



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΑΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ
ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ
ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΜΝΙΑΚΟΥ ΥΓΡΟΥ ΚΑΙ ΟΡΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ – ΧΡΥΣΟΒΑΛΑΝΤΟΥ ΧΑΤΖΗΩΑΝΝΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ
Α.Π.Θ.

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2014



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΕΑΕΚ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ
ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΤΑΜΕΙΟ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ



Η ΠΑΙΔΕΙΑ ΣΤΗΝ ΚΟΡΥΦΗ
Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Εκπαίδευσης και Αρχικής
Επαγγελματικής Κατάρτισης

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ
ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ
ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΜΝΙΑΚΟΥ ΥΓΡΟΥ ΚΑΙ ΟΡΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΧΡΥΣΟΒΑΛΑΝΤΟΥ ΧΑΤΖΗΩΑΝΝΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ Α.Π.Θ.

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: **Αν. Καθ. ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΘΕΟΔΩΡΙΔΗΣ**

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

- 1. Καθ. Ιωάννης Ν. Παπαδογιάννης**
- 2. Αν. Καθ. Γεώργιος Θεοδωρίδης**
- 3. Λέκτορας Ελένη Γκίκα**

Ακρώνυμο: EMBRYOMETABOLOMICS

Τίτλος: Η μεταβολομική ανάλυση ως διαγνωστικό εργαλείο βιωσιμότητας και ανάπτυξης των εμβρύων στην υποβοηθούμενη γονιμοποίηση και κατά την διάρκεια της κύησης.

«Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: ΘΑΛΗΣ. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.»



‘Στάλα τη στάλα το νερό
το μάρμαρο τρυπά το.
Το πράμα που μισεί κιανείς
γυρίζει κι αγαπά το.’

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η ερευνητική εργασία για την απόκτηση διπλώματος ειδίκευσης εκπονήθηκε στα πλαίσια του Διατμηματικού - Διαπανεπιστημιακού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών με τίτλο: «Χημική Ανάλυση – Έλεγχος Ποιότητας».

Το πειραματικό κομμάτι της εργασίας που αφορά τις μετρήσεις με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Ανάλυσης του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΕΙΕ) στην Αθήνα το Νοέμβριο του 2013. Οι αναλύσεις των φασματικών, κλινικών και διατροφικών δεδομένων, καθώς και η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκαν στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Παναγιώτη Ζουμπουλάκη του Εργαστηρίου Μοριακής Ανάλυσης του ΕΙΕ για την εκμάθηση της τεχνολογίας NMR, την παραχώρηση του οργάνου και την καθοδήγηση του καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματικών μετρήσεων. Επιπλέον, για την υπομονή, τις εύστοχες απαντήσεις στις απορίες μου και την πολύτιμη του βοήθεια κατά τα πρώτα μου βήματα στην ανάλυση μεταβολομικών δεδομένων με NMR ευχαριστώ τον Κωνσταντίνο Μπασκάκη. Για τον χρόνο και τις συμβουλές του όσον αφορά τη στατιστική ανάλυση ευχαριστώ τον Χαράλαμπο Φωτάκη. Τέλος, ευχαριστώ όλο τα παιδιά του Εργαστηρίου Μοριακής Ανάλυσης του ΕΙΕ για το φιλικό και οικείο κλίμα που έκαναν την διαδικασία των μετρήσεων τόσο ευχάριστη.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γεώργιο Θεοδωρίδη, για την ευκαιρία που μου έχει δώσει να εργαστώ σε θέματα μεταβολομικής τα τελευταία πέντε χρόνια, την υπόδειξη του παρόντος θέματος στα πλαίσια του έργου 'EMBRYOMETABOLOMICS' και της συνεργασίας με το Εργαστήριο του ΕΙΕ και για την επίβλεψη της εργασίας.

Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά τη Λέκτορα του τμήματος Χημικών Μηχανικών Α.Π.Θ. κα. Ελένη Γκίκα για την πολύτιμη βοήθεια και τις συμβουλές της σε θέματα μεταβολομικής και στατιστικής επεξεργασίας δεδομένων.

Ειδικές ευχαριστίες στον Δρ. Αλέξανδρο Πεχλιβάνη για τις πολύ χρήσιμες παρατηρήσεις του στα πλαίσια της ερευνητικής αυτής εργασίας και γενικότερα για τον τρόπο σκέψης του γύρω από θέματα μεταβολομικής και την αγάπη του για το αντικείμενο που μου έχει μεταδώσει μέσα από τις συζητήσεις και τη συνεργασία μας τα τελευταία χρόνια.

Ευχαριστώ ιδιαίτερω την επίκουρη καθηγήτρια Α.Π.Θ. του τμήματος Γεωπονίας κα. Αλεξάνδρα – Μαρία Μιχαηλίδου και την υποψήφια διδάκτορα Μαρία Φωτίου για όλη την προσπάθεια που κάνανε προκειμένου να οργανώσουν τις πληροφορίες που αφορούσαν τα δείγματα που αναλύθηκαν και την πολύτιμη ανταλλαγή απόψεων σε θέματα διατροφής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να δώσω σε όλα τα παιδιά/ερευνητές και τους ερευνητές/διοργανωτές του EMBO Practical Course on Metabolomics Bioinformatics for Life Scientists, για τις πολύωρες συζητήσεις σε θέματα μεταβολομικής, τόσο κατά τη ‘συγκατοίκηση’ μας όσο και αργότερα διαδικτυακά, και τους νέους ορίζοντες που μου έδειξαν.

Φυσικά, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το χρωστάω στους γονείς μου, Γιώργο και Φωτεινή, και στον αδερφό μου, Χρήστο, για την απόλυτη τους στήριξη τους σε κάθε στιγμή και απόφαση μου. Τέλος, χωρίς την θετική ενέργεια και την υποστήριξη ορισμένων στενών φίλων η εργασία αυτή δε θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί. Για το λόγο αυτό ευχαριστώ την Ελένη και την Αναστασία για την φιλοξενία και τις όμορφες στιγμές που μου χάρισαν κατά τη διαμονή μου στην Αθήνα, τη Δώρα, την Πολυξένη, την Κρυσταλένια, το Σάκη, την Ευγενία, τη Χρυσούλα, τη Δήμητρα

Χρυσοβαλάντου Αναστασία Χατζηγιάννου

Θεσσαλονίκη, Ιούνιος 2014

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	iv
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	vi
ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ	viii
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
ΚΕΦ. 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	2
1.1. <i>ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ</i>	2
1.2. <i>ΠΕΔΙΟ ΤΩΝ –OMICS ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟ(Λ/Ν)ΟΜΙΚΗ</i>	3
1.2.1. <i>Αναλυτικές Τεχνικές και Υποστρώματα</i>	6
ΚΕΦ. 2 ΠΥΡΗΝΙΚΟΣ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ	10
2.1. <i>ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ NMR [10] [11] [12]</i>	12
2.1.1. <i>Χημική Μετατόπιση και Κλίμακα δ</i>	14
2.1.2. <i>Φασματοόμετρο NMR και Μονοδιάστατη Φασματοσκοπία (1D) NMR</i>	18
ΚΕΦ. 3 ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ – ΠΟΛΥΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ	22
3.1. <i>ΛΟΓΙΣΜΙΚΑ ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΦΑΣΜΑΤΩΝ NMR</i>	22
3.2. <i>ΠΟΛΥΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ</i>	25
3.3. <i>ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ/ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΜΕ NMR</i>	30
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ	33
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	35
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	36
ΚΕΦ. 4 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	37
ΚΕΦ. 5 ΔΙΑΛΥΤΕΣ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	37
ΚΕΦ. 6 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ	38
6.1. <i>ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ</i>	38
6.2. <i>ΑΜΝΙΑΚΟ ΥΓΡΟ [1]</i>	39
ΚΕΦ. 7 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ	42
7.1. <i>ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ</i>	42
7.2. <i>ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΛΕΠΤΟΜΕΡΕΙΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ NMR</i>	46
ΚΕΦ. 8 ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΛΗΦΘΕΝΤΩΝ ΦΑΣΜΑΤΩΝ [10], [11]	51
8.1. <i>ΣΤΟΙΧΙΣΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΕΝΩΣΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ</i>	51
8.2. <i>ΔΙΟΡΘΩΣΗ ΤΗΣ ΦΑΣΗΣ ΤΩΝ ΦΑΣΜΑΤΩΝ</i>	53
8.3. <i>ΔΙΟΡΘΩΣΗ ΤΗΣ ΒΑΣΙΚΗΣ ΓΡΑΜΜΗΣ</i>	56
8.4. <i>ΕΞΑΙΡΕΣΗ ΠΕΡΙΟΧΩΝ</i>	58
8.5. <i>ΣΤΟΙΧΙΣΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΕΩΝ ΦΑΣΜΑΤΩΝ [14]</i>	59
8.6. <i>ΜΕΙΩΣΗ ΔΙΑΣΤΑΣΕΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ</i>	62

8.7. ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΚΛΙΜΑΚΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ [15]	66
ΚΕΦ. 9 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ	69
9.1. ΠΟΛΥΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	69
9.1.1. Επιλογή μεθόδου κλιμακοποίησης δεδομένων	69
9.1.2. Υπόστρωμα αμνιακού υγρού	71
9.1.3. Υπόστρωμα ορού αίματος	84
9.2. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ	86
ΚΕΦ. 10 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	90
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ	92
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	94
ABSTRACT	96

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

1D: One-Dimensional

2D: Two-Dimensional

BMI: Body Mass Index, Δείκτης Μάζας Σώματος

CPMG: Carr – Purcell – Meiboom – Gill

DSA: 4,4-Dimethyl-4-silapentane-1-ammonium trifluoroacetate

DSS: 4,4-Dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid

FID: Free Induction Decay, Ελεύθερη Επαγωγική Απόσβεση

GC: Gas Chromatography, Αέριος Χρωματογραφία

GCxGC: Comprehensive Two – Dimensional Gas Chromatography, Δισδιάστατη Αέριος Χρωματογραφία

HAF: Human Amniotic Fluid, Αμνιακό Υγρό

MS: Mass Spectrometry, Φασματομετρία Μαζών

NMR: Nuclear Magnetic Resonance

OPLS: Orthogonal Projections to Latent Structures,

OPLS-DA: Orthogonal Projections to Latent Structures – Discriminant Analysis

PAR: Pareto Scaling

PCA: Principal Component Analysis, Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών

PLS: Partial Least Squares,

PLS-DA: Partial Least Squares – Discriminant Analysis

PQN: Probabilistic Quotient Normalization

SIMCA: Soft Independent Modeling of Class Analogy

TMS: Tetramethylsilane

TSP: Trimethylsilyl propionate

UV: Unit Variance, Διακύμανση Μονάδας

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦ. 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

Μεγάλο μέρος της Αναλυτικής Χημείας πραγματεύεται την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση ενός γνωστού ή αγνώστου δείγματος και αποσκοπεί στον προσδιορισμό των ενώσεων και των ουσιών που το απαρτίζουν. Αυτή η ανάλυση, από την εποχή της γέννησης της αναλυτικής χημείας μέχρι και τα πρόσφατα χρόνια, περιοριζόταν σε ταυτόχρονη μέτρηση και ταυτοποίηση περιορισμένου αριθμού ενώσεων κάθε φορά. Σε όλο αυτό το διάστημα, φυσικά, υπήρξαν βελτιώσεις και σημαντικά επιτεύγματα, τα περισσότερα από τα οποία περιστρέφονταν γύρω από την άρση παρεμποδίσεων κατά την προσπάθεια μέτρησης συγκεκριμένων ενώσεων. Πολύ σημαντική ώθηση στην ανάπτυξη και την πρόοδο της αναλυτικής χημείας δόθηκε από την ραγδαία εξέλιξη των ηλεκτρονικών υπολογιστών. Άμεση απόρροια αυτής της εξέλιξης, αποτέλεσε και εξακολουθεί να αποτελεί η ολοένα και μεγαλύτερη ανάπτυξη των φασματοσκοπικών τεχνικών. Με τη χρήση των φασματοσκοπικών τεχνικών και των συνεχώς αυξανόμενων δυνατοτήτων τους, τέθηκαν οι βάσεις για να ακολουθήσει η αναλυτική χημεία μια νέα, ολιστική προσέγγιση. Ο ολισμός (holism), όπως ονομάζεται αυτός ο τρόπος προσέγγισης, περιγράφεται από την πεποίθηση ότι τα μέρη ενός όλου είναι άρρηκτα συνδεδεμένα μεταξύ τους και μπορεί να περιγραφεί μόνο με αναφορά στο σύνολο του. Όπως εξηγεί ο Δρ. Νικόλας Α. Χρηστάκης «...τις τελευταίες δεκαετίες στόχος της επιστήμης ήταν να διασπαστεί ένα πρόβλημα σε μικρότερα τμήματα, επιδιώκοντας να το κατανοήσουμε. Και αυτό λειτουργεί έως κάποιο βαθμό...αλλά το να τοποθετήσουμε τα ευρήματα στην πραγματική τους θέση είναι δυσκολότερο εγχείρημα και συνήθως συμβαίνει αργότερα κατά την ανάπτυξη της επιστήμης...Θα μπορούσαμε να γνωρίζουμε τα πάντα σχετικά με τους απομονωμένους νευρώνες και να μην είμαστε σε θέση να πούμε πως λειτουργεί η μνήμη...» [1]. Η προσέγγιση αυτή, λοιπόν, ξεπερνάει πλέον τον στόχο του προσδιορισμού μιας περιορισμένης μερίδας ενώσεων που περιέχονται σε ένα δείγμα. Αντίθετα, θέτει ως στόχο τη συλλογή των περισσότερων δυνατών μη στοχευμένων πληροφοριών, ώστε να σχηματισθεί μια 'εικόνα' του δείγματος ως σύνολο. Οι τεχνολογικές καινοτομίες των τελευταίων χρόνων, θέτουν τις βάσεις για την εφαρμογή της ολιστικής ανάλυσης στην πράξη, επιτρέποντας τον

ταυτόχρονο προσδιορισμό μεγάλου αριθμού μεταβολιτών, διατηρώντας παράλληλα σε χαμηλά επίπεδα τον αριθμό των πειραμάτων που απαιτούνται για τον σκοπό αυτό.

Όταν όλες οι παραπάνω μελέτες αφορούν το χώρο των επιστημών ζωής στεγάζονται κάτω από το ευρύ πεδίο της βιολογίας συστημάτων (systems biology). Η βιολογία εντός του περιγραφόμενου πεδίου χάνει την κλασική της εφαρμογή στην μελέτη μεμονωμένων γονιδίων, κυττάρων κτλ. και την επακόλουθη προσπάθεια συσχέτισης των συμβάντων. Η ιδέα αυτή εγκαταλείπεται καθότι οι ληφθείσες πληροφορίες δεν δύναται να παράσχουν μια συνολική απεικόνιση της υγείας του ανθρώπου και να οδηγήσουν τελικά στην αντιμετώπιση σοβαρών ασθενειών. Αντιθέτως, στα πλαίσια της βιολογίας συστημάτων γνώσεις προερχόμενες από διαφορετικά επιστημονικά πεδία, όπως η βιολογία, η χημεία, τα μαθηματικά, η φυσική και η πληροφορική, συνθέτουν τη δόμηση ολόκληρου του μελετώμενου συστήματος. Αντιλαμβανόμαστε ότι είναι σχεδόν αδύνατο να αποδοθεί ένας ακριβής ορισμός του πεδίου, καθώς αποτελεί μια νέα φιλοσοφία στην θεώρηση της έρευνας κι όχι μια συγκεκριμένη εφαρμογή της.

1.2. ΠΕΔΙΟ ΤΩΝ –OMICS ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟ(Λ/Ν)ΟΜΙΚΗ

Η ιδέα πως τα βιολογικά υγρά ενός οργανισμού μπορεί να δώσουν μια εικόνα της υγείας του οργανισμού υπήρχε για πολλά χρόνια πριν την εμφάνιση του πεδίου της μεταβολομικής. Ωστόσο, η έλλειψη τεχνολογικού εξοπλισμού για την ανάλυση τέτοιων δειγμάτων, δεν επέτρεψε να γίνουν ιδιαίτερες μελέτες γύρω από την σκέψη αυτή. Τις δεκαετίες του '60 και '70, όταν οι αναλυτικές τεχνολογίες ξεκίνησαν να αναπτύσσονται ραγδαία, η ιδέα του προσδιορισμού του μεταβολικού προφίλ άρχισε να παίρνει σάρκα και οστά. Οι όροι μεταβονομική [2] και μεταβολομική [3] εμφανίστηκαν στα τέλη της δεκαετίας του '90 και στις αρχές του 2000 αντίστοιχα, κατ' αναλογία των όρων τρανσκριπτομική (transcriptomics) και πρωτεομική (proteomics) που προϋπήρχαν. Χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν την μελέτη του πλήρους συνόλου των μεταβολιτών (metabolome) που παράγονται ή είναι παρόντες σε ένα βιολογικό σύστημα. Η μεταβολομική/μεταβονομική ανάλυση χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο σε μελέτες που αφορούν την ολική χαρτογράφηση των μεταβολιτών

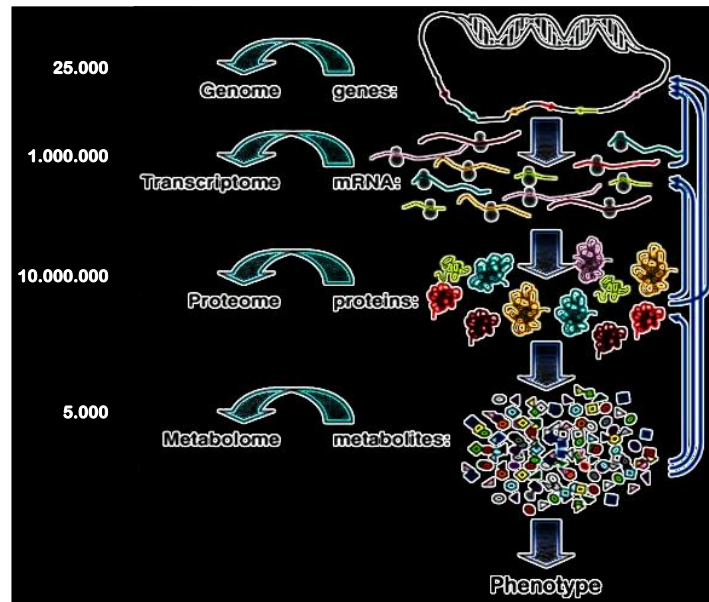
ενός οργανισμού, κυρίως φυτών και βιολογικών δειγμάτων. Πιο συγκεκριμένα, εφαρμογές της απαντώνται σε διατροφικές, περιβαλλοντολογικές και τοξικολογικές μελέτες, στις μεταβολικές επιδράσεις γενετικών τροποποιήσεων, στον έλεγχο εγγενών σφαλμάτων του μεταβολισμού, στη διάγνωση του διαβήτη, του καρκίνου, της παχυσαρκίας, ενώ η λίστα αυτή ολοένα και διευρύνεται. Συνήθως, οι δύο όροι (metabolomics/metabonomics) χρησιμοποιούνται αδιακρίτως, όταν υπάρχουν αναφορές στην ανάλυση ολικού προφίλ των μεταβολιτών σε ιστούς, βιολογικά υγρά (ούρα, πλάσμα/ορός αίματος, εγκεφαλονωτιαίο υγρό κ.α.) και κύτταρα, παρότι το ακριβές νόημα τους διαφέρει. Στη συνέχεια της παρούσας ερευνητικής εργασίας θα χρησιμοποιείται απλά ο όρος μεταβολομική, χάριν απλούστευσης και δεδομένου του γεγονότος ότι οι αναλυτικές διαδικασίες που ακολουθούνται είναι οι ίδιες και στις δύο περιπτώσεις. Ωστόσο, η μεταβολομική (metabolomics) αναφέρεται στην γρήγορη και υψηλής απόδοσης ανάλυση των μεταβολιτών που απαντώνται σε κάποιο οργανισμό (κύτταρα ή ιστοί φυτών και μικροοργανισμών), ενώ η μεταβονομική (metabonomics) αναφέρεται στον προσδιορισμό της απόκρισης των ζώντων οργανισμών σε φαρμακολογικές/τοξικολογικές μελέτες ή γενετικές τροποποιήσεις, λαμβάνοντας πληροφορίες από το σύνολο των μεταβολιτών του συστήματος που μελετάται. Ζητούμενο, δηλαδή, στον τομέα της μεταβονομικής είναι η επίτευξη διαχωρισμού μεταξύ δύο ή περισσότερων πληθυσμών με βάση κάποια χαρακτηριστικά τους, γενετικά ή επίκτητα. Είναι δυνατό να γίνει εφαρμογή της μεταβολομικής είτε ως στοχευμένη, είτε ως μη-στοχευμένη ανάλυση στην προσπάθεια εύρεσης βιολογικών δεικτών, των λεγόμενων βιοδεικτών. Συνήθη πρακτική για την απόκτηση σφαιρικής εικόνας για ένα σύστημα, αποτελεί η επιβολή ορισμένων διαταραχών σε αυτό και η παρακολούθηση των επιπτώσεων που αυτές επιφέρουν. Αυτός είναι κι ο λόγος που η μεταβολομική βρίσκεται σε στενή σύνδεση με το ευρύτερο πεδίο της βιολογίας συστημάτων.

Ως μεταβολίτες (metabolites) χαρακτηρίζονται οι μικρού μοριακού βάρους ενώσεις που παράγονται ή είναι ενδιάμεσες κατά τον μεταβολισμό χημικών ενώσεων. Ως επί τω πλείστον πρόκειται για οργανικές ενώσεις, όπως υδρογονάνθρακες, βιταμίνες, αμινο- και λιπαρά οξέα. Οι μεταβολίτες διακρίνονται σε πρωτογενείς (κύριοι) και δευτερογενείς (δευτερεύοντες). Ένας κύριος μεταβολίτης συμμετέχει άμεσα στη φυσιολογική αύξηση, ανάπτυξη και αναπαραγωγή ενός ζώντος οργανισμού. Μερικά

παραδείγματα κύριων μεταβολιτών είναι το γλουταμινικό οξύ, το ασπαρτικό οξύ και η αιθανόλη. Αντίθετα, ένας δευτερογενής μεταβολίτης δεν εμπλέκεται άμεσα σε αυτές τις διαδικασίες, αλλά μπορεί να παρουσιάζει σημαντική βιολογική δράση, αφού συμμετέχει σε αμυντικούς μηχανισμούς του οργανισμού και σε μηχανισμούς διαμόρφωσης μορφολογικών και αναπαραγωγικών χαρακτηριστικών. Παραδείγματα δευτερευόντων μεταβολιτών είναι τα αλκαλοειδή, τα φλαβονοειδή και οι χρωστικές ουσίες. Ένας άλλος τρόπος κατάταξης των μεταβολιτών είναι η διάκριση τους σε ενδογενείς και εξωγενείς ως προς τον οργανισμό. Αντιλαμβανόμαστε, λοιπόν, ότι, εξαιτίας της πληθώρας των μεταβολιτών, είναι αδύνατο να υπολογιστεί με ακρίβεια το σύνολο τους, καθώς παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των διαφορετικών οργανισμών, αλλά ακόμα και μεταξύ των διαφορετικών ιστών και βιολογικών υγρών του ίδιου οργανισμού. Επιπλέον, ο υπολογισμός του συνόλου των μεταβολιτών επηρεάζεται και από παράγοντες εξωγενείς ως προς τον οργανισμό (π.χ. διατροφή). Αυτοί είναι, άλλωστε, και οι λόγοι, οι οποίοι καθιστούν την ολική χαρτογράφηση των μεταβολιτών ενός οργανισμού ιδιαίτερα δύσκολη υπόθεση. Στους παραπάνω περιορισμούς έρχονται να προστεθούν και άλλοι που μπορεί να οφείλονται στην αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται, στις συνθήκες ανάλυσης που εφαρμόζονται, στον τρόπο συλλογής και προκατεργασίας των δειγμάτων, καθώς και μια πληθώρα άλλων παραγόντων. Θεωρείται απαραίτητο και κρίσιμο να επιχειρηθεί η πρόβλεψη των περισσότερων δυνατών τέτοιων παραγόντων κατά τη διεξαγωγή μιας ολιστικής ανάλυσης για τον προσδιορισμό του συνολικού μεταβολικού προφίλ ενός μελετώμενου συστήματος, ώστε οι διαφοροποιήσεις που τυχόν παρατηρούνται να είναι αποτέλεσμα μόνο του παράγοντα που μελετάται.

Παρά τις παραπάνω δυσκολίες και περιορισμούς, κρίνεται πως η μεταβολομική αποτελεί ένα συνεχώς αναπτυσσόμενο πεδίο, με ολοένα και μεγαλύτερο ερευνητικό ενδιαφέρον. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας του γεγονότος ότι συγκριτικά με τους «συγγενείς» της στο πεδίο των -omics, η μεταβολομική βρίσκεται πλησιέστερα στην πραγματικότητα όσο αφορά στην υγεία του ατόμου. Αυτό φαντάζει λογικό αν αναλογιστούμε ότι περί τις εικοσιπέντε χιλιάδες γονίδια, παράγουν ένα εκατομμύριο μηνύματα, τα οποία μεταφράζονται σε δέκα εκατομμύρια πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες/ένζυμα συμμετέχουν σε πληθώρα χημικών αντιδράσεων παράγοντας ως προϊόντα τους μεταβολίτες. Σε αυτές τις τελικές ενώσεις βρίσκεται αποτυπωμένη η

πραγματική κατάσταση του οργανισμού ως σύνολο [3]. Γίνεται, λοιπόν, αντιληπτός ο λόγος που η μεταβολομική απασχολεί τόσο έντονα τους επιστήμονες τα τελευταία χρόνια (Σχ. 1.1).



Σχήμα 1.1. Σχηματική απεικόνιση του πεδίου των *-omics*. Η πορεία της πληροφορίας κατευθύνεται από τα γονίδια στους μεταβολίτες, μέσω των μεταγραφικών παραγόντων και των πρωτεϊνών. Τα κάθετα βέλη δείχνουν αλληλεπιδράσεις που ρυθμίζουν τις αντίστοιχες εκφράσεις κάθε επιπέδου [4].

1.2.1. Αναλυτικές Τεχνικές και Υποστρώματα

Τα βασικά τεχνολογικά ‘εργαλεία’ που εξυπηρετούν την ολιστική ανάλυση του μεταβολικού προφίλ ενός οργανισμού από αναλυτικής άποψης είναι οι φασματοσκοπικές τεχνικές υψηλής διακριτικής ικανότητας, και πιο συγκεκριμένα η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και οι συνδυασμένες τεχνικές αέριας χρωματογραφίας με φασματομετρία μαζών (GC/MS) και υγρής χρωματογραφίας με φασματομετρία μαζών (LC/MS). Κατά την ανάλυση πολύπλοκων βιολογικών δειγμάτων, κάθε μια από τις τρεις αυτές τεχνικές εμφανίζουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Αναφέρεται χαρακτηριστικά η ανάγκη παραγωγοποίησης ενός βιολογικού δείγματος για την εισαγωγή του στον αέριο χρωματογράφο, διαδικασία που καθυστερεί σημαντικά την προκατεργασία και κατ’

επέκτασιν της ανάλυσης του δείγματος. Γενικά η μεταβολομική ανάλυση με GC-MS και LC-MS είναι περισσότερο χρονοβόρα και αυξάνει το κόστος της ανάλυσης, καθώς χρησιμοποιούνται περισσότερα ή/και ακριβότερα αντιδραστήρια. Τα μειονεκτήματα έρχονται να αντισταθμιστούν από την υψηλότερη ευαισθησία των τεχνικών αυτών, συγκριτικά με την ανάλυση με χρήση NMR. Οδηγούμαστε, επομένως, σε ανίχνευση μεταβολιτών στο δείγμα που βρίσκονται σε χαμηλότερα επίπεδα από το όριο ανίχνευσης του NMR. Από την άλλη μεριά, το NMR έχει χαμηλότερες απαιτήσεις κατά την προκατεργασία των δειγμάτων και αποτελεί ίσως τη μοναδική μη καταστροφική τεχνική από τις εφαρμοζόμενες στην μεταβολομική ανάλυση. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι το δείγμα έπειτα από την ανάλυση με NMR δύναται να επαναχρησιμοποιηθεί και να αναλυθεί με οποιονδήποτε άλλο τρόπο. Επιπλέον μοναδικό χαρακτηριστικό του NMR αποτελεί το γεγονός ότι παρέχει απόλυτη ποσοτικοποίηση, ενώ τα πειράματα που εκτελούνται σε αυτό είναι απολύτως αναπαραγώγιμα [5]. Παρέχοντας τη δυνατότητα μη-στοχευμένη ανάλυσης, θα λέγαμε ότι αποτελεί την πλέον αμερόληπτη τεχνική στην μεταβολομική. Πάντως, είναι εξαιρετικά σημαντική η προσεκτική επιλογή της αναλυτικής τεχνικής που θα εφαρμοστεί σε μια ανάλυση, καθώς είναι ικανή να οδηγήσει τους ερευνητές σε μια πολύ καλή πρώτη εικόνα του μεταβολικού προφίλ, πλούσια σε πληροφορία για τους εμπλεκόμενους βιοχημικούς κύκλους και σε περαιτέρω πιο επικεντρωμένες μελέτες.

Προκειμένου να αποφευχθούν ορισμένα μειονεκτήματα των τριών ‘παραδοσιακών’ τεχνικών αλλά και στην προσπάθεια αναζήτησης της βέλτιστης τεχνικής στο πεδίο της μεταβολομικής, τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο, κι άλλες νεότερες, όπως είναι η αέρια χρωματογραφία δύο διαστάσεων (GCxGC), η υγρή χρωματογραφία υψηλής και υπερυψηλής απόδοσης (HPLC-UPLC), η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE) και η φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR). Αποτέλεσμα των αναλύσεων με κάθε μια από τις παραπάνω τεχνικές είναι η δημιουργία τεράστιου όγκου και γεμάτα πληροφορίες αναλυτικά δεδομένα, καθώς απαιτείται πειραματικός σχεδιασμός που να προβλέπει ανάλυση σχετικά μεγάλου αριθμού βιολογικών δειγμάτων. Επιπλέον πρόκληση κατά τη διαχείριση αυτών των δεδομένων αποτελεί η χημική πολυπλοκότητα και η ετερογένεια των μεταβολιτών [3]. Τα ληφθέντα, λοιπόν, ‘πολυδιάστατα’ δεδομένα επεξεργάζονται με χημειομετρικές αναλύσεις και προηγμένα υπολογιστικά/στατιστικά εργαλεία (πολυπαραμετρική

στατιστική ανάλυση), προκειμένου να επιτευχθεί η βέλτιστη άντληση των πληροφοριών μέσα από τα δεδομένα. Τέτοια εργαλεία είναι οι τεχνικές Principal Components Analysis (PCA) και Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA), που εφαρμόζονται κυρίως στην ανάλυση και επεξεργασία δεδομένων ‘omics’. Ωστόσο, όποια στατιστική επεξεργασία κι αν εφαρμοστεί δε θα επιφέρει κανένα ουσιαστικό αποτέλεσμα, εάν κατά τον σχεδιασμό των πειραμάτων που προηγήθηκαν δεν λήφθησαν υπόψιν όλες οι παράμετροι που δυνητικά θα μπορούσαν να επηρεάσουν την έκβαση της μελέτης και κατά την εκτέλεση τους δεν αφιερώθηκε η απαραίτητα προσοχή.

