

# Metabolomik Çalışmaların Dünü, Bugünü ve Yarını

## Past, Present and Future of Metabolomic Studies

<sup>ORCID</sup> Ozan KAPLAN<sup>a</sup>, <sup>ORCID</sup> Mustafa ÇELEBİER<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya ABD, Ankara, TÜRKİYE

**ÖZET** Metabolomik çalışmalar, son yıllarda ortaya çıkan bilimsel ve teknolojik gelişmelerle beraber hastalıkların erken teşhis ve tedavisi başta olmak üzere çok çeşitli araştırma alanlarında kendine yer bulmuştur. Metabolitler insan vücudunda meydana gelen biyokimyasal reaksiyonlara katılan veya bu reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan, düşük molekül ağırlıklı kimyasal bileşenlere verilen genel addır. Vücutta bulunan metabolitlerin tümü, metabolom terimi ile ifade edilir. Metabolomik ise mümkün olduğunca fazla sayıda metabolitin, ileri analitik teknikler ile ölçülmesidir. İlgili sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilir ve hastalık durumu veya tedavi şekli gibi belirlenen bir değişken üzerinden kontrol grubuyla karşılaştırılır. Böylece metabolom düzeyindeki değişim ortaya çıkarılır, miktarı değişen metabolitler tespit edilir ve hastalık durumundan etkilenen metabolik yollar tanımlanabilir. Metabolomik çalışmalar, metabolom düzeyi ile ilgili anlık bilgi sağlayabilmesi sayesinde genom düzeyinde aydınlatılan genotipe ek olarak fenotipin metabolom düzeyinde incelenmesini sağlar. Bu çalışma; metabolomik çalışmaların kökenleri, bugünkü durumu ve gelecekte oynayabileceği roller üzerine hazırlanmış bir derlemedir. Günümüzde metabolom düzeyinde biyobelirteç keşfi için yaygın olarak gerçekleştirilen sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (LC-MS) temelli hedeflenmemiş metabolomik çalışmalarda yaşanan güncel problemler de bu derleme kapsamında değerlendirilmiştir. Özellikle kanser araştırmalarında sıklıkla söz edilmeye başlanan sıvı biyopsi tanımını uygulamaya geçirmek için klinik uygulamalarda metabolom düzeyinde gerçekleştirilecek çalışmalar büyük önem arz etmektedir. Yakın gelecekte hedeflenmemiş metabolomik çalışmalar sonucu elde edilen bilgi hedeflenmiş çalışmalar ile valide edilerek metabolom düzeyinde farklı hastalıklar için erken tanı ve süreç inceleme amacıyla kullanılabilecek çok sayıda yeni biyobelirteç klinik uygulamalarda kendine yer bulacaktır.

**ABSTRACT** Along with the scientific and technological developments that have emerged in recent years, metabolomic studies have found themselves a place in a wide range of research fields especially including early diagnosis and treatment of diseases. Metabolites are the general names given to low molecular weight chemical components that participate in biochemical reactions or occurring as a result of biochemical reactions in the human body. The term metabolome is used to refer to all the metabolites found in the system of a body. Metabolomics is the measurement of as many metabolites as possible using advanced analytical techniques. The relevant results are evaluated statistically and compared with the control group over a determined variable such as disease status or treatment method. Thus, the change in the metabolome level is clarified, the amount of metabolites that are varying are determined and the metabolic pathways affected by the disease condition can be identified. Metabolomic research provides insight into the metabolome level, allowing the phenotype to be examined at metabolome level in addition to the genotype illuminated at genome level. This study is about the historical development of metabolomic studies, the current situation on metabolomic studies and the roles it could play in future. Current problems experienced in liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) based untargeted metabolomic studies, which are widely performed for biomarker discovery at metabolome level, are also evaluated within the scope of this review. In order to put into practice, the definition of liquid biopsy, which is frequently mentioned in cancer researches, studies conducted at the level of metabolome in clinical applications are of great importance. In the near future, the information obtained as a result of untargeted metabolomic studies will be validated with targeted studies, and many new biomarkers that can be used for early diagnosis and process examination for different diseases at the metabolome level will find their place in clinical applications.

**Anahtar Kelimeler:** Metabolomik; metabolom; sistem biyolojisi; biyokimyasal olaylar

**Keywords:** Metabolomics; metabolome; systems biology; biochemical phenomena

## OMİK ÇALIŞMALARDA GENEL BAKIŞ

1953 yılında Nature dergisinde Watson ve ark. tarafından “Nükleik Asitlerin Moleküler Yapısı: Deoksiriboz Nükleik Asit İçin Bir Yapı” ismiyle yayımlanan

çalışma sayesinde DNA'nın çift sarmal yapısı hakkında ilk bilgilere ulaşılmıştır.<sup>1</sup> 1990'lı yıllara gelindiğinde başlatılan “İnsan Genom Projesi” ile insan genomunun tüm haritası ortaya çıkarılmaya çalışılmış, hastalıkların genom dizilimleriyle bağlantıları

**Correspondence:** Mustafa ÇELEBİER

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya ABD, Ankara, TÜRKİYE/TURKEY

**E-mail:** celebier@hacettepe.edu.tr



Peer review under responsibility of Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences.

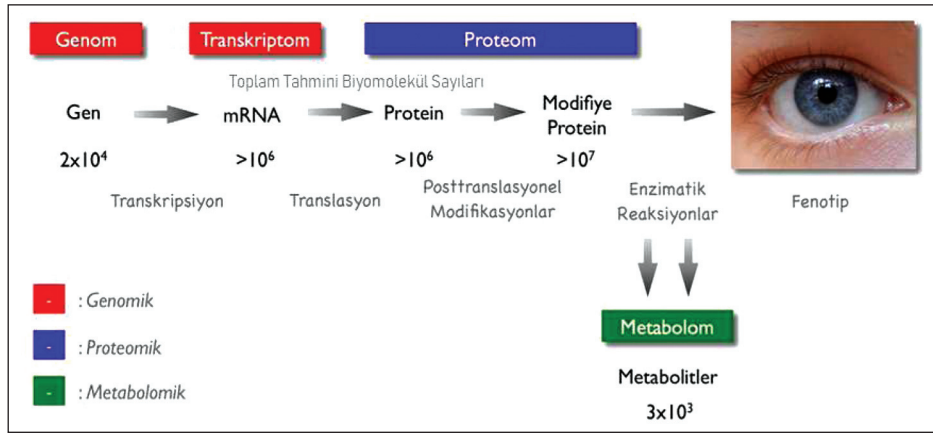
**Received:** 13 Apr 2020

**Received in revised form:** 03 Jul 2020

**Accepted:** 03 Jul 2020

**Available online:** 22 Sep 2020

2146-9040 / Copyright © 2020 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



