



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
**Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών**
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΥ ΑΝΤΙ-COVID-19 ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ
ΑΠΟΤΥΠΩΜΑ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΥΓΕΙΩΝ ΑΤΟΜΩΝ ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ**



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ:
«ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ»

Επιβλέπων Καθηγητής:
Εμμανουήλ Μικρός,
Καθηγητής Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας ΕΚΠΑ

ΣΤΑΘΑΚΗ – ΑΜΑΡΑΝΤΙΔΟΥ ΙΣΜΗΝΗ
Χημικός

ΑΘΗΝΑ 2022

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νόσος COVID-19 ξέσπασε στα τέλη του 2019 και αποτέλεσε μία παγκόσμια απειλή, σημειώνοντας υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα σε παγκόσμια κλίμακα. Η νόσος αυτή οδηγεί στην πρόκληση σοβαρού οξέος αναπνευστικού συνδρόμου τύπου 2 (Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus-2, SARS-CoV-2) .

Άμεση υπήρξε η κινητοποίηση της επιστημονικής κοινότητας και αυτή τη στιγμή ο εμβολιασμός συνιστά την πιο αποτελεσματική στρατηγική για τον μετριασμό της πανδημίας. Τα εμβόλια mRNA ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα ώστε να παράγει εξουδετερωτικά αντισώματα (NAbs) κατά των πρωτεϊνών ακίδων του SARS-CoV-2. Ωστόσο, οι υποκείμενοι μοριακοί μηχανισμοί που επηρεάζουν την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού και την ποσότητα των παραγόμενων αντισωμάτων μετά τον εμβολιασμό παραμένουν ελάχιστα κατανοητοί.

Η μεταβολομική είναι ένα σύγχρονο εργαλείο για την καλύτερη κατανόηση των ανοσολογικών μηχανισμών, αν και σχετικά με την COVID-19 δεν υπάρχουν διαθέσιμα πολλά δεδομένα. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη του μεταβολώματος ατόμων εμβολιασμένων με anti-COVID-19 mRNA εμβόλιο, την 22η ημέρα μετά τον εμβολιασμό τους. Τα εμβολιασμένα άτομα διακρίθηκαν σε ομάδες υψηλής και χαμηλής απόκρισης με βάση το ποσοστό των εξουδετερωτικών αντισωμάτων (NAbs) που είχαν αναπτύξει. Για την καταγραφή του μεταβολικού αποτυπώματος χρησιμοποιήθηκε η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) και συλλέχθηκαν φάσματα πρωτονίου μίας διάστασης δειγμάτων πλάσματος αίματος.

Η στατιστική ανάλυση, χρησιμοποιώντας τόσο μονοπαραμετρικές όσο και πολυπαραμετρικές μεθόδους, ανέδειξε το ρόλο του μεταβολισμού ορισμένων αμινοξέων ως πιθανών προγνωστικών δεικτών στην ανοσολογική απόκριση εμβολιασμένων ατόμων. Πιο συγκεκριμένα, από τα εργαλεία στατιστικής ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν αναδείχθηκε ο ρόλος του αμινοξέος της γλουταμίνης ως πιθανός βιοδείκτης στην ανοσολογική απόκριση των εμβολιασμένων ατόμων. Ωστόσο, για την

εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων απαιτείται περαιτέρω έρευνα και μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων.

ABSTRACT

The COVID-19 disease broke out in late 2019 and has become a global threat, leading to high morbidity and mortality on a global scale. This disease leads to severe acute respiratory syndrome type 2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2, SARS-CoV-2).

The scientific community was immediately mobilized and at the moment vaccination consists the most effective strategy for mitigating the pandemic. mRNA vaccines activate the immune system to produce neutralizing antibodies (NAbs) against SARS-CoV-2 spike proteins. However, the underlying molecular mechanisms that affect the immune response and the quantity of the antibodies produced after vaccination remain poorly understood.

Metabolomics is a modern tool to better understand the immune mechanisms, although the available data for COVID-19 is insufficient. In this work, a study of the metabolome of individuals vaccinated with anti-COVID-19 mRNA vaccine was carried out, on the 22nd day after their vaccination. Vaccinated subjects were divided into high and low responder groups based on the percentage of neutralizing antibodies (NAbs). Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) was used to obtain the metabolic footprint and one-dimensional proton spectra of blood plasma samples were collected.

Statistical analysis using both univariate and multivariate methods highlighted the role of the metabolism of certain amino acids as potential prognostic markers in the immune response of vaccinated individuals. More specifically, the role of L-glutamine as a potential biomarker in the human immune response was elucidated. However, further scientific research and a larger number of samples are necessary to draw any firm conclusions.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Εμμανουήλ Μικρό, ο οποίος είχε την ευθύνη για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος και για την επίβλεψη της εργασίας, για τη συνεργασία και την καθοδήγηση. Κυρίως, όμως, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου για την κατανόηση που έδειξε κατά τους μήνες διεκπεραίωσης της εργασίας αυτής.

Επίσης ευχαριστώ θερμά τα μέλη της τριμελούς μου Επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Ευάγγελο Γκίκα, για τον χρόνο που μου αφιέρωσε και τις συμβουλές που μου έδωσε απλόχερα και τον Ομότιμο καθηγητή κ. Μιχαήλ Κουττπάρη για όλη τη γνώση που παρείχε απλόχερα στα ακαδημαϊκά μας μαθήματα.

Ιδιαίτερως ευχαριστώ την Δρ.Δήμητρα Μπενάκη για την πολύτιμη βοήθεια της και την προσοχή που μου έδειξε όποτε την χρειαζόμουν. Την ευχαριστώ επίσης από την καρδιά μου για τον άπλετο χρόνο που μου αφιέρωσε όποτε της το ζήτησα.

Επιπλέον ευχαριστώ πολύ την Δρ.Κατερίνα Ηλιού για την συντροφικότητα και τη βοήθεια της καθ'όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού.

Τέλος, ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου την οικογένεια μου και τους φίλους μου είναι πάντα εδώ για εμένα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή	8
1.1 Η νόσος της COVID-19	8
1.2 Χαρακτηριστικά του ανοσοποιητικού συστήματος	9
1.3 Ανάπτυξη εμβολίων	11
2. Μεταβολομική	15
2.1 Αναλυτικές Τεχνικές και Βιολογικά δείγματα στη Μεταβολομική	17
2.2 Στοχευμένες και μη στοχευμένες προσεγγίσεις	18
2.3 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού	19
2.4 Φασματομετρία Μαζών	22
3. Πειραματικό Μέρος	25
3.1 Υλικά και Μέθοδοι	25
3.1.1 Οργανολογία	25
3.1.2 Διεξαγωγή και σκοπός της μελέτης	25
3.1.3 Βιολογικό Δείγμα	26
3.1.4 Αντιδραστήρια	27
3.2 Προετοιμασία Δειγμάτων για τη λήψη φασμάτων με NMR	27
3.3 Επεξεργασία δεδομένων NMR	30
3.4 Πολυπαραμετρική Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	32
3.4.1 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Components Analysis, PCA)	32
3.4.2 Διακρίνουσα Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Squares - Discriminant Analysis, PLS-DA)	33
3.4.3 Ορθογώνια Διακρίνουσα Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Orthogonal Partial Least Squares – Discriminant Analysis, OPLS-DA)	33
3.5 Οπτικοποίηση Αποτελεσμάτων	34
3.6 Επικύρωση μοντέλων	35
3.7 Επιλογή χαρακτηριστικών που συμβάλλουν στην ομαδοποίηση	36
3.8 Μονοπαραμετρική Στατιστική ανάλυση των Αποτελεσμάτων	36
3.9 Επικύρωση υποψήφιων βιοδεικτών	37
4. Αποτελέσματα	39
4.1 Αναγνώριση Μεταβολιτών στο φάσμα NMR	39
4.2 Χημειομετρική ανάλυση αποτελεσμάτων	42
5. Συζήτηση Αποτελεσμάτων	58

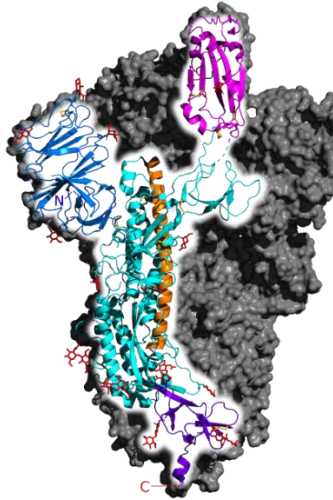
6.Συμπεράσματα.....	59
7.Βιβλιογραφία	61

1. Εισαγωγή

1.1 Η νόσος της COVID-19

Η νόσος COVID-19 είναι η νόσος που προκαλείται από στέλεχος κορωνοϊού και οδηγεί στην εμφάνιση σοβαρού οξέος αναπνευστικού συνδρόμου τύπου 2 (Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus-2, SARS-CoV-2). Ειδικότερα, ο SARS-CoV-2 αποτελεί ένα νέο στέλεχος κορωνοϊού, το οποίο δεν είχε εντοπιστεί στον άνθρωπο πριν από τον Δεκέμβριο του 2019. Η τρέχουσα έξαρση της νόσου COVID-19 ξεκίνησε στα τέλη του 2019, ενώ ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) την κήρυξε πανδημία στις 11 Μαρτίου 2020.¹ Πρόκειται για την πρώτη πανδημία που προκαλείται από κορωνοϊό και αδιαμφισβήτητα συνιστά μια άνευ προηγουμένου παγκόσμια απειλή που έχει οδηγήσει σε υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα παγκοσμίως. Το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας (NIH) των ΗΠΑ τον περιγράφει ως διάδοχο του SARS-CoV-1, ο οποίος ήταν υπεύθυνος για την έξαρση του ιού SARS το χρονικό διάστημα μεταξύ 2002-2004.²⁻³

Ο SARS-CoV-2 είναι κορωνοϊός με γονιδίωμα μονόκλωνου RNA θετικής πολικότητας. Κάθε ιικό σωματίο του SARS-CoV-2 έχει διάμετρο 50-200 νανόμετρα, ενώ συνίσταται από τέσσερις δομικές πρωτεΐνες, γνωστές ως πρωτεΐνες S (ακίδα), E (περίβλημα), M (μεμβράνη) και N (νουκλεοκαψίδιο). Η πρωτεΐνη N συγκρατεί το γονιδίωμα του μονόκλωνου RNA και οι πρωτεΐνες S, E και M δημιουργούν μαζί το ιικό περίβλημα.⁴ Με τη βοήθεια της κρυογονικής ηλεκτρονικής μικροσκοπίας έχει απεικονιστεί η πρωτεΐνη-ακίδα, η οποία επιτρέπει στον ιό να προσκολλάται και να συγχωνεύεται με τη μεμβράνη ενός κυττάρου-ξενιστή.⁵ Συγκεκριμένα, η υπομονάδα S1, όπως αυτή παρουσιάζεται στην Εικόνα 1, είναι υπεύθυνη για την προσκόλληση στα ανθρώπινα κύτταρα και η υπομονάδα S2 ευθύνεται για την είσοδο στο κυτταρόπλασμα μέσω της εξωτερικής μεμβράνης. Πειράματα μοντελοποίησης της πρωτεΐνης-ακίδας του ιού έχουν δείξει ότι ο ιός SARS-CoV-2 έχει μεγάλη συγγένεια με το ένζυμο μετατροπής της αγγιοτενσίνης 2 (ACE2), υποδοχέα των ανθρώπινων κυττάρων. Αυτόν τον υποδοχέα φαίνεται να χρησιμοποιεί ο ιός SARS-CoV-2 ως μηχανισμό εισόδου στα κύτταρα.⁶ Στη συνέχεια, αφού ο ιός εισέλθει στα κύτταρα του ξενιστή, το ιοσωμάτιο απελευθερώνει το RNA στο κύτταρο-ξενιστή, αναγκάζοντας το κύτταρο να παράγει αντίγραφα του ιού, που μολύνουν με τη σειρά τους περισσότερα κύτταρα.⁷



Εικόνα 1: Η πρωτεΐνη-ακίδα με επισημασμένη την υπομονάδα S1 που είναι υπεύθυνη για την προσκόλληση στον υποδοχέα ACE2⁶

1.2 Χαρακτηριστικά του ανοσοποιητικού συστήματος

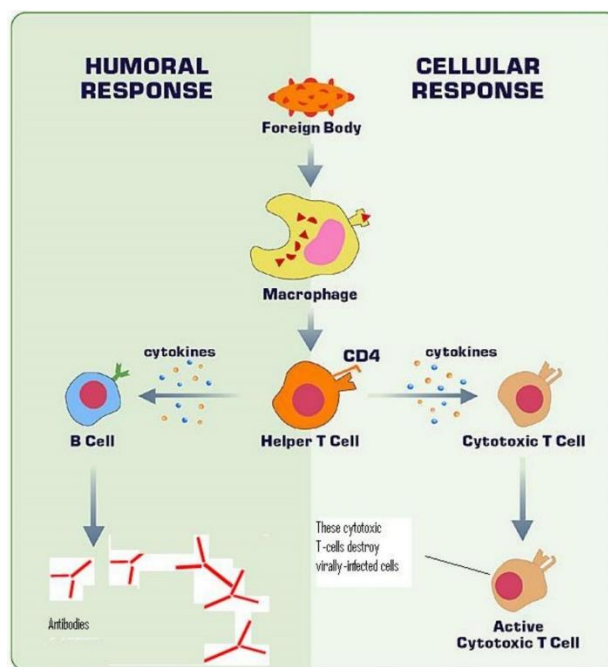
Το ανοσοποιητικό σύστημα ενός οργανισμού είναι ένα σύστημα οργάνων και βιολογικών μηχανισμών υπεύθυνο για την άμυνα και την προστασία του οργανισμού έναντι επιβλαβών εξωγενών παραγόντων (μικρόβια, ιοί, μύκητες κ. ά.), αλλά και εναντίον κυττάρων του ίδιου του οργανισμού, όταν αυτά λειτουργούν λανθασμένα. Το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελείται από ένα σύνολο διαφορετικών κυττάρων, ιστών και οργάνων. Ο μυελός των οστών και ο θύμος αδένας θεωρούνται τα σημαντικότερα όργανα διότι σε αυτά δημιουργούνται και αναπτύσσονται τα ειδικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

Τα κύτταρα που παράγονται στον μυελό των οστών ονομάζονται λεμφοκύτταρα και διακρίνονται στα Τ-λεμφοκύτταρα και στα Β-λεμφοκύτταρα. Τα Τ-λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται και ωριμάζουν στον θύμο αδένα και διαθέτουν στην κυτταρική μεμβράνη τους έναν υποδοχέα δέσμησης αντιγόνου. Τα Β-λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται και ωριμάζουν στον ερυθρό μυελό των οστών και διαθέτουν στην μεμβράνη τους ένα μόριο αντισώματος.⁸

Όταν ένα αντιγόνο προσδεθεί στην κυτταρική μεμβράνη ενός Τ-λεμφοκυττάρου εκκρίνονται αυξητικοί παράγοντες που ονομάζονται κυτοκίνες. Οι παράγοντες αυτοί ενεργοποιούν τα Β-λεμφοκύτταρα καθώς και τα κυτταροτοξικά Τ-κύτταρα τα οποία καταστρέφουν τα κύτταρα του ίδιου του οργανισμού που έχουν υποστεί αλλοιώσεις.

Όταν ένα B-λεμφοκύτταρο συναντήσει ένα αντιγόνο διαιρείται γρήγορα και διαφοροποιείται σε B-λεμφοκύτταρο μνήμης και B-λεμφοκύτταρο τελεστή ή πλασματοκύτταρο. Τα πλασματοκύτταρα παράγουν μεγάλη ποσότητα αντισωμάτων που δρουν πάνω στο αντιγόνο και το καταστρέφουν. Εκτός των λεμφοκυττάρων, άλλα σημαντικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος είναι τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα, τα οποία είναι λιγότερο εξειδικευμένα κύτταρα. Αυτά κυκλοφορούν στο αίμα και προσελκύονται μέσω ειδικών διαβιβαστών στην περιοχή όπου συμβαίνει ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και εξουδετερώνουν τους στόχους τους. Η εξουδετέρωση αυτών γίνεται με την έκκριση τοξικών ουσιών, όπως είναι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και οι κυταροκίνες.⁹

Κάθε ιός και βακτήριο το οποίο εισέρχεται στον οργανισμό έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί μια μοναδική αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος, στην οποία συμμετέχει ένα συγκεκριμένο σύνολο κυττάρων στο αίμα, στον μυελό των οστών και σε ολόκληρο τον οργανισμό, μεταξύ των οποίων τα T-λεμφοκύτταρα και τα B-λεμφοκύτταρα. Η διαφοροποίηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος μετά από την εμφάνιση ενός αντιγόνου παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση ενεργοποίησης T- και B- λεμφοκυττάρων έπειτα από παρουσίαση αντιγόνου⁹

1.3 Ανάπτυξη εμβολίων

Στα περισσότερα εμβόλια που αναπτύσσονται για την καταπολέμηση των διαφόρων ασθενειών εμπεριέχεται, είτε ένα μικρό τμήμα του ιού ή του βακτηρίου, είτε μία εξασθενημένη ή αδρανοποιημένη (εξουδετερωμένη) μορφή του ιού ή του βακτηρίου που προκαλεί τη νόσο. Όταν το εμβόλιο χορηγείται σε ένα άτομο, το ανοσοποιητικό του σύστημα αναγνωρίζει το αντιγόνο (εκάστοτε ιός ή βακτήριο) ως «ξένο σώμα», με αποτέλεσμα να ενεργοποιούνται τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, παράγοντας αντισώματα εναντίον του. Κατ' αυτόν τον τρόπο προκαλείται ανοσοαπόκριση, βοηθώντας τον οργανισμό να αποκτήσει «μνήμη» ενάντια στο συγκεκριμένο παθογόνο κι έτσι αν αργότερα το άτομο έρθει σε επαφή με τον πραγματικό λοιμογόνο ιό ή βακτήριο, το ανοσοποιητικό του σύστημα θα οδηγήσει στην ταχεία δημιουργία των κατάλληλων αντισωμάτων και στην ενεργοποίηση των ανοσοκυττάρων για την εξουδετέρωση του ιού ή του βακτηρίου, προσφέροντας προστασία του οργανισμού από τη νόσο.¹⁰

Από το ξέσπασμα της πανδημίας της COVID-19 έως και σήμερα, ερευνητές από όλο τον κόσμο προσπαθούν να αναπτύξουν εμβόλια ενάντια στην νόσο της COVID-19, με περισσότερα από 44 υποψήφια εμβόλια να βρίσκονται σε κλινικό στάδιο ανάπτυξης και άλλα 151 εμβόλια σε προκλινική αξιολόγηση από τον Φεβρουάριο του 2021.¹¹ Εμβόλια που εμπεριέχουν αδρανοποιημένα στελέχη της COVID-19 έχουν εγκριθεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας και έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε πολλές χώρες για να ανοσοποιήσουν πληθυσμούς διαφορετικών ηλικιών, συμπεριλαμβανομένων παιδιών και έφηβων ηλικίας 3-17 ετών, ενηλίκων 18-59 ετών και ατόμων ηλικίας 60 ετών και άνω.

Στα εγκεκριμένα εμβόλια έναντι του σύγχρονου κορωνοϊού συγκαταλέγονται τα mRNA εμβόλια, τα οποία διαβιβάζουν με ασφάλεια οδηγίες υπό τη μορφή γενετικού κώδικα στα σωματικά κύτταρα. Οι οδηγίες αυτές επιτρέπουν στο σώμα να παράγει ένα αβλαβές τμήμα του κορωνοϊού, την πρωτεΐνη-ακίδα. Ο στόχος είναι η εξοικείωση του ανοσοποιητικού συστήματος με την πρωτεΐνη-ακίδα, ώστε ο οργανισμός να εξουδετερώσει τον ιό σε περίπτωση μόλυνσης και να προλαμβάνεται η νόσος. Τα

εμβόλια αυτά δεν επηρεάζουν ούτε αλληλεπιδρούν με το DNA του οργανισμού-ξενιστή. Μέσω των διαδικασιών της μεταγραφής και της μετάφρασης και την παραγωγή των πρωτεϊνών-ακιδών, το ανοσοποιητικό σύστημα τις αναγνωρίζει ως ξένο σώμα και παράγει αντισώματα και ανοσοκύτταρα που τους επιτίθενται. Το σώμα στη συνέχεια τις αποβάλλει σε σύντομο χρονικό διάστημα κάποιων ημερών. Αν αργότερα ο οργανισμός μολυνθεί από τον κορωνοϊό, το ανοσοποιητικό σύστημα αναγνωρίζει τις πρωτεΐνες-ακίδες και τις εξουδετερώνει, καταστρέφοντας τον ιό και αποτρέποντας τη νόσηση.¹⁰

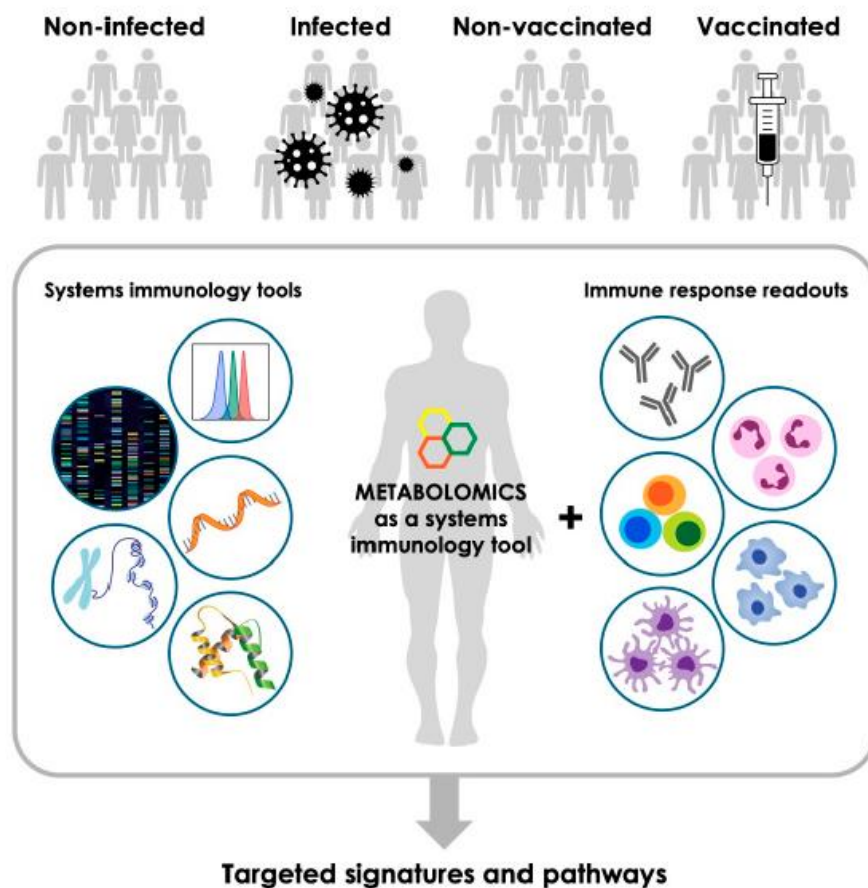
Είναι γεγονός πως οι περισσότερες από τις μελέτες εμβολίων¹² που έχουν λάβει χώρα μέχρι σήμερα, έχουν επικεντρωθεί στην αξιολόγηση της ασφάλειας και της ανοσογονικότητας τους, της ικανότητάς τους δηλαδή να επάγουν την ανοσολογική απόκριση και να ενεργοποιούν την παραγωγή αντισωμάτων και τους μηχανισμούς κυτταρικής ανοσίας. Μελέτες^{13,14} έχουν επικεντρωθεί και στον χαρακτηρισμό των ανοσοκυτταρικών τύπων που ενεργοποιούνται με τον εμβολιασμό και των κυτοκινών που παράγονται. Ωστόσο, οι υποκείμενες μοριακές διεργασίες και οι υποκείμενοι κυτταρικοί μηχανισμοί μέσω των οποίων τα βιολογικά μηνύματα διεγείρουν την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού παραμένουν ελάχιστα κατανοητά μέχρι σήμερα.¹⁵

Όσον αφορά την προστατευτική ανοσία που προκαλείται από τα εμβόλια, αυτή όχι μόνο περιλαμβάνει την απόκριση των έμφυτων και των επίκτητων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, αλλά επάγει και ριζικές αλλαγές στα κυτταρικά πρωτεομικά και μεταβολικά μονοπάτια, αυξάνοντας την ικανότητα των ανοσοκυττάρων να ανταποκρίνονται σε δευτερογενή διέγερση. Μάλιστα, στο πεδίο ανάπτυξης και αξιολόγησης νέων εμβολίων (Vaccinology), οι υψηλής απόδοσης τεχνολογίες «omics» επιτρέπουν την ολοκληρωμένη κυτταρική και μοριακή μελέτη της ανοσολογικής απόκρισης του οργανισμού, προκειμένου να γίνει κατανοητή η ανοσία που επάγεται από τα εμβόλια. Με την συνδρομή των τεχνολογιών «omics» επιτυγχάνεται εν μέσω επιδημιών και πανδημιών ο ταχύς προσδιορισμός της αποτελεσματικότητας των εμβολίων, καθώς και ο άμεσος και έγκαιρος χαρακτηρισμός των πρωτεϊνικών και μεταβολικών αλλαγών.

