



**Metabolomik Çalışmalarda Yazılım ve Veri Bankası Desteği: LC-MS Verilerinin Değerlendirilmesinde XCMS Kullanımı**  
Software and Database Usage on Metabolomic Studies:  
Using XCMS on LC-MS Data Analysis

Mustafa Çelebier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hacettepe Üniv. Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya ABD, Ankara, Turkey

**ABSTRACT**

Metabolome is the complete set of small-molecule metabolites to be found in a cell or a single organism. Metabolomics is the scientific study to determine and identify the chemicals in metabolome with advanced analytical techniques. Nowadays, the elucidation of the molecular mechanism of any disease with genome analysis and proteome analysis is not sufficient. Instead of these, a holistic assessment including metabolomic studies provides rational and accurate results. Metabolite levels in an organism are associated with the cellular functions. Thus, determination of the metabolite amounts identifies the phenotype of a cell or tissue related with the genetic and some other variations. Even though, the analysis of metabolites for medical diagnosis and therapy have been performed for a long time, the studies to improve the analysis methods for metabolite profiling are recently increased. The application of metabolomics includes the identification of biomarkers, enzyme-substrate interactions, drug-activity studies, metabolic pathway analysis and some other studies related with the system biology. The preprocessing and computing of the data obtained from LC-MS, GC-MS, CE-MS and NMR for metabolite profiling are helpful for preventing from time consuming manual data analysis processes and possible random errors on profiling period. In addition, such preprocesses allow us to identify low amount of metabolites which are not possible to be analyzed by manual processing. Therefore, the usage of software and databases for this purpose could not be ignored. In this study, it is briefly presented the software and database used on metabolomics and it is evaluated the capability of these software on metabolite profiling. Particularly, the performance of one of the most popular software called XCMS on the evaluation of LC-MS results for metabolomics was overviewed. In the



near future, metabolomics with software and database support is estimated to be a routine process for medical diagnosis, treatment and identification of the risk of contracting diseases.

**Key words:** Metabolomics, metabolite profiling, metabolite databases.

## ÖZET

Bir hücre veya canlıdaki metabolizmanın tümüne metabolom denilmektedir. Metabolomik, metabolomdaki küçük moleküllü metabolitlerin yüksek hassasiyette analitik teknikler kullanılarak saptanması, tanımlanması ve miktarının belirlenmesidir. Günümüzde herhangi bir hastalığın moleküler mekanizmasının aydınlatılmasında yalnızca genom analizinin ya da yalnızca proteom analizinin yeterli olmadığı, bunun yerine metabolomik çalışmaları da içine alan bütünsel bir değerlendirmenin akılcı olduğu ve kesin sonuçlar verdiği bilinmektedir. Metabolitlerin düzeyleri hücre fonksiyonların işleyiş bilgilerini yansıtır ve bunun sonucu olarak genetik veya çevresel değişikliklere bağlı hücrenin veya dokunun fenotipini tanımlar. Tıbbi teşhis ve tedavi amaçlı metabolit analizleri uzun zamandır uygulanmasına rağmen, çok sayıda metabolitin analiz edilmesi ve profillemesi amacıyla kullanılacak metodların geliştirilmesi için yapılan çalışmalar yeni yeni artmaktadır. Metabolomik çalışmaları içeren uygulamalar; biyobelirteç tespitinde, enzim substrat ilişkisi değerlendirmede, ilaç aktivite çalışmalarında, metabolik yolak analizlerinde ve daha birçok amaca hizmet eden çalışmalarda son dönemlerde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Metabolit profillemeye çalışmaları için LC-MS, GC-MS, CE-MS ve NMR tekniklerinden elde edilen verinin bilgisayar destekli bir ön işlemden geçirilmesi çalışma sürecinde harcanacak zaman kaybını, yapılabilecek olası hataları ve var oldukları halde gözden kaçabilecek metabolitlerin tespit edilememesi sorunlarını en aza indirmektedir. Bu yüzden, yapılan çalışmalarda onlarca hatta yüzlerce metabolitin ayrılması ve tanımlanmasında yazılım ve veribankası desteği kaçınılmazdır. Bu çalışmada; metabolit analizlerinde halihazırda kullanılmakta olan yazılım ve veribankaları kullanım amaçları da belirtilerek özetlenmiş ve LC-MS verilerinin değerlendirilmesinde son yıllarda öne çıkan açık kaynak kodlu XCMS yazılımının kullanımı ve performansı ile ilgili yapılmış olan çalışmalar incelenmiştir. Gün geçtikçe yazılım ve veribankası desteğini de arkasına alarak rutin birer uygulama haline dönüşmesi muhtemel metabolomik uygulamalar ile hastalıklara yakalanma riskinin belirlenmesi ve hastalıkların teşhis ve tedavisinde ulaşılabilecek yeni ufuklar değerlendirilmeye çalışılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Metabolomik, metabolit profillemeye, metabolit veribankası.

## Giriş

1990'larda başlayan İnsan Genom Projesi (Human Genome Project) 2003 yılında tamamlanmış olsa da İnsan Metabolom Projesi (HMP) 2005'de başlayan ve halen devam eden

bir projedir. Bilişim teknolojisindeki hızlı ilerlemeye paralel olarak metabolomik çalışmalarda yazılım ve veribankası desteği artık kaçınılmaz bir hal almıştır. Bu derlemede, metabolomik çalışmalarda kullanılacak yazılım ve veribankaları özetlenmiştir. Tıbbi teşhis, tedavi süreçlerinin incelenmesi ve hastalıkların moleküler mekanizmalarının aydınlatılması amacıyla gerçekleştirilen metabolit profillemeye çalışmaları için sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (LC-MS) verilerinin değerlendirilmesinde kullanılan ve giderek kullanımı yaygınlaşan XCMS yazılımının özellikleri incelenerek kullanımı ile ilgili daha önceden yapılmış çalışmalar gözden geçirilmiştir.

Tıbbi teşhis ve tedavi amaçlı metabolit analizleri uzun zamandır uygulanmasına rağmen, fonksiyonel metabolomik kapsamında çok sayıda hücre içi metabolitin analiz edilmesi ve profillenmesi amacıyla kullanılacak metodların geliştirilmesi için yapılan çalışmalar yeni yeni artmaktadır ve metabolit profillemeye çalışmaları her geçen gün gelişen yazılım ve veribankaları sayesinde artık daha da kolay bir hal almaktadır.