Τα πλέον συνήθη χρησιμοποιούμενα υποστρώματα σε μελέτες μεταβολομικής αποτελούν τα βιολογικά υγρά που είναι εύκολο να ληφθούν από τους οργανισμούς, δηλαδή ούρα και αίμα με τη μορφή του πλάσματος ή του ορού. Τα δύο αυτά υποστρώματα παρέχουν πολύ διαφορετικές πληροφορίες για το βιολογικό σύστημα που αντιπροσωπεύουν. Το αίμα αποτελεί ένα «στιγμιότυπο» του οργανισμού ακριβώς τη στιγμή που έγινε η αιμοληψία. Αντιθέτως, τα ούρα θα μπορούσαν να περιγραφούν με αντίστοιχους όρους ως μια «φωτογραφία μακράς έκθεσης». Οι πληροφορίες που εμπεριέχονται σε αυτή τη φωτογραφία είναι φυσιολογικές, γενετικές, περιβαλλοντικές και διατροφικές. Γίνεται, λοιπόν, αντιληπτό πως η μελέτη και των δύο αυτών βιολογικών δειγμάτων αποδίδει μια περισσότερο ολοκληρωμένη απεικόνιση του τρόπου λειτουργίας του υπό μελέτη συστήματος. Ωστόσο, δεν θα πρέπει να θεωρηθεί πως μόνο τα δύο αυτά υποστρώματα παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες. Γίνεται ιδιαίτερος λόγος για αυτά προκειμένου να καταστεί κατανοητή η σημασία της συλλογής, κατά το δυνατό, περισσότερων πληροφοριών για ένα σύστημα. Αυτός είναι κι ο λόγος για τον οποίο έχουν παρουσιαστεί στη διεθνή βιβλιογραφία μελέτες μεταβολομικής ανάλυσης σε πληθώρα υποστρωμάτων, τόσο βιολογικών υγρών και υλικών (ιστοί, κόπρανα, αμνιακό υγρό, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, θρεπτικά υλικά κ.α.), όσο και μη βιολογικών (οίνοι, προϊόντα γάλακτος κ.α.). Συλλέγοντας τις πληροφορίες που δίνει καθένα από αυτά, η ολική εικόνα του συστήματος συναρμολογείται, πλησιάζοντας πιο κοντά στην ολική χαρτογράφηση.

Συνοψίζοντας, θα μπορούσαμε να πούμε, ότι το μεγάλο πλεονέκτημα του πεδίου της μεταβολομικής είναι η δυνατότητα συλλογής μεταβολικών πληροφοριών, που παρέχει, συχνά με τρόπο μη επεμβατικό. Αυτό πρακτικά σημαίνει, σε επίπεδο ασθενών

ή ευαίσθητων ατόμων, ότι καθίσταται δυνατή η παρακολούθηση αυτών σε βάθος χρόνου και ο έλεγχος, για παράδειγμα, της πορείας κάποιας ασθένειας. Αυτός, άλλωστε, είναι κι ο ρόλος ο οποίος καλείται να διαδραματίσει η μεταβολομική τα επόμενα χρόνια. Μέσω της μελέτης των μεταβολικών αποτυπωμάτων ανθρώπων, ζώων και φυτών, να επιτευχθεί η κατανόηση των αιτιών και των συνθηκών που ευθύνονται για την εμφάνιση ασθενειών, ενώ ταυτόχρονα να παρακολουθηθούν οι επιπτώσεις των θεραπειών, των διατροφικών συνηθειών και των περιβαλλοντικών συνθηκών στα συστήματα αυτά.

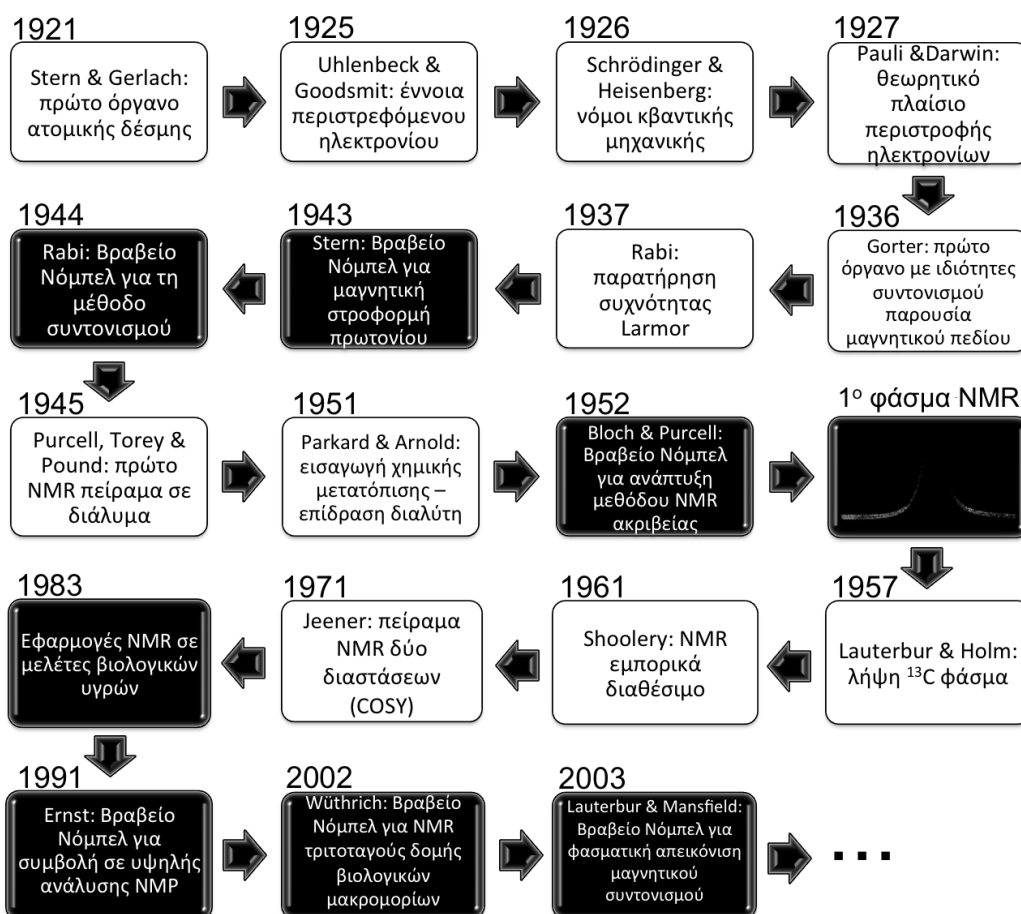


Σχήμα 1.2. Απεικόνιση του ίδιου τοπίου ως μια φωτογραφίας μακράς έκθεσης (*long exposure shot*) και ενός στιγμιότυπου (*snapshot*), ώστε να γίνει κατανοητή η διαφορά της πληροφορίας που φέρουν τα υποστρώματα ούρα και αίμα (απεικόνιση του Αστεροσκοπείου του Πανεπιστημίου Κρήτης (Σκίνακας) – Ψηλορείτης, Κρήτη) [6].

ΚΕΦ. 2 ΠΥΡΗΝΙΚΟΣ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ

Λαμβάνοντας υπόψιν τα μέχρι στιγμής υπάρχοντα τεχνολογικά μέσα, θα λέγαμε πως είναι τεχνικώς αδύνατο να πραγματοποιηθεί μια πλήρης μεταβολομική ανάλυση, καθώς καμιά ή ακόμα και κανένας συνδυασμός αναλυτικών τεχνικών δεν είναι αρκετά ευαίσθητος και εκλεκτικός, ώστε να καταστήσει δυνατή τη μέτρηση όλων των περιεχόμενων μεταβολιτών ενός συστήματος [7]. Αυτό που μπορούμε να επιτύχουμε με τις πιο ισχυρές υπάρχουσες τεχνικές είναι να δημιουργήσουμε το μεταβολικό προφίλ αυτών. Το NMR αποτελεί μια από τις πιο αξιόπιστες για το σκοπό αυτό τεχνικές, παρέχοντας εξαιρετικά υψηλή αναπαραγωγικότητα κι επαναληψιμότητα. Η αναπαραγωγικότητα της τεχνολογίας αυτής δεν αφορά μόνο τη σταθερότητα των φασμάτων μεταξύ των δειγμάτων ή των ημερών κατά τις οποίες λήφθηκαν, αλλά από εργαστήριο σε εργαστήριο και μεταξύ διαφορετικών οργάνων. Επιπλέον, τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο στη μεταβολομική είναι δυνατό να αναλυθούν χωρίς ιδιαίτερη προκατεργασία διαχωρισμού ή παραγωγοποίησης και διατηρώντας, με τον τρόπο αυτό, τις εγγενείς ιδιότητες του δείγματος. Επιπλέον, σε αρκετές περιπτώσεις, ο χρόνος ανάλυσης είναι μικρός. Οι ολοένα και σημαντικότερες βελτιώσεις που λαμβάνουν χώρα στο πεδίο του NMR, ξεκινώντας από την εφαρμογή υπεραγωγίων μαγνητών μέχρι την πρόσφατη επίτευξη ισχυρότερων μαγνητικών πεδίων και την εισαγωγή των κρυογονικών υποδοχέων δείγματος (probe) και νέων παλμών, έδωσαν τεράστια ώθηση στην αύξηση της ευαισθησίας και την βελτίωση της αναλυτικής ικανότητας της τεχνικής. Πλέον το όριο ανίχνευσης ενός μεταβολίτη είναι της τάξης των μM . Παρά τις πολύ μεγάλες βελτιώσεις που έχουν συντελεστεί στην τεχνική του NMR, εξακολουθεί να υστερεί σε σχέση με τη φασματοσκοπία μαζών σε ευαισθησία. Ωστόσο, ας μην ξεχνάμε ότι πλέον είναι δυνατή η αύξηση της ευαισθησίας και της διαχωριστικής ικανότητας με αύξηση της ισχύος του μαγνητικού πεδίου. Τα υψηλότερα μαγνητικά πεδία που έχουν επιτευχθεί μέχρι στιγμής είναι της τάξης του 1GHz, αλλά οι περισσότερες μεταβολομικές μελέτες πραγματοποιούνται σε όργανα 500 ή 600 MHz. Εξάλλου, συγκριτικές μεταβολομικές μελέτες σε όργανα 250, 400, 500 και 800 MHz έχουν δείξει πως οι ίδιοι μεταβολίτες ανιχνεύονται και στα τέσσερα εφαρμοζόμενα μαγνητικά πεδία και οι παρατηρούμενες διαφορές ως προς την ικανότητα πρόβλεψης είναι υπαρκτή στα πεδία 250 με 500 MHz, ενώ μεταξύ των

πεδίων 500 και 800 MHz η επίδραση δεν είναι τόσο έντονη [8]. Επιπλέον, ορισμένα πλεονεκτήματα, όπως η απόλυτη ποσοτικοποίηση που παρέχει, η υψηλή επαναληψιμότητα και η μη απαίτηση για εκ των προτέρων γνώση των ενώσεων που περιέχονται στο δείγμα (μη-στοχευμένη ανάλυση), καθιστούν το NMR μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές σε μεταβολομικές μελέτες. Αξίζει, στο σημείο αυτό, να αναφερθεί ότι τα δεδομένα που προέρχονται από την τεχνική NMR εμφανίζουν μια σχετική ευκολία στο χειρισμό, συγκριτικά με δεδομένα προερχόμενα από άλλες τεχνικές, καθώς χαρακτηρίζονται από δύο διαστάσεις, την ένταση του σήματος και τη χημική μετατόπιση. Αντίθετα, δεδομένα προερχόμενα από χρωματογραφική τεχνική συνδυασμένη με MS χαρακτηρίζονται από τουλάχιστον τρεις διαστάσεις (ένταση σήματος, μάζα και χρόνος).



Σχήμα 2.1. Κομβικά σημεία κατά την ιστορική εξέλιξη του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού από την εμφάνιση της τεχνικής μέχρι τις πιο πρόσφατες εξελίξεις [9].

2.1. ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ NMR [10] [11] [12]

Η φασματοσκοπία του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) αποτελεί μια φασματοσκοπία πυρήνων (Nuclear), η οποία χρησιμοποιεί έναν μεγάλο μαγνήτη (Magnetic) για να εξετάσει τις εγγενείς ιδιότητες αυτοστροφορμής των ατομικών πυρήνων. Όπως συμβαίνει σε όλες τις φασματοσκοπικές τεχνικές, όπου βασιζόμαστε σε διαφορές του τρόπου με τον οποίο τα μόρια απορροφούν την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, το NMR χρησιμοποιεί ένα τμήμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (κύματα ραδιοσυχνότητας) για να προκαλέσει μετάβαση των πυρήνων σε ανώτερα ενεργειακά επίπεδα (Resonance). Κατά την αποδιέγερση από τα ενεργειακά αυτά επίπεδα λαμβάνεται το σήμα.

Η στροφορμή (P) ενός πυρήνα, κατά την κβαντομηχανική, εξαρτάται από το πυρηνικό spin I ως εξής:

$$P = \hbar \cdot I \quad \text{ή} \quad (2.1)$$

$$P = \hbar \sqrt{I(I+1)} \quad (\hbar = \frac{h}{2\pi}) \quad (2.2)$$

όπου I είναι ο κβαντισμένος αριθμός του spin του πυρήνα και προκύπτει από το συνδυασμό των spin των πρωτονίων και των νετρονίων του πυρήνα. Οι δυνατές τιμές του I είναι μηδέν, ακέραιες ή ημιπεριττές ($0, \frac{1}{2}, 1, \frac{3}{2}, \dots$). Το πλήθος των δυνατών προσανατολισμών του P σε σχέση με την κατεύθυνση του πεδίου είναι:

$$m_l = 2I + 1 \quad (2.3)$$

Εκτός της αυτοστροφορμής (P) που εμφανίζουν πολλοί πυρήνες, λόγω του φορτίου του πυρήνα προκαλείται δημιουργία ενός μικροσκοπικού μαγνητικού διπόλου. Το μέγεθος αυτού εκφράζεται με την πυρηνική μαγνητική ροπή (μ). Στροφορμή και μαγνητική ροπή συνδέονται με τη σχέση:

$$\mu = g \frac{e \cdot \hbar}{2 \cdot m \cdot c} I \quad (2.4)$$

όπου e είναι το φορτίο και m η μάζα του πρωτονίου, ενώ c η ταχύτητα του φωτός. Το g αποτελεί μια σταθερά που ονομάζεται πυρηνικός παράγοντας και είναι ανάλογη του παράγοντα Landé των ηλεκτρονίων. Ισχύει, επιπλέον, για την μαγνητική ροπή η σχέση:

$$\boldsymbol{\mu} = \boldsymbol{\gamma} \cdot \mathbf{P} \quad \text{ή} \quad \boldsymbol{\mu} = \boldsymbol{\gamma} \cdot \hbar \cdot \mathbf{I} \quad (2.5)$$

όπου γ μια σταθερά αναλογίας γνωστή ως γυρομαγνητικός λόγος χαρακτηριστικής τιμής για κάθε πυρήνα.

Τα δύο μεγέθη μ και P είναι παράλληλα και ανυσματικά, τυχαίων προσανατολισμών εκτός μαγνητικού πεδίου (εκφυλισμένες καταστάσεις). Εντός, όμως, ομογενούς μαγνητικού πεδίου εντάσεως B_0 η στροφορμή λαμβάνει κβαντισμένες τιμές περιγραφόμενες από την εξίσωση (1). Οι προσανατολισμοί αυτοί διαφέρουν μεταξύ τους κατά ποσό ενέργειας E , η οποία αποτελεί συνάρτηση της έντασης πεδίου B_0 :

$$E = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{B}_0 \cdot \cos\theta \quad \text{ή} \quad E = -\boldsymbol{\gamma} \cdot \hbar \cdot \mathbf{I} \cdot \mathbf{B}_0 \quad (2.6)$$

όπου θ χαρακτηρίζουμε τη γωνία που σχηματίζει ο άξονας περιστροφής (spin) με τη διεύθυνση του πεδίου B_0 . Στην περίπτωση παράλληλου ($\theta=0^\circ$) ή αντιπαράλληλου ($\theta=180^\circ$) προσανατολισμού έχουμε:

$$E_0 = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{B}_0 \quad \text{και} \quad E_{180} = \boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{B}_0 \quad (2.7)$$

Να σημειωθεί ότι η ένταση του μαγνητικού πεδίου που εφαρμόζεται εκφράζεται με τη μαγνητική επαγωγή (B), η οποία μετράται σε μονάδες Gauss (G) ή Tesla (T), όπου $1 \text{ T} = 10^4 \text{ G}$.

Απαραίτητη προϋπόθεση για την ύπαρξη του φαινομένου του συντονισμού αποτελεί η συνθήκη $I \neq 0$. Σε περίπτωση που το $I=0$ το σύστημα βρίσκεται σε

κατάσταση ενέργειας όμοια με αυτή που επικρατεί εκτός πεδίου. Πυρήνες με άρτιο μαζικό κι άρτιο ατομικό αριθμό έχουν $I=0$ (π.χ. $^{12}_6\text{C}$, $^{16}_8\text{O}$, $^{32}_{16}\text{S}$), και κατά συνέπεια δεν δίνουν φάσματα NMR. Πυρήνες με άρτιο μαζικό και περιττό ατομικό έχουν $I=1,2,3\dots$ (π.χ. ^2_1H , $^{14}_7\text{N}$), ενώ πυρήνες με περιττό μαζικό και περιττό ατομικό αριθμό έχουν $I=1/2, 3/2, 5/2\dots$ (π.χ. ^1_1H , $^{13}_6\text{C}$, $^{15}_7\text{N}$, $^{19}_9\text{F}$).

Η λήψη των φασμάτων NMR οφείλεται σε διεγέρσεις μαγνητικών πυρήνων μεταξύ γειτονικών σταθμών ενέργειας $\Delta I=\pm 1$ (κανόνας επιλογής) με την συχνότητα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας ν που αντιστοιχεί στη διαφορά ενέργειας ΔE να βρίσκεται στην περιοχή των βραχέων ραδιοκυμάτων:

$$\Delta E = h \cdot \nu = \frac{\mu \cdot B_0}{I} = \gamma \cdot \hbar \cdot B_0 \quad (2.8)$$

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για διάφορους κλάδους της Χημείας και για τις μελέτες μεταβολομικής παρουσιάζουν τα φάσματα των πυρήνων υδρογόνου (^1H NMR). Τα φάσματα αυτά προτιμώνται καθώς το υδρογόνο είναι το πιο συχνά απαντώμενο στοιχείο στις οργανικές ενώσεις μετά τον άνθρακα. Επιπλέον, εξαιτίας του γεγονότος ότι διαθέτει spin $1/2$ δίνει φάσματα απλά, πλούσια σε πληροφορία και εύκολα στην λήψη τους. Φυσικά, σε αρκετές περιπτώσεις είναι χρήσιμο να λαμβάνονται επιπλέον συμπληρωματικές πληροφορίες από φάσματα ^{13}C NMR και άλλων πυρήνων.

2.1.1. Χημική Μετατόπιση και Κλίμακα δ

Από τις πληροφορίες της προηγούμενης ενότητας ίσως δημιουργείται η εντύπωση ότι όλοι οι πυρήνες ^1H ενός μορίου απορροφούν ενέργεια στην ίδια συχνότητα, όπως και όλοι οι πυρήνες ^{13}C κ.ο.κ.. Από την εμπειρία μας, ωστόσο, διαπιστώνουμε ότι τα φάσματα NMR δεν αποτελούνται από μία και μοναδική ταινία απορρόφησης. Όλοι οι πυρήνες των μορίων περιβάλλονται από ηλεκτρόνια. Όταν ασκηθεί ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο σε κάποιο μόριο, τα ηλεκτρόνια δημιουργούν τα δικά τους μικροσκοπικά τοπικά μαγνητικά πεδία. Αυτά τα τοπικά μαγνητικά πεδία δρουν αντίθετα προς το εφαρμοζόμενο πεδίο, έτσι ώστε το πραγματικό πεδίο στον πυρήνα να

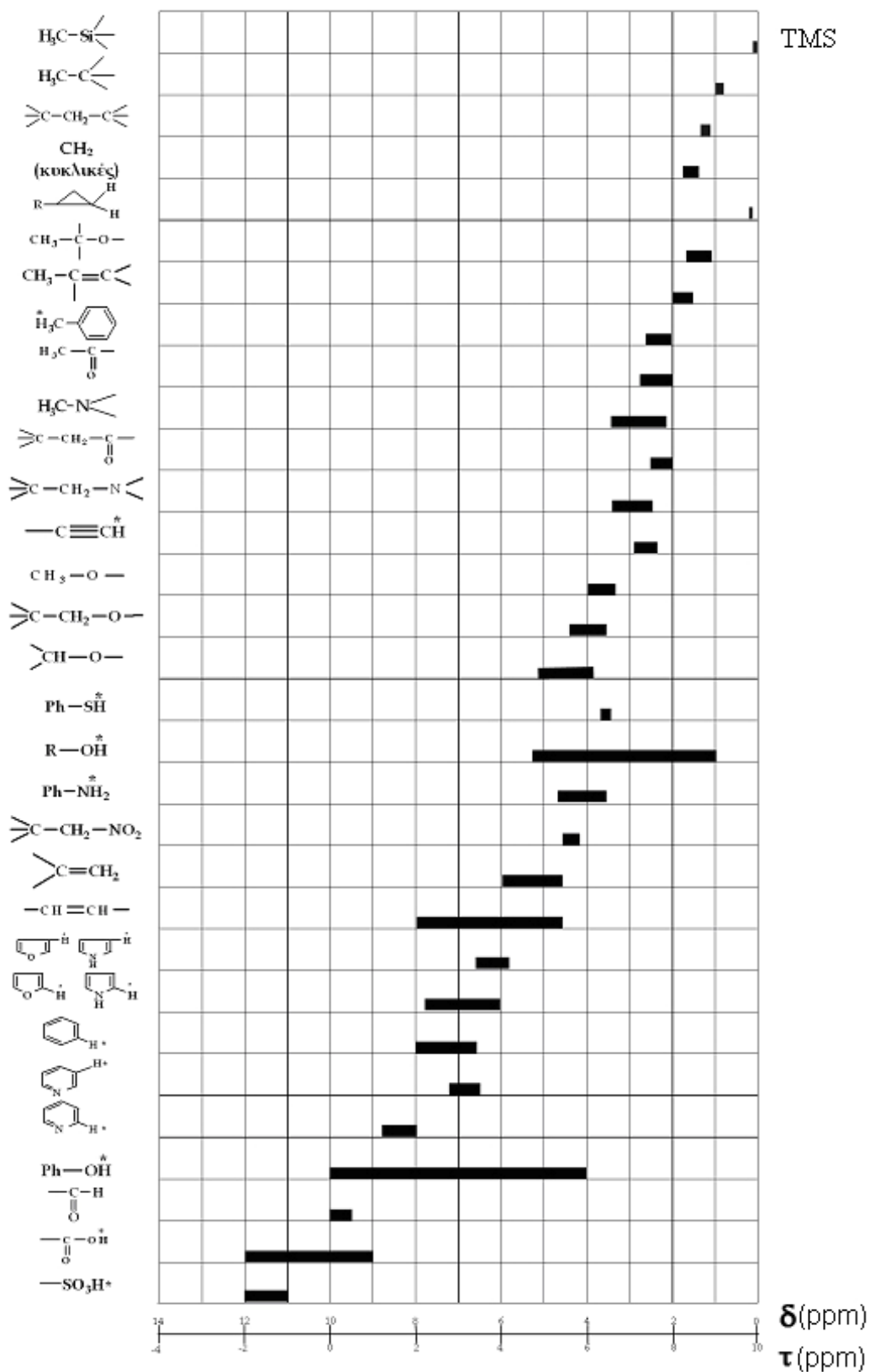
είναι λίγο μικρότερο από το εξωτερικό, αφού το πραγματικό πεδίο είναι το εφαρμοζόμενο χωρίς το τοπικό πεδίο που αναπτύσσεται. Θα μπορούσαμε να περιγράψουμε το φαινόμενο αυτό ως προστασία των πυρήνων από την πλήρη επίδραση του εφαρμοζόμενου πεδίου μέσω των ηλεκτρονίων που τους περιβάλλουν. Καθώς, όμως, όλοι οι πυρήνες βρίσκονται σε κάπως διαφορετικό ηλεκτρονικό περιβάλλον, προστατεύονται και σε διαφορετική έκταση. Αυτό οδηγεί στην παρατήρηση διαφορετικών πραγματικών εφαρμοζόμενων μαγνητικών πεδίων για κάθε πυρήνα και πρακτικά διαφορετικό σήμα NMR για κάθε χημικά διακριτό πυρήνα ενός μορίου (Πίνακας 2.1). Σημειώνεται στο σημείο αυτό ότι χημικά ισοδύναμοι πυρήνες εμφανίζουν μια απορρόφηση πάντα.

Στην τελική απεικόνιση, στο φάσμα NMR όπως καλείται, παρουσιάζεται στον οριζόντιο άξονα το πραγματικά εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο που υφίστανται οι πυρήνες του δείγματος και στον κατακόρυφο άξονα η ένταση απορρόφησης της ενέργειας rf. Πιο συγκεκριμένα, στον οριζόντιο άξονα η ισχύς του εφαρμοζόμενου πεδίου αυξάνεται από αριστερά προς τα δεξιά. Το αριστερό τμήμα του γραφήματος είναι η πλευρά χαμηλού πεδίου (downfield) και το δεξί τμήμα η πλευρά υψηλού πεδίου (upfield). Προκειμένου να είναι δυνατός ο προσδιορισμός της θέσης των απορροφήσεων στο φάσμα του NMR, γίνεται βαθμολόγηση της κλίμακας του και χρήση μιας απορρόφησης αναφοράς. Η απορρόφηση αναφοράς προκύπτει από κάποια ένωση που χρησιμοποιείται για το σκοπό αυτό και η οποία εμφανίζει κατά προτίμηση μία μόνο κορυφή. Επιθυμητό είναι ακόμη η μοναδική αυτή κορυφή να βρίσκεται σε περιοχή πεδίου που να μην εμφανίζονται απορροφήσεις άλλων ενώσεων, ώστε να αποφεύγεται η σύγχυση τους. Μερικές από τις ενώσεις που χρησιμοποιούνται ευρέως ως απορροφήσεις αναφοράς είναι οι TMS, TSP, DSS, DSA κ.α..

Η θέση πάνω στο φάσμα NMR όπου απορροφά ένας πυρήνας καλείται χημική μετατόπιση. Η δε βαθμολόγηση του φάσματος ονομάζεται κλίμακα δέλτα και είναι μια αυθαίρετη κλίμακα που έχει οριστεί συμβατικά. Ως μονάδα δέλτα (δ) χαρακτηρίζεται το ένα μέρος στο εκατομμύριο (part per million, ppm) της συχνότητας λειτουργίας του φασματομέτρου. Με άλλα λόγια, εάν μετρούμε ένα φάσμα με τη χρήση οργάνου 500 MHz, τότε 1 δ θα είναι το 1 ppm των 500.000.000 Hz, συνεπώς 500 Hz. Η χρήση της κλίμακας αυτής αποσκοπεί στην ομοιομορφία και τη δυνατότητα σύγκρισης των χημικών μετατοπίσεων που λαμβάνονται από οποιοδήποτε φασματομέτρο

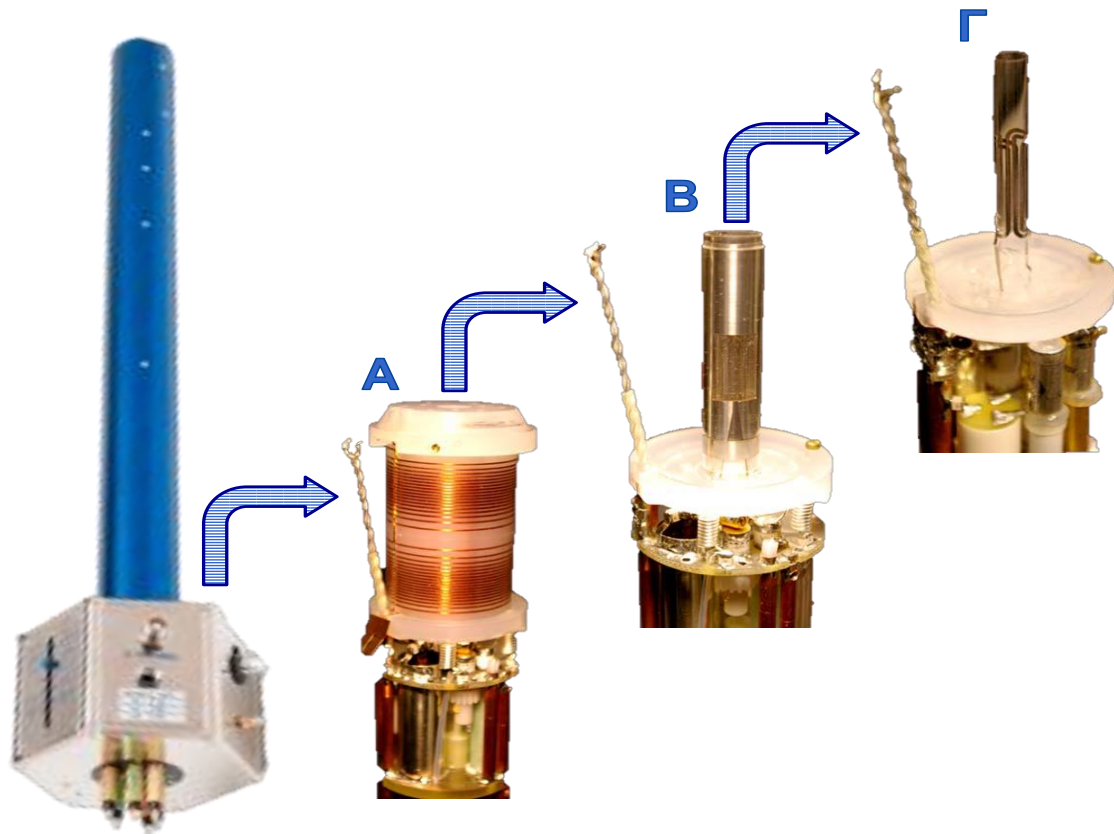
οποιασδήποτε ισχύος μαγνητικού πεδίου. Έτσι, λοιπόν, η χημική μετατόπιση μιας απορρόφησης NMR δίνεται δίδεται σε μονάδες δ και είναι σταθερή και ανεξάρτητη από τη συχνότητα λειτουργίας του εκάστοτε φασματομέτρου. Καθώς σχεδόν όλη η πληροφορία που λαμβάνεται από ^1H NMR παρατηρούνται σε μια περιοχή 0-10 δ η αλληλεπικάλυψη μη ισοδύναμων σημάτων είναι πιθανή. Για αυτό το λόγο υπάρχει η αναγκαιότητα χρήσης ενός οργάνου μεγάλης ισχύος πεδίο ($\sim >500$ MHz), ώστε να εμφανίζονται καλύτερα διαχωρισμένες οι μη ισοδύναμες απορροφήσεις.