Έτσι, για την ολοκληρωμένη μελέτη της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας ενός εμβολίου είναι αναγκαίος ο συνδυασμός δεδομένων από διαφορετικές τεχνολογίες «omics», συμπεριλαμβανομένης της πρωτεομικής και της μεταβολομικής σε πλάσμα αίματος εμβολιασμένων ατόμων, η ανάλυση παραγόμενων κυτοκινών από τον οργανισμό των εμβολιασμένων ατόμων, καθώς και ανοσοχημικές αναλύσεις ειδικών IgM και IgG αντισωμάτων, σε συνδυασμό με υπολογιστικές προσεγγίσεις. Ο συνδυασμός μεταβολομικής και ανοσοχημικών τεχνικών παρουσιάζεται στην Εικόνα 3. Η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο τα εμβόλια επιδρούν στα μεταβολικά μονοπάτια και στη σύνθεση πρωτεϊνών, καθώς και η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που συνοδεύουν την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού συντελούν στην αξιολόγηση της ασφάλειας ενός εμβολίου.

Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεομική και η μεταβολομική του αίματος έχουν προσφέρει έως σήμερα πολύτιμη γνώση για τα πρώιμα στάδια της ανοσοαπόκρισης που επάγεται από τα εμβόλια, καθώς έχει αποδειχθεί ότι διαφορετικές κατηγορίες εμβολίων επάγουν και διαφορετικά μονοπάτια πρωτεϊνικής έκφρασης και μεταβολικής ρύθμισης.¹⁶ Μάλιστα, αυξάνονται συνεχώς τα στοιχεία ότι η εκπαιδευμένη ανοσία συνδέεται με τη μεταβολική ρύθμιση μίας σειράς κεντρικών μεταβολικών οδών, όπως αυτών της γλυκόλυσης, της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, της γλουταμινόλυσης, καθώς και των μονοπατιών σύνθεσης των λιπαρών οξέων και της χοληστερόλης.¹⁷

Έτσι, μπορούν να δοθούν απαντήσεις σε ερωτήματα σχετικά με τις εμπλεκόμενες μεταβολικές οδούς, με το είδος των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος που επηρεάζονται και με τις επιδράσεις που έχουν αυτές οι μεταβολικές αλλαγές στα ανοσοκύτταρα μετά τον εμβολιασμό των ατόμων.¹⁸



Εικόνα 3: Η χρήση της Μεταβολομικής ως συμπληρωματικό εργαλείο ανοσοχημικών μεθόδων για τη μελέτη λοιμώξεων, αλλά και για την ανακάλυψη βιοδεικτών που σχετίζονται με την ανοσοαπόκριση.¹⁹

2. Μεταβολομική

Μία από τις σύγχρονες προκλήσεις στον τομέα της υγείας αποτελεί η κατανόηση των σχέσεων και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ γενετικών διαφορών και αιτίων που προκαλούν τις ασθένειες, ώστε να προκύψουν αποδοτικότερες θεραπείες βασισμένες στην εξατομικευμένη βιολογική κατάσταση των ατόμων (εξατομικευμένη ιατρική – personalized medicine).²⁰

Οι μεταβολίτες είναι τα ενδιάμεσα ή τα τελικά προϊόντα πολλαπλών ενζυμικών αντιδράσεων και ως εκ τούτου είναι άμεσα συνδεδεμένοι με τη βιοχημική λειτουργία ενός οργανισμού. Συνιστούν μικρού μεγέθους μόρια με μοριακό βάρος από 50 έως 1500 Daltons που είτε παράγονται κατά τη διάρκεια κυτταρικών διεργασιών από ρυθμιστικούς μηχανισμούς του οργανισμού, είτε λαμβάνονται από εξωγενείς πηγές, συμπεριλαμβανομένης της διατροφής και των ξενοβιοτικών ουσιών, όπως τα φάρμακα. Στους μεταβολίτες περιλαμβάνονται λιπίδια, αμινοξέα, πεπτίδια, πτητικές αλκοόλες, οργανικά οξέα και βιταμίνες. Το σύνολο των μεταβολιτών αποτελεί το μεταβόλωμα του βιολογικού συστήματος.²¹

Οι μεταβολίτες παίζουν κρίσιμο ρόλο στα βιοχημικά μονοπάτια, καθώς όταν τα βιολογικά συστήματα του οργανισμού διαταράσσονται από μια ασθένεια, από γενετικές μεταλλάξεις ή από περιβαλλοντικούς παράγοντες αλλάζει και το μεταβολικό προφίλ του οργανισμού. Σχεδόν κάθε εσωτερικός και εξωτερικός παράγοντας επηρεάζει τα επίπεδα των μεταβολιτών με το μεταβολικό προφίλ να παρέχει ένα στιγμιότυπο της πολύπλοκης αυτής αλληλεπίδρασης μεταξύ του γονιδιώματος, του περιβάλλοντος και των ενδιαμέσων διεργασιών.²² Αυτό καθιστά τους μεταβολίτες εξαιρετικούς βιοδείκτες και ιδιαίτερα χρήσιμους για την κατανόηση των νοσημάτων και των ασθενειών και των μηχανισμών δράσης των φαρμάκων.²³

Ως Μεταβολομική ορίζεται «η μελέτη της ποσοτικής ανάλυσης όλων των μεταβολιτών ενός βιολογικού συστήματος και των αλλαγών τους που σχετίζονται με γενετικές ή περιβαλλοντικές διαταραχές».²⁴ Η Μεταβολομική παρέχει ένα στιγμιότυπο του μεταβολισμού. Το μεταβόλωμα ανταποκρίνεται γρήγορα ακόμη και σε μικρές διεγέρσεις, καθιστώντας τη μεταβολομική μία ισχυρή προσέγγιση για την αξιολόγηση των ποιοτικών και ποσοτικών αποκρίσεων του οργανισμού στις ασθένειες²⁵, στις

αλληλεπιδράσεις ξενιστή-παθογόνου²⁶, καθώς και στις βραχυπρόθεσμες και μακροπρόθεσμες μεταβολές έπειτα από παθογόνες μολύνσεις²⁷ ή εμβολιασμούς²⁸. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η εφαρμογή της μεταβολομικής συνδυαστικά με την απεικόνιση ζωντανών κυττάρων με στόχο την αξιολόγηση της απόκρισης των μιτοχονδρίων στις δραστικές ρίζες οξυγόνου (*Reactive oxygen species, ROS*) και στο οξειδωτικό στρες.²⁹

Η μεταβολομική βοηθά στον λεπτομερή χαρακτηρισμό του μεταβολικού φαινοτύπου, την ανακάλυψη νέων θεραπευτικών στόχων και βιοδεικτών. Το πλήθος/σύνολο των μεταβολιτών είναι μία δυναμική μάζα που τροποποιείται συνεχώς, επηρεάζοντας τις βιολογικές διεργασίες, παράγοντας έναν πολύπλοκο πλούτο δεδομένων που απαιτεί εξελιγμένες μεθόδους ανίχνευσης, διαχωρισμού και ανάλυσης βάσει των μοριακών τους χαρακτηριστικών. Παρά την εξέλιξη της μεταβολομικής, υπάρχουν ακόμη αχαρτογράφητες περιοχές του μεταβολώματος που ενδεχομένως να είναι χρήσιμες για την κατανόηση της απόκρισης του ξενιστή στη μόλυνση και τα εμβόλια, συμπεριλαμβανομένων των οικογενειών λιπιδίων.³⁰ Τα χιλιάδες είδη λιπιδίων που εμπλέκονται σε πληθώρα βιοχημικών μονοπατιών εξετάζονται μέσω της λιπιδομικής (*Lipidomics*), ενός ταχέως αναπτυσσόμενου κλάδου της μεταβολομικής.³¹

Επειδή οι μεταβολίτες επηρεάζουν και επηρεάζονται από γενετικούς παράγοντες, πρωτεΐνες και μικροβίωμα και περιβάλλον, η μεταβολομική (*Metabolomics*) μπορεί μόνη της ή πολύ περισσότερο σε συνδυασμό με άλλες τεχνολογίες «-ομικής» (*multi-omics*), όπως τη γονιδιωματική (*Genomics*), τη μεταγραφομική (*Transcriptomics*) και την πρωτεομική (*Proteomics*) να οδηγήσουν σε μία πιο ολοκληρωμένη περιγραφή της κατάστασης ενός βιολογικού συστήματος.³² Ο συνδυασμός των τεχνολογιών «-ομικής» (*multi-omics*) παρέχει πληροφορίες για συμπληρωματικές και πολύπλοκες συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις σε διαφορετικά κυτταρικά και μοριακά επίπεδα.³³

Συμπερασματικά, λοιπόν, η ενσωμάτωση όλων αυτών των πολυ-ομικών μεταβλητών συμπληρώνει τα κενά στις υπάρχουσες γνώσεις για την παθογένεια και την εξέλιξη μίας νόσου, και κατά συνέπεια παρέχει ευκαιρίες για έγκαιρη διάγνωση, πρόληψη και πιθανή θεραπεία της νόσου και επιτρέπει την απόκτηση μιας ολιστικής κατανόησης ενός δυναμικού βιολογικού συστήματος.³⁴

2.1 Αναλυτικές Τεχνικές και Βιολογικά δείγματα στη Μεταβολομική

Η μεταβολομική μέσω της μελέτης του μεταβολώματος, του συνόλου δηλαδή των μεταβολιτών που υπάρχει σε ένα βιολογικό δείγμα τη στιγμή που αυτό συλλέγεται και εξετάζεται, έχει πλέον εμφανιστεί ως ένα νέο εργαλείο μελέτης και κατανόησης της βιολογίας των συστημάτων. Εξαιρετικά χρήσιμα αναλυτικά εργαλεία που χρησιμοποιούνται στις μεταβολομικές μελέτες είναι η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (*Nuclear Magnetic Resonance, NMR*) και η φασματομετρία μαζών (*Mass Spectrometry, MS*) οι οποίες θα αναλυθούν στις επόμενες υποενότητες. Το ακριβές σύνολο των μεταβολιτών που παρέχεται μέσω της μεταβολομικής μελέτης εξαρτάται από την ακρίβεια, την ευαισθησία και την ειδικότητα της εκάστοτε χρησιμοποιούμενης αναλυτικής τεχνικής, καθώς επίσης και από το υπό εξέταση βιολογικό δείγμα.

Όσον αφορά τα βιολογικά δείγματα, τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα είναι ο ορός και το πλάσμα του αίματος, τα ούρα, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, το σάλιο, το αμνιακό υγρό, το συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα, καθώς και κύτταρα και επιχρίσματα ή δείγματα ιστού.³⁵ Τα βιολογικά δείγματα αφού συλλεχθούν, υποβάλλονται σε κατάλληλη επεξεργασία ώστε να παραληφθούν όλοι οι μεταβολίτες. Ειδικότερα, στην περίπτωση δειγμάτων κυττάρων ή ιστών πραγματοποιείται καθαρισμός με φυσιολογικό ορό και ακολούθως βαθιά κατάψυξη, ενώ στα υπόλοιπα βιολογικά υγρά ακολουθείται φυγοκέντρηση και βαθιά κατάψυξη.

Λόγω της πολυπλοκότητας των βιολογικών δειγμάτων είναι συχνά απαραίτητο οι μεταβολίτες να διαχωριστούν πριν από την ανάλυση. Για τον λόγο αυτό στη μεταβολομική συνδυάζονται συχνά αναλυτικά εργαλεία, όπως η φασματομετρία μαζών συζευγμένη με υγροχρωματογραφία, αεριοχρωματογραφία, ιοντική χρωματογραφία ή τριχοειδής ηλεκτροφόρηση, ώστε να είναι εφικτή η ανάλυση σύνθετων δειγμάτων.³⁶⁻⁴¹

Τα πλεονεκτήματα της σύζευξης των αναλυτικών τεχνικών είναι η μείωση της επίδρασης του μητρικού υποστρώματος και του φαινομένου καταστολής του ιονισμού, ο διαχωρισμός ισομερών ενώσεων, η παροχή πρόσθετων πολύτιμων πληροφοριών για

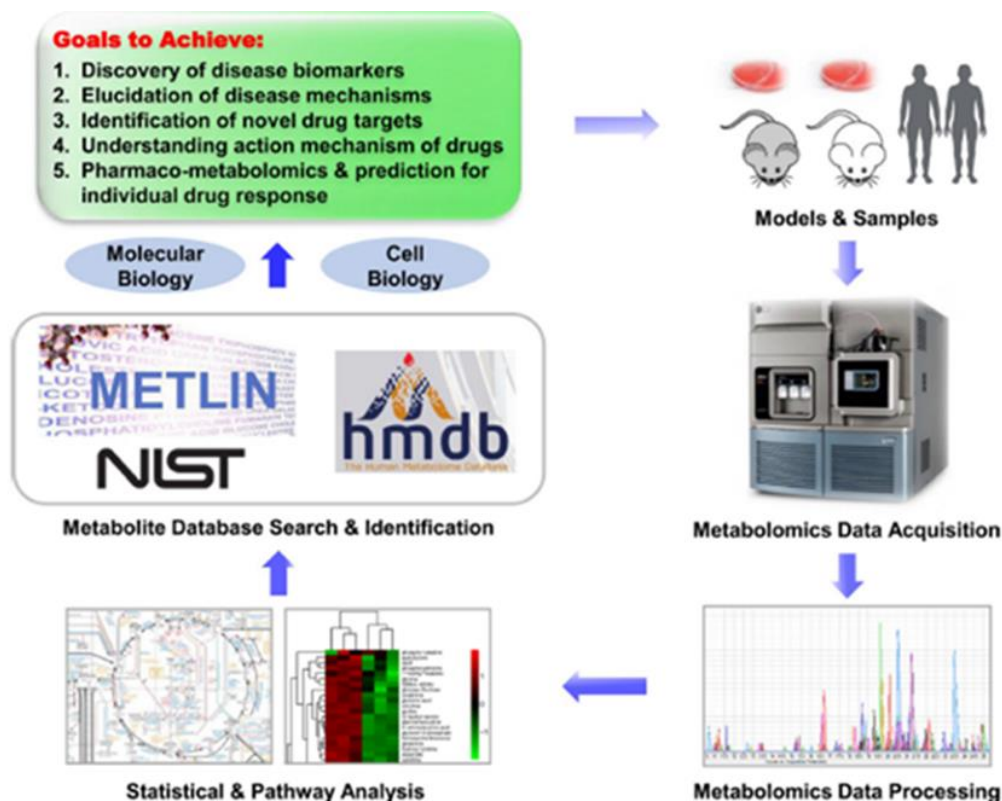
τον χαρακτηρισμό του μεταβολίτη, όπως ο χρόνος συγκράτησής του και η δυνατότητα ακριβέστερης ποσοτικοποίησης των επιμέρους μεταβολιτών.⁴²

2.2 Στοχευμένες και μη στοχευμένες προσεγγίσεις

Σε όλες τις τεχνικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν στοχευμένες και μη στοχευμένες προσεγγίσεις, ανάλογα με την εκάστοτε μελέτη.⁴³ Στη στοχευμένη προσέγγιση (targeted analysis), ένας ή περισσότεροι (έως και εκατοντάδες) προκαθορισμένοι μεταβολίτες μετρώνται σε ένα δεδομένο δείγμα με ποσοτικές ή ημι-ποσοτικές αναλύσεις.⁴⁴ Στη μη στοχευμένη προσέγγιση (untargeted analysis), περιλαμβάνεται μία ολοκληρωμένη ανάλυση με τη μέτρηση όλων των ανιχνεύσιμων μεταβολιτών σε ένα δεδομένο δείγμα, συμπεριλαμβανομένων και άγνωστων μεταβολιτών. Με τη μη στοχευμένη προσέγγιση παρέχεται το προφίλ ενός μεγάλου αριθμού γνωστών και αγνώστων μεταβολιτών σε βιολογικά δείγματα, ενώ παράγεται μεγάλη ποσότητα ακατέργαστων δεδομένων που απαιτεί εκτεταμένη επεξεργασία και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.⁴⁵

Αμφότερες οι προσεγγίσεις περιλαμβάνουν τα στάδια του πειραματικού σχεδιασμού, της συλλογής και προετοιμασίας των βιολογικών δειγμάτων, την απόκτηση και τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.⁴⁶ Τα στάδια αυτά παρουσιάζονται συνοπτικά στο διάγραμμα ροής που παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.

Στόχος της Μεταβολομικής είναι η ανακάλυψη βιοδεικτών που σχετίζονται με ασθένειες, η διαλεύκανση των βιοχημικών μηχανισμών που σχετίζονται με ασθένειες, η ταυτοποίηση καινοτόμων φαρμακολογικών στόχων, η κατανόηση των μηχανισμών δράσης των φαρμάκων και η περαιτέρω εμβάθυνση στη φαρμακομεταβολομική για την πρόβλεψη της εξατομικευμένης απόκρισης σε μία φαρμακευτική θεραπεία.



Εικόνα4: Διάγραμμα ροής (workflow) μεταβολομικής μελέτης που περιλαμβάνει πειραματικό σχεδιασμό, συλλογή δειγμάτων, ανάκτηση και επεξεργασία δεδομένων, στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων, ταυτοποίηση μεταβολιτών και χρήση παγκόσμιων πλατφορμών αναζήτησης μεταβολιτών.⁴⁷

2.3 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

Ένα εξαιρετικά χρήσιμο αναλυτικό εργαλείο που χρησιμοποιείται στις μεταβολομικές μελέτες είναι η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (*Nuclear Magnetic Resonance, NMR*). Η φασματοσκοπία NMR οφείλεται στο γεγονός ότι οι πυρήνες ενός μορίου, όταν αυτό βρίσκεται εντός μαγνητικού πεδίου απορροφούν ενέργεια στην περιοχή των ραδιοκυμάτων, συντονίζονται και επιστρέφοντας στην κατάσταση ισορροπίας, επανεκπέμπουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Η εκπεμπόμενη ακτινοβολία, αποτελεί το σήμα της φασματοσκοπίας NMR. Σε ένα πείραμα NMR το δείγμα προς μελέτη εισάγεται εντός ενός ομογενούς μαγνητικού πεδίου και οι πυρήνες του δείγματος προσανατολίζονται ανάλογα με τη γωνιακή στροφορμή τους. Στη συνέχεια, το δείγμα ακτινοβολείται για μικρή διάρκεια (παλμός, διάρκειας μερικών μs) με

ραδιοκύματα, οι πυρήνες διεγείρονται και μεταβαίνουν σε διεγερμένη κατάσταση. Αφού διακοπεί η ακτινοβολία του δείγματος, οι πυρήνες επανέρχονται στην αρχική τους κατάσταση (κατάσταση ισορροπίας) επανεκπέμποντας ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία η οποία περιλαμβάνει όλες τις συχνότητες που διεγέρθηκαν. Η συλλογή του σήματος φασματοσκοπίας NMR βασίζεται στο φαινόμενο επαγωγής και γίνεται κατά τον χρόνο αποδιέγερσης των πυρήνων. Η μετατροπή του σήματος σε φάσμα συχνοτήτων επιτυγχάνεται με μετασχηματισμό κατά Fourier.⁴⁸

Η φασματοσκοπία NMR προσφέρει τη δυνατότητα εξέτασης μεγαλύτερου εύρους δειγμάτων και παρέχει περισσότερες πληροφορίες για το εκάστοτε δείγμα σε σύγκριση με τις περισσότερες φασματοσκοπικές τεχνικές. Η φασματοσκοπία NMR πρωτονίων (^1H) υψηλής ανάλυσης (*High Resolution ^1H NMR*; *HR- ^1H NMR*) είναι η πιο κοινή μέθοδος που εφαρμόζεται σε μελέτες μεταβολομικής και απαιτεί ελάχιστη ή και καθόλου προεπεξεργασία δείγματος, το οποίο μπορεί να είναι, είτε σε μορφή διαλύματος, είτε σε στερεή κατάσταση. Αποτελεί μία μη καταστροφική τεχνική για το δείγμα, αφού ακόμα και στην περίπτωση των ιστών παρουσιάζει υψηλή διεισδυτικότητα χωρίς να τους καταστρέφει. Η φασματοσκοπία NMR διακρίνεται για την αξιοπιστία και την υψηλή επαναληψιμότητά της, και δείγματα παρασκευασμένα από διαφορετικούς ανθρώπους που λαμβάνονται σε διαφορετικά όργανα (ίδιας ισχύος) παρουσιάζουν εξαιρετικά υψηλή ομοιότητα (αναπαραγωγιμότητα), καθιστώντας τη φασματοσκοπία NMR μία πιο αξιόπιστη αναλυτική τεχνική σε σύγκριση με αυτές που βασίζονται στη χρωματογραφία ή τη φασματομετρία μαζών.⁴⁹ Πρακτικά, όταν ακολουθείται ένα σταθερό πρωτόκολλο λειτουργίας, η οποιαδήποτε διακύμανση μεταξύ των δειγμάτων αντικατοπτρίζει βιολογικές διαφορές και όχι οργανολογικές αποκλίσεις. Τέλος, η φασματοσκοπία NMR συνιστά μία ευαίσθητη αναλυτική τεχνική, η ευαισθησία της οποίας εξαρτάται από την ένταση του μαγνητικού πεδίου.

