



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ-ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗΣ ΣΕ ΜΥΕΣ: ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΤΟ ΗΠΑΡ

**ΠΑΝΑΓΙΩΤΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ - 2022

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΓΚΙΚΑΣ

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλλαν στην εκπόνησή της.

Ευχαριστώ θερμά τον επιβλέπων καθηγητή μου, κύριο Γκίκα Ευάγγελο, που μου ανέθεσε το συγκεκριμένο θέμα, για την καθοδήγηση, τις υποδείξεις του, την επιμονή του, το αμείωτο ενδιαφέρον του, τη συμπαράστασή του και τη συνεχή υποστήριξη που προσέφερε από την αρχή μέχρι το τέλος των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές Ντότσικα Ιωάννη και Παντερή Ειρήνη για τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας, ως μέλη της τριμελούς επιτροπής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην υποψήφια διδάκτορα Μπάρλα Ιωάννα για την πολύτιμη βοήθειά της στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας και τον απεριόριστο χρόνο που διέθεσε για απορίες και συζητήσεις πάνω στα αποτελέσματα του πειράματος.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου για όλη τη στήριξη, τη συμπαράσταση, την ψυχολογική υποστήριξή και την κατανόησή τους, καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	5
Abstract.....	6
Εισαγωγή.....	7
Κολιστίνη.....	7
ανάπτυξη μεθοδολογίας για την μεταβολομική μελέτη τοξικότητας της κολιστίνης σε ήπαρ	10
Επιλογή in-vivo πειραματικού μοντέλου	10
Βιολογικοί δείκτες.....	13
Μεταβολομική.....	15
Ιοντισμός ESI	18
Q-TOF-MS	19
Μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση.....	20
επεξεργασία πειραματικών δεδομένων LC-QTOF μη στοχευμένης σάρωσης.....	22
Σκοπός της εργασίας	26
Μεθοδολογία και Πειραματικό πρωτόκολλο.....	27
αντιδραστήρια	27
Οργανολογία	27
Λογισμικά	27
διαλύματα	28
προκατεργασία βιολογικών δειγμάτων	28
συνθήκες ανάλυσης	29
Επεξεργασία πειραματικών δεδομένων και αποτελέσματα	31
Επιλογή κορυφών	31
Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων	36
Εύρεση στατιστικά σημαντικών μεταβολητών (βιοδεικτών)	40
Ταυτοποίηση και βιολογική ερμηνεία χαρακτηριστικών	42
απόδοση χαρακτηριστικών σε μεταβολίτες.....	45
Docosatetraenoylcarnitine	46
3-oxo-3-carboxy-n-propyl)cysteine	47
Nonic acid	48
Homo-L-arginine	49
dopamine.....	50
Μεταβολομικά μονοπάτια που επηρεάζονται	52

Συσχέτιση μεταβολιτών με φύλο.....	54
Επίλογος.....	57
Προτάσεις για μελλοντική έρευνα	58
Βιβλιογραφία.....	59
Παράρτημα	63
Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.....	63
Επιλογή στατιστικά σημαντικών χαρακτηριστικών.....	67
Χαρακτηρισμός χημικής δομής μεταβολιτών.....	74



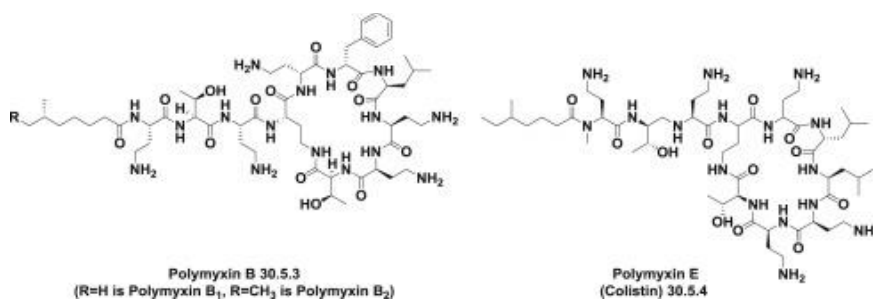
Η κολιστίνη είναι αντιβιοτικό φάρμακο που ανακαλύφθηκε το 1947 και χρησιμοποιήθηκε ευρέως στη δεκαετία του 60', όμως λόγω της τοξικότητας που εμφάνιζε, κυρίως νεφροτοξικότητα και νευροτοξικότητα, καταργήθηκε δύο δεκαετίες μετά. Παρόλα αυτά, με την αύξηση της ανθεκτικότητας που παρουσιάζουν τα βακτήρια σε νεότερα αντιβιοτικά, υπήρξε η ανάγκη επαναχρησιμοποίησης φαρμάκων όπως η κολιστίνη αλλά ως έσχατη λύση σε πολύ επιβαρυνμένες περιπτώσεις ασθενών. Στην παρούσα εργασία γίνεται μεταβολομική μελέτη της τοξικότητας της κολιστίνης σε δείγματα ήπατος μυών, με σκοπό τη διερεύνηση της τοξικότητας στο ήπαρ, για την οποία δεν υπάρχει εκτενής βιβλιογραφία, αλλά και τον εντοπισμό μεταβολιτών που υποδηλώνουν την τοξικότητα της. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε in-vivo πειραματική διαδικασία στην οποία αξιοποιήθηκαν μυς ως πειραματόζωα. Οι μύες χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες, 1) την ομάδα αναφοράς (control group), 2) ομάδα μέγιστης μη τοξικής δόσης, 1 mg/kg και 3) ομάδα τοξικής δόσης, 1.5 mg/kg. Και στις δύο ομάδες οι δόσεις που χορηγήθηκαν ήταν μονοδοσικές. Στη συνέχεια έγινε λήψη του ήπατος των μυών όλων των ομάδων, εφαρμόστηκε πρωτόκολλο εκχύλισης μεταβολιτών και ακολούθησε η ανάλυση τους με UPLC-QTOFMS σε θετικό και αρνητικό ιοντισμό ESI. Στα ληφθέντα φάσματα έγινε επιλογή κορυφών (peak picking) και αξιοποιήθηκε η πολυπαραμετρική ανάλυση για να αναδειχθούν στατιστικά σημαντικοί βιοδείκτες. Τέλος, έγινε χαρακτηρισμός των χημικών δομών των χαρακτηριστικών με τη χρήση in silico μεθόδων θραυσματοποίησης και σχετικών διαδικτυακών βιβλιοθηκών. Έγινε μελέτη πιθανών μεταβολομικών μονοπατιών και στοχευμένη ανάλυση των φασμάτων για την επαλήθευση ύπαρξης επιπλέον μεταβολιτών που συμμετέχουν στα διακεκριμένα μονοπάτια και μελετήθηκε η συσχέτιση της τοξικότητας της κολιστίνης με το φύλο σε συνάρτηση με τη δόση. Εδώ ας αναφέρουμε επιγραμματικά και μερικά συμπεράσματα.

Colistin is an antibiotic drug that was discovered in 1947 and was widely used in the 60s. It was abolished two decades later due to its toxicity, mainly nephrotoxicity and neurotoxicity. However, because of the increase of antimicrobial resistance, there has been a need to reuse drugs such as colistin but as a last resort in very burdened patient cases. In this work, a metabolomic study of the toxicity of colistin in mice liver samples is carried out, with the aim of investigating liver toxicity, for which there is no extensive literature and to identify metabolites that indicate its toxicity. For this purpose, an in-vivo experimental procedure was carried out in which mice were used as experimental animals. Mice were divided into three groups, 1) the reference group (control group), 2) the maximum non-toxic dose group, 1 mg/kg and 3) the toxic dose group, 1.5 mg/kg. In both groups a single dose was given. Then the livers of all groups was obtained, a metabolite extraction protocol was applied and their preparation was followed by UPLC-QTOFMS analysis in positive and negative ESI ionization. Peak picking was performed on the obtained spectra and multiparametric analysis was used to reveal statistically significant biomarkers. Finally, the chemical structures of the features were characterized using in silico fragmentation methods and relevant online libraries. Potential metabolomic pathways and targeted analysis of the spectra were performed to verify the existence of additional metabolites involved in the distinguished pathways, and the sex-related dose-response relationship of colistin toxicity was studied. Here let's briefly mention some conclusions.

ΚΟΛΙΣΤΙΝΗ

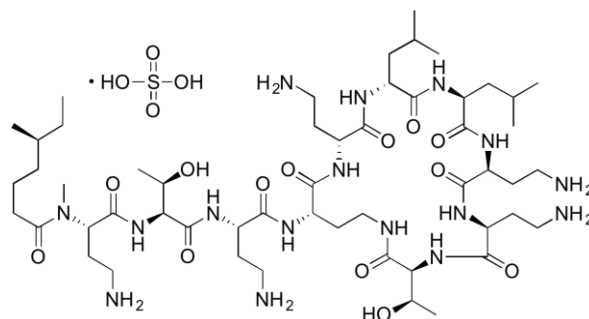
Μια από τις κύριες υγειονομικές κρίσεις των τελευταίων δύο δεκαετιών είναι η μικροβιακή ανθεκτικότητα που προκύπτει από την εμφάνιση μικροοργανισμών που παρουσιάζουν περιορισμένη ή καθόλου ευαισθησία στις διαθέσιμες αντιμικροβιακές θεραπείες. Ειδικά τα gram-αρνητικά βακτήρια (Gram Negative Bacteria, GNB) όπως *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* και *Klebsiella pneumoniae*, ανησυχούν την ιατρική κοινότητα, λόγω της έλλειψης αποτελεσματικών θεραπειών και του περιορισμένου αριθμού αντιβιοτικών που αναπτύσσονται για τη θεραπεία αυτών των δυνητικά θανατηφόρων παθογόνων (Lim et al., 2010). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την περιορισμένη ανακάλυψη νέων αντιβιοτικών έχει οδηγήσει στην επαναχρησιμοποίηση παλαιότερων αντιβιοτικών που είχαν σταματήσει να χορηγούνται. Τα αντιβιοτικά αυτά είναι κυρίως οι πολυμιξίνες (Li et al., 2006).

Οι πολυμιξίνες είναι πολυπεπτίδια με ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι των GNB. Οι πολυμιξίνες A, B, C, D και E απομονώθηκαν και περιγράφηκαν το 1947, εκ των οποίων χρησιμοποιούνται στην κλινική πρακτική η πολυμιξίνη B και η πολυμιξίνη E, γνωστή και ως κολιστίνη (Henkel & Hausmann, 2019). Αυτή η κατηγορία φαρμάκων χρησιμοποιήθηκε ευρέως στη δεκαετία του 1960, αλλά μεταξύ της δεκαετίας του 1970 και του 1980 η χρήση τους καταργήθηκε λόγω των παρενεργειών που προκαλούσαν. Η κολιστίνη (πολυμιξίνη E) ήταν ένα από τα πρώτα αντιβιοτικά με σημαντική δραστηριότητα έναντι των GNB, ιδίως του *Pseudomonas aeruginosa* (Ψευδομονάδα αεριογόνος) (Nation & Li, 2009). Χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στη δεκαετία του 1950 ως ενδοφλέβια σύνθεση.

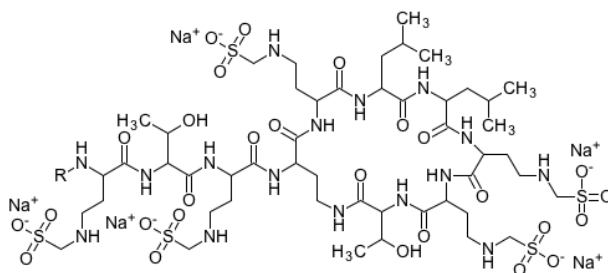


Εικόνα 1: Χημικές δομές της πολυμιξίνης B και της πολυμιξίνης E.

Πλέον, υπάρχουν δύο μορφές κολιστίνης που χορηγούνται για τη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από τα GNB. Συγκεκριμένα: η θειική κολιστίνη (CS) για στοματική και τοπική χρήση και το άλας νατρίου του αρνητικά φορτισμένου παραγώγου της κολιστίνης που είναι γνωστό ως νατριούχος κολιστιμεθάτη (CMS), το οποίο είναι ένα ανενεργό προφάρμακο που χρησιμοποιείται για παρεντερικές και εκνεφωτικές συνθέσεις καθώς είναι λιγότερο τοξικό από τη θειική κολιστίνη.



Εικόνα 2: χημική δομή της θειικής κολιστίνης (colistin sulphate)



Εικόνα 3: χημική δομή νατριούχους κολιστιμεθάτης (colistimethate sodium)

Η πιο κοινή παρενέργεια της κολιστίνης είναι η νεφροτοξικότητα, η οποία χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση νεφρικού τραυματισμού, που οδηγεί σε οξεία νεφρική ανεπάρκεια. Η νεφροτοξικότητα αυτή, είναι εξαρτώμενη από τη δόση που χορηγείται και μπορεί να αποκατασταθεί κατά ένα ποσοστό μετά την παύση της θεραπείας. Τα αναφερόμενα ποσοστά νεφροτοξικότητας που προκαλούνται από την κλινική χρήση κολιστίνης ποικίλλουν ευρέως και κυμαίνονται από 10% έως 45% (Jeong et al., 2016). Ωστόσο, έχει περιγραφεί και η εμφάνιση νευροτοξικότητας η οποία είναι αναστρέψιμη συνήθως μετά την παύση της θεραπείας. Για το λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια, με την αύξηση της εμφάνισης ανθεκτικών μικροοργανισμών, άρχισε να χορηγείται πάλι σε ασθενείς, αλλά ως “εσχάτη λύση” (Lirio et al., 2018).

Για τον μηχανισμό της δράσης της κολιστίνης δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες. Παρόλα αυτά, λόγω της χημικής ομοιότητάς της με την πολυμυξίνη Β, θεωρείται πως έχουν τον ίδιο μηχανισμό. Η πολυμυξίνη Β αλληλεπιδρά με το λιποπολυσακχαρίτη (LPS) της εξωτερικής μεμβράνης των GNB και αντικαθιστά ανταγωνιστικά δισθενή κατιόντα (Ca^{2+} και Mg^{2+}) από τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες του λιπιδίου Α του LPS.

Όσον αφορά την αλλαγή στο μεταβόλωμα που προκύπτει από την έκθεση σε κολιστίνη, μελέτες που έγιναν σε αρουραίους έδειξαν σημαντική αύξηση στις πρωτεΐνες του ουροποιητικού συστήματος όπως η Kim-1, η S-τρανσφεράση άλφα γλουταθειόνης (α -GST) και η N-ακετυλαγαλακτοσιναμιδάση έπειτα από λήψη κολιστίνης ενδοφλεβίως για έως και 7 ημέρες (Jeong et al., 2016). Ωστόσο δεν έχουν χαρακτηριστεί ακόμη πλήρως οι βιοδείκτες για την νεφροτοξικότητα που προκαλεί η κολιστίνη (Keirstead et al., 2014).

Παρόλο που τα ποσοστά αντοχής στην κολιστίνη ήταν σχετικά χαμηλά, πιθανώς λόγω της σπάνιας χρήσης της, πρόσφατα υπήρξε μια απότομη αύξηση των λοιμώξεων που προκλήθηκαν από βακτήρια ανθεκτικά στην κολιστίνη. Υπολογίζεται πως η αντιμετώπιση των GNB με κολιστίνη θα περιοριστεί την επόμενη δεκαετία. Επομένως, υπάρχει επείγουσα ανάγκη βελτιστοποίησης της χρήσης της κολιστίνης προκειμένου να περιοριστεί η δημιουργία ανθεκτικών μικροοργανισμών (Nation & Li, 2009). Ένας αποτελεσματικός τρόπος μείωσης της χρήσης την κολιστίνης με σκοπό τον περιορισμό των αρνητικών παρενεργειών που προκαλεί, είναι η εύρεση βιοδεικτών που να υποδηλώνουν τοξικότητα καθώς και τον μηχανισμό που την επάγει. Επομένως, ο θεραπευτής θα μπορεί να παρακολουθήσει την εξέλιξη της τοξικότητας και θα αποφασίζει εάν μπορεί να συνεχίσει τη χορήγηση της κολιστίνης ή όχι.

ΕΠΙΛΟΓΗ IN-VIVO ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ

Μία μελέτη τοξικότητας φαρμάκου, έχει ως σκοπό τη διερεύνηση βραχυπρόθεσμων ή μακροπρόθεσμων τοξικών επιδράσεων ενός φαρμάκου ή χημικής ουσίας σε έναν οργανισμό. Οι μελέτες αυτές διαφέρουν ανάλογα με το χρόνο έκθεσης του οργανισμού στη δυνητικά τοξική ουσία και εξαρτάται από το πόσο στοχευμένη είναι, δηλαδή αν υπάρχουν ήδη πληροφορίες σχετικά με την τοξικότητα της και την επιρροή της σε συγκεκριμένα συστήματα του οργανισμού (Saganuwan, 2017). Σε κάθε περίπτωση, είναι απαραίτητη η χρήση πειραματόζων ως πειραματικά μοντέλα. Για ηθικούς και οικονομικούς λόγους, είναι σημαντικό να υπάρχει καλός πειραματικός σχεδιασμός όταν χρησιμοποιούνται πειραματόζωα, να αναλύονται σωστά τα δεδομένα και να χρησιμοποιείται ο ελάχιστος αριθμός ζώων που είναι απαραίτητος για την επίτευξη των επιστημονικών στόχων, χωρίς όμως να χάνονται βιολογικά σημαντικά αποτελέσματα ή να απαιτείται περιττή επανάληψη των πειραμάτων.

Η επιλογή του πειραματόζωου εξαρτάται από το σύστημα του οργανισμού που πρόκειται να μελετηθεί αλλά και το χρόνο της έκθεσης. Για παράδειγμα, το κουνέλι χρησιμοποιήθηκε επί πολλά χρόνια ως μοντέλο διαβητικών ανθρώπων για τον προσδιορισμό της ισχύος των σκευασμάτων ινσουλίνης, παρόλο που έχει πολλές διαφορές με τον ανθρώπινο οργανισμό, λόγο του ότι ήταν καλά τεκμηριωμένο ότι η ινσουλίνη μειώνει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και στα κουνέλια όπως στους ανθρώπους (Festing & Altman, n.d.).

Για το πείραμα αυτό επιλέχτηκε ο μύς (ποντίκι) ως πειραματικό μοντέλο, το οποίο αποτελεί ένα από τα πιο διαδεδομένα πειραματόζωα. Το εξημερωμένο ποντίκι της Βόρειας Αμερικής και της Ευρώπης είναι το πιο συχνό πειραματικό μοντέλο που χρησιμοποιείται στις βιο-ιατρικές δοκιμές. Υπολογίζεται πως η χρήση των μυών στα πειράματα ξεκίνησε εκατοντάδες χρόνια πριν με τον William Harvey το 1616 ο οποίος μελετούσε το αναπαραγωγικό σύστημα και την κυκλοφορία του αίματος. Για να υπάρχει μια ομοιομορφία γενετικά, τα ποντίκια αναπαράγονταν επιλεκτικά σύμφωνα με το χρώμα του τριχώματος τους. Στις αρχές της δεκαετίας του 90 ξεκίνησε η αναπαραγωγή μυών που φαινόταν να μιμούνται περισσότερο τον ανθρώπινο οργανισμό. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός είδους μυών που είχε αναπτύξει αντίσταση σε διάφορες μορφές καρκίνου και ιούς κι για αυτό το λόγο εφαρμόστηκε ένα τυχαίο σύστημα συνδυασμού για

αναπαραγωγή τα επόμενα χρόνια. Τα ποντίκια που χρησιμοποιούνται πλέον ως επί το πλείστον αναφέρονται ως Swiss stains.

Η επιλογή του μύ ως πειραματικό μοντέλο δεν είναι τυχαία, καθώς υπερτερεί σε πολλούς τομείς. Αρχικά είναι μικρό σε μέγεθος, άρα και εύκολα διαχειρίσιμο, και δίνει πολλούς απογόνους. Αυτό συνεπάγεται τη χρήση οικονομικού εξοπλισμού για την τροφή και την ασφάλεια τους, καθώς και μικρό χώρο για την τοποθέτησή τους. Επιπροσθέτως, τα ποντίκια έχουν σύντομο χρόνο κυοφορίας και η διάρκεια της ζωής τους είναι αρκετά σύντομη σε σύγκριση με άλλα ζωικά μοντέλα, δίνοντας τη δυνατότητα σε μια ερευνητική ομάδα να εξετάσει έναν οργανισμό σε όλα τα διαστήματα της ζωής του. Τέλος, λόγω της χρήσης του ως πειραματικό μοντέλο εδώ και εκατοντάδες χρόνια, έχει συγκεντρωθεί μεγάλος όγκος πληροφοριών σχετικά με τη διατροφή τους, τα διάφορα συστήματά τους, τις συμπεριφορικές τους συνήθειες κ.α.

Το μειονέκτημα της χρήσης μυών είναι η μεγαλύτερη ευαισθησία που έχουν σε διάφορες παθήσεις λόγω του μικρού τους μεγέθους και του γρηγορότερου μεταβολισμού σε σύγκριση με άλλα πειραματικά μοντέλα, πχ με τους αρουραίους και τα κουνέλια. Μια βλάβη στο σύστημα ρύθμισης της θερμοκρασίας ή του συστήματος αυτόματης παροχής νερού μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στον οργανισμό τους που επηρεάζουν πολύ τα πειραματικά αποτελέσματα. Ακόμη, στις περιπτώσεις που χρειάζεται μεγάλη ποσότητα δείγματος, πχ τρίχας, υπάρχει ο κίνδυνος να μπορεί να γίνει μόνο μία δειγματοληψία η οποία πιθανόν να είναι και ανεπαρκής (Shayne C. Gad, *Animal Models in Toxicology*, Second edition, October 2006).

Πίνακας 1 : χαρακτηριστικά για τη ζωή και την αναπαραγωγή των μυών.

Γενικά

Διάρκεια ζωής	1-2 χρόνια
Μάζα αρσενικών	20-40 g
Μάζα θηλυκών	18-40 g
Αριθμός χρωμοσωμάτων	40
Θερμοκρασία σώματος	36.5 °C

Αναπαραγωγή

Ηλικία αρσενικών	50 ημέρες
Ηλικία θηλυκών	50-60 ημέρες
Περίοδος τοκετού	17-21 ημέρες

Ο οργανισμός του μυός έχει αρκετές ομοιότητες με τον οργανισμό του ανθρώπου αλλά και ορισμένες διαφορές που θα πρέπει πάντα να λαμβάνονται υπόψιν. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω έχουν πολύ γρηγορότερο μεταβολισμό επομένως η ποσότητα μιας ουσίας που είναι τοξική για ένα ποντίκι μπορεί αντίστοιχα να μην είναι τοξική για τον άνθρωπο. Επίσης, τα ποντίκια έχουν πιο περίπλοκες αναπνευστικές διόδους και αναπνέουν μόνο από τη μύτη, οπότε σε περίπτωση που γίνεται η έκθεση μέσω της αναπνοής το πειραματικό μοντέλο ίσως να μην είναι αντιπροσωπευτικό για τον άνθρωπο. Ακόμη, η αναλογία της επιφάνειας του σώματος ως προς τη μάζα του μυός διαφέρει κατά πολύ με άλλα ζώα, όπως και με τον άνθρωπο. Χαρακτηριστικά, το ήπαρ ενός μύ έχει τη διπλάσια σπειραματική επιφάνεια φιλτραρίσματος ανά γραμμάριο σωματικής μάζας σε σχέση με το ήπαρ ενός αρουραίου. Επομένως, είναι σημαντική η χρήση μαθηματικών μοντέλων που να ανάγουν ικανοποιητικά τα αποτελέσματα των πειραμάτων που έγιναν σε ποντίκια, όπως και σε οποιοδήποτε άλλο πειραματικό ζώο, σε δεδομένα που να ισχύουν για τον άνθρωπο. Όπως με κάθε διαγνωστικό τεστ, η αξιοπιστία τους μπορεί να εκτιμηθεί μόνο με τη διεξαγωγή δοκιμών στις οποίες η ίδια ένωση δίνεται τόσο σε ζώα όσο και σε ανθρώπους και καταγράφεται η παρουσία ή η απουσία τοξικότητας. Ένα από τα μαθηματικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται σε αρχικό

στάδιο είναι το PPV (Positive Predictive Value) , που δίνεται από τη σχέση $a / (a + b)$ και αντικατοπτρίζει την πιθανότητα σωστού προσδιορισμού της τοξικότητας στον άνθρωπο από το ζωικό πειραματικό μοντέλο, δεδομένου ότι η έχει παρατηρηθεί τοξικότητα στο μοντέλο αυτό. Για την αξιολόγηση του πειραματικού μοντέλου οι ερευνητές εστιάζουν κυρίως στην ευαισθησία και την ειδικότητα του μοντέλου, καθώς εάν μια ένωση αποδειχτεί τοξική για τα πειραματόζωα δε θα προχωρήσει στην αξιολόγηση της τοξικότητας της στον άνθρωπο. Επομένως ο λόγος PPV δεν είναι ικανοποιητικός για την αξιολόγηση του μοντέλου. Αντιθέτως, ο λόγος PLR που είναι συνάρτηση της ευαισθησίας και της ειδικότητας περιγράφουν καλύτερα την αποδοτικότητα του μοντέλου και δίνεται από τη σχέση:

$$PRL = \text{sensitivity} / (1 - \text{specificity})$$

Εάν για ένα ζωικό μοντέλο η διαφορά της τιμής PRL από τη μονάδα είναι στατιστικά σημαντική, τότε το μοντέλο προβλέπει ικανοποιητικά πως η υπό δοκιμή ουσία θα είναι τοξική για τον άνθρωπο.(Bailey et al., 2014).

ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Οι βιολογικοί δείκτες (βιοδείκτες) είναι «κυτταρικές, βιοχημικές ή μυϊκές μεταβολές που είναι μετρήσιμες σε βιολογικά δείγματα όπως ιστοί, κύτταρα ή βιολογικά υγρά» και αποτελούν τα τελευταία χρόνια το κλειδί για καλύτερη φροντίδα των ασθενών και για τη μείωση του ιατρικού κόστους. Λειτουργούν ως εργαλεία που βοηθούν στην κατανόηση της αιτίας μιας παθολογικής κατάστασης, στη διάγνωσή της, στη προσέγγιση της θεραπείας της αλλά και στον έλεγχο της αποτελεσματικότητάς της. Επίσης, η μέτρηση επιλεγμένων βιοδεικτών αξιοποιείται για τον καθορισμό της σχέσης δόσης και απόδοσης μιας φαρμακευτικής αγωγής για τον κάθε οργανισμό ξεχωριστά. Τέλος, βοηθούν στην κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους σχετίζεται η ασθένεια καθώς και στην πρώιμη διάγνωση της, ακόμα και στον ασυμπτωματικό πληθυσμό(Mayeux, 2004).

Οι βιοδείκτες μπορούν να χωριστούν σε βιοδείκτες:

- Διάγνωσης
- Παρακολούθησης
- Απόκρισης (φαρμακοδυναμικής)
- Πρόβλεψης
- Πρόγνωσης

- Εκτίμησης ρίσκου
- Ασφάλειας

Οι βιοδείκτες διάγνωσης περιγράφουν διαφορές μεταξύ ατόμων λόγω γενετικών ή μη παραγόντων (ηλικία, ηπατική νόσο, νεφρική νόσο, δίαιτα κ.α.) που είναι χαρακτηριστικοί για την διάγνωση μιας παθολογικής κατάστασης. Οι βιοδείκτες απόκρισης ονομάζονται και βιοδείκτες φαρμακοδυναμικής, καθώς υποδεικνύουν την απόκριση του οργανισμού σε ένα είδος θεραπείας. Επομένως, οι βιοδείκτες αυτοί θα πρέπει να συσχετίζονται με το αποτέλεσμα της θεραπείας (Jain et al., 2009). Αντιθέτως, οι βιοδείκτες πρόβλεψης μπορούν να προβλέψουν αν ένας ασθενής θα ανταποκριθεί σε μια δεδομένη θεραπεία. Στην περίπτωση της κολιστίνης, έχουν βρεθεί αρκετοί βιοδείκτες που υποδεικνύουν τοξικότητα σε ένα όργανο, όπως στην περίπτωση της νεφρικής βλάβης όπου χρησιμοποιείται ως βιοδείκτης το NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin).

Η κλινική εφαρμογή των μοριακών τεχνολογιών για την ανάλυση των βιοδεικτών για τη διάγνωση και την παρακολούθηση των ανθρώπινων ασθενειών αναφέρεται ως μοριακή διάγνωση. Είναι ένας ευρύτερος όρος και περιλαμβάνει τεχνολογίες που χρησιμοποιούν DNA, RNA, γονίδια ή πρωτεΐνες ως βάση για διαγνωστικές εξετάσεις. Οι περισσότερες κλινικές εργαστηριακές εξετάσεις πραγματοποιούνται σε βιολογικά υγρά όπως αίμα, ούρα κ.α. Παρά την εκτεταμένη χρήση των βιολογικών υγρών ως δείγματα προσδιορισμού βιοδεικτών, οι βιοδείκτες μπορούν επίσης να ανιχνευθούν σε μελέτες απεικόνισης ή εξέταση ιστών του σώματος, ακόμη και στην εκπνοή.

Οι ανακαλύψεις στη βιοχημεία τα τέλη του 19ου και του 20ου αιώνα έχουν εφοδιάσει την επιστημονική κοινότητα με μια σειρά πολύτιμων γνώσεων σχετικά με το μεταβολισμό. Στις γνώσεις αυτές συμπεριλαμβάνονται οι μεταβολίτες, οι πρωτεΐνες και οι συν-παράγοντες που εμπλέκονται με τον μεταβολισμό, καθώς και οι αλληλεπιδράσεις αυτών στη βιοσύνθεση του μεταβολίτη ή στον καταβολισμό του.

Οι μεταβολίτες είναι οργανικές και ανόργανες χημικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους (<1000 Da) οι οποίες απαντώνται σε βιολογικά συστήματα. Το σύνολο των μεταβολιτών αποτελεί το μεταβόλωμα ενός οργανισμού, το οποίο αντικατοπτρίζει την κατάσταση του οργανισμού σε κάθε χρονική περίοδο. Για ορισμένους επιστήμονες, η έννοια του μεταβολίτη περιλαμβάνει όλες τις οργανικές ουσίες που προκύπτουν φυσικά από τον μεταβολισμό ενός ζωντανού οργανισμού και που δεν προέρχονται άμεσα από την έκφραση του γονιδίου. Αυτό ισχύει για κάθε ζωντανό οργανισμό όπως ένας μικροοργανισμός, έναν άνθρωπο ή ένα φυτό (Mamas et al., 2011).

Οι μεταβολίτες μπορούν να διακριθούν με βάση την προέλευσή τους σε ενδογενείς και εξωγενείς. Οι ενδογενείς μεταβολίτες σχετίζονται με ενδογενείς διαδικασίες του οργανισμού, όπως η ινσουλίνη στην περίπτωση του διαβήτη ή η μυογλοβίνη στην καρδιακή προσβολή και θα μπορούσαν να ταξινομηθούν ως πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες ανάλογα με τη ζωτική σημασία που έχουν για τον οργανισμό. Πρωτογενείς είναι αυτοί που εμπλέκονται άμεσα σε βασικές διαδικασίες, όπως η ανάπτυξη και η αναπαραγωγή. Ένα παράδειγμα είναι αμινοξέα ή τα ενδιάμεσα προϊόντα της γλυκόλυσης (Qureshi et al., 2012). Αντιθέτως, οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι ειδικοί για την κάθε βιολογική διαδικασία έχουν περιορισμένη κατανομή και συντίθενται για μια συγκεκριμένη βιολογική λειτουργία, π.χ τα αλκαλοειδή για τα φυτά και οι ορμόνες για θηλαστικά. Οι εξωγενείς μεταβολίτες αντιπροσωπεύουν τα προϊόντα μεταβολισμού εξωγενών ενώσεων, που προκύπτουν από τη φάση I, δηλαδή την τροποποίηση του αρχικού μορίου για την εισαγωγή μιας λειτουργικής ομάδας και από τη φάση II που αποτελεί την ενζυμική μετατροπή τους σε επιμέρους ουσίες. Αυτές οι εξωγενείς ουσίες μπορεί να είναι φυτοφάρμακα, περιβαλλοντικοί ρύποι, φάρμακα κ.α. (Roux et al., 2011)

Οι μεταβολίτες και οι συγκεντρώσεις τους, σε αντίθεση με άλλα βιομόρια, αντικατοπτρίζουν άμεσα την υποκείμενη βιοχημική δραστηριότητα και την κατάσταση των κυττάρων, καθώς αποτελούν ευαίσθητο αποδέκτη κάθε εσωτερικής ή εξωτερικής μεταβολής. Επομένως, το μεταβόλωμα έναντι άλλων, μπορεί να αντικατοπτρίζει καλύτερα τον μοριακό φαινότυπο, ανά χρονική στιγμή. Από την μελέτη του μεταβολώματος διαρκώς προκύπτουν νέοι βιολογικοί δείκτες χρήσιμοι για τη

διάγνωση και την αξιολόγηση συγκεκριμένων παθολογικών καταστάσεων. Λόγω των παραπάνω, η μελέτη όσο το δυνατόν μεγαλύτερη πληροφορίας αναφορικά με το μεταβολικό προφίλ, οδήγησε στην εδραίωση της μελέτης του μέσω ομικής μεθοδολογίας (μεταβολομικής), ώστε να εξασφαλίζεται ολιστική γνώση. Έχει παρατηρηθεί ότι οι μεταβολομικές μελέτες οδηγούν στην εύρεση βιοδεικτών οι οποίοι μπορεί να παρουσιάζουν μεγαλύτερη εκλεκτικότητα από τους βιοδείκτες που εξετάζονταν μέχρι τώρα (Mamas et al., 2011).

Συγκεκριμένα μια μεθοδολογία omics στοχεύει στη δημιουργία ενός ολοκληρωμένου συνόλου δεδομένων για οτιδήποτε μπορεί να καταγραφεί και να μετρηθεί. Κύριες κατηγορίες μεθοδολογιών omics είναι: transcriptomics, που μελετά το γονιδίωμα, proteomics, που μετρά τις πρωτεΐνες και metabolomics

Γενικά, η ανάπτυξη ολιστικών μελετών όπως η γονιδιωματική, η πρωτεομική, και η μεταβολομική, ακολούθησε τις εξελίξεις στις τεχνολογίες. Πλέον, ο ρόλος των τεχνολογικών εξελίξεων στις επιστημονικές ανακαλύψεις έχει αναθεωρηθεί και σύμφωνα με τον Sydney Brenner “η πρόοδος στην επιστήμη εξαρτάται από νέες τεχνικές, νέες ανακαλύψεις και νέες ιδέες, πιθανώς με αυτή τη σειρά”.

Συγκεκριμένα, στην περίπτωση της μεταβολομικής γίνεται μελέτη της μεταβολικής απόκρισης των ζωντανών συστημάτων, σε παθοφυσιολογικά ερεθίσματα ή σε γενετικές τροποποιήσεις (Robertson, 2005). Η μεταβολομική προσφέρει τη δυνατότητα για ταυτόχρονο προσδιορισμό χιλιάδων διαφορετικών μεταβολιτών μέσα σε ένα δείγμα. Για να επιτευχθεί αυτό αξιοποιεί ευαίσθητες αναλυτικές τεχνικές που δίνουν την δυνατότητα μη στοχευμένης σάρωσης. Ανεξάρτητα από τον ακριβή ορισμό, ο αναλυτικός στόχος της μεταβολομικής είναι η επίτευξη μιας ολοκληρωμένης μέτρησης του μεταβολισμού και του τρόπου με τον οποίο αλλάζει όταν αποκρίνεται σε εξωγενείς ή ενδογενείς παράγοντες, προκειμένου να βρεθεί η σχέση μεταξύ των διαταραχών και των επηρεαζόμενων βιοχημικών οδών.

Η σύγχρονη μεταβολική αύξησε τις απαιτήσεις και συνέβαλε στην ανάπτυξη ολοένα και πιο εξελιγμένων οργάνων που μπορούν να μετρήσουν εκατοντάδες συστατικά ταυτόχρονα με την ποσοτικοποίησή τους. Οι μεταβολομικές μέθοδοι ανάλογα με τον τρόπο προσέγγισης διακρίνονται σε μη στοχευμένες (untargeted) και στοχευμένες (targeted). Σε μία μη στοχευμένη μέθοδο μεταβολομικής προσδιορίζονται σε ένα σύνολο δειγμάτων όσο το δυνατόν περισσότεροι μεταβολίτες, χωρίς να είναι γνωστοί εκ των προτέρων. Αντίθετα, στη στοχευμένη μέθοδο προσδιορίζονται κάποιες ομάδες μεταβολιτών με συγκεκριμένη βιοχημική λειτουργία

Υπάρχουν πολλές διαφορετικές τεχνολογίες μεταβολομικής (NMR, GC-MS, LC-MS, CE-MS) εκ των οποίων η κάθε μία έχει τα δικά της πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Παρόλα αυτά, τα

τελευταία χρόνια, οι δύο τεχνικές που έχουν επικρατήσει είναι το NMR και η υγρή χρωματογραφία με φασματομετρία μάζας. Το NMR χρησιμοποιείται χρόνια στη μεταβολομική, καθώς δεν απαιτεί προεπεξεργασία του δείγματος και μπορούν με αυτή τη μέθοδο να ανιχνευτούν άγνωστοι μεταβολίτες με μη στοχευμένη ανάλυση. Συγκριτικά όμως με τις τεχνικές φασματομετρίας μάζας, το NMR έχει χαμηλότερη ευαισθησία, κι αυτός είναι ένας από τους κύριους λόγους που οι τεχνικές MS υπερτερούν. Επίσης, στις τεχνικές MS υπάρχει η δυνατότητα διαχωρισμού των μεταβολιτών όταν συνδυάζονται με τεχνικές χρωματογραφίας.

Πίνακας 2 : πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα για τις αναλυτικές μεθόδους NMR, GC-MS και LC-MS για τη χρήση τους στη μεταβολομική.

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ		ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ
NMR	• Ποσοτική μέθοδος • Μη καταστρεπτική • Γρήγορη (2-3 λεπτά/δείγμα) • Δε χρειάζεται διαχωρισμός των ουσιών	• Όχι μεγάλη ευαισθησία • Ακριβό όργανο • Μεγάλη ποσότητα δείγματος (0.5 μL) • Ακατάλληλο για άλατα/ανόργανα
GC-MS	• Καλή ευαισθησία • Φθηνή μέθοδος • Σχετικά μικρή ποσότητα δείγματος • Δυνατότητα ποσοτικοποίησης • Πολύ καλή διαχωρητική αναπαραγωγικότητα	• Καταστρεπτική μέθοδος • Απαιτείται παραγωγοποίηση αν δεν είναι πτητικοί οι αναλύτες • Αργή ανάλυση (20-30 λεπτά/δείγμα)
LC-MS	• Εξαιρετική ευαισθησία • Ευέλικτη τεχνολογία • Λίγη ποσότητα δείγματος • Απεικόνιση με MALDI • Δυνατότητα ανίχνευσης του μεγαλύτερου μέρους του μεταβολισμού	• Καταστρεπτική μέθοδος • Αργή ανάλυση (20-30 λεπτά/δείγμα) • Όχι καλή ποσοτικοποίηση • Όχι πολύ καλή αναπαραγωγικότητα

Οι μεταβολομικές αναλύσεις πραγματοποιούνται με τη χρήση αεριοχρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας (GC/MS), υγρής χρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας (LC/MS) και τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης με φασματομετρία μάζας CE/MS, ενώ συνήθως οι μη στοχευμένες πραγματοποιούνται χρησιμοποιώντας Q-TOF/MS ή άλλα όργανα υψηλής ανάλυσης όπως τα

φασματομέτρα μάζας μετασχηματισμού Fourier. (Roux et al., 2011). Για το πείραμα αυτό επιλέχθηκε για το διαχωρισμό των ουσιών υγρή χρωματογραφία UPLC (Ultra-performance Liquid Chromatography) σε συνδυασμό με Q-TOF/MS και ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI). Η τεχνική ESI επιλέχτηκε λόγω του ότι είναι πηγή ήπιου ιοντισμού και δε θα προκαλέσει τη θραυσματοποίηση των μεταβολιτών.

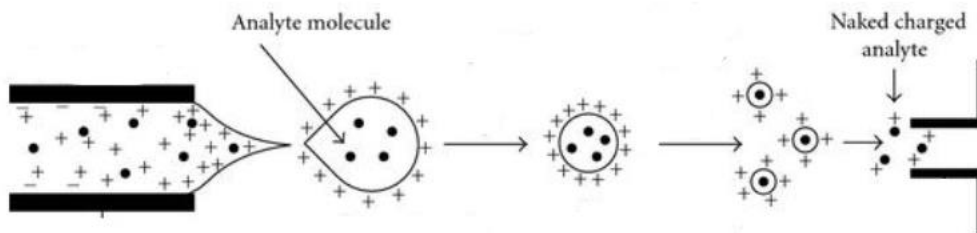
ΙΟΝΤΙΣΜΟΣ ESI

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό είναι μία ήπια μέθοδος ιονισμού, με την οποία επιτυγχάνεται η μεταφορά των ουσιών από το διάλυμα στην αέρια φάση ως ιόντα. Χρησιμοποιείται κυρίως για την ανάλυση μεγάλων, μη πτητικών μορίων, όπως οι πρωτεΐνες. Ωστόσο, εφαρμόζεται εξίσου καλά σε μικρά πολικά μόρια, ιοντικά σύμπλοκα μετάλλων και άλλες ανόργανες ουσίες. Τα τελευταία χρόνια η τεχνική ESI-MS έχει πολλές εφαρμογές στα κλινικά εργαστήρια. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι αποτελεί ένα ευαίσθητο και αξιόπιστο εργαλείο για τη μελέτη, σε ποσότητες fmoι σε όγκο δειγμάτων λίγων μL, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για μη πτητικά και θερμικά ασταθή βιομόρια που δεν είναι δυνατό να αναλυθούν με άλλες συμβατικές τεχνικές. Σε συνδυασμό με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (UPLC) πριν από τη φασματομετρική ανάλυση μάζας (UPLC / ESI-MS) αποτελεί μια πολύ ισχυρή τεχνική ικανή να αναλύει τόσο μικρά όσο και μεγάλα μόρια διαφόρων πολικότητων σε ένα πολύπλοκο βιολογικό δείγμα.

Η τεχνική ESI χρησιμοποιεί ηλεκτρική τάση για να βοηθήσει στον ιοντισμό των αναλυτών και κατά το πέρασμα τους από την υγρή στην αέρια φάση. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τρία στάδια:

- τον ψεκασμό ιοντισμένων σταγονιδίων του δείγματος
- την εξάτμιση διαλύτη
- την εκτόνωση των ιόντων από τα φορτισμένα σταγονίδια

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4, το διάλυμα που έχει εκλυστεί από την χρωματογραφική στήλη διέρχεται από ένα τριχοειδή σωλήνα ο οποίος διατηρείται σε υψηλή τάση, δημιουργώντας έτσι μια ομίχλη υψηλής φόρτισης σταγονιδίων με την ίδια πολικότητα με την τριχοειδή τάση. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια ενός ρεύματος αερίου αζώτου, μειώνεται συνεχώς το μέγεθος των σταγονιδίων λόγω της εξάτμισης του διαλύτη, οδηγώντας σε αύξηση της πυκνότητας επιφανειακής φόρτισης. Τέλος, η ισχύς του ηλεκτρικού πεδίου εντός του φορτισμένου σταγονιδίου φτάνει σε κρίσιμο σημείο στο οποίο είναι κινητικά και ενεργητικά δυνατό να γίνει μεταφορά των ιόντων που βρίσκονται στην επιφάνεια των σταγονιδίων από την υγρή στην αέρια φάση.



Εικόνα 4: σχηματική απεικόνιση των κύριων διαδικασιών του ηλεκτροψεκασμού υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης και θετικού ιονισμού.

Q-TOF-MS

Το Q-TOF-MS είναι ένα όργανο που συνδυάζει τετραπολικές τεχνολογίες με έναν αναλυτή μάζας χρόνου πτήσης (TOF-MS). Το Q-TOF-MS μοιάζει πολύ με το φασματόμετρο μάζας τριπλού τετράπολου, με τη διαφορά ότι το τρίτο τετράπολο έχει αντικατασταθεί από ένα σωλήνα χρόνου πτήσης. Συγκεκριμένα, το δείγμα που εξέρχεται από την χρωματογραφική στήλη εισέρχεται στην πηγή ιοντισμού, όπου οι αναλύτες φορτίζονται μέσω πηγής ιοντισμού. Συνήθως η σύζευξη χρωματογραφίας (ατμοσφαιρική πίεση) με φασματόμετρο μάζας (συνθήκες κενού) γίνεται με πηγή ESI ή APCI. Στο ESI τη βοήθεια αερίου N_2 εξατμίζεται ο διαλύτης και απομακρύνονται οι αναλύτες που δεν έχουν ιοντιστεί. Έπειτα, τα ιόντα συγκεντρώνονται και εισέρχονται σε θάλαμο με συνθήκες κενού.

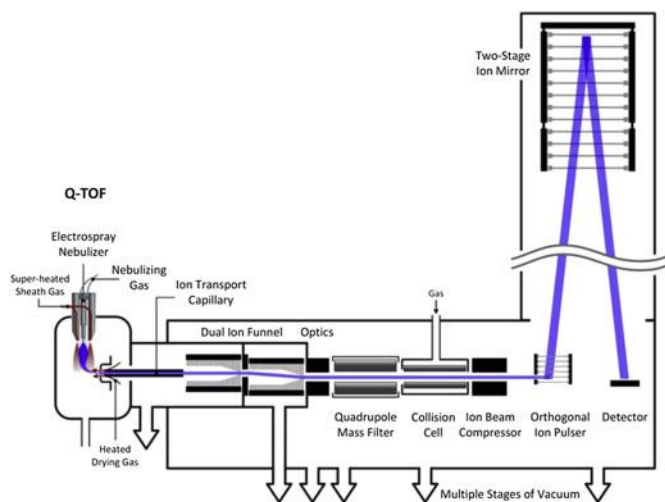
Το πρώτο τετράπολο (Q1) λειτουργεί ως φίλτρο μάζας για την επιλογή συγκεκριμένων ιόντων με βάση την αναλογία μάζας προς φόρτιση (m/z), διαφορετικά ρυθμίζεται σε λειτουργία ραδιοσυχνότητας (RF) και διέρχονται όλα τα ιόντα από το τετράπολο.

Το δεύτερο τετράπολο (Q2) δρα ως χώρος σύγκρουσης, όπου τα ιόντα βομβαρδίζονται από ουδέτερα μόρια αδρανούς αερίου, όπως άζωτο ή αργό, και εφαρμόζεται ενέργεια θραυσματοποίησης (collision energy) με αποτέλεσμα τη θραυσματοποίηση των ιόντων. Αν δεν είναι επιθυμητή η θραυσματοποίηση των ιόντων μπορεί επίσης να εφαρμοστεί μόνο λειτουργία ραδιοσυχνότητας (Allen & McWhinney, 2019).

Μετά την έξοδό τους από το δεύτερο τετράπολο, τα ιόντα εισέρχονται σε έναν επιταχυντή ώστε να αποκτήσουν όλα κοινή Κινητική Ενέργεια και έπειτα κατευθύνονται στον αναλυτή χρόνου

πτήσης, όπου »ταξιθεύουν σε συνθήκες κενού» και αποκτούν ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη της μάζας τους. Ιδανικά, όλα τα ιόντα έχουν την ίδια κινητική ενέργεια ($1/2mv^2$) επομένως τα ιόντα με τη μικρότερη μάζα θα φτάσουν πιο γρήγορα στον ανιχνευτή. Όμως, ανάλογα με το που βρίσκεται το κάθε ιόν σε σχέση με το ηλεκτρόδιο που τα επιταχύνει μπορεί να δεχτεί άλλη διαφορά δυναμικού σε σύγκριση με τα υπόλοιπα, άρα και διαφορετική κινητική ενέργεια. Σχηματίζεται έτσι μια κατανομή ιόντων ανάλογα με την κινητική τους ενέργεια.

Για να μειωθεί αυτή η διασπορά των ιόντων που έχουν ίδιο m/z , τα ιόντα ανακλώνται από τον ανακλαστή, ο οποίος αποτελείται από δακτυλίους στους οποίους εφαρμόζεται δυναμικό ίδιου φορτίου με τα ιόντα ώστε να απωθηθούν. Στη συνέχεια επιταχύνονται προς την αρχική τους κατεύθυνση, προκειμένου να αποκτήσουν όλα την ίδια κινητική ενέργεια. Συγκεκριμένα, όσο μεγαλύτερη κινητική ενέργεια είχαν αρχικά τα ιόντα τόσο πιο μακριά θα φτάσουν κατά την ανάκλασή τους, κι έτσι γίνεται διόρθωση της διασποράς της κινητικής ενέργειας και της χωρικής διασποράς ιόντων που εμφανίζουν τα ίδια m/z , αλλά έχουν διαφορετικές ταχύτητες (Daniel C. Harris, Quantitative Chemical Analysis, W. H. Freeman, 2010)



Εικόνα 5: σχηματική απεικόνιση ενός μηχανίσματος Q-TOF

ΜΗ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση αποτελεί μια ισχυρή τεχνολογία που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε πολλούς ερευνητικούς τομείς, συμπεριλαμβανομένης, ενδεικτικά, της ανακάλυψης βιοδεικτών ασθενειών, της μελέτης μεταβολικών οδών, της παρακολούθησης του συνόλου των περιβαλλοντικών εκθέσεων και της αναζήτησης βιοδραστικών χημικών που ρυθμίζουν ορισμένους φαινοτύπους ασθενειών, όπως διαβήτη, καρκίνο κ.λπ. (Beyer et al., 2018). Η υγρή

χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας είναι επί του παρόντος η ιδανικότερη πλατφόρμα για μη στοχευμένη μεταβολομική, λόγω υψηλής απόδοσης, ευαισθησίας και ειδικότητας.