ŞEKİL 1: Hücre içerisinde gerçekleşen olaylar sonucu genomdan proteoma artan karmaşık yapı ve hücre içerisinde ilgili moleküllerin tahmini sayıları.

araştırılmaya başlanmıştır.<sup>2</sup> 2003 yılında sonlanan projeye “postgenomik çağ” denilen, genlerin translasyonu, genom-proteom ilişkileri ve genom-metabolom ilişkilerini inceleyen yeni bir dönem açılmıştır.<sup>3</sup> Bugün bu çalışmalar sonucuyla ortaya çıkan ve “sistem biyolojisi” olarak adlandırılan çalışma alanıyla birden fazla omik çalışma arasında bağlantılar kurulup, anlamlı sonuçlara ulaşılabilmektedir.<sup>4</sup> Şekil 1’de, omik çalışmaların ilgi alanları ve fenotiple bağlantıları, ayrıca omik çalışmalara göre analizi hedeflenen gen, protein ve metabolit miktarı şematize edilmiştir.

## METABOLİT, METABOLOM VE METABOLOMİK KAVRAMLARI

Hücre tarafından sentezlenen veya enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan, düşük molekül ağırlıklı kimyasal bileşiklerin her biri metabolit olarak adlandırılır. Hücredeki metabolitlerin tamamına ise bir bütün olarak metabolom denilmektedir. Yunanca kökenli omik eki, metabolom terimine eklenerek metabolomla ilgilenen anlamına gelen metabolomik terimini türetir. Metabolomik çalışmalar, bir hücre veya dokuda bulunan metabolitlerin miktarlarının ölçülmesi, tanımlanması ve çalışma kapsamında belirlenen değişkenler üzerinden birbirleriyle karşılaştırılmasıdır.<sup>5</sup> Tanı ve tedavi amaçlı olarak metabolit analizleri, uzun süredir uygulanmasına rağmen metabolit profillemeye çalışmalarıyla hücre içinde veya fizyolojik sıvılarda var olan çok sayıda metabolitin analiz edilmesi ve profillenmesi sonucu, çeşitli hastalıkların moleküler düzeyde etki mekanizmalarını

aydınlatmaya ve dolayısıyla metabolom düzeyinde hastalık süreçleriyle ilgili biyobelirteçleri bulmaya yönelik çalışmalar yeni yeni artmaktadır.<sup>6-10</sup> Biyobelirteç, bilindiği üzere bir hastalığın tanı, teşhis ve tedavisini takip etmeye yarayan biyomoleküllere verilen genel addir.<sup>11</sup> Örnek olarak BRCA<sub>1</sub> gen mutasyonları göğüs kanseri riskini belirlemede kullanılan bir genetik biyobelirteçtir.<sup>12</sup> Glukoz metaboliti diyabet hastalığında, kreatinin ise böbrek fonksiyonlarını ölçmede biyobelirteç olarak kullanılan metabolitlerdendir.<sup>13</sup> Klinik metabolomik çalışmalarda nihai hedef, biyobelirteç olarak kullanılacak metabolitlerin tespit edilmesidir.

Metabolomik çalışmalar, en genel anlamıyla metabolit profillemeye ve hedeflenmiş metabolomik olmak üzere 2 ana başlığa ayrılırlar. Metabolit profillemeye basamağı, belirlenen bir değişken (örneğin bir hastalık durumu) üzerinden tanımlanan gruplar arasında, metabolom düzeyindeki olası farklılıkları gözlemlemek amacıyla yapılan çalışmalardır. Metabolit profillemeye basamağından elde edilen verilerle, seçilen metabolitleri tanımlamak, yapılarını aydınlatmak ve miktarlarını belirlemek amacıyla hedeflenmiş metabolomik çalışmaları yapılır.<sup>14</sup>

Metabolitler; oligonükleotidler, şekerler, peptidler, nükleozidler, organik asitler, ketonlar, aldehitler, aminler, amino asitler, lipidler, steroidler, alkaloidler ve ilaçlar gibi kimyasal bileşiklerdir ve molekül ağırlıkları genellikle 1500 Da’un altındadır.<sup>15</sup> Bu bileşikler, metabolik yollar vasıtasıyla hücresel reaksiyonlara katılır veya ürün olarak çıkarlar. Metabolitler ve metabolitlerin oluşturduğu metabolom ve

genomun aksine beslenme, cinsiyet, yaş ve hastalık gibi çevresel değişkenlerden anlık olarak etkilenir.

## GÜNCEL DURUM TESPİTİ: METABOLOMİK ÇALIŞMALARIN TARİHSEL GELİŞİMİ VE İNSAN METABOLOM PROJESİNE GİDEN YOL

Omik bilimler ve metabolomik görece yeni alanlar olmasına karşın bugün metabolit olarak tanımladığımız vücuttaki bazı kimyasal bileşiklerin çeşitli vücut sıvılarından analiziyle tanı ve teşhis amacıyla kullanılması eskilere dayanır.<sup>16</sup> Modern metabolomik çalışmalar geçmiş birkaç 10 yıla bakılarak takip edilebilirken, kökenleri ise Antik Çağlara uzanan ilkel analitik yöntemlere kadar varabilmektedir. Tarihte bilinen en eski örneklerden birisi, MÖ 2000 yıllarında Antik Çin uygarlığında diyabet tanısı koymak amacıyla uygulanan ve karıncaların idrar numunelerine göre değerlendirilen ilkel bir analiz tekniği ve tanı koyma yöntemidir.<sup>17</sup> Orta Çağ döneminde Ulrich Pinder, “üre tekerleği” adını verdiği bir renk tayfi modellemesiyle bazı hastalıklara teşhis ve tanı koymaya çalışmıştır. Modern metabolomik çalışmaların başlangıcı ise Williams ve ark. tarafından 1950’li yılların başında gerçekleştirilen çalışma olarak kabul edilebilir.<sup>18</sup> Williams bu çalışmada, alkolikler, şizofreni hastaları, mental bozukluk ve daha birçok hastalık gruplarından örnekler toplayarak 200.000’den fazla kâğıt kromatografisi analizi gerçekleştirmiş ve sonuçları hastalık gruplarına göre ayırarak ilk profillemeye çalışmasını yapmıştır.