Η ευαισθησία των σημάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού εξαρτάται από τις κβαντικές μαγνητικές ιδιότητες του εκάστοτε μελετούμενου ατομικού πυρήνα, καθώς και από την φυσική του αφθονία. Τα πιο φυσικά άφθονα εμφανιζόμενα ισότοπα του υδρογόνου και του φωσφόρου χρησιμοποιούνται ευρέως στη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Αντίθετα, οι πυρήνες του άνθρακα και του αζώτου

έχουν ισότοπα με εξαιρετικά μικρή φυσική παρουσία καθιστώντας το σήμα τους στην φασματοσκοπία NMR αδύναμο. Οι πλέον χρησιμοποιούμενοι πυρήνες είναι του ^1H και του ^{13}C με $\text{spin} = \pm 1/2$ και με φυσική αφθονία του ^1H να είναι 99%, ενώ του ^{13}C 1,1%.⁵⁰

Όσον αφορά στην οργανολογία της φασματοσκοπίας NMR, τα βασικά τμήματα από τα οποία αποτελείται είναι ένα φασματόμετρο NMR, ο μαγνήτης (σε συνθήκες υπεραγωγιμότητας), ο υποδοχέας δείγματος, ο ανιχνευτής και δέκτης (probe) και το σύστημα επεξεργασίας δεδομένων. Ο μαγνήτης είναι υπεύθυνος για τη δημιουργία ομογενούς και σταθερού πεδίου B_0 . Στο κέντρο αυτού τοποθετείται το δείγμα που βρίσκεται μέσα σε ειδικό περιέκτη από χαλαζία και οι άξονες περιστροφής των πυρήνων του δείγματος ευθυγραμμίζονται με τον άξονα του ομογενούς μαγνητικού πεδίου. Οι παλμοί ραδιοκυμάτων που διεγείρουν τους πυρήνες του δείγματος, ελέγχονται μέσω κατάλληλου λογισμικού και παράγονται από εξειδικευμένες διατάξεις.⁵¹ Τέλος, υπάρχει το σύστημα ανίχνευσης, ενίσχυσης και καταγραφής του σήματος εκπομπής των πυρήνων κατά την επιστροφή του συστήματος στην κατάσταση ισορροπίας. Με αυτό τον τρόπο τα φάσματα λαμβάνουν τη μορφή των γραφημάτων που γνωρίζουμε.⁵² Ένα τέτοιο φασματόμετρο NMR παρουσιάζεται στην Εικόνα 5.



Εικόνα 5: Σύγχρονο Φασματόμετρο NMR Bruker AvanceIII™ HD 600 MHz⁵³

Η φασματοσκοπία NMR είναι ένα πολύτιμο αναλυτικό εργαλείο, τόσο για τον προσδιορισμό της δομής χημικών ουσιών, όσο και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων.⁵⁴ Η φασματοσκοπία NMR είναι μία από τις δύο κύριες φασματοσκοπικές

τεχνικές για την ταυτοποίηση ενώσεων και την επιβεβαίωση της ταυτότητας καινοτόμων συνθετικών ενώσεων, όπως αυτή απαιτείται από επιστημονικά περιοδικά.

2.4 Φασματομετρία Μαζών

Η φασματομετρία μαζών είναι μία ευαίσθητη τεχνική για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό χημικών ενώσεων. Βασίζεται στον διαχωρισμό των μαζών φορτισμένων σωματιδίων με την βοήθεια κατάλληλης οργανολογικής διάταξης και την εύρεση της αντιστοιχίας των μαζών των λαμβανομένων ιόντων με την δομή της πρόδρομης ένωσης. Η αντιστοιχία αυτή προϋποθέτει την γνώση των διαδικασιών ιονισμού και επιπλέον του μηχανισμού της πιθανής θραυσματοποίησης των ιόντων.

Όσον αφορά την οργανολογία ενός φασματομέτρου μαζών, αυτό απαρτίζεται από τέσσερα τμήματα τα οποία λειτουργούν υπό συνθήκες υψηλού κενού. Αυτά είναι τα εξής: το σύστημα εισαγωγής δείγματος (inlet), η πηγή ιόντων (ion source), ο αναλυτής μαζών (mass analyzer) και ο ανιχνευτής ιόντων (ion detector).⁵⁵

Αναλυτικότερα, η περιοχή ιονισμού είναι ο χώρος στον οποίο ένα μέρος του δείγματος ιονίζεται, ενώ στις περισσότερες τεχνικές ιονισμού απαιτείται αυτό να βρίσκεται στην αέρια φάση. Ο ιονισμός των μορίων γίνεται με διάφορες τεχνικές, με συνηθέστερες τις εξής: την ηλεκτρονιακή πρόσκρουση (*Electron impact ionization, EI*) με ταχέως κινούμενα ηλεκτρόνια σε ηλεκτρικό πεδίο, τον φωτοϊονισμό (*Photoionization, PI*) με την βοήθεια φωτός στην υπεριώδη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος και τον χημικό ιονισμό (*Chemical ionization, CI*) μέσω κρούσεως με άλλα ιόντα. Ο προσδιορισμός της μοριακής μάζας διευκολύνεται από τη λήψη του κατιόντος της χημικής ένωσης (μητρικό ιόν). Η θραυσματοποίηση (*fragmentation*) του μητρικού ιόντος είναι αναπόφευκτη για την πληθώρα των χημικών ενώσεων που ιονίζονται με την απλούστερη και συχνότερα απαντούμενη τεχνική της πρόσκρουσης ηλεκτρονίων, με κινητική ενέργεια στην περιοχή 40–70 eV. Άλλες τεχνικές ιονισμού είναι και ο ιονισμός εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενος από υλικό μήτρας (*matrix assisted laser desorption ionization, MALDI*), ο ιονισμός ηλεκτροψεκασμού με εκρόφηση (*desorption electrospray ionization, DESI*) και ο ιονισμός ηλεκτροψεκασμού με υποβοηθούμενη εκρόφηση (*extractive electrospray ionization, EESI*).⁵⁶

Στη συνέχεια, τα παραγόμενα ιόντα οδηγούνται στον αναλυτή μαζών. Ο σκοπός του αναλυτή μαζών είναι ο διαχωρισμός των ιόντων σύμφωνα με την μοριακή τους μάζα και την επιλογή των ιόντων με μάζα σε συγκεκριμένη περιοχή (με εύρος συνήθως 1 amu, διακριτική ικανότητα 1 amu), τα οποία συνεχίζουν την πορεία τους στον ανιχνευτή ιόντων. Ο ανιχνευτής συλλαμβάνει τα προσπίπτοντα ιόντα, ενισχύει το λαμβανόμενο ασθενές σήμα και το οδηγεί στην κεντρική συσκευή ελέγχου και μέτρησης. Η φασματομετρία μαζών αποτελεί μία ποσοτική αναλυτική τεχνική με συνεχώς εξελισσόμενες μεθόδους ιονισμού, διαχωρισμού μαζών και ανίχνευσης ιόντων.⁵⁶

Στις μεταβολομικές αναλύσεις απαιτείται η ανίχνευση των μεταβολιτών με υψηλή διακριτική ικανότητα και ευαισθησία. Για τον λόγο αυτό, έχουν αναπτυχθεί και μεθοδολογίες θραυσματοποίησης των πρόδρομων ιόντων έτσι, ώστε να εξάγονται επιπλέον δομικές πληροφορίες (tandem MS, MS_n). Με τη βοήθεια των μεθοδολογιών θραυσματοποίησης επιτυγχάνεται ταυτόχρονα αύξηση της ειδικότητας και επομένως και της ευαισθησίας των μεθοδολογιών ποσοτικοποίησης βασισμένων στη φασματομετρία μαζών (παρακολούθηση πολλαπλών αντιδράσεων θραυσματοποίησης, multiple reaction monitoring MRM).⁵⁷⁻⁵⁸ Ένας σύγχρονος υγροχρωματογράφος υψηλής απόδοσης συζευγμένος με φασματόμετρο μαζών παρουσιάζεται στην Εικόνα 6.

Επί του παρόντος, οι κλινικές εφαρμογές της φασματομετρίας μαζών (*Mass Spectrometry, MS*) βασίζονται κυρίως σε ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό (*Electrospray Ionization, ESI*) και σε ιονισμό εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενο από υλικό μήτρας (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI*) για μεγαλύτερα βιομόρια, καθώς και σε χημικό ιονισμό σε ατμοσφαιρική πίεση (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI*) και ιοντισμό περιβάλλοντος (*Atmospheric Ionization, AI*) για μικρότερους μεταβολίτες. Για ταυτόχρονη ανάλυση πολλών αναλυτών, χρησιμοποιείται η υγροχρωματογραφία συζευγμένη με διαδοχική φασματομετρία μαζών (*LC-MS/MS*) που έχει αναδειχθεί ως μια ισχυρή τεχνική. Χαρακτηριστική εφαρμογή που βασίζεται στη φασματομετρία μαζών κι έχει εγκριθεί από τον FDA των ΗΠΑ είναι ο προσυμπτωματικός έλεγχος νεογνών (*Newborn Screening, NBS*)⁵⁹.



Εικόνα 6: Σύγχρονος Υγροχρωματογράφος υψηλής απόδοσης Shimadzu HPLC-MS/MSQ₃⁶⁰

3. Πειραματικό Μέρος

3.1 Υλικά και Μέθοδοι

3.1.1 Οργανολογία

Κατά τη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συσκευές-όργανα :

-Φασματόμετρο NMR Avance III 600 MHz, (Bruker BioSpin GmbH, Germany)

-Πλαστικοί περιέκτες τύπου erpendorf 1,5 mL

-Σωληνάρια NMR χαλαζία, διαμέτρου 5 mm, της εταιρείας Bruker (Bruker GmbH, Germany)

3.1.2 Διεξαγωγή και σκοπός της μελέτης

Για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας συλλέχθηκαν δείγματα πλάσματος 59 υγιών ατόμων μετά τον εμβολιασμό τους με το mRNAεμβόλιο BNT162b2 COVID-19 τις ημέρες: 1 (που αντιστοιχεί στην πρώτη μέρα μετά τον εμβολιασμό), 22 (τη μέρα του δευτέρου εμβολιασμού) και 90 (3 μήνες μετά τον πρώτο εμβολιασμό). Τα δείγματα επιλέχθηκαν με βάση τον αριθμό των εξουδετερωτικών αντισωμάτων (Neutralizing Antibodies, NAbs) κατά του SARS-CoV-2 την 22η ημέρα. Ακολούθησε διάκριση των ατόμων σε άτομα χαμηλής ανταπόκρισης (low responders, NAbs<40%, $N_{LOW}=29$) και σε άτομα υψηλής ανταπόκρισης (high responders, NAbs>70%, $N_{HIGH}=30$). Οι 59 συνολικά συμμετέχοντες ήταν ηλικίας από 25 έως 68 ετών, με 40 από αυτούς να είναι γυναίκες ($N_{LOW}=17$, $N_{HIGH}=23$) και 19 άνδρες ($N_{LOW}=12$, $N_{HIGH}=7$).

Όλοι οι συμμετέχοντες συνιστούν εγγεγραμμένα μέλη μίας μεγάλης μελέτης προοπτικής (NCT04743388) για την αξιολόγηση της κινητικής των αντισωμάτων κατά του SARS-CoV-2 μετά τον εμβολιασμό κατά της COVID-19 σε υγιή άτομα και σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες ή όγκους. Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή

Δεοντολογίας του Γενικού Νοσοκομείου Αλεξάνδρα στην Αθήνα, σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι και το Διεθνές Συνέδριο για την Εναρμόνιση για την Ορθή Κλινική Πρακτική. Όλοι οι ασθενείς και οι μάρτυρες παρείχαν γραπτή συγκατάθεση πριν από την εγγραφή τους στη μελέτη αυτή.

Έως και σήμερα εφαρμόζεται πληθώρα εξειδικευμένων ανοσοχημικών ελέγχων για τον ποσοτικό προσδιορισμό ειδικών αντισωμάτων έναντι της S πρωτεΐνης του ιού (anti-spike IgG), τα οποία αποτελούν σημαντικό στοιχείο της ανοσολογικής απόκρισης του οργανισμού και η παρουσία τους θεωρείται ένδειξη προστασίας έναντι του ιού. Έχει φανεί, ωστόσο, ότι η ανοσοαπόκριση που έπεται του εμβολιασμού διαφέρει από άτομο σε άτομο, ενώ μεγάλη διακύμανση παρουσιάζεται και στον αριθμό των παραγόμενων εξουδετερωτικών αντισωμάτων (NABs) από άτομο σε άτομο. Έτσι, σκοπό της εργασίας αυτής αποτέλεσε η εύρεση μίας πιθανής συσχέτισης μεταξύ του αριθμού των παραγόμενων αντισωμάτων και του μεταβολικού αποτυπώματος του πλάσματος αίματος των εμβολιασμένων ατόμων, αξιοποιώντας τα εργαλεία της Μεταβολομικής. Μέσω της Μεταβολομικής δίνεται η δυνατότητα να βρεθεί η συσχέτιση μίας χαμηλής ή υψηλής ανοσοαπόκρισης με το μεταβολικό προφίλ των εμβολιασμένων ατόμων τη δεδομένη χρονική στιγμή, να βρεθούν τα βιοχημικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην ανοσοαπόκριση και στην παραγωγή των αντισωμάτων και να υποδειχθούν μεταβολίτες ως υποψήφιοι βιοδείκτες της ανοσοαπόκρισης.

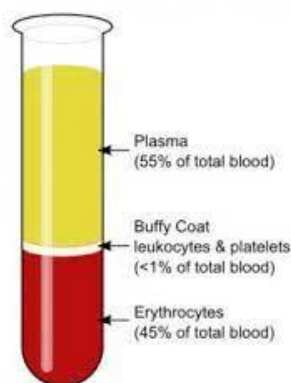
3.1.3 Βιολογικό Δείγμα

Το αίμα αποτελείται από το πλάσμα και από τα έμμορφα στοιχεία μεταξύ των οποίων τα ερυθρά αιμοσφαίρια ή ερυθροκύτταρα, τα λευκά αιμοσφαίρια ή λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια. Το πλάσμα είναι υποκίτρινο υγρό που αποτελεί τη βάση του συνδετικού ιστού του κυκλοφορικού συστήματος. Το χρώμα του οφείλεται στο προϊόν αποδόμησης της αιμοσφαιρίνης, τη χολερυθρίνη. Αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό οργανικών και ανόργανων ουσιών, διαλυτών στο νερό. Περιλαμβάνει πρωτεΐνες, κυρίως την αλβουμίνη, διάφορους ηλεκτρολύτες και νερό.

Η διαφορά μεταξύ πλάσματος αίματος και ορού έγκειται στο γεγονός ότι το πλάσμα περιέχει επιπλέον και τους παράγοντες πήξης του αίματος σε σχέση με τον

ορό. Επομένως, χαρακτηρίζουμε το πλάσμα ως το ολικό αίμα χωρίς τα έμμορφα συστατικά του αίματος.⁶¹ Για την παραλαβή του πλάσματος, φυγοκεντρείται νωπό ολικό αίμα, στο οποίο έχει γίνει προσθήκη αντιπηκτικής ουσίας, έως ότου τα κύτταρα του αίματος καταβυθιστούν, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 7.

Τα δείγματα πλάσματος της παρούσας μελέτης συλλέχθηκαν σε περιέκτες προγεμισμένους με κιτρικό οξύ ή EDTA ως αντιπηκτικό παράγοντα και φυλάχθηκαν σε υπερκατάψυξη -80 °C έως την ανάλυση.



Εικόνα 7: Αναπαράσταση της σύστασης του αίματος μετά από φυγοκέντρωση⁶¹

3.1.4 Αντιδραστήρια

Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε δευτεριωμένο νερό (D_2O) αγορασμένο από την Deutero GmbH (Kastellaun, Germany). Το τριμεθυλ-σιλυλ-προπιονικό οξύ (Trimethylsilyl propanoic acid, TSP), το διβασικό φωσφορικό νάτριο (Na_2HPO_4), καθώς και το υδροχλωρικό οξύ (HCl) 37% αγοράστηκαν από τη SigmaAldrich-Merck (Darmstadt, Germany). Το αζίδιο του νατρίου (NaN_3) αγοράστηκε από την Acros Organics-Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, U.S.). Όλες οι χημικές ουσίες ήταν υψηλής αναλυτικής ποιότητας και διαλυμένες σε υπερκαθαρό νερό (ddH_2O).

3.2 Προετοιμασία Δειγμάτων για τη λήψη φασμάτων με NMR

Τα δείγματα πλάσματος την ημέρα της ανάλυσης μεταφέρθηκαν από τους -80°C και αφέθηκαν να ξεπαγώσουν σε πάγο. Σε περίπτωση παρατήρησης σωματιδίων στο

δείγμα, χρησιμοποιήθηκε βελόνα για την απομάκρυνσή τους. Για την παρασκευή των δειγμάτων NMR μεταφέρθηκαν 350 μL δείγματος σε σωληνάριο Eppendorf και προστέθηκε ίσος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών με $\text{pH}=7,4$. Το ρυθμιστικό διάλυμα, 0,074 M Na_2HPO_4 , περιείχε 0,8 mg/mL TSP ως εσωτερικό πρότυπο και 0,4 mg/mL NaN_3 ως αντιμικροβιακό παράγοντα. Το pH ρυθμίστηκε χρησιμοποιώντας HCl 1N. Η χρήση ρυθμιστικού διαλύματος είναι απαραίτητη για την εξίσωση του pH των διαφορετικών δειγμάτων και ώστε να είναι εφικτή η σύγκρισή τους. Δεν εφαρμόστηκε στροβιλισμός των δειγμάτων και η ανάμειξη επιτεύχθηκε με ήπιο πιπτετάρισμα. 600 μL μεταφέρθηκαν με πιπέτα ακριβείας σε σωληνάριο NMR διαμέτρου 5 mm. Παρασκευάστηκε επίσης ένα λευκό διάλυμα που περιείχε 350 μL του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και 350 μL υπερκαθαρού νερού.

Όλα τα φάσματα NMR πάρθηκαν στο φασματόμετρο NMR Bruker AVANCE III 600 MHz (Bruker BioSpin GmbH, Germany) και σε θερμοκρασία 310K. Η μεταφορά του δείγματος στο εσωτερικό του μαγνήτη, η σταθεροποίηση της θερμοκρασίας, η βελτίωση της ομοιογένειας πεδίου, η βαθμονόμηση του παλμού 90 deg, η λήψη δεδομένων και η επεξεργασία (διόρθωση φάσης, γραμμής βάσης και βαθμονόμηση του άξονα των ppm) ήταν πλήρως αυτοματοποιημένες και ελεγχόμενες από το λογισμικό IconNMR v. 5.0.7 (Bruker BioSpin GmbH, Germany). Το λογισμικό TopSpin 4.0.9 (Bruker BioSpin GmbH, Germany) χρησιμοποιήθηκε για την οπτικοποίηση των φασμάτων και για τη βαθμονόμηση της χημικής μετατόπισης στο ανωμερικό πρωτόνιο της α -γλυκόζης στα 5,23 ppm από το εσωτερικό πρότυπο (TSP).

Λόγω της παρουσίας των ευρέων ταινιών απορρόφησης των πρωτεϊνών του πλάσματος, για κάθε δείγμα ελήφθη φάσμα ^1H -NMR μίας διάστασης (1D) χρησιμοποιώντας την ακολουθία Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) με κορεσμό της κορυφής του διαλύτη με παλμό ισχύος 25 Hz. Η αλληλουχία των παλμών στα φάσματα CPMG έχει ως συνέπεια την εξασθένιση των κορυφών που προέρχονται από τα μεγαλομόρια του πλάσματος (πρωτεΐνες και λιπίδια) και διαταράσσουν την γραμμή βάσης, παρεμποδίζοντας την αξιόπιστη σύγκριση των συγκεντρώσεων των μεταβολιτών. Για κάθε φάσμα CPMG αποκτήθηκε με 32 σαρώσεις, με δειγματοληψία 73k σημείων και με αποτέλεσμα χρόνο λήψης 3.1 s.

Στα δείγματα πλάσματος, εκτός από τα φάσματα CPMG, λαμβάνονται και φάσματα συμπληρωματικά, τα οποία καταστέλλουν τις κορυφές συντονισμού μορίων μικρού μοριακού βάρους (μεταβολίτες) και συλλέγουν σήματα μόνο από τα μεγαλομόρια. Χρησιμοποιώντας τη LED της βιβλιοθήκης της Bruker. Για κάθε φάσμα LED ελήφθησαν 32 σαρώσεις, με δειγματοληψία 96k σημείων και με χρόνο λήψης κάθε σάρωσης 2,7 s.

Για ένα επιλεγμένο δείγμα, ελήφθησαν πειράματα NMR δύο διαστάσεων (2D) για να βοηθήσουν τη μοριακή ταυτοποίηση. Πιο συγκεκριμένα ελήφθησαν: α) ένα φάσμα ομοπυρηνικό στο οποίο εμφανίζονται όλες οι συσχετίσεις μεταξύ των πυρήνων του ίδιου συστήματος spin (Total Correlation Spectroscopy, TOCSY) και β) ένα ετεροπυρηνικό, στο οποίο οι κορυφές συσχετίζουν πυρήνες υδρογόνου και πυρήνες άνθρακα που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένοι (Heteronuclear Single Quantum Coherence, HSQC).

Το γεγονός ότι το πλάσμα του αίματος δεν περιέχει μόνο μεταβολίτες (μόρια με μικρό μοριακό βάρος), αλλά και πρωτεΐνες (μεγαλομόρια), έχει ως συνέπεια η αποτύπωση του μεταβολικού προφίλ να είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη. Ειδικότερα, τα πειράματα NOESY οδηγούν σε φάσματα στα οποία συνυπάρχουν, τόσο κορυφές μικρού εύρους που οφείλονται σε ενώσεις μικρού μοριακού βάρους, όσο και ευρείες ζώνες μακρομορίων, όπως πρωτεϊνών και λιποπρωτεϊνών. Σε βιολογικά δείγματα με μεγάλη περιεκτικότητα σε ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους, όπως είναι οι πρωτεΐνες, εφαρμόζεται ο παλμός CPMG που απομακρύνει τις ευρείες απορροφήσεις των πρωτεϊνών. Τα πειράματα CPMG οδηγούν σε φάσματα με μειωμένες τις εντάσεις των ευρέων σημάτων χρησιμοποιώντας τη διαφορά των χρόνων αποκατάστασης των μακρομορίων και των ενώσεων μικρού μοριακού βάρους. Έτσι τα φάσματα εμφανίζουν βελτιωμένη γραμμή βάσης, όπου οι αιχμηρές κορυφές των μεταβολιτών είναι ευκολότερο να παρατηρηθούν και να ποσοτικοποιηθούν. Ωστόσο, δεδομένου ότι και οι πληροφορίες που εξάγονται από τα μακρομόρια είναι εξίσου σημαντικές, εκτός του παλμού CPMG χρησιμοποιείται και η παλμική αλληλουχία LED. Τα πειράματα LED μειώνουν τις εντάσεις των μικρών μορίων με αποτέλεσμα τα φάσματα να αποτελούνται

κυρίως από τα ευρεία σήματα των μακρομορίων, επιτρέποντας την ταυτοποίηση λιπιδίων, λιποπρωτεϊνών και άλλων λιπαρών οξέων.