Υπάρχουν τρεις τρόποι λήψης δεδομένων MS για την καταγραφή μεταβολικών σημάτων: πλήρης σάρωση, data-dependent acquisition (DDA) και data-independent acquisition (DIA). Η μη στοχευμένη μεταβολομική με βάση την υγρή χρωματογραφία πραγματοποιείται εκτελώντας πρώτα LC-full scan MS σε κάθε μεμονωμένο δείγμα για να ληφθεί ακριβής λόγος μάζας προς φορτίο (m/z) και σχετική αφθονία για όλα τα μεταβολικά χαρακτηριστικά. Στη συνέχεια, οι ληφθείσες μεταβολικές πληροφορίες επεξεργάζονται χρησιμοποιώντας ένα λογισμικό προεπεξεργασίας δεδομένων (π.χ. XCMS, MZmine). Στη συνέχεια πραγματοποιείται ανάλυση LC-MS² (ονομάζεται επίσης LC-MS/MS) για τη συλλογή φασμάτων των θραυσματοποιημένων μεταβολιτών, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η χημική τους ταυτότητα. Η μέθοδος αυτή είναι αποτελεσματική αλλά απαιτεί αρκετό χρόνο και μεγάλο όγκο δείγματος καθώς ο ποσοτικός προσδιορισμός και ο δομικός προσδιορισμός των μεταβολιτών γίνεται με ξεχωριστές αναλύσεις.

Αντιθέτως, στην περίπτωση του DDA το όργανο MS εκτελεί πλήρη σάρωση MS αμέσως ακολουθούμενη από ανάλυση MS² σε μια λίστα πρόδρομων ιόντων που επιλέγονται από το φάσμα πλήρους σάρωσης. Με αυτόν τον τρόπο λαμβάνονται δομικές και ποσοτικές πληροφορίες στην ίδια ανάλυση, επιτρέποντας ταυτόχρονη επεξεργασία δεδομένων και ταυτοποίηση μεταβολιτών, μειώνοντας σημαντικά το χρόνο της συνολικής ανάλυσης. Το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι το γεγονός ότι η επιλογή των πρόδρομων ιόντων που θα θραυσματοποιηθούν εξαρτάται από την έντασή τους, επομένως δε θα προκύψουν δομικές πληροφορίες για μεταβολίτες χαμηλής αφθονίας. Το κενό αυτό καλύπτει η μέθοδος DIA κατά την οποία όλα τα ιόντα θραυσματοποιούνται, επομένως προκύπτει δομική πληροφορία για όλους τους μεταβολίτες. Το μειονέκτημα όμως αυτής της μεθόδου είναι ότι προκύπτουν πολύπλοκα φάσματα MS² λόγω της μεγάλης πληροφορίας που εμπεριέχει και απαιτεί πιο "στοχευμένα" λογισμικά για την επεξεργασία τους. Στο συγκεκριμένο πείραμα επιλέχθηκε η μέθοδος DIA καθώς κρίθηκε σημαντικότερη η συλλογή όσο το δυνατόν περισσότερης πληροφορίας.

Η εξέλιξη της τεχνολογίας που χρησιμοποιείται στη μεταβολομική έχει ως αποτέλεσμα τη λήψη περισσότερων και πολυπλοκότερων δεδομένων. Τα αναλυτικά όργανα, παρέχουν ολιστική πληροφορία για τα συστατικά του δείγματος που μπορούν να ιοντιστούν και όχι για συγκρίσιμες λίστες μεταβολιτών, επομένως τα ακατέργαστα δεδομένα πρέπει να υποβληθούν σε επεξεργασία για τη δημιουργία ενός πρακτικού πίνακα δεδομένων ώστε να δώσουν όλες τις σημαντικές πληροφορίες που φέρουν. Η επεξεργασία αυτή στη μεταβολομική γίνεται με τη βοήθεια της χημειομετρίας, η οποία παρουσιάζει μια πλήρη θεωρία και μεθοδολογία για τη διαχείριση πολύπλοκων δεδομένων. Η χημειομετρία μπορεί να θεωρηθεί ως η εφαρμογή μαθηματικών και στατιστικών μεθόδων στη χημεία. Στο πλαίσιο της μεταβολικής που βασίζεται σε NMR ή MS, περιλαμβάνεται οποιοδήποτε μαθηματικό ή στατιστικό εργαλείο που χρησιμοποιείται για φασματική επεξεργασία, ευθυγράμμιση κορυφών, ανίχνευση κορυφών, ομαλοποίηση κ.λπ. (Robertson, 2005). Το βασικό βήμα της επεξεργασίας είναι η εξάλειψη της διακύμανσης στην ανάλυση δεδομένων για τη μείωση της πολυπλοκότητας και την ενίσχυση μεταβολικά σημαντικών σημάτων. Κατά συνέπεια, έχουν αναπτυχθεί διάφοροι αλγόριθμοι και έχουν εφαρμοστεί πολλαπλά προγράμματα ανοιχτού κώδικα για την επεξεργασία ακατέργαστων δεδομένων που προκύπτουν από φασματομέτρο μάζας (Yi et al., 2016).

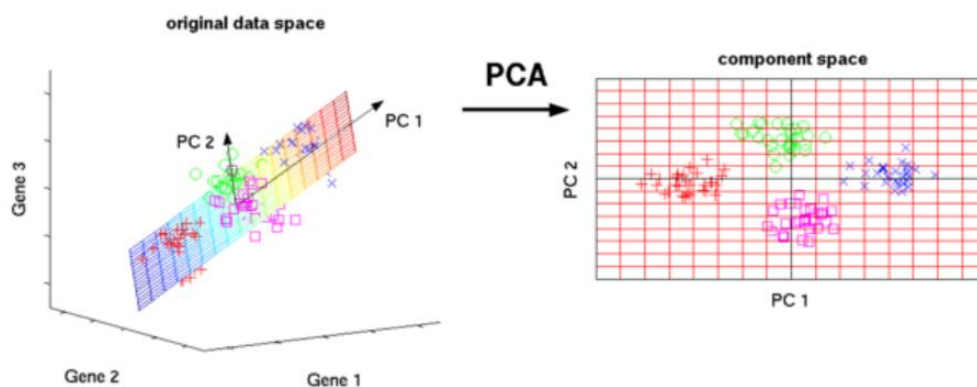
Ορισμένα από τα προγράμματα ανοιχτού κώδικα που χρησιμοποιούνται συχνά στη μεταβολομική που γίνεται με φασματομετρία μάζας είναι το XCMS, το MZmine και το OpenMS τα οποία αποτελούν αποτελεσματικές και πρακτικές λύσεις για τα φάσματα μάζας. Σε γενικές γραμμές, τα εργαλεία για την προ-επεξεργασία ακατέργαστων δεδομένων περιλαμβάνουν τέσσερις βασικές ενότητες, το φιλτράρισμα του θορύβου κι τη διόρθωση της γραμμής βάσης, την ανίχνευση των κορυφών και το διαχωρισμό τους, και τέλος το alignment και την κανονικοποίηση τους σε σχέση με το χρόνο ή την ένταση του σήματος. Για κάθε μία από αυτές τις διεργασίες είναι σημαντική η επιλογή των κατάλληλων παραμέτρων ώστε να προκύψει μία μεθοδολογία που θα παρέχει τις πιο σημαντικές πληροφορίες για το μεταβολικό προφίλ των δειγμάτων (Yi et al., 2016).

Στη μεταβολομική, όταν χρησιμοποιούνται τεχνικές πλήρους σάρωσης, ο αριθμός των σημάτων που ανιχνεύονται φτάνουν τις μερικές χιλιάδες, και ως εκ τούτου, είναι δύσκολο να απομονωθούν οι παράγοντες που επηρεάζουν περισσότερο την ταξινόμηση των δειγμάτων στις αντίστοιχες ομάδες, την ανάδειξη βιοδεικτών κλπ. . Για αυτό, εφαρμόζονται πολυπαραμετρικές τεχνικές που στοχεύουν στην ελαχιστοποίηση των μεταβλητών, αναδεικνύοντας εκείνες με την μεγαλύτερη

στατιστική σημασία και έχουν πιθανά έχουν καθοριστικότερο ρόλο (Roux et al., 2011). Με αυτόν τον τρόπο, δημιουργούνται απλούστερες σχέσεις, που βοηθούν στην ανάδειξη των σχέσεων μεταξύ των δεδομένων και διευκολύνουν την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

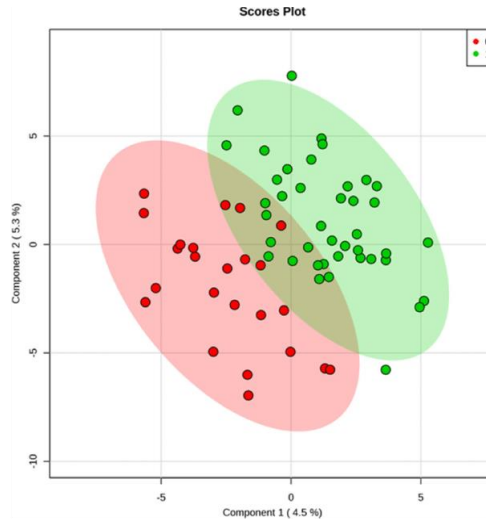
Η πιο απλή στατιστική δοκιμή που μπορεί να εφαρμοστεί για τη σύγκριση δειγμάτων είναι ο έλεγχος T ή αλλιώς student t-test δύο δειγμάτων. Πρόκειται για μια μονοπαραμετρική στατιστική ανάλυση, που στην περίπτωση της μεταβολομικής σημαίνει ότι εφαρμόζεται σε έναν μεταβολίτη τη φορά για να προσδιοριστεί εάν οι μέσες τιμές των δύο ομάδων είναι διαφορετικές. Η μηδενική υπόθεση για έναν μεταβολίτη είναι $H_0 : \text{ομάδα1} = \text{ομάδα2}$ και η εναλλακτική υπόθεση είναι $H_a : \text{ομάδα1} \neq \text{ομάδα2}$. Εάν η τιμή p για τη δοκιμή είναι μικρότερη από μια τιμή αποκοπής, συνήθως 0,05, η μηδενική υπόθεση απορρίπτεται. Εάν η τιμή p είναι μεγάλη, δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών για τις δύο ομάδες, υποδεικνύοντας ότι δεν πρόκειται για τον μεταβολίτη που μπορεί να διαχωρίσει τις ομάδες αυτές. Από την άλλη πλευρά, μια μικρή τιμή p δεν εγγυάται ότι ο μεταβολίτης έχει επαρκή ισχύ για να διαχωρίσει τις δύο ομάδες στην ταξινόμηση. Ως εκ τούτου, οι μεταβολίτες με μικρές τιμές p πρέπει να αξιολογηθούν περαιτέρω κατά την κατασκευή ενός μοντέλου ταξινόμησης.

Συνήθως το πρωταρχικό βήμα μετά το t-test είναι η εφαρμογή μίας μη επιβλεπόμενης μεθόδου, με επικρατέστερη την Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA), ώστε να μελετηθεί η υπάρξει «φυσικής τάσης ταξινόμησης» των δειγμάτων σε ομάδες. Η PCA είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος ανάλυσης πολυμεταβλητών δεδομένων που στοχεύει στη μείωση των αρχικών μεταβλητών, και την αντιπροσώπευσή τους από λιγότερες (κύριες) συνιστώσες. Αυτό επιτυγχάνεται με την προβολή δειγμάτων σε λιγότερες διαστάσεις, συνήθως σε δύο ή τρεις, επιτρέποντας την οπτικοποίηση της κατανομής των δειγμάτων. Στη μεταβολομική ανάλυση, η PCA είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την αρχική προσέγγιση και διερεύνηση των δεδομένων, προς ανίχνευση τάσεων σε αυτά, αλλά και για τον έλεγχο ύπαρξης έκτροπων τιμών (outliers) (Abdi et al., n.d.).



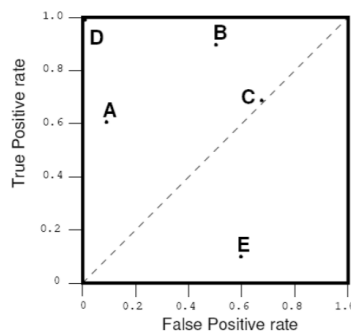
Εικόνα 6: Principal Component Analysis (Ανάλυση κατά κύριες συνιστώσες)

Συνέχεια της PCA είναι η ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares analysis, PLS) η οποία αποτελεί μία επιβλεπόμενη μέθοδο, δηλαδή λαμβάνει υπόψη την ομάδα που ανήκουν τα δείγματα κατά τη δημιουργία του μοντέλου. Στην PLS λαμβάνονται υπόψιν και τα δεδομένα X και Y ενώ στην PCA μόνο τα δεδομένα ενός άξονα. Επίσης, τα scores για τον κάθε άξονα δεν επιλέγονται με βάση την κατεύθυνση των περισσότερων δεδομένων αλλά επιλέγονται με σκοπό τη μεγιστοποίηση της συσχέτισης μεταξύ των scores τόσο για τις μεταβλητές X όσο και για τις Y. Πρόκειται, επίσης, για μέθοδο με την οποία επιτυγχάνεται μείωση των αρχικών μεταβλητών και αντιπροσώπευσή τους από λιγότερες (Worley et al., 2013). Ωστόσο οι νέες μεταβλητές που προκύπτουν, ονομάζονται και λανθάνουσες μεταβλητές και εξηγούν πλέον τη συνδιακύμανση του πίνακα των προβλεπόμενων μεταβλητών με τον πίνακα των μεταβλητών απόκρισης. Στην μεταβολομική, η ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων συνδυάζεται, αρκετά συχνά, με την διαχωριστική ανάλυση PLS-DA (Partial Least Squares-Discriminant Analysis). Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται τόσο για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων, βάσει της κλάσης στην οποία ανήκουν τα δείγματα, τόσο για την ανάδειξη μεταβολικών διαφορών, όσο και για πρόβλεψη (Ebbels & Cavill, 2009).



Εικόνα 7: Παράδειγμα απεικόνισης αποτελεσμάτων της PLS-DA (Partial Least Squares-Discriminant Analysis).

Μία άλλη χρήσιμη τεχνική για την οργάνωση, την επιλογή και απεικόνιση δεδομένων είναι οι καμπύλες ROC (receiver operating characteristic curve). Οι καμπύλες ROC, σε αντίθεση με την PCA, αποτελούν μονο-παραμετρική ανάλυση και είναι δισδιάστατα γραφήματα στα οποία το ποσοστό των αληθώς θετικών αποτελεσμάτων, TPR (True Positive Rate) σχεδιάζεται στον Y άξονα και το ποσοστό των ψευδών θετικών αποτελεσμάτων, FPR (False Positive Rate) στον X άξονα. Προκειμένου να συγκρίνουμε τα χαρακτηριστικά (features), περιορίζεται η ROC αναπαράσταση σε μία απλά βαθμιδωτή τιμή, η οποία αντιπροσωπεύει την αναμενόμενη αναπαράσταση. Μία συνηθισμένη μέθοδος είναι να υπολογίσουμε το εμβαδόν κάτω από τη ROC καμπύλη, το οποίο συντομογραφικά είναι γνωστό ως AUC και κυμαίνεται πάντα μεταξύ του 0 και του 1.0. Οι τιμές που έχουν AUC ίσο ή κοντά στο 1.0 έχουν την καλύτερη αναπαράσταση.



Εικόνα 8: Ένα βασικό ROC γράφημα με πέντε διακριτούς ταξινομητές.

Η κολιστίνη είναι ένα αντιβιοτικό που ενώ είχε καταργηθεί, έχει αρχίσει να επαναχρησιμοποιείται λόγω της εμφάνισης ανθεκτικών σε αντιβιοτικά βακτηρίων. Το μειονέκτημα αυτού του αντιβιοτικού είναι η τοξικότητα που εμφανίζει κυρίως στους νεφρούς και το νευρικό σύστημα, κατά τη χορήγηση του σε ασθενείς. Προκειμένου να εξασφαλιστεί η ασφαλέστερη αξιοποίηση του ως αντιβιοτικό παράγοντα, αλλά και να κατανοηθεί ο τρόπος που επιδρά στον οργανισμό, είναι σημαντική η διενέργεια μελετών τοξικότητας. Η παρούσα εργασία σχεδιάστηκε λαμβάνοντας υπόψη τον περιορισμό των βιβλιογραφικών αναφορών να εξηγήσουν τα αίτια πίσω από την εμφάνιση τοξικότητας κατά την χορήγηση της κολιστίνης και των δυνατοτήτων που παρέχει η μελέτη του μεταβολικού προφίλ στην κατανόηση εσωτερικών και εξωτερικών μεταβολών που επιδρούν στους οργανισμούς. Καθώς η επίδραση της κολιστίνης στο ήπαρ είναι αδιερεύνητη μέχρι στιγμής, η μεταβολομική μελέτη αξιοποιεί δείγματα ήπατος μυών με με πρώτο στόχο την μελέτη πιθανής τοξικής-επίδρασης της κολιστίνης στους μεταβολίτες του ήπατος, προσδιορίζοντας μεταβολίτες που έχουν ήδη συσχετιστεί βιβλιογραφικά με την ηπατική τοξικότητα. Επόμενος στόχος είναι ο και τον εντοπισμός νέων βιοδεικτών που «μαρτυρούν» συγκεκριμένα την τοξικότητας λόγω της χορήγησης κολιστίνης.

Κατά την ανάπτυξη και εφαρμογή της μεθοδολογίας, χρησιμοποιήθηκαν τρεις ομάδες μυών εκ των οποίων η κάθε ομάδα περιείχε δύο θηλυκούς και τρεις αρσενικούς μύες.

- Ομάδα A: 1 mg/kg κολιστίνη (ομάδα χαμηλής-μη τοξικής δόσης),
- ομάδα B: 1.5 mg/kg κολιστίνη (ομάδα υψηλής-τοξικής δόσης)
- ομάδα Ελέγχου: δε χορηγήθηκε κολιστίνη.

Συλλέχθηκαν 90 mg ήπατος και εκχυλίστηκαν με MeOH/H₂O. Ακολούθησε ανάλυση των μεταβολιτών με UPLC/Q-TOF-MS με θετικό και αρνητικό ιοντισμό ESI. Αναπτύχθηκε κατάλληλο πρωτόκολλο επεξεργασίας των πειραματικών αποτελεσμάτων (φασμάτων) που προέκυψαν, και πρωτόκολλο στατιστικής επεξεργασίας των χαρακτηριστικών (*mz_tr*) ώστε να διαπιστωθεί ποια από αυτά είναι στατιστικά σημαντικά για να αποτελέσουν πιθανούς βιοδείκτες τοξικότητας. Στα στατιστικά σημαντικά χαρακτηριστικά έγινε απόδοση του χημικού τύπου και της δομής σε συγκεκριμένους μεταβολίτες με τη χρήση γνωστών ηλεκτρονικών βιβλιοθηκών. Επίσης, εντοπίστηκαν τα μεταβολικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν αυτοί οι μεταβολίτες. Τέλος, ελέγχθηκε η αλληλεπίδραση του φύλου και της δόσης στον μεταβολισμό της κολιστίνης.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Ammonium Formate (Fischer Scientific)
- Ammonium Acetate (Fischer Scientific)
- Formic Acid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- MeOH, Chloroform (Fluka, Buchs, Switzerland)
- Distilled water

ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

- Dionex UltiMate 3000 RSLC (Thermo Fischer Scientific, Dreieich, Germany)
- Maxis Impact QTOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with an Electrospray Ionization
- NEYA 16R centrifugation apparatus (REMI, Mumbai, India) at 10000 rpm, 5 minutes, 4°C
- HyperVAC-LITE centrifugal vacuum concentration (Hanil Scientific Inc, Gimpo, Korea)
- tissue homogenizing CKMix lysing kit (Bertin Corp.) // homogenizer: CRYOLYS EVOLUTION tissue homogenizer (Bertin Instruments, France)
- Milli-Q purification apparatus (Millipore Direct-Q UV, Bedford, MA, USA)

ΛΟΓΙΣΜΙΚΑ

- Data Analysis 5.1 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany)
- SIMCA 14.1 (Umetrics, Upsala, Sweden)

- Mzmine 2.51 ()
- MetaboAnalyst 5.0 (University of Alberta)
- R 4.0.3
- ProteoWizard

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Κινητή φάση A (θετικού ιοντισμού): Διάλυμα 5mM Οξικού Αμμωνίου σε Νερό – Μεθανόλη (90-10) οξινισμένο με 0.01 % Μυρμηκικό οξύ

Κινητή φάση B (θετικού ιοντισμού): 5mM Οξικού Αμμωνίου σε Μεθανόλη οξινισμένο με 0.01 % Μυρμηκικό οξύ

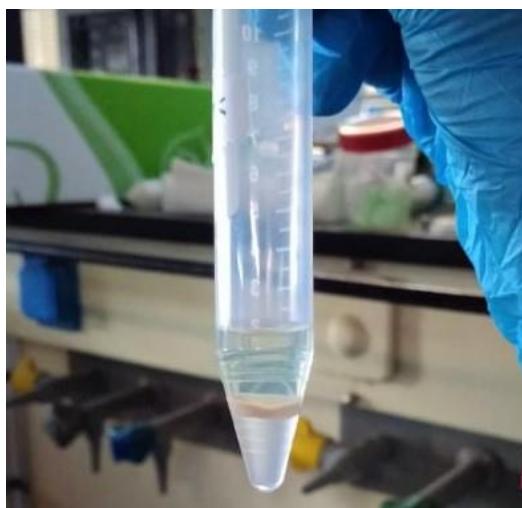
Κινητή φάση A (αρνητικού ιοντισμού): Διάλυμα 5mM Οξικού Αμμωνίου σε Νερό – Μεθανόλη (90-10)

Κινητή φάση B (αρνητικού ιοντισμού): Νερό – Μεθανόλη (90-10)

Διάλυμα Ανασύστασης: Νερό – Μεθανόλη (1-1)

ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Αρχικά ζυγίστηκαν 90 mg ιστού (ήπαρ) και ακολούθησε εκχύλιση σε δύο στάδια με συνολικά 1 ml διαλύτη MeOH/H₂O 50:50. Συγκεκριμένα, προστέθηκαν 900 μl του διαλύτη, έγινε ανάδευση με vortex και τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον ομογενοποιητή ιστών (tissue homogenizer) για 3 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά και συλλέχτηκε η υπερκείμενη φάση. Έπειτα, προστέθηκε ο υπόλοιπος διαλύτης και έγινε ξανά ομογενοποίηση, φυγοκέντρηση και συλλογή της υπερκείμενης φάσης. Για να απομακρυνθούν τα λιπίδια έγινε προσθήκη 0.5 ml διχλωρομεθανίου στο κάθε δείγμα προκειμένου να δημιουργηθούν δύο στοιβάδες, από τις οποίες συλλέχτηκε η ανώτερη στοιβάδα ενώ η κατώτερη λιπιδική στιβάδα αποθηκεύτηκε στους -80°C για μελλοντική μελέτη με οργανολογία NMR. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε εξάτμιση του διαλύτη με ροή αερίου N₂ σε θερμοκρασία 25°C και ανασύσταση των δειγμάτων με διαλύτη MeOH/H₂O 50:50.



Εικόνα 9 : δημιουργία 3 στιβάδων έπειτα από την προσθήκη διχλωρομεθανίου: Η κατώτερη στιβάδα είναι η λιπιδική στιβάδα του διχλωρομεθανίου, η μεσαία είναι καταβυθισμένες πρωτεΐνες και μεγάλου MW σωματίδια και η ανώτερη είναι η στιβάδα εκχύλισης των μεταβολιτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Χρωματογραφική Στήλη: Thermo Fischer Scientific , Acclaim RSL C18 column (2.1 x 100 mm, 2.2 μ m)

Θερμοκρασία Στήλης: 30 °C

Πρόγραμμα Βαθμιδωτή έκλυση:

0-1min: 1% B, 200 μ L/min

1-2min: 39% B 200 μ L/min

2-13min: 99.9% B 200 μ L/min

13-15min: 1% B 480 μ L/min

ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

End plate offset: 500V

Nebulizer (N2): 2bar

Drying gas (N2): 10 L min⁻¹

Drying temperature: 200°C

Collision energy (MS): 4V

Collision energy (bbCID): 24-36 V (ramp)

Capillary Voltage:

ESI(+): 2500 V

ESI(-): 3000 V

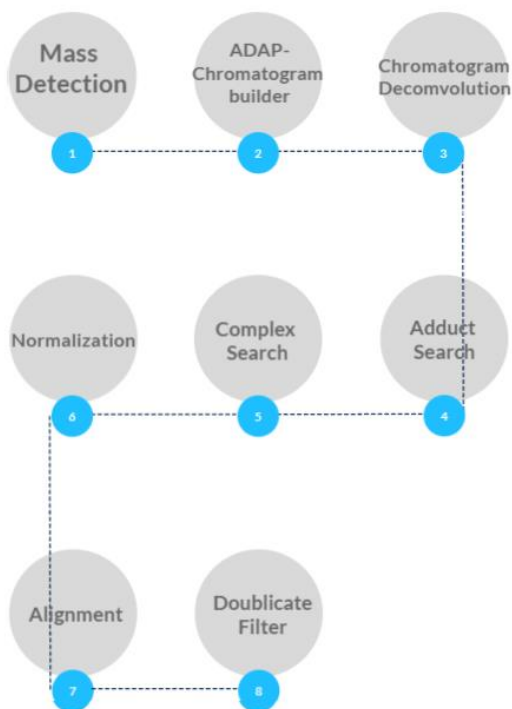
ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΟΡΥΦΩΝ

ΜΕΤΡΟΠΗ ΑΡΧΕΙΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Το λογισμικό που επιλέχτηκε για την επεξεργασία των φασμάτων είναι το MZmine, καθώς έναντι άλλων, δίνει στο χρήστη την δυνατότητα επιλογής παραμέτρων σε όλα τα στάδια και της διαδικασίες και επιπλέον έχει το προτέρημα της παρουσίασης της πιθανής απεικόνισης των αποτελεσμάτων (preview) πριν εφαρμοστεί μια παράμετρος, δίνοντας την δυνατότητα στο χρήστη να επιλέξει ευκολότερα τις βέλτιστες συνθήκες. Επίσης, ο χρήστης έχει την επιλογή να επιστρέψει σε προηγούμενα στάδια της επεξεργασίας και να εφαρμόσει νέες παραμέτρους ή νέους αλγορίθμους, καθώς δε χάνονται τα παλιά δεδομένα.