Πίνακας 2.1. Χημικές μετατοπίσεις διαφόρων οργανικών ενώσεων σε ^1H NMR.

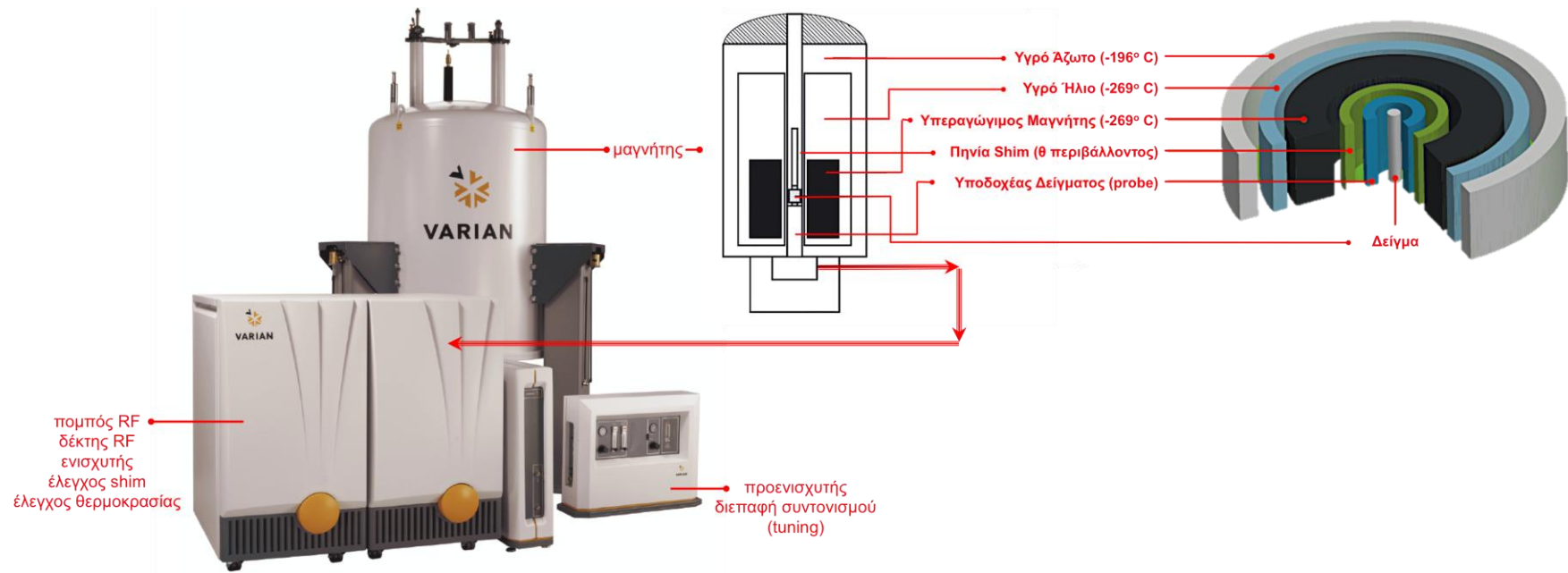


2.1.2. Φασματόμετρο NMR και Μονοδιάστατη Φασματοσκοπία (1D) NMR

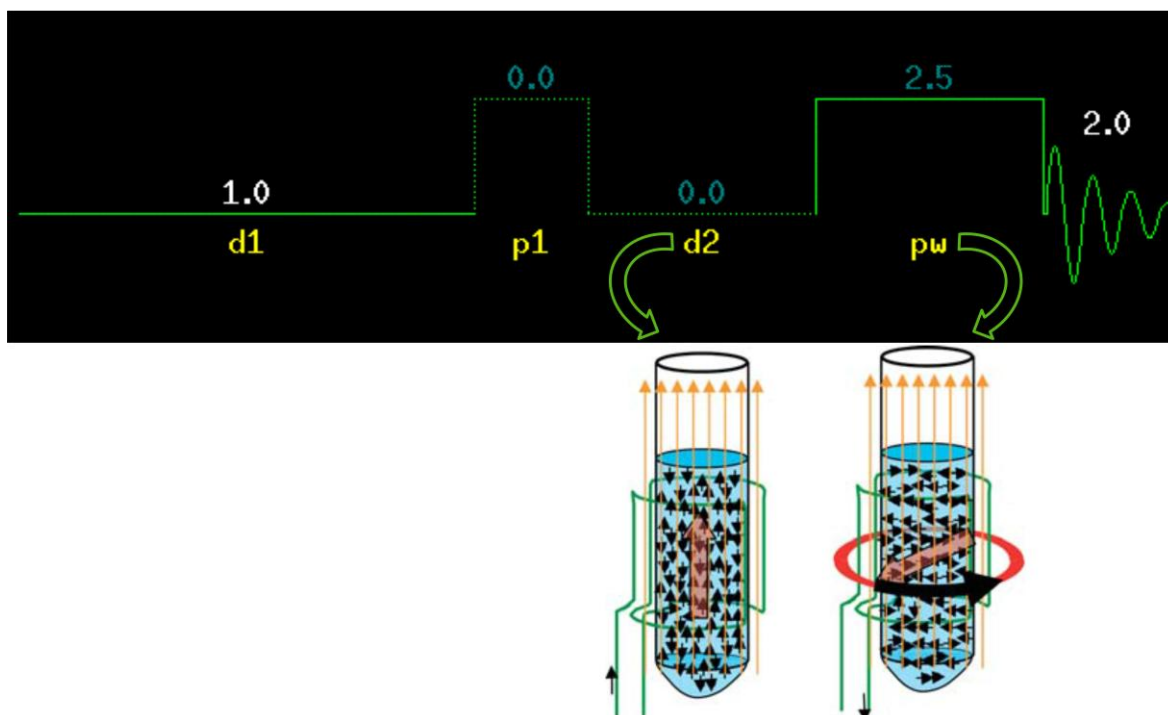
Τα βασικά τμήματα από τα οποία απαρτίζεται κάθε φασματόμετρο NMR είναι ο μαγνήτης, ο υποδοχέας δείγματος (probe), ο ανιχνευτής και το σύστημα επεξεργασίας δεδομένων. Ο υπεραγωγίμος μαγνήτης είναι υπεύθυνος για τη δημιουργία ομογενούς και σταθερού πεδίου B_0 . Στο κέντρο αυτού τοποθετείται το δείγμα μέσα σε ειδικό γυάλινο σωλήνα και εξαιτίας του ομογενούς μαγνητικού πεδίου ευθυγραμμίζονται οι άξονες περιστροφής των πυρήνων που περιέχονται στο δείγμα. Το σημείο όπου εναποτίθεται το δείγμα ονομάζεται υποδοχέας δείγματος (Σχήμα. 2.2). Επιπλέον, υπάρχει ο ραδιοπομπός (RF), που εξασφαλίζει τη δημιουργία του προσωρινού στρεφόμενου μαγνητικού πεδίου B_1 , κάθετο ως προς το κύριο πεδίο B_0 . Με τη βοήθεια του κεντρικού υπολογιστή και του χρησιμοποιούμενου λογισμικού δημιουργούνται παλμοί ραδιοκυμάτων που μεταδίδονται στο δείγμα μέσω πηνίων ραδιοκυμάτων που βρίσκονται στον υποδοχέα δείγματος (Σχήμα. 2.2.B και 2.2.Γ), προκαλώντας διέγερση και προσανατολισμό των πυρήνων εκτός του πεδίου B_0 [13]. Κάθε παλμός ραδιοσυχνότητας χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένη συχνότητα, πλάτος και σχήμα, ώστε να λαμβάνονται πολλές και διαφορετικές πληροφορίες από το δείγμα. Τέλος υπάρχει το σύστημα ανίχνευσης, ενίσχυσης και καταγραφής του σήματος απορρόφησης από το συντονισμό. Μέσω των συστημάτων αυτών, πραγματοποιείται η μέτρηση της ελεύθερης επαγωγικής απόσβεσης (Free Induction Decay, FID), δηλαδή του σήματος που παράγεται καθώς οι άξονες περιστροφής των πυρήνων του δείγματος επανέρχονται στην αρχική τους ευθυγράμμιση υπό την επίδραση του πεδίου B_0 . Η διαδικασία αυτή εκτελείται σε ελάχιστα δευτερόλεπτα και περιγράφεται ως μια συνάρτηση της έντασης σήματος με το χρόνο. Τα σήματα αυτά, που ανιχνεύονται στον υποδοχέα δείγματος, μεταφέρονται στην κονσόλα του NMR κι από εκεί στον κεντρικό υπολογιστή. Αυτό είναι το σημείο όπου μετατρέπονται από συναρτήσεις του χρόνου σε συναρτήσεις συχνοτήτων μέσω μιας διαδικασίας γνωστής ως μετασχηματισμός Fourier (FT). Μετά από το βήμα αυτό, τα φάσματα λαμβάνουν πλέον τη μορφή των γραφημάτων που γνωρίζουμε.



Σχήμα 2.2. Στο αριστερό τμήμα της εικόνας φαίνεται ο υποδοχέας δείγματος (*probe*), όπως ακριβώς συναντάται όταν βρίσκεται τοποθετημένος πάνω στο όργανο. Στη φωτογραφία A απεικονίζεται το εσωτερικό του υποδοχέα, αφού αφαιρεθεί το εξωτερικό κάλυμμα. Τα πηνία που φαίνονται δεν είναι τα πηνία που επιδρούν στο δείγμα, αλλά αυτά που θωρακίζουν το κύριο μαγνητικό πεδίο. Στη φωτογραφία B βλέπουμε τα ‘εξώτερα’ πηνία ραδιοσυχνότητας που δημιουργούν το πεδίο B1 και ανιχνεύουν τα δημιουργούμενα σήματα. Στη φωτογραφία Γ απεικονίζεται το δεύτερο πηνίο ραδιοσυχνότητας, το οποίο βρίσκεται εγγύτερα στο δείγμα και παρέχει τη μεγαλύτερη ευαισθησία. Τα δύο B1 πεδία που δημιουργούνται από τα δύο αυτά πηνία είναι κάθετα μεταξύ τους, ώστε να αποτραπεί το ρεύμα ραδιοσυχνότητας του ενός πηνίου να υποστεί επαγωγή από το ρεύμα του άλλου πηνίου [13].



Σχήμα 2.3. Διαγραμματική απεικόνιση των τμημάτων ενός φασματομέτρου NMR εξωτερικά (αριστερά) και εσωτερικά (κέντρο και δεξιά).



Σχήμα 2.4. Στιγμιότυπο του λογισμικού VNMR του φασματομέτρου κατασκευαστή Varian, όπου αναπαριστάται μια ακολουθία παλμών 1D πειράματος (συγκεκριμένα του παλμού Presat). Με d συμβολίζεται ο χρόνος προετοιμασίας, με p ο παλμός ραδιοσυχνότητας συγκεκριμένης γωνίας διέγερσης και με pw το πλάτος του παλμού (πρακτικά η χρονική περίοδος κατά την οποία συμβαίνει η ακτινοβολήση του δείγματος). Οι αριθμοί συμβολίζουν τα δευτερόλεπτα, s (λευκή γραμματοσειρά) και τα μικροδευτερόλεπτα, μs (γαλάζια γραμματοσειρά) που κάθε λειτουργία διαρκεί. Η τεθλασμένη γραμμή στο δεξί τμήμα της εικόνας αποτελεί το χρόνο καταγραφής της ελεύθερης επαγωγικής απόσβεσης (FID). Στους σωλήνες κάτω από το μαύρο πλαίσιο αναπαρίστανται οι θέσεις των πυρήνων τόσο κατά τον χρόνο προετοιμασίας, όσο και κατά την εφαρμογή του παλμού RF.

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί πως ένα πείραμα NMR, όπως περιγράφηκε παραπάνω, δεν εκτελείται μια φορά μόνο. Αντιθέτως, επαναλαμβάνεται αρκετές φορές, όσες οριστεί από το χρήστη (number of transients (nt)=128 scans ή 256 scans ή 512 scans κτλ.). Αυτή η επανάληψη της ακολουθίας των παλμών έχει ως στόχο να ληφθεί τελικά ένα φάσμα – άθροισμα των μεμονωμένων καταγεγραμμένων λήψεων FID (acquisitions). Με τον τρόπο αυτό βελτιώνεται η αναλογία σήματος/θορύβου και λαμβάνονται καθαρότερα φάσματα. Αντιλαμβανόμαστε, συνεπώς, ότι ο αυξημένος αριθμός επαναλήψεων είναι επιθυμητός. Καθώς, όμως, οι επαναλήψεις είναι σε ευθεία

αναλογία με το συνολικό χρόνο της ανάλυσης, χρειάζεται να προσδιοριστεί ο βέλτιστος αριθμός επαναλήψεων, ώστε να επιτευχθεί ένας λογικός χρόνος ανάλυσης.

ΚΕΦ. 3 ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ – ΠΟΛΥΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

Αναζητώντας κανείς βιβλιογραφία που αφορά εφαρμογές μεταβολομικής αναπόφευκτα θα συναντήσει πολυάριθμες εφαρμογές της φασματοσκοπίας NMR, καθώς έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε μελέτες εύρεσης μεταβολικού προφίλ κυττάρων, ιστών και βιολογικών υγρών. Οι εφαρμογές αυτές αφορούν μελέτες εύρεσης βιοδεικτών ασθενειών [14] και τοξικότητας, διατροφικών χαρακτηριστικών [15] κ.α. και η λίστα ολοένα και διευρύνεται. Σε όλες αυτές τις μελέτες, η ανάλυση με τη συγκεκριμένη τεχνολογία αποτελεί το ‘όχημα’ για την προσέγγιση των απαντήσεων που απασχολούν. Ωστόσο, όπως ακριβώς ένα αυτοκίνητο δεν κατευθύνεται αυτόματα προς ένα προορισμό, αλλά το καθοδηγεί ο οδηγός του και κινείται καταναλώνοντας καύσιμο, ενώ χωρίς τα παραπάνω το όχημα θα παρέμενε καθηλωμένο, έτσι ακριβώς και τα ληφθέντα φάσματα NMR δεν θα δώσουν κάποια πληροφορία παραμένοντας γραφήματα σε μια οθόνη υπολογιστή. Το καύσιμο στην περίπτωση των βασισμένων σε NMR μεταβολομικών μελετών είναι τα διάφορα λογισμικά που χρησιμοποιούνται για την προεπεξεργασία των φασμάτων και την ακόλουθη στατιστική ανάλυση. Ο ‘οδηγός’ καθ’ όλη αυτή την πολύπλοκη και επίπονη διαδικασία είναι φυσικά ο ερευνητής, ο οποίος καλείται να καταλήξει σε μερικούς μεταβολίτες-κλειδιά, τους βιοδείκτες, που αποτελούν την πεμπτουςία της εκάστοτε μελέτης. Παρακάτω παρουσιάζονται ορισμένα από τα λογισμικά αυτά, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας.

3.1. ΛΟΓΙΣΜΙΚΑ ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΦΑΣΜΑΤΩΝ NMR

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο όγκος των δεδομένων, που προκύπτουν από τέτοιου είδους αναλύσεις, είναι τεράστιος. Όλη αυτή η πληθώρα δεδομένων χρειάζεται να χειρισθεί κατάλληλα, ώστε να ανακτηθούν όσο το δυνατόν περισσότερες χρήσιμες και αξιοποιήσιμες πληροφορίες (data extraction). Παρόλο που η πρόταση αυτή μοιάζει να περιγράφει μια απλή σχετικά σειρά βημάτων, στην πραγματικότητα αναφέρεται σε

διαδικασίες που πολλές φορές δημιουργούν περισσότερα προβλήματα στους ερευνητές από ολόκληρη την έως σε αυτό το σημείο ανάλυση. Το στάδιο της διαχείρισης των δεδομένων μιας ανάλυσης αποτελούσε προβληματισμό των επιστημόνων ακόμα και κατά τις εποχές που οι πληροφορίες λαμβάνονταν από απλούστερες τεχνικές σε σχέση με τις σημερινές, όπως είναι η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, και οι προκύπτουσες πληροφορίες ήταν ασύγκριτα λιγότερες και λιτότερες. Στις μέρες μας, το πρόβλημα εμφανίζεται ακόμα μεγαλύτερο λόγω της πληθώρας τεχνικών, οι οποίες εξυπηρετούν το πεδίο της μεταβολομικής από αναλυτικής άποψης. Κάθε μια από τις τεχνικές αυτές, οι οποίες κατονομάστηκαν νωρίτερα, παρουσιάζει τα δεδομένα με διαφορετική μορφή, καθώς εστιάζουν σε διαφορετικά όρια ευαισθησίας, εκλεκτικότητας και ταχύτητας. Έτσι δημιουργείται επιπλέον σύγχυση, στην ήδη σημαντική πολυπλοκότητα του θέματος.

Παρά το γεγονός ότι όλα τα σύγχρονα όργανα που χρησιμοποιούνται στο πεδίο της μεταβολομικής διαθέτουν λογισμικό για ποσοτικοποίηση των δεδομένων που προκύπτουν, καθίσταται αδύνατο να χρησιμοποιηθούν για τον μεγάλο όγκο πληροφοριών που προκύπτει. Η μη δυνατότητα αξιοποίησης τους, οφείλεται στην αδυναμία τους να επεξεργαστούν τέτοια πληθώρα δεδομένων, καθώς από κατασκευής τους απευθύνονται σε αναλύσεις με σαφώς μικρότερο όγκο πληροφοριών και λιγότερους προσδιορίσιμους 'στόχους'. Ωστόσο, εάν ο επιστήμονας ήταν διαθέσιμος να αφιερώσει πολύ χρόνο λειτουργώντας ουσιαστικά χειροκίνητα τα λογισμικά, πιθανότητα θα λάμβανε ένα αρκετά ικανοποιητικό αποτέλεσμα, αφού παρέχουν τη δυνατότητα διόρθωσης και βελτιστοποίησης τις περισσότερες φορές. Πάντως παρά τον χρόνο και την προσπάθεια αρκετά από τα δεδομένα δεν θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν επαρκώς ή ίσως και καθόλου. Αυτή η αδυναμία υπήρξε και ο λόγος που οδήγησε στη δημιουργία σύγχρονων λογισμικών, τα οποία παρέχουν αυτοματοποιημένη ή ημι-αυτοματοποιημένη επεξεργασία των δεδομένων. Όλο και περισσότερα τέτοια λογισμικά εξαγωγής δεδομένων εμφανίζονται στην αγορά, και αρκετά από αυτά διαθέτουν δωρεάν μέσω του διαδικτύου. Με χρήση των λογισμικών αυτών, όχι μόνο αξιοποιούνται σαφώς καλύτερα και στο σύνολο τους τα υπάρχοντα δεδομένα, αλλά παράλληλα επιτυγχάνεται εξαιρετική εξοικονόμηση χρόνου υπέρ του αναλυτή. Ένα ακόμα πλεονέκτημα που παρέχουν είναι η δυνατότητα επεξεργασίας δεδομένων προερχόμενων από όργανα διαφορετικών κατασκευαστών, χωρίς να

απαιτείται η κατοχή συγκεκριμένου λογισμικού για την επεξεργασία των εκάστοτε αποτελεσμάτων και η εκμάθηση αυτού.

Ωστόσο, ένα αρκετά σημαντικό μειονέκτημα των αυτοματοποιημένων λογισμικών είναι ο περιορισμός που θέτουν ως προς τις μορφές δεδομένων που είναι ικανά να ‘διαβάσουν’. Επιπλέον, καθώς δεν επιτρέπουν στον αναλυτή να επέμβει στο λογισμικό τους, συμβαίνει συχνά η εμφάνιση σφαλμάτων, που αφορούν στην ολοκλήρωση των κορυφών, στον λανθασμένο συνυπολογισμό σημάτων θορύβου, στην ευθυγράμμιση των κορυφών (alignment) κ.α.. Τα σημαντικότερα από αυτά τα σφάλματα, που εντοπίζονται κατά τις μεταβολομικές αναλύσεις, αφορούν στον προσδιορισμό μιας κορυφής χαμηλού σήματος και στη διάκριση αυτής από το υπόβαθρο του θορύβου, καθώς αποτελεί σύνηθες φαινόμενο για τους μεταβολίτες να εντοπίζονται σε ιδιαίτερα χαμηλές συγκεντρώσεις. Αντιλαμβανόμαστε, λοιπόν, την σημασία της ανάπτυξης λογισμικών που να παρέχουν τα ασφαλέστερα δυνατά αποτελέσματα.

Δύο τέτοια λογισμικά είναι τα ACD/NMR Processor και MestReNova NMR που παρέχουν τόσο βασικές όσο και προχωρημένες λειτουργίες επεξεργασίας φασμάτων 1D και 2D NMR. Αποτελούν λογισμικά επεξεργασίας πολλών διαφορετικών τύπων φασμάτων NMR, φασμάτων που έχουν ληφθεί από διαφορετικούς τύπους οργάνων και από όργανα διαφορετικών κατασκευαστών (Agilent, Bruker, κτλ.), ενώ επιπλέον είναι δυνατή η εισαγωγή τιμών από αρχεία κειμενογράφου (*.txt, *.csv). Εκτός, λοιπόν, από την απλή προβολή φασμάτων NMR σε προσωπικούς ηλεκτρονικούς υπολογιστές απομακρυσμένους και ανεξάρτητους από τον κεντρικό υπολογιστή του οργάνου, παρέχεται η δυνατότητα στο χρήστη να προετοιμάσει τα φάσματα για τη στατιστική ανάλυση εφαρμόζοντας μια σειρά αλγορίθμων σε αυτά, προκειμένου όλα τα φάσματα να καταστούν άμεσα συγκρίσιμα μεταξύ τους. Ορισμένοι από τους περισσότερο γνωστούς τέτοιους χειρισμούς που χρησιμοποιούνται ευρέως στη βασισμένη σε NMR μεταβολομική είναι η διόρθωση της φάσης των φασμάτων, η μεταξύ τους ευθυγράμμιση βάση κάποιας κορυφής αναφοράς, η διόρθωση της βασικής γραμμής τους, η κανονικοποίηση και φυσικά ο τεμαχισμός του φάσματος σε συνεχόμενες περιοχές ορισμένης χημικής μετατόπισης (buckets ή bins). Όλοι αυτοί οι χειρισμοί, και πολλοί ακόμα, είναι δυνατό να εφαρμοστούν ταυτόχρονα σε όλα τα φάσματα που επιθυμούμε να μελετήσουμε περαιτέρω και με τα δύο λογισμικά. Ο λόγος που οδήγησε, λοιπόν, στη χρήση δύο λογισμικών με παρόμοια χαρακτηριστικά και

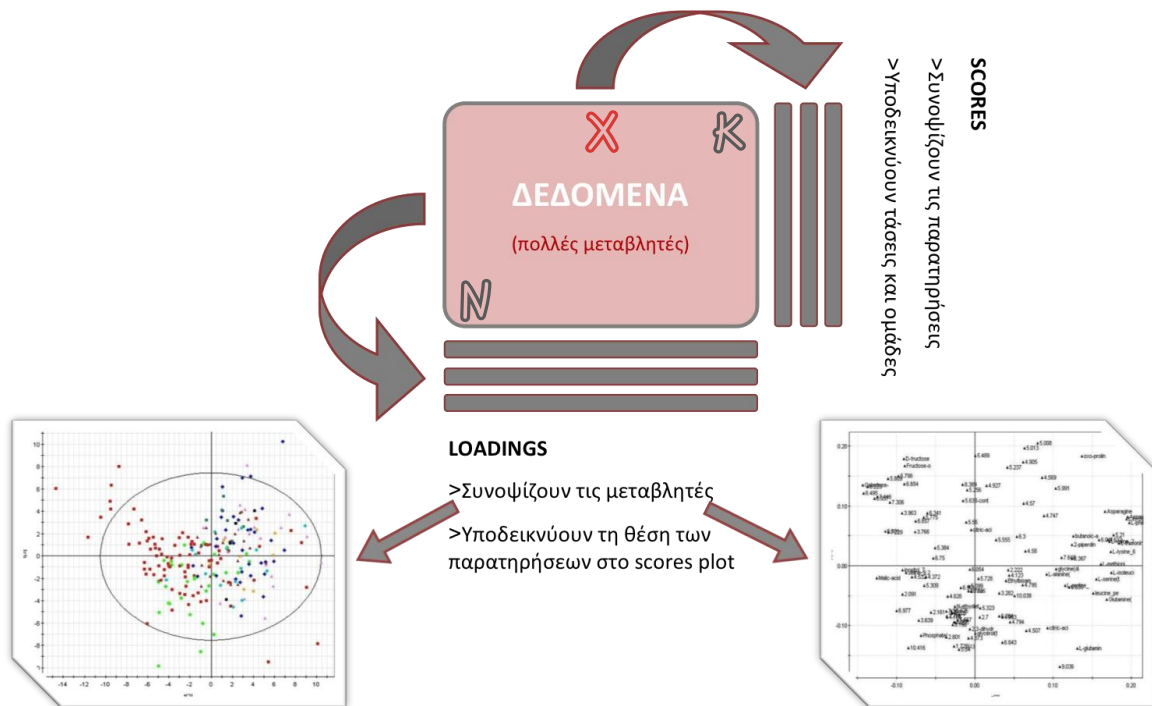
λειτουργίες, είναι οι μικρές διαφορές που εντοπίστηκε πως εμφανίζουν μεταξύ τους και θεωρήθηκε ότι θα μπορούσαν δυνητικά να εισάγουν κάποιες βελτιώσεις στην μετέπειτα στατιστική επεξεργασία. Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκε η έκδοση ACD/NMR Processor (Academic Edition, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, www.acdlabs.com, 2014). η οποία διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο από την ιστοσελίδα των ACD/Labs για ακαδημαϊκή χρήση και η έκδοση MestReNova 7 και 9 (free trial license).

3.2. ΠΟΛΥΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Στόχος όλων των μεταβολομικών μελετών, τελικά, είναι η προβολή των αποτελεσμάτων μιας πολυπαραμετρικής ανάλυσης με μια μορφή φιλική προς τον ερευνητή, που καθιστά δυνατή την προβολή και τη διάκριση των αποτελεσμάτων, ενώ παράλληλα προϋποθέτει την παραλαβή όλων των χρήσιμων πληροφοριών από τα δεδομένα, αποτρέποντας την απώλεια τους. Προκειμένου να επιτευχθεί ο στόχος αυτός, εκμεταλλευόμαστε τους πίνακες αποτελεσμάτων που εξάγονται από λογισμικά παρόμοια με αυτά που περιγράφηκαν στην προηγούμενη ενότητα, και τις δυνατότητες που παρέχουν οι πολυπαραμετρικές μέθοδοι προβολής. Ο πίνακας αυτός, ή μήτρα X , είναι της μορφής $N \times K$ (σειρές \times στήλες), όπου, στην περίπτωση φασμάτων NMR, η μία παράμετρος εκπροσωπεί το πλήθος των δειγμάτων (observations) και η άλλη τα μικρά κομμάτια χημικής μετατόπισης που προήλθαν από τον τεμαχισμό του φάσματος, δηλαδή τον αριθμό των μεταβλητών (variables). Πριν τη διεξαγωγή της πολυπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης, τα δεδομένα του πίνακα υποβάλλονται σε μια διαβάθμιση, χρησιμοποιώντας διάφορα πρωτόκολλα, προκειμένου να συνυπολογιστεί η σημαντικότητα κάθε μεταβλητής στο τελικό αποτέλεσμα. Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται είναι το unit variance (UV), mean – centering (Ctr) ή pareto (Par). Η πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση διακρίνεται σε δύο τύπους: στις μη προκατειλημμένες τεχνικές (PCA), όπου δεν παρέχεται καμιά πληροφορία σχετική με τα δείγματα και τη διαφοροποίησή τους, και στις προκατειλημμένες (PLS-DA, OPLS-DA), όπου οι πληροφορίες αυτές παρέχονται πριν την εφαρμογή της ανάλυσης.

Ένα από τα πολυτιμότερα μη προκατειλημμένα ‘εργαλεία’ της πολυπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης είναι η PCA (Principal Components Analysis). Πρόκειται, ουσιαστικά, για μια μαθηματική διαδικασία, η οποία επιτυγχάνει να μετατρέψει ένα σύνολο παρατηρήσεων σχετιζόμενων μεταβλητών σε σύνολο μη σχετιζόμενων μεταβλητών. Οι νέες μεταβλητές είναι, συνήθως, λιγότερες από τις αρχικές, καθώς τα δεδομένα συμπιέζονται, και καλούνται κύριες συνιστώσες (Principal Components). Μέσω της συμπίεσης των δεδομένων, καθίσταται δυνατή η βελτιωμένη παρακολούθηση τους και η διάκριση των τάσεων τους, πιθανών ομάδων κοινών χαρακτηριστικών που προκύπτουν και δειγμάτων ακραίων τιμών, τα οποία οδηγούν σε λανθασμένα συμπεράσματα τις περισσότερες φορές. Αυτή η συμπίεση πραγματοποιείται με τέτοιο τρόπο ώστε η πρώτη κύρια PCA συνιστώσα να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη δυνατή διακύμανση ενός πλήθους σημείων, ενώ κάθε επόμενη συνιστώσα να έχει την επόμενη μεγαλύτερη διακύμανση, με τον περιορισμό να σχηματίζει ορθή γωνία με τις συνιστώσες που προηγήθηκαν. Έτσι, τελικά, όλες οι προκύπτουσες συνιστώσες είναι κάθετες μεταξύ τους. Αυτό που ουσιαστικά επιτυγχάνει η PCA, είναι να εντοπίζει κάθετους μεταξύ τους άξονες στο χώρο των δεδομένων, οι οποίοι φέρουν το σημαντικότερο μέρος των πληροφοριών, χωρίς να διαθέτει οποιαδήποτε άλλη γνώση για τα υπό μελέτη δείγματα. Θα μπορούσαμε να περιγράψουμε την PCA ως την τεχνική που επιτρέπει στα δεδομένα να ‘μιλήσουν από μόνα τους’. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται, τελικά, η γραφική αναπαράσταση πολυδιάστατων δεδομένων.

Κάθε μια από τις κύριες συνιστώσες, αποτελείται από ένα διάνυσμα συνιστωσών (score vector) και ένα διάνυσμα μεταβλητών (loading vector). Τα διανύσματα συνιστωσών/scores αντιπροσωπεύουν ένα χώρο μικρότερων διαστάσεων, συγκριτικά με τον χώρο των αρχικών δεδομένων, και το γράφημα διασποράς τους (t_1, t_2) συνοψίζει όλα τα δειγμάτων του αρχικού πίνακα δεδομένων. Τα διανύσματα μεταβλητών/loadings, από την άλλη πλευρά, μέσω του διαγράμματος τους (p_1, p_2) καθορίζουν τη σχέση ανάμεσα στις μεταβλητές του πίνακα δεδομένων.



Σχήμα 3.1. Διαγραμματική απεικόνιση της λειτουργίας της μη προκατειλημμένης τεχνικής PCA. Αρχικά ένας μεγάλος πίνακας X (μήτρα) δεδομένων συμπιέζεται και διασπάται σε δύο μικρότερους (scores και loadings). Αριστερά στο σχήμα βλέπουμε ένα διάγραμμα συνιστωσών (scores plot ($t1/t2$)) και δεξιά ένα διάγραμμα μεταβλητών (loadings plot ($p1/p2$)).

