شیمی سبز و فناوری های پایدار

نقش طیف سنجی تشدید مغناطیسی هسته پروتون(^{1}HNMR) در تشخیص زود هنگام بیماری ها با رویکرد متابولومیکس

سلمان طاهری*[1]، افسانه عارفی اسکویی[2]، میثم کلانتری[2]

1: پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی، تهران، ایران

2: گروه علوم پایه، بخش شیمی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

Email: taheri@ccerci.ac.ir

چکیده

متابولومیک به عنوان زمینه تحقیقاتی بین رشته ای توجه دانشمندان زیادی را در سالهایی اخیر به خود جلب کرده است. یکی از قدرتمند ترین ابزارهای مطالعات متابولیکی، تشدید مغناطیس هسته (NMR) می باشد. در این مقاله مروری به جایگاه NMR در تشخیص زود هنگام بیماری و کشف شاخص های زیستی در مطالعات متابولیکی به منظور شناسایی متابولیتهای درگیر در فرآیند های شیمیایی مختلف (همچون بیماری، مصرف دارو ، مقایسه چند حالت فیزیولوژیکی و ...) پرداخت شده است. NMR به مانند یک پنجره ای است برای مشاهده ی دقیق اکثر ترکیبات شیمیایی موجود در مایعات زیستی (سرم، پلاسما، عصاره سلولی و...با طیف سنج محلول) و سایر نمونه ها همچون (بافت ، ارگان و یا دیگر نمونه های جامد و یا نیمه جامد با روش طیف سنجی حالت جامد و طیف سنجی NMR در حال چرخش زاویه جادویی) بدون نیاز به دستکاری نمونه و مشتق سازی مایعات مهم زیستی که محققین در سایر تکنیکهای آنالیز مجبور به استفاده هستند. تکرار پذیری بالای نتایج کار، زمان کوتاه آزمایش نسبت به سایر تکنیکها از مزایای این روش محسوب می شود. جایگاه کمومتریکس و آنالیزهای چند متغیره (آنالیزهای غیر نظارتی و نظارتی) در متابولومیک به دلیل پیچیدگی طیف¬های موجود از اهمیت شایانی برخوردار است. در ادامه مقاله، پایگاه های داده مهم و پر کاربرد و نرم افزارهای اختصاصی مورد استفاده در مطالعات متابولیکی بر پایه NMR معرفی شده اند و در انتها پیشرفت¬هایی که اخیراً، در حوزه قدرتمند کردن وکاستن محدودیتهای این تکنیک بوجود آمده است پرداخت شده است.

واژگان کلیدی: متابولومیکس، رزونانس مغناطیس هسته، کمومتریکس، پایگاه داده

The Importance of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (^{1}HNMR) in the Early Detection of Diseases by Metabolomics Approach

SalmanTaheri[1*], Afsaneh Arefi Oskouie[2], Meysam Kalantari[1]

1: Chemistry and Chemical Engineering Research Center of Iran, Tehran, Iran

2: Faculty of Paramedical Sciences, Department of Basic Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

As an interdisciplinary research field, metabolomics studies have attracted many scientists in recent years. One of the most powerful tools for metabolomic studies is nuclear magnetic resonance (NMR). In this paper, we will review the status of NMR in diagnosis of disease and the discovery of biomarkers in metabolic studies in order to identify the metabolites involved in various chemical processes (such as disease, drug use, comparison of several physiological conditions, etc.). NMR is like a window for accurate observation of most of the chemical compounds present in biological fluids (serum, plasma, cell extract, etc. with solution NMR) and other samples such as (tissue, organ or semi-solid samples by solid state spectroscopy and MAS spectroscopy (magic-angle spinning) without the need for manipulation of the sample and the derivation of important biological fluids that the researchers have to force in other analysis techniques. The high repeatability of the results, the short time of experimentals are considered to be the advantages of this method versus other techniques. The role of chemometrics and multivariate analysis (unsupervised and supervised classification) in metabolomics studies are important due to the complexity of the existing spectrum. In the following, article introduces important and useful databases and proprietary software used in NMR-based metabolic studies. Finally, improvements have recently been made in the area of enhancing and limiting the limitations of this technique.

Keywords: Metabolomics, NMR, Chemometrics

مقدمه

طیف سنجی تشدید مغناطیس هسته¬ای (NMR) بر پایه تابش امواج الکترومغناطیس در ناحیه طول موج رادیویی بنا شده است. در طیف سنجی NMR به جای الکترون¬های بیرونی که در اغلب تکنیکهای طیف سنجی دخیل هستند، هسته اتم در فرایند جذب در گیر است . وقتی هسته اتم در میدان مغناطیسی قوی قرار می¬گیرد بین ترازهای انرژی اسپین هسته اختلاف ایجاد می‌گردد. جهت‌گیری‌های همسو و ناهمسوی اسپین هسته به انرژی‌های متفاوتی منجر می شوند. پدیده‌ی تشدید مغناطیسی هسته‌ای زمانی رخ می‌دهد که هسته‌های هم جهت میدان اعمال شده انرژی جذب کرده و جهت اسپین خود را نسبت به آن میدان تغییر دهند، این عمل به رزونانس یا تشدید موسوم است. هسته هایی در تکنیک NMR قابل استفاده و ردیابی هستند که دارای عدد اتمی فرد یا عدد جرمی فرد یا هردو فرد باشند. از جمله آن ها می‌توان به هیدروژن، کربن13 و فسفر31 اشاره کرد [1] ابتدا نمونه تحت امواج رادیویی قرار می¬گیرد، سپس این امواج رادیویی توسط گیرنده رادیویی خاصی دریافت می¬شود و توسط الگوریتم تبدیل فوریه رمزگشایی انجام می¬پذیرد و زبان هسته به زبان قابل فهم تبدیل می¬شود. خروجی این تکنیک تولید یک طیف می¬باشد که از دو محور افقی وعمودی تشکیل شده است، محور افقی بیانگر جابجایی شیمیایی و محور عمودی شدت سیگنال حاصل از میدان مغناطیسی را نشان می¬دهد ، می¬توان با کمک پیک¬های بدست آمده گروه¬های شیمیایی و مولکول های مختلف را شناسایی کرد.