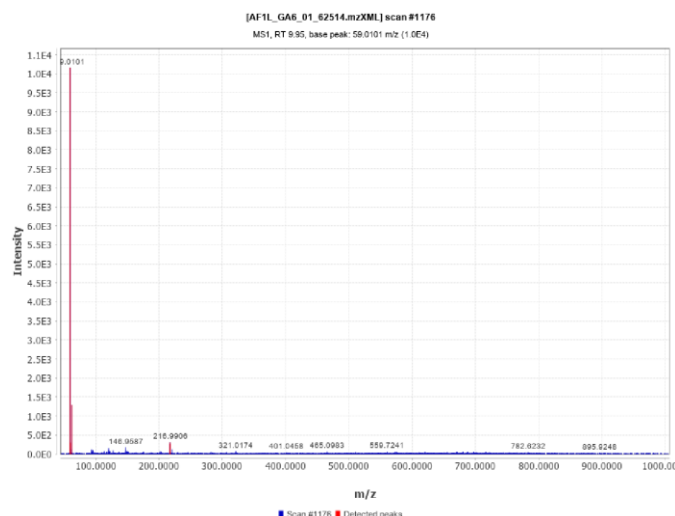
Η ανίχνευση και ο διαχωρισμός των κορυφών πραγματοποιείται σε τρία βασικά στάδια:

- επιλογή μαζών – απομάκρυνση φασμάτων θορύβου
- δημιουργία χρωματογραφημάτων
- διαχωρισμός χρωματογραφικών κορυφών βάση του χρόνου έκλουσης (tr)



Εικόνα 2: Διάγραμμα ροής επεξεργασίας χρωματογραφημάτων μάζας

Στην Εικόνα 6 αποτυπώνεται το διάγραμμα ροής εργασιών τις προεργασίας των φασματικών δεδομένων. Πιο αναλυτικά, αρχικά επιλέχθηκε η εντολή Mass Detection με την οποία δημιουργείται μια λίστα ιόντων μάζας για κάθε scan event. Σε αυτή τη φάση ορίζεται το ύψος της γραμμής θορύβου και αφαιρείται από τη λίστα μαζών. Χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος «centroid» καθώς όλα τα πρωτογενή φάσματα έχουν κεντροειδή μορφή.



Εικόνα 10: Preview του mass detection που δείχνει ποιές κορυφές θα παραμείνουν μετά τον ορισμό της γραμμής θορύβου.

Για την δημιουργία χρωματογραφημάτων που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένο m/z , επιλέχτηκε ο αλγόριθμος «ADAP Chromatogram builder». Σε αυτό το σημείο επιλέγεται ο ελάχιστος αριθμός σαρώσεων για την κάθε κορυφή (min group size in # of scans), το μέγιστο ύψος του θορύβου (group intensity threshold), το ελάχιστο ύψος μιας κορυφής (min highest intensity) και η αποδεκτή απόκλιση του λόγου m/z (m/z tolerance).

Στη συνέχεια επιλέχτηκε το Chromatogram Deconvolution προκειμένου να γίνει διαχωρισμός των χρωματογραφημάτων σε κορυφές με βάση το χρόνο, τα στοιχεία αυτά πλέον συγχωνεύουν την πληροφορία και για το m/z και για το t_r . Τα στοιχεία αυτά, στο ακόλουθο κείμενο θα τα αποκαλούμε «χαρακτηριστικά» ή «features». Ο αλγόριθμος που εφαρμόστηκε για τον διαχωρισμό είναι ο «Noise Amplitude», ο οποίος αποτελεί μια από τις πιο αξιόπιστες επιλογές και βοηθάει στις περιπτώσεις όπου ο θόρυβος δεν έχει ένα σταθερό εύρος αλλά μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Στις παραμέτρους επιλέγεται το ελάχιστο αποδεκτό ύψος των κορυφών (min peak height), η αποδεκτή χρονική διάρκεια των κορυφών σε λεπτά της ώρας (peak duration range) και το εύρος της έντασης του σήματος στην περιοχή του θορύβου (amplitude of noise).

Αφού έχει γίνει ο διαχωρισμός των features ακολουθεί ο προσδιορισμός των παραγώγων ενώσεων (adducts) με τα οποία μπορεί να έχει φορτιστεί ο κάθε αναλύτης. Αυτό γίνεται με το Adduct Search, όπου η διαφορά μάζας μεταξύ του αρχικού αναλύτη και του φορτισμένου ιόντος πρέπει να είναι ίση με τη μάζα των adducts που έχει επιλεγεί. Συγκεκριμένα, για τα φάσματα με θετικό ιοντισμό επιλέχθηκαν τα παρακάτω adducts:

- $[M+Na-H]$ με 21.9825 m/z
- $[M+K-H]$ με 37.9559 m/z
- $[M+NH_3]$ με 17.0265 m/z
- $[M+MeOH]$ με 33.0330 m/z
- $[M+HCOOH]$ με 46.0049 m/z

Αντίστοιχα για τα φάσματα με αρνητικό ιοντισμό επιλέχθηκαν τα adducts:

- $[M-H]$ με -1.0073 m/z
- $[M+Na-H]$ με 20.9747 m/z
- $[M-H_2O-H]$ με -19.0184 m/z
- $[M+K-H]$ με -36.9486 m/z

Για την επισήμανση των κορυφών που αντιστοιχούν σε ισότοπα επιλέχθηκε το Isotopic peaks grouper και αφού εντοπιστούν αφαιρούνται αυτόματα από την peak list. Επιλέγεται η αποδεκτή απόκλιση του λόγου m/z (m/z tolerance) και τα όρια της διαφοράς του χρόνου έκλουσης (retention time tolerance), καθώς και το μέγιστο φορτίο που μπορεί να έχει ο αναλύτης, το οποίο για να βρεθεί θα πρέπει να ανατρέξουμε στο φασματογράφημα και να αποφασίσουμε από τις αναλογίες των κορυφών τι φόρτιση έχουμε.

Στη συνέχεια, επιλέχθηκε το Complex search ώστε να προσδιοριστούν τα σύμπλοκα ιόντων, δηλαδή τα ζεύγη ιόντων που εμφανίζονται μαζί στον ίδιο χρόνο έκλουσης, και σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα ιόντων που περιέχουν μικρότερα ιόντα ως συστατικά. Τα σύμπλοκα προσδιορίζονται με δύο τρόπους:

- 1) ο χρόνος συγκράτησης των συστατικών ιόντων και του σύνθετου ιόντος πρέπει να είναι ο ίδιος
- 2) το άθροισμα των μαζών των συστατικών ιόντων πρέπει να είναι ίσο με τη μάζα του συμπλόκου, εκτός από τη μεταβολή μάζας που προκαλείται από τον ιονισμό.

Τα παράγωγα ιόντα, τα ισότοπα καθώς και τα σύμπλοκα ιόντα αφαιρέθηκαν από την τελική λίστα features καθώς αποτελούν επαναλαμβανόμενη εμφάνιση του ίδιου αναλύτη και θα λειτουργούσαν αποπροσανατολιστικά στην περεταίρω στατιστική επεξεργασία. Στόχος είναι η λίστα των features να περιέχει μόνο ιόντα της μορφής M+H. Οι παραπάνω πληροφορίες παρόλα αυτά είναι χρήσιμες στο τελευταίο βήμα της ταυτοποίησης.

Έπειτα, έγινε κανονικοποίηση (normalization) του χρόνου έκλουσης των κοινών κορυφών μεταξύ των δειγμάτων. Αυτό πραγματοποιήθηκε με την επιλογή «καλώς συμπεριφερόμενων κορυφών» (well behaved peaks), οι οποίες είναι επαναλήψιμες ως προς το χρόνο έκλουσης, την ακρίβεια μάζας και βρίσκονται σε μεγάλη αφθονία. Οι κορυφές αυτές λειτούργησαν σαν «άγκυρες» για την μείωση της ως-προς-το-χρόνο ολίσθησης των άλλων κορυφών.

Για να δημιουργηθεί μία ενιαία λίστα η οποία θα εμπεριέχει όλα τα «χαρακτηριστικά» και το περιεχόμενο τους σε όλα τα δείγματα, έγινε Alignment. Αρχικά επιλέχτηκε η κύρια λίστα κορυφών (L) με την οποία θα ταιριάζει κάθε νέο δείγμα. Για κάθε σειρά i στο L εφαρμόζεται ένα δισδιάστατο παράθυρο (του οποίου το μέγεθος επιλέγεται από τον χρήστη), που ονομάζεται alignment window (AW) και ορίζει τις περιοχές των m/z και RT όλων των επιμέρους κορυφών στη σειρά. Στο παράθυρο αυτό εφαρμόζεται μια συνάρτηση προκειμένου να αποδοθούν τα scores των μεταβολιτών στο κάθε δείγμα. Η συνάρτηση αυτή ορίζεται ως:

$$\text{score} = ((1 - \text{MZdifference} / \text{MZtolerance}) \times \text{MZweight}) + ((1 - \text{RTdifference} / \text{RTtolerance}) \times \text{RTweight})$$

Με αυτόν τον τρόπο δημιουργήθηκε μια alignment list όπου φαίνεται η αφθονία ενός αναλύτη σε κάθε δείγμα.

Average		Identity 	Comment	Peak shape	AM1L_GA3_01_62511.mzXML			AF2L_GB4_01_62521.n	
m/z	RT				Status	Height	Area	Status	Height
601.0972	0.81	Complex of 96.9618 ...				6.8E2	3.1E3		1.0E3
611.1390	0.70	Complex of 145.0506...							
439.0561	0.85	Complex of 133.0047...				6.4E2	1.6E3		
423.0829	0.77	Complex of 118.0429...							6.4E2
243.0584	0.90	Complex of 116.0640...							
227.0850	0.88	Complex of 116.0640...							
503.1538	0.80	Complex of 102.0475...				1.2E3	2.4E3		
214.0335	0.89	Complex of 101.0165...				7.2E2	4.2E3		7.2E2
112.9778	0.10					5.4E5	1.8E6		5.5E5
89.0169	0.76					2.4E5	1.0E6		2.4E5
89.3087	0.76					8.8E4	2.8E5		8.4E4
123.9982	0.73					8.4E4	3.2E5		7.3E4

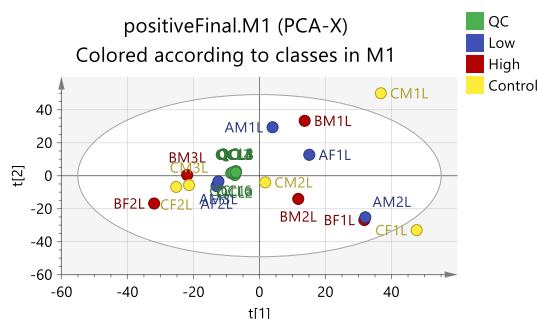
Εικόνα 11: Μέρος την peak list που προέκυψε μετά το alignment για τον θετικό ιοντισμό. Με πράσινο φαίνονται οι αναλύτες που υπάρχουν στο συγκεκριμένο δείγμα και με κόκκινο οι αναλύτες που δεν εντοπίζονται στο δείγμα.

Μετά το alignment, η λίστα κορυφών (peak list) που προκύπτει μπορεί να περιέχει κορυφές που λείπουν λόγω αδυναμίας εντοπισμού κορυφών ή λάθους κατά τη διαδικασία του alignment. Για το λόγο αυτό επιλέγεται ένας αλγόριθμος που γεμίζει τα κενά στην peak list όταν είναι δυνατό σύμφωνα με τις παραμέτρους που ορίζει ο χρήστης. Οι πιο κρίσιμες παράμετροι είναι το "m/z tolerance" και το "RT tolerance" που καθορίζουν το παράθυρο όπου ο αλγόριθμος πρέπει να βρει τη νέα κορυφή. Τέλος αφαιρούνται οι διπλές κορυφές με το Duplicate filter και γίνεται εξαγωγή της τελικής μορφής της peak list.

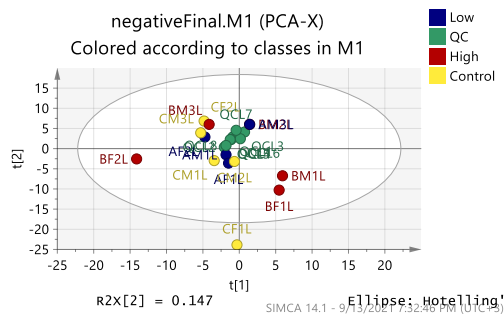
Πριν ξεκινήσει η στατιστική ανάλυση των δεδομένων, είναι απαραίτητο να γίνει διόρθωση της έντασης του σήματος με βάση τα δείγματα QC. Η επαναλαμβανόμενη ανάλυση δειγμάτων QC ενδιάμεσα από τα δείγματα εφαρμόζεται όλο και περισσότερο στην αξιολόγηση της ολίσθησης του αναλυτικού σήματος, όσο και για τη χημειομετρική διόρθωση της. Το εργαλείο που χρησιμοποιήθηκε είναι το statTarget, που χρησιμοποιεί περιβάλλον R, και το οποίο παρέχει ολοκληρωμένες υπολογιστικές και στατιστικές μεθόδους που εφαρμόζονται συνήθως για την ανάλυση δεδομένων -. Επομένως, έγινε διόρθωση του σήματος των δειγμάτων σύμφωνα με τη σειρά που αναλύθηκαν, αξιοποιώντας το σήμα των QC. Ο αλγόριθμος που χρησιμοποιήθηκε είναι ο QCRLSC, ο οποίος βασίζεται στην μέθοδο LOWESS. Τα δεδομένα που προέκυψαν μετά τη διόρθωση του σήματος χρησιμοποιήθηκαν για στατιστική ανάλυση.

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SIMCA® και το online λογισμικό MetaboAnalyst.

Αρχικά, έγινε διόρθωση του σήματος με τη χρήση του αλγορίθμου QCRLSC και εφαρμόστηκε μοντέλο PCA. Όπως φαίνεται στις εικόνες 12 και 13, τα δείγματα QC, τα οποία προέρχονται από ανάλυση του ίδιου δείγματος σε διαφορετικούς χρόνους, είναι συγκεντρωμένα με μικρή εσωτερική διακύμανση της ομάδας και υπάρχει επαναληψιμότητα, ιδιαίτερα στην περίπτωση του θετικού ιοντισμού. Επομένως, η διόρθωση του σήματος ήταν επιτυχής.



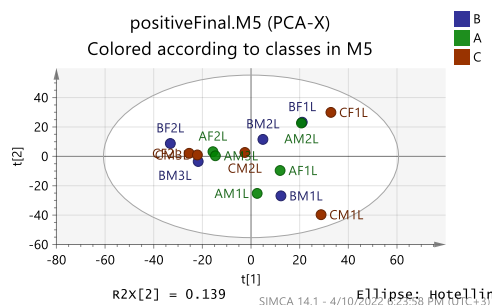
Εικόνα 12 : μοντέλο PCA για τα αποτελέσματα του θετικού ιοντισμού.



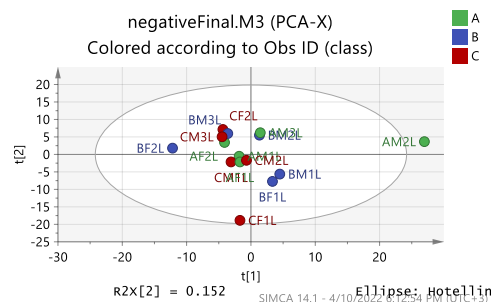
Εικόνα 13 : μοντέλο PCA για τα αποτελέσματα του αρνητικού ιοντισμού.

Για τη εξαγωγή των αποτελεσμάτων επιλέχθηκαν οι ομάδες στις οποίες χορηγήθηκε κολιστίνη, δηλαδή η high και η low, καθώς είναι μεγαλύτερης σημασίας ο έλεγχος της διαφοροποίησης του μεταβολώματος ανάμεσα στους οργανισμούς που λαμβάνουν μη τοξική δόση και σε αυτούς που λαμβάνουν τοξική δόση, ώστε να ερευνηθεί η εξάρτηση της τοξικότητας με τη δόση. Συγκεκριμένα, στους μεταβολίτες της ομάδας χαμηλής δόσης και της ομάδας ελέγχου δεν θα πρέπει να

εμφανίζονται μεταβολίτες, ενδεικτικοί για την τοξικότητα, οι μεταβολίτες της ομάδας υψηλής δόσης αναμένεται να έχουν μεγαλύτερη διαφορά, εφόσον η κολιστίνη είναι τοξική σε μεγάλες δόσης. Από το μοντέλο PCA για τον αρνητικό και το θετικό ιοντισμό δεν παρατηρείται εμφανής διαχωρισμός των τριών ομάδων, γεγονός που προκύπτει από το αποτέλεσμα της PCA, όπως φαίνεται στις εικόνες 14 και 15. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο μικρό στατιστικό δείγμα του πειράματος, αλλά και στην πιθανότητα η κολιστίνη να μην έχει τόσο έντονη επίδραση στους μεταβολίτες του ήπατος καθώς η κολιστίνη δεν έχει συσχετιστεί μέχρι στιγμής με ήπατο-τοξικότητα.. Υπενθυμίζεται πως η υψηλή δόση κολιστίνης αντιστοιχεί σε 50% περισσότερη ποσότητα χορηγούμενης κολιστίνης, συγκριτικά της χαμηλής δόσης. Η δόση αυτή είναι ικανή για την οριακή εμφάνιση συμπτωμάτων τοξικότητας στον άνθρωπο. Η συνήθης τοξική δόση σε μελέτες τοξικότητας σε πειραματόζωα είναι 5 φορές μεγαλύτερη από την κανονική. Ο σκοπός του πειράματος ήταν να προσομοιωθεί η τοξικότητα της κολιστίνης στους ανθρώπους, για αυτό το λόγο δεν αναμένουμε πολύ εξεσημασμένες διαφορές στο μεταβόλωμα, αλλά πιθανοί βιο-δείκτες που θα προκύψουν μέσω αυτής της μελέτης, μπορούν να αξιοποιηθούν για την έγκαιρη διάγνωση της τοξικότητας στους ανθρώπους. Για το λόγο αυτό η μεταβολομικές διαφορές μεταξύ των ομάδων δεν αναμένεται να είναι τόσο έντονες.



Εικόνα 14 : μοντέλο PCA για τις ομάδες A, B και C του θετικού ιοντισμού.



Εικόνα 15 : μοντέλο PCA για τις ομάδες A, B και C του αρνητικού ιοντισμού.

Στη συνέχεια εφαρμόστηκε επιβλεπόμενο μοντέλο PLS-DA για τις ομάδες υψηλής και χαμηλής δόσης για να βρεθούν οι μεταβλητές που διαφοροποιούνται στατιστικά λόγω της διαφορετικής δόσης κολιστίνης. Σε αυτού του είδους τα μοντέλα υπάρχει ο κίνδυνος της υπερπροσαρμογής, δηλαδή το μοντέλο PLS-DA προκειμένου να μπορεί να προσαρμόζεται καλά στο σετ εκπαίδευσης, να χρησιμοποιεί μεταβλητές χαμηλού πληροφοριακού περιεχομένου όπως τα τυχαία σήματα, ως στατιστικά σημαντικές, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η προβλεπτική του ικανότητα.

Οι μέθοδοι κλιμάκωσης που δοκιμάστηκαν ήταν η μέθοδος UV (Unit Variance) και η μέθοδος Pareto. Στη μέθοδο UV κάθε μεταβλητή πολλαπλασιάζεται με τον λόγο $1/SD$ όπου SD η τυπική απόκλιση της, επομένως οι μεταβλητές αποκτούν συγκρίσιμο στατιστικό βάρος και κάθε μεταβλητή έχει την ανάλογη επίδραση στη δημιουργία του μοντέλου. Παρομοίως, στη μέθοδο Pareto κάθε μεταβλητή πολλαπλασιάζεται με το $1/\sqrt{SD}$, με αποτέλεσμα να διατηρείται με μεγαλύτερη πιστότητα η αναλογία των σημάτων της χρωματογραφικής ανάλυσης. Στο UV ο θόρυβος γίνεται εξίσου σημαντικός με το σήμα, ενώ στο Pareto όχι.

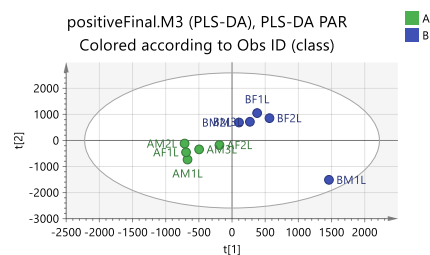
Για την αξιολόγηση των μοντέλων λήφθηκε υπόψιν η προσαρμοστικότητα του (R^2) και η προβλεπτική του ικανότητα (Q^2). Πραγματοποιήθηκαν στατιστικοί έλεγχοι των μοντέλων, όπως η Δοκιμασία Αντιμεταθέσεων (Permutation test), που μπορεί να εκτιμηθεί το κατά πόσο τα μοντέλα είναι τυχαία. Το permutation test έχει σχεδιαστεί για να προσδιορίσει εάν η διαφορά των μέσων είναι αρκετά μεγάλη ώστε να απορριφθεί η μηδενική υπόθεση ότι όλα τα δεδομένα προέρχονται από την ίδια κατανομή. Αυτό επιτυγχάνεται με την αμοιβαία ανταλλαγή των παρατηρήσεων μεταξύ των δύο ομάδων.

Στην περίπτωση του συγκεκριμένου πειράματος, το permutation test επιλέχθηκε λόγω της αποτελεσματικότητας του ακόμη και σε μικρό αριθμό δειγμάτων. Για το θετικό ιοντισμό επιλέχθηκε να γίνουν 50 ανταλλαγές ενώ στον αρνητικό ιοντισμό 20, λόγω του μικρότερου αριθμού χαρακτηριστικών.

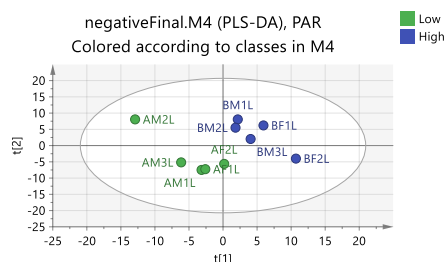
Πίνακας 3: τιμές προσαρμοστικότητας (R2) και προβλεψιμότητας (Q2) για τα μοντέλα UV και Pareto στον αρνητικό και τον θετικό ιοντισμό.

	UV				PARETTO			
	R2 θεωρητικ ό	Q2 θεωρητικ ό	R2 μοντέλο υ	Q2 μοντέλο υ	R2 θεωρητικ ό	Q2 θεωρητικ ό	R2 μοντέλο υ	Q2 μοντέλο υ
POSITIVE IONISATION	0.99	0.54	1	0.31	1	0.88	1	0.88
NEGATIVE IONISATION	1	0.86	1	0.95	1	0.96	1	0.97

Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα (προσαρμοστικότητα, προβλεψιμότητα) των δύο ιοντισμών με τη χρήση των διαφορετικών μεθόδων κλιμάκωσης και τα αποτελέσματα της δοκιμασίας αντιμεταθέσεων. Όπως φαίνεται από το πίνακα, η κλιμάκωση pareto δίνει πιο αποτελεσματικά μοντέλα. Επίσης φαίνεται πως ο αρνητικός ιοντισμός δίνει μοντέλο με μεγαλύτερη ανθεκτικότητα και καλύτερες επιδόσεις στο permutation test. Παρόλα αυτά, ο θετικός ιοντισμός οδηγεί σε ομάδες με μικρότερη εσωτερική διακύμανση



Εικόνα 16: μοντέλο PLS-DA για τον θετικό ιοντισμό και τις ομάδες A και B.

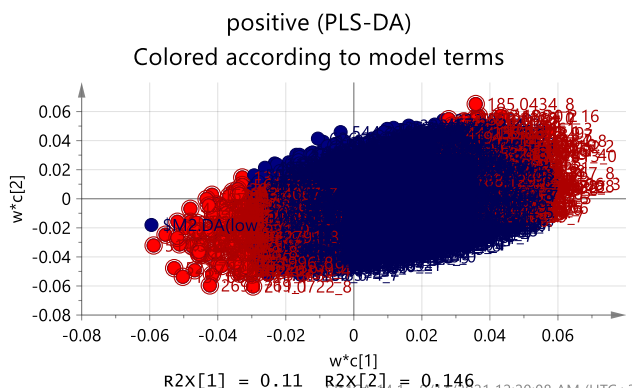


Εικόνα 17: μοντέλο PLS-DA για τον αρνητικό ιοντισμό και τις ομάδες A και B.