Williams’ın çalışmaları umut verici sonuçlar vermesine karşın, yöntem ve uygulamadaki zorluklar yeni çalışmaları geciktirmiş, benzer araştırmaların devam etmesi 1970’li yılları bulmuştur. Bu tarihlerde, gaz kromatografisinde oluşan bilimsel ve teknolojik ilerlemeler sonucu çalışmalar çeşitlenmeye ve hız kazanmaya başlamıştır.<sup>19</sup> 1971 yılındaki gaz kromatografisi temelli çalışmasında Hornings, “metabolit profillemeye” terimini kaynaklarda ilk kullanan araştırmacı olarak göze çarpmaktadır.<sup>20</sup> 1980’li yıllardaki metabolomik çalışmalarda 2 yeni analitik tekniğin kullanılmaya başlandığı yıllar olarak dikkat çekmektedir. Games ve ark. tarafından 1984 yılında gerçekleştirilen ve karabiber bileşenlerini inceleyen araştırma “sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi

(LC-MS)” cihazıyla yapılan ilk metabolomik çalışmalardandır.<sup>21</sup> 1989 yılında ise Bell ve ark., vücut sıvılarından metabolit profillemeye deneyleri yaparak, “nükleer manyetik rezonans (NMR)” cihazını metabolomik çalışmalara katan ilk grup olmuşlardır.<sup>22</sup> LC-MS ve NMR yöntemlerinin de katılımıyla beraber 1990’lı yıllar her gelişen analitik ve biyoinformatik teknolojinin metabolomik çalışmalara da entegre edilmeye başlandığı yıllar olmuştur. Yine 1990’lı yıllarda “kapiller elektroforez” ve “ultra performanslı sıvı kromatografisi [ultra performance liquid chromatography (UPLC)]” ile yapılan profillemeye araştırmaları da metabolomik çalışmalar arasına girmeye başlamıştır.<sup>23,24</sup> Fiehn, 2002 yılında yayımlanan makalesinde metabolom terimini ilk kez kullanmıştır.<sup>25</sup>

İnsan Metabolom Projesi [Human Metabolome Project (HMP)] ilk kez 2005 yılında tanımlanmış ve insan metabolomunun ortaya çıkarılması için çalışmalara başlanmıştır. Diğer omik alanlara göre metabolomik çalışmaların bu kadar yeni tarihli olmasının sebebi hipotezin yani hastalıkların teşhisi, tanısı ve tedaviye yanıt sürecini incelemede vücut içerisinde miktarı artan veya azalan metabolitlerin biyobelirteç olarak kullanılabilmesi düşüncesinin hayata geçirilmesinde, teknolojik olarak gerekli imkânların daha önceki yıllarda var olmamasıdır. Şöyle ki herkes tarafından bilinen kreatinin ve bilirubin yıllardır biyobelirteç olarak böbrek ve karaciğer fonksiyonlarını incelemede ve hastalıkların teşhisi için ve tedaviye yanıt sürecini takip etmede kullanılan 2 önemli metabolittir. Ancak vücut içerisinde güncel rakamlara göre >15.000 endojen metabolit gezinmektedir. Bu metabolitler, metabolik yollarla ilişkilidir ve hastalık durumuna bağlı olarak metabolik yollarındaki değişimlerden etkilenmekte ve miktarları sağlıklı bir insana göre farklılaşmaktadır. Dolayısıyla daha dün için bilim kurgu gibi görünen bir metod olan “liquid biopsy” yani sadece idrar, kan, omurilik sıvısı, tükürük gibi biyolojik sıvılar hatta nefes örnekleri alınarak bir kişideki metabolit düzeylerinin sağlıklı kişilerle karşılaştırılması süreci artık teknolojik olarak mümkün olabilmektedir. Bu bilgiler, kişilerin hangi hastalıklara yakalanmış olduğunu veya hangi hastalık süreçlerinin başladığını ve hatta tedaviye ne şekilde yanıt verdiğini, yanıt verip vermediğini saptayabilecek niteliktedir.

Ocak 2005 tarihinde başlatılan ve Genome Canada tarafından finanse edilen 7,5 milyon dolarlık HMP'nin ana hedefleri şu şekilde belirlenmiştir:

1. Hastalıkların tanımlanması, teşhisi ve tedaviyle tedaviye yanıt sürecini incelemede metabolomla hastalık arasında metabolik yollar üzerinden ilişki kurulması,
2. İlaç metabolizması ve toksikolojisinin değerlendirilmesi,
3. İnsan metabolizması ve insan genomu arasında bir bağlantı oluşturulması,
4. Metabolomik çalışmalar için bir yazılım geliştirilmesi.

Öyle ki HMP başladığında henüz insan vücudunda gezinen eksojen (dışarıdan alınan ve vücut tarafından üretilemeyen) ve endojen (vücut tarafından üretilebilen) metabolitlerin çoğu henüz tanımlanmamıştı. HMP aracılığıyla kurulan İnsan Metabolom Veri Bankası [Human Metabolome Database (HMDB)], bugün için gelişerek 4.0 sürümüne yükseltilmiştir (<http://www.hmdb.ca>). Bu sürümle birlikte HMDB, yeni özellikler kazanmasının yanında kayıtlı metabolit sayısını 114.100'e yükseltmiştir. Wishart ve ark. tarafından 2017 yılında yayımlanan bir çalışmada HMDB'nin her bir sürüm ile birlikte ne kadar geliştiği açıkça ortaya konulmaktadır.<sup>26</sup>

HMDB 3.0 sürümü 2013 yılında, HMDB 2.0 sürümü ise 2009 yılında yayımlandığına göre HMDB'ye kayıtlı metabolit sayısında 10 yıl içerisinde 114100/6408=17,80 katlık değişim, metabolomik çalışmaların neden daha önceki senelerde hak ettiği şekilde gerçekleştirilemediğini gözler önüne sermektedir. Ayrıca güncel verilerde henüz daha 82.274 metabolitin varlığının anlaşılması ama henüz tanımlanamamış olması son derece ilgi çekicidir.