اغلب روش های مورد استفاده برای شناسایی و تشخیص بیماری ها مستلزم استفاده از روشهای تهاجمی و پر هزینه می باشند و همین طور دسترسی به ارگان هدف، نیاز به جراحی و روش¬های پیچیده پزشکی دارد. ولی با استفاده از تکنیکهای طیف سنجی غیرتهاجمی می¬توان اطلاعات ضروری از مکانیسم بیماری¬ها را فراهم کرد تا درک بشر از علت وقوع بیماری¬ها مخصوصا بیماری¬های متابولیکی افزایش یابد. در این میان حوزه تحقیقاتی متابولومیک به عنوان حوزه ای نسبتا نوظهور توانسته است توجه بسیاری از محققین را به خود جلب نماید[2]. متابونومیکس را می توان بدین گونه تعریف نمود ، علم متابولومیکس یا متابونومیکس با مطالعه کمّی و کیفی متابولیت¬ها در واکنش به یک محرک بیماری¬زا یا تغییرات ژنتیکی در یک سیستم زنده سرو کار دارد [3]. متابولیتها مولکول¬های آلی هستند با جرم مولکولی کمتر از 1500 دالتون که از آن جمله می توان به ترکیباتی همچون قندها، نوکلئوزیدها ، اسیدهای آلی، کتون-ها، آلدئیدها، آمین¬ها، اسیدهای آمینه، لیپیدها، استروئیدها، آلکالوئیدها، مواد غذایی، افزودنی¬های مواد غذایی، مواد سمی، آلوده کنندها، مواد مخدر و متابولیت¬های دارو و ... .اشاره کرد. در این مقاله مروری بر مطالعات متابولومیکی که از تکنیک NMR برای مطالعات خود استفاده کرده پرداخت خواهد شد و مراحل مطالعه در این نوع تحقیق ها و ابزارهای کار توضیح داده خواهد شد.

اهمیت و مزایای طیف سنجی رزونانس مغناطیس هسته ای در تحقیقات متابولیکی

مطالعات متابولومیکی بر پایه دو تکنیک مهم طیف سنجی جرمی (MS) و یا رزونانس مغناطیس هسته اتم بنیان نهاده شده است. این تکنیک¬ها هر کدام دارای مزایا و محدودیتهایی می باشند، از مزایای تکنیک NMR نسبت به MSمی توان به موارد زیر اشاره کرد: به جداسازی آنالیت¬ها از نمونه خام نیازی ندارد و تکنیک غیر تخریبی می باشد یعنی نمونه پس از طیف گیری بازیافت می شود. تکرار پذیری بالای داده ها و توانمندی کمّی کار کردن با آن و محدوده دینامیک وسیع و امکان شناسایی ترکیبات نامعلوم با روشهای دوبعدی از مزایای NMR می باشد. به کمک این تکنیک با انتخاب برچسب¬های ایزوتوپ دار می توان مسیرهای متابولیکی را ردیابی کرد. نتایج NMR دارای ارزش ترجمه¬ای از وضعیت in vitroبه یافته¬های کاربردی بالینی به صورت in vivo نیز می باشند. به کمک این تکنیک بر خلاف آنچه در تکنیک MS محدودیت محسوب میشود، ترکیباتی که به سختی یونیزه می¬شوند و یا به سختی می توان با مشتق سازی آن¬ها را شناسایی کرد براحتی می¬توان شناسایی کرد [4]

. از مزایای مهم دیگر تکنیک طیف رزونانس هسته¬ای این است که می¬توان در کنار اطلاعات شناسایی ترکیبات موثر، از آن درکسب اطلاعات دینامیکی سلول نیز استفاده کرد.[5] بنابراین با استفاده از طیف رزونانس مغناطیس هسته¬ای چالش¬های فیزیولوژیکی مثل ورزش را هم می¬توان بررسی کرد [6].

تکنیک های رایج در طیف سنجی رزونانس مغناطیس هسته-ای فعال در حوزه متابولومیک شامل عناصر ^{31}P-NMR,^{13}C-NMR ,^{1}H-NMR می باشد. ^{31}P NMR برای بررسی وضعیت انرژی سلولی به صورت in vivo وex vivo مناسب است . از محدودیت‌های ^{31}P NMR این است که سیگنال های ترکیبات فسفردار در ترکیبات متابولیتی با هم همپوشانی زیادی دارند.[7] در این مقاله به علت وسعت مطالعات تنها به مطالعات ^{1}H-NMR بسنده خواهد شد.

یکی از اهداف مهم مطالعات متابوبومیکی کشف شاخص های زیستی درگیر در فرآیندهای زیستی می باشد. در واقع، شاخص زیستی را می توان یک مولکول، ژن یا مشخصه¬ای که به طور طبیعی رخ می دهد و قابل اندازه گیری در شرایط زیستی است و می¬تواند به عنوان عامل اختلال زیستی ناشی از یک بیماری ویا تغییر در هومئوستازی باشد، تعریف کرد. شاخص های زیستی را می توان برای تشخیص یا پیش بینی بیماری و هم چنین برای اندازه¬گیری پاسخ¬های زیستی برخی داروها مطالعه و بررسی نمود .شاخص ها ی زیستی طیف گسترده¬ای از مواد از قبیل مواد شیمیایی، متابولیت ، ژن، رونوشتRNA، پروتئین¬ها یا کمپلکس پروتئین ها با لیگاندها و ... را شامل می شوند .