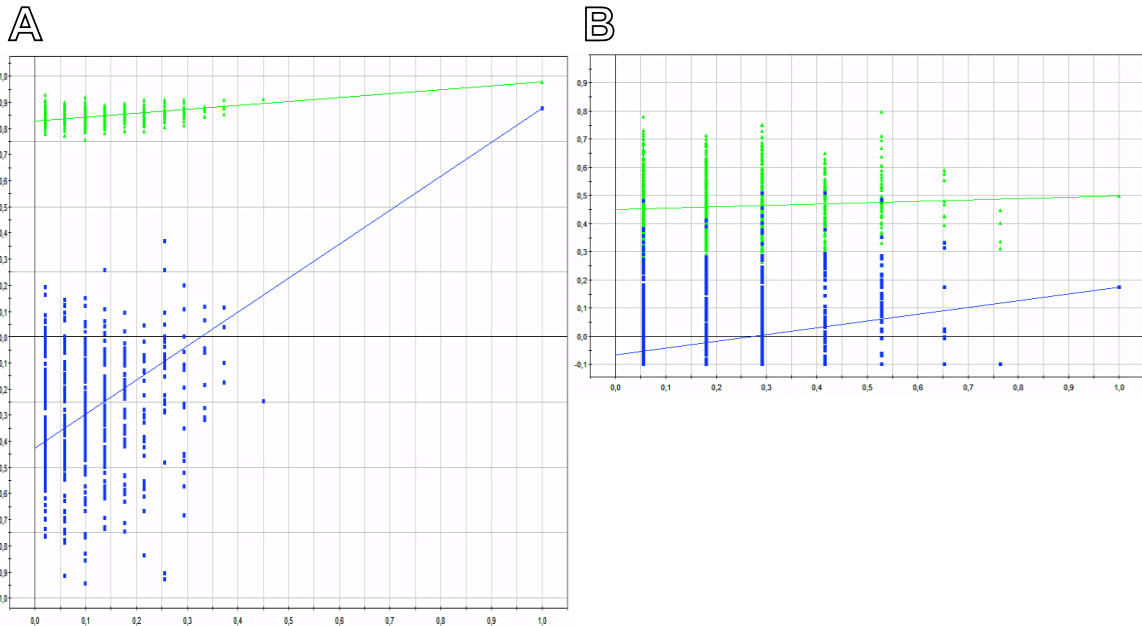
Η εγγενής διαφορά των μη προκατειλημμένων (unsupervised) και των προκατειλημμένων (supervised) τεχνικών στατιστικής ανάλυσης είναι ότι στις δεύτερες καθορίζει ο ερευνητής εκ των προτέρων τις ομάδες που διακρίνονται στο δειγματοχώρο, προκειμένου να καταστεί ο διαχωρισμός των δοθέντων ομάδων ορατός στο scores plot. Αυτό που στην πραγματικότητα συμβαίνει σε μια μη προκατειλημμένη τεχνική στατιστικής ανάλυσης είναι η εύρεση μοτίβων μέσα σε μια μήτρα δεδομένων X . Από την άλλη μεριά στις προκατειλημμένες τεχνικές τα μοτίβα που εντοπίζονται στη μήτρα X συσχετίζονται με πρόσθετα δεδομένα (π. χ. κλινικά δεδομένα), τα οποία περιέχονται σε μια μήτρα Y . Μεγάλο εγγενές μειονέκτημα των προκατειλημμένων τεχνικών αποτελεί το γεγονός ότι είναι δυνατό να οριστούν τυχαίες ομάδες, τις οποίες ο αλγόριθμος θα προσπαθήσει να τις διαχωρίσει, οδηγώντας σε παραπλανητικά αποτελέσματα. Για αυτό το λόγο, κατά τη εφαρμογή προκατειλημμένων τεχνικών είμαστε ιδιαίτερος επιφυλακτικοί και απαιτούμε να συνοδεύονται πάντα από

διαγράμματα και τιμές που να επικυρώνουν τα εξαγόμενα, με βάση αυτά τα μοντέλα, συμπεράσματα. Οι παράμετροι αυτές που ενδιαφέρουν κατά τον έλεγχο της αξιοπιστίας των μοντέλων είναι:

- R^2X : δείχνει το ποσοστό της διακύμανσης στο σύνολο δεδομένων το οποίο εξηγείται από το μοντέλο.
- R^2Y : παρέχει το προβλεπόμενο ποσοστό της απόκρισης.
- Q^2Y : αντιστοιχεί στην εκτίμηση της δυνατότητας πρόβλεψης του μοντέλου και υπολογίζεται μέσω της διασταυρωμένης επικύρωσης. Παρέχει τη δυνατότητα ελέγχου της εγκυρότητας του μοντέλου ως προς την υπερπροσαρμογή που είναι δυνατό να παρατηρείται στα προκατειλημμένα μοντέλα.

Ο βέλτιστος τρόπος επικύρωσης ενός στατιστικού μοντέλου είναι η χρήση μιας ανεξάρτητης σειράς δεδομένων προκειμένου να ελεγχθεί η ικανότητα πρόβλεψης της πραγματικής σειράς δεδομένων. Καθιερωμένη εναλλακτική επιλογή για την επικύρωση ενός μοντέλου είναι η ανάλυση μετάθεσης (permutation analysis) κατά την οποία τα δεδομένα της μήτρας Y κατ' επανάληψη μετατίθενται με τυχαίο τρόπο και το μοντέλο επανυπολογίζεται βάσει των νέων αυτών δεδομένων [16]. Εάν το μοντέλο είναι σταθερό και οι συσχετίσεις με τα δεδομένα της μήτρας Y έχουν μόνο βιολογική προέλευση, η τυχαιοποιημένη μετάθεση των Y δεδομένων θα μειώσει την διακύμανση και την ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου. Ασθενή μοντέλα, όπου οι συσχετίσεις με τα δεδομένα της μήτρας Y είναι τυχαίες και ανεξάρτητες των βιολογικών παραγόντων, θα δημιουργήσουν μοντέλα μετάθεσης με αντίστοιχη ή μεγαλύτερη ικανότητα πρόβλεψης σε σχέση με το αρχικό μοντέλο. Τα μοντέλα αυτά θεωρούνται ακατάλληλα και μη αξιόπιστα για εξαγωγή συμπερασμάτων.

Κρίνεται χρήσιμο να υπογραμμιστεί το γεγονός ότι η βαρύτητα ενός επικυρωμένου προκατειλημμένου στατιστικού μοντέλου μπορεί να είναι μεγαλύτερη από τη βαρύτητα ενός μοντέλου που δημιουργήθηκε με κάποια μη προκατειλημμένη τεχνική. Αυτό οφείλεται στην καθοδήγηση που επιβάλλεται στις προκατειλημμένες μεθόδους ως προς το βιολογικό προβληματισμό εξαρχής.



Σχήμα 3.2. Παραδείγματα επικύρωσης μοντέλων με χρήση ανάλυσης μετάθεσης (permutation analysis), όπου το διάγραμμα A αντιστοιχεί σε αποδεκτά επικυρωμένο μοντέλο και το διάγραμμα B σε μη επικυρωμένο μοντέλο. Οι πραγματικές τιμές R^2 και Q^2 βρίσκονται στο δεξιότερο σημείο του διαγράμματος. Ο άξονας x κάθε διαγράμματος αντιστοιχεί στην απόσταση του πραγματικού και του μοντέλου που έχει υποστεί μετάθεση, ενώ ο άξονας y στις τιμές των R^2 και Q^2 .

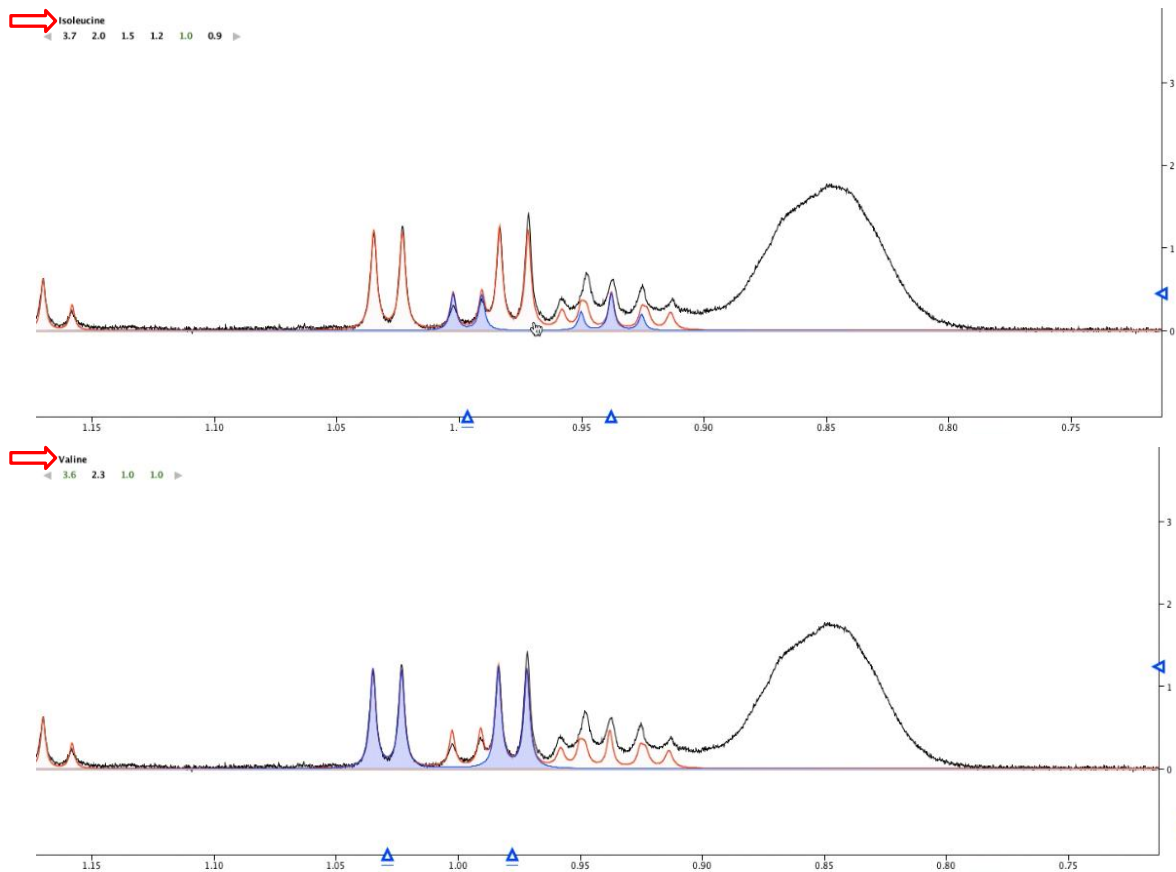
Χρησιμοποιώντας τα εργαλεία αυτά της πολυπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης αναζητούμε διαχωρισμούς στον στατιστικό χώρο που δημιουργούν τα αναλυτικά δεδομένα. Οι διαχωρισμοί γίνονται εμφανείς στα διαγράμματα των συνιστωσών (scores plot) και στη συνέχεια αναζητούμε τους παράγοντες/μεταβολίτες που προκάλεσαν αυτή τη διαφοροποίηση στα διαγράμματα μεταβλητών (loadings plot). Υπογραμμίζεται το γεγονός ότι από τα εξαγόμενα συμπεράσματα είναι απαραίτητο να εμπιστευτεί κανείς μόνο τα προερχόμενα από πλήρως επικυρωμένα μοντέλα. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας οι πολυπαραμετρικές στατιστικές αναλύσεις εκτελέστηκαν με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SIMCA 13 της εταιρίας Umetrics (Umea, Sweden).

3.3. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ/ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΜΕ NMR

Στις μεταβολομικές μελέτες, το επόμενο βήμα μετά την αναγνώριση ορισμένων δυνητικών μεταβολιτών ως δείκτες από την πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση, είναι η ταυτοποίηση τους. Η διαδικασία αυτή μπορεί να γίνει ιδιαίτερα χρονοβόρα και επίπονη εάν αποφασιστεί να αναλυθούν πρότυπες ενώσεις που πιθανόν να έχουν βρεθεί βιβλιογραφικά σε συγκεκριμένες περιοχές χημικών μετατοπίσεων που ενδιαφέρουν. Επιπλέον, εξίσου χρονοβόρα εναλλακτική λύση αποτελεί η ανάλυση με λήψη φασμάτων δύο διαστάσεων (2D) ορισμένων αντιπροσωπευτικών δειγμάτων από αυτά που ήδη αναλύθηκαν με πειράματα 1D που προηγήθηκαν. Για το λόγο αυτό, οι σωλήνες NMR που περιέχουν τα δείγματα, η ανάλυση των οποίων έχει ολοκληρωθεί, φυλάσσονται σε θερμοκρασία -24°C μέχρι το πέρας της στατιστικής επεξεργασίας και της μελέτης γενικότερα. Ωστόσο, τα πειράματα 2D απαιτούν αρκετές ώρες λειτουργίας του οργάνου για ένα μόνο δείγμα κάθε φορά και η ποιότητα του φάσματος πιθανόν να μην ικανοποιήσει τον ερευνητή με τις πρώτες προσπάθειες. Επιπλέον, η ταυτοποίηση των ενώσεων, παρόλο που είναι απόλυτη με τον τρόπο αυτό, απαιτεί σημαντικό χρόνο και εκπαιδευμένο άτομο για να την διεκπεραιώσει.

Βέλτιστη λύση θα αποτελούσε η ύπαρξη βιβλιοθηκών φασμάτων, όπως συμβαίνει για παράδειγμα με τα φάσματα που λαμβάνονται με GC-MS. Εξίσου σημαντική συμβολή, λοιπόν, στην ταυτοποίηση ενώσεων σε φάσματα NMR αποτελεί το λογισμικό Chenomx NMR Suite. Το συγκεκριμένο λογισμικό βρίσκει ευρεία εφαρμογή σε ταυτοποίηση ενώσεων σε φάσματα πολύπλοκων υποστρωμάτων. Αποτελεί ένα ολοκληρωμένο πακέτο εργαλείων τόσο για τον εντοπισμό όσο και για την ποσοτικοποίηση μεταβολιτών σε φάσματα NMR. Με τον τρόπο αυτό συμβάλλει ενεργά στον συσχετισμό μεταβολικών αποκρίσεων με παράγοντες όπως η παχυσαρκία, η τοξικότητα φαρμάκων, η φυσιολογία ή οποιουδήποτε άλλου αποτελεί πεδίο έρευνας μιας μεταβολομικής μελέτης. Οι δυνατότητες του συγκεκριμένου λογισμικού δεν περιορίζονται μόνο στην ταυτοποίηση, αλλά επεκτείνονται και σε περισσότερο κλασσικές λειτουργίες, όπως η διόρθωση της φάσης ενός φάσματος και της βασικής γραμμής του. Ωστόσο, στην συγκεκριμένη εργασία οι λειτουργίες αυτές εκτελέστηκαν με τα δύο λογισμικά που περιγράφηκαν στην προηγούμενη ενότητα και το Chenomx χρησιμοποιήθηκε μόνο για την ταυτοποίηση των μεταβολιτών. Η λειτουργία που

παρέχει τα εργαλεία για την ταυτοποίηση ονομάζεται Chenomx Profiler. Με τη χρήση της γίνεται μια ιδιαίτερα εξελιγμένη σύγκριση του φάσματος που ενδιαφέρει με πρότυπα φάσματα ενώσεων που εμπεριέχονται στη βιβλιοθήκη του λογισμικού (Σχήμα 3.2). Η σύγκριση εκτελείται με τοποθέτηση του προτύπου φάσματος πάνω από το υπό εξέταση φάσμα και σύγκριση όλων των κορυφών που θα έπρεπε να εμφανίζει η συγκεκριμένη ένωση. Σε περίπτωση που οι κορυφές αυτές διακρίνονται και στο πραγματικό φάσμα, γίνεται αποδοχή της ένωσης που προτάθηκε από το λογισμικό ως πιθανή για τη συγκεκριμένη χημική μετατόπιση, που ο ερευνητής θέτει. Επιπλέον, σε περίπτωση που στο δείγμα έχει χρησιμοποιηθεί κάποια ένωση αναφορά από τις TSP, DSS και φορμικό οξύ είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί εντελώς αυτοματοποιημένα και η ποσοτικοποίηση της ένωσης που προτείνεται από το λογισμικό βάση της συγκέντρωσης της πρότυπης ένωσης. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η βιβλιοθήκη του λογισμικού είναι αρκετά ενημερωμένη αναφορικά με τους μεταβολίτες που απαντώνται στα πολύπλοκα βιολογικά υποστρώματα.



Σχήμα 3.2. Στιγμιότυπα κατά την επεξεργασία των φασμάτων ορού αίματος της παρούσας εργασίας προς ταυτοποίηση των παρατηρούμενων μεταβολιτών. Και στις δύο εικόνες απεικονίζεται η ίδια ακριβώς περιοχή του φάσματος. Η **μαύρη** γραμμή αποτελεί το πραγματικό φάσμα, όπως λήφθηκε από το φασματόμετρο NMR, η **κόκκινη** την περιοχή που έχει ταυτοποιηθεί με κάποιο μεταβολίτη και η **μπλε** περιοχή την κορυφή που αντιστοιχεί στον πρότυπο μεταβολίτη που εξετάζεται η ταύτιση των κορυφών αλλά και του σχήματος τους με τις κορυφές του πραγματικού φάσματος. Οι μεταβολίτες που εξετάζονται στα στιγμιότυπα είναι η ισολευκίνη (πάνω) και η βαλίνη (κάτω) και παρατηρούμε πως η ταύτιση με το πραγματικό φάσμα είναι απόλυτη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ

- 1 http://edge.org/q2011/q11_6.html (τελευταία επίσκεψη Μάιος 2014).
- 2 Nicholson, J.K., Lindon, J.C., and Holmes, E., *Xenobiotica*, 1999, **29**, 1181-1189.
- 3 Fiehn, O., *Plant Mol. Biol.*, 2002, **48**, 155-171.
- 4 Goodacre, R., *Metabolomics*, 2005, **1**, 1-2.
- 5 Pan, Z., Raftery, D., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **387**, 525-527.
- 6 <http://www.capella-observatory.com> (τελευταία επίσκεψη Μάιος 2014).
- 7 Kraly, J.R., Holcomb, R.E., Guan, Q., and Henry, C.S., *Anal. Chim. Acta*, 2009, **653**, 23-35.
- 8 Bertram, H.C., Malmendal, A., Petersen, B.O., Madsen, J.C., Pedersen, H., Nielsen, N.C., Hoppe, C., Mølgaard, C., Michaelsen, K.F., and Duus, J.Ø., *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 7110–7115.
- 9 Becker, E. D., *Anal. Chim.*, 1993, **65**, 295A-302A.
- 10 Αλεξάνδρου, Ν.Ε., Γενική Οργανική Χημεία, Τεύχος Β', Αναθεωρημένη έκδοση, Ζήτη, Θεσσαλονίκη, 1996, 86-141.
- 11 Αργυρόπουλος, Ν., Βαρέλλα, Ε., Κουτούλη – Αργυροπούλου, Ε., Λίτινας, Κ., Μαλαμίδου – Ξενικάκη, Ε., Μαρούλης, Α., Σπυρούδης, Σ., Τσολερίδης, Κ., Χατζηαντωνίου – Μαρούλη, Κ., και Χατζημιχαλάκης, Φ., Σημειώσεις Πειραματικής Οργανικής Χημείας, Α. Γενικό μέρος, Υπηρεσία δημοσιευμάτων Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη, 1997, 278-317.
- 12 McMurry, J., μτφ. Βάρβογλης, Α., Ορφανόπουλος, Μ., Σμόνου, Ι., και Στρατάκης, Μ., *Οργανική χημεία*, Τόμος Ι, 5^η έκδοση, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο Κρήτης, 2005, 559-587.
- 13 <http://chemnmr.colorado.edu/moreinfo/instruments/probe1.html> (τελευταία επίσκεψη Μάιος 2014).
- 14 Brindle, J.T., Antti, H., Holmes, E., Tranter, G., Nicholson, J. K., Bethell, H.W.L., Clarke, S., Schofield, P.M., McKilligin, E., Mosedale, D.E., Grainger, D.J., *Nat. Med.*, 2002, **8**, 1439-1445.
- 15 Lenz, E.M., Bright, J., Wilson, I.D., Hughes, A., Morrisson, J., Lindberg, H., Lockton, A., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2004, **36**, 841-849.

- 16 Westerhuis, J.A., Hoefsloot, H.C.J., Smit, S., Vis, D.J., Smilde, A.K., van Velzen, E.J.J., van Duijnhoven, J.P.M., and van Dorsten, F.A., *Metabolomics*, 2008, **4**, 81-89.

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στην εργασία αυτή το ενδιαφέρον μας επικεντρώθηκε στην ανάλυση του μεταβολικού προφίλ αμνιακού υγρού και ορού αίματος γυναικών που βρίσκονται στο δεύτερο τρίμηνο της κύησης τους με την τεχνική ^1H NMR, στοχεύοντας στον προσδιορισμό και την ταυτοποίηση μεταβολιτών - βιοδεικτών που σχετίζονται με τις διατροφικές συνήθειες των γυναικών αυτών. Το γενικότερο πλαίσιο μέσα στο οποίο εντάσσεται η διπλωματική εργασία ειδίκευσης είναι η εκμετάλλευση του πεδίου της μεταβολομικής ως διαγνωστικό εργαλείο για την παρακολούθηση της ανάπτυξης των εμβρύων και του πρόωρου εντοπισμού τυχόν διαταραχών της υγείας του εμβρύου ή/και της μητέρας μέσω συγκεκριμένων μεταβολικών δεικτών.

Παρότι, όπως είναι γνωστό, έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες μελέτες γύρω από το υπόστρωμα του αμνιακού υγρού και έχει καθιερωθεί η αμνιοπαρακέντηση ως η πλέον διαδεδομένη εξέταση προγεννητικού ελέγχου, ελάχιστες αναφορές σε ολιστική μελέτη του υποστρώματος συναντώνται στη βιβλιογραφία. Από την άλλη μεριά, ο ορός αίματος αποτελεί ένα από τα πλέον διαδεδομένα υποστρώματα μεταβολομικής, και επιλέχθηκε προκειμένου να δώσει τυχόν συμπληρωματικές πληροφορίες, αλλά και προκειμένου να καταστήσει μελλοντικά δυνατή την αποφυγή της αμνιοπαρακέντησης.

Η επιλογή της τεχνικής NMR στη συγκεκριμένη εργασία βασίστηκε στην αξιοπιστία που αυτή εμφανίζει σε εφαρμογές μεταβολομικής ανάλυσης και στο γεγονός ότι επιτρέπει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό ενός μεγάλου εύρους διαφορετικών τύπων μεταβολιτών.

Στα ακόλουθα κεφάλαια παρουσιάζεται το πλήρες περίγραμμα της μεταβολομικής μελέτης ξεκινώντας από την προετοιμασία των δειγμάτων (Κεφάλαιο 6), την ανάλυση αυτών με NMR (Κεφάλαιο 7), την προεπεξεργασία των δεδομένων που λήφθηκαν από την ανάλυση (Κεφάλαιο 8), φτάνοντας μέχρι την στατιστική ανάλυση και την αξιολόγηση τους (Κεφάλαιο 9.1). Επιπλέον, στο τελευταίο τμήμα της αξιολόγησης (Κεφάλαιο 9.2) παρουσιάζεται και το λογισμικό που χρησιμοποιείται για την αναγνώριση/ταυτοποίηση των ενώσεων κατά την προσπάθεια προσδιορισμού βιοδεικτών σε φάσματα ληφθέντα με ^1H NMR.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦ. 4 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Κατά τη διεξαγωγή του πειραματικού τμήματος της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συσκευές – όργανα:

- Αναδευτήρας (Vortex)
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος (Hermle)
- Διάταξη λυοφιλίωσης
- Φασματόμετρο NMR Varian V600 MHz:
 - Εισαγωγέας δείγματος (probe) $^1\text{H}\{^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\}$ 5 mm PFG Automatable Triple Resonance
 - Λογισμικό: VNMRJ 2.2C
 - Έγινε χρήση του παλμού Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG).

Επιπλέον, τα φιαλίδια που χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας ήταν τα ακόλουθα:

- Πλαστικά φιαλίδια φυγοκέντρωσης τύπου eppendorf 1.5 mL.
- Σωλήνες NMR πλάτους 5 mm των εταιριών Norell και Willmad.

ΚΕΦ. 5 ΔΙΑΛΥΤΕΣ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Deuterium oxide (D₂O) ≥ 99.9 atom % D.
- Sodium maleate dibasic (anhydrous, $\geq 98.0\%$), Sigma-Aldrich (Germany).
- Sodium phosphate monobasic (anhydrous, $\geq 99.9\%$), Sigma-Aldrich (Germany).
- Sodium phosphate dibasic (anhydrous, $\geq 99.9\%$), Sigma-Aldrich (Germany).

ΚΕΦ. 6 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας ήταν δείγματα ορού αίματος και αμνιακού υγρού ληφθέντα από είκοσι εννέα (29) γυναίκες, οι οποίες υποβλήθηκαν σε αμνιοπαρακέντηση, στα πλαίσια προγεννητικού ελέγχου, μεταξύ της 17^{ης} και της 24^{ης} εβδομάδας της κύησης τους. Τα δείγματα πλάσματος και αμνιακού υγρού που συλλέχθηκαν από τον ειδικό γυναικολόγο διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία -80° C, μέχρι την ανάλυση τους. Εκτός της λήψης των βιολογικών δειγμάτων, στις συγκεκριμένες γυναίκες είχαν χορηγηθεί ερωτηματολόγια που αφορούσαν την διατροφή τους. Οι ερωτήσεις εστίαζαν στην εξαγωγή δύο κυρίως τύπων πληροφοριών: την πρόσφατη διατροφή των γυναικών και τις γενικές διατροφικές τους συνήθειες.

6.1. ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ

Ο ορός του αίματος είναι το συστατικό του αίματος που δεν είναι ούτε κύτταρα αίματος, καθώς δεν περιέχει ούτε λευκοκύτταρα ούτε ερυθροκύτταρα, αλλά ούτε και τους παράγοντες πήξης (ινωδογόνο αίματος). Αποτελείται κατά βάση από νερό, ενώ περιέχει εν διαλύσει όλες τις πρωτεΐνες εκτός αυτών που χρησιμοποιούνται στην πήξη του αίματος, μεταλλικά ιόντα, ορμόνες, αντισώματα, αντιγόνα, αλλά και μια μεγάλη ποικιλία χημικά διαφορετικών ενώσεων, μικρού μοριακού βάρους – τους μεταβολίτες. Οι μεταβολίτες παρουσιάζουν μεγάλη διακύμανση στη συγκέντρωση και στη σταθερότητα τους, ενώ συνδέονται με τις πρωτεΐνες του αίματος με μη ομοιοπολικούς δεσμούς.

Πολλές φορές, λανθασμένα, ο ορός συγχέεται με το πλάσμα του αίματος. Η διαφορά τους έγκειται στο γεγονός ότι ο ορός του αίματος δεν περιέχει επιπλέον και τους παράγοντες πήξης σε σχέση με το πλάσμα. Εάν, δηλαδή, χαρακτηρίζαμε το πλάσμα ως το ολικό αίμα μείον τα κύτταρα του αίματος, ο ορός θα ήταν και μείον τους παράγοντες πήξης. Για την παραλαβή του πλάσματος, φυγοκεντρείται νωπό ολικό αίμα, στο οποίο έχει προστεθεί αντιπηκτική ουσία, έως ότου τα κύτταρα του αίματος καταβυθιστούν. Εάν, αντίθετα, στοχεύεται η παραλαβή του ορού του αίματος φυγοκεντρείται, προκειμένου να απομακρυνθούν τα κυτταρικά συστατικά, χωρίς την

προσθήκη αντιπηκτικής ουσίας. Με τον τρόπο αυτό, αποδίδεται ορός χωρίς ινωδογόνο, αν και λίγοι παράγοντες πήξης είναι πιθανό να παραμείνουν.



Σχήμα 6.1. Αναπαράσταση σωληναρίων με αίμα μετά από φυγοκέντρωση στα 2500 rpm για 10 min. Στο σωληνάριο A έχει προστεθεί αντιπηκτική ουσία και παραλαμβάνεται το πλάσμα αίματος στην υπερκείμενη φάση, ενώ στο B δεν έχει προστεθεί αντιπηκτική ουσία και η υπερκείμενη φάση αποτελεί τον ορό.

Ο ορός του αίματος χρησιμοποιείται ευρέως εξαιτίας του γεγονότος ότι παρέχει σημαντικές μεταβολικές πληροφορίες για ένα βιολογικό σύστημα, που αφορούν στη φυσιολογική κατάσταση του οργανισμού ακριβώς τη στιγμή της δειγματοληψίας. Αυτός είναι και ο λόγος που επιλέχθηκε το συγκεκριμένο μεταβολικό υπόστρωμα στην παρούσα εργασία.

6.2. AMNΙΑΚΟ ΥΓΡΟ [1]

Αμνιακό υγρό (human amniotic fluid, HAF) ονομάζεται το άσηπτο, σχεδόν άχρωμο, διαυγές υγρό εμβρυϊκής και μητρικής προέλευσης που αποτελεί το περιεχόμενο της αμνιακής κοιλότητας. Κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης προέρχεται κυρίως από το αίμα της μητέρας, ενώ κατά το δεύτερο τρίμηνο κι έπειτα εμπλουτίζεται συνεχώς από τις εκκρίσεις του εμβρύου. Η ποσότητα του, δηλαδή, δεν παραμένει σταθερή αλλά διαφοροποιείται ανάλογα με την εβδομάδα της κύησης. Ο ρυθμός

διαφοροποίησης δίνεται ενδεικτικά:

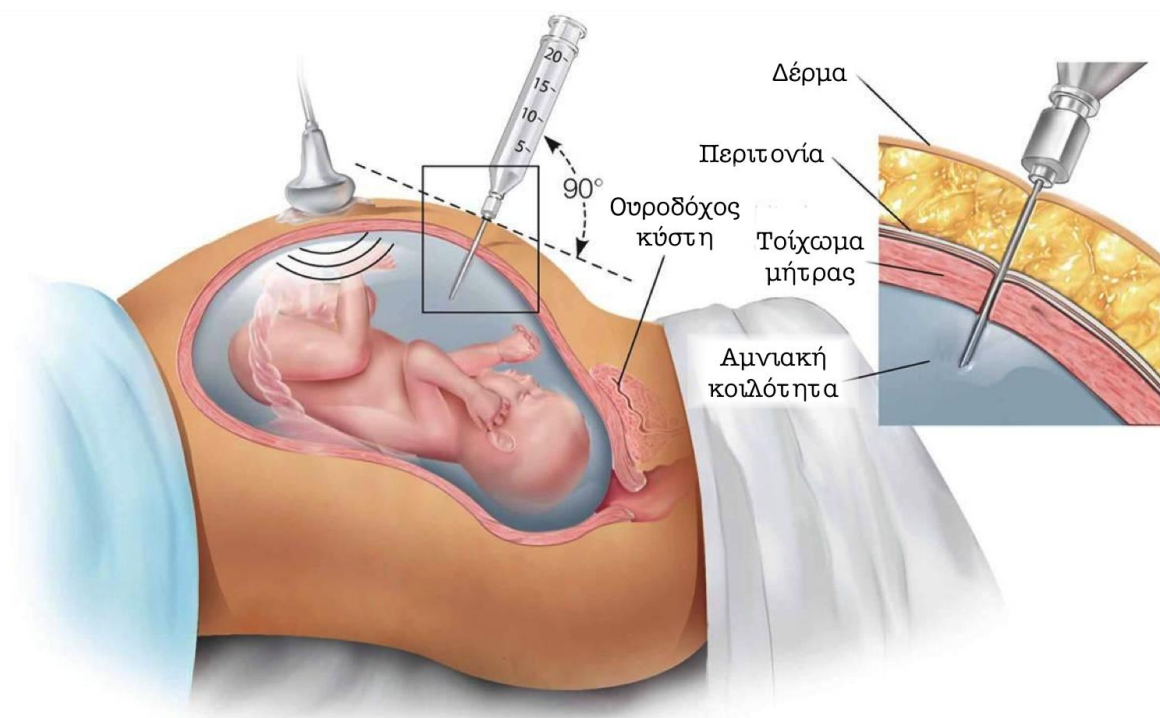
- 7^η εβδομάδα: 30 mL
- 12^η εβδομάδα: 58 mL
- 16^η εβδομάδα: 170 mL
- 20^η εβδομάδα: 350 mL
- 35^η εβδομάδα: 1000 mL ...