3.3 Επεξεργασία δεδομένων NMR

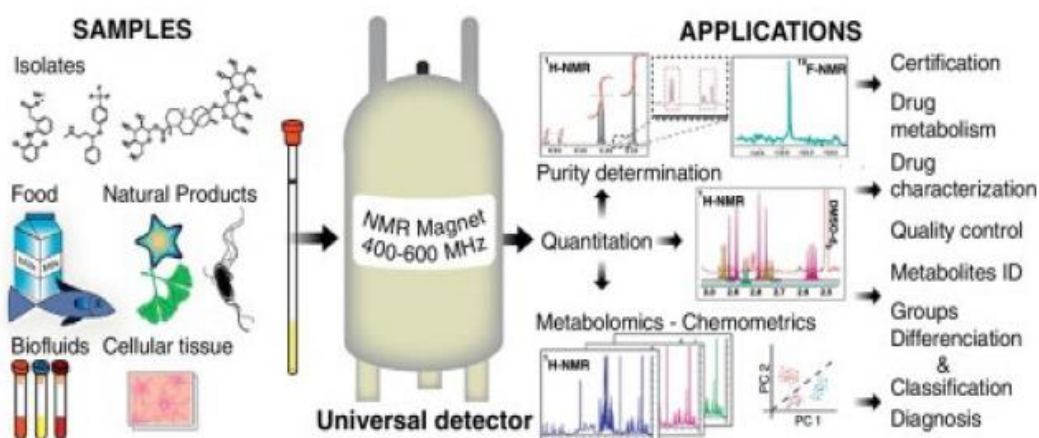
Η επεξεργασία των φασμάτων αποτελεί αναγκαίο και εξαιρετικά σημαντικό στάδιο που προηγείται της στατιστικής ανάλυσης των φασμάτων και καθορίζει την ποιότητά της σε εξίσου σημαντικό βαθμό με την παρασκευή των δειγμάτων και τη λήψη των φασμάτων. Η επεξεργασία των φασμάτων έγινε, είτε με εξειδικευμένα λογισμικά, είτε σε περιβάλλον MATLAB. Η μείωση του αριθμού των μεταβλητών (data reduction ή bucketing) των φασμάτων CPMG πλήρους ανάλυσης, πραγματοποιήθηκε με ομαδοποίηση σε ισαπέχοντα τμήματα (buckets) με τη βοήθεια του λογισμικού AMIX v.3.9.14 (Bruker BioSpin, Germany). Η ομαδοποίηση έγινε σε φασματικό εύρος 0,5 – 8,5 ppm, σε τμήματα των 0,005 ppm, στα οποία αντιστοιχήθηκε το εμβαδό των κορυφών που περιείχαν. Η τμηματοποίηση αυτή είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία 8001 φασματικών μεταβλητών. Ιδανικά, το εμβαδόν που περιέχεται σε κάθε τέτοια διαιρεμένη περιοχή θα ήταν χρήσιμο να αντιστοιχεί αποκλειστικά στην περιοχή που σχετίζεται με μία απορρόφηση σε κάθε φάσμα. Έπειτα από τη μείωση των διαστάσεων των δεδομένων, προκειμένου να δημιουργηθούν δεδομένα συγκρίσιμα μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε κανονικοποίησή τους (normalization). Η κανονικοποίηση αφορά στην ομαλοποίηση των διαφορών που συναντώνται ανάμεσα στα δείγματα εξαιτίας ποικίλων παραγόντων. Μία από τις πιο συνηθισμένες μεθόδους κανονικοποίησης είναι ως προς τη συνολική ένταση (Total Intensity) κάθε φάσματος και πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό AMIX. Κατά την εφαρμογή της σε κάθε νέα φασματική μεταβλητή αντιστοιχίζεται ο λόγος του εμβαδού της συγκεκριμένης περιοχής προς το συνολικό εμβαδό του εκάστοτε φάσματος. Ο πίνακας δεδομένων που προέκυψε ήταν αυτός που υποβλήθηκε στα εργαλεία της στατιστικής ανάλυσης.

Τα δείγματα αίματος συλλέχθηκαν σε φιαλίδια προγεμισμένα, είτε με EDTA, είτε με κιτρικό οξύ ως αντιπηκτικά συμπληρώματα. Αμφότερες ενώσεις, παρουσιάζουν ισχυρές κορυφές συντονισμού στα φάσματα ^1H NMR που παρεμποδίζουν την ανάλυση και για αυτό τον λόγο αφαιρούνται πριν τη διαδικασία της κανονικοποίησης από το

σύνολο δεδομένων NMR. Συγκεκριμένα, αφαιρέθηκαν οι ακόλουθες περιοχές, οι οποίες δεν έφεραν χρήσιμες πληροφορίες: δ 4,35-5,00 ppm που αντιστοιχεί στην περιοχή του υπολειπόμενου σήματος του διαλύτη, δ 2,47- 2,93 ppm περιοχή συντονισμού του κιτρικού οξέος, Ca-EDTA (δ 2.53- 2.59) και Mg-EDTA (δ 2.67-2.71), η περιοχή δ 3.06-3.03 ppm που αντιστοιχεί σε κορυφές Ca-EDTA, Mg-EDTA και η περιοχή δ 3.57-3.68 ppm που αντιστοιχεί σε κορυφές EDTA. Οι φασματικές περιοχές που αντιστοιχούν στο EDTA και τα σύμπλοκά του και στο κιτρικό οξύ αφαιρέθηκαν από το σύνολο των δειγμάτων, προκειμένου όλα τα φάσματα να περιγράφονται από τις ίδιες φασματικές μεταβλητές και να είναι δυνατή η ταυτόχρονη επεξεργασία του συνόλου των δειγμάτων. Η κανονικοποίηση των φασμάτων πραγματοποιήθηκε για τις φασματικές περιοχές που δεν εξαιρέθηκαν από την ανάλυση.

Για την ταυτοποίηση των μεταβολιτών στα φάσματα NMR χρησιμοποιήθηκαν διαδικτυακές βάσεις δεδομένων (HMDB, The Human Metabolome Database) και εξειδικευμένα λογισμικά (Chenomx NMR Suite v.8.4). Με το λογισμικό TOPSPIN (3.6.1 version, Bruker BioSpin GmbH) έγινε η προβολή των μονοδιάστατων και των δισδιάστατων φασμάτων.

Η Εικόνα 8 παρουσιάζει συνοπτικά τα προαναφερθέντα στάδια μίας μεταβολομικής μελέτης που πραγματοποιείται με τη χρήση Φασματοσκοπίας Μαγνητικού Πυρηνικού Συντονισμού.



Εικόνα 8: Σχηματικό διάγραμμα των βασικών σταδίων μίας μεταβολομικής μελέτης με χρήση φασματοσκοπίας NMR⁶²

3.4 Πολυπαραμετρική Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Στόχος των πειραμάτων της μεταβολομικής είναι η ανακάλυψη των διαφορών μεταξύ των μεταβολικών προφίλ δύο ή περισσότερων συστημάτων έτσι, ώστε να συναχθεί μια βιολογική σχέση. Η στατιστική επεξεργασία αποτελεί ένα πολύ σημαντικό στάδιο στη Μεταβολομική, καθώς δίνει τη δυνατότητα για αξιολόγηση και προσδιορισμό της αβεβαιότητας, αλλά και οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Κύριο στάδιο της ανάλυσης του μεταβολικού αποτυπώματος είναι η χρήση των μεθόδων της πολυμεταβλητής (πολυπαραμετρικής) ανάλυσης (multivariate analysis). Η πολυπαραμετρική ανάλυση δεδομένων επιτρέπει την εξαγωγή πληροφοριών από μεγάλα σύνολα δεδομένων, όπως είναι τα φάσματα NMR, με στόχο τη διάκριση ομάδων σε εξαιρετικά πολύπλοκα σύνολα δεδομένων. Δύο από τις περισσότερο εφαρμοζόμενες μεθόδους είναι η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Components Analysis, PCA) και η Διακρίνουσα Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Squares projection to latent structures – Discriminant Analysis, PLS-DA), καθώς και η Ορθογώνια Διακρίνουσα Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Orthogonal Projection to Latent Structures-Discriminant Analysis, OPLS-DA).

3.4.1 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Components Analysis, PCA)

Η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Components Analysis, PCA) αποτελεί την βάση της πολυπαραμετρικής ανάλυσης δεδομένων και είναι μία μη επιβλεπόμενη τεχνική. Έχει ως στόχο να διακρίνει ομάδες σε εξαιρετικά πολύπλοκα σύνολα δεδομένων, παρά την εγγενή μεταβλητότητα που υπάρχει μέσα στην ίδια ομάδα, καταλήγοντας σε ένα γραμμικό μετασχηματισμό που διατηρεί στο μεγαλύτερο δυνατό βαθμό τη μεταβλητότητα των αρχικών δεδομένων σε λιγότερες, όμως, διαστάσεις. Ειδικότερα, το μοντέλο αυτό χρησιμοποιεί ορθογώνιο μετασχηματισμό για να μετατρέψει ένα σύνολο παρατηρήσεων πιθανώς συσχετισμένων μεταβλητών, σε ένα σύνολο τιμών γραμμικά μη συσχετισμένων μεταβλητών που ονομάζονται κύριες συνιστώσες. Ο αριθμός των κύριων συνιστωσών είναι μικρότερος, είτε από τον αριθμό των αρχικών μεταβλητών ή τον αριθμό των παρατηρήσεων. Η πρώτη κύρια συνιστώσα παρουσιάζει τη μεγαλύτερη δυνατή διακύμανση (δηλαδή αντιπροσωπεύει όσο το δυνατόν

μεγαλύτερη μεταβλητότητα στα δεδομένα). Κάθε επακόλουθη κύρια συνιστώσα έχει τη μεγαλύτερη υπολειπόμενη δυνατή διακύμανση υπό τον περιορισμό ότι είναι ορθογώνια σε σχέση με τις προηγούμενες κύριες συνιστώσες. Το τελικό αποτέλεσμα είναι μη συσχετισμένα διανύσματα κύριων συνιστωσών που αποτελούν ένα ορθογώνιο σύνολο βάσης. Πρόκειται ουσιαστικά για ένα μαθηματικό αλγόριθμο που μειώνει τις διαστάσεις των δεδομένων και παράλληλα διατηρεί το μεγαλύτερο μέρος της πληροφορίας. Πρόκειται για ένα χώρο όπου τα δεδομένα αποτελούνται από ένα πίνακα με N σειρές (παρατηρήσεις) και με K στήλες (μεταβλητές). Οι παρατηρήσεις μπορεί να είναι δείγματα προς ανάλυση και οι μεταβλητές μπορεί να προέρχονται από κάποιο φάσμα NMR, IR, UV, αλλά και από χρωματογραφήματα (HPLC, GC).⁶³⁻⁶⁵

3.4.2 Διακρίνουσα Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Squares - Discriminant Analysis, PLS-DA)

Η Διακρίνουσα Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Squares-Discriminant Analysis, PLS-DA) αποτελεί επιβλεπόμενη τεχνική πολυπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης, προέκταση της μεθόδου PCA που βασίζεται στην ιδιότητα ομάδας (class membership) κάθε παρατήρησης. Ειδικότερα, στηρίζεται στην μέθοδο των προβολών και στην εξαγωγή κυρίων συνιστωσών με στόχο την επίτευξη της καλύτερης δυνατής συσχέτισης μεταξύ των μεταβλητών X και Y . Και σε αυτή την περίπτωση, όπως και στην PCA, τα δεδομένα αποτελούνται από ένα πίνακα ο οποίος περιλαμβάνει τις παρατηρήσεις και τις μεταβλητές, με την μόνη διαφορά ότι οι παρατηρήσεις ταξινομούνται σε ομάδες. Τεχνικά προστίθεται μια επιπλέον στήλη όπου καταγράφονται οι ομάδες των παρατηρήσεων. Με τη βοήθεια των κυρίων συνιστωσών που εξάγονται από τις μεταβλητές κάθε ομάδας τα δείγματα θα ταξινομηθούν στην ομάδα όπου ανήκουν.⁶⁶⁻⁶⁷

3.4.3 Ορθογώνια Διακρίνουσα Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Orthogonal Partial Least Squares – Discriminant Analysis, OPLS-DA)

Η Ορθογώνια Διακρίνουσα Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Orthogonal Partial Least Squares – Discriminant Analysis, OPLS-DA) είναι επίσης επιβλεπόμενη τεχνική και αποτελεί επέκταση της προηγούμενης μεθόδου.

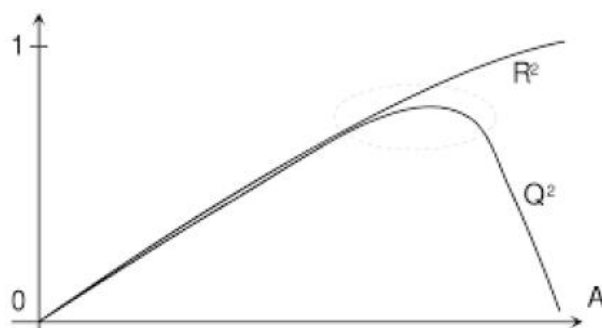
Χρησιμοποιείται για τις περιπτώσεις εκείνες όπου χρειάζεται πιο σαφής διαχωρισμός μεταξύ των ομάδων των παρατηρήσεων ώστε να γίνουν πιο κατανοητά τα αποτελέσματα. Η OPLS αφαιρεί την διακύμανση των X η οποία είναι κάθετη προς τα Y και είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την αφαίρεση ανεπιθύμητων συνιστωσών οι οποίες είναι ορθογώνιες ως προς τον πίνακα Y . Η τεχνική αυτή πλεονεκτεί στο γεγονός ότι τα δεδομένα που έχουν αναλυθεί με αυτή την τεχνική είναι πιο εύκολο στη συνέχεια να ερμηνευτούν με λιγότερες και πιο περιεκτικές συνιστώσες. Ο διαχωρισμός μεταξύ των ομάδων παρατηρήσεων είναι ευκρινέστερος, καθώς και η εύρεση των σημαντικών χαρακτηριστικών που είναι υπεύθυνα για την ομαδοποίηση.⁶⁶

3.5 Οπτικοποίηση Αποτελεσμάτων

Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται με τη βοήθεια των διαγραμμάτων αντικειμένων (scores plot) και φορτίων (loadings plot). Κάθε σημείο του διαγράμματος αντικειμένων (scores) αντιστοιχεί σε ένα δείγμα και μέσω αυτού εντοπίζονται οι διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, την πιθανή ομαδοποίησή τους, αλλά και την ύπαρξη έκτροπων τιμών (outliers). Στο διάγραμμα φορτίων, τα φορτία (loadings) αντιπροσωπεύουν τον τρόπο με τον οποίο οι αρχικές μεταβλητές σχηματίζουν τις νέες μεταβλητές μέσω γραμμικού συνδυασμού τους.

Απαραίτητος κρίνεται επίσης και ο έλεγχος του στατιστικού μοντέλου με τη βοήθεια διαγνωστικών παραμέτρων, όπως το κριτήριο Hotelling's T^2 , το οποίο δείχνει τις έκτροπες τιμές (outliers) που εμφανίζονται στο διάγραμμα αντικειμένων και έχουν ισχυρή επίδραση στο μοντέλο. Οι συντελεστές R^2 (συντελεστής συσχέτισης) και Q^2 (διασταυρούμενος συντελεστής συσχέτισης) δείχνουν την ικανότητα περιγραφής (ή προσαρμογής) και την ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου, αντίστοιχα. Ο συντελεστής R^2 δείχνει επίσης το πόσο καλά μπορούν να αναπαραχθούν μαθηματικά τα δεδομένα του συνόλου εκμάθησης. Σύμφωνα με το διάγραμμα που παρατίθεται τα R^2 και Q^2 τείνουν να έχουν διαφορετική συμπεριφορά όσο αυξάνεται η πολυπλοκότητα του μοντέλου (αυξάνεται όσο συμπεριλαμβάνεται μεγαλύτερος αριθμός κυρίων συνιστωσών). Το R^2 τείνει στο 1 όσο αυξάνεται η πολυπλοκότητα, ενώ το Q^2 φαίνεται να εμφανίζει ένα μέγιστο (πλατώ) και από εκεί και ύστερα αρχίζει να μειώνεται, παρά την

προσθήκη επιπλέον κυρίων συνιστωσών, όπως αυτό διαφαίνεται στο διάγραμμα της Εικόνας 9.



Εικόνα 9: Διάγραμμα που διαφαίνονται οι συντελεστές R^2 και Q^2 για την ικανότητα περιγραφής και την ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου⁶⁸

Τέλος, στις μεταβολομικές μελέτες πρέπει να πραγματοποιείται εξομάλυνση των δεδομένων, δηλαδή εξάλειψη του συστηματικού σφάλματος που ενυπάρχει στα δεδομένα και επηρεάζει τα αποτελέσματα της ανάλυσης. Κυρίως στα στατιστικά μοντέλα εφαρμόζεται ως μέθοδος εξομάλυνσης η κλιμάκωση των δεδομένων (scaling) με αποτέλεσμα κάθε μεταβλητή να έχει την ίδια συνεισφορά στο μοντέλο. Η διαδικασία αυτή μπορεί να γίνει με πολλούς τρόπους αλλά, κυρίως χρησιμοποιούνται οι μεθοδολογίες Unit Variance (UV) και το Pareto (Par).⁶⁸

3.6 Επικύρωση μοντέλων

Για τον έλεγχο της αξιοπιστίας και της υπερπροσαρμογής των μοντέλων PLS χρησιμοποιούνται τα διαγράμματα μεταθέσεων (permutation splots) τα οποία παράγονται μεταθέτοντας τυχαία τις τιμές Y , παράγοντας με αυτόν τον τρόπο αριθμό συνιστωσών ίσο με εκείνες στο αρχικό μοντέλο. Οι μεταθετικοί έλεγχοι (permutation test) πραγματοποιούνται ώστε να διευκρινιστεί αν μία πιθανή καλή διάκριση στον διαχωρισμό των ομάδων μπορεί να είναι στατιστικά σημαντική ή να οφείλεται σε τυχαία συσχέτιση. Το διάγραμμα που προκύπτει παρουσιάζει στον άξονα X το συντελεστή διακύμανσης μεταξύ της αρχικής τιμής Y και των τιμών που έχουν προκύψει από τις τυχαίες μεταθέσεις, ενώ στον άξονα Y τις τιμές R^2 και Q^2 για το κάθε μοντέλο. Ένα μοντέλο κρίνεται αξιόπιστο και ισχυρό, εάν οι τιμές R^2 και Q^2 που προέρχονται από τυχαίες μεταθέσεις των Y είναι χαμηλότερες από τις πραγματικές τιμές R^2 και Q^2 , ενώ αν

συμβαίνει το αντίθετο, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα τα αποτελέσματα του μοντέλου να οφείλονται στην τύχη.⁶⁹

3.7 Επιλογή χαρακτηριστικών που συμβάλλουν στην ομαδοποίηση

Για την εύρεση των στατιστικά σημαντικών χαρακτηριστικών κατασκευάζεται το διάγραμμα S-plot το οποίο χρησιμοποιείται για την παρουσίαση της συνδιακύμανσης και της συσχέτισης των μεταβλητών με το άνυσμα της πρόβλεψης $t[1]$. Οι μεταβλητές που απέχουν περισσότερο στον οριζόντιο άξονα του διαγράμματος (X) είναι οι κυρίως υπεύθυνες για τον διαχωρισμό, ενώ αυτές που απέχουν περισσότερο από τον κατακόρυφο άξονα (Y) είναι αυτές που συμβάλλουν περισσότερο στην ομαδοποίηση των δεδομένων.⁷⁰

Το επόμενο βήμα μετά την πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση των δεδομένων είναι η εύρεση των μεταβολιών εκείνων στους οποίους οφείλεται ο παρατηρούμενος διαχωρισμός των ομάδων. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται τα διαγράμματα των Σημαντικών Μεταβλητών για την Προβολή (Variable Importance in the Projection VIP) τα οποία λαμβάνονται από τις μεθόδους PLS-DA και OPLS-DA. Το διάγραμμα αυτό περιγράφει την σχέση των μεταβλητών Y και X. Απαιτείται η τιμή VIP να είναι όσο το δυνατόν υψηλότερη και σε κάθε περίπτωση >1 , καθώς όσο πιο υψηλή η τιμή αυτή τόσο πιο σημαντική είναι η συμμετοχή του δεδομένου αυτού στην διάκριση των ομάδων.⁷¹

3.8 Μονοπαραμετρική Στατιστική ανάλυση των Αποτελεσμάτων

Εκτός της Πολυπαραμετρικής Στατιστικής ανάλυσης με στόχο την ομαδοποίηση των δεδομένων, σημαντικό στάδιο της ανάλυσης του μεταβολικού αποτυπώματος είναι και η χρήση της μονοπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης (univariate analysis). Η μονοπαραμετρική ανάλυση δεδομένων επιτρέπει την απεικόνιση και τη μελέτη της στατιστικής κατανομής των δεδομένων ανά παράμετρο ενδιαφέροντος.

Αρχικά, πραγματοποιείται η αναγνώριση εκτρόπων τιμών, όπου ως έκτροπη τιμή (outlier) σε ένα πληθυσμιακό δείγμα χαρακτηρίζεται κάθε τιμή που ανήκει σε διαφορετικό πληθυσμό από τον πληθυσμό της πλειονότητας των μετρήσεων. Ακολουθεί

και έλεγχος της κανονικότητας (normality) προκειμένου να αποσαφηνιστεί αν η κατανομή του πληθυσμού είναι κανονική ή αν τα δεδομένα ακολουθούν κατά κανόνα διαφορετικές ή και απρόβλεπτες κατανομές, όπως στην περίπτωση των περισσότερων υπό εξέταση δειγμάτων κλινικού ενδιαφέροντος. Στην περίπτωση που τα δεδομένα ακολουθούν κανονική κατανομή (normal distribution) ή κατανομή κατά Gauss (Gaussian distribution), τότε σε δεδομένη στάθμη εμπιστοσύνης (Confidence level, CL) εφαρμόζεται η δοκιμασία F (F του Snedecor) για να εξαχθούν συμπεράσματα ως προς το αν οι διακυμάνσεις δύο πληθυσμών είναι ίδιες ή όχι. Τέλος, σε περίπτωση όπου έστω και ένας από τους ελέγχους κανονικότητας δείξουν ότι δεν ακολουθείται κανονική κατανομή τότε εφαρμόζονται μη παραμετρικές στατιστικές δοκιμασίες.

3.9 Επικύρωση υποψήφιων βιοδεικτών

Ένας από τους απώτερους στόχους μίας μεταβολομικής μελέτης είναι η εύρεση σημαντικών βιοδεικτών που βοηθούν στην έγκαιρη πρόβλεψη μίας ασθένειας. Για να μπορούμε να θεωρήσουμε ότι ένα μοντέλο παρουσιάζει επιτυχημένη ταξινόμηση, πρέπει τα χαρακτηριστικά του μοντέλου αυτού να έχουν την ικανότητα να διαχωρίζουν τις υπό μελέτη ομάδες. Όταν αναφερόμαστε σε μοντέλα ταξινόμησης τότε μπορούμε να βασιστούμε στις καμπύλες λειτουργικού χαρακτηριστικού δείκτη (Receiver Operating Characteristic, ROC), αλλά και στα διαγράμματα θηκογράμματος (Boxplots). Και οι καμπύλες ROC και τα διαγράμματα «boxplots» συνιστούν ευρέως διαδεδομένα στατιστικά εργαλεία για την επικύρωση της ταξινόμησης ενός μοντέλου.