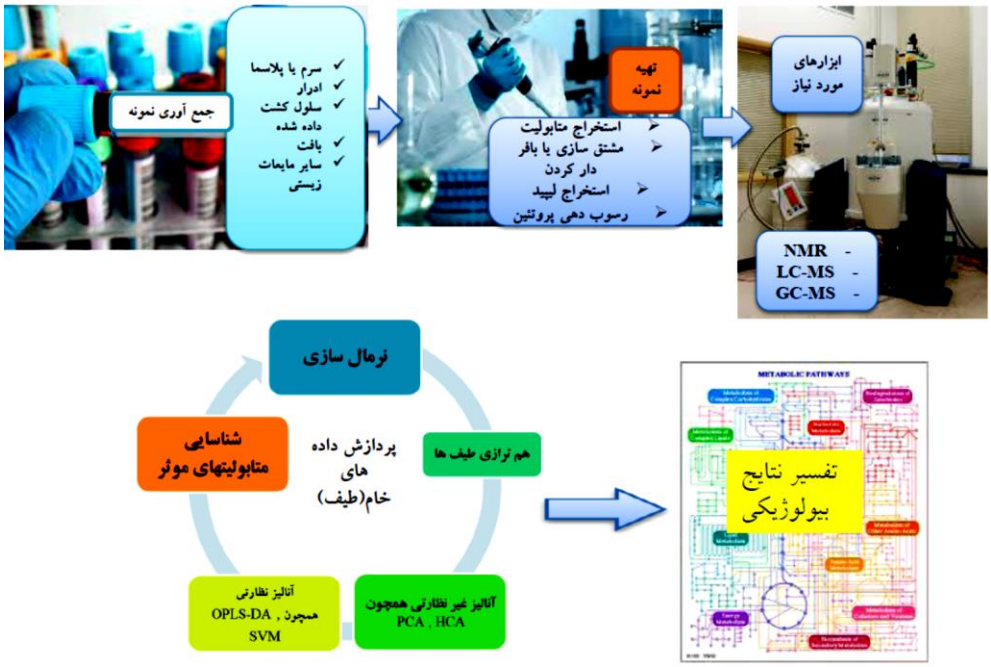
همانطور که گفته شد به کمک طیف رزونانس مغناطیس هسته¬ای به عنوان یک تکنیک غیر تهاجمی اطلاعات متابولیت¬های درگیر در فعل و انفعالات شیمیایی درگیر در سلول ها را بدست ¬آورده و با بررسی نقش و عملکرد متابولیتهای افتراقی در شبکه های سلولی آنها را بعنوان شاخص زیستی مطرح نمود. [8, 9] فلوچارت و شمای کلی مطالعات متابولیکی در شکل 1 آورده شده است.

مطالعات متابولومیکی در بررسی بیماری ها به کمک ^{1}H-NMR

با یک جستجو در پایگاه داده متابولوم انسانی(hmdb.ca) که مرتبا بروز رسانی می شود مشخص می گردد که بیماری های وسیعی توسط تکنیک NMR مورد مطالعه قرار گرفته است بطوریکه 659 بیماری تا کنون [2019] قابل بررسی به کمک متابولومیک می باشد. بیماری هایی همچون سرطان و انواع آن [10-14] [15, 16]بیماری های قلبی عروقی[17-22]، دیابت [23, 24]و

چاقی[25] جزء پر استنادترین بیماری های بررسی شده با این تکنیک می باشند. مطالعات اپیدمیولوژیکی در مقیاس وسیع متابولومیک بر پایه NMR جزو داغ ترین موضوعات این حوزه می باشد که هر روزه مطالب جدیدی در این خصوص منتشر می شود. این حوزه نشانگرهای زیستی جدیدی را برای بیماریهای مختلف کشف کرده است و در درک اتیولوژیک بیماری ها نقش بسزایی داشته است و توانایی پیش بینی خطرات بیماری و اثرات دارو را نشان داده است. از جمله این مطالعات وسیع می توان به مطالعات در خصوص بیماری سیلیاک اشاره ای کرد. سیلیاک بعنوان بیماری چند عاملی متاثر از محیط و ژنتیک که پاسخ ایمنی فرد را تحت تاثیر منفی قرار داده و به عنوان بیماری خودایمنی محسوب شده و با برهم زدن متابولیسم انرژی و اجسام کتونی در بدن فرد باعث عدم تحمل فرد به محصولات شامل گلوتن می شود. مطالعاتی بر روی نمونه سرم، ادرار توسط تیم های تحقیقاتی مستقل بر روی افراد درگیر بر روی این بیماری انجام شده است[26و 27و 28]. یکی از یافته های جالب و قابل این بود که افرادی که بالقوه سلیاک دارند(سیلیاک خاموش) ، یعنی کسانی که تست آنتی بادی ضد ترانس گلوتامیناز بافتی آنها مثبت بوده اما بدون علائم و آسیب های جزئی روده ای بودند در مطالعات متابولومیکی و نتایج برگرفته از افراد مورد مطالعه به عنوان افراد مبتلابه سیلیاک طبقه بندی شدند و این نشان دهنده این واقعیت می باشد که متابوتیپ بیماران سیلیاکی

پیش از تظاهرات بالینی می باشد و اهمیت این حوزه را چندین برابر می کند .