## Metabolitler ve Metabolomik Çalışmalar

İnsan genom projesindeki temel amaç, insan DNA' sındaki genleri tanımlayarak genetik hastalıklara yatkınlığı belirlemek, ilgili genlerin yapılarını aydınlatmak ve böylece tanı ve tedaviyi olanaklı kılmak idi. Bu projenin sonucunda fiziksel özellikleri belirleyen öğelerin yanı sıra çeşitli hastalıkların da genler aracılığıyla ortaya çıktığı anlaşılmıştır<sup>1</sup>. Ancak ortada olan bir gerçek şudur ki; bir gen farklı biyolojik işlevlere sahip birden fazla proteini kodlamakta ve bu proteinler gen işlevinden bağımsız olarak çevrim sonrası değişimlere uğramaktadırlar. Dolayısıyla sadece genomik çalışmalar hastalıkların önlenmesinde, teşhisinde ve tedavisinde yeterli olmamaktadır. Metabolitlerin ve proteinlerin oluşturduğu karmaşık ağın taşıdığı bilgi genomik bilgiden fazladır ve bu bilgi sadece genomik bilgiden yola çıkılarak aydınlatılamaz<sup>2-4</sup>. Günümüzde herhangi bir hastalığın moleküler mekanizmasının aydınlatılmasında yalnızca genom analizinin ya da yalnızca proteom analizinin yeterli olmadığı, bunun yerine metabolomik çalışmaları da içine alan bütünsel bir değerlendirmenin akılcı sonuçlar verdiği bilinmektedir<sup>5-7</sup>.

Biyokimyasal reaksiyonların ara ürünleri olan metabolitler, canlı hücre içerisinde gerçekleşen çok sayıda farklı yolların bağlanmasında rol alan veya bu metabolik yolların işleyişi sırasında ortaya çıkan önemli kimyasal yapılardır. Küçük moleküller, peptitler, oligonükleotidler, şekerler, nükleozidler, organik asitler, ketonlar, aldehitler, aminler, amino

asitler, lipitler, steroidler, alkaloidler ve ilaçlar, birer metabolittir ve molekül ağırlıkları 1.500 Da'un altındadır<sup>8</sup>. Metabolomik ise belirli bir zaman diliminde dokularda, hücrelerde ve fizyolojik sıvılarda ve diğer hücre bileşenlerinde görevi bulunan metabolitlerin yüksek hassasiyette analitik teknikler kullanılarak saptanması, tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesidir<sup>9</sup>.

Fenotip, genetik ve çevresel etkenlerin oluşturduğu özelliklerin canlının dış görünüşündeki yansımadır. Fenotip çoğunlukla genler tarafından belirlenir ancak bazı koşullarda çevresel etkenler fenotipin genotipe yüzde yüz uymasını engelleyebilir. Metabolitlerin düzeyleri hücre fonksiyonlarının işleyiş bilgilerini yansıtır ve bunun sonucu olarak genetik veya çevresel değişikliklere bağlı hücrenin veya dokunun fenotipini tanımlar. Klinik fenotipi belirleyen bilgi hücrede oluşan metabolitlerde saklıdır. Transkriptom ve proteom gibi metabolom da hücre fonksiyonlara bağımlı olup her bir metabolitin seviyesi hücre, doku ya da organizmanın fizyolojik, gelişimsel ve patolojik durumuna göre değişkenlik gösterir. Ancak en önemli fark, mRNA ve proteinlerin aksine genler ile metabolitler arasında doğrudan bir bağlantının kurulmasının zor ya da imkansız olmasıdır<sup>10,11</sup>.

Metabolitler hastalıkların teşhisinde iyi birer biyobelirteç (biomarker) görevi görmektedirler. Biyobelirteçler vücut tarafından üretilen ve vücut sıvılarında tespit edilebilen spesifik bir süreci, durumu veya hastalığı belirten maddelerdir. Konuyla ilgili güncel bir örnek sağ kalan meme kanseri hastalarının kanlarından metabolit profilleme çalışmalarıdır. Bu çalışmalar sonucunda meme kanserli hastalarda kanserin tekrarlama riski ile ilişkili olduğu anlaşılan bazı metabolitler tespit edilmiştir<sup>12</sup>. Tespit edilen bu metabolitler hastalarda hastalığın ileride tekrar nüks etme eğilimi olup olmadığıyla ilgili bilgi edinilmesi açısından önem arz etmektedir.

Genom, transkriptom ve proteomların aydınlatılması, 4 farklı nükleotid (genom ve transkriptom) veya 22 aminoasitten (proteom) oluşan biyopolimerlerin hedeflendirilmiş kimyasal analizlerine dayanır. Bu bileşenler kimyasal olarak oldukça benzerdir ve rutin analitik yaklaşımlara olanak tanır<sup>8</sup>. Genomik, transkriptomik, ve proteomik analiz metodları hızlı bir gelişme döneminde olması ve halihazırda kullanılmasına rağmen metabolomun analizine imkan sağlayan tek ve temel bir yöntem bulunmamaktadır<sup>13-16</sup>. Metabolom, iyonik inorganik türlerden hidrofilik karbonhidratlara, uçucu alkoller ve ketonlara, amino ve amino olmayan organik asitlere, hidrofobik lipitlere ve karmaşık doğal ürünlere kadar son derece farklı kimyasal

bileşiklerden oluşur. Dolayısıyla metabolom için kimyasal yapılar ve özelliklerde büyük farklılıklar vardır. Bu karmaşık yapı metabolomun tamamının eş zamanlı (simultane) belirlenmesini ve profillenmesini hemen hemen imkansız hale getirmektedir<sup>17,18</sup>. Pek çok metabolit vücut içi sıvılarda düşük derişimlerde bulunur ve metabolit havuzları aracılığıyla çok yüksek akış ve devir göstermektedir<sup>9</sup>.

Metabolomik; kromatografi, moleküler spektroskopi ve kütle spektrometrisi gibi analitik tekniklerin çok değişkenli veri analiz yöntemleriyle birleştirilmesiyle iç içe işleyen biyoloji, kimya ve matematiğin iç içe geçtiği multi-disipliner bir bilimdir<sup>19,20</sup>.

## Metabolomik Uygulamalar

Metabolomik çalışmalar; metabolitlerin ayrımını sağlayan metabolit ayırım teknikleri (Gaz kromatografisi, sıvı kromatografisi ve kapiler elektroforez), metabolitlerin analizini sağlayan dedeksiyon teknikleri (Kütle spektroskopisi ve Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi), metabolitlerin teşhisini ve tanımlanmasını sağlayan yazılım-veribankası kullanımı ve istatistiksel değerlendirmeden oluşmaktadır<sup>10</sup>.

