in Metabolomics study". IntechOpen, Advances in Gas Chromatography.

doi: https://dx.doi.org/10.5772/57397

[4] Dostupno na https://wikiqube.net/wiki/Metabolomics#Metabolome (4.9.2021.)

[5] Dostupno na https://www.irb.hr/Zavodi/Zavod-za-elektroniku/Novosti/Znanstvenici-IRB-a-razvili- metodu-za-neciljano-metabolicko-profiliranje-bioloskih-uzoraka (4.9.2021.)

[6] R.Pechlaner, S.Tsimikas, X.Yin, P.Willeit, F.Baig, P.Santer, F.Oberhollenzer, G.Egger, J.L.Witztum, V.J.Alexander, J.Willeit, S.Kiechl, M.Mayr: "Very-Low-Density Lipoprotein-Associated Apolipoproteins Predict Cardiovascular Events and are Lowered by Inhibition of APOC-III". Journal of the American College of Cardiology. 2017 Feb; 69 (7) 789-800.

doi: https://www.jacc.org/doi/abs/10.1016/j.jacc.2016.11.065

[7] L.D.Roberts, A.L.Souza, R.E.Gerszten, C.B.Clish: "Targeted Metabolomics". Chapter 30, "Curr.protoc.mol.biol." 2012. Unit 30 2.1.PMIID: 22470063.

doi: 10.1002/0471142727.mb3002s98.

[8] J.Chong, O.Soufan, C.Li, I.Caraus, S.Li, G.Bourque, D.S.Wishart, J. Xia, "MetaboAnalyst 4.0:towards more transparent and integrative metabolomics analysis". Jul 2; 46(W1):W486-W494, 2018.

doi: 10.1093/nar/gky310

[9] Y.He, Z.M.Zhang, O.Ma, H.C.Ji, H.M.Lu, "GC-MS profiling of leukemia cells: an optimized preparation potocol for the intracellular metabolome". Anal.Methods, 2018, 10, 1266.

doi: 10.1039/c7ay02579e

[10] Dostupno na: https://www.news-medical.net/news/20180508/Simplified-ammalian-Cell-Harvesting-without-Centrifuging.aspx (18.9.2021.)

[11] Dostupno na: https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/home.xhtml (17.9.2021.)

7. POPIS OZNAKA I KRATICA

MS	masena spektrometrija
GC	plinska kromatografija
LC	tekućinska kromatografija
AFP	alfa-fetoprotein
PSA	specifični autogen prostate
DI	direktna fuzija
NMR	nuklearna magnetska rezonanca
PLS-DA	metoda parcijalnih projekcija najmanjih kvadrata
PCA	analiza glavnih komponenti
UPLC	ultravisoko djelotvorna tekućinska kromatografija
QTOF	kvadripol i analizator vremena leta
FTICR	Fourierova transformacija ionske ciklotron-rezonance
IMS	spektrometrija ionske pokretljivosti
REIMS	brzo isparljiva ionizacijska MS
DESI	desorpcijska ionizacija elektrosprejom
MS-FLO	optimizator liste značajki masenog spektra
QC	kontrola kvalitete
CID	disocijacija izazvana sudarom
HCD	disocijacija izazvana sudarom veće energije
ID	razrjeđenje izotopa
CVD	kardiovaskularne bolesti
TAG	triacilglicerol
CE	ester kolesterola
PE	fosfatidiletnaolamin
SM	sfingomijelin
HCC	hepatocelularni karciom