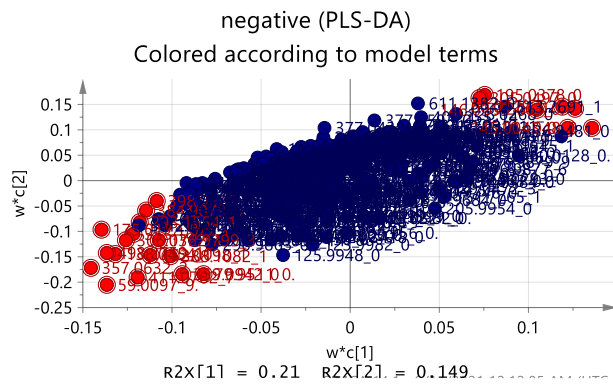
Όπως διαπιστώνεται και στην εικόνα 16 και στην εικόνα 17, τα μοντέλα PLS-DA που αναπτύχθηκαν και για τους δύο τρόπους ιοντισμού, εξασφαλίζουν καλό διαχωρισμό ανάμεσα στις δύο ομάδες. Στην περίπτωση του θετικού ιοντισμού μπορούμε να διαπιστώσουμε ότι η διασπορά των δειγμάτων της ίδιας ομάδας είναι σημαντικά μικρότερη, συγκριτικά με αυτή του αρνητικού ιοντισμού. Αυτό αποτελεί πρώτη ένδειξη πως ο θετικός ιοντισμός παρέχει μεταβλητές (mz_tr) που αποδίδουν καλύτερα την επίδραση της τοξικής δόσης.

ΕΥΡΕΣΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΗΤΩΝ (ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ)

Τα κριτήρια για την επιλογή των σημαντικών χαρακτηριστικών που αντιστοιχούν σε πιθανούς σημαντικούς μεταβολίτες είναι στατιστικά, κατά την διαδικασία ταυτοποίησης απαιτείται η διερεύνηση της βιολογικής τους υπόστασης. Από τα αποτελέσματα της PLS-DA, χρησιμοποιήθηκαν οι ακραίες τιμές στο διάγραμμα φορτίων (loadings plot). Αυτά τα features έχουν και τις πιο υψηλές τιμές (Variable Importance in Projection) VIP, που είναι χαρακτηριστικές τιμές που έχουν ισχυρή επίδραση στο μοντέλο. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση του θετικού ιοντισμού, βρέθηκαν συνολικά 2.674 χαρακτηριστικά εκ των οποίων τα 302 είχαν τιμή VIP μεγαλύτερη του 1.5 (Κανόνας Kaiser). Αντίστοιχα, στον αρνητικό ιοντισμό βρέθηκαν 317 χαρακτηριστικά εκ των οποίων τα 25 είχαν VIP score μεγαλύτερο του 1.5. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως στον αρνητικό ιοντισμό, είναι περιορισμένη η ανίχνευση ενώσεων, το οποίο είναι αναμενόμενο, καθώς έχει παρατηρηθεί εμπειρικά πως η πλειοψηφία των μεταβολιτών ιοντίζεται θετικά.



Διάγραμμα 1 : μέθοδος μερικών ελάχιστων τετραγώνων - διακριτής ανάλυσης (PLS-DA) για τα χαρακτηριστικά του θετικού ιοντισμού.



Διάγραμμα 2 : μέθοδος μερικών ελάχιστων τετραγώνων - διακριτής ανάλυσης (PLS-DA) για τα χαρακτηριστικά του αρνητικού ιοντισμού.

Στην συνέχεια, κατασκευάστηκαν μονοπαραμετρικές καμπύλες χαρακτηριστικού δέκτη – (ROC) και επιλέχτηκαν τα χαρακτηριστικά που έχουν AUC (Εμβαδόν Υπό της Καμπύλης) μεγαλύτερο από 0,9. Η ROC ανάλυση μας δείχνει ποιοι από τους μεταβολίτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες καθώς «εξετάζει» αν μπορεί ένας συγκεκριμένος μεταβολίτης να διαχωρίσει τις δύο ομάδες, και ποια είναι η αξιοπιστία του διαχωρισμού. Επίσης, πραγματοποιήθηκε μονοπαραμετρική ανάλυση με τη χρήση του t-test για τον κάθε μεταβολίτη, που αναμένεται για τους διαφοροποιημένους μεταβολίτες να έχει τιμή πιθανότητας μικρότερη του 0,05.. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν συγκρίθηκαν μεταξύ τους και επιλέχθηκαν όσα χαρακτηριστικά είναι κοινά και στις δύο μεθοδολογίες, καθώς θεωρήθηκε η μία μέθοδος ως διαδικασία επαλήθευσης της άλλης. Τέλος, ελέγχθηκε αν τα χαρακτηριστικά αυτά αντιστοιχούν σε πραγματικές κορυφές στα χρωματογραφήματα ή πρόκειται για θόρυβο. Με βάση τα παραπάνω, καταλήξαμε σε 11 χαρακτηριστικά, τα οποία είναι βιοδείκτες της τοξικότητας και άμεσα συσχετισμένα με την αυξημένη δόσης της κολιστίνης, σε σχέση με το φυσιολογικό.

Τα χαρακτηριστικά (mz_rt) που πληρούσαν τις προδιαγραφές που προαναφέρθηκαν είναι συνολικά 11 (πίνακας 4). Το M11 δεν έχει υψηλό AUC , αλλά συμπεριλήφθηκε στη λίστα των μεταβολιτών, αφενός γιατί έχει πολύ καλό VIP score, και μπορεί να είναι ενδεικτικός του μηχανισμού της τοξικότητας, ακόμα κι αν δεν αποτελεί κατάλληλο βιοδείκτη.

Πίνακας 4: τα χαρακτηριστικά που είναι στατιστικά σημαντικά και τα αντίστοιχα scores τους απο την ανάλυση PLS-DA και τις ROC-curves.

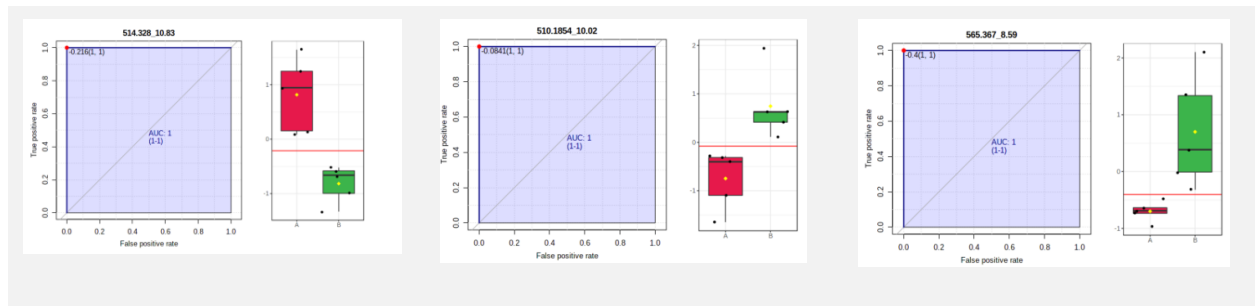
				PLS-DA	ROC curve (metaboanalyst)	
	Ρύθμιση (regulation)	m/z	Retention Time (min)	VIP score	AUC	p-value of t- test
M1	↓	514.3260	10.8	2.8	1.00	0.0014
M2	↑	510.1854	10.0	2.6	1.00	0.0069
M3	↑	565.3670	8.6	2.4	1.00	0.015
M4	↑	264.0596	3.2	2.4	0.92	0.017
M5	↑	206.1405	10.5	2.5	0.96	0.028
M6	↓	605.3150	7.2	2.5	0.96	0.86
M7	↓	189.1247	2.3	1.7	1.00	0.12
M8	↓	357.0632	2.4	2.2	1.00	0.012
M9	↓	411.0782	7.3	2.0	1.00	0.057
M10	↓	175.0122	0.7	2.0	0.96	0.018
M11	↓	154.0705	1.8	5.7	0.53	0.370

Πίνακας 5 : τα αποτελέσματα των roc curves για τους σημαντικότερους στατιστικά μεταβολήτες.

M1: m/z: 514.326 RT: 10.83

M2: m/z: 510.1854 RT: 10.02

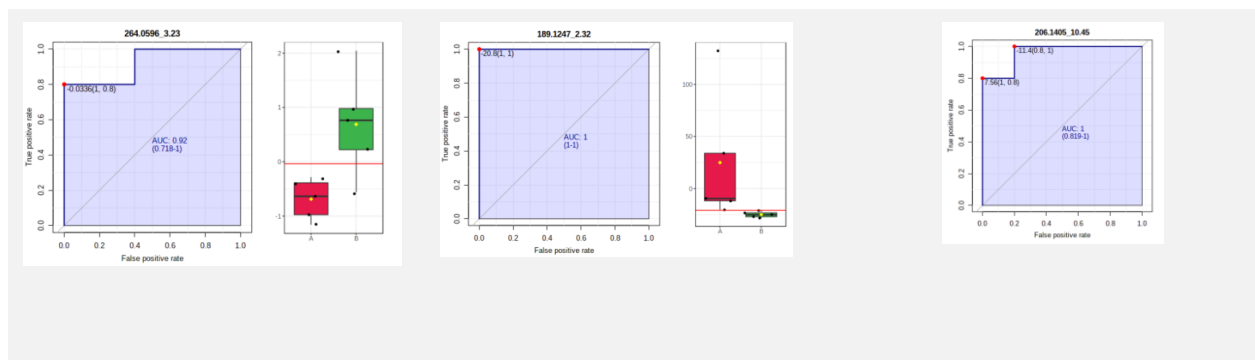
M3: m/z: 565.3670 RT: 8.59



M4: m/z: 264.0596 RT: 3.23

M5: m/z: 206.1405 RT: 10.45

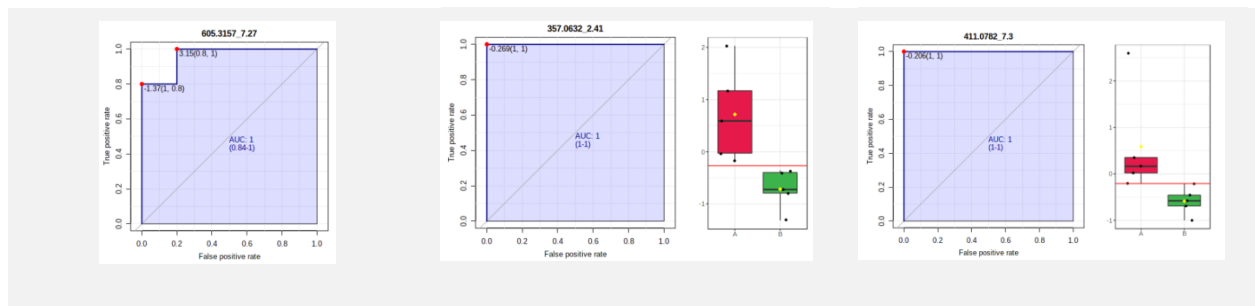
M6: m/z: 605.3150 RT: 7.24



M7: m/z: 189.1247 RT: 2.32

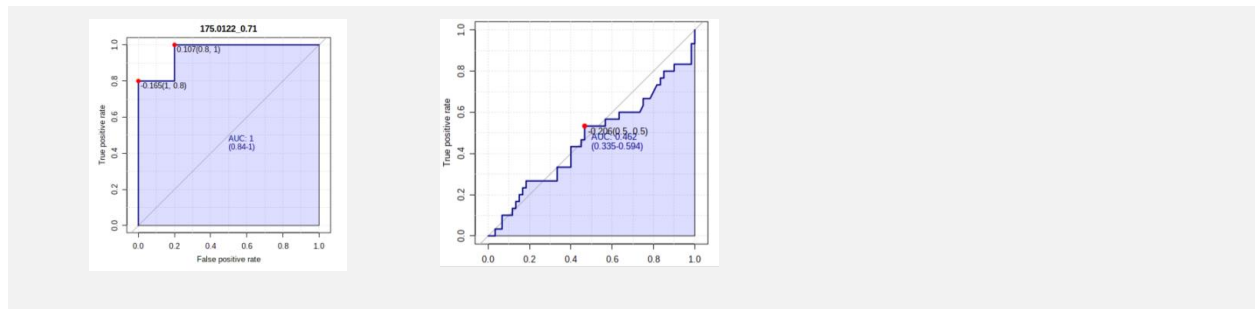
M8: m/z: 357.0632 RT: 2.41

M9: m/z: 357.0632 RT: 7.30



M10: m/z: 175.0122 RT: 0.71

M11: m/z: 154.0705 RT: 1.77



Από τα χαρακτηριστικά που επιλέχθηκαν φαίνεται πως μερικά μειώνονται όσο αυξάνεται η δόση της κολίστινης και άλλα αυξάνονται. Συγκεκριμένα, τα M2,M6,M7,M8,M9,M10 και M11

μειώνονται στα δείγματα με την υψηλή δόση (ομάδα Β) ενώ τα M2,M3,M4 και M5 αυξάνονται (πίνακας 6).

Πίνακας 6 : ποιοτική αποικόνιση της ποσότητας του κάθε μεταβολίτη για τις ομάδες χαμηλής (Α) και υψηλής (Β) δόσης όπως προέκυψε απο το λογισμικό SIMCA.

M1	Μειώνεται με την αύξηση της δόσης	M7 Μειώνεται με την αύξηση της δόσης
M2	Αυξάνεται με την αύξηση της δόσης	M8 Μειώνεται με την αύξηση της δόσης
M3	Αυξάνεται με την αύξηση της δόσης	M9 Μειώνεται με την αύξηση της δόσης
M4	Αυξάνεται με την αύξηση της δόσης	M10 Μειώνεται με την αύξηση της δόσης
M5	Αυξάνεται με την αύξηση της δόσης	M11 Μειώνεται με την αύξηση της δόσης
M6	Μειώνεται με την αύξηση της δόσης	

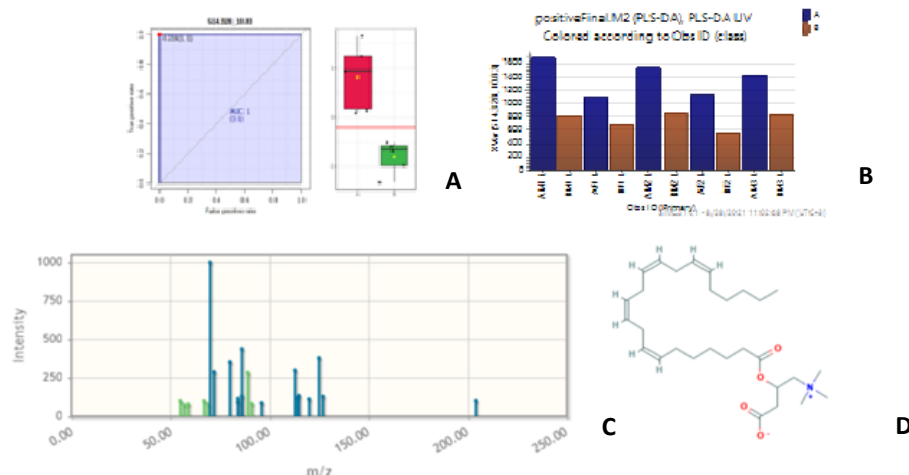
Για την απόδοση των σημαντικών χαρακτηριστικών σε μεταβολίτες χρησιμοποιήθηκαν τα online λογισμικά metFrag και MyCompoundID. Και τα δύο πραγματοποιούν σύγκριση του πειραματικού MSMS με in silico fragmentation, δηλαδή βρίσκουν για την κάθε χημική ένωση τα πιθανά θραύσματα που μπορεί να προκύψουν από αυτή και τα συγκρίνουν με τα πειραματικά του φάσματος MS/MS. Στην παρούσα εργασία, επειδή δεν έχουμε MS/MS πληροφορία, αλλά full-scan MS σε υψηλή και χαμηλή ενέργεια θραυσματοποίησης, χρησιμοποιήσαμε τα φάσματα υψηλής ενέργειας θραυσματοποίησης, καθώς είναι ταυτόσημα της MSMS πληροφορίας. Τα software υπολογίζουν το fit score που αντιστοιχεί στην ομοιότητα που παρουσιάζουν τα πειραματικά φάσματα, με τα φάσματα αναφοράς, σχετικά με την απόκλιση στην μάζα και την αυθονία των ιόντων. Συγκεκριμένα, το metFrag αντλεί πληροφορίες από πολλές βιβλιοθήκες, από τις οποίες επιλέχτηκαν οι HMDB, CHEBI, KEGG και MetaCyc ενώ το MyCompoundID χρησιμοποιεί μόνο την HMDB. Από τους 11 πιθανούς μεταβολίτες μόνο στους 5 έγινε ικανοποιητική ταυτοποίηση, καθώς στους υπόλοιπους είτε δεν πρόκυπτε αντιστοίχιση πιθανής ουσίας στο πειραματικό m/z, είτε το fit score δεν ήταν ικανοποιητικό (<0.7), είτε η ουσία που προέκυψε δε αντιστοιχούσε σε μεταβολίτη με βιολογική σημασία, πχ ήταν μεταβολίτης φυτού ή φαρμάκου. Παρόλα αυτά, και οι μη ταυτοποιημένες μεταβλητές είναι εξίσου χρήσιμες, και χρειάζεται να διερευνηθούν περεταίρω, καθώς υπάρχουν, είναι στατιστικά σημαντικές και μπορεί να αποτελούν μεταβολισμένους μεταβολίτες, οι οποίοι δεν έχουν καταγραφεί στις βάσεις δεδομένων μέχρι στιγμής. Τα αποτελέσματα φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα 7.

Πίνακας 7: χαρακτηρισμός των στατιστικά σημαντικών μεταβολιτών.

m/z	RT	adducts	Fit score	Experimental mass (Da)	Theoretical mass (Da)	Δm	Molecular formula	Analyte
189.1247	2.32	[M+H]	0.99	188.1174	188.1273	0.0099	C ₇ H ₁₆ N ₄ O ₂	Homo-L-arginine
206.1405	10.45	[M+NH ₄]	0.76	188.1057	188.1049	0.0008	C ₉ H ₁₆ O ₄	Nonic acid
264.0596	3.23	[M+H]	1.00	263.0523	263.0464	0.0059	C ₉ H ₁₃ NO ₆ S	N-acetyl-S-(3-oxo-3-carboxy-n-propyl)cysteine
514.3280	10.83	[M+K]	1.00	475.3648	475.3662	0.0014	C ₂₉ H ₄₉ NO ₄	(7Z,10Z,13Z,16Z)-docosatetraenoylcarnitine
154.0705	1.77	[M+H]	0.77	153.0632	153.0790	0.0016	C ₈ H ₁₁ NO ₂	Dopamine

DOCOSATETRAENOYLCARNITINE

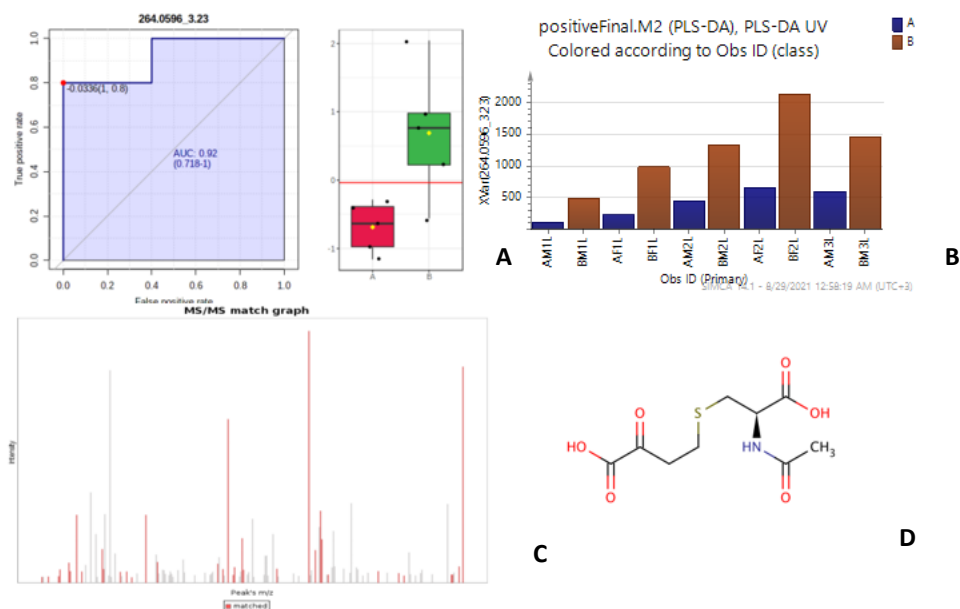
Για τον μεταβολίτη M1 η προτεινόμενη δομή είναι μία ακυλοκαρνιτίνη και συγκεκριμένα η (7Z,10Z,13Z,16Z)-Docosatetraenoylcarnitine. Τα λιπαρά οξέα πολύ μακράς αλυσίδας δεν μπορούν να συμμετάσχουν στη β-οξειδωση που γίνεται στα μιτοχόνδρια, επομένως μεταφέρονται στα υπερόξυσώματα όπου μεταβολίζονται συνθέτοντας ακυλοκαρνιτίνες (G et al., 2008). Οι μεταβολές στα επίπεδα των καρνιτινών γενικότερα θα μπορούσαν να υποδεικνύουν ανισορροπία του μεταβολισμού και διατάραξη της κυτταρικής ενέργειας (Long et al., 2022). Στο πείραμα αυτό φαίνεται πως ο μεταβολίτης αυτός αυξάνεται με την τοξική δόση της κολιστίνης, Ενδεχομένως να μην είναι ιδιαίτερα εκλεκτικός βιοδείκτης για την τοξικότητα της κολιστίνης, αλλά σε συνδυασμό με άλλους βιοδείκτες θα μπορούσε να συμβάλει στη μελέτη του μηχανισμού έκφρασης της τοξικότητας της.



Εικόνα 18: τα στοιχεία που συλλέχθηκαν για την (7Z,10Z,13Z,16Z)-Docosatetraenoylcarnitine A: roc curve B: η εικόνα του μεταβολίτη στα δείγματα C: Σύγκριση του πειραματικού φάσματος μάζας MS/MS με το αντίστοιχο της βιβλιοθήκης D: χημική δομή της (7Z,10Z,13Z,16Z)-Docosatetraenoylcarnitine

3-OXO-3-CARBOXY-N-PROPYL)CYSTEINE

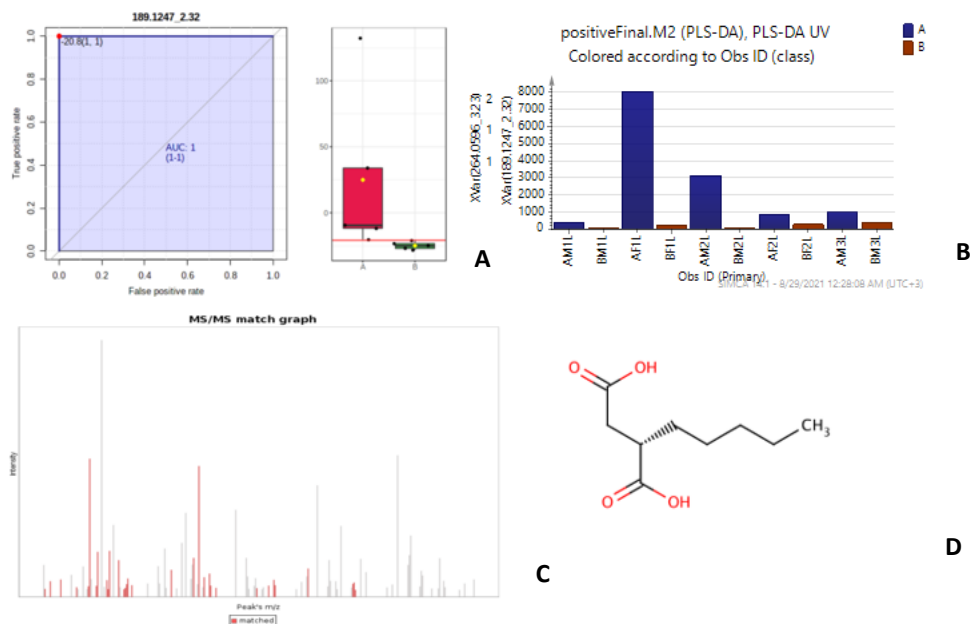
Ο δεύτερος μεταβολίτης που ταυτοποιήθηκε με ικανοποιητικό fit score είναι ο M4 και σύμφωνα με τη βιβλιοθήκη HMDB πρόκειται για την N-ακετυλ-S- (3-οξο-3-καρβοξυ-η-προπυλ) κυστεΐνη (N-acetyl-S-(3-oxo-3-carboxy-n-propyl)cysteine). Ο μεταβολίτης αυτός έχει εντοπιστεί εδώ και αρκετά χρόνια στα ούρα ασθενών με κυσταθειονουρία (Zhang et al., 1995), μία ασθένεια που προκαλείται από ανεπάρκεια της δραστηριότητας της γ-λυάσης της κυσταθειονίνης, η οποία απαιτείται για τη μετατροπή της μεθειονίνης σε κυστεΐνη. Η κυσταθειονουρία και τα αυξημένα επίπεδα κυσταθειονίνης στον ορό και στα ούρα έχουν αναφερθεί ότι εμφανίζονται σε ηπατικές παθήσεις, επομένως ο συγκεκριμένος μεταβολίτης θα αποτελούσε σημαντικό βιοδείκτη ηπατοτοξικότητας της κολιστίνης.