### Ayırım Teknikleri

#### Gaz Kromatografisi (GC)

Metabolomik çalışmalarda en sık kullanılan tekniklerden biridir. GC' nin kromatografik ayırım kapasitesi yüksektir ancak sadece uçucu metabolitlerin ayrımını sağlar ve dolayısıyla uçucu olmayan çoğu biyomolekül için türevlendirme gerekebilmektedir. Kütle spektrometresi ile kombine vaziyette kullanılır. En önemli avantajı GC ile kromatografik ayımlarda tekrarlanabilirliğin yüksek oluşudur ve bu sebeple GC-MS uygulamaları için halihazırda alıkonma zamanı indekslerini de içeren birçok veribankası bulunmaktadır<sup>15,21</sup>.

#### Sıvı Kromatografisi (LC)

Son yıllarda ön plana çıkan UPLC (Ultra performanslı sıvı kromatografisi) cihazları ile kromatografik ayırım geliştirilmiş olsa da GC ile kıyaslandığında daha düşük bir kromatografik ayırım kapasitesi vardır. Buna rağmen GC ile kıyaslandığında en büyük avantajı daha fazla sayıda metabolitin ayrımına izin vermesidir. LC-MS için farklı biyolojik sıvılarda veya hücre kültürü ortamında rutin metabolit profilleme çalışmaları için C18 ve HILIC kolonların kullanıldığı protokoller kullanılabilmektedir<sup>14,22,23</sup>.

**Tablo 1. Metabolomik Çalışmalarda Kullanılan Yazılımlardan Bazıları**

| Yazılım Adı*                       | Kullanım Amacı  |
|------------------------------------|---|
| BioSpider                          | Biyomoleküllerin raporlanmasında kullanılan bir yardımcıdır. Metabolitlerin kimyasal isimlerini, yaygın isimlerini, fiziksel ve kimyasal özelliklerini ve CAS** numaralarını raporlamada yardımcı olur <sup>36</sup> .<br><a href="http://www.biospider.ca/">http://www.biospider.ca/</a>   |
| Colmar                             | Kompleks metabolit karışımlarındaki metabolitlerin NMR ile teşhisine yardımcı olan bir web tabanlı yazılımdır. NMR spektrumlarını içeren bir veribankası aracılığıyla çalışır ve piklere ait kimyasal kayma değerleri ile ilgili listeler içermektedir.<br><a href="http://spinportal.magnet.fsu.edu/">http://spinportal.magnet.fsu.edu/</a>  |
| FiD (Fragment Identifier)          | MS/MS analizlerinden elde edilen bilginin yorumlanmasında grafik arabirimi kullanarak çalışabilen kolay kullanımlı bir yardımcı yazılımdır. Fragmentlerin yapıları ve parçalanma mekanizmaları ile ilgili bilgi verebilmektedir.<br><a href="http://www.cs.helsinki.fi/group/sysfys/software/fragid/">http://www.cs.helsinki.fi/group/sysfys/software/fragid/</a>   |
| HORA (Human Blood Range Validator) | İnsan kanından tespit edilen metabolitlerin profillenmesinde bir yardımcı yazılımdır. Plazmadaki ve kandaki "normal" metabolit düzeyleri sistemdeki bir veribankasında saklıdır ve bu veribankası ile analiz sonucu elde edilen bilgilerin karşılaştırılmasına olanak tanıyarak metabolomik çalışmaların valide edilmesine yardımcı olur.<br><a href="http://www.paternostrolab.org/">http://www.paternostrolab.org/</a>  |
| MeltDB                             | Farklı gruplar için metabolomik verilerin karşılaştırılmasına olanak tanıyan web tabanlı çalışan bir yardımcı programdır. Çalışmacılara kendi veri gruplarını kaydetme ve diğer veri gruplarıyla karşılaştırma olanağı tanır <sup>37</sup> .<br><a href="https://meltdb.cebitec.uni-bielefeld.de/cgi-bin/login.cgi">https://meltdb.cebitec.uni-bielefeld.de/cgi-bin/login.cgi</a>   |
| MetaboloAnalyst                    | Metabolomik verilerin analizi, birbiri ile karşılaştırılması, istatistiksel olarak değerlendirilmesi ve farklılıkların bulunmasına olanak tanıyan web tabanlı bir uygulamadır. Metabolitler için NMR spektrumlarıyla ilişkili pik listesi, MS pikleri listesi ve metabolit derişim bilgileri vererek detaylı raporlama hazırlanmasına yardımcı olur.<br><a href="http://www.metaboloanalyst.ca/MetaboloAnalyst/faces/Home.jsp">http://www.metaboloanalyst.ca/MetaboloAnalyst/faces/Home.jsp</a> |
| MetaboMiner                        | Kompleks vücut sıvılarından metabolitlerin analizinde 2 boyutlu NMR verilerinin yarı otomatik olarak değerlendirilmesine olanak tanır. 500' e yakın metabolitin NMR verileri ile edeki verilerin birbiriyle karşılaştırılmasına ve bu sayede metabolitlerin tanımlanmasına yardımcı olur <sup>38</sup> .<br><a href="http://wishart.biology.ualberta.ca/metabominer/">http://wishart.biology.ualberta.ca/metabominer/</a>   |
| OpenMS                             | MS verilerinin anlaşılmasına yardımcı olmayı hedefleyen ve kolay kullanım özellikleriyle dikkat çeken bir yazılımdır <sup>39</sup> .<br><a href="http://open-ms.sourceforge.net/">http://open-ms.sourceforge.net/</a>   |
| SetupX                             | BinBase isimli veribankası ile GC-MS verilerinin eşleştirilmesi ve metabolitlerin bu sayede tespiti amacıyla web tabanlı çalışan bir uygulamadır <sup>40</sup> .<br><a href="http://fiehnlab.ucdavis.edu/projects/binbase_setupx">http://fiehnlab.ucdavis.edu/projects/binbase_setupx</a>   |
| XCMS                               | LC-MS verilerini analiz ederek alıkonma zamanı farklılıklarını düzelten, pikleri tanımlayan ve veribankasıyla eşleştirebilen açık kaynak kodlu bir yazılımdır <sup>41</sup> .<br><a href="http://metlin.scripps.edu/xcms/">http://metlin.scripps.edu/xcms/</a>  |

\* Yazılım adları alfabe sırasına göre verilmiştir; \*\* CAS kayıt numaraları kimyasal bileşikler, polimerler, biyolojik dizinler, karışımlar ve alaşımlar için kullanılan tek tanımlayıcı (unique) sayılardır. CAS numarası olarak da bilinirler.

### **Kapiler Elektroforez (CE)**

LC ile kıyaslandığında tabiatı gereği CE tekniklerinde daha fazla teorik tabaka sayısı oluşmakta ve dolayısıyla daha iyi bir ayırım gerçekleştirilmektedir. CE tekniği, özellikle yüklü moleküllerin ayırımına olanak tanıyarak LC ve GC' ye göre daha fazla sayıda metabolitin analizine imkan sağlamaktadır<sup>13,24-27</sup>. Ancak bütün bu avantajlara rağmen CE ile çalışmalarda en büyük sorun tekrarlanabilirlik, duyarlılık ve sağlamlığın düşük olmasıdır. Metabolit profillemeye kendisine kullanım alanı bulmasına rağmen kompleks biyolojik sıvılardan ayırım için iyi bir seçenek oluşturmamaktadır ve gelişmeye açıktır<sup>16</sup>.