شکل 1: شمای کلی از روند یک مطالعه متابولومیکی

همانطور که اشاره شد سرطان یکی از وسیع ترین حوزه مطالعات متابولومیکی بوده است. بیشتر تحقیقات نشان می دهند که سلول‌های سرطانی به مقدار بیشتری از انرژی برای رشد و بیوسنتز ترکیبات ضروری خود نیاز دارند که عمدتاً از طریق افزایش گلوکز و گلوتامین، تولید لاکتات و بیوسنتز لیپیدها صورت می‌گیرد[29] . برای تولید انرژی حتی در حضور اکسیژن، سلول‌های توموری فرآیندی بنام گلیکولیز هوازی (که تحت عنوان اثر "واربرگ" نیز شناخته می‌شود) را انجام می‌دهند که منجر به تولید لاکتات، ATP و NADPH در سیتوزول شده که برای رشد سلول‌های سرطانی لازم می‌باشند [30] .

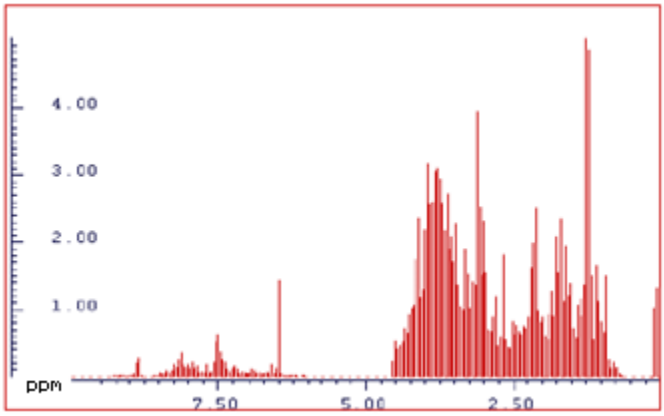
مطالعات متابولومیکی روی بافت دست نخورده سرطان با کمک طیف سنجی جامد با زاویه جادویی نتایج خیلی جالبی را نشان می دهد. مطالعه ای روی بافت سرطانی پانکراس و مقایسه آن با بافت سالم انجام شده و نشان می دهد که اتانول آمین مارکر واحد و شاخص اختصاصی بیماری معرفی شده است[31].

برای تشخیص زود هنگام بیماریهای قلبی عروقی مطالعات متابولیک گزینه ای عالی به نظر می رسد . به عنوان مثال ، نارسایی قلبی (HF) به عنوان سندرم پیش رونده، پیچیده و مزمن بوده که در آن عضله قلب قادر به انجام پمپ مقدار کافی خون و اکسیژن برای رفع نیاز بدن نیست و متأسفانه نارسایی قلبی در مراحل اولیه بدون علامت است. مراحلی که مداخله های پزشکی می تواند موثر باشد. بنابراین ، ارزیابی زودرس این بیماری از اهمیت بسیاری برخوردار است. به همین منظور مطالعه های متعددی با رویکرد متابولومیک انجام شده که از بین آنها به یک مورد اشاره می شود. تنوری و همکاران در سال 2013 بر روی 185 نمونه سرم افراد مبتلا به نارسایی قلبی و 111 نفر افراد سالم به کمک تکنیک NMRمطالعه ای انجام دادند[19] نتایج یافته ها با حد اختصاصیت بسیار خوبی توانست بین دو گروه مورد مطالعه افتراق قائل شود یا بعبارتی فرد با یک آزمایش ساده خون می تواند از سلامت قلب خود اطمینان حاصل نماید .

در کنار مطالعات متابولومیک بر روی بیماری ها، این حوزه تحقیقاتی در سایر زمینه ها همچون داروسازی[32]، صنعت غذا [33, 34] نیز گامهای بزرگی برداشته است که در این مقاله مجال پرداخت به آنها نیست.

اهمیت استفاده از کمومتریکس و آنالیزهای چند متغیره در تحقیقات متابولومیکس بر پایهNMR

یکی از مراحل مهم مطالعات متابولومیکی کمومتریکس می باشد. کمومتریکس یک شاخه از پردازش اطلاعات شیمیایی است که از آمار و تکنیک های تشخیص الگو برای طبقه بندی و یا تجزیه و تحلیل داده های طیفی یا ساختاری از مواد شیمیایی استفاده می‌کند. علت استفاده از کمومتریکس در مطالعات متابولیکی این است که تفسیر طیف مایعات زیستی و سایر نمونه های زیستی به گونه عادی غیرممکن است یا بعبارتی شناسایی ترکیبات دقیق مایعات زیستی مقدور نیست. برای حل مسئله و شناسایی ترکیبها، از روش¬های کمومتریکس بهره میگیرند. به طوری که از پیکهای هم تراز که ممکن است متعلق به یک ترکیب یکسان باشد استفاده می¬کنند. طیف NMR نمونه زیستی به مناطق یا سطل¬ها ی کوچک به نام بین تقسیم می شود تا اینکه ویژگی¬های خاص، پیک¬ها یا گروهی از پیک¬ها در یک طیف چند گانه نقشه برداری شود و در میان بسیاری از طیف¬های مختلف مقایسه شود. [35] شکل 2 یک طیف برگرفته از برنامه پرومتاب می باشد[36].