Το αμνιακό υγρό ανακυκλώνεται πολύ γρήγορα, έχοντας ένα χρόνο ημιζωής περί των δύο – τριών ωρών. Η ρύθμιση της ποσότητας και της ποιότητας του αμνιακού υγρού εξαρτάται από τον όγκο των αποβαλλόμενων ούρων, των πνευμονικών εκκρίσεων, των εκκρίσεων των υμένων και των δερματικών και στοματικών εκκρίσεων, την ποσότητα κατάποσης από το έμβρυο, την ποσότητα απορρόφησης από τον πλακούντα και τους εμβρυϊκούς υμένες. Αποτελεί, συνεπώς, ένα δυναμικό σύστημα, του οποίου τα χαρακτηριστικά εξαρτώνται και επηρεάζονται από τη διαρκή ανταλλαγή συστατικών μεταξύ του εμβρύου και της μητέρας. Το αμνιακό υγρό δεν αντανακλά επομένως μόνο το περιβάλλον στο οποίο ζει το έμβρυο, αλλά θα μπορούσε να παρέχει και πληροφορίες για την ανάπτυξη ή την παθολογία αυτού. Διάφοροι τύποι κυττάρων, άλατα, ύδωρ, αντιμικροβιακοί παράγοντες, λιπίδια, ορμόνες και πρωτεΐνες συνθέτουν αυτό το υπόστρωμα. Η λήψη αμνιακού υγρού καλείται αμνιοπαρακέντηση και πραγματοποιείται με χρήση βελόνας και λήψη δια μέσου του πρόσθιου κοιλιακού τοιχώματος, μετά την 16^η εβδομάδα της κύησης.

Το συγκεκριμένο βιολογικό υγρό επιλέχθηκε προκειμένου να ελεγχθεί η υπόθεση ότι δυνητικά το αμνιακό υγρό θα μπορούσε να διαδραματίσει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην κατανόηση και τη διάγνωση αρκετών διαταραχών της υγείας τόσο των εμβρύων όσο και των μητέρων. Υπάρχουν στη βιβλιογραφία έρευνες στις οποίες έχει γίνει προσπάθεια να συσχετισθούν τα φάσματα ¹H NMR, για παράδειγμα, με την εμφάνιση χρωμοσωμικών διαταραχών στο έμβρυο ή διαβήτη κύησης στις μητέρες [2]. Επιπλέον, έχουν πραγματοποιηθεί προσπάθειες να ταυτοποιηθούν ενώσεις που εμφανίζονται στα φάσματα NMR του αμνιακού υγρού [3]. Δεν έχει ωστόσο πραγματοποιηθεί κάποια προσπάθεια, σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, να

συσχετισθεί το αμνιακό υγρό με τη διατροφή της μητέρας.

Αξίζει να σημειωθεί πως οι συγκεντρώσεις των συστατικών που περιέχονται στο αμνιακό ποικίλουν ανάλογα με την ηλικία της κύησης και τις διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Επομένως, είναι σημαντικό, ανάλογα με το ζητούμενο της εκάστοτε μελέτης, να υπάρχει ομοιομορφία των δειγμάτων ως προς την ηλικία κύησης κατά την οποία γίνεται λήψη τους.



Σχήμα 6.2. Απεικόνιση του τρόπου εκτέλεσης της αμνιοπαρακέντησης με χρήση βελόνης. Προσαρμοσμένη εικόνα – μετάφραση στα ελληνικά [4].

ΚΕΦ. 7 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ

7.1. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Για τον ορό αίματος και το αμνιακό υγρό που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία δεν ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο προκατεργασίας. Γενικά τα δείγματα αίματος, πλάσματος και ορού, θεωρούνται πολύ πυκνότερα υποστρώματα από αυτά του αμνιακού υγρού ή των ούρων. Πρακτικά αυτό σημαίνει ότι η ποιότητα του φάσματος αναμένεται να είναι καλύτερη όταν αναλύουμε ένα δείγμα αίματος σε σχέση με ένα δείγμα ούρων. Ένας τρόπος αντιμετώπισης του προβλήματος της μεγάλης αραίωσης των δειγμάτων που πρόκειται να αναλυθούν με NMR είναι η λυοφιλίωση τους. Η λυοφιλίωση είναι ένας τρόπος ξήρανσης που επιτυγχάνεται με ψύξη σε πολύ χαμηλή θερμοκρασία, ώστε να παγώσει το περιεχόμενο στο δείγμα νερό. Στη συνέχεια, με εφαρμογή κενού το παγωμένο νερό απομακρύνεται περνώντας από την στερεή απευθείας στην αέρια φάση, χωρίς να περάσει από την υγρή φάση, αφού βρίσκεται κάτω από το τριπλό σημείο του (εξάχνωση). Έχουμε με τον τρόπο αυτό τη δυνατότητα να επαναδιαλύσουμε το δείγμα στον διαλύτη και στον τελικό όγκο που επιθυμούμε.

Τα φάσματα NMR κατά προτίμηση λαμβάνονται υπό μορφή διαλύματος χαμηλού ιξώδους και απαλλαγμένου από στερεά σωματίδια και αιωρήματα. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό δεν πρέπει να απορροφούν στην περιοχή του φάσματος που ενδιαφέρει για την εκάστοτε ανάλυση (στην παρούσα περίπτωση 0~10 ppm). Επιπλέον, χρειάζεται να διαθέτουν καλή διαλυτική ικανότητα και να είναι χημικά αδρανείς, ώστε να μην επηρεάζουν τις χημικές μετατοπίσεις του δείγματος. Προτιμώνται, συνεπώς, διαλύτες άνευ πρωτονίων, όπως είναι οι πλήρως δευτεριωμένοι ή αλογονωμένοι υδρογονάνθρακες. Στην εργασία αυτή επιλέχθηκε το δευτεριωμένο ή βαρύ νερό (D₂O). Καθώς η δευτερίωση των διαλυτών είναι αδύνατο να είναι τέλεια (99 – 99.8%) τα λίγα πρωτόνια που εξακολουθούν να υπάρχουν δίνουν τις αντίστοιχες απορροφήσεις [5]. Προκειμένου, να αποφευχθεί η ανταλλαγή πρωτονίων του περιβάλλοντος με τον δευτεριωμένο διαλύτη είναι ιδιαίτερα σημαντικό κατά το άνοιγμα του φιαλιδίου που τον περιέχει να βεβαιωθούμε ότι δεν έχει σημαντικά διαφορετική θερμοκρασία από τον περιβάλλοντα χώρο.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την προετοιμασία των δειγμάτων ορού

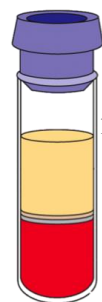
αίματος ήταν επιθυμητό να παραμείνει απλή και σύντομη. Έτσι, λοιπόν, μετά την απομάκρυνση των δειγμάτων ορού από τους -80°C , όπου διατηρήθηκαν από τη στιγμή της λήψης τους, και το πλήρες ξεπάγωμα τους, λήφθηκαν 400 μL και μεταφέρθηκαν σε φιαλίδιο erpendorf. Στο ίδιο φιαλίδιο προστέθηκαν 150 μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pD 7,31) και 50 μL διαλύματος 6 mM της ένωσης αναφοράς για τον ορισμό της κλίμακας χημικής μετατόπισης στα δ 5.994 ppm. Το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών παρασκευάστηκε με διάλυση NaH_2PO_4 και Na_2HPO_4 σε 10 mL D_2O , προκειμένου να προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 0,5 M. Η χρήση ρυθμιστικού διαλύματος σε πειράματα μεταβολομικής με χρήση NMR κρίνεται απαραίτητη, καθώς μικρές διαφοροποιήσεις στο pH των δειγμάτων είναι δυνατό να οδηγήσουν σε διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις, πράγμα που θα καθιστούσε τελικά τα φάσματα μη συγκρίσιμα μεταξύ τους. Μετά από ανακίνηση του μίγματος για 1 min σε vortex ακολουθεί φυγοκέντριση για 10 min στα 12000 g στους 4°C . Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, 550 μL από το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρονται σε σωλήνα NMR 5 mm. Σημειώνουμε στο σημείο αυτό ότι κάθε μέρα προετοιμάζονταν τα δείγματα που επρόκειτο να αναλυθούν κατά τυχαία σειρά και διατηρούνταν στο ψυγείο. Τα δείγματα περίπου 20 min πριν την εισαγωγή τους στο φασματομέτρο προς ανάλυση απομακρύνονταν από το ψυγείο, ώστε κατά την εισαγωγή τους να έχουν επανέλθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων αμνιακού υγρού χρησιμοποιήθηκαν 500 μL δείγματος, μετά την απομάκρυνση του από τους -80°C και το πλήρες ξεπάγωμα του. Αυτή η ποσότητα μεταφέρθηκε σε erpendorf, το οποίο βυθίστηκε σε λουτρό υγρού αζώτου ($\theta = -196^{\circ}\text{C}$). Αφού πάγωσε όλη η ποσότητα του αμνιακού υγρού που περιεχόταν στο erpendorf, το φιαλίδιο μεταφέρθηκε άμεσα στην συσκευή λυοφιλίωσης, όπου και παρέμεινε μέχρι την απόλυτη ξήρανση του. Ο χρόνος που χρειάζονταν τα δείγματα ώστε να φτάσουν στην απόλυτη ξήρανση τους διαπιστώθηκε με τη μέθοδο των επαναλαμβανόμενων ζυγίσεων και βρέθηκε πως είναι οι 5 h. Για το λόγο αυτό όλα τα δείγματα παρέμεναν στη συσκευή λυοφιλίωσης για αυτό το χρονικό διάστημα. Μετά την απομάκρυνση των δειγμάτων, ακολουθεί επαναδιάλυση σε 450 μL D_2O και προσθήκη 100 μL του ρυθμιστικού διαλύματος ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 0.5 M (pD 7,31) και 50 μL 6 mM του δινάτριου άλατος του μηλεϊνικού οξέος για τον ορισμό της κλίμακας χημικής μετατόπισης. Μετά από

ανακίνηση του μίγματος για 1 min (vortex) ακολουθεί φυγοκέντριση για 10 min στα 12000 g στους 4° C. Σε σωλήνα NMR 5 mm μεταφέρονται 550 μ L από το προκύπτον υπερκείμενο διάλυμα. Η συσκευή λυοφιώσεως που χρησιμοποιήθηκε είναι οκτώ θέσεων, συνεπώς κάθε μέρα προετοιμάζονταν οκτώ τυχαία επιλεγμένα δείγματα, τα οποία διατηρούνταν στο ψυγείο μέχρι 20 min πριν την ανάλυση τους, προκειμένου να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου, προτού εισέλθουν στο φασματόμετρο.

Η ένωση αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε είναι το δινάτριο άλας του μηλεϊνικού οξέος (sodium maleate dibasic). Η ένωση αυτή επιλέχθηκε μετά από βιβλιογραφική έρευνα και προκαταρκτικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν. Η αρχική σκέψη ήταν η χρήση του τετραμεθυλοσιλανίου (tetramethylsilane, TMS) ως ένωση αναφοράς. Η ένωση αυτή είναι η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη ένωση αναφοράς στη φασματοσκοπία NMR, εξαιτίας της χημικής της αδράνειας, του συντονισμού της σε μεγαλύτερες τιμές πεδίου από όλες τις συνηθισμένες οργανικές ενώσεις δίνοντας μια έντονη ταινία απορρόφησης και της εύκολης ανάμιξης της με τις περισσότερες οργανικές ενώσεις. Το γεγονός, όμως, ότι εμφανίζει χαμηλή διαλυτότητα στο νερό δεν επέτρεψε την χρήση της στην παρούσα εφαρμογή. Το μειονέκτημα της διαλυτότητας σε υδατικά διαλύματα, σε συμβατικά πειράματα NMR, το επιλύει η ένωση DSS (4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid), η οποία είναι απόλυτα διαλυτή στο νερό. Ωστόσο, και αυτή απορρίφθηκε, καθότι τα υδρογόνα που υπάρχουν στο μόριο της δίνουν απορροφήσεις σε περιοχές χημικών μετατοπίσεων που ενδιαφέρουν σε μια μεταβολομική μελέτη. Στη συνέχεια δοκιμάστηκε το 3-(τριμεθυλοσίλυλο)προπανοϊκό οξύ (3-(trimethylsilyl)propanoic acid, TSP). Το συγκεκριμένο εσωτερικό πρότυπο εγκαταλείφθηκε εξαιτίας της χημικής αλληλεπίδρασης που εμφανίζει με τις πρωτεΐνες του ορού [6]. Πρακτικά αυτό που παρατηρήθηκε στα ληφθέντα φάσματα που έγινε χρήση του συγκεκριμένου εσωτερικού προτύπου ήταν η σταδιακή μείωση της έντασης των ληφθέντων σημάτων του εσωτερικού προτύπου κατά την παραμονή ενός δείγματος στο ψυγείο μέχρι την ανάλυση του, εντός της ημέρας. Τα παραπάνω προβλήματα οδήγησαν στην επιλογή του δινάτριου άλατος του μηλεϊνικού οξέος για το σκοπό αυτό, που έδειξε να αίρει τα μειονεκτήματα των υπολοίπων, χωρίς να προσθέτει επιπλέον δυσκολίες.

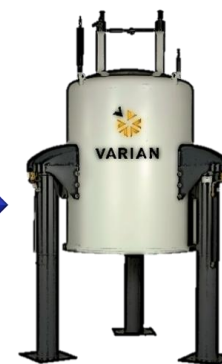
Ορός αίματος



400 μL ορός
+
150 μL ρυθμιστικό 0.5 M D_2O
(NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4)
+
50 μL $\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_4\text{Na}_2$ 6 mM

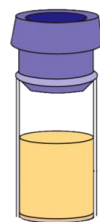


Ανακίνηση & Φυγοκέντρωση



- Varian 600 MHz NMR φασματογράφος
- $^1\text{H}\{^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\}$ 5 mm PFG Automatable Triple Resonance probe
- CPMG παλμός
- 128 σαρώσεις σε φάσμα εύρους 6613,8 Hz
- Συμπύεση του σήματος του διαλύτη (H_2O) με εφαρμογή ακολουθίας παλμών Presat

Αμνιακό υγρό



500 μL
HAF



Λυοφιλίωση



Επαναδιάλυση:
450 μL D_2O
+
100 μL ρυθμιστικό 0.5 M D_2O
(NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4)
+
50 μL $\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_4\text{Na}_2$ 6 mM



Ανακίνηση & Φυγοκέντρωση



Σχήμα 7.1. Γράφημα απεικόνισης της πορείας που ακολουθήθηκε για την προετοιμασία των δειγμάτων και την ανάλυση αυτών με φασματοσκοπία NMR.

7.2. ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΛΕΠΤΟΜΕΡΕΙΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ NMR

Εξαιρετικά κρίσιμο σημείο κατά την εκτέλεση πειραμάτων μεταβολομικής με τη βοήθεια της τεχνολογίας NMR, όπως άλλωστε συμβαίνει και με όλες τις μελέτες μεταβολομικής, είναι η διατήρηση επαναλήψιμων συνθηκών καθ' όλη τη διάρκεια των εκτελούμενων πειραμάτων. Αυτό στοχεύει στη λήψη φασμάτων όπου πρακτικά η μόνη παρατηρούμενη διαφορά θα οφείλεται μόνο στις βιολογικές διαφορές που εμφανίζουν μεταξύ τους τα διάφορα δείγματα. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό γίνεται προσπάθεια βελτιστοποίησης των συνθηκών ανάλυσης, οι οποίες θα διατηρηθούν σταθερές κατά την ανάλυση ολόκληρης της σειράς δειγμάτων, πριν την εκκίνηση των πειραμάτων. Έτσι, λοιπόν, χρησιμοποιούμε ένα ή δύο αντιπροσωπευτικά δείγματα αρχικά και αναζητούμε τις βέλτιστες παραμέτρους για την ανάλυση αυτών. Παράμετροι που χρειάζεται να ληφθούν υπόψιν και να βελτιστοποιηθούν είναι οι ακόλουθες [7]:

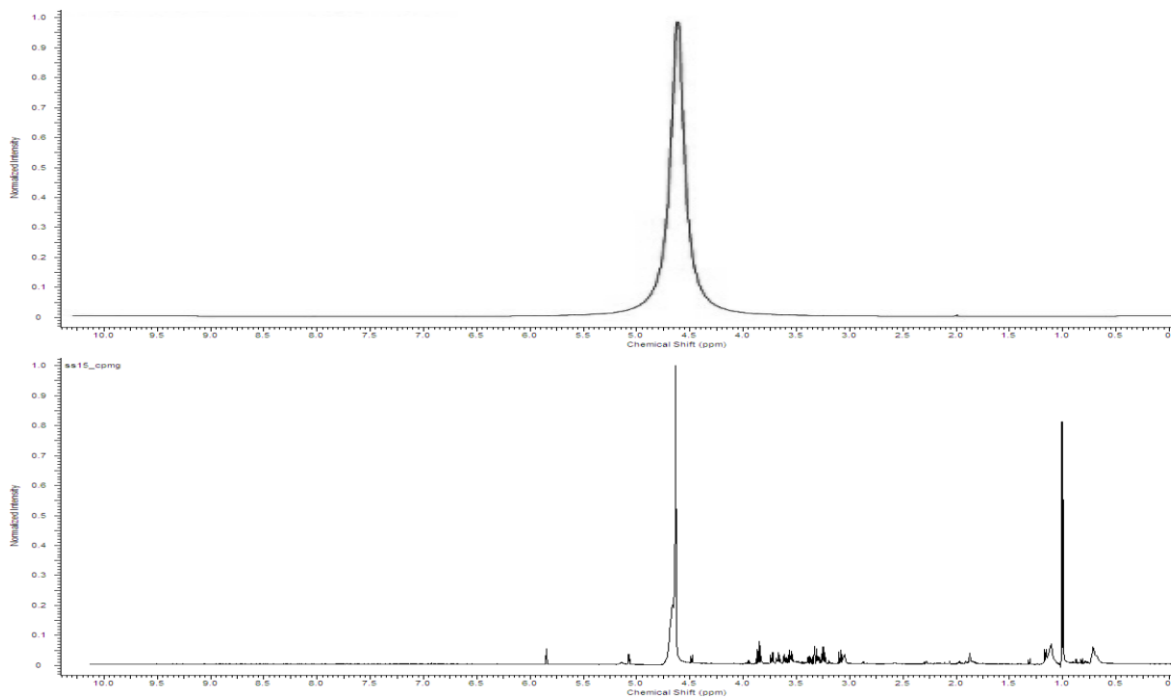
- σταθεροποίηση και ομογενοποίηση του πεδίου για τον πυρήνα που ενδιαφέρει και το διαλύτη που χρησιμοποιείται στα πειράματα (lock power, LK Power και lock gain, LK Gain),
- διάρκεια της περιόδου προετοιμασίας ή της καθυστέρησης αποδιέγερσης (relaxation delay, d1),
- διάρκεια της περιόδου ακτινοβολήσης (observe pulse, pw),
- βαθμονόμηση του παλμού των 90° , από όπου προκύπτει η διάρκεια της περιόδου ακτινοβολήσης pw (90° pulse calibration, pw90)
- διάρκεια λήψης του σήματος NMR (acquisition time, at),
- εύρος της περιοχής σε Hz όπου μετρούνται τα σήματα/φασματικό πλάτος (spectral with, sw),
- αριθμός επαναλαμβανόμενων εκτελέσεων της ακολουθίας του παλμού/σαρώσεις (requested scans, nt),
- ενίσχυση του ληφθέντος σήματος πριν την ψηφιοποίηση (receiver gain, gain) και
- αριθμός σημείων που αποτελούν το ψηφιοποιημένο σήμα του NMR (complex points, np).

Επιπλέον, προκειμένου να καταστεί δυνατή η αποτελεσματική παρακολούθηση μεγαλύτερου εύρους συγκεντρώσεων μεταβολιτών, απαιτείται η καταστολή του σήματος του νερού (water suppression), που πραγματοποιείται με εφαρμογή του παλμού PRESAT. Η συμπίεση αυτή του σήματος του νερού δεν είναι δυνατό να είναι πλήρης, καθώς ο ισχυρός παλμός που θα εφαρμοζόταν για το σκοπό αυτό θα επηρέαζε σημαντικά και τις γειτονικές κορυφές. Ιδανικά επιθυμούμε η κορυφή του νερού να μειώνεται τόσο ώστε να είναι ίση ή και μικρότερη από την υψηλότερη κορυφή κάποιου μεταβολίτη του φάσματος [8]. Για το σκοπό αυτό, γίνονται δοκιμές στα αντιπροσωπευτικά αυτά δείγματα ώστε να προσδιοριστεί τόσο η βέλτιστη ισχύς του παλμού (presat power), όσο και η ακριβής περιοχή (presat frequency), όπου χρειάζεται να εφαρμοστεί ο παλμός αυτός.

Πίνακας 2.1. Παράμετροι λειτουργίας του φασματομέτρου NMR κατά την εκτέλεση των δύο σειρών πειραμάτων (1^{ος} πίνακας: ορός αίματος, 2^{ος} πίνακας: αμνιακό υγρό).

Ορός Αίματος		Αμνιακό Υγρό	
NMR παράμετροι	Βέλτιστες τιμές	NMR παράμετροι	Βέλτιστες τιμές
LK Power	33	LK Power	28
LK Gain	28	LK Gain	22
Lock	~ 40	Lock	~ 60
Solvent	D ₂ O - 10%	Solvent	D ₂ O
Spectral width	6613,8 Hz -1,0 - 10,0 ppm	Spectral width	7225,4 Hz -1,0 - 10,0 ppm
Acquisition time	4,838 s	Acquisition time	4,429 s
Complex points	32000	Complex points	32000
Requested scans	128	Requested scans	256
Temperature	25° C	Temperature	25° C
Relaxation delay	6,0 s	Relaxation delay	4,0 s
Observe pulse	10,47 μs	Observe pulse	10,00 μs
Receiver gain	30 dB	Receiver gain	30 dB
PRESAT Power	4 dB	PRESAT Power	0 dB
PRESAT Frequency	-224,4 Hz	PRESAT Frequency	-217,9 Hz
PRESAT Delay	2 s	PRESAT Delay	2 s
Time	27 min 50 sec	Time	45 min 23 sec

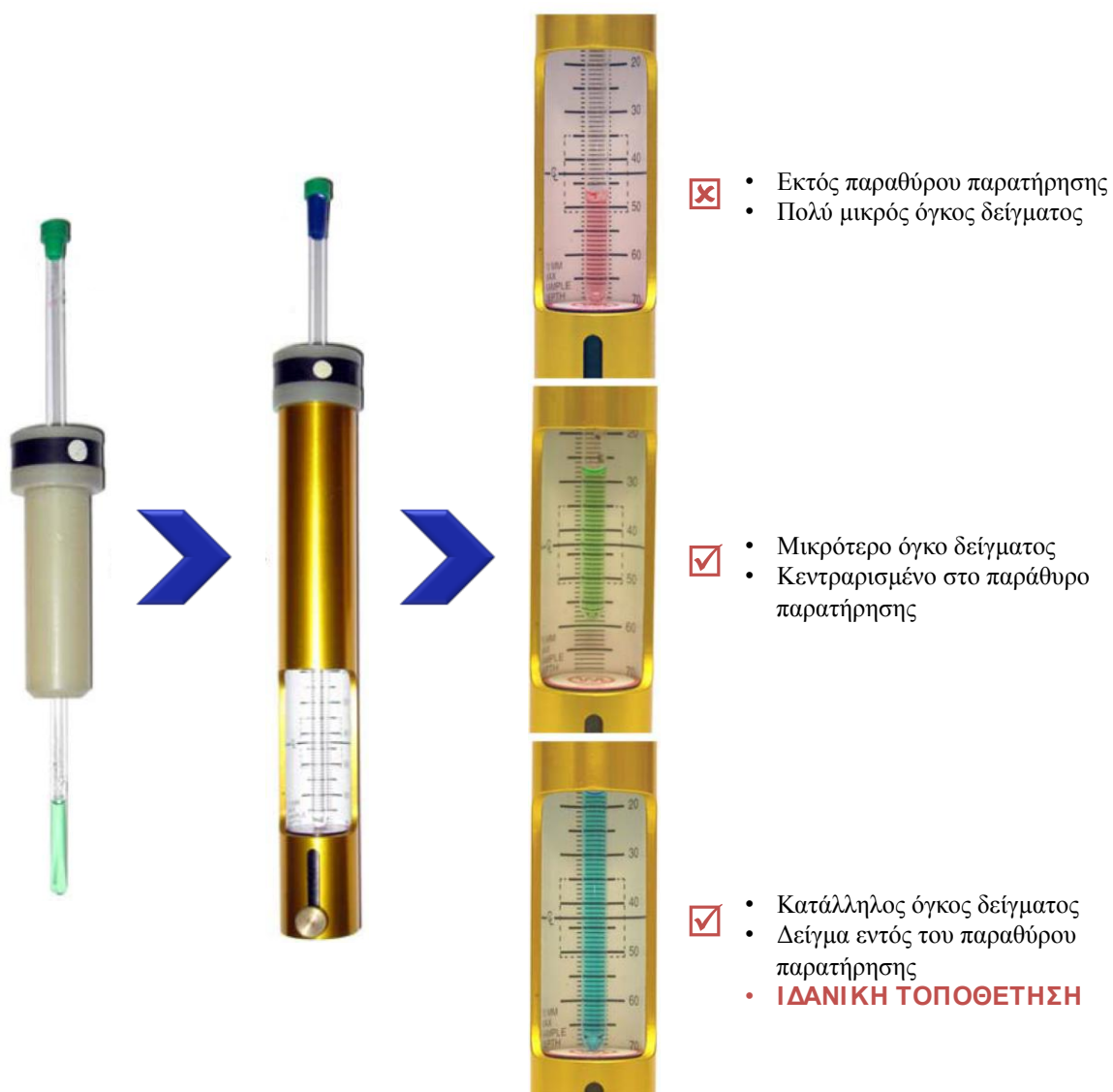
Τέλος, σε βιολογικά δείγματα με μεγάλη περιεκτικότητα σε μακρομοριακές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους (πρωτεΐνες) εφαρμόζεται ο παλμός των Carr – Purcell – Meiboom – Gill, γνωστός ως CPMG. Τα μακρομόρια παράγουν ιδιαίτερα ευρύς συντονισμούς, λόγω της περιορισμένης περιστροφικής τους ικανότητας και των μικρών χρόνων εφησυχασμού. Για το λόγο αυτό δημιουργούν προβλήματα κατά τη φασματική ερμηνεία. Ο παλμός αυτός, λοιπόν, απομακρύνει τις ευρείες απορροφήσεις που δίνουν οι υπάρχουσες πρωτεΐνες σε δείγματα αίματος για παράδειγμα, ενώ εμπεριέχει και τον παλμό PRESAT, στον οποίο έγινε αναφορά παραπάνω. Με τον τρόπο αυτό διευκολύνεται η παρατήρηση των υπολοίπων μεταβολιτών μικρότερου μοριακού βάρους που υπάρχουν επίσης στο δείγμα. Ο χρόνος λήψης ενός φάσματος αυξάνεται με την εφαρμογή του παλμού CPMG, συγκριτικά με ένα απλό ^1H NMR φάσμα, ωστόσο η ‘θύσια’ αυτή οδηγεί σε πολύ πιο πλούσια σε πληροφορία φάσματα [9]. Επιπλέον, παύει η αναγκαιότητα της απομάκρυνσης των πρωτεϊνών σε επιπλέον στάδια κατά την προκατεργασία των δειγμάτων, κάτι που προσέθετε επιπλέον στάδια και, συνεπώς, επιπλέον σφάλματα στην ανάλυση. Στο σχήμα 7.2. παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της εφαρμογής του συγκεκριμένου παλμού σε ένα από τα πραγματικά δείγματα ορού αίματος της μελέτης μας και γίνεται σαφής η αναγκαιότητα της εφαρμογής αυτού. Πριν την εφαρμογή του παλμού CPMG, στο λαμβανόμενο φάσμα υπήρχε μία μόνο πολύ ευρεία απορρόφηση που επισκίαζε οτιδήποτε άλλο, αυτή του νερού. Μόνο έπειτα από την εφαρμογή του παλμού καθίσταται δυνατή η παρατήρηση των λοιπών μεταβολιτών του δείγματος.



Σχήμα 7.2. Το πραγματικό φάσμα ενός δείγματος ορού αίματος της παρούσας μελέτης, πριν την καταστολή του σήματος του νερού (πάνω φάσμα) και έπειτα από την εφαρμογή του παλμού CPMG (κάτω φάσμα).

Στα πλαίσια της επαναληψιμότητας των συνθηκών ανάλυσης, χρήσιμο θα ήταν να γίνει αναφορά και στον τρόπο με τον οποίο γίνεται η εισαγωγή του δείγματος στο φασματόμετρο NMR. Το ειδικό, αυστηρών διαστάσεων, κυλινδρικό, μαγνητικά ισότροπο, γυάλινο σωληνάκι NMR, στο οποίο έχει τοποθετηθεί το δείγμα κατά την προκατεργασία, ανακινείται ελαφρά πριν την τοποθέτηση του στο φασματόμετρο. Παρατηρήθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας ότι η μη ανακίνηση όλου του όγκου του περιεχόμενου διαλύματος έχει σαν αποτέλεσμα την λήψη φάσματος χαμηλότερης ποιότητας. Στη συνέχεια, το σωληνάκι προσαρμόζεται σε κατάλληλο πλαστικό εξάρτημα, που ονομάζεται περιστροφέας (spinner) (Σχήμα 7.3). Μαζί με τον περιστροφέα, το σωληνάκι τοποθετείται στον υποδοχέα δείγματος του φασματομέτρου NMR, ‘επιπλέοντας’ ουσιαστικά πάνω σε ένα ρεύμα αέρα. Το ρεύμα αυτό αέρα που υπάρχει στο κέντρο του μαγνήτη και εξέρχεται από το πάνω του άκρο, με μείωση της έντασης του εναποθέτει το σωληνάκι στο κέντρο του ισχυρού ομογενούς μαγνητικού πεδίου, αποτρέποντας την είσοδο μικροσωματιδίων εντός του μαγνήτη. Με τη βοήθεια

αυτού του ρεύματος αέρα είναι δυνατό να επιτευχθεί και περιστροφή του δείγματος, αίροντας τυχόν ανομοιογένεια του πεδίου στα διάφορα σημεία του δείγματος [5]. Ωστόσο, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, επιλέχθηκε να μη χρησιμοποιηθεί η περιστροφή, καθώς είναι πιθανό να οδηγούμασταν σε λήψη δορυφορικών σημάτων (spinning side bands) των κορυφών των μεταβολιτών, πράγμα που θα περιέπλεκε κατά πολύ την ανάλυση μας.