### **Dedeksiyon Metodları**

#### **Kütle Spektrometrisi (MS)**

Kütle spektrometrisi GC, LC veya CE ile ayrılan metabolitlerin analizinde kullanılır. Ayrılan ve kütle spektrometrisine giden metabolitler kütle spektrumlarını içeren veribankaları sayesinde tanımlanarak metabolit profillemeye gerçekleştirilmiş olur. MS/MS uygulamaları içinse fragment iyonları hakkında bilgi içeren ve hali hazırda kullanımı bulunan veribankaları bulunmaktadır. MS teknolojisi hassasiyeti ve özgün sonuçlar alınabilmesi açısından metabolomik çalışmalarda vazgeçilmez bir kullanım alanına sahiptir. Kütle spektrometrisinin kullanımında bir diğer yaklaşım ise numunede bulunan metabolitlerin tamamının ayrılmadan kütle spektrometrisine verilmesidir. Özellikle yüksek ayırım gücüne (>1,000,000) ve kesinliğe (< 1 ppm) sahip Fourier Transform Kütle Spektrometrisi (FTMS) cihazları bu iş için kullanıldığında tatmin edici sonuçlar alınabilmektedir<sup>28,29</sup>. FTMS' in metabolomik çalışmalarda rutin kullanımına en büyük engel şu an için yüksek maliyeti ve dolayısıyla seyrek kullanımındır<sup>16</sup>.

#### **Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi**

NMR, günümüzde metabolitlerin ayırımını gerçekleştirmeye ihtiyaç duymadan metabolomik çalışmaların yapılabildiği ve kendisine yaygın kullanım alanı edinmiş yegane yöntemlerden birisidir. Çok sayıda metaboliti eş zamanlı olarak analiz edebilme özelliği ve metabolomik çalışmalar için geliştirilmiş onlarca veribankası sayesinde evrensel bir metabolit dedektörü olma yolunda ilerlemektedir. Metabolitlerin ayırımını gerçekleştirmeye gerek duyulmadığı için basit ve yaygın kullanılan protokoller sayesinde numune hazırlama süreci kolaylıkla gerçekleştirilebilmektedir<sup>30</sup>. Ancak; bütün bu avantajlarının yanında en büyük sorun şu an için

duyarlılığının düşük olması ve dolayısıyla kütle spektrometresi kullanılan tekniklerle karşılaştırıldığında düşük derişimdeki metabolitlerin teşhisinde yaşanan sıkıntılardır<sup>31,32</sup>.

## Metabolomik Çalışmalarda Yazılım ve Veri Bankası Desteği

Metabolomik çalışmaları içeren uygulamalar biyobelirteç tespitinde, enzim substrat ilişkisi değerlendirmede, ilaç aktivite çalışmalarda, metabolik yolak analizlerinde ve daha birçok amaca hizmet eden çalışmalarda son dönemlerde yaygın olarak kullanılmaktadır<sup>9,33-35</sup>. Metabolit profillemeye çalışmaları için LC-MS, GC-MS, CE-MS ve NMR tekniklerinden elde edilen verinin bilgisayar destekli bir ön işlemden geçirilmesi çalışma sürecinde harcanacak zaman kaybını, yapılabilecek olası hataları ve var oldukları halde gözden kaçabilecek metabolitlerin tespit edilememe sorunlarını en aza indirmektedir. Bu amaçla çeşitli ticari veya ticari olmayan yazılımlar bulunmaktadır. Bu tür yazılımlardan bazıları amaçlarına göre Tablo 1' de sunulmaktadır.

Metabolit profillemeye çalışmalarının veri bankası kullanılmadan yapılamayacağı gerçeği ortadadır. Yüzlerce metabolitin kütle değerlerinin tek tek taranması, tandem-kütle spektrometreyi parçalanma ürünlerinin irdelenmesi veya NMR verilerinin tek tek incelenmesi profillemeye çalışmalarında zaman kaybına ve iş gücünün verimli kullanılmamasına sebep olmaktadır. Ayrıca tespit ve teşhis edilen her bir metabolitle ilgili klinik bilgiye, yayınlara, kimyasal ve fiziksel özelliklere ve hatta bu metabolitin katıldığı metabolik yollarla ilgili bilgilere tek bir kaynaktan ulaşılabilme ihtimali veri bankalarının kullanımını cazip hale getirmektedir. Ancak; genlerle veya proteinlerle karşılaştırıldığında yapıları farklı olan ve tek bir şekilde tanımlanamayan binlerce kimyasalın yani aranan ve anlam ifade eden/edebilecek her bir metabolitin veri bankalarına kayıtlı olmadığı bir gerçektir. Dolayısıyla metabolomik veri bankaları genomik veya proteomik veri bankaları kadar detaylı ve tamamlanmış bilgiyi henüz içermemektedir. Her geçen gün tanımlanan metabolitlerin sayısının artmasıyla ve metabolitlerin fonksiyonlarının aydınlatılmasıyla metabolomik veri bankaları daha da zenginleşecektir<sup>42</sup>.

Metabolomik Derneği ([www.metabolomicsociety.org](http://www.metabolomicsociety.org)) tarafından yapılan ayrıma göre metabolomik veri bankaları; karşılaştırmalı metabolomik veri bankaları, metabolik yolak veri bankaları, kimyasal özellikler ve spesifik kimyasallara ait veri bankaları, ilaç ve metabolitleri veri bankaları ve spektral veri bankaları olarak ayrılmaktadır. Ancak bu gruplandırma çoğu veri bankası için iç içe geçmiş vaziyettedir ve çoğu veri bankası birden fazla



amaca hizmet edebilmektedir. Tablo 2’de metabolomik derneği tarafından önerilen ve metabolomik çalışmalar için kullanılabilir veribankaları listelenmiştir.