شکل 2: بین بندی طیف NMR به کمک کمومتریکس

شدت پیک (یا مساحت کل زیر منحنی) در هر سطل جدول بندی می شود و با استفاده از تجزیه و تحلیل آماری چند متغیره مورد تجزیه و تحلیل قرار می گیرد. در روش¬های کمومتریکس، بسیار مهم است که تعداد زیادی از طیف¬های مختلف از نمونه¬های مختلف جمع آوری شده و به طوریکسان پردازش شوند. هم چنین اطمینان از یکنواختی نمونه نیز حائز اهمیت است. استفاده از تعداد زیاد طیفها، در ترکیب کمک میکند تا مشکلات آماری ناشی از ناهمواری طیف و یا هم تراز کردن، اعوجاج خطوط، تفاوت عرض خطوط و یا رانش جابجایی شیمیایی طبیعی را کاهش داد. نکته حائز اهمیت در کمومتریکس این است که هدف کمومتریکس بر روی شناسایی و اندازه گیری متابولیت¬ها روی تک تک پیکها متمرکز نیست، بلکه شناسایی متابولیت بر اساس روند کلی در الگوهای پیک طیفها استوار است. [37] اگر پیکهای طیف ^{1}HNMR یک ترکیب به خوبی از هم جدا باشند و نسبت سیگنال به نویز قابل قبولی داشته باشند. شدت¬پیک ها به صورت خطی با غلظت ماده متناسب است. برای تعیین غلظت مطلق ، باید یک ماده با غلظت دقیق

و پیک¬های مشخص که به استاندارد مشهور می باشد به نمونه مورد آنالیز اضافه شود.از جمله استانداردهای مورد استفاده در ^{1}HNMR برای مایعات زیستی می توان به DSS، TSP و ... اشاره کرد[38].

یکی از دلایلی که می‌توان با NMR مطالعات به صورت کمّی انجام داد، این است که اکثر متابولیت‌ها مانند اثر انگشت هستند و تغییرات شیمیایی خاص و منحصر یه فردی دارند به طوری که جابجایی شیمیایی، ثابت کوپلاژ و مساحت زیر پیک هر ماده مختص خودش هست ، زیرا بعید است که دو ترکیب مختلف از لحاظ تعداد پیکهاو جابجایی شیمیایی و کوپلینگ چرخشی و نیز شدت پیکها کاملا یکسان باشند. امروزه با استفاده از طیف سنجی رزونانس مغناطیسی هسته در متابولومیکس قادر به شناسایی حداکثر 200 ترکیب به صورت هم زمان در نمونه های زیستی هستیم [4, 39, 40] .

ازدحام پیکهای حاصل از نمونه های زیستی و همپوشانی پیکها موجب ایجاد مشکلاتی در تفسیر نتایج حاصله می شودکه برای این موضوع راه حل های گوناگونی وجود دارد. از آن جمله می توان به تکنیک های دو بعدی طیف سنجی رزونانس مغناطیس هسته اشاره کرد که نقش بسزایی در پیشرفت متابولومیک ایفا می کنند. از جمله این تکنیکها می توان به COSY, HSQC, TOCSY, HMBC و NOESYاشاره کرد[41]. خلاصه عملکرد هر کدام از این تکنیکها در جدول 1 آورده شده است.

جدول1: تکنیکهای دوبعدی مورد استفاده در مطالعات متابولومیک

نام تکنیک	عملکرد و ویژگی
COSY	ارتباط بین دو هسته مشابه و اندازه گیری ثابت کوپلاژ حاصل از آن -ساده ترین تکنیک دو بعدی -ثابت کوپلاژ ($^{3}J_{HH}$) قابل اندازه گیری است.
TOCSY	علاوه بر ثابت کوپلاژ ($^{3}J_{HH}$) سایر کوپلاژها چهار و بیش از چهار پیوند را اندازه می گیرد.
HSQC	ارتباط کوپلاژی دو هسته نامشابه مانند کربن و هیدروژن (^{1}J) را به هم ارتباط می دهد. فاصله بین هسته ها یک پیوند می باشد.(J=120-215 Hz)
HMBC	جابجایی شیمیایی دو هسته نامشابه مانند کربن و هیدروژن ($^{2}J,^{3}J$) را به هم ارتباط می دهد.
NOESY	برای تعیین اینکه کدام سیگنالها از کدام پروتونها می باشند که از طریق فضایی به هم نزدیک می باشند حتی اگر با پیوند به هم ارتباط نداشته باشند. ارتباط فضایی اتمهای هیدروژن را از طریق آسایش اسپین-شبکه نشان می دهد. حالت کنفورماسیون و صورت بندی های مختلف ترکیبات را نشان می دهد.

خروجی طیفها یک سری اعداد در قالب ماتریس می باشند که بعنوان ورودی آنالیزهای چند متغیره می باشند. آمار چندمتغیره به بررسی توزیع‌های احتمال چندمتغیره می‌پردازد تا آنهایی که برای مدل‌سازی داده و استنباط آماری مناسب هستند را تشخیص دهد. این آنالیزها به دو نوع اصلی آنالیزهای نظارتی و غیرنظارتی تقسیم می‌شوند. در آنالیز غیرنظارتی، اطلاعات داده‌ها در ساخت مدل وارد نمی‌شوند که از نمونه‌های آن، آنالیز مؤلفه اصلی (PCA) را می‌توان نام برد. در آنالیزهای نظارتی، اطلاعات گروه‌بندی داده‌ها در مدل وارد شده و بر اساس بیشترین واریانس، داده‌ها از هم تفکیک می‌شوند. از مثال‌های روش نظارتی، آنالیز OPLS و مدل رندوم فارست (RF) را می‌توان نام برد.

پایگاه داده های رایج و نرم افزارهای متابولومیکس بر اساسNMR

در این مقاله جهت شناسایی متابولیت های موجود در نمونه¬های زیستی به معرفی مهمترین منابع دسترسی آزاد و تجاری بر پایه¬ی داده¬های NMR پرداخت می شود. برای تفسیر نتایجNMR ، نیاز به استفاده از نرم افزار پیچیده و پایگاه داده¬های اختصاصی می¬باشد [42]و [39].