Πιο συγκεκριμένα, η καμπύλη ROC χρησιμοποιείται για την επικύρωση της ταξινόμησης του εφαρμοζόμενου στατιστικού μοντέλου, αλλά και για τον προσδιορισμό της ειδικότητας και της ευαισθησίας του μοντέλου. Απεικονίζει το πως το αληθώς θετικό ποσοστό αποτελεσμάτων, που αναφέρεται στην ευαισθησία του μοντέλου, αλλάζει με το ψευδώς θετικό ποσοστό αποτελεσμάτων, που αναφέρεται στην ειδικότητα του μοντέλου. Η καμπύλη αυτή παράγεται από τον σχεδιασμό του πραγματικά θετικού ποσοστού σε συνάρτηση με το ψευδώς θετικό ποσοστό των αποτελεσμάτων, ενώ όσον αφορά την περιοχή κάτω από την καμπύλη ROC (Area Under Curve, AUC) αυτή αποτελεί μέτρο της επίδοσης του μοντέλου ταξινόμησης. Όταν αυτή η περιοχή έχει τιμή κοντά στο 1, τότε το μοντέλο είναι επιτυχημένο, χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία

και ειδικότητα και το υπό έλεγχο χαρακτηριστικό μπορεί να θεωρηθεί με ασφάλεια υποψήφιος βιοδείκτης. Όταν η περιοχή έχει τιμές εμβαδού μικρότερες του 0,6 τότε υποδηλώνεται αποτυχία στην ταξινόμηση.^{72,73}

Το θηκόγραμμα (boxplot) αποτελεί άλλο ένα στατιστικό εργαλείο για την επικύρωση των χαρακτηριστικών ενός μοντέλου. Οι πληροφορίες που παρέχει αφορούν τη διάμεση τιμή, τη διαφορά πρώτου και τρίτου τεταρτημορίου και την ύπαρξη έκτροπων τιμών. Σε ένα θηκόγραμμα στον άξονα των X απεικονίζεται η ποιοτική μεταβλητή και στον άξονα των Ψ η ποσοτική μεταβλητή. Η γραμμή που βρίσκεται μέσα σε αυτό δείχνει τη διάμεση τιμή, ενώ οι αποστάσεις μεταξύ των δύο άκρων αντιπροσωπεύουν το μέγεθος της διασποράς και της ασυμμετρίας των δεδομένων.⁷³

4. Αποτελέσματα

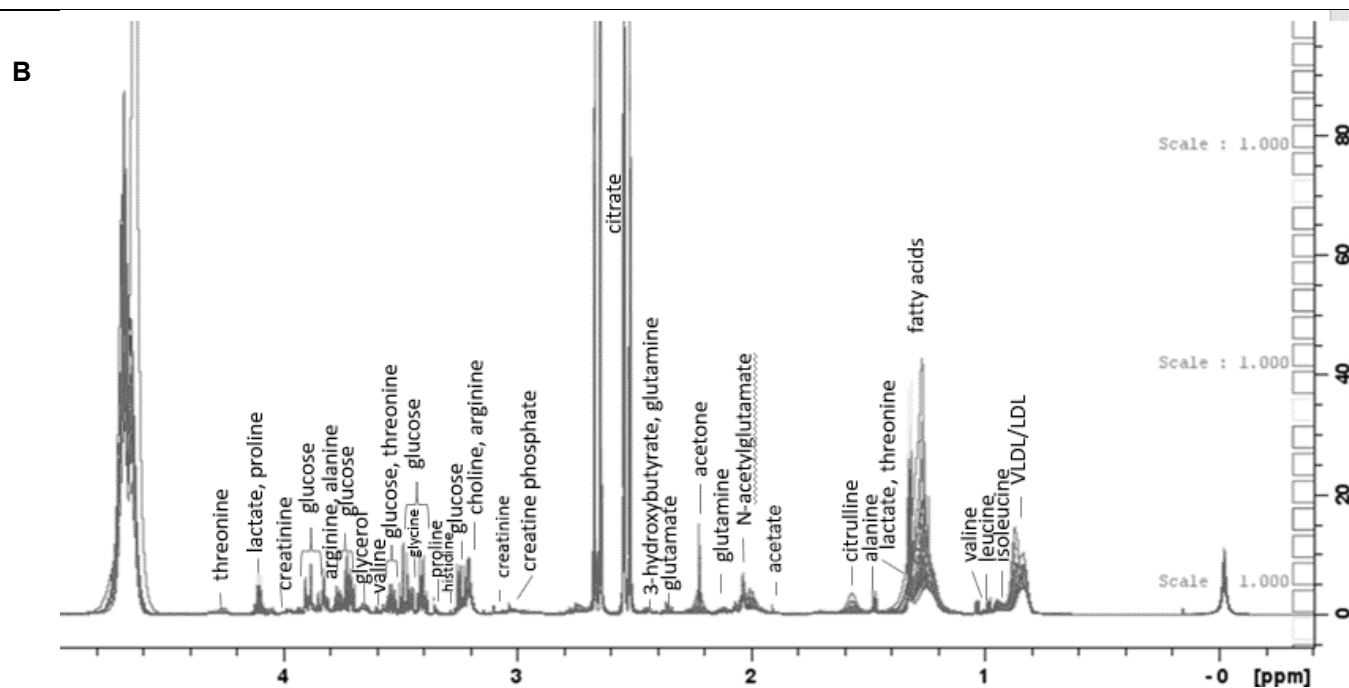
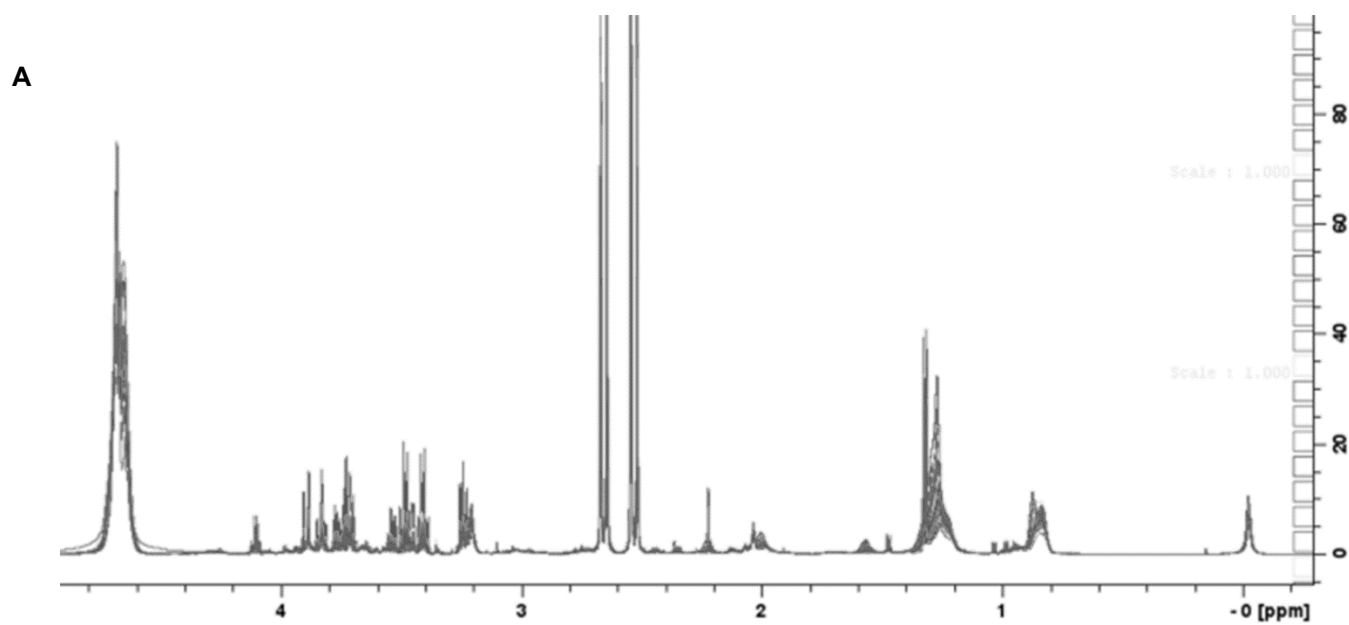
4.1 Αναγνώριση Μεταβολιτών στο φάσμα NMR

Με τη φασματοσκοπία NMR μελετήθηκαν 59 δείγματα πλάσματος υγιών ατόμων μετά την 22^η ημέρα από τον εμβολιασμό τους με το εμβόλιο BNT162b2 COVID-19. Από αυτά τα δείγματα 29 δείγματα προέρχονται από άτομα με μικρό αριθμό εξουδετερωτικών αντισωμάτων (άτομα χαμηλής απόκρισης, Low Responders) και 30 δείγματα προέρχονται από άτομα με μεγάλο αριθμό εξουδετερωτικών αντισωμάτων (άτομα υψηλής απόκρισης, High Responders). Για την ταυτοποίηση των μεταβολιτών στα φάσματα NMR χρησιμοποιήθηκε το εξειδικευμένο λογισμικό Chenomx NMR Suite v. 8.4 και η διαδικτυακή βάση δεδομένων HMDB (The Human Metabolome Database). Για την προβολή των φασμάτων στον μονοδιάστατο χώρο χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Top Spin. Οι μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 1, ενώ στην Εικόνα 10 παρουσιάζεται αντιπροσωπευτικό φάσμα $1D^{11}H$ -NMR με την απόδοση κορυφών συντονισμού.

Πίνακας 1: Μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν με φασματοσκοπία NMR σε δείγματα πλάσματος ατόμων μετά την 22η ημέρα από τον εμβολιασμό τους με το εμβόλιο BNT162b2 COVID-19

	Μεταβολίτης	Χημική μετατόπιση δ (ppm) και πολλαπλότητα κορυφής (s, d, t, q, m, dd)
1	VLDL / LDL	0,845 (s, broad)
2	Isoleucine	0,942 (t)
3	Leucine	0,981 (t)
4	Valine	1,032 (d), 3,602 (d)
5	Lysine	1,904 (m), 1,717 (m), 3,090 (m)
6	Proline	3,355 (m), 4,105 (q)
7	Threonine	4,226 (m), 3,750 (d), 1,319 (d)
8	3- hydroxybutyrate	1,233 (d), 2,389 (q), 2,446 (q), 4,116 (q)
9	Lactate	1,319 (d), 4,105 (q)
10	Alanine	1,472 (d), 3,760 (q)

11	Citrulline	1.568 (m), 1.909 (m)
12	Arginine	1,901 (m), 3,312 (t), 3,712 (t)
13	Acetone	2,222 (s)
14	N-acetylglutamate	2,036 (s), 2,069 (t)
15	Glutamine	2,123 (m), 2,466 (m)
16	Glutamate	2,122 (m), 2,349 (m), 3,762 (m)
17	Methanol	3,362 (s)
18	Glycerol	3,561 (q), 3,652 (q)
19	Acetate	1,909 (s)
20	Pyruvate	2,409 (s)
21	Succinate	2,409 (s)
22	Citrate	2,528 (d), 2,659 (d)
23	Creatinine	3,011 (s), 4,045 (s)
24	Creatine phosphate	3,025 (s)
25	Choline	3,207 (s), 4,064 (m)
26	Glucose	3,244 (t), 3,408 (m), 3,488 (t), 3,450 (m), 3,532 (dd), 3,713 (m), 3,762 (q), 3,830 (m), 3,893 (dd), 4,639 (d), 5,230 (d)
27	Ornithine	3,057 (t), 3,782 (t), 1,920 (m), 1,818 (m), 1,743 (m)
28	Cis-Aconitate	5,679 (s)
29	Tyrosine	6,893 (d), 7,189 (d)
30	3-Methylhistidine	7,657 (s), 6,954 (s)
31	Phenylalanine	7,324 (m), 7,371 (m), 7,423 (m)
32	Histidine	3,100 (d), 3,131 (d), 3,244 (q), 3,922(t), 7,055(s), 7,780 (s)
33	Formate	8,452 (s)
34	Glycine	3,555 (s)
35	Fatty acid region	1,264 (s, broad), 5,291 (s, broad)



Εικόνα 10: Αντιπαράβολή φασμάτων ^1H -NMR δείγματος πλάσματος (A) ατόμων χαμηλής απόκρισης εμβολιασμένων με anti-COVID εμβόλιο και (B) ατόμων υψηλής απόκρισης

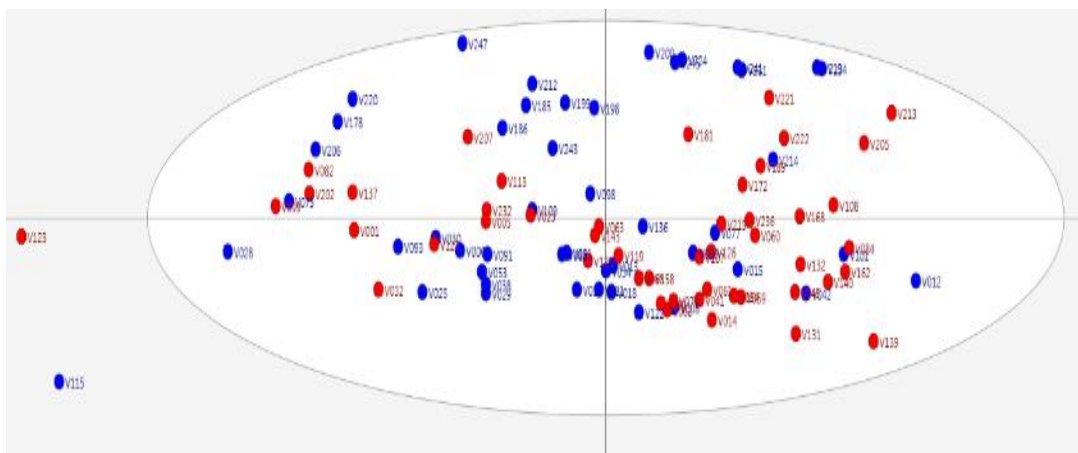
εμβολιασμένων με anti-COVID εμβόλιο με χρήση του παλμού CPMG στο οποίο φαίνονται οι κυριότεροι μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν στην περιοχή χημικής μετατόπισης $\delta = 0-5$ ppm.

Στην Εικόνα 10 παρουσιάζεται το φάσμα 1D NMR δειγμάτων πλάσματος, τα οποία έχουν ληφθεί με τη παλμική αλληλουχία CPMG με στόχο την ελαχιστοποίηση των κορυφών συντονισμού των μακρομορίων. Η εφαρμογή της συγκεκριμένης αλληλουχίας επιτυγχάνει τη βελτίωση της γραμμής βάσης, ώστε να είναι εφικτή η ανίχνευση μικρών μορίων – μεταβολιτών. Παρά τη βελτίωση της γραμμής βάσης, υπολειπόμενες κορυφές συντονισμού οι οποίες προέρχονται από λιποπρωτεΐνες (λιπίδια LDL, VLDL και λιπαρά οξέα) συνεχίζουν να παρατηρούνται στα φάσματα.

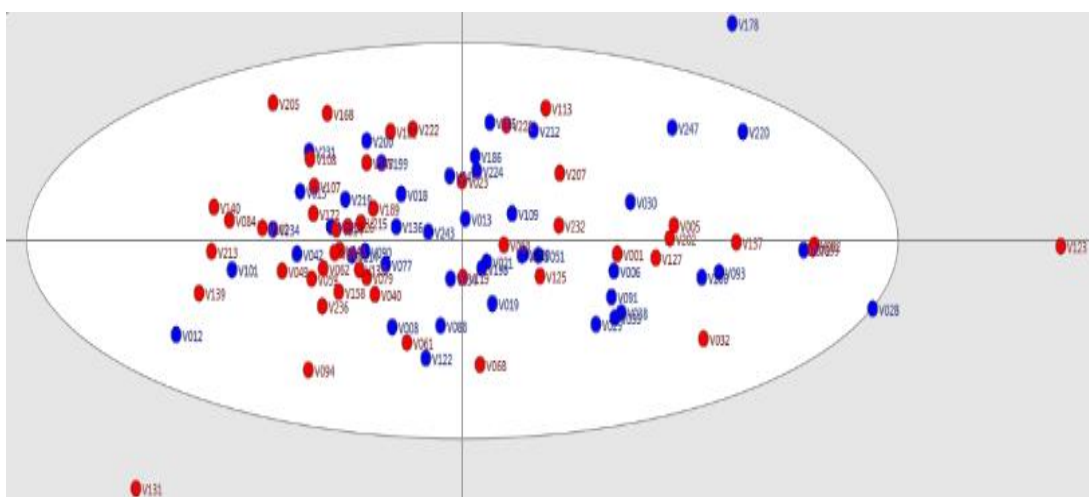
4.2 Χημειομετρική ανάλυση αποτελεσμάτων

Μετά την τμηματοποίηση (bucketing) των φασματικών δεδομένων ακολούθησε η εισαγωγή του πίνακα στο λογισμικό στατιστικής ανάλυσης της SIMCAP-14.1. Παρακάτω παρουσιάζονται τα καταλληλότερα μοντέλα ανάλυσης των αποτελεσμάτων μέσω των διαγραμμάτων αντικειμένων (scores plots) και φορτίων (loadings plots), καθώς και των διαγραμμάτων S και VIP plots.

Στην Εικόνα 11 παρουσιάζεται το διάγραμμα αντικειμένων PCA για όλους τους συμμετέχοντες χρησιμοποιώντας κλιμάκωση UV και στην Εικόνα 12 παρουσιάζεται η κλιμάκωση Pareto. Η περιγραφική ικανότητα του μοντέλου με UV scaling είναι $R^2X(\text{cum})=0,479$ και η προβλεπτική του ικανότητα είναι $Q^2(\text{cum})=0,284$. Με κλιμάκωση Pareto, που θεωρείται ότι ενδείκνυται για φασματικά δεδομένα, η περιγραφική ικανότητα είναι $R^2X(\text{cum})=0,423$ και η προβλεπτική του ικανότητα είναι $Q^2(\text{cum})=0,164$. Όπως φαίνεται και από τα διαγράμματα PCA της Εικόνας 12 και της Εικόνας 13 δεν επιτυγχάνεται ένας καλός διαχωρισμός μεταξύ των δύο ομάδων.

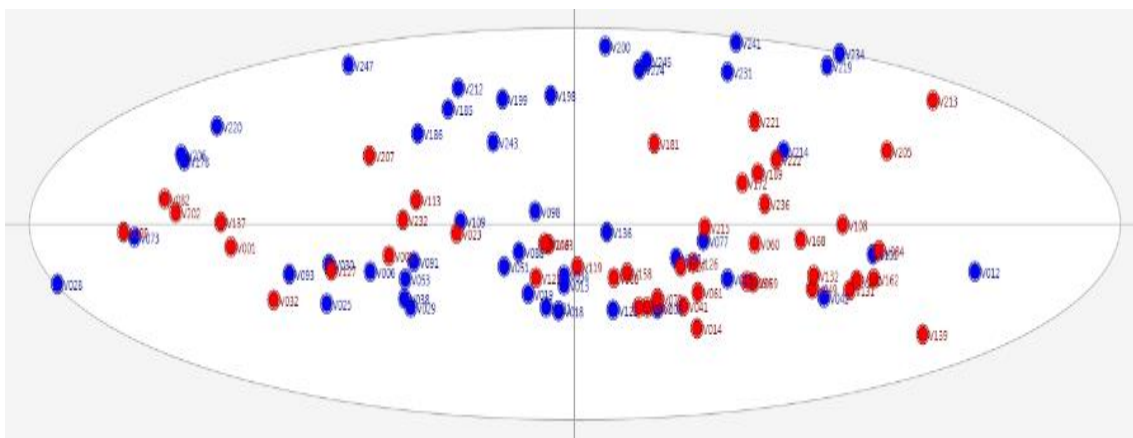


Εικόνα 11: Απεικόνιση αντικειμένων PCA των δεδομένων NMR κατόπιν κλιμάκωσης UV για τα άτομα χαμηλής απόκρισης (μπλε απόχρωση) και υψηλής απόκρισης (κόκκινη απόχρωση)

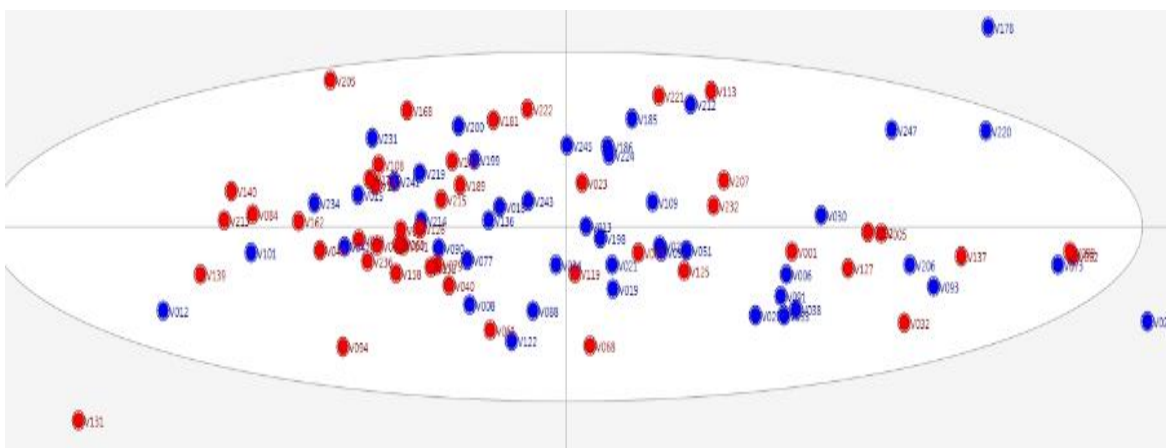


Εικόνα 12: Απεικόνιση αντικειμένων PCA των δεδομένων NMR κατόπιν κλιμάκωσης Pareto για τα άτομα χαμηλής απόκρισης (μπλε απόχρωση) και υψηλής απόκρισης (κόκκινη απόχρωση)

Εκτός του ότι δεν επιτεύχθηκε καλός διαχωρισμός των ομάδων, στα διαγράμματα PCA υπήρχαν και έκτροπες τιμές (outliers), οι οποίες αφαιρέθηκαν στη συνέχεια, όπως παρουσιάζεται στα επόμενα διαγράμματα. Η περιγραφική ικανότητα του μοντέλου με UV scaling είναι $R^2X(\text{cum})=0,466$ και η προβλεπτική του ικανότητα είναι $Q^2(\text{cum})=0,233$. Με το Pareto scaling η περιγραφική ικανότητα είναι $R^2X(\text{cum})=0,810$ και η προβλεπτική του ικανότητα είναι $Q^2(\text{cum})=0,712$. Η εικόνα ωστόσο του διαχωρισμού δεν φάνηκε να βελτιώνεται ούτε με τη χρήση UV scaling, αλλά ούτε και με τη χρήση Pareto scaling, όπως διαφαίνεται και στις Εικόνες 13 και 14, αντίστοιχα.