Εικόνα 19: τα στοιχεία που συλλέχθηκαν για τη της N-ακετυλ-S- (3-οξο-3-καρβοξυ-η-προπυλ) κυστεΐνη A: roc curve B: η εικόνα του μεταβολίτη στα δείγματα C : Σύγκριση του πειραματικού φάσματος μάζας MS/MS με το αντίστοιχο της βιβλιοθήκης D: χημική δομή της της N-ακετυλ-S- (3-οξο-3-καρβοξυ-η-προπυλ) κυστεΐνης

NONIC ACID

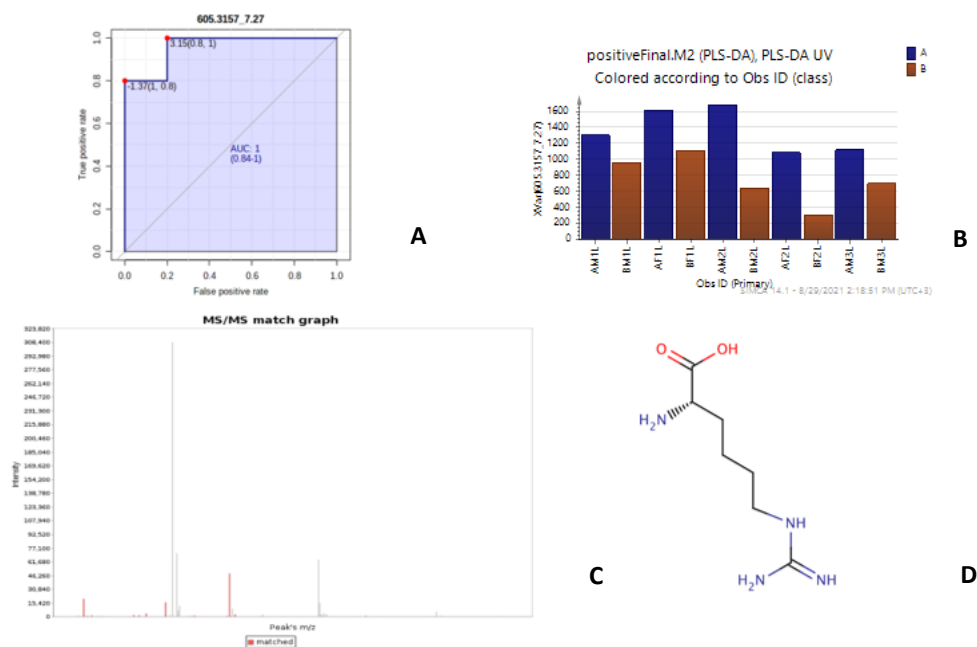
Η προτεινόμενη δομή για το M5 είναι αυτή του νωνικού οξέος. Το νωνικό οξύ είναι μια ανιονική μορφή του ηλεκτρικού οξέος το οποίο συμμετέχει στον κύκλο του κιτρικού οξέος, περιέχει δύο καρβοξύλια και μπορεί να μεταφερθεί μέσω της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Συνεπώς η απορρύθμιση αυτού του μεταβολίτη υποδηλώνει μιτοχονδριακή δυσλειτουργία (Cheema et al., n.d.) Επομένως το νωνικό οξύ είναι ένας μεταβολίτης που επηρεάζεται από την αγωγή κολιστίνης. Όμως, λόγω του ότι οι μεταβολίτες που συμμετέχουν στον κύκλο του κιτρικού οξέος μπορούν να επηρεαστούν από πολλούς παράγοντες, είναι πιθανό να μην αποτελεί έναν ειδικό βιοδείκτη τοξικότητας.τι εννοείς; Παρόλα αυτά, σε συνδυασμό με τους υπόλοιπους μεταβολίτες που έχουν βρεθεί θα μπορούσε να βοηθήσει στην επιβεβαίωση των τοξικών επιπέδων κολιστίνης σε έναν ασθενή.



Εικόνα 20: τα στοιχεία που συλλέχθηκαν για το νωνικό οξύ A: roc curve, B: η εικόνα του μεταβολίτη στα δείγματα, C : Σύγκριση του πειραματικού φάσματος μάζας MS/MS με το αντίστοιχο της βιβλιοθήκης, D: χημική δομή του νωνικού οξέος

HOMO-L-ARGININE

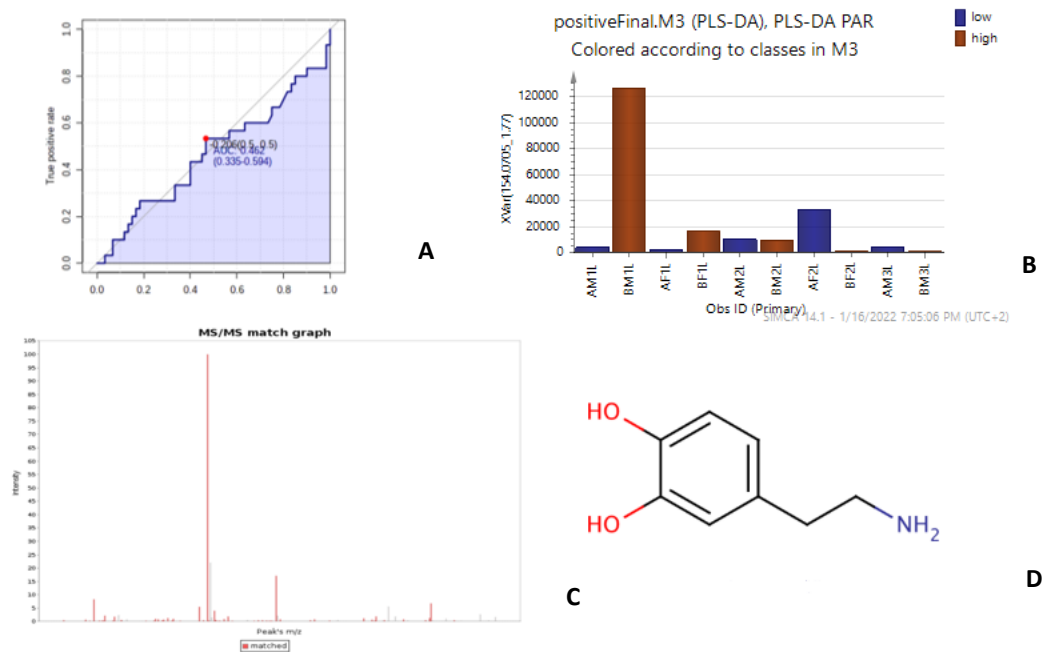
Η πιθανή δομή που βρέθηκε για το M7 βρέθηκαν είναι αυτή της L-ομοαργινίνης, η οποία είναι ένα αμινοξύ που μπορεί να συντεθεί στο ήπαρ από τον καταβολισμό της λυσίνης. Η L-ομοαργινίνη αποτελεί ένα εναλλακτικό υπόστρωμα για τη συνθάση του οξειδίου του αζώτου, επομένως αυξάνει την παραγωγή NO επηρεάζοντας έτσι τη λειτουργία του ενδοθηλίου. Έρευνες έχουν δείξει πως τα χαμηλά επίπεδα L-ομοαργινίνης σχετίζονται με κίρρωση του ήπατος και πως αποτελεί έναν ειδικό, μη ανταγωνιστικός αναστολέα της ανθρώπινης ηπατικής και οστικής αλκαλικής φωσφοϋδρολάσης. Στο πείραμα αυτό φαίνεται πως τα επίπεδα της L-ομοαργινίνης μειώνονται με την αύξηση της δόσης της κολιστίνης. Επομένως, αποτελεί έναν πιθανό μεταβολίτη που υποδηλώνει ηπατική τοξικότητα της κολιστίνης και μπορεί να λειτουργήσει ως βιοδείκτης για την τοξικότητά της.



Εικόνα 21: τα στοιχεία που συλλέχθηκαν για τη L-ομοαργινίνης: roc curve, B: η εικόνα του μεταβολίτη στα δείγματα, C : Σύγκριση του πειραματικού φάσματος μάζας MS/MS με το αντίστοιχο της βιβλιοθήκης, D: χημική δομή της L-ομοαργινίνης

DOPAMINE

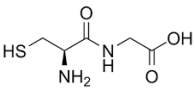
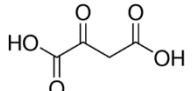
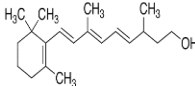
Τέλος, για το M11 η προτεινόμενη χημική δομή είναι αυτή της ντοπαμίνης. Η ντοπαμίνη είναι ενδογενής μεταβολίτης που συμμετέχει κυρίως από τον νευρικό ιστό και τα επινεφρίδια, πρώτα με την ενυδάτωση του αμινοξέος τυροσίνη σε DOPA από την υδροξυλάση τυροσίνης και στη συνέχεια με την αποκαρβοξυλίωση του DOPA από την αποκαρβοξυλάση του αρωματικού L-αμινοξέος. (Mezzelani et al., 2015). Στο πείραμα βλέπουμε πως υπάρχει μία τάση προς αύξηση της ντοπαμίνης με την αύξηση της δόσης.



Εικόνα 22: τα στοιχεία που συλλέχθηκαν για την ντοπαμίνη: roc curve, B: η εικόνα του μεταβολίτη στα δείγματα, C : Σύγκριση του πειραματικού φάσματος μάζας MS/MS με το αντίστοιχο της βιβλιοθήκης, D: χημική δομή της ντοπαμίνης

Για τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά χρησιμοποιήθηκε μια άλλη λειτουργία του MyCompoundID που ονομάζεται 1-reaction. Η λειτουργία αυτή, χρησιμοποιεί πάνω από 70 αντιδράσεις μεταβολισμού των μεταβολιτών, πχ. Μεθυλίωση της Αργινίνης. Έπειτα προσπαθεί να αντιστοιχήσει το πειραματικό m/z στο θεωρητικό m/z του μεταβολισμένου μεταβολίτη. Ακολουθώς, δημιουργεί μία θεωρητική *in-silico* θραυσματοποίηση και την συγκρίνει με το πειραματικό MSMS. Η μέθοδος δίνει τη δυνατότητα να διερευνήσουμε αν αυτές οι δομές μπορεί να αποτελούν προϊόντα που πιθανόν υπάρχουν στον οργανισμό, αλλά ακόμα δεν έχουν καταγραφεί. Ακόμα και αν η αξιοπιστία της έχει περιορισμούς, παρέχει την δυνατότητα διερεύνησης του άγνωστου μεταβολώματος (dark metabolome).

Πίνακας 8: χαρακτηρισμός των στατιστικά σημαντικών μεταβολιτών, με την επιλογή 1-reaction στο My Compound.

m/z	RT	adducts	Reaction	Fit score	Natural mass (Da)	Theoretical mass (Da)	Δm	Formulation-name	Structure
175.0122	0.71	[M-H] ⁻	[-H ₂]	0.90	176.0195	178.0412	-0.0061	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃ S Cysteinyglycine	
357.0632	2.41	[M-H] ⁻	[+C ₉ H ₁₀ N ₂ O ₅]	0.99	358.0705	132.0059	0.0056	C ₄ H ₄ O ₅ Oxalacetic acid	
514.3280	10.83	[M+H] ⁺	[+C ₉ H ₁₁ N ₃ O ₄]	0.68	513.3207	288.2453	0.0004	C ₂₀ H ₃₂ O All-trans-13,14-dihydroretinol	

Η κυστεΐνυλογλυκίνη συμμετέχει στον μεταβολισμό της γλουταθειόνης. Οι οδοί που σχετίζονται με την αντιοξειδωση, όπως ο μεταβολισμός της γλουταθειόνης έχει παρατηρηθεί ότι υπαρυθμίζονται με την εμφάνιση τοξικότητας της κολιστίνης, γεγονός που πιθανώς να σχετίζεται με αυξημένο οξειδωτικό στρες και κυτταρική βλάβη σε όργανα όπως τα νεφρά (Long et al., 2022). Επίσης, το οξαλοξικό οξύ συμμετέχει στον μεταβολισμό της αλανίνης, ο οποίος συνδέεται με τη νεφροτοξικότητα της κολιστίνης. Συγκεκριμένα ένας από τους βιοδείκτες που υποδικνύουν νεφροτοξικότητα είναι κατά τη χωρήγηση του αντιβιοτικού είναι η η αμινοτρανσφεράση της αλανίνης (ALT).

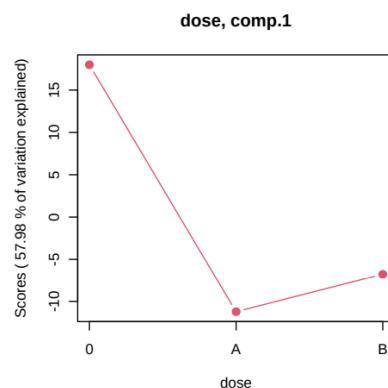
ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΝΤΑΙ

Οι παραπάνω μεταβολίτες μπορούν να βοηθήσουν στην κατανόηση των μεταβολομικών μονοπατιών τα οποία επηρεάζει η κολιστίνη προκαλώντας τοξικότητα. Για την εύρεση αυτών των μονοπατιών έγινε χρήση του λογισμικού metaboAnalyst.

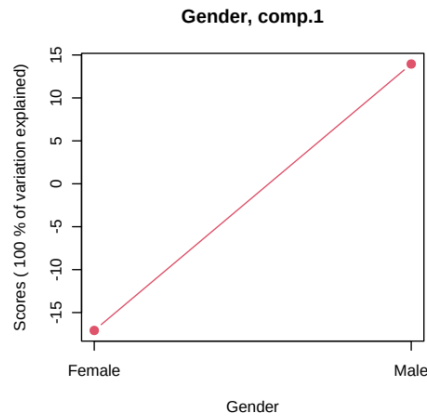
Τα κύρια μονοπάτια που αναδείχθηκαν ήταν του μεταβολισμού της τυροσίνης (ντοπαμίνη και οξαλικό οξύ), της αλανίνης (οξαλικό οξύ), της γλουταθειόνης (κυστεινυλογλυκόλη), της ουρίας και του κιτρικού οξέος. Η γενική παρατήρηση είναι πως η χορήγηση κολιστίνης φαίνεται να επηρεάζει τα βιολογικά μονοπάτια των αμινοξέων.

Προκειμένου να διερευνηθεί πιθανή συσχέτιση του φύλου και της επίδρασης της κολιστίνης, αναπτύχθηκε ένα μοντέλο ANOVA - Simultaneous Component Analysis (ASCA). Η ASCA αποτελεί μια πολυπαραμετρική επέκταση της κλασσικής μονοπαραμετρικής ANOVA. Στόχος ήταν να συσχετίσουμε την επίδραση που έχει το φύλο και οι διαφορετικές δόσεις κολιστίνης στο μεταβολώμα των ποντικών, και να αναγνωρίσουμε μοτίβα ή αλληλεπιδράσεις των δύο παραγόντων.

Παράγοντες ήταν το φύλο και η δόση. Η σκέψη που οδήγησε στην επιλογή της συγκεκριμένης στατιστικής διαδικασίας ήταν πως ανάλογα με το βιολογικό φύλο είναι πιθανό να διαφέρει ο μεταβολισμός της κολιστίνης σε συνάρτηση με τη δόση. Γενικότερα, η δόση ενός φαρμάκου εξαρτάται από τον όγκο κατανομής (volume of distribution) και τη νεφρική κάθαρση (clearance) (Anderson, 2008). Τα θηλυκά άτομα έχουν υψηλότερο ποσοστό σωματικού λίπους από τα αρσενικά, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει τον όγκο κατανομής ορισμένων φαρμάκων. Επίσης υπάρχουν διαφορές ανάλογα με το φύλο στη δραστηριότητα των ενζύμων του κυτοχρώματος P450 (CYP) και της διφωσφορικής ουριδίνης γλυκουρονοσυλοτρανσφεράσης (UGT) και της νεφρικής απέκκρισης που έχουν ως αποτέλεσμα διαφορές στη νεφρική κάθαρση (Franconi et al., 2007).

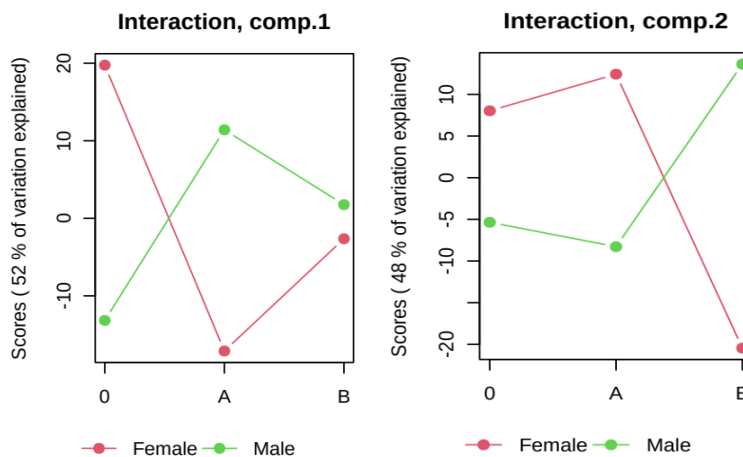


Εικόνα 23: Σχηματική απεικόνιση της μεταβολής του μεταβολώματος συναρτήσει της δόσης της κολιστίνης.



Εικόνα 24: Σχηματική απεικόνιση της μεταβολής του μεταβολώματος συναρτήσει του φύλου των μυών.

Στην Εικόνα 23 και Εικόνα 24 αποτυπώνονται τα διαγράμματα, που περιγράφουν την επίδραση της δόσης φαρμάκου και του φύλου στο μεταβολικό προφίλ των ποντικών, αντίστοιχα. Στην Εικόνα 24 φαίνεται ότι το φύλο εξηγεί 100% την διαφοροποίηση στο μεταβολικό προφίλ των ποντικών. Αντίστοιχα, στην Εικόνα 23 φαίνεται πως η κύρια διαφοροποίηση του μεταβολώματος οφείλεται στη αρχική χορήγηση της κολίστινης (σημείο 0 με σημείο A: χαμηλή δόση), ενώ η διαφοροποίηση λόγω αύξησης της δόσης είναι χαρακτηριστικά μικρότερη.



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση της αλληλεπίδρασης της δόσης της κολίστινης και του φύλου στο μεταβολώμα των μυών.

Στην Εικόνα 24 αποτυπώνονται ταυτόχρονα η επίδραση της δόσης και του φύλου, ώστε να αναδεικνύονται πιθανές αλληλεπιδράσεις (στα σημεία που τέμνονται οι γραμμές).

Σε αντίθεση με την Εικόνα 23, που το φύλο εξηγεί 100% την διαφοροποίηση των μεταβολιτών, στην Εικόνα 24 φαίνεται ότι υπάρχουν 2 πιθανά «μοτίβα» που εξηγούν την επίδραση της κολίστινης. Βλέπουμε ότι και στις δύο περιπτώσεις, η πρώτη δόση, επιδρά με αντίστροφο τρόπο

στα θηλυκά και τα αρσενικά ποντίκια, που πιθανόν οφείλετε στην διαφορετική κατανομή λίπους. Το 52% της διακύμανσης «εξηγείται» από την αντίστροφη επίδραση της A δόσης στα δύο φύλα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 24^α, τροποποιεί-αντιστρέφει την επίδραση του φύλου, ενώ το 48% εξηγείται από την ενίσχυση της διαφοροποίησης των μεταβολικών λόγω του φύλου (Εικόνα 24β). Αντίστοιχα, παρατηρούμε ότι η επίδραση της τοξικής δόσης, στην Εικόνα 24^α «υπερκαλύπτει» ή διαφορετικά εξισώνει τις διαφορές λόγω φύλου, οδηγεί σε ένα κοινό μεταβολικό αποτύπωμα, στο οποίο πιθανώς υπερεκφράζονται ορισμένοι μηχανισμοί χαρακτηριστικοί της τοξικότητας.

Η κολιστίνη είναι ένα αντιβιοτικό με δράση κατά των gram-αρνητικών βακτηρίων, το οποίο όμως είναι γνωστό πως εμφανίζει τοξικότητα. Στο πείραμα αυτό έγινε μεταβολομική μελέτη τοξικότητας της κολιστίνης σε δείγματα ήπατος μυών, με σκοπό τον εντοπισμό πιθανής τοξικότητας στο ήπαρ αλλά και τη διερεύνηση της διαφοροποίησης της μεταβολομικής εικόνας του οργανισμού μετά τη χορήγηση του φαρμάκου και την εύρεση μεταβολιτών που μπορούν να λειτουργήσουν ως βιολογικοί δείκτες για τα επίπεδα τοξικότητας της κολιστίνης. Η δόση που θεωρήθηκε «τοξική» ουσιαστικά αντιστοιχεί σε ημιδιπλασιασμό της κανονικά χορηγούμενης δόσης, ώστε να εντοπιστούν βιοδείκτες έγκαιρης πρόβλεψης της εμφάνισης τοξικότητας.

Η παρούσα μελέτη αποδεικνύει για πρώτη φορά την επίδραση της κολιστίνης στην ηπατική λειτουργία, και φαίνεται να προκαλεί απορρύθμιση από την πρώτη φάση χορήγησης του φαρμάκου.

Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστική διαφοροποίηση του μεταβολώματος της ομάδας που λαμβάνει θεραπευτική δόση κολιστίνης και της ομάδας που λαμβάνει τοξική δόση κολιστίνης. Από την στατιστική ανάλυση (πολυπαραμετρική και μόνοπαραμετρική), ξεχώρισαν ορισμένα «features» τα οποία αξιοποιήθηκαν στην πορεία ώστε να αποδοθούν σε μεταβολίτες. Χαρακτηρίστηκαν 8 από τις 11 στατιστικά σημαντικές μεταβλητές. Οι μεταβολίτες που ξεχώρισαν είναι η (7Z,10Z,13Z,16Z)-Docosatetraenoylcarnitine, η την N-ακετυλ-S- (3-οξο-3-καρβοξυ-η-προπυλ) κυστεΐνη, το νωνικό οξύ, η L-ομοαργινίνη, η ντοπαμίνη, η κυστεΐνυλογλυκίνη, το οξαλοξικό οξύ και η all-trans-13,14-διυδρορετινόλη. Από αυτούς έχουν συνδεθεί με τοξικότητα. Από αυτούς τους μεταβολίτες, η ντοπαμίνη και το οξαλοξικό οξύ συμμετέχουν στο μεταβολομικό μονοπάτι της τυροσίνης. Άλλα μονοπάτια που φαίνεται να επηρεάζονται είναι ο μεταβολισμός της γλουταθειόνης, ο κύκλος της ουρίας, ο κύκλος του κιτρικού οξέος κ.α. Τέλος, φαίνεται πως υπάρχει διαφοροποίηση στον τρόπο που μεταβολίζεται η κολιστίνη στα θηλυκά και τα αρσενικά ποντίκια.

Τα παραπάνω ευρήματα δείχνουν πως είναι σημαντικό να μελετηθεί περεταίρω η τοξικότητα της κολιστίνης στο ήπαρ. Αρχικά προτείνεται η περαιτέρω μελέτη των μεταβολικών μονοπατιών που προέκυψαν ως στατιστικά σημαντικά και η διερεύνηση της συσχέτισης τους με την τοξικότητα της κολιστίνης. Επιπλέον, θα ήταν χρήσιμη η στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση των μεταβολιτών που συμμετέχουν στα μονοπάτια αυτά για την εύρεση των συγκεντρώσεων τους, ώστε να εξακριβωθεί η συσχέτισή τους με την κολιστίνη.

Για να γίνει ακόμη καλύτερη στατιστική μελέτη, προτείνεται η επανάληψη του πειράματος σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων. Ακόμη, επειδή στα πειραματόζωα αυτού του πειράματος δόθηκε μόνο μια εφάπαξ δόση κολιστίνης, θα είχε ενδιαφέρον η επανάληψη του πειράματος με παρατεταμένη έκθεση στην κολιστίνη, καθώς το φάρμακο αυτό συνήθως χορηγείται για μερικές μέρες στους ασθενείς, επομένως μπορεί να διαφέρει αρκετά το μεταβολικό αποτύπωμα της χρόνιας έκθεσης. Επίσης θα μπορούσε να μελετηθεί μεγαλύτερο εύρος δόσεων, ώστε να ξεχωρίσουν μεταβολίτες που έχουν άμεση συσχέτιση με την αύξηση της δόσης. Τέλος, τα δείγματα του συγκεκριμένου πειράματος θα μπορούσαν να αναλυθούν και με άλλες τεχνικές - omics και να συγκριθούν μεταξύ τους τα αποτελέσματα.