پایگاه داده های BMRB ، HMDB و MQMCD جزء پایگاه¬های پراستناد در این حوزه به شمار می¬روند که لینک¬های مفید با سایر پایگاه داده¬ها را نیز دارند. از ویژگی¬های ارائه شده توسط این پایگاه داده¬ها می توان به جستجوی پیشرفته متابولیت¬ها از طریق ساختارهای SMILES، InCHIیا ترسیم ساختارها با اپلت¬های وب جاوا اشاره کرد. متابوهانتر پایگاه داده ی دیگری است که مبتنی بر وب می¬باشد و برای شناسایی متابولیت¬ها از هردو پایگاه داده HMDB و MQMCD با آپلود لیست پیک¬ها یا کل طیف¬ها استفاده می کند.

MQMCD با امکان جاوا اپلت شرایطی را فراهم می¬کند که امکان دسترسی و لینک به ساختار ترکیب به صورت Jmol و طیف ^{1}H NMR و ^{13}CNMR ترکیبات را داراست. با این ابزار محقق می¬تواند پیکی را در طیف NMR انتخاب کند و اتم¬های مسئول آن پیک در ساختار Jmol به صورت برجسته نمایان شود و یا برعکس با انتخاب اتم خاص پیک مربوط به آن در طیف را مشخص کند. پایگاهMQMCD در هنگام استفاده از دستگاه با قدرت بالا و طیف NMR چند بعدی نتایج عالی را ارائه می¬دهد.[1]

BMRB, HMDB, MQMCDبه کاربر اجازه می¬دهند که لیست پیک¬ها را از داده¬های تجربی آپلود کنند. نتایج به صورت جدولی با ضریبی که بیانگر میزان شباهت با موارد مثبت هست ارائه می¬شود.

اخیرا دو منبع که روی مایع¬های زیستی ویژه¬ای متمرکز هستند به وجود آمده¬اند و از HMDB نشات گرفته و توسعه پیدا کرده¬اند. متابولوم مایع مغزی نخاعی انسانی (http://www.csfmetabolome.ca)[37] و متابولوم سرم انسانی، (http://www.serummetabolome.ca)[43] حاوی اطلاعات با ارزش و جامع از تمام متابولیت¬های شناسایی شده در این منابع زیستی هستند. دو پایگاه داده دیگر که به روش مشابه طراحی شده¬اند، پایگاه داده متابولوم مخمر هستند (http://www.ymdb.ca) [25] و پایگاه داده متابولوم E.coli (http://www.ecmdb.ca) [44] می¬باشند. تمام اطلاعات استاندارد NMR موجود در این پایگاه داده¬ها از HMDB یا BMRB به¬دست آمده است. از مشکلات این دو منبع اخیر این است که فقدان داده¬های تجربی تایید کننده اطلاعات استخراج شده از متون می باشد. در سالهای اخیر پایگاه داده MetaboLights [45] (به عنوان منبع جامع و کامل نیز معرفی شده است .

برخی از بسته های نرم افزاری تجاری مانند Chenomx NMR Suiteو KnowItAll ، MNova، MetaboAnalystو TopSpin می باشند که دارای کتابخانه های استاندارد طیفها و پایگاه های داده اختصاصی می باشند. پکیج نرم افزار rNMR برای شناسایی اتوماتیک متابولیتها از داده های TOCSY و HSQC در دسترس می¬باشد. برای دسترسی کامل به لیست پایگاه داده ها و نرم افزارهای موجود می توان به مقالات مروری که در این زمینه جمع آوری شده اند اشاره کرد[42].

پیشرفت های اخیر در دستگاهوریNMR

یکی از ضعف های تکنیکNMR حساسیت پایین این دستگاه می باشد. تمام تکنیک¬ها و روشهایی که حساسیت دستگاه را افزایش می¬دهند از اهمیت بالایی برخوردار هستند. در 2017 مارکلی در مورد آینده تکنیک NMR در متابولومیکس به بررسی راهکارهایی می پردازد که حساسیت پایین این تکنیک را بهبود می دهد. به همین منظور امروزه از دستگاه‌هایی با قدرت میدان مغناطیسی بالا (600 مگاهرتز تا 1/2 گیگاهرتز) استفاده می‌شود. در سال 2017 برای اولین بار از دستگاه 1/2 گیگاهرتز استفاده شد. پرابهای سوپر کنداکتور دمای بالا[1] می تواندسیگنالهای ضعیف را تقویت کنند. پروب‌های 1/5 میلی متری ابررسانای دمای بالا[2]برای کربن سیزده امکان مطالعات ترکیبات طبیعی را بسیار تسهیل نموده اند. این پیشرفت با پروب‌های دو کانال هیدروژن- کربن بر اساس doubletuned بهینه و دنبال شده است. کریوپروبها نیز در این راستا سهم بسزایی داشته‌اند. با کوپل کردن NMR به طیف سنج جرمی نیز می توان تحول شگفت انگیزی را مشاهده نمود [46].

نتیجه گیری کلی:

مطالعات در تحقیقات سال¬های اخیر نشان می¬دهد که متابولومیکس بر پایه NMR نقش مهمی در مطالعات نمونه¬های پیچیده زیستی، شبکه متابولیکی و اندرکنش متابولیت¬ها با بیوماکرومولکول¬ها دارد NMR .فرصت-های منحصر به فردی برای درک سیستم بیولوژی، کشف شاخص های زیستی و اهداف بالقوه درمان ارائه می-دهد و یافته¬های آزمایشگاهی را به کاربرد در بالین نزدیک می¬کند. امکان کمّی کار کردن از مزایای دیگر این تکنیک می¬باشد. در کنار توسعه روش¬های جدید و کارآمدتر، متابولومیک بر پایه NMR نیازمند توسعه پایگاه داده¬های استاندارد، بزرگ و یکپارچه داده¬های NMR بر روی مولکول¬های کوچک و همچنین وجود آرشیوهایی که نشان دهنده اثر انگشت متابولیک NMR از مایعات و بافت¬های زیستی استاندارد، عصاره بافت-های انسانی و ... می¬باشد. برای جبران معایب تکنیکNMR ، پیشرفت¬های چمشگیری محقق شده که به بخشی از آن پرداخت شده است. همچون توسعه دستگاه¬های با قدرت مغناطیسی بالا، توسعه پروب با کوئل گیرنده¬های چندگانه، کوپل دستگاه با طیف سنج جرمی. از اهداف بلند مدت متابولومیک بر پایه NMR این است که با پیشرفتهای اخیر در این حوزه، امکان مطالعه متابولومیک به صورت in vivo مقدور می گردد.