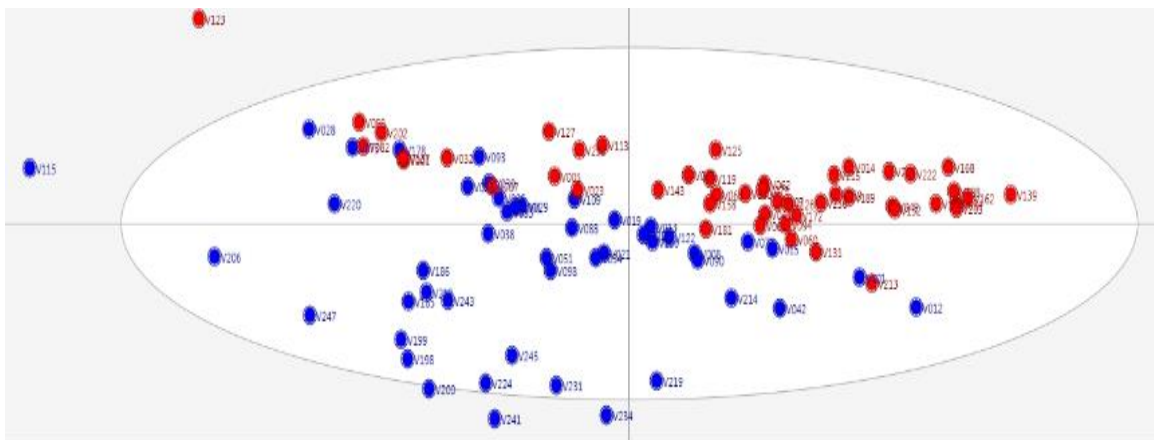
Εικόνα 13: Απεικόνιση αντικειμένων PCA των δεδομένων NMR κατόπιν κλιμάκωσης με UV και αφαίρεση των εκτρόπων τιμών για τα άτομα χαμηλής απόκρισης (μπλε απόχρωση) και υψηλής απόκρισης (κόκκινη απόχρωση)



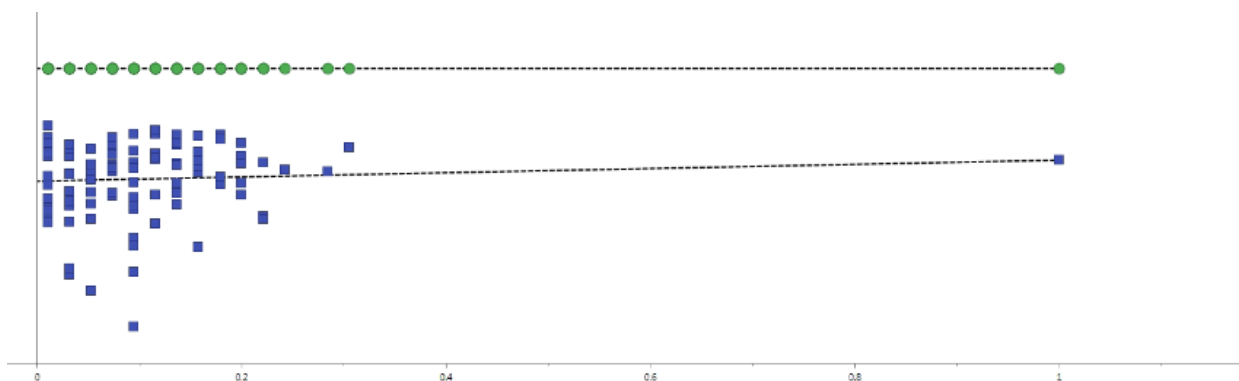
Εικόνα 14: Απεικόνιση αντικειμένων PCA των δεδομένων NMR κατόπιν κλιμάκωσης Pareto και αφαίρεση των εκτρόπων τιμών για τα άτομα χαμηλής απόκρισης (μπλε απόχρωση) και υψηλής απόκρισης (κόκκινη απόχρωση)

Η πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση συνεχίστηκε με την εφαρμογή της επιβλεπόμενης μεθόδου PLS-DA. Όπως και προηγουμένως, έτσι και για την μέθοδο PLS-DA έγινε χρήση των δύο τρόπων κλιμάκωσης UV και Pareto scaling. Όπως φαίνεται στα παρακάτω διαγράμματα φαίνεται να υπάρχει καλύτερος διαχωρισμός σε σχέση με το μοντέλο PCA. Ο δύο κλιμακώσεις φαίνεται να μην έχουν μεγάλες διαφορές στο διάγραμμα αντικειμένων PLS-DA, όπως αυτές παρουσιάζονται στα διαγράμματα των Εικόνων 15 και 17. Η επικύρωση του μοντέλου PLS-DA έγινε με τον μεταθετικό

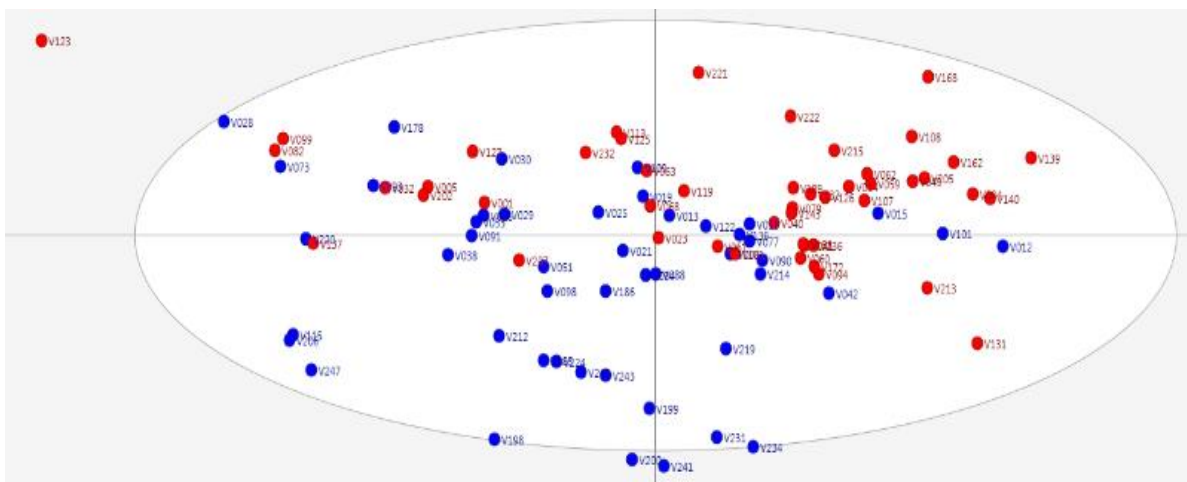
έλεγχο (permutationtest), επιτρέποντας 100 τυχαίες μεταθέσεις, προκειμένου να αξιολογηθεί η προβλεψιμότητα του μοντέλου και για τους δύο τρόπους κλιμάκωσης. Στην κλιμάκωση UV οι τομές ήταν $R^2=(0, 0,1)$, $Q^2=(0, 0,905)$, ενώ στην κλιμάκωση Pareto οι τομές ήταν $R^2=(0, 0,161)$, $Q^2=(0, -0,135)$. Από το διάγραμμα μεταθετικού ελέγχου προκύπτει ότι το μοντέλο PLS-DA με την κλιμάκωση UV δεν είναι έγκυρο(Εικόνα 16), ενώ με την κλίμακα Pareto είναι έγκυρο (Εικόνα 18).



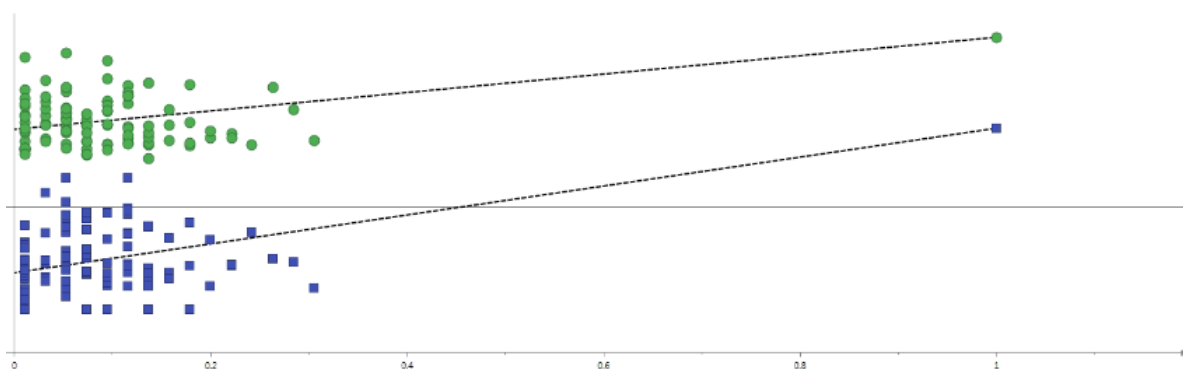
Εικόνα 15: Απεικόνιση αντικειμένων PLS-DA των δεδομένων NMR κατόπιν κλιμάκωσης με UV για τα άτομα χαμηλής απόκρισης (μπλε απόχρωση) και υψηλής απόκρισης (κόκκινη απόχρωση)



Εικόνα 16: Μεταθετικός έλεγχος επιτρέποντας 100 τυχαίες μεταθέσεις για το μοντέλο PLS-DA από την ανάλυση δείγματος πλάσματος, όπου R^2 με πράσινη απόχρωση και Q^2 με μπλε απόχρωση (Μη έγκυρο μοντέλο)

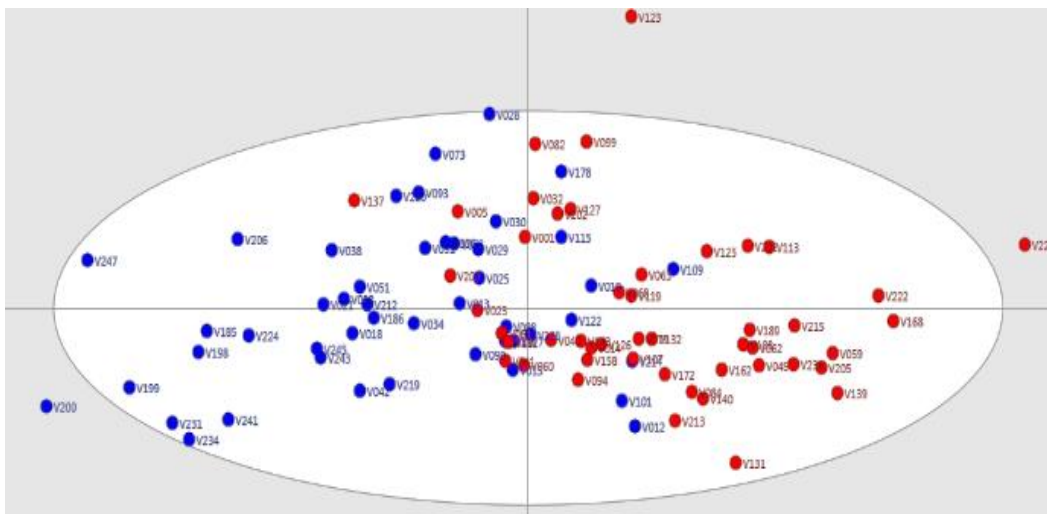


Εικόνα 17: Απεικόνιση αντικειμένων PLS-DA των δεδομένων NMR κατόπιν κλιμάκωσης με Pareto για τα άτομα χαμηλής απόκρισης (μπλε απόχρωση) και υψηλής απόκρισης (κόκκινη απόχρωση)

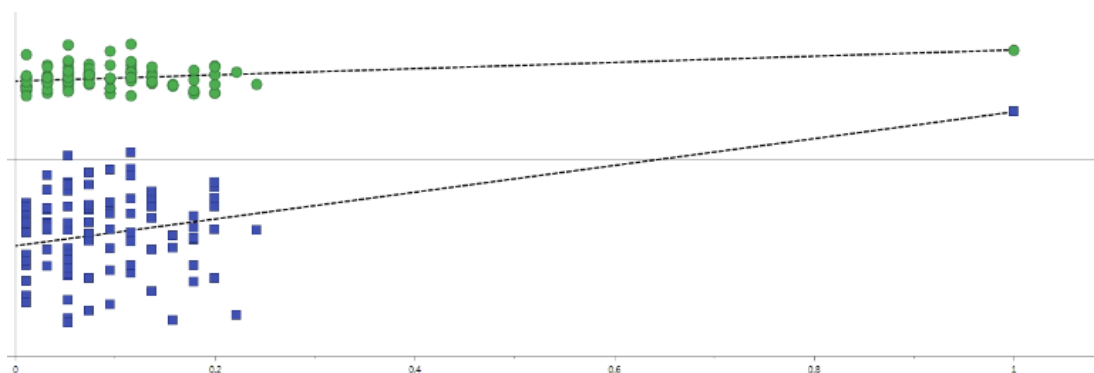


Εικόνα 18: Μεταθετικός έλεγχος επιτρέποντας 100 τυχαίες μεταθέσεις για το μοντέλο PLS-DA από την ανάλυση δείγματος πλάσματος, όπου R^2 με πράσινη απόχρωση και Q^2 με μπλε απόχρωση (Έγκυρο μοντέλο)

Τέλος, πραγματοποιήθηκε και η στατιστική ανάλυση με την επίσης επιβλεπόμενη μέθοδο OPLS-DA μόνο με Pareto scaling και επιτεύχθηκε καλός διαχωρισμός μεταξύ των δύο ομάδων όπως φαίνεται και στην Εικόνα 19. Η επικύρωση του μοντέλου OPLS-DA έγινε με τον μεταθετικό έλεγχο (permutation test), επιτρέποντας 100 τυχαίες μεταθέσεις. Το μοντέλο θεωρείται έγκυρο και οι τομές ήταν $R^2=(0, 0,316)$, $Q^2=(0, -0,351)$, όπως παρουσιάζονται στην Εικόνα 20.

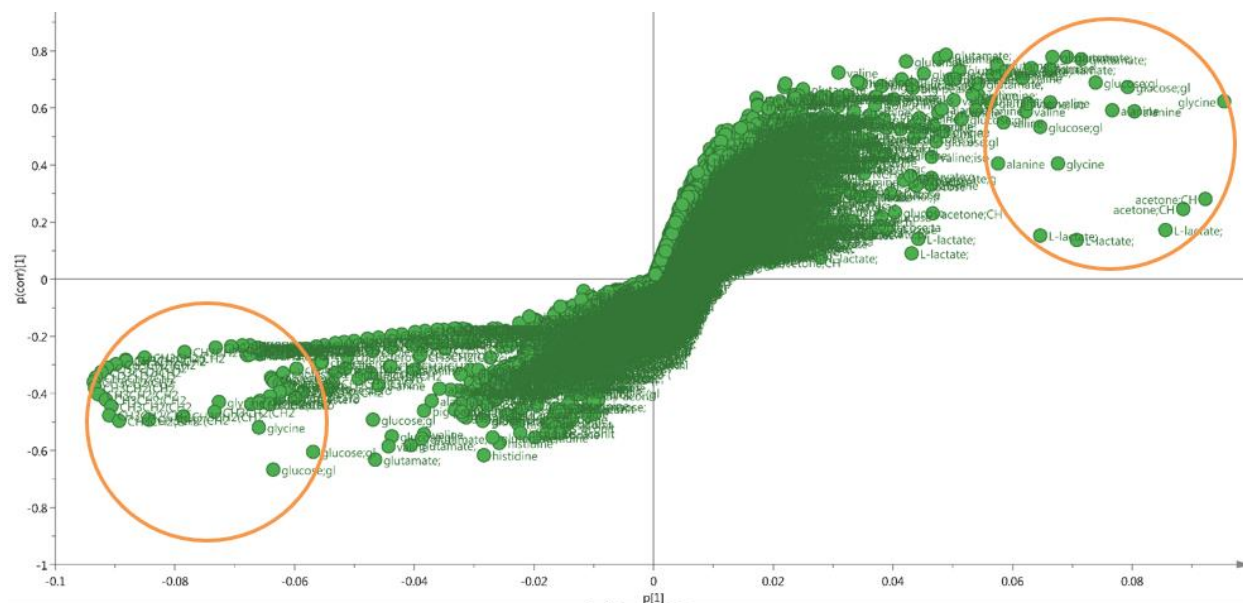


Εικόνα 19: Απεικόνιση αντικειμένων OPLS-DA των δεδομένων NMR κατόπιν κλιμάκωσης με Pareto για τα άτομα χαμηλής απόκρισης (μπλε απόχρωση) και υψηλής απόκρισης (κόκκινη απόχρωση)



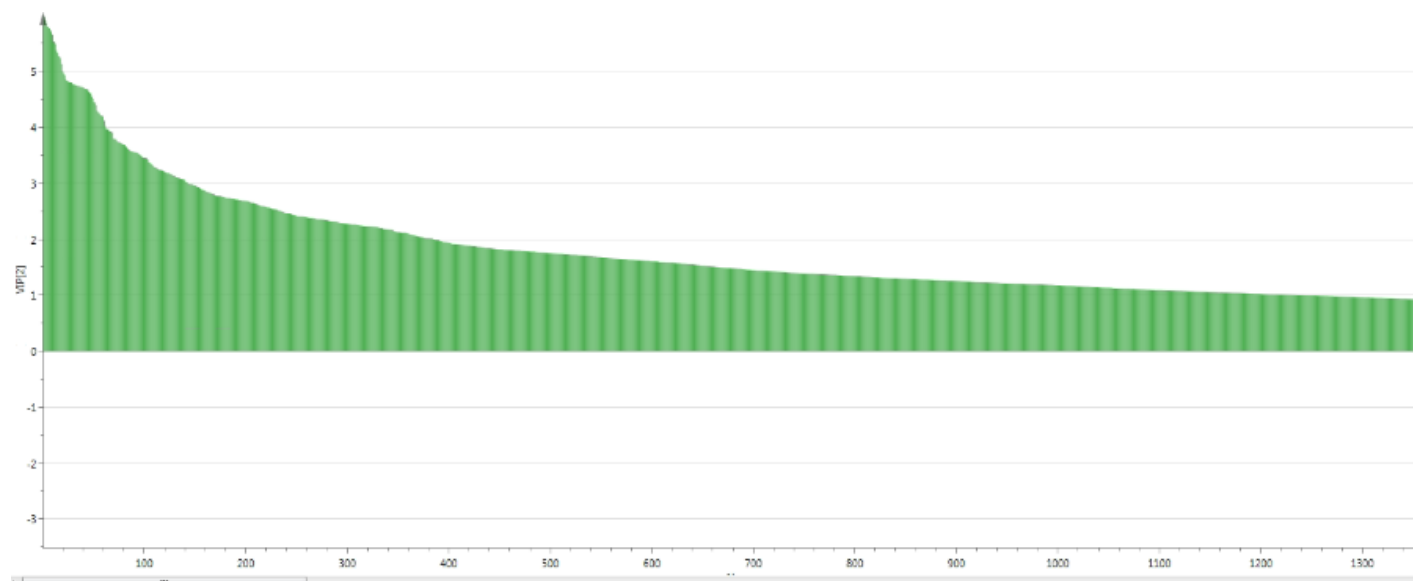
Εικόνα 20: Μεταθετικός έλεγχος επιτρέποντας 100 τυχαίες μεταθέσεις για το μοντέλο OPLS-DA από την ανάλυση δείγματος πλάσματος, όπου R² με πράσινη απόχρωση και Q² με μπλε απόχρωση (Έγκυρο μοντέλο)

Στη συνέχεια προκειμένου να εντοπιστούν οι σημαντικοί μεταβολίτες, εκείνοι δηλαδή που συμβάλλουν στο διαχωρισμό των δύο ομάδων, υπολογίστηκαν οι τιμές VIP από το μοντέλο OPLS-DA και πραγματοποιήθηκε το διάγραμμα S-plot από το μοντέλο OPLS-DA, όπως αυτό φαίνεται στην Εικόνα 21.



Εικόνα 21: Διάγραμμα S-plot από το μοντέλο OPLS-DA

Στη συνέχεια, υπολογίστηκαν οι τιμές VIP για την προσέγγιση OPLS-DA, που αφορά τον διαχωρισμό των ομάδων υψηλής απόκρισης από εκείνες με χαμηλή απόκριση όσον αφορά το ποσοστό των παραγόμενων αντισωμάτων. Οι τιμές VIP χρησιμοποιήθηκαν για να υποδείξουν τις παραμέτρους με τη μεγαλύτερη επιρροή στην κατάταξη των ομάδων. Από τις τιμές VIP επιλέχθηκαν οι πρώτες μεταβλητές που όλες είχαν τιμές μεγαλύτερες από 1,5, όπως φαίνεται στον πίνακα παρακάτω.



Εικόνα 22: Τιμές VIP από το μοντέλο OPLS-DA

Τελικά οι πιο σημαντικοί μεταβολίτες που προέκυψαν από την πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2: Σημαντικοί μεταβολίτες που προέκυψαν από την πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση μέσω του μοντέλου OPLS-DA με τιμή VIP μεγαλύτερη του 1.5

Χημική μετατόπιση δ (ppm)	Μεταβολίτης	Τιμή VIP
1,264	Fatty acid chains	7.023
3,556	Glycine	5.769
2,222	Acetone	5.644
1,319	Lactate	5.629
3,762	Glucose, Glutamate	5.373
3,244	Glucose, Histidine	4.797
1,472	Alanine	4.613
2,123	Glutamate, Glutamine	3.953
3,602	Valine	3.934
0,948	Valine, Isoleucine	3.513
2,372	Pyruvate, Glutamate	2.425

Για την μονοπαραμετρική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό GraphPad 9.0 Statistics. Πιο συγκεκριμένα, για κάθε μεταβολίτη που είχε ταυτοποιηθεί από τα φάσματα CPMG πραγματοποιήθηκε έλεγχος για έκτροπες τιμές με τρεις δοκιμασίες (ROUT Method, Grubbs' test, Iterative Grubbs), ενώ η ακραία τιμή αφαιρέθηκε μόνο στις περιπτώσεις που επιβεβαιωνόταν και από τις τρεις δοκιμασίες. Ακολούθησε έλεγχος κανονικότητας προκειμένου να διαπιστωθεί αν τα δεδομένα ακολουθούν κανονική κατανομή ή κατανομή κατά Gauss ή αν αποκλίνουν από αυτή. Οι τέσσερις δοκιμασίες που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής: Anderson-Darling test, D'Agostino & Pearson test, Shapiro-Wilk test, Kolmogorov-Smirnov test. Στις περιπτώσεις που η κατανομή θεωρήθηκε κανονική, αυτό επιβεβαιωνόταν από όλες τις δοκιμασίες, εάν έστω και μία δοκιμασία έδειχνε την ύπαρξη μη κανονικής κατανομής τότε η κατανομή θεωρούνταν ως μη κανονική.

Ακολούθως εφαρμοσθήκε ο έλεγχος συνδιακύμανσης F, προκειμένου να διαπιστωθεί αν οι ομάδες δεδομένων είχαν ίδιες ή όχι διακυμάνσεις. Υπολογίστηκε ο λόγος F και οι βαθμοί ελευθερίας DF_n, DF_d για τις ομάδες παρατηρήσεων, αντίστοιχα, ενώ η αξιολόγηση έγινε με βάση τη λαμβανόμενη τιμή P (P-value) για στάθμη εμπιστοσύνης 95%, όπου για CL 95% και $P_{value} \leq 0,05$ θεωρούνται άνισες οι διακυμάνσεις.

Για τις ομάδες δεδομένων με κανονική κατανομή και ίδιες διακυμάνσεις εφαρμόστηκε η δοκιμασία unpaired t-test, ενώ για αυτές με άνισες διακυμάνσεις εφαρμόστηκε η δοκιμασία t-test with Welch's correction. Η τελευταία χρησιμοποιείται για να ελεγχθεί η υπόθεση ότι δύο πληθυσμοί έχουν ίσους μέσους όρους και είναι μια προσαρμογή του Student's t-test πιο αξιόπιστη όταν τα δύο δείγματα έχουν άνισες διακυμάνσεις και πιθανώς άνισα μεγέθη δείγματος. Αυτές οι δοκιμές αναφέρονται συχνά ως t-test "μη ζευγαρωμένων" ή ανεξάρτητων δειγμάτων, καθώς εφαρμόζονται συνήθως όταν οι στατιστικές μονάδες στις οποίες βασίζονται τα δύο δείγματα που συγκρίνονται είναι μη επικαλυπτόμενες.⁷⁴

Τα αποτελέσματα των δοκιμασιών unpaired t-test και t-test with Welch's correction αξιολογήθηκαν και πάλι με τη λαμβανόμενη τιμή P (P-value) για στάθμη εμπιστοσύνης 95%, όπου για CL 95% και $P_{value} \leq 0,05$ ο υπό μελέτη μεταβολίτης στο σύνολο των εξεταζόμενων δειγμάτων θεωρούνταν στατιστικά σημαντικός.