Elbette ki HMDB'nin bu derece ilerlemesinde HMP'nin payı büyüktür. Ancak tek başına HMP, böylesi bir ilerlemeyi sağlayamazdı. Bu ilerlemenin altında:

- İleri analitik teknikler ve cihaz teknolojisindeki gelişim,
- Bilgisayar teknolojisindeki gelişim,
- Yazılım teknolojisindeki gelişim,
- Konuya ilgi duyan bilim insanı sayısındaki artış da azımsanmayacak kadar önem taşımaktadır.

Bütün bu parametreler tek tek irdelenecek olursa, AstraZeneca firmasından Tony Bristow tarafından European Pharmaceutical Review isimli popüler bilim dergisi/web sitesinde ([www.europeanpharmaceuticalreview.com](http://www.europeanpharmaceuticalreview.com)) 2011 yılında yayımlanan "Evolution and revolution in time-of-flight mass spectrometry and its impact on research within the pharmaceutical industry" isimli çalışmada 2008 yılından 2011 yılına kadar geçen 3 yılda MS cihazlarının "rezolüsyon" yani ayırtıcılığının 2 kat arttığı, 2006 yılından 2009 yılına kadar geçen 3 yılda ise "accuracy" yani doğruluğunun 2 kat arttığı gösterilmektedir.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazlarının UPLC cihazlarına dönüşüm süreci de son 10 yıla ait bir gelişmedir. Gritti ve Guiochen tarafından 2012 yılında yayımlanan bir çalışmada, şimdi neredeyse standart hâle gelen 1,7 mm partikül çaplı kolonların 2006 yılında kullanılmaya başlandığı görülmektedir.<sup>27</sup>

Cihaz teknolojisindeki değişimlere paralel olarak bilgisayar teknolojisindeki değişimler de son 10 yılda göz alıcıdır. İlk akıllı telefonun 2007 yılında piyasaya çıktığı düşünülürse son 10 yılda bilgisayar teknolojisindeki değişim açıkça görülecektir. 2007 yılında 128 MB olan ortalama bir USB belleğe ait kapasite bugün için neredeyse 128 GB'a (1.000 kat artış) ulaşmıştır. Yeni teknoloji bir Sıvı Kromatografisi-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (Q-TOF LC/MS) cihazında gerçekleştirilen metabolit profillemeye çalışmasına ait 1 saatlik bir gradient elüsyon programından elde edilen verinin yaklaşık 0,5 GB yer kapladığı düşünülürse cihaz teknolojisindeki gelişimin, bilgisayar teknolojisiyle ne şekilde desteklendiği de açıkça görülecektir. 2007 yılında bugün elde edilen bir metabolomik veriyi işleyecek bilgisayar, süper bilgisayar olarak anılırken, bugün masaüstü bilgisayarlar metabolomik veriyi işleyebilecek düzeydedir.

## ■ GÜNCEL DURUM TESPİTİ: SIVI KROMATOĞRAFİSİ KÜTLE SPEKTROMETRİSİ TEMELLİ METABOLOMİK ÇALIŞMALARDA KULLANILAN YAZILIMLAR

LC/MS ile elde edilmiş bir kromatogramda metabolomik veriyi işleyebilecek yazılımların tarihi HMP'nin başlangıcına dayanmakla birlikte gelişimini



tamamlayarak işlevsel hâle gelmesi 2009 yılını bulmuştur. Bu yazılımlar içerisinde güncel ve en çok kullanılan yazılımlardan birisi XCMS'dir ([https://xcmsonline.scripps.edu/landing\\_page.php?pgcontent=mainPage](https://xcmsonline.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=mainPage)).

2006 yılında R programlama dili altında çalışan bir yazılım olarak yoluna başlayan XCMS, 2012 yılında online çalışan bir platform 2018 yılında ise bir enstitü hâline gelmiştir. ([https://xcmsonline.scripps.edu/landing\\_page.php?pgcontent=institute](https://xcmsonline.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=institute)).<sup>28,29</sup>

XCMS, metabolomik çalışmalar için geliştirilen, "R" istatistik yazılımı tabanlı, açık kaynak kodlu bir yazılımdır. XCMS, girilen parametreler doğrultusunda ham datayı matematiksel modellemelere çevirir. XCMS, piklerin belirlenmesi, örnek setindeki diğer numunelerdeki piklerle eşleştirilmesi, pik şiddetlerinin karşılaştırılması, istatistiksel testler ve ayrılmış iyon kromatogramlarını elde etmede kullanılır.<sup>30,31</sup> XCMS'nin en önemli özelliği açık kaynak kodlu olmasıdır. Yani XCMS'ye ait kaynak kodlarını herhangi bir araştırmacı, ticari amacı olmadığı takdirde serbest olarak kullanabilir. Buna en güzel örnek İngiltere merkezli IDEOM'dur.<sup>32</sup> IDEOM, kurulduğu dönemde XCMS'nin kolay kullanılmasını sağlayan (R programlama dili bilmeye gerek olmadan) bir Excel arayüzüdür.

XCMS'ye alternatif yazılımlardan başlıca olanı ise MZmine'dir.<sup>33</sup> MZmine ile XCMS'yi karşılaştıran yayınlar hâlen yayımlanmaktadır.<sup>34</sup> Ancak temelde her ikisi de artık kabul görmüş bir algoritma olan "CentWave" algoritmasını kullanmaktadırlar.<sup>35</sup> CentWave algoritmasını kısaca açıklamak gerekirse; x eksenini zaman, y eksenini intensite, z eksenini ise m/z değeri olan bir LC/MS kromatogramı için o kromatogramda hangileri gerçekten bir metabolite ait pik, hangileri metabolite ait pik değil ortaya koymak için piklere ait bazı parametreler üzerinden (örneğin, en küçük ve en büyük pik genişliği ne kadar olmalı vb.) pikleri ortaya çıkarmaktır.

XCMS ve MZmine haricinde farklı platformlar da kurulmakla birlikte artık temel yaklaşım XCMS kaynak kodlarını kolay kullanılabilir hâle getirme ve yeni özellikler katma çabasıdır.