Σχήμα 7.3. Δείγμα στον περιστροφέα (spinner) και υπόδειξη κατάλληλης τοποθέτησης του σωλήνα NMR ώστε να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή ποιότητα φάσματος.

ΚΕΦ. 8 ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΛΗΦΘΕΝΤΩΝ ΦΑΣΜΑΤΩΝ [10], [11]

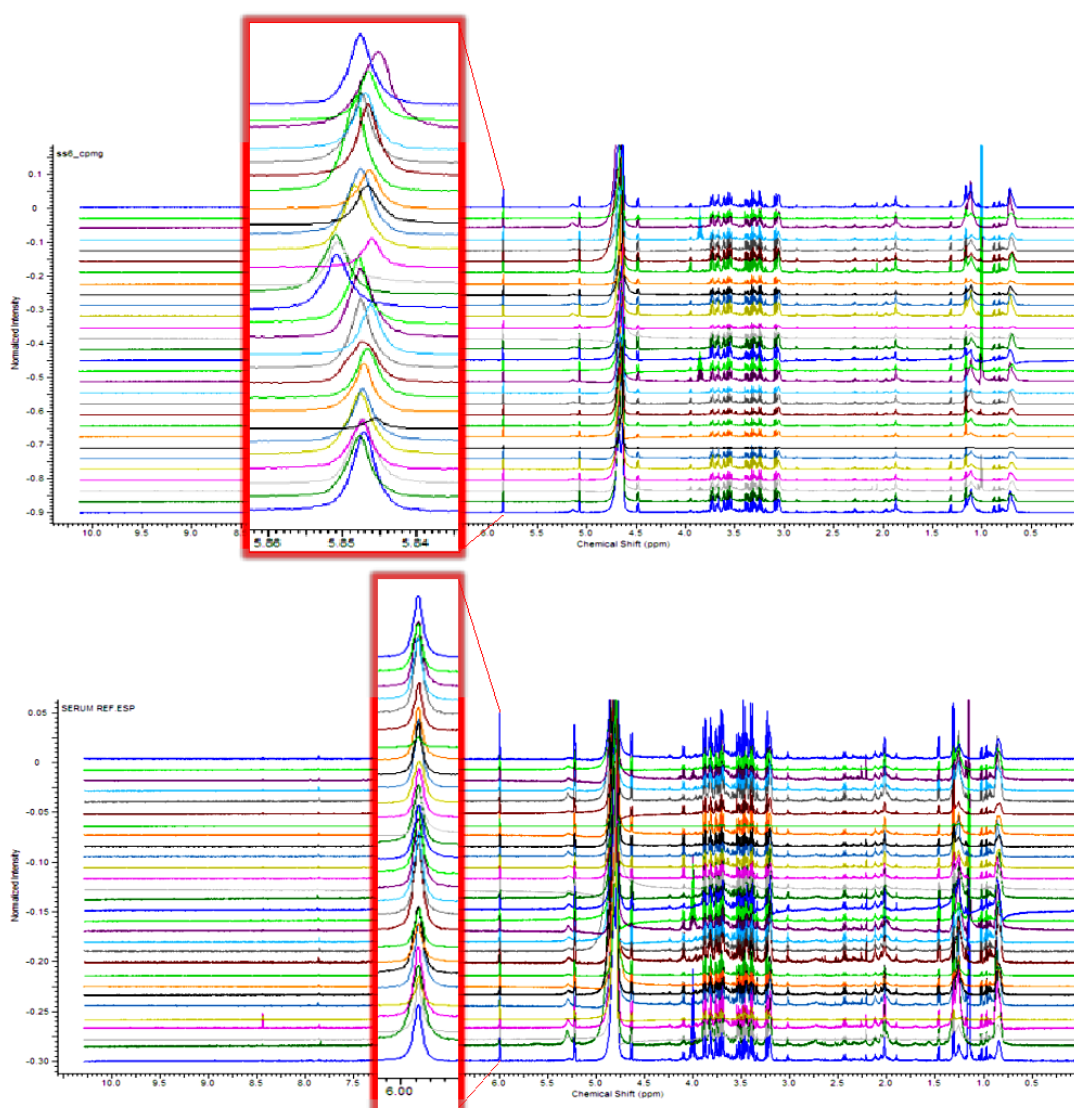
Η προεπεξεργασία των φασμάτων μπορεί να θεωρηθεί ως ένα ενδιάμεσο στάδιο ανάμεσα στην καταγραφή των φασμάτων και στην στατιστική τους ανάλυση. Το στάδιο αυτό είναι αναγκαίο ώστε να μειωθούν οι διακυμάνσεις μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων και οι επιρροές που θα μπορούσαν να δημιουργήσουν πρόβλημα στη μετέπειτα στατιστική ανάλυση. Τέτοιες συχνές επιρροές σε μια μελέτη μεταβολομικής βιολογικών δειγμάτων βασισμένη στο NMR είναι οι ποικίλες βασικές γραμμές και οι λανθασμένες φάσεις, οι διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις των δειγμάτων και οι ελαφρές μετατοπίσεις των χημικών απορροφήσεων διαφόρων μεταβολιτών. Οι διορθώσεις που έλαβαν χώρα στην συγκεκριμένη μελέτη περιγράφονται και σχολιάζονται αναλυτικά παρακάτω.

8.1. ΣΤΟΙΧΙΣΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΕΝΩΣΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Η προεπεξεργασία των φασμάτων NMR είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί είτε εφαρμόζοντας τους ίδιους αλγορίθμους στα μεμονωμένα φάσματα είτε υπερθέτοντας όλα τα φάσματα και εφαρμόζοντας κάθε αλγόριθμο ταυτόχρονα στο σύνολο τους. Όταν ο χειρισμός των φασμάτων γίνεται ταυτόχρονα, επιδρούν ακριβώς οι ίδιοι αλγόριθμοι με τις ακριβώς ίδιες παραμέτρους σε όλα τα φάσματα. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγονται διαφοροποιήσεις που πιθανόν να προκύψουν εξαιτίας των εφαρμοζόμενων αλγορίθμων της προεπεξεργασίας. Αυτό τον ταυτόχρονο χειρισμό επιτρέπουν και τα δύο λογισμικά προεπεξεργασίας που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία αυτή και αποτελεί τη μέθοδο που τελικά προτιμήθηκε.

Αφού, λοιπόν, βρεθούν όλα τα φάσματα σε υπέρθεση, παρατηρείται η ύπαρξη μικρών διαφοροποιήσεων στις χημικές μετατοπίσεις από φάσμα σε φάσμα (Σχήμα 8.1, άνω). Προκειμένου να προχωρήσουμε στην προεπεξεργασία και στην μετέπειτα στατιστική ανάλυση είναι απαραίτητο να βαθμονομήσουμε τον άξονα των χημικών μετατοπίσεων όλων των φασμάτων με τον ίδιο τρόπο. Η βαθμονόμηση αυτή επιτυγχάνεται με χρήση της ένωσης αναφοράς, που περιέχεται σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν. Στην περίπτωση της συγκεκριμένης μελέτης, όπως αναφέρθηκε και

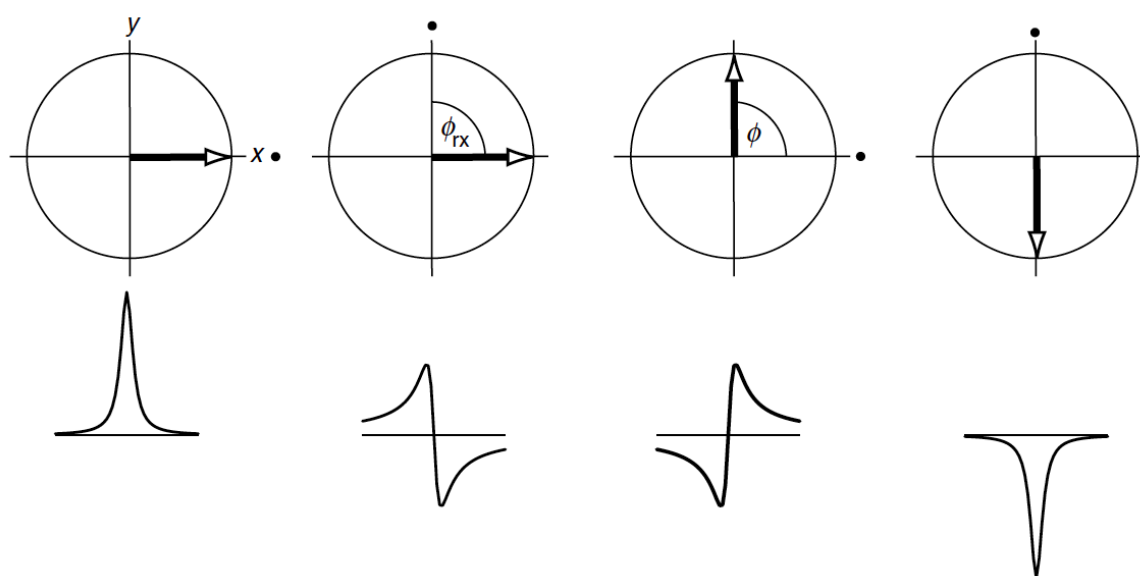
προηγουμένως, χρησιμοποιήθηκε για τον ορισμό του άξονα των χημικών μετατοπίσεων στα δ 5.994 ppm το δινάλτριο άλας του μηλεϊνικού οξέος. Το αποτέλεσμα της βαθμονόμησης είναι η κατακόρυφη στοίχιση όλων των φασμάτων (Σχήμα 8.1, κάτω). Ωστόσο, ακόμα κι έπειτα από μια ορθή βαθμονόμηση των φασμάτων είναι δυνατό να παρατηρούνται μικρές διακυμάνσεις στις χημικές μετατοπίσεις ορισμένων κορυφών (π.χ. ιστιδίνες), εξαιτίας μικρών διαφορών στο pH των δειγμάτων ή στην ιονική ισχύ αυτών. Χρειάζεται να υπογραμμιστεί στο σημείο αυτό πως ορθή στοίχιση των φασμάτων είναι απολύτως αναγκαία για να θεωρηθεί η αναγνώριση κάποιου μεταβολίτη αξιόπιστη.



Σχήμα 8.1. Πραγματικά φάσματα ορού αίματος της παρούσας μελέτης πριν (πάνω) και μετά (κάτω) την βαθμονόμηση της κλίμακας των χημικών μετατοπίσεων. Τα στιγμιότυπα έχουν ληφθεί από το λογισμικό *ACD/NMR Processor*.

8.2. ΔΙΟΡΘΩΣΗ ΤΗΣ ΦΑΣΗΣ ΤΩΝ ΦΑΣΜΑΤΩΝ

Συνήθως, τα φάσματα NMR απαιτούν μια διόρθωση φάσης, ώστε να επιτευχθούν καλά σχηματισμένες γραμμές απορροφήσεων, για όλες τις κορυφές των φασμάτων NMR. Οι κορυφές που λαμβάνονται σε ένα φάσμα NMR χρειάζεται να είναι όσο το δυνατόν πιο στενές και συμμετρικές. Αυτό δεν είναι κάτι που συμβαίνει πάντοτε και σε όλες τις κορυφές ενός φάσματος. Εκτός από τις προσπάθειες προς αυτή την κατεύθυνση που πραγματοποιούνται κατά την ανάλυση των δειγμάτων, η φάση χρειάζεται να διορθωθεί υπολογιστικά κατά το στάδιο της προεπεξεργασίας. Είναι σημαντικό να γίνει κατανοητό ότι η σωστή ή λανθασμένη φάση δεν αναφέρεται στο σύνολο του φάσματος, αλλά σε κάθε κορυφή ξεχωριστά.

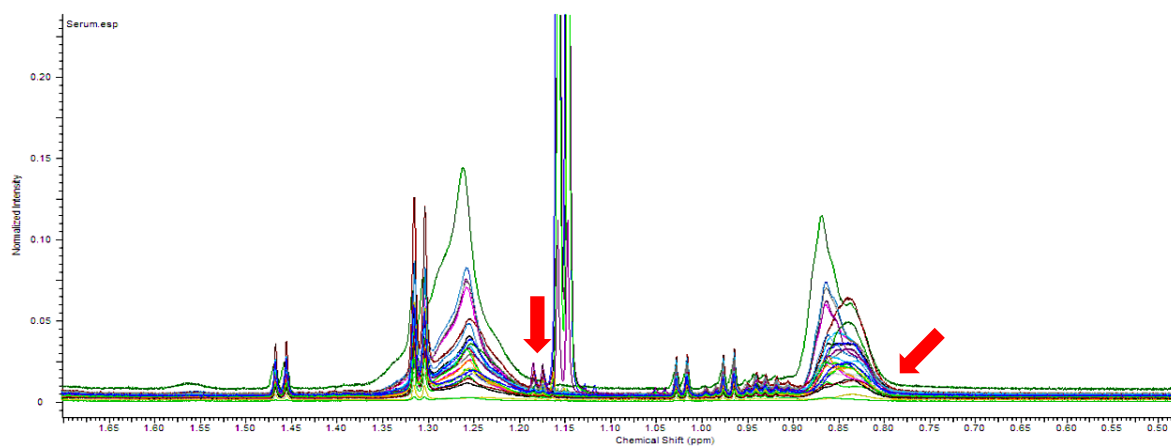
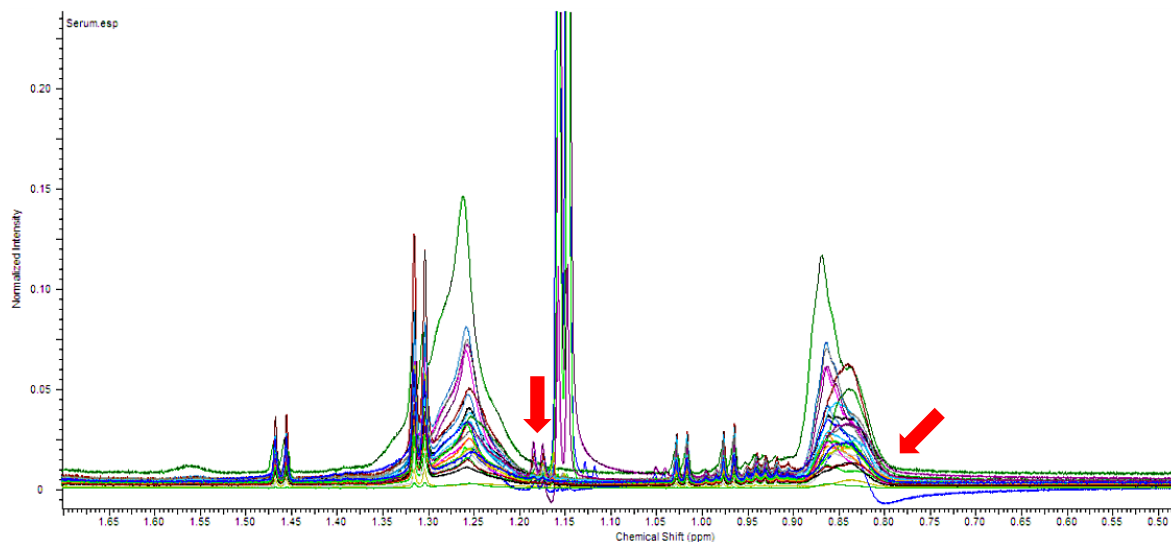


Σχήμα 8.2. Διαγραμματική αναπαράσταση των πιθανών φάσεων που είναι δυνατό να απαντηθούν σε ένα φάσμα NMR. Το επιθυμητό αποτέλεσμα είναι το πρώτο φάσμα, ενώ οι υπόλοιπες τρεις μορφές χρήζουν διόρθωσης κατά την προεπεξεργασία. Το διάνυσμα στο πάνω μέρος της εικόνας αναπαριστά τη θέση του μαγνητικού πεδίου σε χρόνο $t=0$, ενώ η τελεία δείχνει τον άξονα κατά τον οποίο ο δέκτης/ανιχνευτής είναι ευθυγραμμισμένος.

Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη ενότητα, η εφαρμογή του λογαρίθμου διόρθωσης της φάσης του φάσματος είναι δυνατό να εφαρμοστεί είτε σε μεμονωμένα

φάσματα, είτε στο σύνολο τους. Και στην περίπτωση αυτή προτιμάται η εφαρμογή του αλγορίθμου ταυτόχρονα στο σύνολο των φασμάτων, ώστε να εξασφαλιστεί η ομοιομορφία και η δυνατότητα σύγκρισης των φασμάτων μεταξύ τους. Επιπλέον, η διόρθωση της φάσης δύναται να πραγματοποιηθεί είτε χειροκίνητα από το χρήστη του λογισμικού, είτε αυτοματοποιημένα. Ο χειροκίνητος χειρισμός κατά την ταυτόχρονη κατεργασία ενός σημαντικού αριθμού δειγμάτων, δεν αποτελεί εύκολη υπόθεση. Από την άλλη μεριά, ο αυτοματοποιημένος χειρισμός δίνει τη δυνατότητα στο χρήστη να επιλέξει μεταξύ μιας σειράς αλγορίθμων. Σε κάθε λογισμικό, συναντώνται διαφορετικοί αλγόριθμοι για το σκοπό αυτό και απαιτείται η κρίση του χρήστη ώστε να επιλέξει αυτόν που παρέχει τη βέλτιστη διόρθωση στα φάσματα της εκάστοτε μελέτης. Αξίζει να σημειωθεί πως μη αποτελεσματική διόρθωση φάσης επιδρά αρνητικά στην τελική εμβαδομέτρηση των κορυφών, κι επομένως και στην πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση.

Από τους τρεις αλγορίθμους διόρθωσης της φάσης που παρέχει το λογισμικό ACD/NMR Processor βέλτιστα αποτελέσματα στα συγκεκριμένα φάσματα που μελετήθηκαν προκύπτουν κατά την εφαρμογή της αυτοματοποιημένης απλής διόρθωσης της φάσης (Auto Phasing Simple). Τόσο τα αποτελέσματα από τους δύο άλλους αλγορίθμους (Auto Phasing by Baseline Optimization και Auto Phasing by Symmetrical Lines), όσο και από το χειροκίνητο χειρισμό δεν κρίθηκαν ικανοποιητικά, ώστε να συνεχίσουμε στα επόμενα στάδια της προεπεξεργασίας. Αντιστοίχως, από τους τρεις αλγορίθμους που παρέχει το MestReNova (Global method, Metabolomics, Selective method) και τους πιθανούς συνδυασμούς τους, καταλληλότερος κρίθηκε ο αλγόριθμος Metabolomics για τα δείγματα αμνιακού υγρού και ο Global για τα δείγματα ορού αίματος.



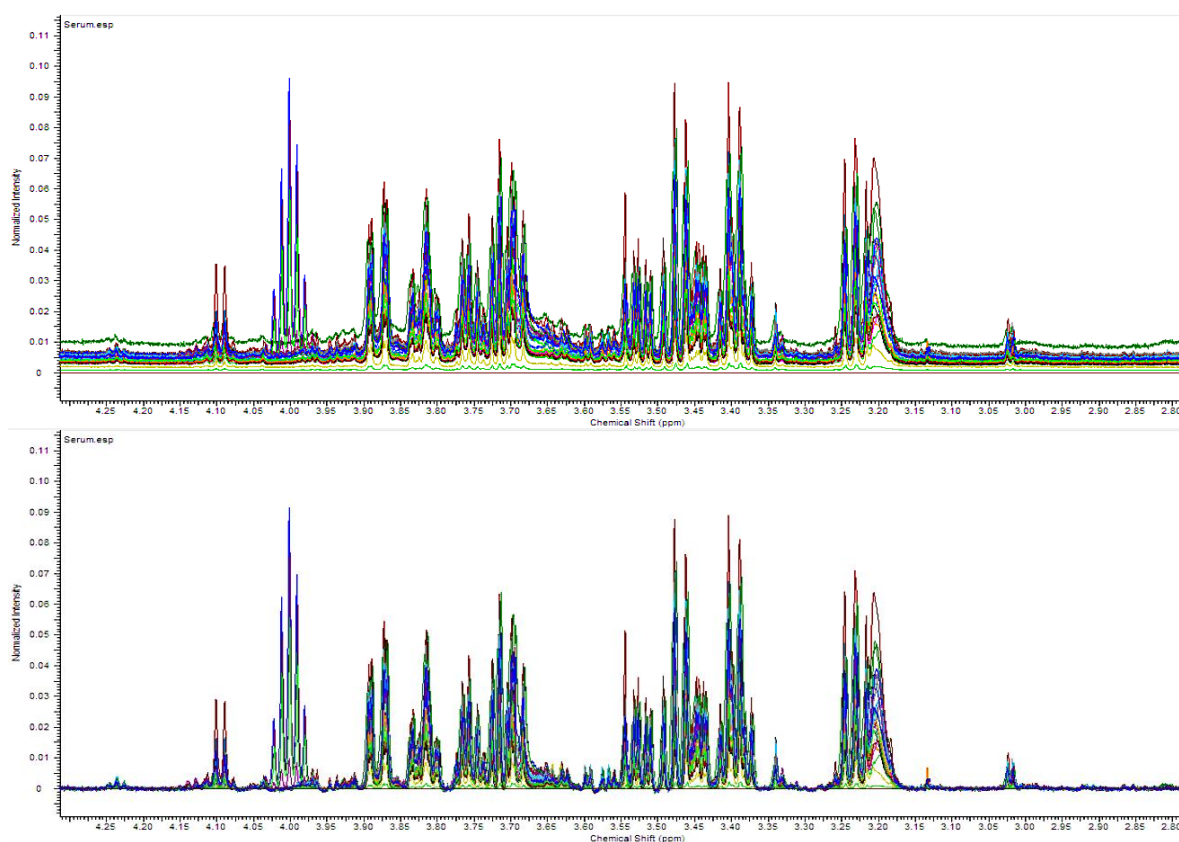
Σχήμα 8.3. Πραγματικά φάσματα (0,50 – 1,70 ppm) ορού αίματος της παρούσας μελέτης πριν (πάνω) και μετά (κάτω) την διόρθωση φάσης που εφαρμόστηκε στο σύνολο των φασμάτων στο ACD/NMR Processor. Τα κόκκινα βέλη υποδεικνύουν τις περιοχές όπου η λανθασμένη φάση ορισμένων φασμάτων δημιούργησε εντονότερο πρόβλημα.

8.3. ΔΙΟΡΘΩΣΗ ΤΗΣ ΒΑΣΙΚΗΣ ΓΡΑΜΜΗΣ

Το τρίτο στάδιο κατά την προεπεξεργασία των φασμάτων ώστε να προκύψουν συγκρίσιμα και αξιόπιστα δεδομένα είναι η διόρθωση της βασικής γραμμής τους. Η βασική γραμμή αποτελεί την θεωρητική γραμμή η οποία ενώνει μεταξύ τους τα σημεία του φάσματος που δεν αποτελούν κορυφές. Η ελάχιστη απαίτηση για τη βασική γραμμή είναι να τέμνει στο σημείο 0 τον άξονα y . Ωστόσο, οι αλγόριθμοι που εφαρμόζονται είναι περισσότερο πολύπλοκοι, χρησιμοποιώντας μαθηματικές ή πολυωνυμικές συναρτήσεις ώστε να επιτύχουν να ‘κατεβάσουν’ την βασική γραμμή στο μηδέν σε όλη την έκταση του φάσματος. Καθώς οι εντάσεις και τα εμβαδά των κορυφών υπολογίζονται με βάση το μηδέν, γίνεται αντιληπτό ότι μη επαρκής διόρθωση της βασικής γραμμής παρέχει στρεβλωμένα αποτελέσματα, με δυσμενή επίδραση στην επακόλουθη στατιστική ανάλυση.

Όμοια με τη διόρθωση φάσης, που αναπτύχθηκε παραπάνω, και η διόρθωση της βασικής γραμμής είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί είτε χειροκίνητα, είτε αυτοματοποιημένα. Στο λογισμικό ACD/NMR Processor εμφανίζονται τρεις αυτοματοποιημένες μέθοδοι διόρθωσης της βασικής γραμμής: polynomial, FID Reconstruction, Spectrum Averaging. Η πολυωνυμική (polynomial) επιτυγχάνει τη διόρθωση τεμαχίζοντας το φάσμα σε 64 περιοχές και αναγνωρίζοντας τις περιοχές που αντιστοιχούν σε θόρυβο. Καθορίζεται από το χρήστη ένας πολυωνυμικός βαθμός που ταιριάζει στις περιοχές αυτές και στη συνέχεια το πολυώνυμο αφαιρείται από όλο το φάσμα. Η ανοικοδόμηση της ελεύθερης επαγωγικής απόσβεσης (FID Reconstruction) διαχωρίζει το σήμα από το θόρυβο πριν το μετασχηματισμό Fourier που εφαρμόζεται, όταν ακόμα οι εντάσεις είναι συναρτήσεις του χρόνου. Εκεί ‘κατασκευάζεται’ η βασική γραμμή χρησιμοποιώντας τα πρώτα 16 σημεία της ελεύθερης επαγωγικής απόσβεσης και στη συνέχεια ξαναμετατρέπεται σε συνάρτηση με τη συχνότητα. Τέλος, η μέθοδος μέσος όρος φάσματος (spectrum averaging) εντοπίζει τις περιοχές όπου δεν εμπεριέχονται σήματα και τις τοποθετεί σε ένα ορθογώνιο περίγραμμα. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή μισού πλάτους του ορθογωνίου τόσο πιο επίπεδη θα είναι η βασική γραμμή. Στη συγκεκριμένη μέθοδο, όσο περισσότερος είναι ο θόρυβος του φάσματος, τόσο μεγαλύτερη εμφανίζεται η πιθανότητα ορισμένα σήματα να

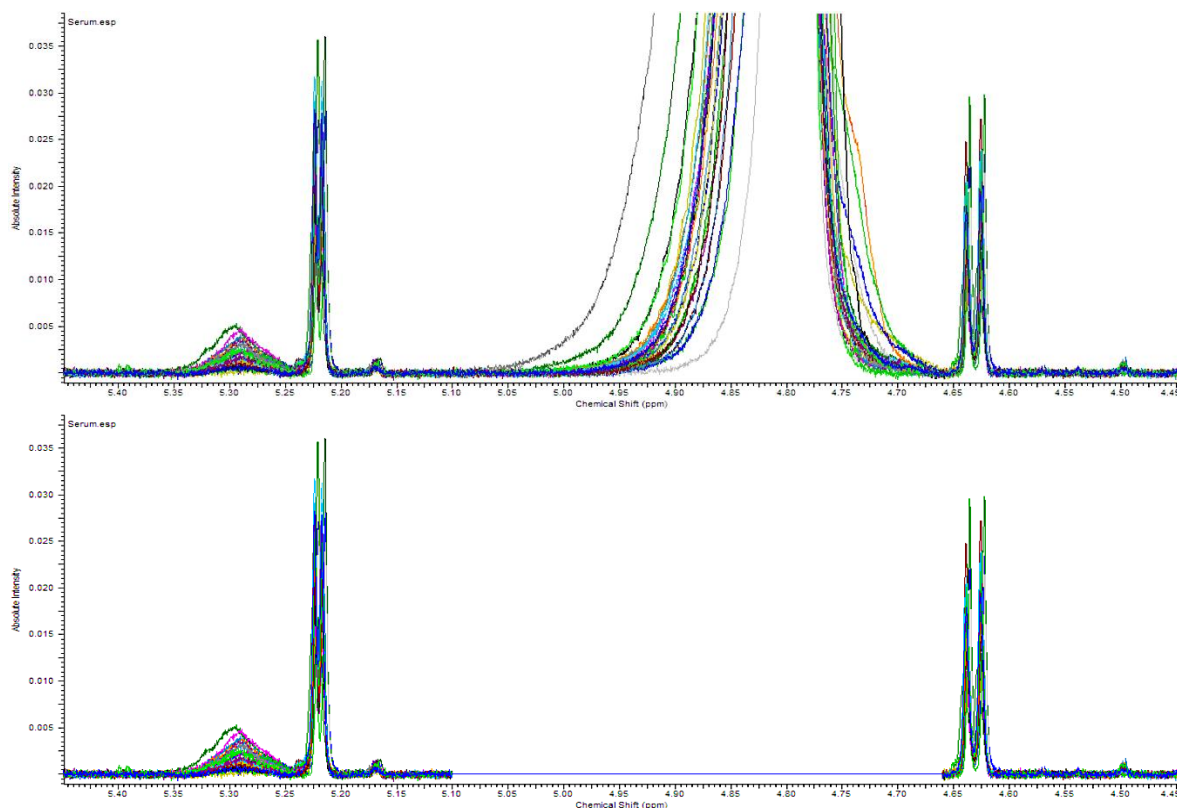
θεωρηθούν βασική γραμμή [12]. Τόσο στο υπόστρωμα ορού αίματος, όσο και στο υπόστρωμα αμνιακού υγρού, η βέλτιστη διόρθωση βασικής γραμμής επιτεύχθηκε με εφαρμογή της μεθόδου FID Reconstruction στο ACD/NMR Processor (Σχήμα 8.4). Στο MestReNova οι διαθέσιμοι αλγόριθμοι είναι οι Polynomial Fit, Bernstein Polynomial Fit και Whittaker Smoother (in-house ανεπτυγμένος αλγόριθμος). Βέλτιστη διόρθωση της βασικής γραμμής επιτεύχθηκε με τον αλγόριθμο Whittaker Smoother στα φάσματα και των δύο υποστρωμάτων της παρούσας εργασίας.



Σχήμα 8.4. Πραγματικά φάσματα (2,80 – 4,30 ppm) ορού αίματος της παρούσας μελέτης πριν (πάνω) και μετά (κάτω) την διόρθωση βασικής γραμμής που εφαρμόστηκε στο σύνολο των φασμάτων στο ACD/NMR Processor.