Τέλος, για τις ομάδες δεδομένων με μη κανονική κατανομή εφαρμόστηκε μη παραμετρική στατιστική ανάλυση και πιο συγκεκριμένα η δοκιμασία Mann-Whitney, η οποία ανήκει στις μη παραμετρικές στατιστικές δοκιμασίες κατάταξης των παρατηρήσεων. Μία γενικευμένη διατύπωση της θεωρίας των Mann και Whitney είναι πως παρατηρήσεις και από τις δύο ομάδες είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους, οι αποκρίσεις είναι ταξινομήσιμες και συγκρίσιμες, ενώ σύμφωνα με τη μηδενική υπόθεση H_0 , οι κατανομές και των δύο πληθυσμών είναι πανομοιότυπες και σύμφωνα με την εναλλακτική υπόθεση H_1 οι κατανομές δεν είναι πανομοιότυπες.⁷⁵ Με την εφαρμογή της δοκιμασίας αυτής, η λαμβανόμενη τιμή P (P-value) για στάθμη εμπιστοσύνης 95% αξιολογήθηκε, όπου για CL 95% και $P_{value} \leq 0,05$ ο υπό μελέτη μεταβολίτης στο σύνολο των εξεταζόμενων δειγμάτων θεωρούνταν στατιστικά σημαντικός.

Στον Πίνακα 3 συνοψίζονται όλα τα αποτελέσματα των δοκιμασιών στατιστικής ανάλυσης για τους υπό μελέτη μεταβολίτες.

Πίνακας 3: Στατιστικά σημαντικοί μεταβολίτες που προέκυψαν από την μονοπαραμετρική στατιστική ανάλυση

Metabolite	Ala	Glu	Gln	Gly	His	Ile	Leu
outliers excluded	0	1	0	1	0	0	0
Unequal variances (F-test)	no	no	yes	no	no	no	no
F, DFn, Dfd	1,459, 47, 46	1,983, 46, 46	678,2, 46, 47	1,483, 47, 45	1,386, 47, 46	1,358, 47, 46	1,081, 47, 46
P-value	0,2025	0,2222	<u><0,0001</u>	0,1864	0,2697	0,3015	0,7916
Normality test							
Anderson-Darling test	yes	no	yes	yes	yes	yes	yes
D'Agostino & Pearson test	yes	no	yes	no	yes	yes	yes
Shapiro-Wilk test	yes	no	yes	no	yes	yes	yes
Kolmogorov-Smirnov test	no	no	yes	yes	yes	yes	yes
Unpaired T-test					<u>0,0324</u>	0,2177	0,216
T-test with Welch's correction			<u>< 0,0001</u>				
Mann-Whitney test (non-parametric)	0,2945	0,5864		0,4895			

Metabolite	Lys	Phe	Orn	Pro	Tyr	Val	3-Methylhistidine
outliers	0	1	1	0	0	0	0

excluded							
Unequal variances (F-test)	no	no	no	no	no	no	no
F, DFn, Dfd	1,596, 47, 46	1,132, 47, 45	1,196, 46, 46	1,143, 46, 47	1,044, 47, 46	1,174, 47, 46	1,173, 46, 47
P-value	0,115	0,6775	0,5462	0,6499	0,8846	0,5877	0,5869

Normality test

Anderson-Darling test	no	yes	no	yes	yes	yes	yes
D'Agostino & Pearson test	no	yes	no	yes	yes	yes	yes
Shapiro-Wilk test	no	yes	no	yes	yes	yes	no
Kolmogorov-Smirnov test	no	yes	no	yes	yes	yes	yes
Unpaired T-test		<u>0,0145</u>		0,8158	0,1831	0,1751	
T-test with Welch's correction							
Mann-Whitney test (non-parametric)	<u>0,0021</u>		0,8729				<u><0,0001</u>

Metabolite	Creatine	Creatinine+Lys	Formate	Lactate	Succinate	Pyruvate	cis-Aconitate
outliers excluded	1	1	0	1	0	0	1
Unequal variances (F-test)	yes	yes	no	no	no	no	yes
F, DFn, Dfd	3,177, 46, 46	1,818, 47, 45	1,098, 46, 47	1,135, 46, 46	1,099, 46, 47	1,054, 47, 46	3,149, 45, 47
P-value	<u>0,0001</u>	<u>0,046</u>	0,7499	0,6693	0,747	0,8584	<u>0,0002</u>

Normality test

Anderson-	no	no	no	no	yes	yes	no
-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----	-----	-----------

Darling test							
D'Agostino & Pearson test	no	no	no	no	yes	yes	no
Shapiro-Wilk test	no	no	no	no	yes	yes	no
Kolmogorov-Smirnov test	no	no	no	no	yes	yes	no
Unpaired T-test					0,994	0,1409	
T-test with Welch's correction							
Mann-Whitney test (non-parametric)	0,2253	<u>0,0056</u>	0,1994	0,8676			0,4895

Metabolite	Glucose	Hydroxybutyric Acid	Acetone	Methanol
outliers excluded	0	1	0	0
Unequal variances (F-test)	no	no	no	yes
F, DFn, Dfd	1,078, 47, 46	1,054, 47, 45	1,289, 46, 47	1,843, 47, 46
P-value	0,7991	0,8604	0,389	0,04

Normality test

Anderson-Darling test	yes	yes	no	yes
D'Agostino & Pearson test	no	yes	no	yes
Shapiro-Wilk test	yes	yes		yes
Kolmogorov-Smirnov test	yes	yes	no	no
Unpaired T-		0,3053		

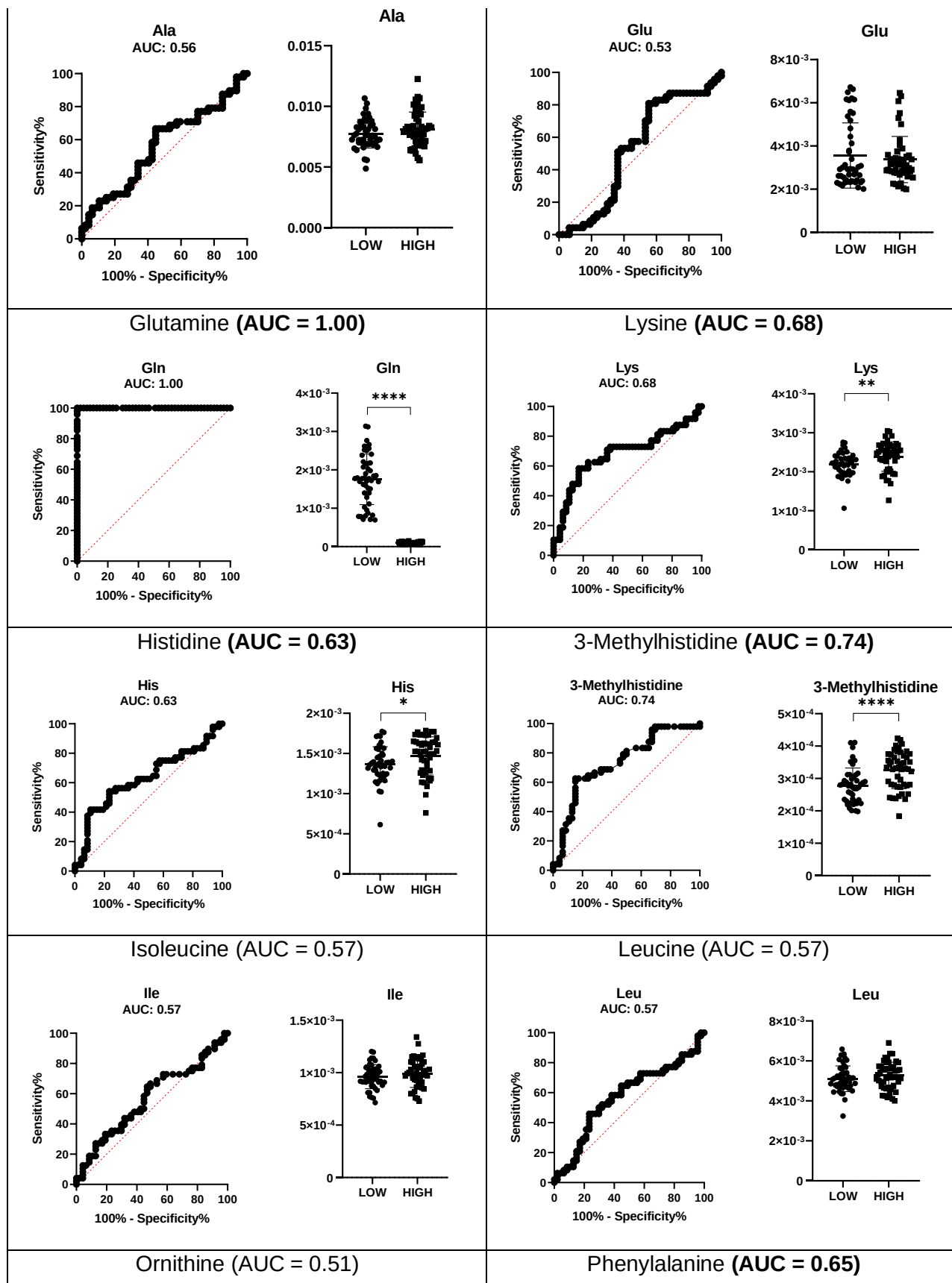
test				
T-test with Welch's correction				
Mann-Whitney test (non-parametric)	0,4472		0,4595	0,2047

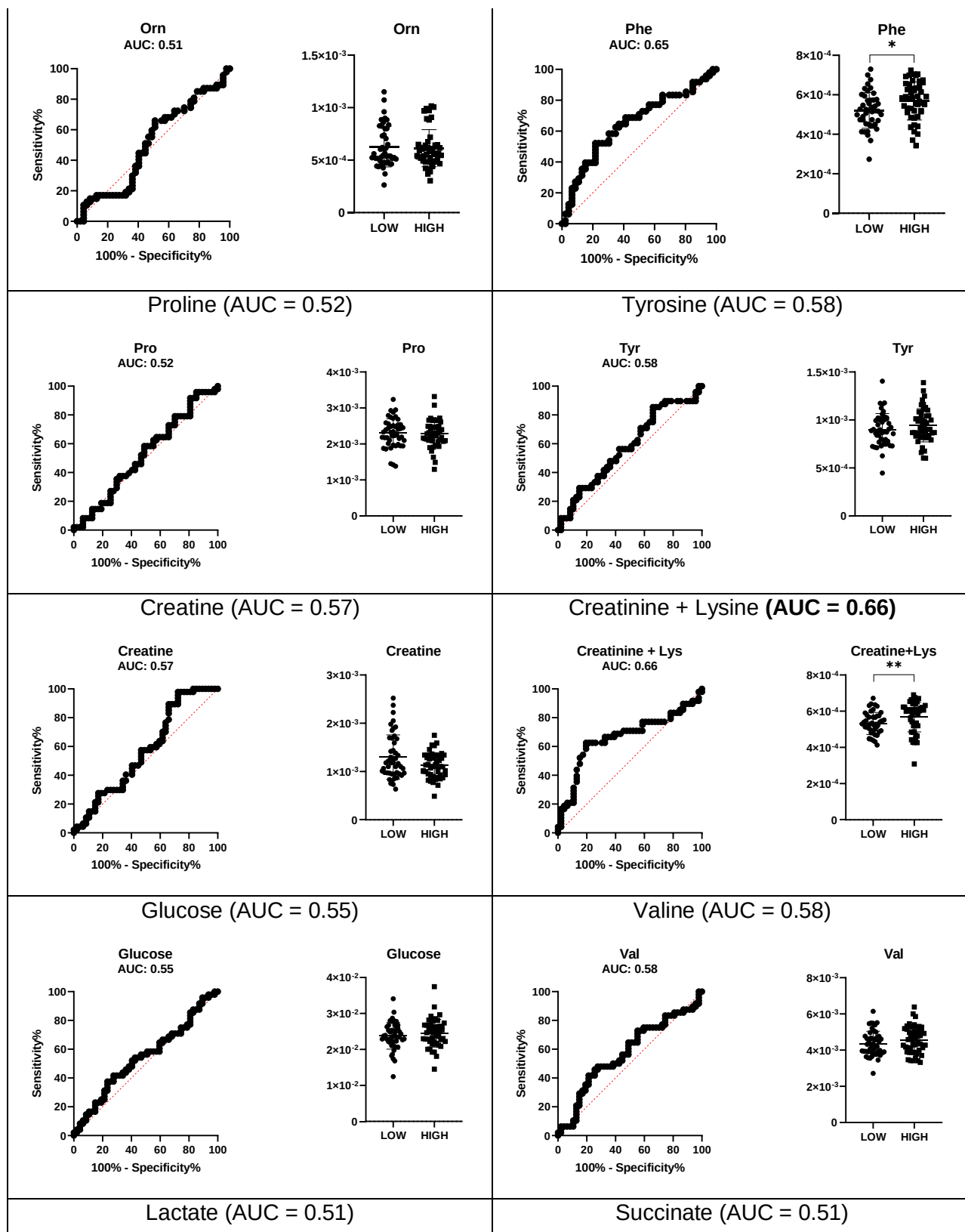
Από την ανάλυση αυτή προκύπτουν ως στατιστικά σημαντικοί μεταβολίτες για το διαχωρισμό των δύο ομάδων η γλουταμίνη, η ιστιδίνη, η λυσίνη, η φαινυλαλανίνη, η 3-μεθυλο-ιστιδίνη και η κρεατινίνη μαζί με τη λυσίνη.

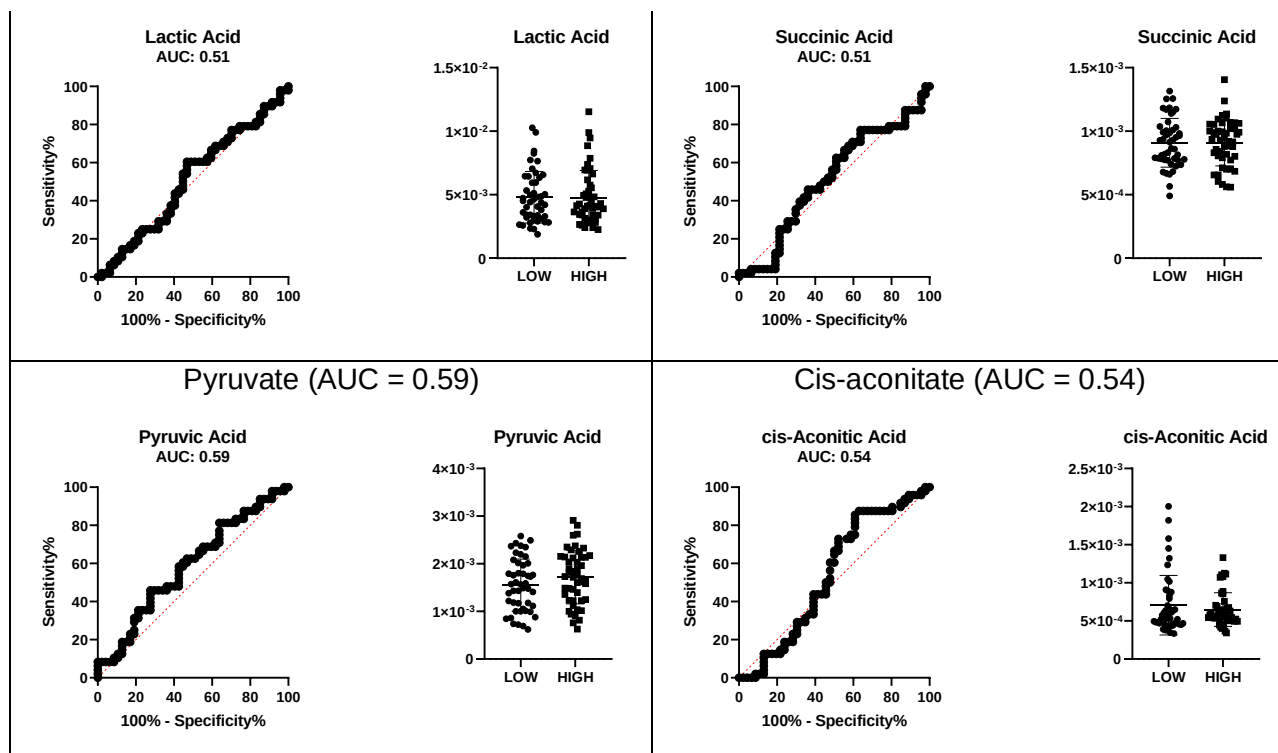
Τέλος, μέσω του λογισμικού του GraphPad Prism 9.0 κατασκευάστηκαν και οι καμπύλες ROC για κάθε μεταβολίτη ενδιαφέροντος, αλλά υπολογίστηκε και η περιοχή κάτω από την καμπύλη ROC (Area Under Curve, AUC). Ο υπό έλεγχο μεταβολίτης μπορεί να θεωρηθεί με ασφάλεια ως υποψήφιος βιοδείκτης όταν αυτή η περιοχή έχει τιμή κοντά στο 1 και το μοντέλο θεωρείται επιτυχημένο με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Όταν η περιοχή έχει τιμές εμβαδού μικρότερες του 0,6 τότε υποδηλώνεται αποτυχία στην ταξινόμηση. Για οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων για κάθε υπό εξέταση μεταβολίτη κατασκευάστηκαν και τα αντίστοιχα θηκογράμματα (boxplots), στα οποία η γραμμή που βρίσκεται μέσα σε αυτό δείχνει τη διάμεση τιμή, ενώ οι αποστάσεις μεταξύ των δύο άκρων αντιπροσωπεύουν το μέγεθος της διασποράς και της ασυμμετρίας των δεδομένων.

Στα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζονται οι καμπύλες ROC με τις αντίστοιχες AUC περιοχές, καθώς και τα boxplots για κάθε υπό έλεγχο μεταβολίτη.

Alanine (AUC = 0.56)	Glutamate (AUC = 0.53)
----------------------	------------------------







Από τις καμπύλες ROC και τις υπολογισμένες τιμές του εμβαδού των AUC περιοχών προκύπτει το συμπέρασμα πως η γλουταμίνη είναι ο μόνος μεταβολίτης ο οποίος θα μπορούσε με ασφάλεια να αξιολογηθεί ως ένας υποψήφιος βιοδείκτης αφού η καμπύλη ROC παρουσιάζει να έχει εμβαδό (AUC) ίσο με τη μονάδα και το εφαρμοζόμενο μοντέλο ταξινόμησης φαίνεται να έχει 100% ευαισθησία και 100% ειδικότητα. Από το θηκόγραμμα της φαίνεται πως η γλουταμίνη συναντάται στα δείγματα των χαμηλά ανταποκρινόμενων ατόμων με δεδομένη διασπορά, ενώ στους υψηλά ανταποκρινόμενα άτομα η συγκέντρωσή της είναι αμελητέα.

Από τους υπόλοιπους μεταβολίτες που εξετάστηκαν, φαίνεται πως η 3-μεθυλοιστιδίνη, η ιστιδίνη, η λυσίνη, η κρεατινίνη με τη λυσίνη και η φαινυλαλανίνη μπορούν να συγκαταλεχθούν στους δυνητικά υποψήφιους βιοδείκτες, χωρίς ωστόσο τα μοντέλα ταξινόμησής τους να χαρακτηρίζονται από 100% ειδικότητα και ευαισθησία.

5. Συζήτηση Αποτελεσμάτων

Μέχρι σήμερα, σε αρκετές μεταβολικές μελέτες έχει εξεταστεί ο ρόλος της μεταβολικής ρύθμισης στην ανοσοαπόκριση του ανθρώπινου οργανισμού σε διάφορα εμβόλια, είτε αυτά αφορούν εμβόλια κατά των βακτηρίων (*M. tuberculosis*), είτε εμβόλια κατά των ιών (*influenza*, *variola virus*). Στις μελέτες αυτές τονίζεται μεταξύ άλλων και ο ρόλος της γλυκόλυσης, του μεταβολισμού των πουρινών, της θρυπτοφάνης, αλλά και ο μεταβολισμός άλλων αμινοξέων.⁷⁶

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκαν μεταβολικές διαφορές στο πλάσμα αίματος μεταξύ υψηλά και χαμηλά ανταποκρινόμενων υγιών ατόμων εμβολιασμένων με το εμβόλιο BNT162b2 κατά της COVID-19. Η ανοσολογική απόκριση του οργανισμού συσχετίστηκε με αλλαγές στο μεταβολικό προφίλ των υπό εξέταση δειγμάτων και πιο συγκεκριμένα στον μεταβολισμό αμινοξέων και λιπιδίων. Μέσω των εργαλείων πολυπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης και των εφαρμοζόμενων μοντέλων ταξινόμησης, βρέθηκαν στατιστικά σημαντικοί μεταβολίτες, μεταξύ των οποίων η γλυκίνη, το γαλακτικό οξύ, η γλυκόζη, η ιστιδίνη, το γλουταμικό οξύ, η γλουταμίνη, η αλανίνη και η βαλίνη. Από τους μεταβολίτες αυτούς επιβεβαιώθηκε από τα εργαλεία της μονοπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης η γλουταμίνη και η ιστιδίνη. Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα των δοκιμασιών που έλαβαν χώρα, η γλουταμίνη θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ένας υποψήφιος βιοδείκτης για το διαχωρισμό των υπό μελέτη δειγμάτων.

Εκτός των μεταβολιτών αυτών, στατιστικά σημαντικά από τα εργαλεία της πολυπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης φαίνεται να είναι και τα λιπίδια. Τα λιπίδια συνιστούν βασικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών και πηγές ή αποθήκες ενέργειας των κυττάρων. Πολλά λιπίδια εμπλέκονται στη σηματοδότηση των κυττάρων και μπορούν να ρυθμίσουν την ανοσολογική απόκριση και την απόκριση στη φλεγμονή, συμπεριλαμβανομένης της σύνθεσης αντιφλεγμονωδών κυτοκινών.⁷⁷ Στην παρούσα μελέτη, λόγω των υπολειπόμενων σημάτων των λιπιδίων στα φάσματα CPMG, δεν μπορούν να εξαχθούν περαιτέρω πληροφορίες και για αυτό απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση με τη λήψη πληροφοριών από φάσματα LED.

Είναι γεγονός πως σημαντικός αριθμός μεταβολιτών σχετίζεται με τη σύνθεση και την αναδίπλωση των παραγόμενων αντισωμάτων. Η γλουταμίνη αποτελεί το πιο

άφθονο αμινοξύ στο ανθρώπινο πλάσμα και εμπλέκεται σε αρκετές βασικές βιοχημικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της σύνθεσης πρωτεϊνών, νουκλεοτιδίων και σακχάρων. Σε μελέτη των *Choi et al.*⁷⁸ αναφέρεται η επίδραση της L-γλουταμίνης στην παραγωγή κυτοκινών από τα μονοκύτταρα και μακροφάγα και στην παραγωγή αντισωμάτων. Ειδικότερα, τα λεμφοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος κατά την ταχεία διαίρεσή τους κατά την ανοσολογική απόκριση χρησιμοποιούν τη γλουταμίνη ως δότη αζώτου για τη σύνθεση νουκλεοτιδίων και ενέργειας.