Çelebier tarafından 2014 yılında yayımlanan derleme çalışmada metabolit profillemeye XCMS'nin

önemi şu cümleyle ortaya konulmaktadır: "2 farklı grup için (örnek olarak hasta ve sağlıklı grup) beşer kez LC/MS analizi yapılan bir metabolit profillemeye çalışmasında her 1 grup için 5 adet LC/MS ve 2 grup için toplam 10 adet LC/MS kromatogramı olacaktır."<sup>31</sup> Bu gruplar için uygulanan yöntemle ilgili olarak analiz süresinin 30 dk ve taranacak m/z değerlerinin 50-500 arasında olduğu düşünülür. Böyle bir çalışmada her 1 sn için dedektör tarafından taranan verinin toplamı oldukça büyüktür. Her 1 dk için belki de onlarca farklı metabolit kolondan elue olacak ve kütle spektrometresinde analiz edilecektir. Bu metabolitlerin derişimleri birbirinden oldukça farklı olacağına göre bunlara ait piklerin intensiteleri de birbirinden tamamen farklı olacaktır.

Böyle bir çalışmada tekrarlı analizler için ayırım tekniğindeki (LC) hata payından dolayı metabolitler farklı zamanlarda kolondan elue olabilecek ve dedeksiyon tekniğindeki (kütle spektrometresi) hata payından dolayı her bir metabolit için m/z değerleri arasında bir miktar da olsa farklılık görülecektir. Eğer ne aradığımızı veya neler aradığımızı biliyorsak bu ufak varyasyon çok da problem olmayabilir; ancak yüzlerce metabolitin farklı gruplar için profillemeye bir çalışmada ufak gibi görünen bu farklılıklar yüzünden metabolitlerin tespit edilmesi ve tanımlanması imkânsız olmamakla birlikte zaman alıcı ve zor bir süreçtir. Özellikle düşük derişimdeki metabolitler, insan emeğiyle kromatogramların taranması sırasından gözden kaçabilir veya zemindeki gürültüyle karıştırılabilirler.

XCMS, bütün bu sorunların üstesinden gelmek ve farklı gruplar için metabolit düzeyindeki farklılıkları teşhis etmek amacıyla kullanılan ve "R" programlama dili altında çalışan, internet üzerinden erişilebilen ve kâr amacı taşımayan bir yardımcı yazılımdır.

Nevedomskaya ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada metabolit olan kreatinin (m/z 114,12±0,05) için analiz sonucu göç zamanını gösteren elektroferogramı ve XCMS ile müdahale edilmiş elektroferogramı arasındaki fark, güncel yazılımların hedeflenmemiş ve hedeflenmiş analizlerde sağladığı faydayı gözler önüne sermektedir.<sup>36</sup> İlgili çalışmada, farklı örneklerde farklı intensitelere sahip kreatin pi-

kinin, diğer metabolitler içerisinde “CentWave” algoritması ve istatistiksel bir analizle tespit edilip, göç zamanındaki değişimin istatistiksel sınırlar içerisinde yorumlanıp, bütün kromatogramlar için eşleştirilmesi insan emeğiyle oldukça zordur. Kaldı ki böyle bir işlemi binlerce metabolit için insan emeğiyle gerçekleştirmek öngörülemez bir zaman kaybıdır. Belki hedeflenmiş bir metabolit için bu işlem yapılabilir ancak hedeflenmemiş bir profillemeye çalışmasında bilinmeyenler içerisinde bu işlemi yapmak fazlasıyla zaman alıcıdır.

### GÜNCEL DURUM TESPİTİ: METABOLOMİK ÇALIŞMALARDA YAŞANAN PROBLEMLER

İnsan metabolom projesinin ortaya çıkışının dolaylı sebepler haricinde nihai sebebi; hastalıkların tanımlanması, teşhisi ve tedavisiyle tedaviye yanıt sürecini incelemede metabolomla hastalık arasında metabolik yollar üzerinden ilişki kurulması idi. İnsan genom projesi birçok başarıya imza atsa da hastalıkların erken teşhisi konusunda istenilen başarıya yeterince ulaşamamıştır.<sup>37</sup> Bunun en belirgin sebebi, insanların genomunun sadece %1'inin birbirinden farklı oluşu ve ayrıca genomun statik yani durağan oluşu sonucu fenotiple ilgili yeterli bilginin elde edilememesidir. Örneğin meme kanseri olan birçok kişide BRCA<sub>1</sub> geni olmasa dahi hastalık nüksedebilmektedir. Bu durum, genlerin yanı sıra fenotiple de ilişkilidir. Hepimizin bildiği üzere kişinin yaşam tarzı, obezite, sigara, kullanılan ilaçlar vb. birçok dış faktör meme kanseri daha doğrusu kanserle ilişkilendirilmektedir. Oysaki meme kanseriyle ilgili 2010 yılında gerçekleştirilen Kanada merkezli bir metabolomik çalışmada, meme kanseri ve yumurtalık kanserinin idrardaki metabolitlerin miktarında meydana gelen değişiklikten yararlanılarak erken teşhisin olanaklı olduğu ifade edilmiştir.<sup>38</sup> Çalışmada, erken teşhis edilen meme kanserinde 5 yıl içerisinde hayatta kalma oranının %100 olduğu belirtilerek çalışmanın öneminden söz edilmiştir. NMR ile gerçekleştirilen bu çalışma güncel bakış açısıyla incelendiğinde en dikkati çeken nokta 67 tane ne olduğunu bilinmeyen ancak tespit edilen metabolit miktarının, meme kanseriyle birlikte istatistiksel olarak anlamlı derecede değiştiğidir. İlgili yıllarda metabolomik çalışmalar,

kromatografi ağırlıklı değil, NMR ağırlıklı çalışmalardı. Bu tür çalışmalarda metabolitlerin ne olduğunu ortaya çıkarılmadan düzey değişiminin istatistiksel olarak ortaya konulması dahi anlamlı sonuç olarak kabul edilmektedir. 2010 yılında GC-MS ile idrardan gerçekleştirilen bir diğer metabolomik çalışmada 5 adet metabolit miktarının meme kanserine bağlı olarak idrarda miktarının değiştiği ortaya konulmuştur.<sup>39</sup> Ancak yine bu çalışmada ilgili metabolitlerin neler olduğu tanımlanamamıştır. Sadece m/z değerleri yani dolaylı olarak kütleleri ve alıkonma zamanları bilinmektedir. Hatta araştırmacı ne olduğunu bilmediği metabolitlere birer kod vermiş ve de bu metabolitlerin miktarlarındaki değişime bağlı olarak meme kanseri tanısıyla ilgili bir tablo oluşturmuştur. 2010 yılında HMDB 2.0 sürümü içerisinde sadece 6.000 civarı metabolit tanımlıdır. Dolayısıyla 2 grubu, yani sağlıklı ve hasta grubu birbirinden Temel Bileşenler Analizi (PCA) ile ayırabilmek yeterli bir veri olarak kabul görmektedir.