8.4. ΕΞΑΙΡΕΣΗ ΠΕΡΙΟΧΩΝ

Αφού έχουν προηγηθεί οι παραπάνω χειρισμοί και προτού προχωρήσουμε στην προεπεξεργασία που αφορά στη μείωση του όγκου των δεδομένων πριν τη στατιστική ανάλυση, κρίνεται χρήσιμο να απομακρυνθούν τυχόν περιοχές των φασμάτων, οι οποίες δεν φέρουν ουσιαστικά καμιά πληροφορία. Στην περίπτωση των φασμάτων που αφορούν την παρούσα μελέτη τέτοια περιοχή αποτελεί η περιοχή του νερού, 4,66 - 5,10 ppm. Η απορρόφηση του νερού, έστω και μετά την εφαρμογή του παλμού PRESAT εμφανίζεται πολύ ευρεία, μη παρέχοντας κάποια χρήσιμη πληροφορία, και επηρεάζει τη βασική γραμμή. Για τον λόγο αυτό η συγκεκριμένη περιοχή χημικών μετατοπίσεων εξαιρείται, με γνώμονα την όσο το δυνατόν μεγαλύτερη μείωση του όγκου των δεδομένων. Άλλες περιοχές που μπορούν να εξαιρεθούν είναι οι περιοχές πάνω από τα 9 ppm και κάτω από 0 ppm, όπου καμιά απορρόφηση δεν παρατηρείται.



Σχήμα 8.5. Πραγματικά φάσματα (4,45 – 5,45 ppm) ορού αίματος της παρούσας μελέτης πριν (πάνω) και μετά (κάτω) την αφαίρεση της περιοχής του νερού (4,66 – 5,10 ppm) που εφαρμόστηκε στο σύνολο των φασμάτων στο ACD/NMR Processor.

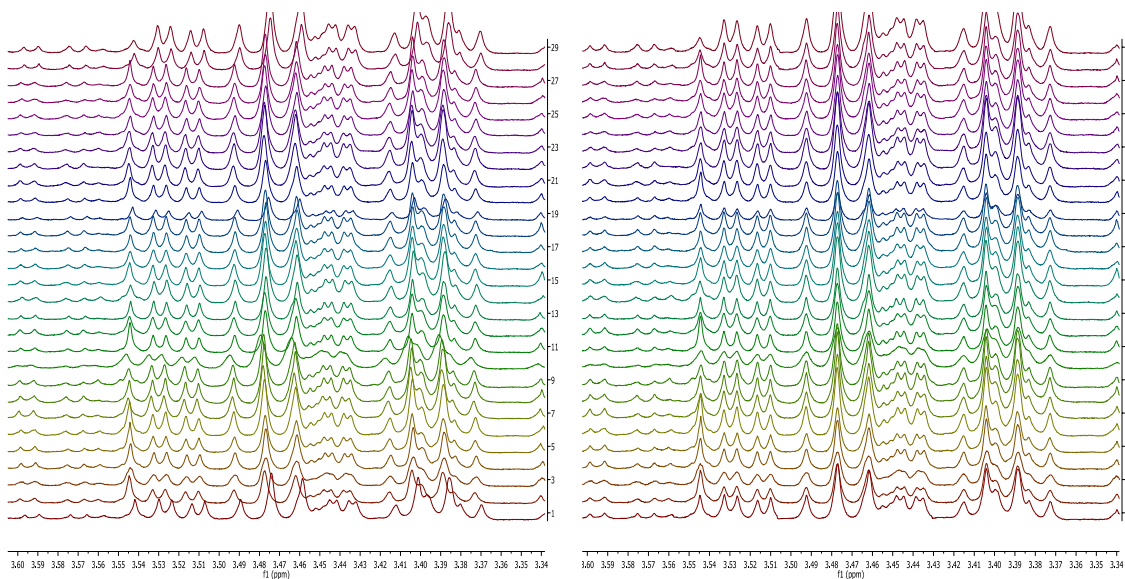
8.5. ΣΤΟΙΧΙΣΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΕΩΝ ΦΑΣΜΑΤΩΝ [14]

Παρότι οι χημικές μετατοπίσεις των πυρήνων των μορίων είναι γενικά πολύ σταθερές και επαναλαμβανόμενες, είναι πιθανό, εξαιτίας μια σειράς πειραματικών παραμέτρων, σε ορισμένες περιπτώσεις να δημιουργηθούν ελαφρές ή και αρκετά σημαντικές διαφοροποιήσεις. Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα των βασισμένων σε NMR μεταβολομικών μελετών είναι αυτή η παρουσία μετατοπίσεων κορυφών μεταξύ διαφορετικών φασμάτων. Αυτές οι μικρές διαφοροποιήσεις δημιουργούν πρόβλημα κατά την πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση, προκαλώντας την ομαδοποίηση ανόμοιων κορυφών και επισκιάζοντας την ανακάλυψη διαφορετικών μοτίβων στα φάσματα. Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες στους οποίους μπορεί να οφείλονται αυτές οι μετατοπίσεις: οργανολογικοί, διακυμάνσεις του pH και της θερμοκρασίας, συνολική αραίωση κάποιων δειγμάτων, ανομοιογένεια του πεδίου κ.α.. Οι παράγοντες αυτοί, παρόλο που επιδρούν στο σύνολο του δείγματος, δεν επηρεάζουν στον ίδιο βαθμό όλες τις κορυφές και μετατοπίζουν ορισμένες από αυτές με μη ελεγχόμενο τρόπο. Δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο εάν μπορούν να αποσπαστούν χρήσιμες πληροφορίες μελετώντας τις μετατοπίσεις αυτές, καθώς υπεισέρχονται αρκετές παράμετροι που δυνητικά ευθύνονται για την ύπαρξη τους. Άλλωστε αποτελεί μια σκέψη που αρκετά πρόσφατα άρχισε να απασχολεί τους επιστήμονες και να ελέγχεται σε πειραματικές εργασίες [13].

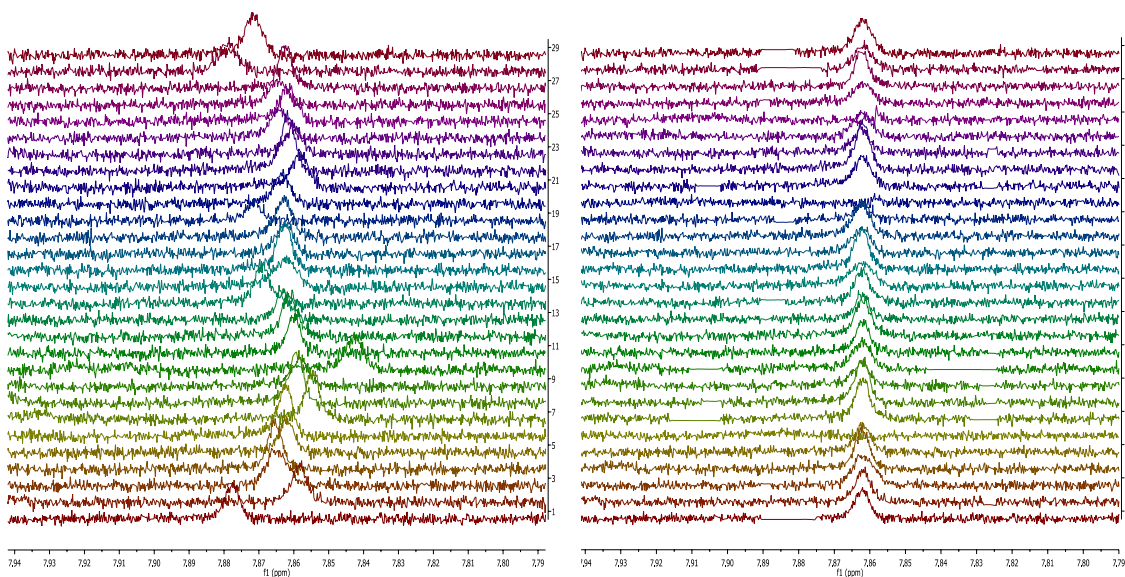
Αντιλαμβανόμαστε λοιπόν από τα παραπάνω, ότι η στοίχιση των χημικών μετατοπίσεων όλων των κορυφών όλων των φασμάτων είναι κρίσιμο στάδιο της προεπεξεργασίας. Προκειμένου να περιοριστεί κατά το δυνατόν περισσότερο το φαινόμενο αυτό απαιτείται αυστηρός σχεδιασμός κι έλεγχος των πειραματικών συνθηκών. Αυτός, άλλωστε, είναι κι ο λόγος που χρησιμοποιείται σε μελέτες μεταβολομικής με NMR κάποιο ρυθμιστικό διάλυμα, όπως υπογραμμίστηκε παραπάνω. Επιπλέον, έχουμε ήδη αναφερθεί στην στοίχιση των φασμάτων βάση της ένωσης αναφοράς. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται μια συνολική στοίχιση των φασμάτων μεταξύ τους, βαθμονομώντας τους άξονες τους με την ίδια κλίμακα. Ωστόσο, πολλές φορές αυτός ο χειρισμός δεν είναι αρκετός, καθώς σε μελέτες βασισμένες στο NMR το πρόβλημα εντοπίζεται μεταξύ ορισμένων περιοχών στις

περισσότερες περιπτώσεις. Βιβλιογραφικά συναντώνται πολλές μελέτες, όπου ελέγχεται η επίδραση διαφορετικών μεθόδων στοίχισης σε φάσματα NMR [13], ενώ έχει προταθεί και μια σειρά διαφορετικών αλγορίθμων για το σκοπό αυτό (interval correlated shifting, correlation optimized warping, (COW) beam search, fuzzy warping, hierarchical cluster-based peak alignment (CluPA)).

Το λογισμικό ACD/NMR Processor δεν παρέχει τη δυνατότητα στοίχισης των φασμάτων με χρήση κάποιου αλγορίθμου στοίχισης (alignment ή warping), πέραν αυτού που βαθμονομεί τους άξονες των φασμάτων βάση κάποιας ένωσης αναφοράς και κατ' επέκταση στοιχίζει και τα εμπλεκόμενα φάσματα (§8.1). Αντιθέτως, επιχειρεί να επιλύσει τα προβλήματα στοίχισης που συναντώνται στα φάσματα, με άλλον τρόπο, ο οποίος θα αναπτυχθεί στην επόμενη ενότητα. Από την άλλη μεριά, το λογισμικό MestReNova παρέχει μια σειρά δυνατοτήτων προς αυτή την κατεύθυνση. Επιτρέπει χειροκίνητο μερικώς αυτοματοποιημένο χειρισμό συνολικής στοίχισης (manual), πλήρως αυτοματοποιημένο χειρισμό συνολικής στοίχισης (fully automatic) και συνολική – κατά περιοχές στοίχιση των φασμάτων (spectral alignment). Ο αλγόριθμος στοίχισης κατά περιοχές χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη για την στοίχιση όλων των περιοχών όλων των φασμάτων. Οι περισσότερες περιοχές χημικών μετατοπίσεων δεν εμφάνιζαν σημαντικά προβλήματα ευθυγράμμισης (Σχήμα 8.6). Σε ορισμένες λίγες περιοχές των φασμάτων των βιολογικών δειγμάτων οι αποκλίσεις των χημικών μετατοπίσεων ήταν υπαρκτές και οδήγησαν στην ανάγκη επιβολής της στοίχισης μέσω του συγκεκριμένου αλγορίθμου (Σχήμα 8.7).



Σχήμα 8.6. Πραγματικά φάσματα ορού αίματος της παρούσας μελέτης περιοχής χωρίς σημαντικό πρόβλημα ευθυγράμμισης (3,34 – 3,60 ppm) πριν (δεξιά) και μετά (αριστερά) την εφαρμογή του αλγορίθμου της στοίχισης των φασμάτων κατά περιοχές, που εφαρμόστηκε στο σύνολο των φασμάτων στο MestReNova.



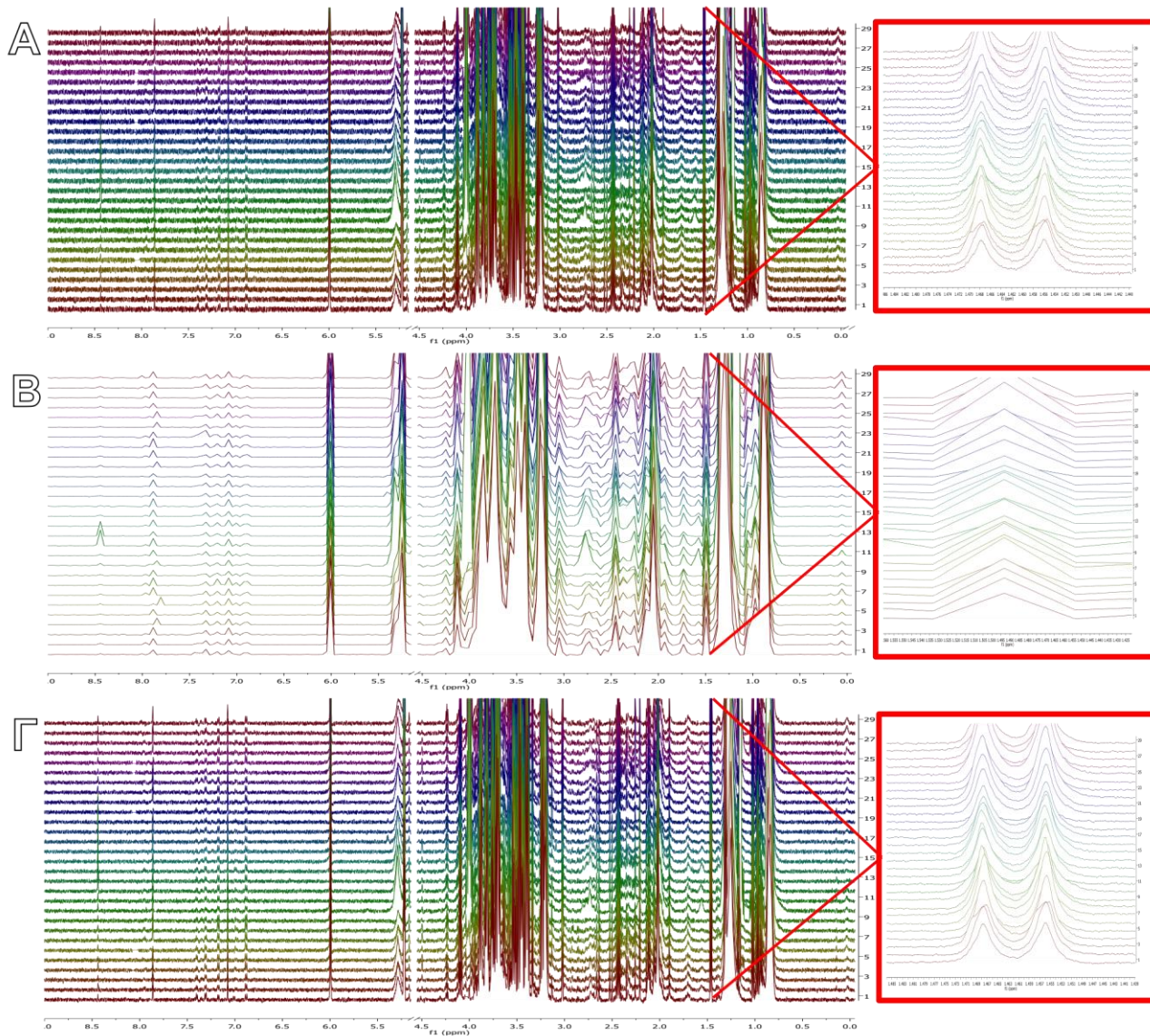
Σχήμα 8.7. Πραγματικά φάσματα ορού αίματος της παρούσας μελέτης της περιοχής των ιστιδινών (7,79 – 7,94 ppm), όπου παρατηρείται σοβαρό πρόβλημα ευθυγράμμισης, πριν (δεξιά) και μετά (αριστερά) την εφαρμογή του αλγορίθμου της στοίχισης των φασμάτων κατά περιοχές στο σύνολο των φασμάτων στο MestReNova.

8.6. ΜΕΙΩΣΗ ΔΙΑΣΤΑΣΕΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Ένα φάσμα NMR περιέχει μερικές χιλιάδες σημεία δεδομένων (data points). Προκειμένου να μειωθούν οι διαστάσεις των δεδομένων εφαρμόζεται ευρέως η μέθοδος της υποδιαίρεσης του φάσματος (binning ή bucketing) σε διάφορες περιοχές. Το φάσμα διαιρείται σε περιοχές χημικών μετατοπίσεων και το συνολικό εμβαδόν που περιέχεται σε καθεμιά περιοχή, χρησιμοποιείται ως κατά προσέγγισιν αναπαράσταση του αρχικού φάσματος. Ιδανικά, το εμβαδόν που περικλείεται σε κάθε τέτοια διαιρεμένη περιοχή (bin ή bucket) θα ήταν χρήσιμο να αντιστοιχεί σε ολόκληρη την περιοχή που σχετίζεται με μια συγκεκριμένη απορρόφηση σε κάθε φάσμα. Με τον τρόπο αυτό, αίρεται και ο προβληματισμός της μετατόπισης συγκεκριμένων κορυφών μεταξύ των φασμάτων. Οι δυνατές επιλογές για τον τρόπο διαίρεσης των διαιρεμένων περιοχών είναι δύο: είτε διαίρεση του φάσματος σε ίσες μεταξύ τους περιοχές χημικών μετατοπίσεων (π.χ. πλάτους 0.04 ppm), είτε με εφαρμογή συγκεκριμένου αλγορίθμου, σε μη σταθερού πλάτους περιοχές εντοπίζοντας τις απορροφήσεις και εφαρμόζοντας την διαίρεση γύρω από αυτές. Με οποιονδήποτε από τους δύο τρόπους κι αν γίνει η διαίρεση το αποτέλεσμα είναι η μείωση του όγκου των δεδομένων με μείωση της φασματικής ανάλυσης. Πιο συγκεκριμένα, ένα τυπικό φάσμα με εύρος 6001.6 Hz που λήφθηκε σε φασματόμετρο συχνότητας 500,13 MHz, διαιρεμένο σε περιοχές πλάτους 0.04 ppm, θα κατέληγε σε 300 τιμές εμβαδών. Ωστόσο, όταν χρησιμοποιείται διαίρεση σε μεγάλες περιοχές, ορισμένες μικρές κορυφές χάνονται. Επιπλέον, εάν κάποια κορυφή δεν εντοπίζεται ολόκληρη εντός μιας διαιρεμένης περιοχής, αλλά αντίθετα διαιρείται σε δύο περιοχές, δύναται να έχει αρνητική επίδραση στην πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση. Με τη μέθοδο μη σταθερού πλάτους καθίσταται δυνατό να πραγματοποιηθεί διαίρεση στις οποίας τις διαιρεμένες περιοχές θα περιέχονται μόνο πλήρεις κορυφές.

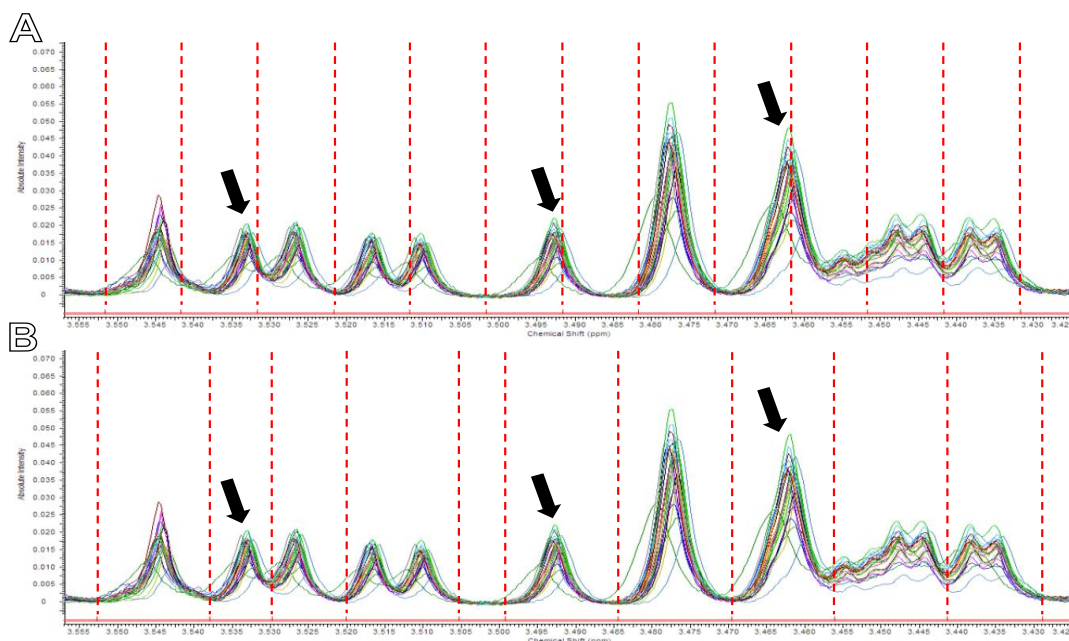
Και τα δύο λογισμικά που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της προκατεργασίας στη συγκεκριμένη εργασία διαθέτουν αλγορίθμους και για τις δύο μεθόδους διαίρεσης του φάσματος. Στο Σχήμα 8.8 παρατίθενται πραγματικά φάσματα της παρούσας μελέτης πριν (Σχήμα 8.8Α) και μετά την εφαρμογή του αλγορίθμου διαίρεσης σταθερού πλάτους (Σχήμα 8.8Β και 8.8Γ) από το λογισμικό MestReNova. Στο Σχήμα 8.8Β η

διαίρεση πραγματοποιήθηκε σε τμήματα πλάτους 0.04 ppm και είναι εμφανές ότι η απώλεια σε φασματική ανάλυση και πληροφορία είναι ιδιαίτερα σημαντική. Προκειμένου να γίνει πλήρως κατανοητό αυτό, έχει προστεθεί σε μεγέθυνση η περιοχή 1.44 – 1.48 ppm, που πριν την εφαρμογή της διαίρεσης περιελάμβανε μια διπλή κορυφή. Μετά την εφαρμογή της διαίρεσης είναι αδύνατο να παρατηρηθεί η διπλή αυτή κορυφή. Στο Σχήμα 8.8Γ η διαίρεση πραγματοποιήθηκε σε τμήματα πλάτους 0.00035 ppm, δηλαδή περίπου δύο τάξεις μεγέθους μικρότερου πλάτους από αυτό της προηγούμενης περίπτωσης. Είναι εύκολο να παρατηρήσει κανείς την πολύ βελτιωμένη φασματική ανάλυση που προκύπτει με τον ορισμό μικρότερου πλάτους περιοχών, παρατηρώντας τη μεγεθυμένη εικόνα στα δεξιά του Σχήματος 8.8Γ.



Σχήμα 8.8. Πραγματικά φάσματα ορού αίματος της παρούσας μελέτης κατά την εφαρμογή του αλγορίθμου διαίρεσης φάσματος σε περιοχές σταθερού πλάτους. Στην Α υποεικόνα απεικονίζονται τα φάσματα πριν την εφαρμογή του αλγορίθμου, στην Β μετά την εφαρμογή διαίρεσης πλάτους 0.04 ppm και στη Γ μετά την εφαρμογή διαίρεσης 0.00035 ppm στο σύνολο των φασμάτων στο MestReNova. Στις μικρότερες εικόνες δεξιά παρατίθεται μεγένθυση της ίδιας κάθε φορά περιοχής των φασμάτων.

Πέραν της διερεύνησης για την επιλογή του κατάλληλου πλάτους διαίρεσης των φασμάτων, ελέγχθηκε και ο αλγόριθμος διαίρεσης μη σταθερού πλάτους. Στην περίπτωση αυτού ρυθμίζεται το κατά προσέγγισιν επιθυμητό πλάτος διαίρεσης των φασμάτων και ο βαθμός ελαστικότητας γύρω από το πλάτος αυτό. Στο Σχήμα 8.9A παρουσιάζονται τα πραγματικά φάσματα του ενός υποστρώματος της μελέτης αυτής (ορός αίματος), στα οποία έχει επιβληθεί διαίρεση σταθερού πλάτους 0.01 ppm. Παρατηρεί κανείς ότι οι απορροφήσεις που υποδεικνύονται με τα βέλη μοιράζονται σε δύο διαιρεμένες περιοχές, παρατήρηση που θα μπορούσε να δημιουργήσει σημαντικά προβλήματα στην μετέπειτα πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση. Προκειμένου να αποτρέψουμε την εμφάνιση τέτοιων φαινομένων, χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος διαίρεσης μη σταθερού πλάτους του λογισμικού ACD/NMR Processor, με κατά προσέγγισιν πλάτος 0.01 ppm και 50% βαθμό ελαστικότητας. Το αποτέλεσμα της διαίρεσης αυτής παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.9B. Τα βέλη υποδεικνύουν τις κορυφές που κατά τον προηγούμενο χειρισμό δημιούργησαν τον προβληματισμό που συζητήθηκε.



Σχήμα 8.9. Πραγματικά φάσματα ορού αίματος της παρούσας μελέτης (3,43 – 3,55 ppm) με εφαρμογή αλγορίθμου διαίρεσης σταθερού (A) και μη σταθερού πλάτους (B) 0.01 ppm στο σύνολο των φασμάτων στο ACD/NMR Processor. Οι **κόκκινες** διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν τα σημεία όπου διαιρείται το φάσμα και τα **μαύρα** βέλη τα σημεία όπου η διαίρεση σταθερού πλάτους ‘σπάζει’ μια απορρόφηση σε δύο περιοχές (bins).

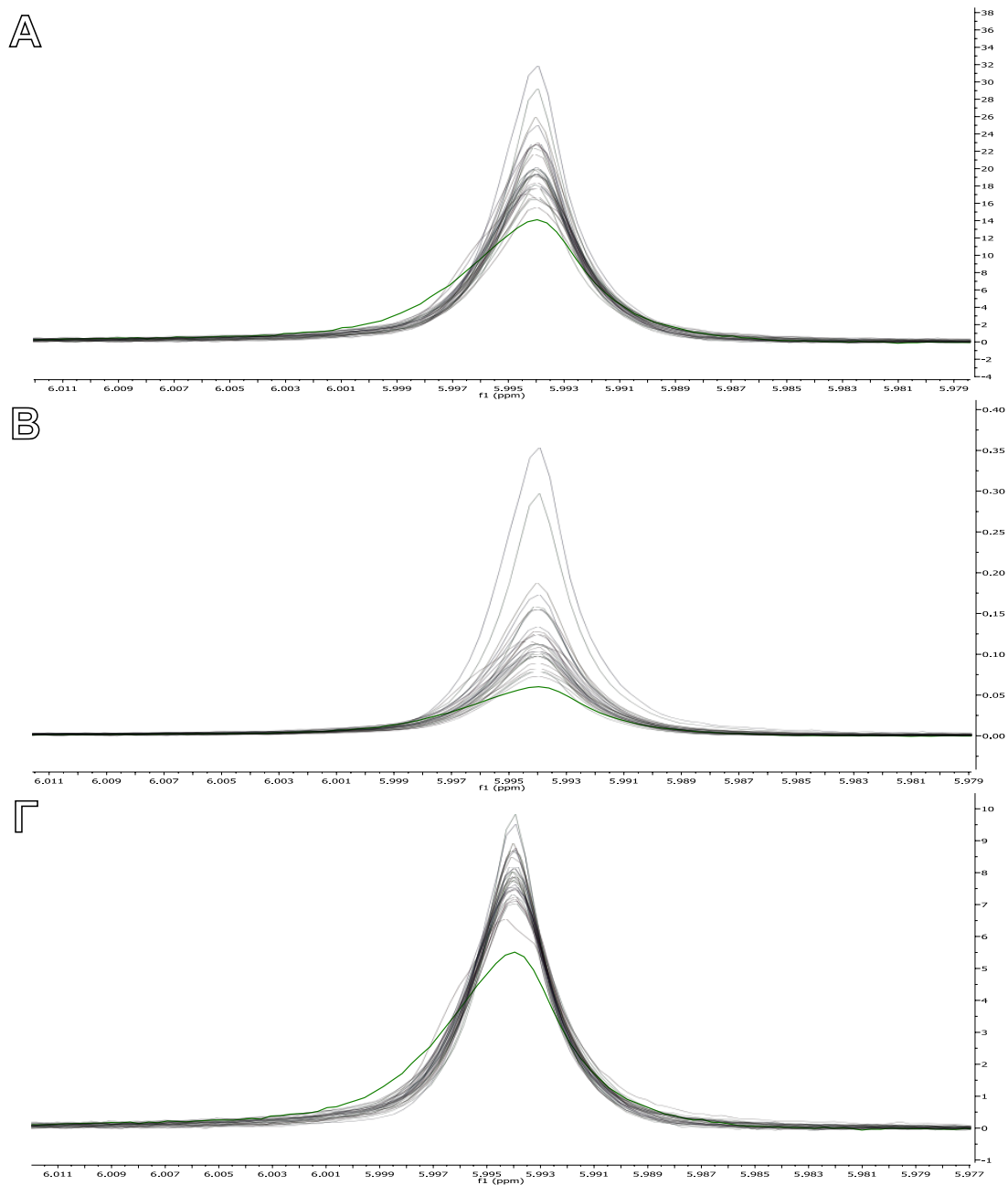
8.7. ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΚΛΙΜΑΚΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ [15]

Έπειτα από τη μείωση των διαστάσεων των δεδομένων, προκειμένου να δημιουργήσουμε δεδομένα συγκρίσιμα μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων, μεσολαβούν δύο τελευταία στάδια πριν από τη στατιστική ανάλυση. Τα στάδια αυτά καλούνται κανονικοποίηση (normalization) και κλιμακοποίηση (scaling). Η κανονικοποίηση αφορά στην ομαλοποίηση των διαφορών που απαντώνται ανάμεσα στα δείγματα εξαιτίας ποικίλων παραγόντων, ενώ η κλιμακοποίηση έχει ως στόχο τον καθορισμό του στατιστικού βάρους κάθε μεταβλητής κατά τη δημιουργία του στατιστικού μοντέλου. Αν θεωρήσει κανείς τα δεδομένα που λαμβάνονται από μια μεταβολομική μελέτη ως έναν πίνακα, οι γραμμές αντιστοιχούν στα διάφορα δείγματα ή σε διαφορετικά αναλυτικά πειράματα και οι στήλες σε μετρήσεις των δειγμάτων αυτών (ένταση/εμβαδόν κορυφών ή συγκεντρώσεις μεταβολιτών). Η κανονικοποίηση, λοιπόν, αποτελεί μια λειτουργία που επιδρά κατά μήκος των γραμμών του πίνακα αυτού, ενώ η κλιμακοποίηση κατά μήκος των στηλών του. Σημαντικός παράγοντας, που συχνά εισάγει ‘τεχνητές’ διαφοροποιήσεις μεταξύ των δειγμάτων και απαντάται κατά κόρον σε βιολογικά δείγματα, είναι η αραίωση, δεδομένου ότι διαφορετικά βιολογικά δείγματα έχουν ελαφρώς διαφορετικές περιεκτικότητες σε νερό. Ως απλουστευμένη γενική αρχή της λειτουργίας της κανονικοποίησης θα μπορούσε να αποδοθεί ο πολλαπλασιασμός κάθε φάσματος NMR με μια σταθερά. Η σταθερά αυτή είναι δυνατό να υπολογιστεί με πολλούς διαφορετικούς τρόπους. Έχουν, λοιπόν, προταθεί αρκετές μέθοδοι κανονικοποίησης και στόχος είναι να χρησιμοποιηθεί εκείνη που θα δώσει την βέλτιστη και πιστότερη αναπαράσταση των εκάστοτε δεδομένων.