**Tablo 2. Metabolomik Çalışmalarda Kullanılan Veribankalarından Başlıcaları**

| Veribankaları   | İçeriği  |
|---|--|
| HMDB (Human Metabolome Database)  | Kimyasal bilgi, klinik bilgi ve moleküler biyoloji/biyokimyasal bilgi sağlar. 6500 kadar metabolit ve bu metabolitlerle ilişkili 1500 kadar protein (ve DNA) dizilimi içerir. Birçok metabolit için yer aldığı metabolik yollar ile ilgili olarak KEGG, PubChem, MetaCyc, ChEBI, PDB, Swiss-Port ve GenBank gibi veribanlarıyla ilişkilendirme sağlar. Kimyasal yapıları gösterebilmenin yanısıra yaklaşık 790 bileşik için <sup>1</sup> H ve <sup>13</sup> C NMR verisi içeren, 800 bileşik için MS/MS verisi içeren ve 260 bileşik için GC-MS ve alıkonma zamanı bilgisi içeren bir altyapısı bulunmaktadır. 3100 farklı metabolit içinse sanal NMR spektrumu önerebilmektedir <sup>43</sup> . |
| Metlin  | Kimyasal isim, formül ve kütle değeri bilgilerini kullanarak tarama yapmaya olanak tanıyan 15000’ den fazla metabolit bilgisini içinde barındıran bir veribankasıdır. LC-MS ve MS/MS bilgisi ışığında kütle aralığı girilerek biyolojik kaynağı ve hastalık sınıfına göre metabolitleri bulabilmekte ve listeler halinde ayırabilmektedir. XCMS yazılımıyla birlikte çalışabilme özelliği sunar <sup>44</sup> .  |
| MMCD (Madison Metabolomics Consortium Database)                             | 10000 kadar metaboliti içeren 500 kadar metabolite ait spektral veriyi içinde barındıran kapsamlı bir veribankasıdır. Kimyasal ve fiziksel özelliklerin, formüllerin ve isimlerin yanısıra metabolitler için teorik NMR kimyasal kayma değerleri de sunabilmektedir.   |
| SetupX  | Özellikle GC-MS çalışmaları için geliştirilen ve BinBase isimli veribankası ile ortak çalışan ve ilişkilendirme sağlayan bir veribankasıdır <sup>40</sup> .  |
| Fiehn GC-MS Database  | Adından da anlaşılacağı üzere GC-MS ile metabolit analizinde yaklaşık 713 kadar metabolit için MS spektrumu ve alıkonma zamanı verisini içerir.  |
| BML-NMR (Birmingham Metabolite Library Nuclear Magnetic Resonance database) | Yaklaşık 210 yaygın metabolit için NMR spektrumları içerir. En önemli özelliği farklı pH’ larda (6.0, 7.0, 7.4) kaydedilmiş NMR spektrumlarını ve 2 boyutlu NMR spektrumlarını da içermesidir.   |
| Golm Metabolome Database  | Detaylı GC-MS verileri içerir ve bu veriler kütle spektrumları, alıkonma zamanı indeksleri ve metabolitlerle ilgili kütüphanelerden oluşur. NIST/AMDIS yazılımı ile birlikte çalışabilmektedir. Bu yazılım sayesinde eldeki verilere ait alıkonma zamanı ve kütle spektrumu ile veribankası arasında eşleştirme yapabilmektedir. Farklı GC-MS koşulları için kayıtlı kütüphaneleri taranmaya ve indirilmeye açıktır <sup>45</sup> .  |
| PubChem<br>ChEBI<br>ChemSpider  | Sadece metabolitler için olmamakla birlikte metabolitleri de kapsayan ve küçük kütleli moleküllere ait yapıları, fiziksel ve kimyasal özellikleri kapsayan, ilgili yayınları ve bazen klinik bilgileri de içeren veribankalarıdır <sup>46,47</sup> .   |
| DrugBank<br>PharmGKB<br>STITCH<br>SuperTarget                               | Onaylı ve halihazırda kullanılan veya üzerinde çalışılmış molekülleri de içeren geniş arşivlere sahip veribankalarıdır. İlaçların farmakolojik özellikleri, ilaç etkileşimleri, katıldıkları metabolik yollar ve ilaç moleküllerine ait fiziksel ve kimyasal özelliklerin de içinde bulunduğu pek çok veriyi içinde barındırırlar. Protein/peptid cinsi biyoteknolojik ilaç molekülleri hakkında da bilgi edinilebilmektedir <sup>48-50</sup> .  |

Metabolit hedef analizlerinde (targeted metabolomics) iki farklı grup arasında (örneğin hasta grup ve sağlıklı grup) hedeflenen metabolitlerin miktarlarındaki farklılaşma tespit edilerek sonuç çıkarılmaya çalışılmaktadır. Bu tür çalışmalar gerek rutin gerekse bilimsel amaçlı olarak uygulanabilmektedir<sup>51,52</sup>. Metabolit hedef analizleri gibi uygulamalarda aranan metabolitlerin kütlelerini bilmek büyük avantajdır. Bu sayede kütle bilinen metabolitler yüksek ayırım gücüne sahip cihazlarla ayrılıp TOF gibi yüksek kesinlikte çalışan bir kütle analizörü ile analiz edildiğinde karşılaştırılan gruplar arasındaki metabolit düzeylerini ortaya çıkarmada oldukça başarılı sonuçlara ulaşılmaktadır. Benzer şekilde, binlerce metabolitin ayrılıp taranarak yapılarının aydınlatıldığı metabolit profillemeye çalışmalarında metabolitlerin alıkonma zamanları ve kütlelerini veritabanlarından bularak elde edilen numuneler ile karşılaştırmak, zaman ve iş gücü kaybını en aza indirmek açısından önemli kolaylıklar sağlar.

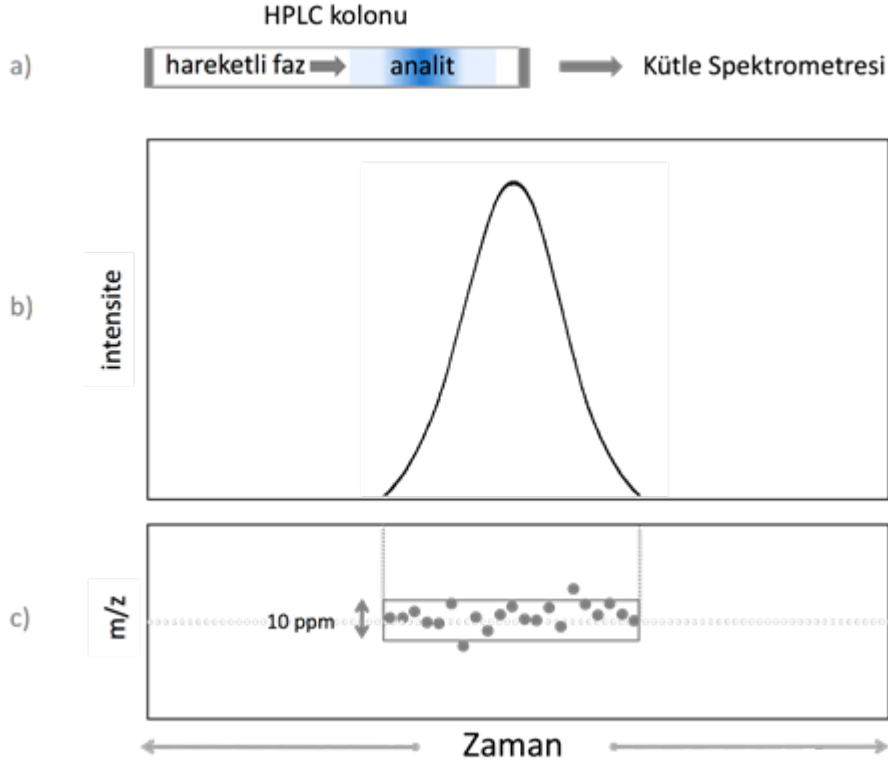
### **Metabolomik Çalışmalarda XCMS kullanımı**