Yukarıda söz edilen Kim ve ark. gerçekleştirdiği çalışmada belki de miktarı artan ve azalan ancak tanımlanamayan metabolitler kanserle ilişkili çok önemli bir metabolik yolağa ait metabolitlerdir ve de meme kanseri oluşumu sırasında bu metabolik yolağın etkilediğinde ilgili metabolitlerin miktarlarında değişimler gözlenmektedir.<sup>39</sup> Ancak o yıllarda tanımlanamamış olan bu metabolitler günümüzde HMDB vb. veri bankaları aracılığıyla tespit edilebilmektedir. Burada da en temel problem, bir metabolit pikinin Q-TOF LC/MS gibi <1,0 ppm doğruluğa sahip bir cihazla tespitinde dahi, ilgili metabolite ait m/z değeri ve dolayısıyla kütle değerinin birden fazla metabolitle eşleşebiliyor olmasıdır. Bunu somut bir örnek üzerinden açıklamak gerekirse fenilketonüri hastalığının, kandaki fenilalanin düzeyiyle ilişkisinin henüz bilinmediğini hayali bir ortamda gerçekleştirilen hedeflenmemiş metabolomik çalışmada Q-TOF LC/MS gibi hassas bir cihazla çalışıldığında kan plazmasında molekül ağırlığı 165,1891 olan bir pikin miktarının hastalarda artmış olduğu görülecektir. Bu kütle değeri, fenilalaninin kütlesine eşittir. Fakat, cihazın hata payı ve rastgele hatalar dolayısıyla m/z değeri, dolayısıyla kütle değeri 10 farklı hasta ve 10 farklı sağlıklı birey için 165,1886-165,1912 aralığında okunabilecektir. Ayrıca ilgili pike ait alıkonma zamanları da

12,67-12,72 aralığında dağılım gösterebilecektir. Burada birinci sorun hem kütle hem alıkonma zamanı hem de hastalığa bağlı düzeydeki değişim sonucu oluşan varyasyonun binlerce pik arasından ilgili pik için nasıl tespit edileceğidir. Kısaca “Alıkonma zamanı 12,67 dk olan ve kütle değeri 165,1786 olan pik ile alıkonama zamanı 12,72 olan ve kütle değeri 165,2264 olan pik aynı mı?” sorusuna yanıt bulunması gerekecektir. Bu sorunun üstesinden XCMS gelebilmektedir. XCMS, sırayla pikleri bulma, eşleştirme ve o pike ait varyasyonu ortaya koyabilme kapasitesine sahip algoritmalar içerir. XCMS ile ilgili pikin %95 güven seviyesinde her bir numune için aynı metabolite ait olduğu bilgisini edinilebilecektir. Bundan sonra yapılacak ilk iş ilgili pikin hangi metabolite ait olduğunun veri bankaları aracılığı ile taramasıdır. Ancak HMDB ile ilgili aralık girildiğinde fenilalanin de dâhil olmak üzere 13 adet metabolitin ilgili pikle eşleştiği görülecektir. Benzokain vb. eksojen metabolitler listeden elense dahi endojenler arasında da ilgili metabolitin fenilalanin olduğuna ait net bir kanıt yoktur. Dolayısıyla hedeflenmiş çalışmalara geçilmeden hedeflenmemiş çalışmalar üzerinden metabolom düzeyinde biyobelirteç önerebilmek oldukça zordur ancak hedeflenmemiş çalışmalar olmadan da yeni biyobelirteçlerin tanımlanabilmesi süreci zaman alıcıdır.

## ÇALIŞMADA ADI GEÇEN YAZILIM VE VERİ BANKALARI İLE İLGİLİ ÖZET BİLGİLENDİRME

Kütle spektrometresi verilerinin istatistiksel analizi için tasarlanmış biyoinformatik yazılımlardır. Hedeflenmemiş metabolomik verileri, istatistiksel olarak işlemek üzerine odaklanmış, elde edilen sonuçları görselleştirebilen açık kaynak kodlu mimariye sahiptirler.

### CENTWAVE

XCMS uygulamalarında ham veri içerisinde var olan metabolit piklerinin farklı gruplar için eşleştirilmesi, istatistiksel olarak değerlendirilmesi ve özet bir tablo hâlinde sunulması için kullanılan bir algoritmadır. XCMS içerisine gömülü vaziyettedir. Bir sinyalin pik olup olmadığını matematiksek olarak ortaya koymayı sağlar. XCMS’ye girilen parametreler ışığında meta-

bolit piki olduğunu varsaydığı tüm sinyalleri kullanıcıya özet bir tablo ve görsel olarak iletebilir. Hatalı pozitif sonuçlar vermeye de sebep olabilen bu algoritmanın sonuçlarının tek tek kontrol edilmesi ve/veya çeşitli istatistiksel analizlere tabi tutulmasıyla hatalı pozitif sonuçlardan mümkün olduğunca kurtulabilmek mümkündür.

### IDEOM

Hedeflenmemiş metabolomik çalışmalarda ham veriyi işleyebilmek üzere programlanmış, MS Excel altında çalışan bir arayüzdür. Alıkonma zamanı indeksi gibi farklı özellikleriyle içerisinde barındırdığı kayıtlı veri ile ham verinin işleme sürecine yardımcı bulunur.

### HMDB

İnsan metabolome veri tabanı, insan vücudunda bulunan küçük moleküllü metabolitlerle ilgili kapsamlı bilgilere serbestçe erişimi sağlayan çevrimiçi bir veri tabanıdır. Genome Canada tarafından finanse edilen insan metabolom projesi aracılığıyla hazırlanmıştır. Klinik biyokimyada hâlihazırda kullanılan kreatinin, bilirubin gibi iyi bilinen metabolitlerden henüz yeni keşfedilen metabolitlere kadar fiziksel, kimyasal, biyokimyasal ve klinik bilgiye aynı çatı altında ulaşım imkânı sağlar.