- Abdi, H., Abdi, H., & Williams, L. J. (n.d.). *Overview Principal component analysis*. Retrieved June 11, 2021, from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/summary?doi=10.1.1.298.9127>
- Allen, D. R., & McWhinney, B. C. (2019). Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry: A Paradigm Shift in Toxicology Screening Applications. *Clinical Biochemist Reviews*, 40(3), 135–146. <https://doi.org/10.33176/AACB-19-00023>
- Anderson, G. D. (2008). Chapter 1 Gender Differences in Pharmacological Response. *International Review of Neurobiology*, 83, 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(08\)00001-9](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(08)00001-9)
- Animal Models in Toxicology - Βιβλία Google*. (n.d.). Retrieved May 27, 2021, from [https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=N0PMBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=mice+models+in+toxicology&ots=7Z16ZehXIZ&sig=h_5ldCIJaZpJURXbA01kk3rJxQ&redir_esc=y#v=onepage&q=mice models in toxicology&f=false](https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=N0PMBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=mice+models+in+toxicology&ots=7Z16ZehXIZ&sig=h_5ldCIJaZpJURXbA01kk3rJxQ&redir_esc=y#v=onepage&q=mice+models+in+toxicology&f=false)
- Bailey, J., Thew, M., & Balls, M. (2014). An analysis of the use of animal models in predicting human toxicology and drug safety. *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, 42(3), 181–199. <https://doi.org/10.1177/026119291404200306>
- Beyer, B. A., Fang, M., Sadrian, B., Montenegro-Burke, J. R., Plaisted, W. C., Kok, B. P. C., Saez, E., Kondo, T., Siuzdak, G., & Lairson, L. L. (2018). Metabolomics-based discovery of a metabolite that enhances oligodendrocyte maturation. *Nature Chemical Biology*, 14(1), 22–28. <https://doi.org/10.1038/NCHEMBIO.2517>
- Cheema, A. K., Hinzman, C. P., Mehta, K. Y., Hanlon, B. K., Garcia, M., Fatanmi, O. O., & Singh, V. K. (n.d.). Plasma Derived Exosomal Biomarkers of Exposure to Ionizing Radiation in Nonhuman Primates. *International Journal of Molecular Sciences Article*. <https://doi.org/10.3390/ijms19113427>
- Ebbels, T. M. D., & Cavill, R. (2009). Bioinformatic methods in NMR-based metabolic profiling. In *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* (Vol. 55, Issue 4, pp. 361–374). <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2009.07.003>
- Festing, M. F. W., & Altman, D. G. (n.d.). *Guidelines for the Design and Statistical Analysis of*

Experiments Using Laboratory Animals. Retrieved November 11, 2021, from <https://academic.oup.com/ilarjournal/article/43/4/244/981872>

Franconi, F., Brunelleschi, S., Steardo, L., & Cuomo, V. (2007). Gender differences in drug responses. *Pharmacological Research*, 55(2), 81–95.
<https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2006.11.001>

G, D., S, B., C, R., L, R., V, D. C., R, C., MC, M., DW, J., & C, D.-V. (2008). Urine acylcarnitine analysis by ESI-MS/MS: a new tool for the diagnosis of peroxisomal biogenesis disorders. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 398(1–2), 86–89.
<https://doi.org/10.1016/J.CCA.2008.08.018>

Henkel, M., & Hausmann, R. (2019). Diversity and Classification of Microbial Surfactants. *Biobased Surfactants: Synthesis, Properties, and Applications*, 41–63.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812705-6.00002-2>

Jain, R. K., Duda, D. G., Willett, C. G., Sahani, D. V., Zhu, A. X., Loeffler, J. S., Batchelor, T. T., & Sorensen, A. G. (2009). Biomarkers of response and resistance to antiangiogenic therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 6(6), 327–338.
<https://doi.org/10.1038/NRCLINONC.2009.63>

Jeong, E. S., Kim, G., Moon, K. S., Kim, Y. B., Oh, J. H., Kim, H. S., Jeong, J., Shin, J. G., & Kim, D. H. (2016). Characterization of urinary metabolites as biomarkers of colistin-induced nephrotoxicity in rats by a liquid chromatography/mass spectrometry-based metabolomics approach. *Toxicology Letters*, 248, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.02.018>

Keirstead, N. D., Wagoner, M. P., Bentley, P., Blais, M., Brown, C., Cheatham, L., Ciaccio, P., Dragan, Y., Ferguson, D., Fikes, J., Galvin, M., Gupta, A., Hale, M., Johnson, N., Luo, W., McGrath, F., Pietras, M., Price, S., Sathe, A. G., ... Kern, G. (2014). Early prediction of polymyxin-induced nephrotoxicity with next-generation urinary kidney injury biomarkers. *Toxicological Sciences*, 137(2), 278–291. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft247>

Li, J., Nation, R. L., Turnidge, J. D., Milne, R. W., Coulthard, K., Rayner, C. R., & Paterson, D. L. (2006). *Colistin : the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections*.

Lim, L. M., Pharm, D., Ly, N., Anderson, D., Pharm, D., Yang, J. C., Pharm, D., Macander, L., Pharm, D., Jarkowski, A., Pharm, D., Forrest, A., Pharm, D., Bulitta, J. B., Ph, D., Tsuji, B. T., & Pharm, D. (2010). Resurgence of Colistin: A Review of Resistance, Toxicity,

- Pharmacodynamics, and Dosing. *Pharmacotherapy*, 30(12), 1279–1291.
- Lírio, M., Aguiar, G., Spínola, S. U., Mendes, A. V., & Barberino, M. G. (2018). Colistin induced neurotoxicity: a case report and review of literature. *Rev. Bras. Neurol*, 54(71), 30–33.
- Long, N. P., Oh, J. H., Park, S. M., Yen, N. T. H., Phat, N. K., Cho, Y. S., Kim, H. M., Yoon, S., Shin, J. G., & Kim, D. H. (2022). Delineation of the molecular mechanisms underlying Colistin-mediated toxicity using metabolomic and transcriptomic analyses. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 439. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2022.115928>
- Mamas, M., Dunn, W. B., Neyses, L., & Goodacre, R. (2011). The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease. *Archives of Toxicology*, 85(1), 5–17. <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0609-6>
- Mayeux, R. (2004). Biomarkers: Potential Uses and Limitations. *NeuroRx*, 1(2), 182–188. <https://doi.org/10.1602/neurorx.1.2.182>
- Mezzelani, A., Landini, M., Facchiano, F., Raggi, M. E., Villa, L., Molteni, M., De Santis, B., Brera, C., Caroli, A. M., Milanesi, L., & Marabotti, A. (2015). Environment, dysbiosis, immunity and sex-specific susceptibility: a translational hypothesis for regressive autism pathogenesis. *Nutritional Neuroscience*, 18(4), 145–161. <https://doi.org/10.1179/1476830513Y.00000000108>
- Nation, R. L., & Li, J. (2009). Colistin in the 21st century. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 22(6), 535–543. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e328332e672>
- Qureshi, A., Gurbuz, Y., & Niazi, J. H. (2012). Biosensors for cardiac biomarkers detection: A review. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 171–172, 62–76. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2012.05.077>
- Robertson, D. G. (2005). Metabonomics in toxicology: A review. *Toxicological Sciences*, 85(2), 809–822. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi102>
- Roux, A., Lison, D., Junot, C., & Heilier, J. F. (2011). Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: A review. *Clinical Biochemistry*, 44(1), 119–135. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.08.016>
- Saganuwan, S. A. (2017). Toxicity studies of drugs and chemicals in animals: An overview. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 20(4), 291–318.

<https://doi.org/10.15547/bjvm.983>

Worley, B., Halouska, S., & Powers, R. (2013). Utilities for quantifying separation in PCA/PLS-DA scores plots. *Analytical Biochemistry*, 433(2), 102–104.

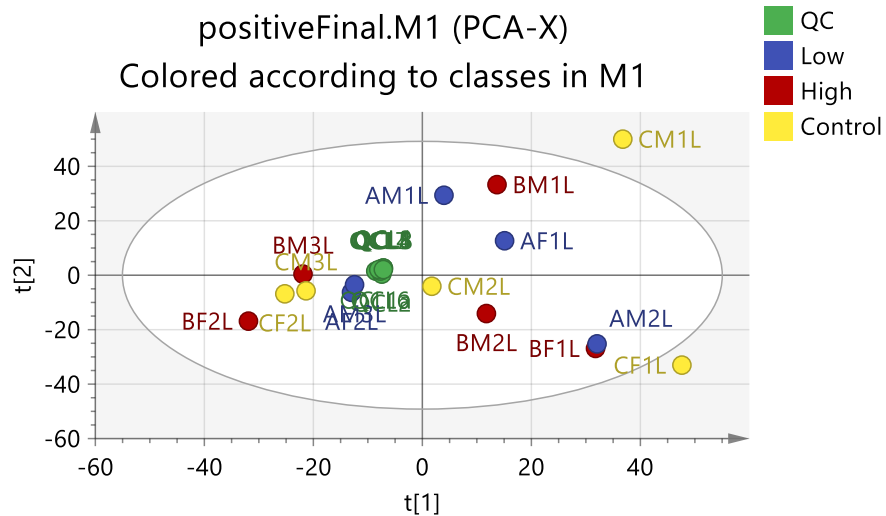
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.10.011>

Yi, L., Dong, N., Yun, Y., Deng, B., Ren, D., Liu, S., & Liang, Y. (2016). Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review. *Analytica Chimica Acta*, 914, 17–34. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.02.001>

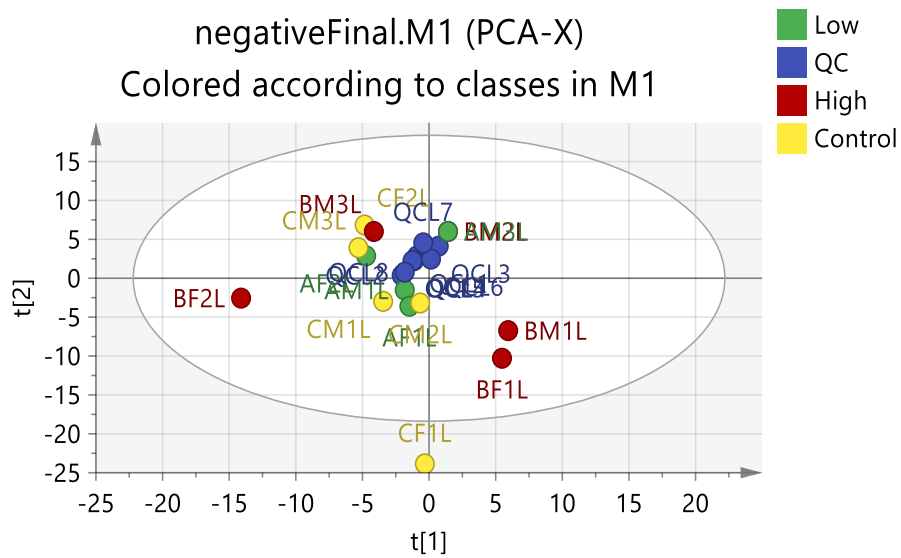
Zhang, J., Masuoka, N., Ubuka, T., Sugahara, K., & Kodama, H. (1995). Identification of N-acetyl-S-(3-oxo-3-carboxy-n-propyl)cysteine in the urine of a patient with cystathioninuria using LC/APCI-MS. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 18(6), 675–681.

<https://doi.org/10.1007/BF02436756>

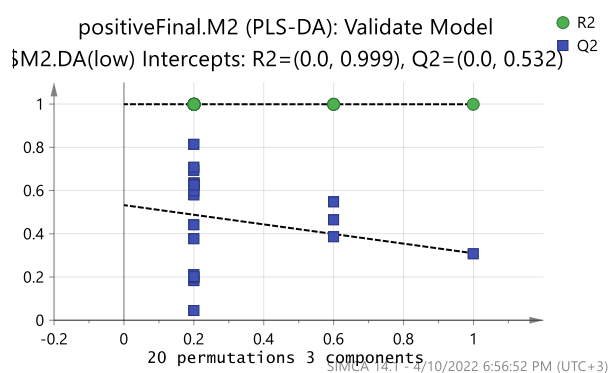
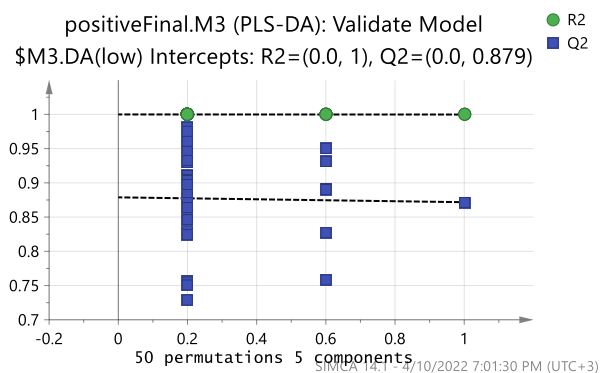
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ



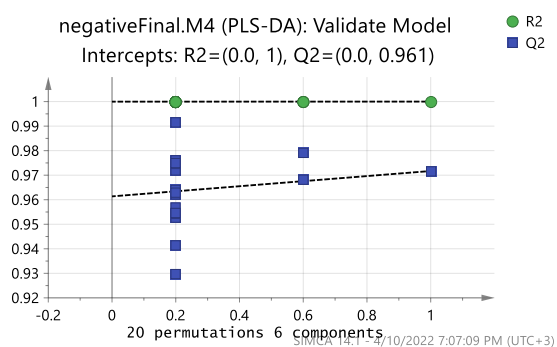
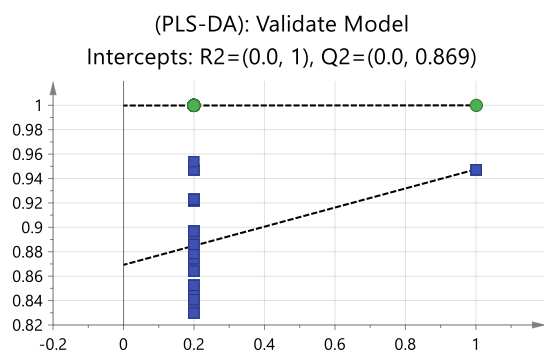
μοντέλο PCA για τα αποτελέσματα του θετικού ιοντισμού



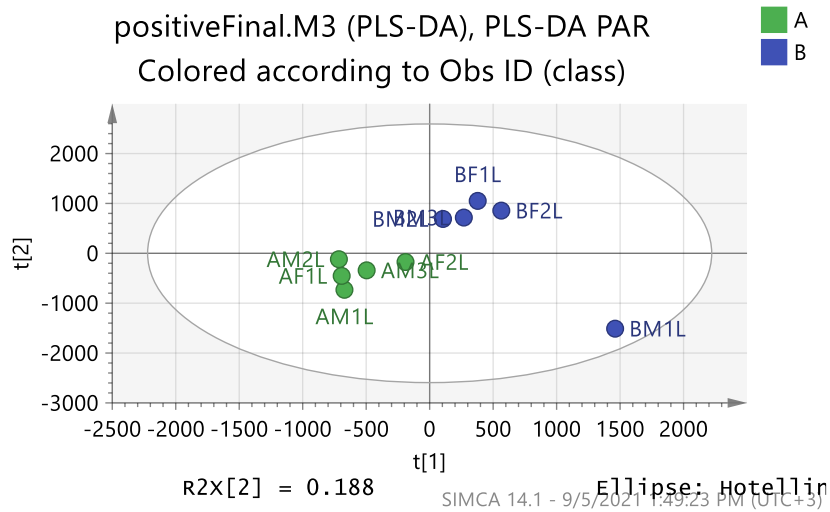
μοντέλο PCA για τα αποτελέσματα του αρνητικού ιοντισμού



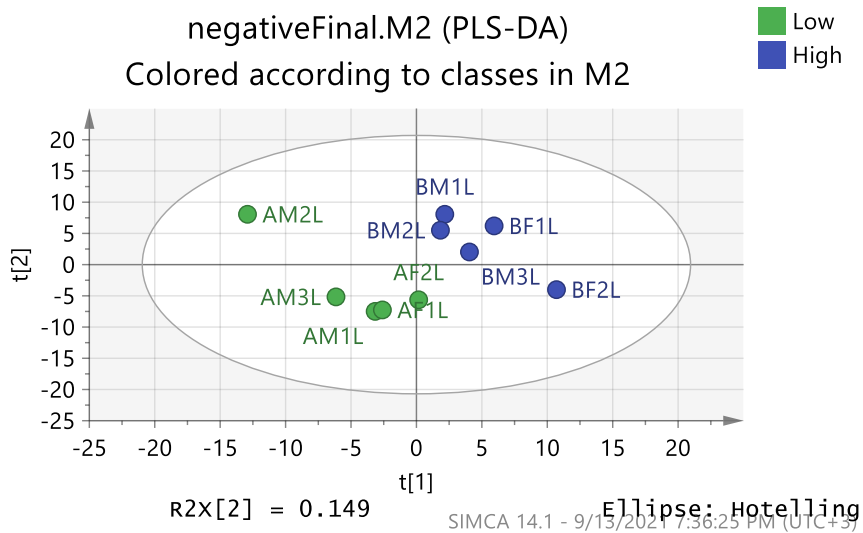
Permutation test για τις ομάδες A και B για τους μεταβολίτες που προέκυψαν από θετικό ιοντισμό.



Permutation test για τις ομάδες A και B για τους μεταβολίτες που προέκυψαν από αρνητικό ιοντισμό.



μοντέλο PLS-DA για τον θετικό ιοντισμό και τις ομάδες A και B

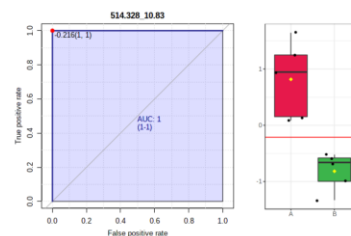
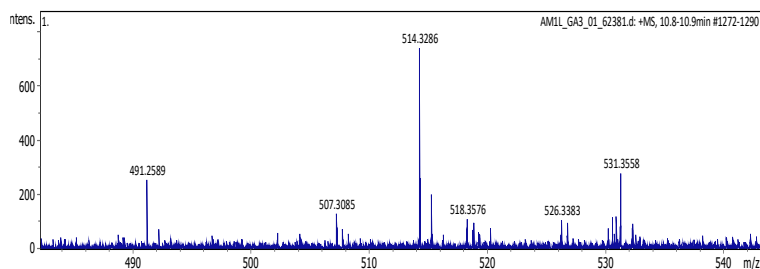
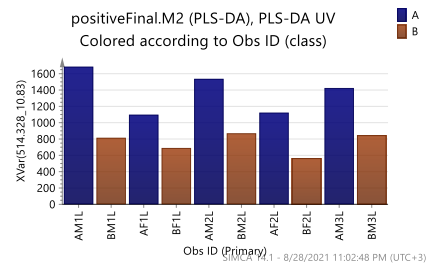
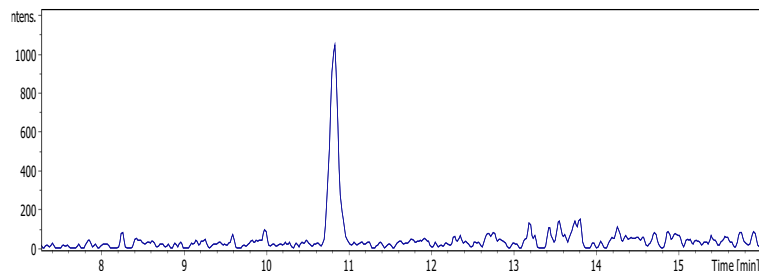


μοντέλο PLS-DA για τον αρνητικό ιοντισμό και τις ομάδες A και B

ΕΠΙΛΟΓΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ

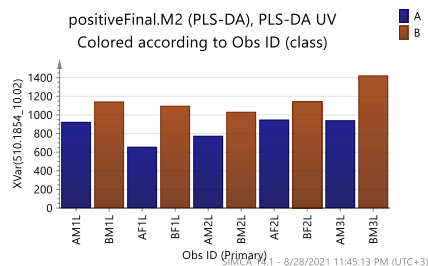
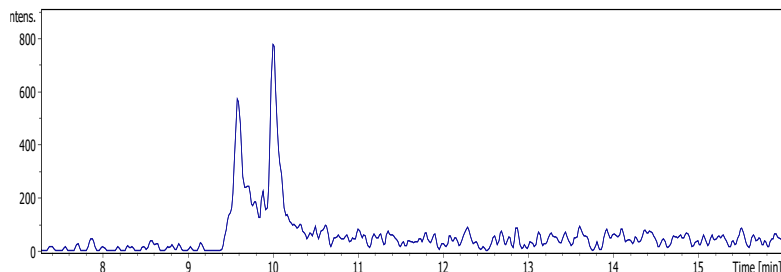
514.326_10.83

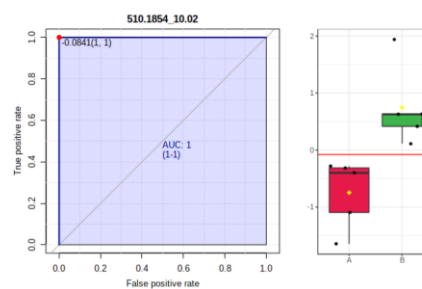
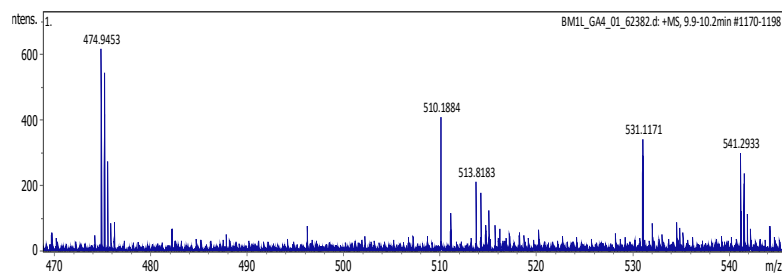
M1: m/z: 514.326 RT: 10.83



510.1854_10.02

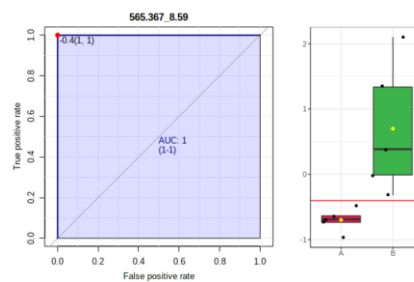
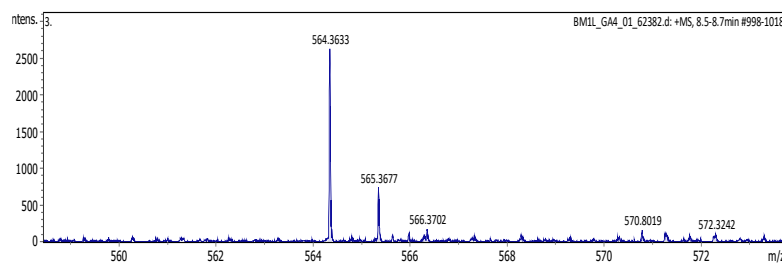
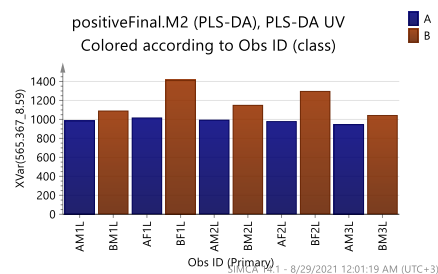
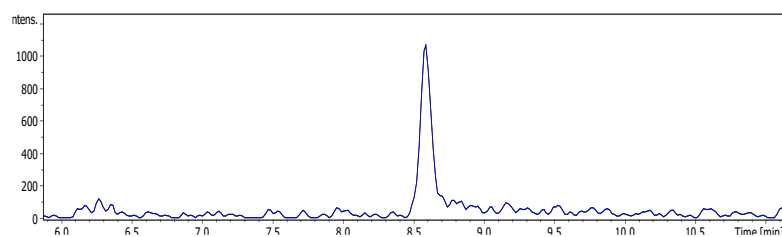
M2: m/z:510.1854 RT: 10.02





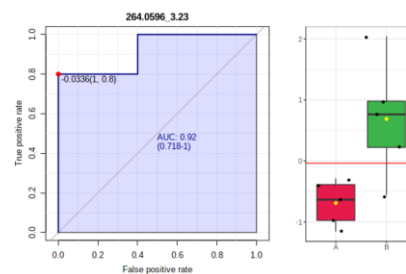
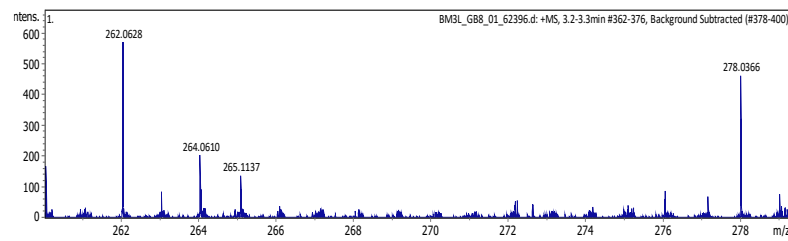
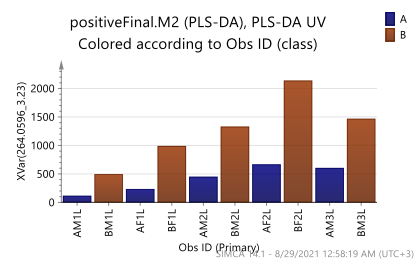
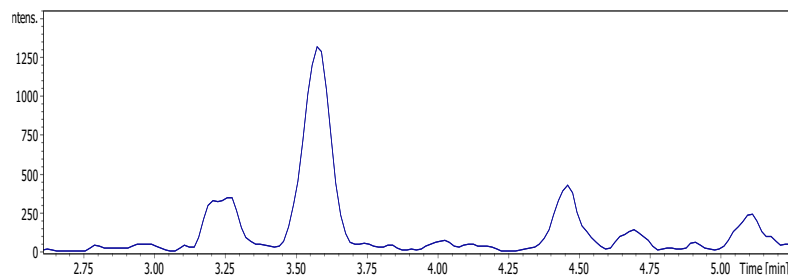
565.3670_8.59