XCMS yazılımı, LC-MS tabanlı metabolomik çalışmalarda tekrarlı analizlerde grup içi ve gruplar arası alıkonma zamanları arasındaki farklılaşmaları doğrusal olmayan (nonlinear) matematiksel modellemelerle eşleştirerek gidermek ve analiz edilen metabolit kütleleri arasındaki farklılıkları istatistiksel olarak değerlendirerek grup içi ve gruplar arası eşleşen ve kalitatif anlamda farklılaşan metabolitleri tespit etmek için kullanılan bir metabolit profillemeye yardımcı yazılımdır<sup>41</sup>.

Bir LC-MS analizinde kolon içinde ayırım sırasında difüze olmuş analit molekülleri bir çan eğrisi oluşturacak şekilde yani en fazla molekül sayısı pik genişliğinin ortasında toplanmış vaziyette dağılırlar. Kolondan çıkan her bir molekül kütle spektrometresine gönderilir ve zamana karşı her bir molekülün kütle/yük (m/z) değerlerinin ölçülmesi sonucu oluşan intensite - zaman grafiği ekrana pik olarak yansır.

Tautenhan ve arkadaşları tarafından bir LC-MS analizinde herhangi bir metabolit için ekrana yansıyan pik şeklinin oluşumu Şekil 1' dekinde benzer bir biçimde şematize edilmiştir<sup>53</sup>. İki farklı grup için (örnek olarak hasta ve sağlıklı grup) beşer kez LC-MS analizi yapılan bir metabolit profillemeye çalışmasında her bir grup için 5 adet LC-MS ve iki grup için toplam 10 adet LC-MS kromatogramı olacaktır. Bu gruplar için uygulanan yöntemle ilgili olarak analiz süresinin 30 dakika ve taranacak m/z değerlerinin 50-500 arasında olduğu düşünülün. Böyle bir çalışmada her bir saniye için dedektör tarafından taranan verinin toplamı oldukça büyüktür. Her bir dakika için belkide 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.



### Şekil 1. LC-MS Kullanımında Bir Metabolitin Kolondan Elue Olması Ve Kütle Spektrometresinde Dedekte Edilmesine Ait Şematik Gösterim

(a) analitin kolondan bir çan eğrisi oluşturacak şekilde elue olması, (b) bu analite ait pik şeklinin o analitin m/z değeri için intensite-zaman ekseninde oluşumu (c) kolondan elue olan her bir analit molekülünün kütle spektrometresine ulaşması sonucu m/z değerlerinin 10 ppm hata payı ile ölçülmesi<sup>53</sup>

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 profillendiği bir çalışmada ufak gibi görünen bu farklılıklar yüzünden metabolitlerin tespit edilmesi ve tanımlanması imkansız olmamakla birlikte zaman alıcı ve zor bir süreçtir. Özellikle düşük derişimdeki metabolitler, insan emeği ile kromatogramların taranması sırasında gözden kaçabilir veya zemindeki gürültü ile 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 kar amacı taşımayan bir yardımcı yazılımdır<sup>54</sup>. Smith ve ark. tarafından XCMS' in işleyiş algoritması Şekil 2' deki gibi ifade edilmektedir.



**Şekil 2. XCMS Uygulamasında Kullanılan Algoritmanın Şeması<sup>54</sup>**

Bu algoritmadaki adımlar şu şekilde sıralanabilir:

1. LC-MS verisinin XCMS ile uyumlu hale getirilmesi: Nihayetinde XCMS bir bilgisayar programıdır ve LC-MS verilerini işleyebilmesi için kromatogramların XCMS'in analiz edebileceği türden bir veri formatına dönüştürülmesi gerekmektedir. XCMS ile veri analizine başlamadan önce LC-MS verileri uygun formata dönüştürülür ve XCMS'e tanıtılır.
2. Piklerin belirlenmesi ve alıkonma zamanlarının düzeltilmesi: XCMS, grup içi ve gruplar arasında aynı metabolite ait olduğunu düşündüğü pik şeklindeki bütün sinyalleri "centwave" ve "matchfilter" adı verilen iki farklı algoritma kullanarak tespit edebilmektedir. Her iki algoritma da birbirinden farklı mantıkla çalışır ancak amaç

alınma zamanı ve kütle değerleri arasındaki varyasyonları gidererek düşük derişimli metabolitleri de içine alacak şekilde pikleri tespit etmek ve eşleştirmek<sup>53</sup>.

3. Piklerin karşılaştırılması: Tespit edilen pikler, gruplar arasında nicel anlamda ne kadar farklılaştığının belirlenmesi amacıyla ortalama pik alanı değerlerine göre orantısal olarak karşılaştırılacaktır.
4. İstatistiksel değerlendirme yapılması: Alınma zamanlarının, kütle değerlerinin ve pik alanlarının istatistiksel olarak karşılaştırılmasıyla bütün metabolitlerin tanımlanması ve farklılaşan metabolitlerin en üst düzeyde tespit edilebilmesi amaçlanmaktadır.
5. Önemli pikleri görüntüleme: XCMS bütün bu işlemler sonunda tespit ettiği ve farklılaşan metabolitlere ait olduğuna karar verdiği piklerin her biri için alınma zamanı düzeltilmiş yeni kromatogramlar yayınlayacaktır.