## SONUÇ

### METABOLOMİK ÇALIŞMALAR NEREYE GİDİYOR?

Hastalık durumu ve tedaviye yanıt süreci gibi durumlarla ilişkili biyobelirteçlerin ortaya çıkarılmasına ilişkin çalışmalarda daimî yaklaşım hedeflenmemiş çalışmalar yani metabolit profillemedir. Metabolit profilleme, ne arandığı bilinmeden gerçekleştirilen ve ilgili hipotezin sadece “2 grup arasında metabolom düzeyinde değişiklikler oluşmalı” temeli üzerine dayandığı çalışmalardır. Metabolomik çalışmaların bir diğer türü olan hedeflenmiş metabolomik çalışmalarda ise hastalık durumuna bağlı olarak miktarı değişim gösteren potansiyel metabolitler (metabolit profilleme sonucunda bulunan) ya da hastalık durumunda etkilendiği düşünülen metabolik yollardaki metabolitlerin miktarları, ilgili metabolitlere ait standartlar kullanılarak tespit edilmektedir.

Zhang ve ark. 2017 yılında Oncotarget dergisinde yayınladıkları “Metabolomics for biomarker discovery in the diagnosis, prognosis, survival and recurrence of colorectal cancer: a systematic review” isimli çalışmalarında 1998 yılından 2017 yılına kadar kolorektal kanserle ilgili biyobelirteç bulma çalışmalarından elde edilmiş sonuçlar bir arada derlenmiştir.<sup>40</sup> Çalışmanın metabolomik çalışmalarla ilgili en ilginç yönü kolorektal kanserle ilgili gerçekleştirilmiş bütün metabolomik çalışmalar sonucu tespit edilen biyobelirteçleri bir tablo hâlinde özet olarak sunabilmesidir. Aslında beklenen durum, kolorektal kansere bağlı olarak plazma ve idrarda aynı metabolitlerin miktarlarında değişim gözlenmiş olması ve bir kere gerçekleştirilmiş bir kolorektal kanser-metabolomik çalışmasının tekrarına ihtiyaç duyulmamasıdır. Fakat burada dikkat edilmesi gereken nokta, metabolomun dinamik oluşu ve toplumdan topluma hatta aynı toplum içinde çevresel faktörlere bağlı olarak değişim gösteriyor olmasıdır. Aslında sağlıklı ve hasta diye 2’ye ayrılmış her bir grup, metabolomik çalışmalar için kendi içinde onlarca varyasyona sahip birden fazla gruptur. Dolayısıyla kolorektal kanserle ilişkili bütün metabolomik çalışmalardan elde edilen nihai ve rafine bilgi ancak kolorektal kanserin erken teşhisinde kullanılabilir bir bilgidir. Sırf bu yüzden Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi de henüz metabolitlerin birçoğunu hastalıklar için birer biyobelirteç olarak kabul etmeye karşı çekinceyle yaklaşmaktadır.

Metabolomik çalışmalarda aynı hastalık için biyobelirteç olarak önerilen metabolitlerle ilişkili varyasyonlar sadece grup içi varyasyonlarla da ilişkilendirilmemelidir. Metabolitler, genler veya proteinler gibi tek tip bileşikler değildir. Ortak tek özellikleri molekül ağırlıklarınının <1,5 kDa oluşudur. Ne kimyasal olarak ne de fiziksel olarak birbirleriyle başka hiçbir ilişkileri yoktur ve sayıları yüz binlerle ifade edilmektedir. Böyle bir durumda bütün metabolomu profilleyebilecek bir analitik yöntem henüz geliştirilememiştir ve teorik olarak LC-MS bazlı bir

yöntem de bütün metabolomu tek başına profilleyemez.

Sonuç olarak, metabolomik çalışmalar kişiselleştirilmiş tıp uygulamaları, hastalık tanı ve süreç incelemesi, beslenme tarzıyla ilgili klinik çalışmalar, ilaç araştırmaları vb. birçok alanda kendine yer bulmaktadır. Yakın gelecekte, bir damla kan numunesine uygulanabilecek rutin kan testleriyle kişinin, sağlık durumuna dair metabolom düzeyinde anlık bilgiye ulaşmasını sağlayabilecek bilimsel altyapı kurulmuş olacaktır. Gelişen yazılım ve bilgisayar teknolojisiyle buna paralel olarak ilerleyen analitik cihaz teknolojisi sayesinde her gün metabolom ve metabolitlere dair bildiklerimize yenileri eklenmektedir. Metabolomik çalışmalardaki gelişmelerle birlikte canlı metabolizması her geçen gün daha da iyi anlaşılmaktadır.

#### **Teşekkür**

*Bu derlemenin giriş kısmı Uzm. Kim. Ozan Kaplan’ın Yüksek Lisans tez çalışması baz alınarak tasarlanmıştır.*

#### **Finansal Kaynak**

*Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.*

#### **Çıkar Çatışması**

*Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin, çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.*

#### **Yazar Katkıları**

**Fikir/Kavram:** Ozan Kaplan, Mustafa Çelebier; **Tasarım:** Mustafa Çelebier; **Denetleme/Danışmanlık:** Mustafa Çelebier; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Ozan Kaplan, Mustafa Çelebier; **Analiz ve/veya Yorum:** Mustafa Çelebier; **Kaynak Taraması:** Ozan Kaplan; **Makalenin Yazımı:** Ozan Kaplan, Mustafa Çelebier; **Eleştirel İnceleme:** Mustafa Çelebier.