تشکر و قدردانی :

این مقاله یک مروری است از مجموعه مطالعات متابولومیکی بر پایه NMR و نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد .

منابع

1. Damadian R, Zaner K, Hor D, DiMaio T, Minkoff L, Goldsmith M. Nuclear magnetic resonance as a new tool in cancer research: human tumors by NMR. Ann N Y Acad Sci 1973; 222:1048-76.
2. Nobakht M. Gh BF, Aliannejad R, Rezaei-Tavirani M, Taheri S, Oskouie AA. The metabolomics of airway diseases, including COPD, asthma and cystic fibrosis. Biomarkers 2015; 20:5-16.
3. Beckonert O, Keun HC, Ebbels TM, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. Nat Protoc 2007; 2:2692.
4. Weljie AM, Newton J, Mercier P, Carlson E, Slupsky CM. Targeted profiling: quantitative analysis of 1H NMR metabolomics data. Anal Chem 2006; 78:4430-42.
5. Smith RL, Oldfield E. Dynamic structure of membranes by deuterium NMR. Science 1984; 225:280-88.
6. Santone C, Dinallo V, Paci M, D'Ottavio S, Barbato G, Bernardini S. Saliva metabolomics by NMR for the evaluation of sport performance. J Pharm Biomed Anal 2014; 88:441-46.

[1] high temperature superconducting(HTS) resonators

[2] high temperature superconducting NMR probe

7. Sandlers Y. The future perspective: metabolomics in laboratory medicine for inborn errors of metabolism. Transl Res 2017;189:65-75 .

8. Gebregiworgis T, Powers R. Application of NMR metabolomics to search for human disease biomarkers. Comb Chem High Throughput Screen 2012; 15:595-610.

9. Taherkhani A, Kalantari S, Arefi Oskouie A, Nafar M, Taghizadeh M, Tabar K. Network analysis of membranous glomerulonephritis based on metabolomics data. Mol Med Rep 2018 Nov; 18:4197-4212.

10. Bernacchioni C, Ghini V, Cencetti F, Japtok L, Donati C, Bruni P, et al. NMR metabolomics highlights sphingosine kinase-1 as a new molecular switch in the orchestration of aberrant metabolic phenotype in cancer cells. Mol Oncol 2017; 11:517-533.

11. Claudino WM, Quattrone A, Biganzoli L, Pestrin M, Bertini I, Di Leo A. Metabolomics: available results, current research projects in breast cancer, and future applications. J Clin Oncol 2007;25:2840-46.

12. Spratlin JL, Serkova NJ, Eckhardt SG. Clinical applications of metabolomics in oncology: a review. Clin Cancer Res 2009; 15:431-40.

13. Rocha CM, Carrola J, Barros AS, Gil AM, Goodfellow BJ, Carreira IM, et al. Metabolic signatures of lung cancer in biofluids: NMR-based metabonomics of blood plasma. J Proteome Res 2011; 10:4314-24.

14. Hasim A, Ma H, Mamtimin B, Abudula A, Niyaz M, Zhang L-w, et al. Revealing the metabonomic variation of EC using 1 H-NMR spectroscopy and its association with the clinicopathological characteristics. Mol Biol Rep 2012; 39:8955-64.

15. Khanim FL, Hayden RE, Birtwistle J, Lodi A, Tiziani S, Davies NJ, et al. Combined bezafibrate and medroxyprogesterone acetate: potential novel therapy for acute myeloid leukaemia. PLoS One 2009; 4:e8147.

16. Yang Y, Liu Y, Zheng L, Zhang Q, Gu Q, Wang L, et al. 1H NMR based serum metabolic profiles associated with pathological progression of pancreatic islet β cell tumor in Rip1-Tag2 Mice. Int J Biol Sci 2015; 11:595

17. Saccenti E, Suarez-Diez M, Luchinat C, Santucci C, Tenori L. Probabilistic networks of blood metabolites in healthy subjects as indicators of latent cardiovascular risk. J Proteome Res 2014; 14:1101-11.

18. Deidda M, Piras C, Dessalvi CC, Locci E, Barberini L, Torri F, et al. Metabolomic approach to profile functional and metabolic changes in heart failure. J Transl Med 2015; 13:297.

19. Tenori L, Hu X, Pantaleo P, Alterini B, Castelli G, Olivotto I, et al. Metabolomic fingerprint of heart failure in humans: a nuclear magnetic resonance spectroscopy analysis. Int J Cardiol 2013; 168:e113-e15.

20. Brindle JT, Nicholson JK, Schofield PM, Grainger DJ, Holmes E. Application of chemometrics to 1 H NMR spectroscopic data to investigate a relationship between human serum metabolic profiles and hypertension. Analyst 2003; 128:32-36.

21. Brindle JT, Antti H, Holmes E, Tranter G, Nicholson JK, Bethell HW, et al. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using 1 H-NMR-based metabonomics. Nat Med 2002; 8:1439.