M3: m/z: 565.3670 RT: 8.59



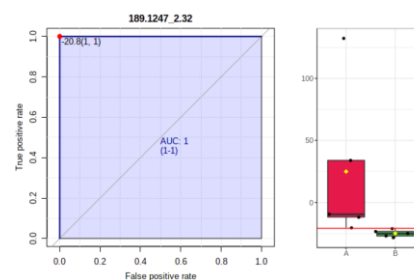
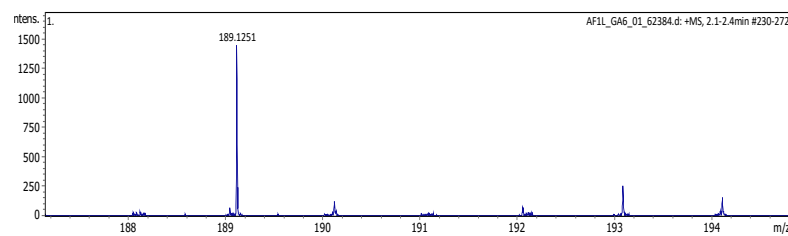
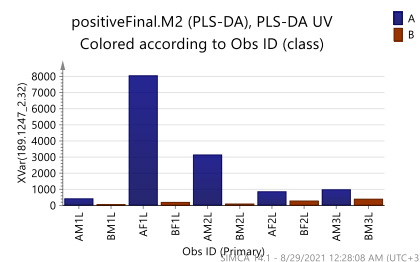
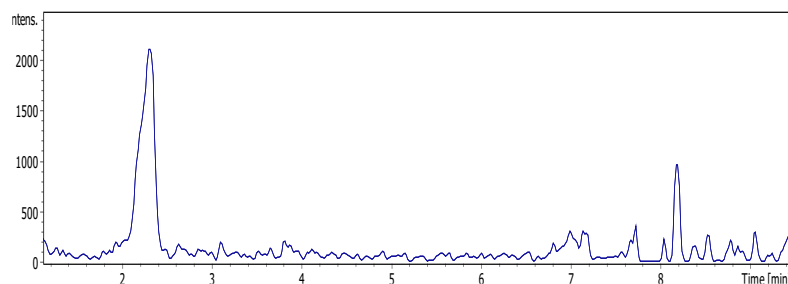
264.0566_3.23

M4: m/z: 264.0566 RT: 3.23



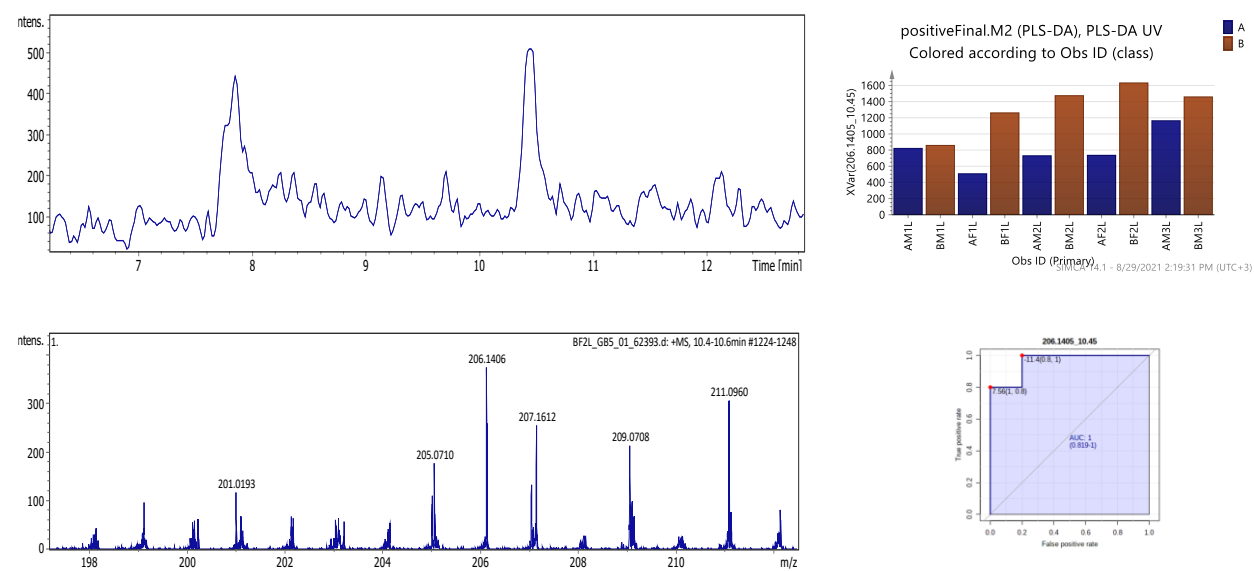
189.1247_2.32

M5: m/z: 189.1247 RT: 2.32



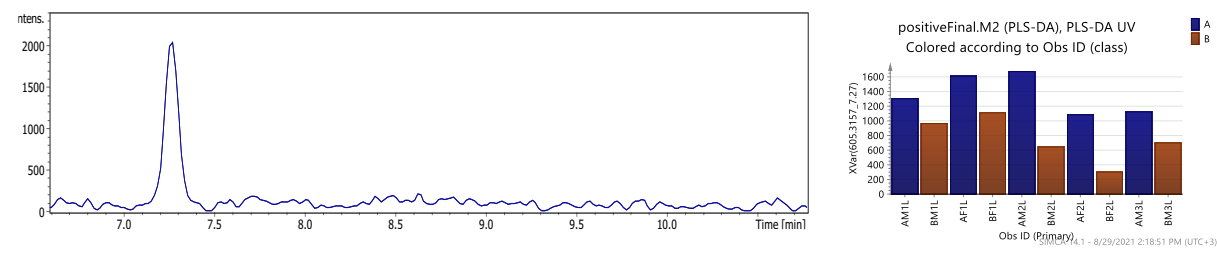
206.1405_10.45

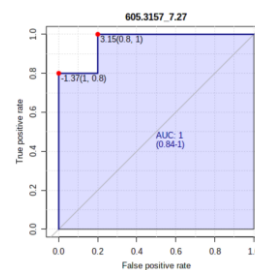
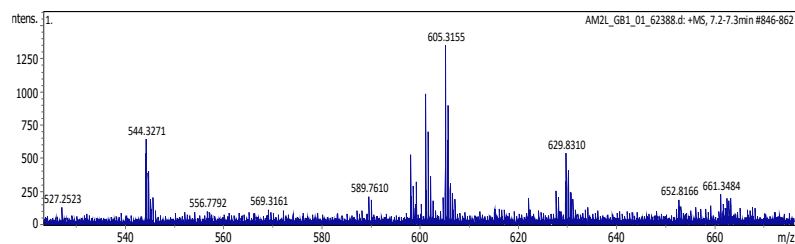
M6: m/z: 206.1405 RT: 10.45



605.3157_7.27

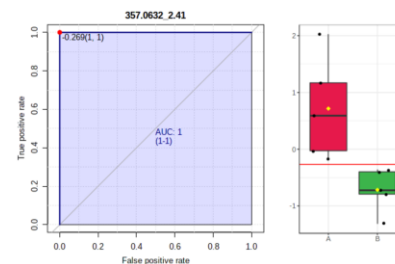
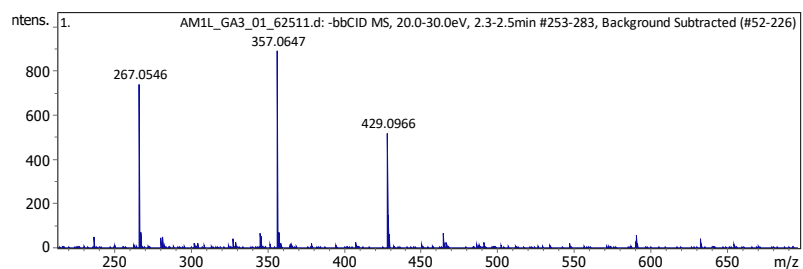
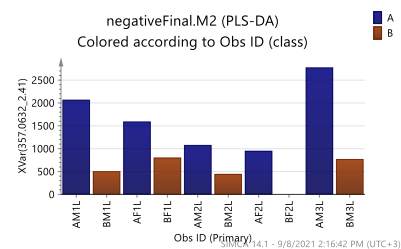
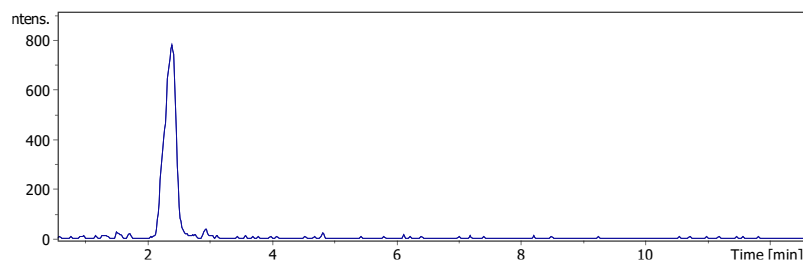
M7: m/z: 605.3157 RT: 7.27





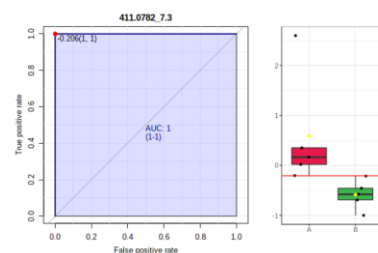
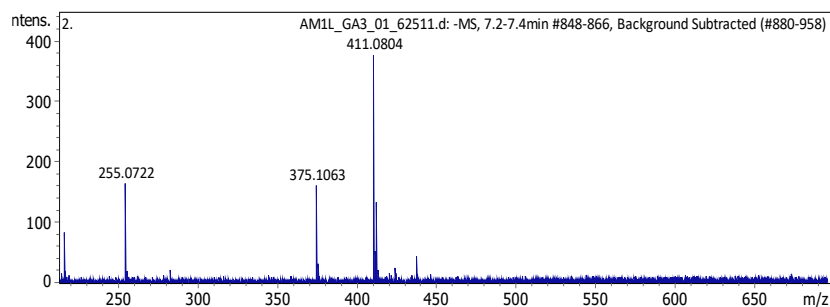
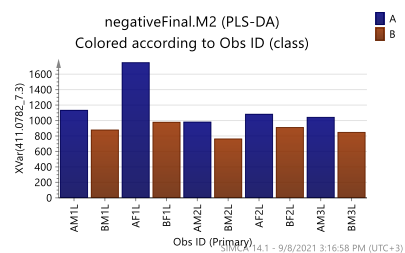
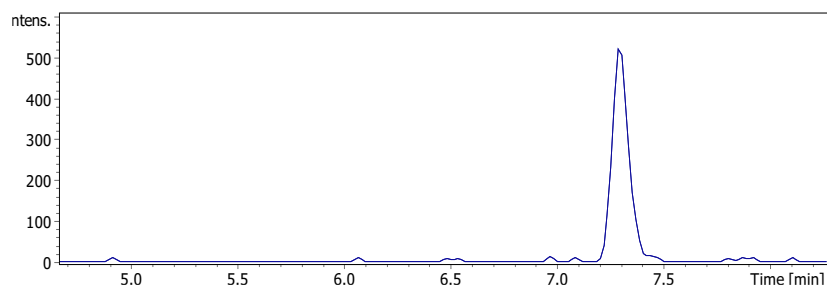
357.032_2.41

M8: m/z: 357.0632 RT: 2.41



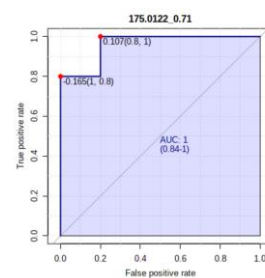
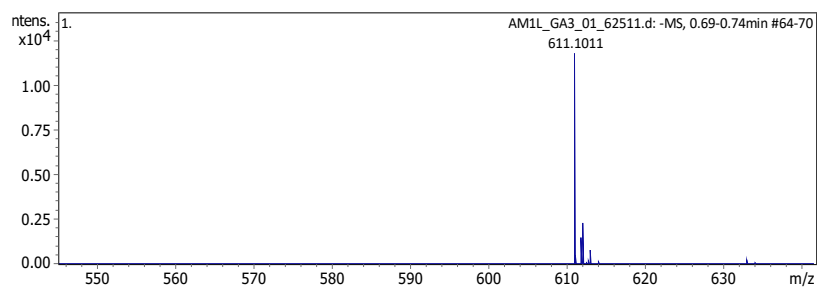
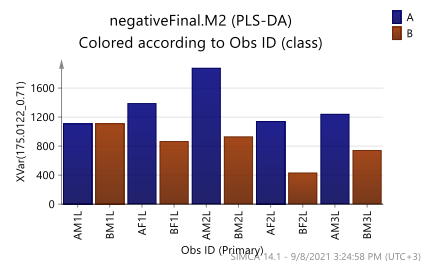
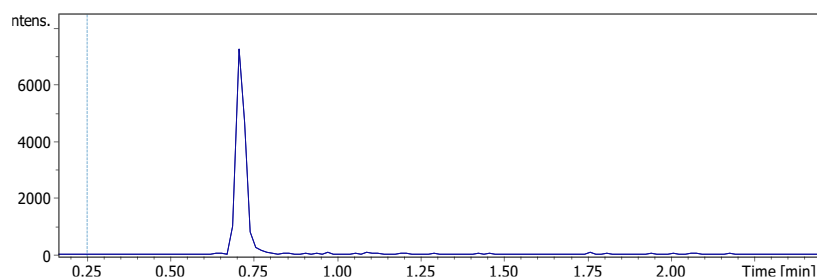
411.0782_7.30

M9: m/z: 411.0782 RT: 7.30



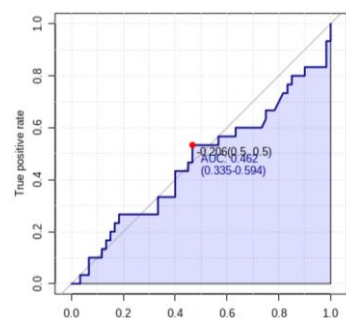
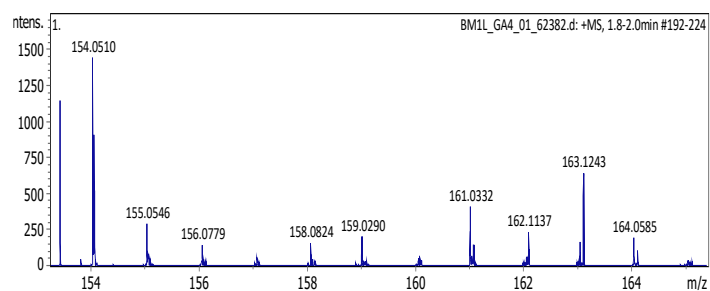
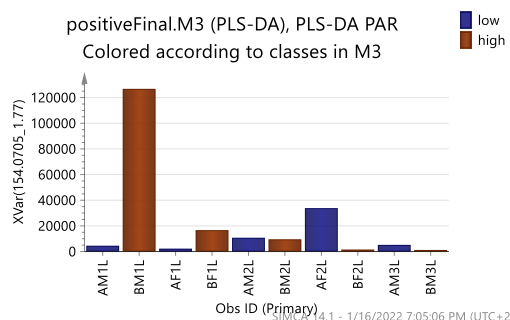
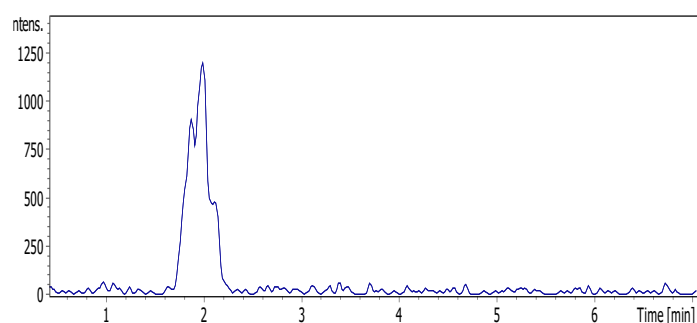
175.0122_0.71

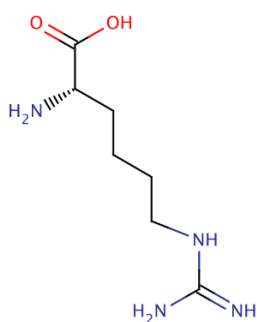
M10: m/z: 175.0122 RT: 0.71



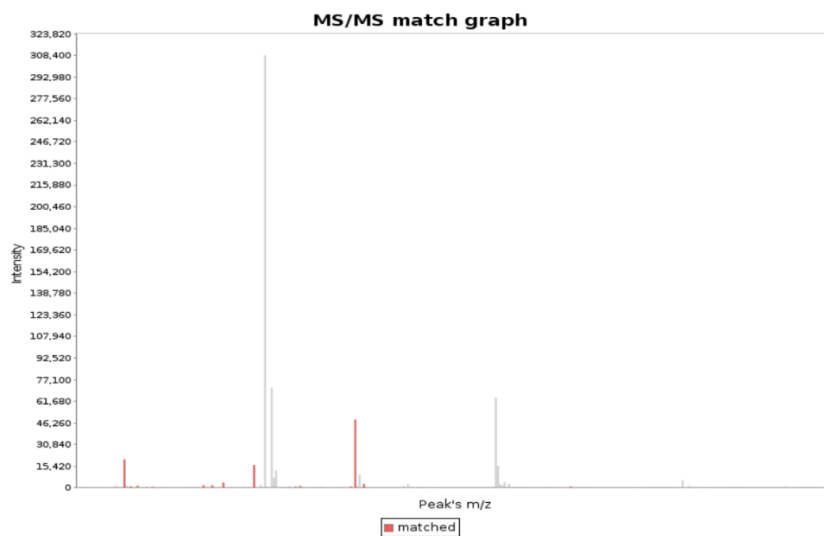
154.0705_1.77

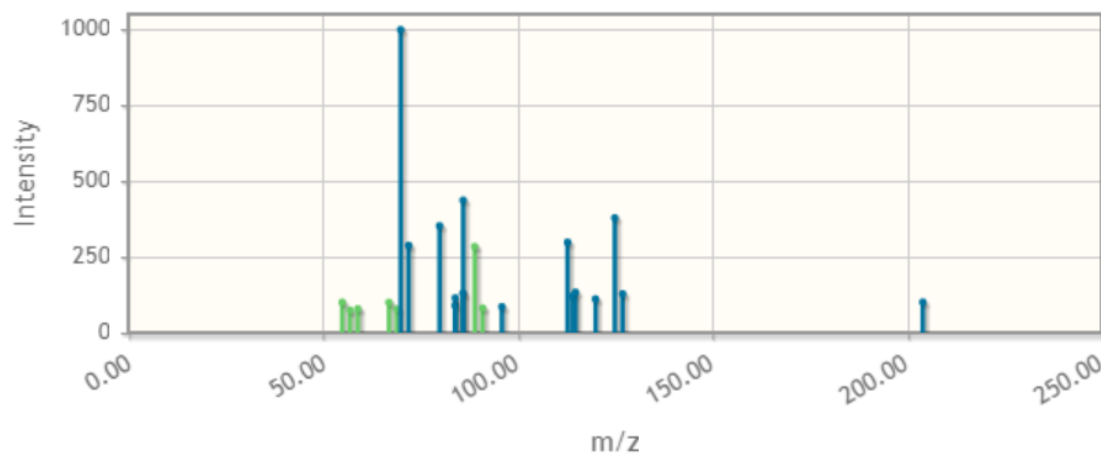
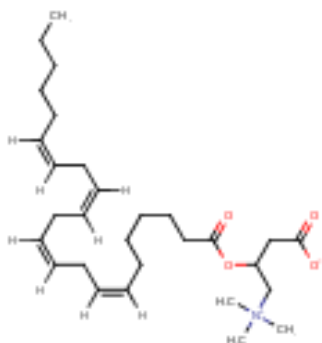
M11: m/z: 154.0705 RT: 1.77





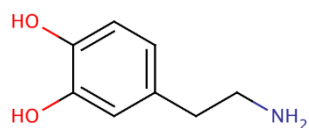
χημική δομή της L-ομοαργινίνης (Homo-L-arginine).



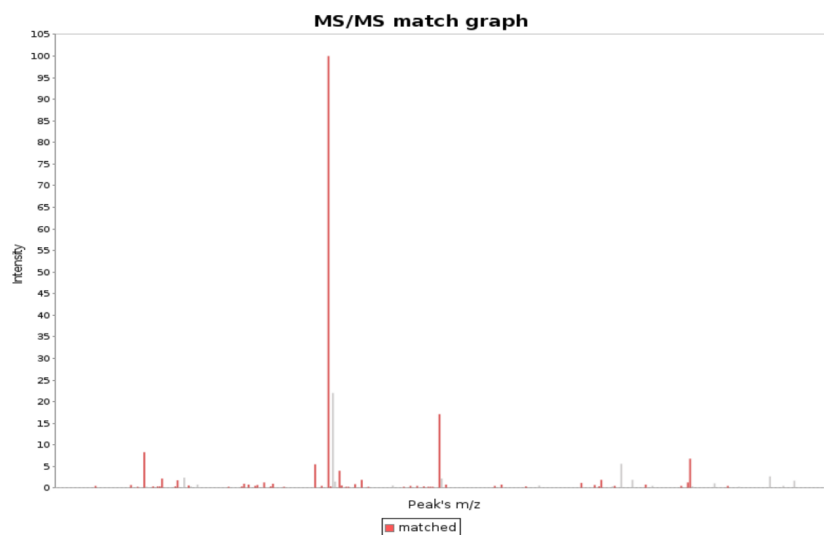


χημική δομή της
(7Z,10Z,13Z,16Z)-
Docosatetraenoylcarnitine.

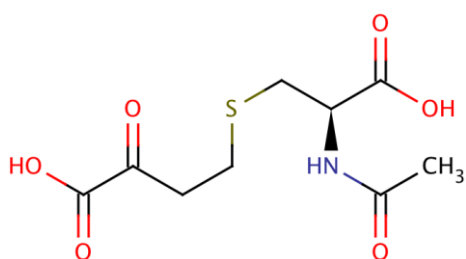
Σύγκριση του πειραματικού φάσματος μάζας MS/MS με το αντίστοιχο της βιβλιοθήκης
της (7Z,10Z,13Z,16Z)-Docosatetraenoylcarnitin



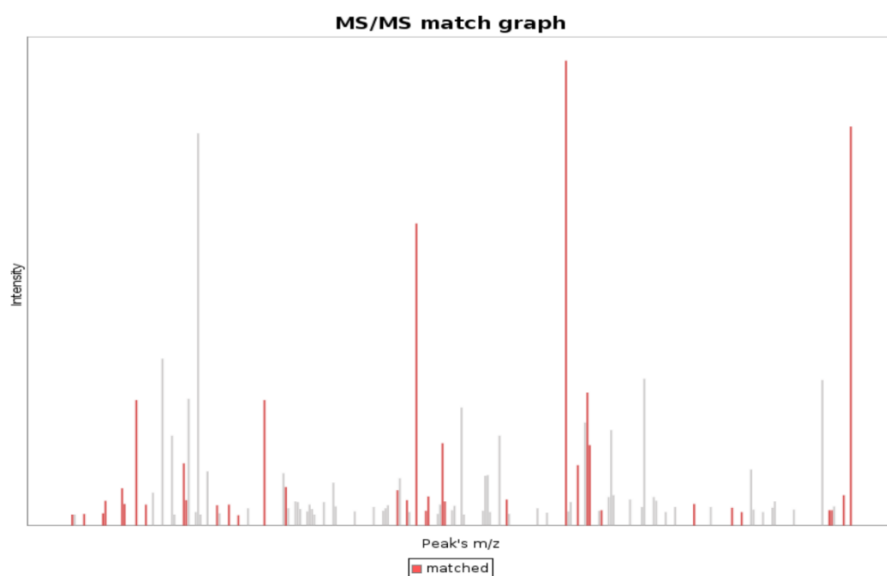
χημική δομή της
ντοπαμίνης (dopamine).



Σύγκριση του πειραματικού φάσματος μάζας MS/MS με το
αντίστοιχο της βιβλιοθήκης της ντοπαμίνης (dopamine).



χημική δομή N-ακετυλ-S- (3-οξο-3-καρβοξυ-η-προπυλ) κυστεΐνη (N-acetyl-S-(3-oxo-3-carboxy-n-propyl)cysteine)



Σύγκριση του πειραματικού φάσματος μάζας MS/MS με το αντίστοιχο της βιβλιοθήκης της N-ακετυλ-S- (3-οξο-3-καρβοξυ-η-προπυλ) κυστεΐνη (N-acetyl-S-(3-oxo-3-carboxy-n-propyl)cysteine).