XCMS ile gruplar arasında farklılaşan metabolitlerin teşhis edilmesi sonucunda program bir tablo ve alınma zamanlarının düzeltildiği yeni kromatogramlar verecektir<sup>55</sup>. İlgili tablo aşağıda sıralanmış bilgileri veren sütunlar içerir;

- Kromatogramdaki piklerin alınma zamanlarının düzeltildiği, farklı gruplardaki ve grup içi gözlenen alınma zamanı arasındaki farklılıkları içeren (gözlenen en düşük ve en yüksek alınma zamanının belirtildiği) sütunlar.
- Kromatogramdaki piklerin kütle değerlerinin eşleştirildiği, farklı gruplardaki ve grup içi gözlenen kütle değerleri arasındaki farklılıkları içeren (gözlenen en düşük ve en yüksek kütle değerinin belirtildiği) sütunlar.
- Bir metabolite ait olduğu düşünülen her bir pikin grup içinde ve gruplar arasında istatistiksel olarak ne kadar örtüştüğünü gösterir sütunlar.
- Analiz edilen metabolitlerin pik alanı değerlerini gösterir sütunlar.
- Pik alanlarının istatistiksel değerlendirmesi sonucunda iki farklı grup için metabolit düzeyindeki değişimi ifade eden "fold change" yani pik alanlarındaki orantısal farklılık değerlerini veren sütunlar.
- Metlin veribankası ile eşleştirme sonucunda tespit edilen m/z değerlerine göre olası metabolitlerin neler olduğu ile ilgili internet bağlantısını içeren sütunlar.

XCMS, normalde LC-MS için geliştirilmiş bir platform olduğu için CE-MS uygulamaları açısından yaygın kullanımı olmasa da Nevedomskaya ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada XCMS' in kapasitesi CE-MS uygulamaları için değerlendirilmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır<sup>56</sup>.

XCMS uygulamasında gerek *centwave* gerekse *matchfilter* algoritmaları için belirlenecek alıkonma zamanı düzeltme ve pik tespiti parametreleri kullanılan ayırım ve dedeksiyon sisteminin özellikleri doğrultusunda yazılıma girilebilmektedir. Bu sayede mümkün olan en fazla sayıda metabolitin (düşük derişimli metabolitler de dahil) profillenmesi ve gruplararası kalitatif anlamda farklılaşan moleküllerin tespiti sağlanmaktadır. XCMS, her geçen gün yeni özellikler kazanan ve daha fazla kullanıcı dostu bir arayüze kavuşan bir platformdur. Dolayısıyla yakın gelecekte metabolit profilleme çalışmalarının vazgeçilemez bir unsuru haline dönüşeceği düşünülmektedir.

## Sonuç

Günümüzde klinik fenotipi belirleyen bilginin aydınlatılmasında anahtar rolün hücrede oluşan metabolitlerde saklı olduğu gerçeği ortadadır. Bu amaçla 2005 senesinde Kanada Alberta Üniversitesi'nin, Genom Kanada ve Kanada İnovasyon Kurumu'nun desteği ile İnsan Metabolom Projesi (HMP) başlatılmıştır. Bu proje ile insanda vücut içi sıvılarda analiz edilebilecek en düşük derişimdeki metabolitler de dahil tüm metabolitleri tanımlamak, ölçmek ve normal-anormal değer aralığını belirlemek, bu verilerin serbestçe elektronik ortamda elde edilebilir olmasını sağlamak için bir kütüphane (Human Metabolome Database (HMDB) oluşturulması planlanmıştır.

Tıp bilgisindeki hızlı ilerlemeye paralel olarak artık hastalıkların teşhisinde ve mekanizmalarının aydınlatılmasında kişiye özel yaklaşımlar geliştirilmektedir. Metabolomik çalışmalar bu sürecin işleyişinde ve uygulamasında önemli paya sahiptirler. Bilginin artışına zıt bir biçimde bilgiye ulaşma hızının kolaylaştığı şu günlerde ileri analitik tekniklerin gelişimi ve yaygınlaşması dikkate alınırsa özellikle metabolit profilleme çalışmaların önü her geçen gün daha da açılmaktadır. Metabolomik çalışmalar amaca yönelik yazılım ve veribankası desteği ile yakın gelecekte belki de hastalıklara yakalanma riski, hastalıkların teşhisi, tedavisi, tedaviye cevap ve ilerleyiş sürecini görmede rutin birer analiz yöntemleri haline dönüşecektirler.

## Kaynaklar

1. Venter JC. A part of the human genome sequence. *Science*. 2003; 299:1183-4.
2. Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature*. 2003; 422:193-7.
3. Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. 2000; 405:837-46.
4. Mishra NC. *Introduction to Proteomics: Principles and Applications*. USA, Wiley, 2010.
5. Fiehn O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comparative and Functional Genomics*. 2001; 2:155-68.
6. Perroud B, Lee J, Valkova N, Dhirapong A, Lin PY, Fiehn O et. al. Pathway analysis of kidney cancer using proteomics and metabolic profiling. *Mol Cancer*. 2006; 5:64.
7. Ibanez C, Valdes A, Garcia-Canas V, Simo C, Celebier M, Rocamora-Reverte L et. al. Global Foodomics strategy to investigate the health benefits of dietary constituents. *J Chromatogr A*. 2012; 1248:139-53.
8. Bařaran E, Aras S, Cansaran-Duman D. Genomik, Proteomik, Metabolomik kavramlarına genel bakış ve uygulama alanları. *Turk Hij Deney Biyol Derg*. 2010; 67: 85-96.
9. Griffiths WJ, Karu K, Hornshaw M, Woffendin G, Wang Y. Metabolomics and metabolite profiling: past heroes and future developments. *Eur J Mass Spectrom*(Chichester, Eng). 2007; 13:45-50.
10. Villas-Bôas SG, Roessner U, Hansen MAE, Smedsgaard J, Nielsen J: *Metabolome Analysis: An Introduction*. USA, Wiley, 2007.
11. Kurban S, Mehmetoglu İ. Proteomik. *Yeni Tıp Dergisi*. 2010; 27:70-75.
12. Asiago VM, Alvarado LZ, Shanaiah N, Gowda GA, Owusu-Sarfo K, Ballas RA et al. Early detection of recurrent breast cancer using metabolite profiling. *Cancer Res*. 2010; 70:8309-18.
13. Ramautar R, Somsen GW, de Jong GJ. CE-MS in metabolomics. *Electrophoresis*. 2009; 30:276-91.
14. Bajad S, Shulaev V. LC-MS-based metabolomics. *Methods Mol Biol*. 2011; 708:213-28.
15. Garcia A, Barbas C. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolomics. *Methods Mol Biol*. 2011; 708:191-204.
16. Lei Z, Huhman DV, Sumner LW. Mass spectrometry strategies in metabolomics. *J Biol Chem*. 2011; 286:25435-42.
17. Nielsen J, Oliver S. The next wave in metabolome analysis. *Trends Biotechnol*. 2005; 23:544-6.
18. Carroll AJ, Badger MR, Harvey Millar A. The MetabolomeExpress Project: enabling web-based processing, analysis and transparent dissemination of GC/MS metabolomics datasets. *BMC Bioinformatics*. 2010; 11:376.
19. Madsen R, Lundstedt T, Trygg J. Chemometrics in metabolomics--a review in human disease diagnosis. *Anal Chim Acta*. 2010; 659:23-33.