22. Bernini P, Bertini I, Luchinat C, Tenori L, Tognaccini A. The cardiovascular risk of healthy individuals studied by NMR metabonomics of plasma samples. J Proteome Res2011; 10:4983-92.

23. Mäkinen V-P, Tynkkynen T, Soininen P, Peltola T, Kangas AJ, Forsblom C, et al. Metabolic diversity of progressive kidney disease in 325 patients with type 1 diabetes (the FinnDiane Study). J Proteome Res 2012; 11:1782-90.

24. Liu X, Gao J, Chen J, Wang Z, Shi Q, Man H, et al. Identification of metabolic biomarkers in patients with type 2 diabetic coronary heart diseases based on metabolomic approach. Sci Rep 2016; 6:30785.

25. Gralka E, Luchinat C, Tenori L, Ernst B, Thurnheer M, Schultes B. Metabolomic fingerprint of severe obesity is dynamically

The food metabolome: a window over dietary exposure. Am J Clin Nutr 2014; 99:1286-308.
35. Madsen R, Lundstedt T, Trygg J. Chemometrics in metabolomics—a review in human disease diagnosis. Anal Chim Acta 2010; 659:23-33.
36. Viant MR. Improved methods for the acquisition and interpretation of NMR metabolomic data. Biochem Biophys Res Commun 2003; 310:943-48.
37. Wishart DS, Lewis MJ, Morrissey JA, Flegel MD, Jeroncic K, Xiong Y, et al. The human cerebrospinal fluid metabolome. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2008;871:164-73.
38. Morrison N, Bearden D, Bundy JG, Collette T, Currie F, Davey MP, et al. Standard reporting requirements for biological samples in metabolomics experiments: environmental context. Metabolomics 2007; 3:203-10.
39. Serkova NJ, Davis DM, Steiner J, Agarwal R. Quantitative NMR-Based Metabolomics on Tissue Biomarkers and Its Translation into In Vivo Magnetic Resonance Spectroscopy. High-Throughput Metabolomics: Methods Mol Biol 2019; 1978:369-387.
40. Serkova NJ, Niemann CU. Pattern recognition and biomarker validation using quantitative ^{1}H-NMR-based metabolomics. Expert Rev Mol Diagn 2006; 6:717-31.
41. Guennec AL, Giraudeau P, Caldarelli S. Evaluation of fast 2D NMR for metabolomics. Anal Chem 2014; 86:5946-54.
42. Ellinger JJ, Chylla RA, Ulrich EL, Markley JL. Databases and software for NMR-based metabolomics. Curr Metabolomics 2013; 1:28-40.
43. Psychogios N, Hau DD, Peng J, Guo AC, Mandal R, Bouatra S, et al. The human serum metabolome. PloS One 2011; 6:e16957.
44. Guo AC, Jewison T, Wilson M, Liu Y, Knox C, Djoumbou Y, et al. ECMDB: the E. coli Metabolome Database. Nucleic Acids Res 2012; 41:D625-D30.
45. Haug K, Salek RM, Conesa P, Hastings J, de Matos P, Rijnbeek M, et al. MetaboLights—an open-access general-purpose repository for affected by bariatric surgery in a procedure-dependent manner. Am J Clin Nutr 2015; 102:1313-22?
26. Bertini I, Cacciatore S, Jensen BV, Schou JV, Johansen JS, Kruhøffer M, et al. Metabolomic NMR fingerprinting to identify and predict survival of patients with metastatic colorectal cancer. Cancer Res 2012; 72:356-64.
27. Fathi F, Ektefa F, Oskouie AA, Rostami K, Rezaei-Tavirani M, Alizadeh AHM, et al. NMR based metabonomics study on celiac disease in the blood serum. Gastroenterol Hepatol Bed Bench 2013; 6:190.
28. Fathi F, Majari-Kasmaee L, Mani-Varnosfaderani A, Kyani A, Rostami-Nejad M, Sohrabzadeh K, et al. 1H NMR based metabolic profiling in Crohn's disease by random forest methodology. Magn Reson Chem 2014; 52:370-6.
29. Farrokhi Yekta R, Rezaie Tavirani M, Arefi Oskouie A, Mohajeri-Tehrani M, Soroush A. The metabolomics and lipidomics window into thyroid cancer research. Biomarkers 2017; 22:595-603.
30. Yekta RF, Tavirani MR, Oskouie AA, Mohajeri-Tehrani MR, Soroush AR, Baghban AA. Serum-based metabolic alterations in patients with papillary thyroid carcinoma unveiled by non-targeted ^{1}H-NMR metabolomics approach. Iran J Basic Med Sci. 2018; 21(11):1140.
31. Battini S, Faitot F, Imperiale A, Cicek A, Heimburger C, Averous G, et al. Metabolomics approaches in pancreatic adenocarcinoma: tumor metabolism profiling predicts clinical outcome of patients. BMC Med 2017; 15:56.
32. Kaddurah-Daouk R, Weinshilboum RM, Network PR. Pharmacometabolomics: implications for clinical pharmacology and systems pharmacology. Clin Pharmacol Ther 2014; 95:154-67.
33. Ralli E, Amargianitaki M, Manolopoulou E, Misiak M, Markakis G, Tachtalidou S, et al. NMR Spectroscopy Protocols for Food Metabolomics Applications. Methods Mol Biol 2018; 1738:203-211.
34. Scalbert A, Brennan L, Manach C, Andres-Lacueva C, Dragsted LO, Draper J, et al.

metabolomics studies and associated meta-data. Nucleic Acids Res 2012; 41:D781-D86.
46. Markley JL, Brüschweiler R, Edison AS, Eghbalnia HR, Powers R, Raftery D, et al. The future of NMR-based metabolomics. Curr Opin Biotechnol 2017; 43:34-40.