Για την παραγωγή των αντισωμάτων απαραίτητη κρίνεται η ισορροπία μεταξύ του μεταβολισμού της ενέργειας και μεταβολισμού των αμινοξέων. Ως κεντρικός σύνδεσμος με τον ενεργειακό μεταβολισμό, οι μεταβολίτες στον κύκλο τρικαρβοξυλικού οξέος (*Tricarboxylic acid cycle, TCA cycle*) εμπλέκονται επίσης σε διαφορετικές μεταβολικές οδούς αμινοξέων. Στη μελέτη των Wang *et al.*⁷⁹ αναφορικά με τους υποκείμενους βιοχημικούς μηχανισμούς της επαγόμενης ανοσίας από το mRNA εμβόλιο CoronaVac, βρέθηκε ότι οι βασικοί ενδιάμεσοι μεταβολίτες στον κύκλο TCA μεταβάλλονται σημαντικά σε δείγματα εμβολιασμένων ατόμων. Αυτοί οι ενδιάμεσοι μεταβολίτες του κύκλου TCA, συμπεριλαμβανομένου του πυροσταφυλικού, του κιτρικού, του μηλικού και του γαλακτικού οξέος, βρέθηκε ότι διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος με κάποιους να ενεργοποιούν την ανοσοαπόκριση και άλλους να την καταστέλλουν.⁸⁰ Επιπλέον, η ισορροπία μεταξύ του μεταβολισμού της ενέργειας και των αμινοξέων είναι απαραίτητη για την παραγωγή αντισωμάτων.

6. Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζεται μία προσέγγιση των μεταβολομικών αλλαγών και των μεταβολικών διαφορών που παρατηρούνται σε υγιή άτομα 22 ημέρες μετά από τον εμβολιασμό τους με το mRNA εμβόλιο BNT162b2 κατά της COVID-19. Στην μελέτη αυτή παρατηρήθηκαν διακριτά μεταβολικά προφίλ στο πλάσμα αίματος μεταξύ των δύο ομάδων υγιών ατόμων, η διάκριση των οποίων έγινε με βάση την αξιολόγηση των επιπέδων εξουδετερωτικών αντισωμάτων (NAb) στο αίμα τους. Σκοπός της μελέτης

ήταν να βρεθεί η συσχέτιση του ποσοστού των παραγόμενων εξουδετερωτικών αντισωμάτων και του μεταβολικού προφίλ των εμβολιασμένων ατόμων.

Συμπερασματικά, από την μεταβολομική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε δείγματα πλάσματος αίματος εμβολιασμένων ατόμων με anti-COVID-19 mRNA εμβόλιο, την 22η ημέρα μετά εμβολιασμό τους προέκυψε η ανάδειξη μεταβολιτών με κυριότερη τη γλουταμίνη με τους οποίους μπορεί πιθανώς να συσχετίζεται η ανοσολογική απόκριση μετά από εμβολιασμό. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται πως μία υψηλή ανοσοαπόκριση κατά την οποία το άτομο παρουσιάζει μεγάλο ποσοστό εξουδετερωτικών αντισωμάτων ($\text{NAbs} \geq 70\%$) συνδέεται με αμελητέα συγκέντρωση του αμινοξέος L-γλουταμίνης στο πλάσμα του αίματος. Αντίθετα, σε ένα χαμηλά ανταποκρινόμενο άτομο με χαμηλά ποσοστά εξουδετερωτικών αντισωμάτων ($\text{NAbs} \leq 40\%$), το ίδιο αμινοξύ φαίνεται να υπάρχει σε συγκεντρώσεις της τάξεως των $2 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$. Αυτό καθ' αυτό το γεγονός είναι ενθαρρυντικό στα πλαίσια της εφαρμογής της μεταβολομικής ανάλυσης στην ανακάλυψη βιοδεικτών και στη διαλεύκανση των βιοχημικών μηχανισμών που σχετίζονται με την ανοσοαπόκριση του οργανισμού, ωστόσο σε κάθε περίπτωση απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, με περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τα ποσοστά των αντισωμάτων και με μετρήσεις σε περισσότερα χρονικά διαστήματα.

7.Βιβλιογραφία

1. Janeway, C.; Travers, P.; Immunobiology: The Immune System in Health and Disease 2007 (7th edition). ISBN 978-0-8153-4123-9.
2. Coronavirus disease named Covid-19». BBC News. Accessed February 2021
3. Organization, World Health (2020) Surveillance case definitions for human infection with novel coronavirus (nCoV): interim guidance, 11 January 2020.
4. Wu, C.; Liu, Y.; Yang, Y.; Zhang, P.; Zhong, W.; Wang, Y.; Wang, Q.; Xu, Y. et al Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods Acta Pharmaceutica Sinica. B 2020, 10 (5), 766–788. <https://doi:10.1016/j.apsb.2020.02.008>.
5. Wrapp, D.; Wang, N.; Corbett, K.S.; Goldsmith, J.A.; Hsieh, C.; Abiona, O.; Graham, B.S.; McLellan, J.S. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation Science 2020, 367 (6483), 1260–1263. <https://doi:10.1126/science.abb2507>.
6. Xu, X.; Chen, P.; Wang, J.; Feng, J.; Zhou, H.; Li, X.; Zhong, W.; Hao, P. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission Science China. Life Sciences 2020, 63 (3), 457–460. <https://doi:10.1007/s11427-020-1637-5>.
7. «Understanding SARS-CoV-2 and the drugs that might lessen its power». The Economist, 2020.
8. Sompayrac, L. How the immune system works 2019, ISBN 978-1-119-54212-4.
9. <https://microbiologynote.com/humoral-immune-response>
10. Ευρωπαϊκή πύλη πληροφοριών εμβολιασμού, <https://vaccination-info.eu/el>
11. Hodgson, S.H., Mansatta, K., Mallett, G., Harris, V., Emary, K.R.W., and Pollard, A.J., What defines an efficacious COVID-19 vaccine? A review of the challenges assessing the clinical efficacy of vaccines against SARS-CoV-2. The Lancet. Infectiousdiseases 21(e26-e35) (2021).
12. Polack, F.P.; Thomas, S.J.; Kitchin, N.; Absalon, J.; Gurtman, A.; Lockhart, S., Perez, J.L.; Pérez Marc, G.; Moreira, E.D.; Zerbini, C. et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine The New England journal of medicine 2020, 383 (27), 2603-261. <https://doi:10.1056/NEJMoa2034577>.

13. Wang, J.; Jiang, M.; Chen, X.; Montaner, L.J. Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. *Journal of leukocyte biology* 2020, 108 (1), 17-41. <https://doi:10.1002/JLB.3COVR0520-272R>.
14. Wu, Z.; Zhang, Z.; Lei, Z.; Lei, P. CD14: Biology and role in the pathogenesis of disease. *Cytokine & growth factor reviews* 2019, 48, 24-31. <https://doi:10.1016/j.cytogfr.2019.06.003>.
15. Zhang, Y.; Zeng, G.; Pan, H.; Li, C.; Hu, Y.; Chu, K.; Han, W.; Chen, Z.; Tang, R.; Yin, W. et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18-59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase ½ clinical trial *The Lancet Infectious diseases* 2021, 21 (2), 181-192. [https://doi:10.1016/S1473-3099\(20\)30843-4](https://doi:10.1016/S1473-3099(20)30843-4).
16. Voss, K.; Hong, H.S.; Bader, J.E.; Sugiura, A.; Lyssiotis, C.A.; Rathmell, J.C. A guide to interrogating immunometabolism. *Nature reviews. Immunology* 2021, 21 (10), 637-652. <https://doi:10.1038/s41577-021-00529-8>.
17. Arts, R.J.; Novakovic, B.; Ter Horst, R.; Carvalho, A.; Bekkering, S.; Lachmandas, E.; Rodrigues, F.; Silvestre, R.; Cheng, S.C.; Wang, S.Y. et al. Glutaminolysis and Fumarate Accumulation Integrate Immunometabolic and Epigenetic Programs in Trained Immunity Cell metabolism 2016, 24 (6), 807-819. <https://doi:10.1016/j.cmet.2016.10.008>.
18. Bekkering, S.; Arts, R.J.W.; Novakovic, B.; Kourtzelis, I.; Van der Heijden, C.; Li, Y.; Popa, C.D.; Ter Horst, R.; Van Tuijl, J.; Netea-Maier, R.T. et al. Metabolic Induction of Trained Immunity through the Mevalonate Pathway. *Cell* 2018, 172 (1-2), 135-146. <https://doi:10.1016/j.cell.2017.11.025>.
19. Diray-Arce, J.; Conti, M.G.; Petrova, B.; Kanarek, N.; Angelidou, A.; Levy, O. Integrative Metabolomics to Identify Molecular Signatures of Responses to Vaccines and Infections, *Metabolites* 2020, 10 (12), 49. <https://doi:10.3390/metabo10120492>.
20. Nicholson, J. K. Global systems biology, personalized medicine and molecular epidemiology. *Mol. Syst. Biol.* 2006, 2, 52. <https://doi:10.1038/msb4100095>.

21. Viant, M.R.; Kurland, I.J.; Jones, M.R.; Dunn, W.B. How close are we to complete annotation of metabolomes? *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2017, 36, 64–69. [https://doi: 10.1016/j.cbpa.2017.01.001](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.01.001).
22. Johnson, C.H.; Ivanisevic, J.; Siuzdak, G. Metabolomics: Beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2016, 17 (7), 451–459. [https://doi: 10.1038/nrm.2016.25](https://doi.org/10.1038/nrm.2016.25).
23. Sun, Y.V.; Hu, Y.J. Integrative Analysis of Multi-omics Data for Discovery and Functional Studies of Complex Human Diseases. *Adv. Genet.* 2016, 93, 147–190. [https://doi: 10.1016/bs.adgen.2015.11.004](https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.11.004).
24. Nicholson, J.K.; Lindon, J.C.; Holmes, E. “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*. 1999, 29 (11), 1181–1189. [https://doi: 10.1080/004982599238047](https://doi.org/10.1080/004982599238047).
25. Sun, C.; Li, T.; Song, X.; Huang, L.; Zang, Q.; Xu, J.; Bi, N.; Jiao, G.; Hao, Y.; Chen, Y. et al. Spatially resolved metabolomics to discover tumor-associated metabolic alterations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2019, 116 (1), 52–57. [https://doi: 10.1073/pnas.1808950116](https://doi.org/10.1073/pnas.1808950116).
26. Liu, N.N.; Acosta-Zaldivar, M.; Qi, W.; Diray-Arce, J.; Walker, L.A.; Kottom, T.J.; Kelly, R.; Yuan, M.; Asara, J.M.; Lasky-Su, J.A.; et al. Phosphoric Metabolites Link Phosphate Import and Polysaccharide Biosynthesis for *Candida albicans* CellWall Maintenance. *mBio* 2020, 11 (2). [https://doi:10.1128/mBio.03225-19](https://doi.org/10.1128/mBio.03225-19).
27. Beale, D.J.; Oh, D.Y.; Karpe, A.V.; Tai, C.; Dunn, M.S.; Tilmanis, D.; Palombo, E.A.; Hurt, A.C. Untargeted metabolomics analysis of the upper respiratory tract of ferrets following influenza A virus infection and oseltamivir treatment. *Metabolomics* 2019, 15, 33. [https://doi:10.1007/s11306-019-1499-0](https://doi.org/10.1007/s11306-019-1499-0).
28. Li, S.; Sullivan, N.L.; Rouphael, N.; Yu, T.; Banton, S.; Maddur, M.S.; McCausland, M.; Chiu, C.; Canniff, J.; Dubey, S.; et al. Metabolic Phenotypes of Response to Vaccination in Humans. *Cell* 2017, 169 (5), 862–877. [https://doi: 10.1016/j.cell.2017.04.026](https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.026).

29. Rusz, M.; Del Favero, G.; El Abiead, Y. et al. Morpho-metabotyping the oxidative stress response. *Sci Rep* 2021, 11, 15471. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94585-8>.
30. German, J.B.; Gillies, L.A.; Smilowitz, J.T.; Zivkovic, A.M.; Watkins, S.M. Lipidomics and lipid profiling in metabolomics. *Curr. Opin. Lipidol.* 2007, 18 (1), 66–71. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e328012d911>.
31. Han, X. Lipidomics for studying metabolism. *Nature Reviews Endocrinology* 2016, 12(11), 668–679. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.98>.
32. Sun, Y.V.; Hu, Y.J. Integrative Analysis of Multi-omics Data for Discovery and Functional Studies of Complex Human Diseases. *Adv. Genet.* 2016, 93, 147–190. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.11.004>.
33. Hariharan, M.; Dewey, F.E.; et al. Personal omics profiling reveals dynamic molecular and medical phenotypes. *Cell* 2012, 148 (6), 1293–1307. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.009>.
34. Petersen, A.K.; Zeilinger, S.; Kastenmuller, G.; Romisch-Margl, W.; Brugger, M.; Peters, A.; Meisinger, C.; Strauch, K.; Hengstenberg, C.; Pagel, P.; et al. Epigenetics meets metabolomics: An epigenome-wide association study with blood serum metabolic traits. *Hum. Mol. Genet.* 2014, 23 (2), 534–545. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt430>.
35. Gowda G.N.; Zhang, S.; Gu, H.; Asiago, V.; Shanaiah, N.; Raftery, D.; Metabolomics based methods for early disease diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2008, 8(5), 617-633. <https://doi.org/10.1586/14737159.8.5.617>.
36. Madji Hounoum, B.; et al. Analytical methodology for metabolomics study of adherent mammalian cells using NMR, GC-MS and LC-HRMS. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015, 407 (29), 8861-8872. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9047-x>.
37. Harada, S.; et al. Metabolomic profiling reveals novel biomarkers of alcohol intake and alcohol-induced liver injury in community-dwelling men. *Environ. Health Prev. Med.* 2016, 21 (1), 18–26. <https://doi.org/10.1007/s12199-015-0494-y>
38. Xu, J.-D. et al. Highperformance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry with programmed ionization mode switching and time segment scanning approach for quantifying multi-components in traditional

- complex herbal medicines, Qiong-Yu-Gao as an exam. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015, 112, 139–46. [https://doi: 10.1016/j.jpba.2015.04.015](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.04.015).
39. Guo, J.; et al. Metabolite identification strategy of non-targeted metabolomics and its application for the identification of components in Chinese multicomponent medicine *Abelmoschus Manihot* L. *Phytomedicine* 2015, 22 (5), 579–587. [https://doi: 10.1016/j.phymed.2015.02.002](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.02.002).
 40. Deroussent, A.; et al. Simultaneous quantification of preactivated ifosfamide derivatives and of 4-hydroxyifosfamide by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry in mouse plasma and its application to a pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. B* 2015, 992, 30–35. 15. [https://doi: 10.1016/j.jchromb.2015.04.025](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.04.025).
 41. Klepacki, J.; Klawitter, J.; Klawitter, J.; Thurman, J. M.; Christians, U. A high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry – based targeted metabolomics kidney dysfunction marker panel in human urine. *Clin. Chim. Acta* 2015, 446, 43–53. [https://doi:10.1016/j.cca.2015.04.005](https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.04.005).
 42. Lei, Z.; Huhman, D. V.; Sumner, L. W. Mass spectrometry strategies in metabolomics. *J. Biol. Chem.* 2011, 286 (29), 25435–25442. [https://doi: 10.1074/jbc.R111.238691](https://doi.org/10.1074/jbc.R111.238691).
 43. Liu, X.; Locasale, J.W. Metabolomics: a primer. *Trends Biochem. Sci.* 2017, 42 (4), 274–284. [https://doi:10.1016/j.tibs.2017.01.004](https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.01.004).
 44. Chen, J.; et al. Target-based metabolomics for the quantitative measurement of 37 pathway metabolites in rat brain and serum using hydrophilic interaction ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2016, 408 (10), 2527–2542. [https://doi:10.1007/s00216-016-9352-z](https://doi.org/10.1007/s00216-016-9352-z).
 45. Zhou, B.; Xiao, J.F.; Tuli, L.; Ransom, H.W. LC-MS-based metabolomics. *Mol. Biosyst.* 2012, 8 (2), 470–481. [https://doi:10.1039/c1mb05350g](https://doi.org/10.1039/c1mb05350g).
 46. León, Z.; Garcia-Cañaveras, J.C.; Donato, M.T.; Lahoz, A. Mammalian cell metabolomics: experimental design and sample preparation. *Electrophoresis* 2013, 34 (19), 2762–2775. [https://doi:10.1002/elps.201200605](https://doi.org/10.1002/elps.201200605)

47. Huanhuan, P.; Wei, J.; Zeping, H. Emerging Applications of Metabolomics in Clinical Pharmacology Clinical Pharmacology & Therapeutics 2019, 106 (3), 544-556. <https://doi:10.1002/cpt.1538>.
48. Bothwell, J. H. F.; Griffin, J. L. An introduction to biological nuclear magnetic resonance spectroscopy. Biological Reviews, 2011, 86 (2), 493–510. <https://doi:10.1111/j.1469-185X.2010.00157.x>.
49. Pan, Z.; Raftery, D. Comparing and combining NMR spectroscopy and mass spectrometry in metabolomics. Anal. Bioanal. Chem. 2007, 387 (2), 525–527. <https://doi:10.1007/s00216-006-0687-8>
50. Θ. Μαυρομούστακος, Ι. Ματσούκας. Αρχές και Εφαρμογές Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού στην Ιατρική, Φαρμακευτική Χημεία, Βιοχημεία, Χημεία Τροφίμων και Ποτών, 2006, Εκδόσεις Παρισιάνος, ISBN 960-88751-5-3
51. Nicholson, J.K.; Wilson, I.D. High resolution proton magnetic resonance spectroscopy of biological fluids. Prog Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 1989, 21 (4-5), 449-501. [https://doi:10.1016/0079-6565\(89\)80008-1](https://doi:10.1016/0079-6565(89)80008-1).
52. Beckonert, O.; Keun, H.C.; Ebbels, T.M.D.; et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. Nat Protoc. 2007, 2(11), 2692-2703. doi:10.1038/nprot.2007.376.
53. <https://www.uochb.cz/en/instrumentation/4/bruker-avance-iiitm-hd-600-mhz>
54. Pavia; D.; Lampman; G.; Kriz; G.; Vyvyan; J. Introduction to spectroscopy, 2009.
55. Gross, J.H.; Mass Spectrometry. Berlin, Heidelberg, 2011. <https://doi:10.1007/978-3-642-10711-5>
56. Putri S, Fukusaki E. Mass spectrometry-based metabolomics: a practical guide. 2016. <https://content.taylorfrancis.com/books/download?dac=C2013-0-21500-6&isbn=9780429161599&format=googlePreviewPdf>. Accessed September 2019
57. Lenz, E. M.; Wilson, I. D. Analytical strategies in metabonomics. J. Proteome Res. 2007, 6 (2), 443–458. <https://doi:10.1021/pr0605217>.
58. Walker, J. M. Mass Spectrometry in Metabolomics IN Series Editor, 2014.

59. Food and Drug Administration, HHS. Medical devices; clinical chemistry and clinical toxicology devices; classification of newborn screening test systems for amino acids, free carnitine, and acylcarnitines using tandem mass spectrometry. Final rule. Fed. Regist. 2004, 69 (226), 68254–68255.
60. <https://www.utm.my/ppmu/laboratory-services/advance-mass-spectroscopy-lab/hp-lcms-ms-q3-high-performance-liquid-chromatography-tandem-mass-spectrometry-of-triple-quadrupole>
61. Γεωργιάδου, Δ., Εγγλεζοπούλου, Α. «Οδηγός Προετοιμασίας, Λήψης, Αποθήκευσης και Μεταφοράς αιματολογικών δειγμάτων στο αιματολογικό τμήμα του εργαστηριακού τομέα», Αιματολογικό Τμήμα ΝΜ Αμαλία Φλέμινγκ, 2018.
62. Simmler, C.; Napolitano, J.G.; McAlpine, J.B.; Chen, S-N.; Pauli, G.F. Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples. Curr. Opin. Biotechnol. 2014, 25, 51-59. <https://doi:10.1016/J.COPBIO.2013.08.004>.
63. Miller, J.N., Miller J.C Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. Pearson Education, 2010. <https://lib.hpu.edu.vn/handle/123456789/28549>. Accessed August 1, 2019
64. Rajalahti, T.; Kvalheim, O. M. Multivariate data analysis in pharmaceuticals: A tutorial review. Int. J. Pharm. 2011, 417 (1-2), 280–290. <https://doi:10.1016/j.ijpharm.2011.02.019>
65. Worley, B.; Powers, R. Multivariate Analysis in Metabolomics. Curr. Metabolomics 2013, 1 (1), 92–107. <https://doi:10.2174/2213235X11301010092>.
66. Barker; M., Rayens; W. Partial least squares for discrimination. J. Chemom. 2003, 17 (6), 166–173.
67. Cloarec, O.; Dumas, M.E.; Trygg, J.; Craig, A.; Barton, R.H.; Lindon, J.C. et al. Evaluation of the orthogonal projection on latent structure model limitations caused by chemical shift variability and improved visualization of biomarker changes in ¹H NMR spectroscopic metabolomic studies Anal Chem 2005, 77 (2), 517-526. <https://doi:10.1021/ac048803i>.
68. Liland, K. H. Multivariate methods in metabolomics – from pre-processing to dimension reduction and statistical analysis. TrAC Trends Anal. Chem. 2011, 30, 827–841.

69. Wang, Z.; Chen, Z.; Yang, S. et al. ¹H NMR-based metabolomic analysis for identifying serum biomarkers to evaluate methotrexate treatment in patients with early rheumatoid arthritis. *Exp Ther Med.* 2012, 4 (1), 165-171. <https://doi:10.3892/etm.2012.567>
70. Wiklund, S. et al. Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. *Anal. Chem.* 2008, 80 (1), 115–122. <https://doi:10.1021/ac0713510>.
71. Szymańska, E.; Saccenti, E.; Smilde, A. K.; Westerhuis, J. A. Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies 2 *Metabolomics* 2012, 8, 3–16. <https://doi:10.1007/s11306-011-0330-3>.
72. Xi, B.; Gu, H.; Baniasadi, H; Raftery, D. Statistical Analysis and Modeling of Mass Spectrometry-Based Metabolomics Data. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 2014, 1198, 333–353. https://doi:10.1007/978-1-4939-1258-2_22.
73. Broadhurst, D. I.; Kell, D. B. Statistical strategies for avoiding false discoveries in metabolomics and related experiments. *Metabolomics* 2007, 2 (4), 171–196. <https://doi:10.1007/s11306-006-0037-z>.
74. Fay, P.; Proschan, M. A. Wilcoxon–Mann–Whitney or t-test? On assumptions for hypothesis tests and multiple interpretations of decision rules". *Statistics Surveys* 2010, 4, 1–39. <https://doi:10.1214/09-SS051>.
75. Ruxton, G. D. The unequal variance t-test is an underused alternative to Student's t-test and the Mann–Whitney U test. *Behavioral Ecology* 2006, 17, 4, 688–690. <https://doi:10.1093/beheco/ark016>.
76. Diray-Arce, J.; Conti, M.G.; Petrova, B.; Kanarek, N.; Angelidou, A.; Levy, O. Integrative metabolomics to identify molecular signatures of responses to vaccines and infections. *Metabolites* 2020, 10, 492.
77. Serhan, C.N.; Yacoubian, S.; Yang, R. Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. *Annu. Rev. Pathol.* 2008, 3, 279–312.
78. Newsholme, P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? *J. Nutr.* 2001, 131, 2515S–2522.

79. Wang, Y.; Wang, X.; Luu, L.D.W.; Chen, S.; Jin, F.; Wang, S.; Huang, X.; Wang, L.; Zhou, X.; Chen, X.; Cui, X.; Li, J.; Tai, J.; Zhu, X. Proteomic and Metabolomic Signatures Associated with the Immune Response in Healthy Individuals Immunized With an Inactivated SARS-CoV-2 Vaccine. *Front. Immunol.* 2022, 13, 848961. [https://doi: 10.3389/fimmu.2022.848961](https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.848961).
80. Choi, I.; Son, H.; Baek, J.H. Tricarboxylic Acid (TCA) Cycle Intermediates: Regulators of Immune Responses. *Life* 2021, 11,69. [https://doi: 10.3390/life11010069](https://doi.org/10.3390/life11010069).