## KAYNAKLAR

1. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 1953;25;171(4356):737-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
2. Bentley DR. The human genome project--an overview. *Med Res Rev*. 2000;20(3):189-96. [[Crossref](#)]
3. Jones P. Bioinformatics in the post-genomic age. *World Patent Information*. 2001;23(4):349-54. [[Crossref](#)]
4. Kitano H. Systems biology: a brief overview. *Science*. 2002;295(5560):1662-4. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
5. Griffiths WJ, Karu K, Hornshaw M, Woffendin G, Wang Y. Metabolomics and metabolite profiling: past heroes and future developments. *Eur J Mass Spectrom (Chichester)*. 2007;13(1):45-50. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
6. Becker S, Kortz L, Helmschrodt C, Thiery J, Ceglarek U. LC-MS-based metabolomics in the clinical laboratory. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2012;883:68-75. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
7. Griffiths WJ, Koal T, Wang Y, Kohl M, Enot DP, Deigner HP, et al. Targeted metabolomics for biomarker discovery. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2010;49(32):5426-45. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
8. Venter JC. A part of the human genome sequence. *Science*. 2003;299(5610):1183-4. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
9. Xiao JF, Varghese RS, Zhou B, Nezami Ranjbar MR, Zhao Y, Tsai TH, et al. LC-MS based serum metabolomics for identification of hepatocellular carcinoma biomarkers in Egyptian cohort. *J Proteome Res*. 2012;11(12): 5914-23. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
10. Zhou B, Xiao JF, Tuli L, Resson HW. LC-MS-based metabolomics. *Mol Biosyst*. 2012;8(2):470-81. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
11. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers?. *Curr Opin HIV AIDS*. 2010;5(6):463-6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
12. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 1994;7;266(5182):66-71. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
13. Polascik TJ, Oesterling JE, Partin AW. Prostate specific antigen: a decade of discovery-what we have learned and where we are going. *J Urol*. 1999;162(2):293-306. [[Crossref](#)]
14. Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omic trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(4):263-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
15. Başaran E, Aras S, Sansaran-Duman D. [General outlook and applications of genomics, proteomics and metabolomics]. *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*. 2010;67(2):85-96.
16. Rieder MJ, Uetrecht J, Shear NH, Cannon M, Miller M, Spielberg SP, et al. Diagnosis of sulfonamide hypersensitivity reactions by in-vitro "rechallenge" with hydroxylamine metabolites. *Ann Intern Med*. 1989;110(4):286-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
17. van der Greef J, Smilde AK. Symbiosis of chemometrics and metabolomics: past, present, and future. *J Chemometrics*. 2005;19(5-7):376-86. [[Crossref](#)]
18. Institute UoTB, Research CF. [Individual Metabolic Patterns and Human Disease: An Exploratory Study Utilizing Predominantly Paper Chromatographic Methods, from the Biochemical Institute and the Dept. of Chemistry, the University of Texas, and the Clayton Foundation for Research, Austin, Issue 4. Austin: Austin University of Texas; 1951. p.205.
19. Gates SC, Sweeley CC. Quantitative metabolic profiling based on gas chromatography. *Clinical Chem*. 1978;24(10):1663-73. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
20. Horning EC, Horning MG. Metabolic profiles: gas-phase methods for analysis of metabolites. *Clin Chem*. 1971;17(8):802-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
21. Games DE, Alcock NJ, van der Greef J, Nyssen LM, Maarse H, Ten MC, et al. [Analysis of pepper and capsicum oleoresins by high-performance liquid chromatography--mass spectrometry and field desorption mass spectrometry]. *Journal of Chromatography A*. 1984;294:269-79. [[Crossref](#)]
22. Bell JD, Brown JC, Sadler PJ. NMR studies of body fluids. *NMR Biomed*. 1989;2(5-6):246-56. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
23. Plumb R, Castro-Perez J, Granger J, Beattie I, Joncour K, Wright A, et al. Ultra-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-orthogonal time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2004;18(19):2331-7. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
24. Soga T, Heiger DN. Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*. 2000;72(6):1236-41. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
25. Fiehn O. Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol*. 2002;48(1-2):155-71. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
26. Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, Guo AC, Liang K, Vázquez-Fresno R, et al. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D608-D17. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
27. Gritti F, Guiochon G. The current revolution in column technology: how it began, where is it going?. *J Chromatogr A*. 2012;1228:2-19. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
28. Forsberg EM, Huan T, Rinehart D, Benton HP, Warth B, Hilmers B, et al. Data processing, multi-omic pathway mapping, and metabolite activity analysis using XCMS Online. *Nature protocols*. 2018;13(4):633-51. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
29. Tautenhahn R, Patti GJ, Rinehart D, Siuzdak G. XCMS online: a web-based platform to process untargeted metabolomic data. *Anal Chem*. 2012;84(11):5035-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
30. Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal Chem*. 2006;78(3):779-87. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
31. Çelebier M. [Software and database usage on metabolomic studies: using XCMS on LC-MS data analysis]. *Archives Medical Review Journal*. 2014;23(2):168-85. [[Crossref](#)]
32. reek DJ, Jankevics A, Burgess KEV, Breitling R, Barrett MP. IDEOM: an Excel interface for analysis of LC-MS-based metabolomics data. *Bioinformatics*. 2012;28(7):1048-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
33. Katajamaa M, Miettinen J, Oresic M. MZmine: toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. *Bioinformatics*. 2006;22(5):634-6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
34. Myers OD, Sumner SJ, Li S, Barnes S, Du X. Detailed investigation and comparison of the XCMS and MZmine 2 chromatogram construction and chromatographic peak detection methods for pre-processing mass spectrometry metabolomics data. *Anal Chem*. 2017;89(17):8689-95. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
35. Tautenhahn R, Boettcher C, Neumann S. Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS. *BMC Bioinformatics*. 2008; 9(504):1-16. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
36. Nevedomskaya E, Derks R, Deelder AM, Mayboroda OA, Palmblad M. Alignment of capillary electrophoresis-mass spectrometry datasets using accurate mass information. *Anal Bioanal Chem*. 2009;395(8):2527-33. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
37. Nerlich B, Dingwall R, Clarke DD. The book of life: How the completion of the Human Genome Project was revealed to the public. *Health*. 2002;6(5):445-69. [[Crossref](#)]
38. Slupsky CM, Steed H, Wells TH, Dabbs K, Schepansky A, Capstick V, et al. Urine metabolite analysis offers potential early diagnosis of ovarian and breast cancers. *Clin Cancer Res*. 2010;16(23): 5835-41. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
39. Kim Y, Koo I, Jung BH, Chung BC, Lee D. Multivariate classification of urine metabolome profiles for breast cancer diagnosis. *BMC Bioinformatics*. 2010;11 Suppl 2:S4. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
40. Zhang F, Zhang Y, Zhao W, Deng K, Wang Z, Yang C, et al. Metabolomics for biomarker discovery in the diagnosis, prognosis, survival and recurrence of colorectal cancer: a systematic review. *Oncotarget*. 2017;8(21): 35460-72. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]