20. Gu H, Pan Z, Xi B, Asiago V, Musselman B, Raftery D. Principal component directed partial least squares analysis for combining nuclear magnetic resonance and mass spectrometry data in metabolomics: application to the detection of breast cancer. *Anal Chim Acta*. 2011; 686:57-63.
21. Schauer N, Steinhäuser D, Strelkov S, Schomburg D, Allison G, Moritz T et al. GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. *FEBS Lett*. 2005; 579:1332-7.
22. Gika H, Theodoridis G. Sample preparation prior to the LC-MS-based metabolomics/metabonomics of blood-derived samples. *Bioanalysis*. 2011; 3:1647-61.
23. Zhou B, Xiao JF, Tuli L, Ressom HW. LC-MS-based metabolomics. *Mol Biosyst*. 2012; 8:470-81.
24. Soga T, Ohashi Y, Ueno Y, Naraoka H, Tomita M, Nishioka T. Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2003; 2: 488-94.
25. Monton MR, Soga T. Metabolome analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2007; 1168:237-46.
26. Ramautar R, Mayboroda OA, Somsen GW, de Jong GJ. CE-MS for metabolomics: developments and applications in the period 2008-2010. *Electrophoresis*. 2011; 32:52-65.
27. Celebier M, Ibanez C, Simo C, Cifuentes A. A Foodomics approach: CE-MS for comparative metabolomics of colon cancer cells treated with dietary polyphenols. *Methods Mol Biol*. 2012; 869:185-95.
28. Han J, Danell RM, Patel JR, Gumerov DR, Scarlett CO, Speir JP et al. Towards high-throughput metabolomics using ultrahigh-field Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Metabolomics*. 2008; 4:128-40.
29. Takahashi H, Kai K, Shinbo Y, Tanaka K, Ohta D, Oshima T et al. Metabolomics approach for determining growth-specific metabolites based on Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2008; 391:2769-82.
30. Beltran A, Suarez M, Rodriguez MA, Vinaixa M, Samino S, Arola L et al. Assessment of compatibility between extraction methods for NMR- and LC/MS-based metabolomics. *Anal Chem*. 2012; 84:5838-44.
31. Griffin JL. Metabonomics: NMR spectroscopy and pattern recognition analysis of body fluids and tissues for characterisation of xenobiotic toxicity and disease diagnosis. *Curr Opin Chem Biol*. 2003; 7: 648-54.
32. 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; 2:2692-703.
33. Affolter M, Bergonzelli GE, Blaser K, Blum-Sperisen S, Corthesy B, Fay LB et al. -Omics for prevention: gene, protein and metabolite profiling to better understand individual disposition to disease. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program*. 2006; 57:247-50.



34. Griffiths WJ, Koal T, Wang Y, Kohl M, Enot DP, Deigner HP. Targeted metabolomics for biomarker discovery. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2010; 49:5426-45.
35. Fernie AR, Trethewey RN, Krotzky AJ, Willmitzer L. Innovation - Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. *Nat Rev Mol Cell Bio.* 2004; 5:763-9.
36. Knox C, Shrivastava S, Stothard P, Eisner R, Wishart DS. BioSpider: a web server for automating metabolome annotations. *Pac Symp Biocomput.* 2007:145-56.
37. Kessler N, Neuweiger H, Bonte A, Langenkamper G, Niehaus K, Nattkemper TW et. al. MeltDB 2.0-advances of the metabolomics software system. *Bioinformatics.* 2013.
38. Xia JG, Bjorndahl TC, Tang P, Wishart DS. MetaboMiner - semi-automated identification of metabolites from 2D NMR spectra of complex biofluids. *BMC Bioinformatics.* 2008; 9:507.
39. Sturm M, Bertsch A, Gropl C, Hildebrandt A, Hussong R, Lange E et al. OpenMS-An open-source software framework for mass spectrometry. *BMC Bioinformatics.* 2008; 9:163.
40. Scholz M, Fiehn O. SetupX--a public study design database for metabolomic projects. *Pac Symp Biocomput.* 2007:169-80.
41. Tautenhahn R, Patti GJ, Rinehart D, Siuzdak G. XCMS Online: a web-based platform to process untargeted metabolomic data. *Anal Chem.* 2012; 84:5035-9.
42. Tsoka S, Ouzounis CA. Metabolic database systems for the analysis of genome-wide function. *Biotechnol Bioeng.* 2003; 84:750-5.
43. Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y et al. HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41:D801-7.
44. Smith CA, O'Maille G, Want EJ, Qin C, Trauger SA, Brandon TR et al. METLIN: a metabolite mass spectral database. *Ther Drug Monit.* 2005; 27:747-51.
45. Kopka J, Schauer N, Krueger S, Birkemeyer C, Usadel B, Bergmuller E et al. GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database. *Bioinformatics.* 2005; 21:1635-8.
46. Wang YL, Xiao JW, Suzek TO, Zhang J, Wang JY, Zhou ZG et al. PubChem's BioAssay Database. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40:D400-12.
47. Hastings J, de Matos P, Dekker A, Ennis M, Harsha B, Kale N et al. The ChEBI reference database and ontology for biologically relevant chemistry: enhancements for 2013. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41:D456-63.
48. Knox C, Law V, Jewison T, Liu P, Ly S, Frolkis A et al. DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'Omics' research on drugs. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39:D1035-41.
49. Zhu F, Han BC, Kumar P, Liu XH, Ma XH, Wei XN et al. Update of TTD: Therapeutic Target Database. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38: D787-91.
50. Kuhn M, Szklarczyk D, Franceschini A, Campillos M, von Mering C, Jensen LJ et. al. STITCH 2: an interaction network database for small molecules and proteins. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38:D552-6.

51. Dudley E, Yousef M, Wang Y, Griffiths WJ. Targeted metabolomics and mass spectrometry. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2010; 80:45-83.
52. Koal T, Deigner HP. Challenges in mass spectrometry based targeted metabolomics. *Curr Mol Med.* 2010; 10:216-26.
53. Tautenhahn R, Bottcher C, Neumann S. Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS. *BMC Bioinformatics.* 2008; 9:504.
54. 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; 78:779-87.
55. Nordstrom A, O'Maille G, Qin C, Siuzdak G. Nonlinear data alignment for UPLC-MS and HPLC-MS based metabolomics: Quantitative analysis of endogenous and exogenous metabolites in human serum. *Anal Chem.* 2006; 78:3289-95.
56. 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; 395:2527-33.

**Correspondence Address / Yazışma Adresi**

Mustafa Çelebier  
Hacettepe Üniv. Eczacılık Fakültesi  
Analitik Kimya Anabilim Dalı  
Ankara, Turkey  
e-mail: celebier@hacettepe.edu.tr