Μια από τις περισσότερο συνηθισμένες μεθόδους κανονικοποίησης είναι η κανονικοποίηση ως προς τη συνολική ένταση (Total Area Normalization). Κατά την εφαρμογή της λαμβάνεται ο λόγος της έντασης του φάσματος σε κάθε διαιρεμένη περιοχή, όπως προέκυψε από τη διαίρεση του φάσματος στο προηγούμενο στάδιο της προεπεξεργασίας, προς την συνολική ένταση όλου του φάσματος. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή είναι αρκετά ευπαθής σε στρεβλώσεις όταν μία ή κάποιες εντάσεις σήματος μεταβάλλονται σημαντικά μεταξύ των φασμάτων. Άλλη διαδεδομένη μέθοδος είναι η κανονικοποίηση ως προς το εσωτερικό πρότυπο που έχει προστεθεί, ή ως προς κάποια ένωση που υπάρχει στα δείγματα και θεωρείται αμετάβλητη. Παράδειγμα τέτοιας

ένωσης αποτελεί η κρεατινίνη σε υπόστρωμα ούρων, καθώς θεωρείται ότι η έκκριση κρεατινίνης είναι σταθερή και αμετάβλητη [16]. Αρκετές νέες μέθοδοι κανονικοποίησης έχουν προταθεί, όπως είναι η κανονικοποίηση πιθανοτικού πηλίκου (Probabilistic Quotient Normalization, PQN), η κανονικοποίηση σταθεροποίησης διακύμανσης (Variance Stabilisation Normalization) κ.α.. Στο Σχήμα 8.10 φαίνονται τα αποτελέσματα της εφαρμογής των αλγορίθμων κανονικοποίησης ως προς τη συνολική ένταση και ως προς την ένωση εσωτερικού προτύπου. Η κανονικοποίηση ως προς την ένωση του εσωτερικού προτύπου παρέχει βελτιωμένα αποτελέσματα στην παρούσα μελέτη και αποτελεί και την επιλεγείσα μέθοδο.

Η κλιμακοποίηση των δεδομένων εφαρμόζεται πριν την στατιστική ανάλυση και στα πλαίσια της εργασίας αυτής μέσω του στατιστικού λογισμικού SIMCA. Μια σειρά διαφορετικών μεθόδων είναι διαθέσιμες για το σκοπό αυτό στο συγκεκριμένο λογισμικό. Η προεπιλογή είναι η κλιμακοποίηση μοναδιαίας διακύμανσης (unit variance, UV), κατά την οποία πραγματοποιείται μεσοστάθμιση των τιμών των μεταβλητών. Αυτό επιτυγχάνεται με διαίρεση κάθε τιμής έντασης ή εμβαδού ενός μεταβολίτη με την τυπική απόκλιση των εντάσεων ή των εμβαδών του συγκεκριμένου μεταβολίτη σε όλα τα δείγματα. Οι άξονες των μεταβλητών αποκτούν το ίδιο μήκος, παρέχοντας σε όλες τις μεταβλητές την ίδια σημαντικότητα. Ενδείκνυται για περιπτώσεις όπου δεν διαθέτουμε στοιχεία για τη σημαντικότητα των μετρούμενων μεταβλητών. Άλλη διαδεδομένη μέθοδος είναι η κλιμακοποίηση Pareto, όπου κάθε μεταβολίτης διαιρείται με την τετραγωνική ρίζα της τυπικής απόκλισης των εντάσεων ή των εμβαδών του συγκεκριμένου μεταβολίτη σε όλα τα δείγματα. Οι δύο αυτές μέθοδοι είναι οι περισσότερο χρησιμοποιούμενες σε μελέτες μεταβολομικής. Η μέθοδος κεντραρίσματος του μέσου (mean-centering) παρέχεται από το λογισμικό SIMCA, αλλά η εφαρμογή της στα δεδομένα της μελέτης δεν απέδωσε αξιοσημείωτα αποτελέσματα. Είναι σημαντικό να υπογραμμιστεί στο σημείο αυτό ότι η επιλογή διαφορετικών τύπων κλιμακοποίησης, οδηγεί σε διαφορετικά αποτελέσματα. Επομένως, είναι κρίσιμο να επιλεγεί η καταλληλότερη μέθοδος για κάθε εφαρμογή.



Σχήμα 8.10. Πραγματικά φάσματα ορού αίματος της παρούσας μελέτης της περιοχής του εσωτερικού προτύπου (5,98 – 6,01 ppm) μετά την διαίρεση του φάσματος σε περιοχές σταθερού πλάτους 0.00035 ppm (A), με εφαρμογή αλγορίθμου κανονικοποίησης ως προς τη συνολική ένταση (B) και κανονικοποίησης ως προς το εσωτερικό πρότυπο (Γ) στο σύνολο των φασμάτων στο MestReNova.

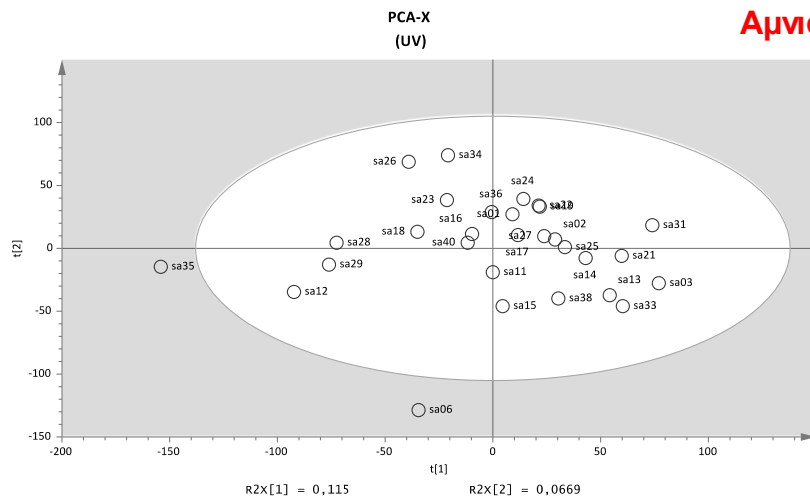
ΚΕΦ. 9 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

9.1. ΠΟΛΥΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

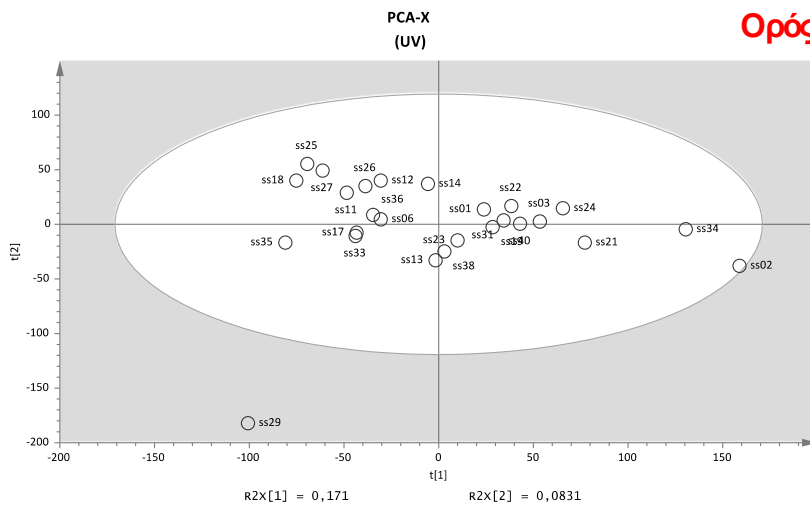
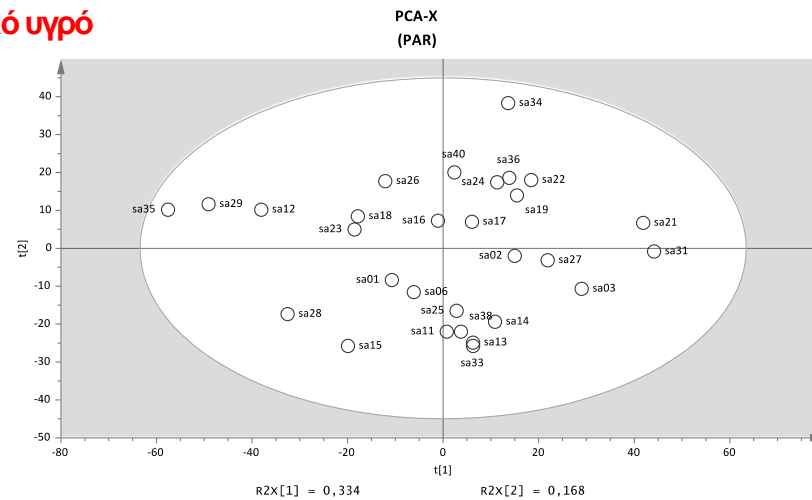
Η στατιστική ανάλυση των μεταβολομικών δεδομένων εξαρτάται από την βιολογική ερώτηση που τίθεται και το σχεδιασμό της εκάστοτε μελέτης. Συνεπώς, δεν υπάρχει καθολική μέθοδος στατιστικής ανάλυσης για δεδομένα αυτού του τύπου. Ωστόσο, υπάρχουν στη βιβλιογραφία καταγεγραμμένες κατευθυντήριες γραμμές που χρειάζεται να ακολουθούνται στις μεταβολομικές μελέτες ως ελάχιστα κριτήρια, ώστε να εξασφαλίζεται η αποδοχή τους [17]. Ο περισσότερο διαδεδομένος τρόπος ταυτόχρονου χειρισμού των μεγάλου όγκου δεδομένων της μεταβολομικής είναι η πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση. Μέσω αυτής προσδιορίζεται η ύπαρξη εγγενών μοτίβων ή ομαδοποιήσεων στα δεδομένα, που αντικατοπτρίζουν συγκεκριμένες βιολογικές καταστάσεις. Επιπλέον, καθίσταται δυνατός ο προσδιορισμός των μεταβλητών που ευθύνονται για αυτές τις ομαδοποιήσεις.

9.1.1. Επιλογή μεθόδου κλιμακοποίησης δεδομένων

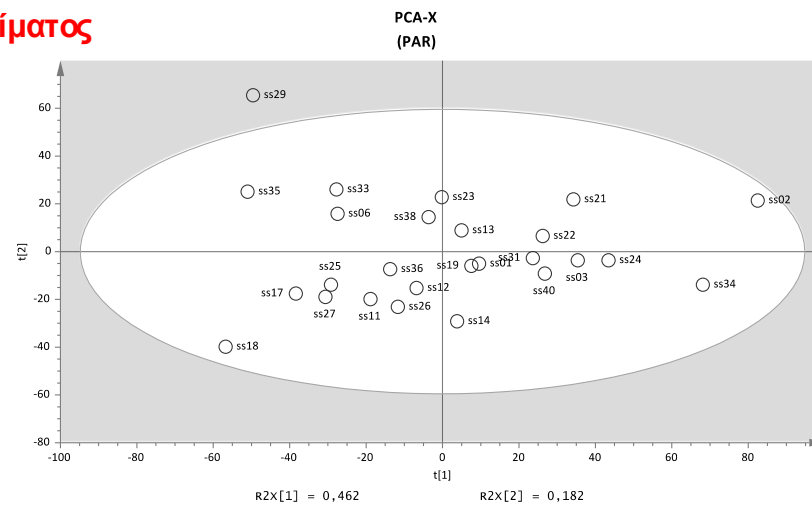
Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη ενότητα, στα πλαίσια της μελέτης αυτής δύο ήταν οι κύριες μέθοδοι κλιμακοποίησης που ελέγχθηκαν, ως οι πλέον συνήθεις σε μελέτες μεταβολομικής. Στο Σχήμα 9.1 παρατίθενται διαγράμματα συνιστωσών PCA δειγμάτων αμνιακού υγρού και ορού αίματος στα οποία έχει εφαρμοστεί αρχικά κλιμακοποίηση UV, και στη συνέχεια Pareto. Στα διαγράμματα με κλιμακοποίηση UV των αμνιακών υγρών και των ορών αίματος οι δύο πρώτες συνιστώσες PC1 και PC2 εξηγούν το 18,19% και το 25,41% της διαφοροποίησης των δειγμάτων [αμνιακό: $R^2X(1,2)=0,1819$, ορός: $R^2X(1,2)=0,2541$] αντιστοίχως. Όταν εφαρμόζεται κλιμακοποίηση Pareto οι δύο πρώτες συνιστώσες PC1 και PC2 εξηγούν το 50,20% και το 64,40% της διαφοροποίησης των δειγμάτων [αμνιακό: $R^2X(1,2)=0,502$, ορός: $R^2X(1,2)=0,644$] για τα ίδια σετ δειγμάτων. Γίνεται, επομένως, αντιληπτό ότι τα μοντέλα με κλιμακοποίηση Pareto περιγράφουν πολύ καλύτερα τη διαφοροποίηση των δεδομένων στις δύο πρώτες συνιστώσες. Άλλωστε, η συγκεκριμένη μέθοδος κλιμακοποίησης είναι και η πιο συχνά απαντώμενη σε δεδομένα NMR.



Αμνιακό υγρό



Ορός αίματος

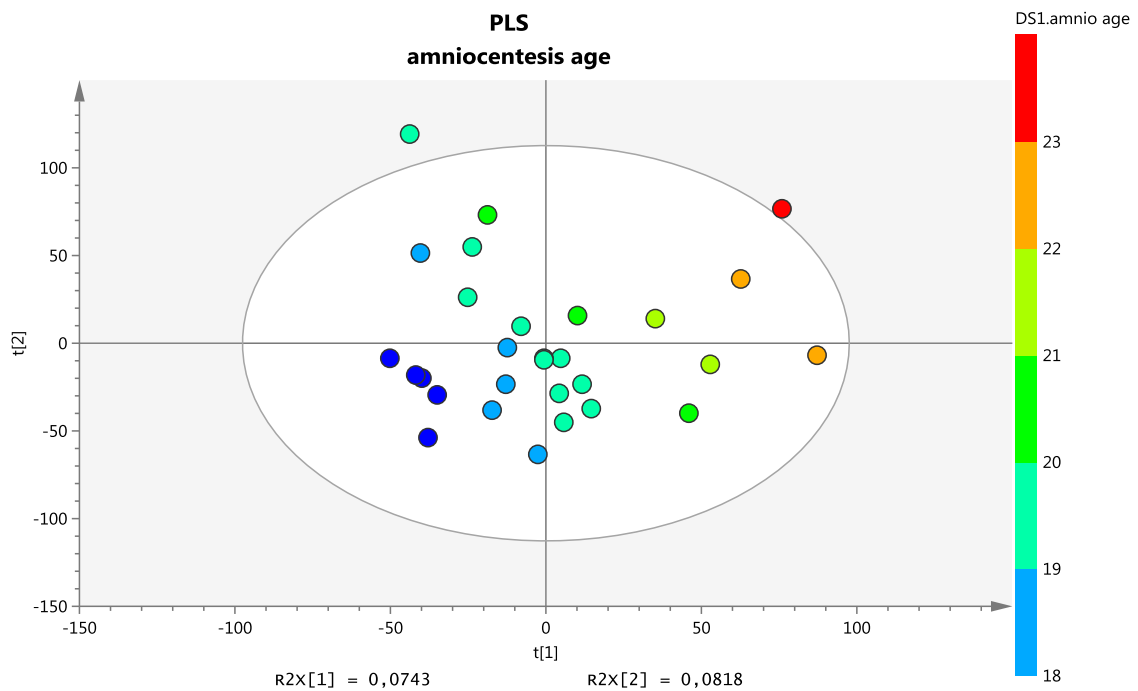


Σχήμα 9.1. PCA διαγράμματα συνιστωσών (scores plot) δειγμάτων αμνιακού υγρού και ορού αίματος με κλιμακοποίηση UV και Pareto.

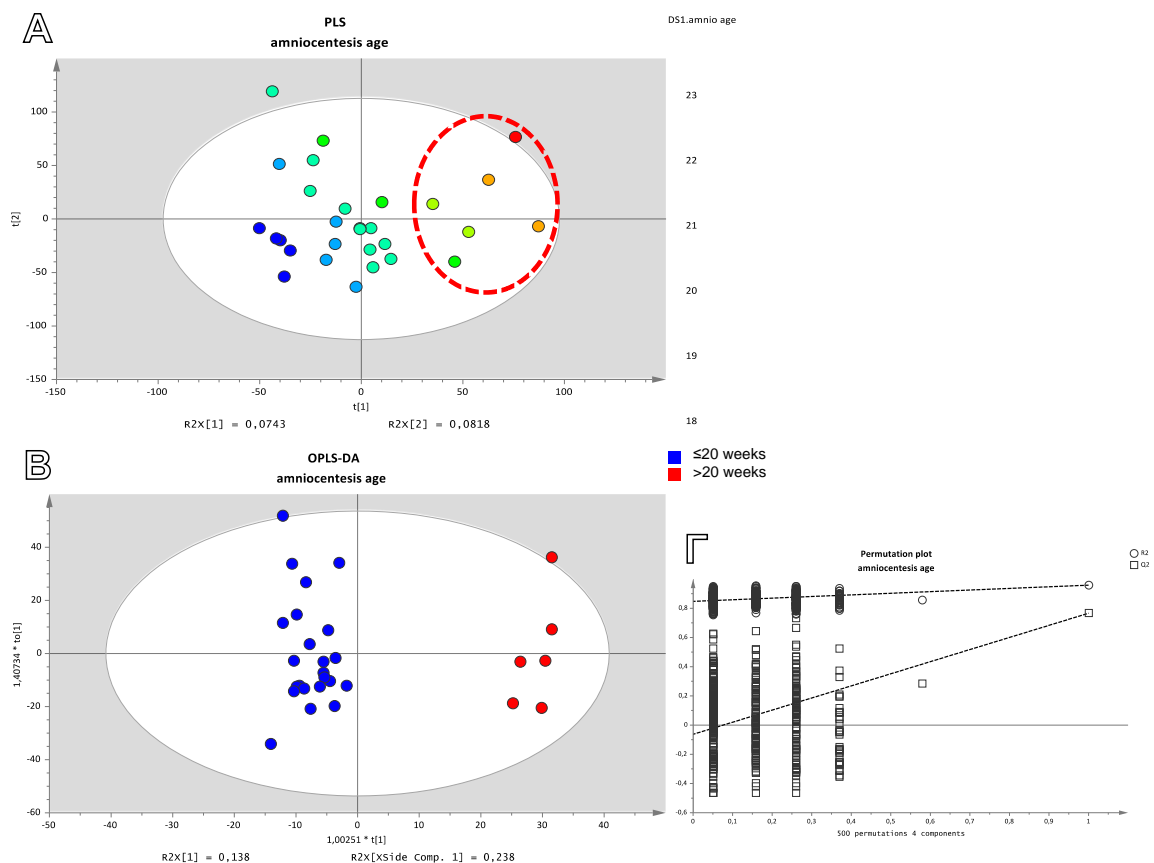
9.1.2. Υπόστρωμα αμνιακού υγρού

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο έκτο κεφάλαιο, αποτελεί ζητούμενο υψίστης σημασίας για την μελέτη υποστρώματος αμνιακού υγρού η ύπαρξη ομοιομορφίας ως προς την εβδομάδα δειγματοληψίας. Έχοντας τη σκέψη αυτή ως γνώμονα, πραγματοποιήθηκε αρχικά στα δείγματα των αμνιακών υγρών έλεγχος συσχέτισης τους με την εβδομάδα αμνιοπαρακέντησης. Ο έλεγχος επιτεύχθηκε με τη δημιουργία μοντέλου παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares regression – PLS) και συσχετίζοντας τη μήτρα δεδομένων των δειγμάτων αμνιακού υγρού με ανεξάρτητη μήτρα που περιείχε πληροφορίες της εβδομάδα που έλαβε χώρα η δειγματοληψία. Η παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων λειτουργεί αντίστοιχα ως προς την PCA, καθώς προσπαθεί να καλύψει τη μέγιστη διακύμανση των δεδομένων μας. Επιπλέον, όμως, αναζητά άξονες που να συσχετίζονται κατά το δυνατόν με κάποια κλάση, στην παρούσα περίπτωση την εβδομάδα αμνιοπαρακέντησης. Το διάγραμμα συνιστωσών που οπτικοποιεί τις παρατηρήσεις φαίνεται στο Σχήμα 9.2. Στο διάγραμμα διαφαίνεται η ύπαρξη συσχέτισης της εβδομάδας αμνιοπαρακέντησης με τα δεδομένα που λήφθηκαν από την ανάλυση με NMR. Πιο συγκεκριμένα παρατηρούμε ότι δείγματα που λήφθηκαν μεταξύ 17^{ης} και 20^{ης} εβδομάδας εμφανίζονται αρκετά συγκεντρωμένα, ενώ δείγματα που συλλέχθηκαν μεταξύ 21^{ης} και 24^{ης} εβδομάδας διασπείρονται στο δισδιάστατο χώρο. Αυτό, πρακτικά επιβεβαιώνει την υπόθεση ότι το υπόστρωμα αμνιακού υγρού προκειμένου να μελετηθεί περαιτέρω, χρειάζεται να προέρχεται από παρόμοιες ως προς την εβδομάδα δειγματοληψίες.

Με βάση αυτή την παρατήρηση, διερευνήθηκε η αιτία που διαφοροποιεί τα δείγματα σε σχέση με την εβδομάδα αμνιοπαρακέντησης κατασκευάζοντας μοντέλο OPLS-DA (Σχήμα 9.3B). Με ανάλυση μετάθεσης (Σχήμα 9.3Γ) ελέγχεται η επικύρωση του μοντέλου αυτού και, μετά την αποδοχή του, κατασκευάζεται διάγραμμα συντελεστών (coefficients' plot) (Σχήμα 9.4).



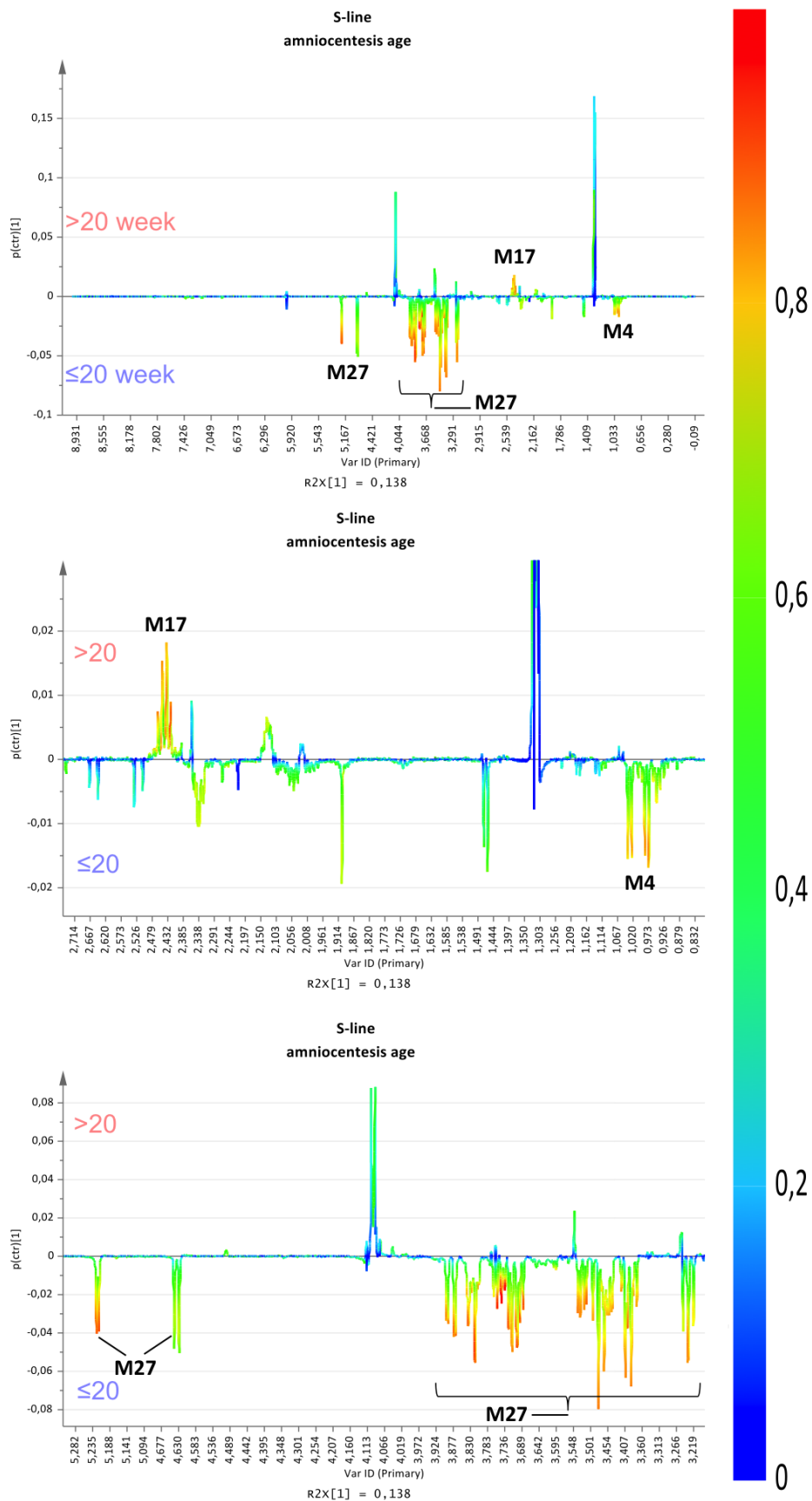
Σχήμα 9.2. PLS διάγραμμα όπου διαφαίνεται η συσχέτιση της μήτρας των δεδομένων που λήφθηκαν από το NMR με τον παράγοντα της εβδομάδας αμνιοπαρακέντησης.



Σχήμα 9.3. Α. Σχήμα 9.2 με επισήμανση των δειγμάτων που διαφοροποιούνται. Β. OPLS-DA μοντέλο δειγμάτων ≤20^η εβδομάδα (μπλε) και >20^η εβδομάδα (κόκκινα). Γ. Επικύρωση μοντέλου με ανάλυση μετάθεσης (permutation plot).

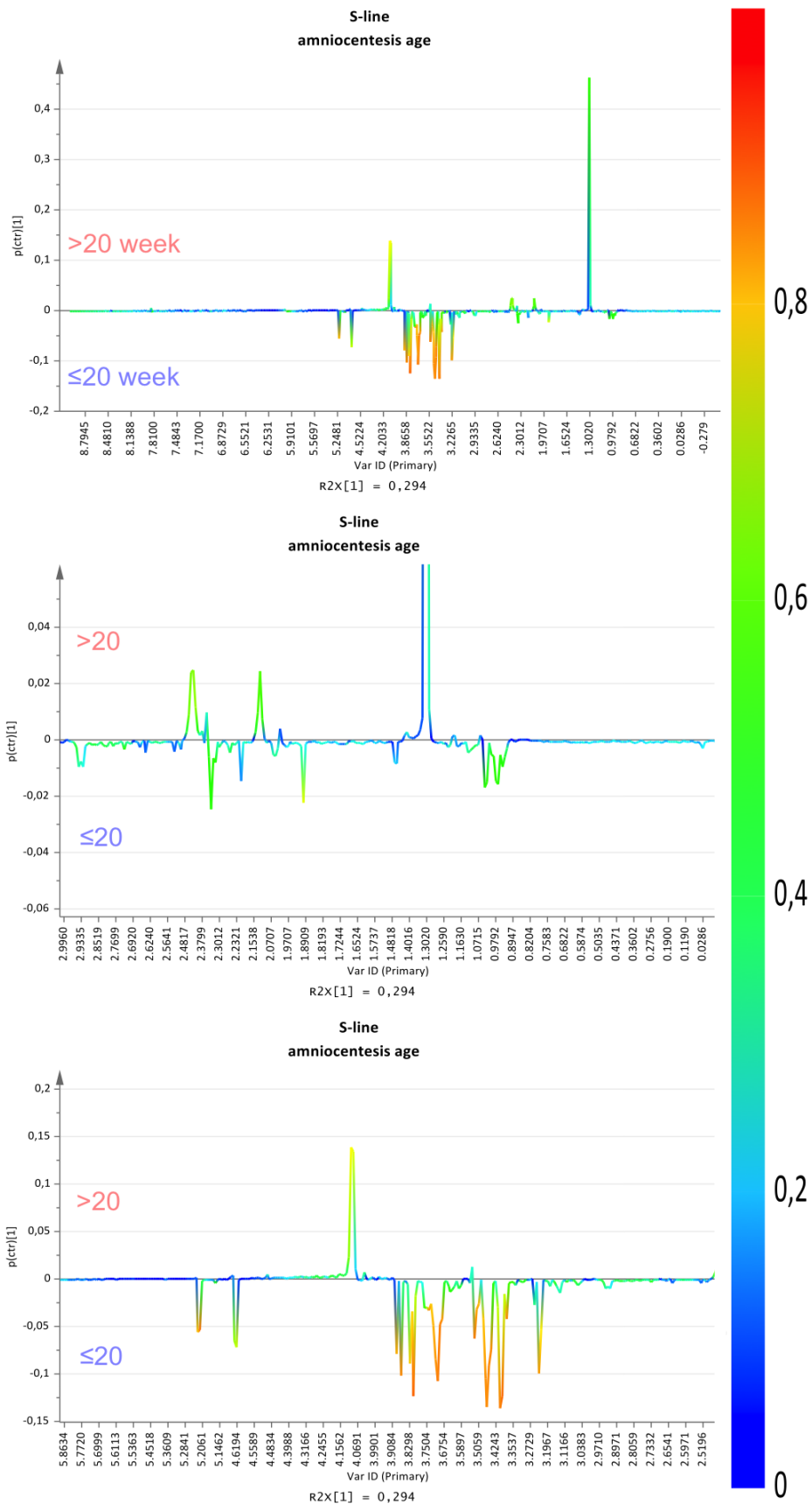
Το διάγραμμα συντελεστών OPLS-DA οπτικοποιεί τις μεταβλητές που ευθύνονται για το μοντέλο και για τη διάκριση των κλάσεων που έχουν δηλωθεί κατά την κατασκευή του μοντέλου OPLS-DA. Βέλτιστος τρόπος προβολής των διαγραμμάτων αυτών σε περιπτώσεις δεδομένων NMR θεωρείται το ψευδο-φάσμα NMR. Πρόκειται για μια γραμμή που αναπαριστά κατά προσέγγιση τα πραγματικά φάσματα NMR που χρησιμοποιήθηκαν και κατασκευάζεται βάσει της συνδιακύμανσης των μεταβλητών. Η σημαντικότητα των μεταβλητών στον παρατηρούμενο διαχωρισμό του μοντέλου υποδεικνύεται με χρωματική κλίμακα, όπου τα ψυχρά χρώματα αντιστοιχούν σε χαμηλή συσχέτιση, ενώ τα θερμά βρίσκονται σε υψηλή συσχέτιση με τον μελετώμενο διαχωρισμό.

Στο Σχήμα 9.4 παρουσιάζεται το ψευδο-φάσμα NMR και δύο μεγεθύνσεις των περιοχών με τις υψηλότερες συσχετίσεις για το διαχωρισμό αυτό (θερμά χρώματα). Σημαντική αύξηση στα δείγματα δειγματοληψίας μετά τις είκοσι (20) εβδομάδες παρατηρείται να έχει ο μεταβολίτης γλουταμίνη, ενώ σημαντική μείωση παρατηρείται στους μεταβολίτες βαλίνη και γλυκόζη.

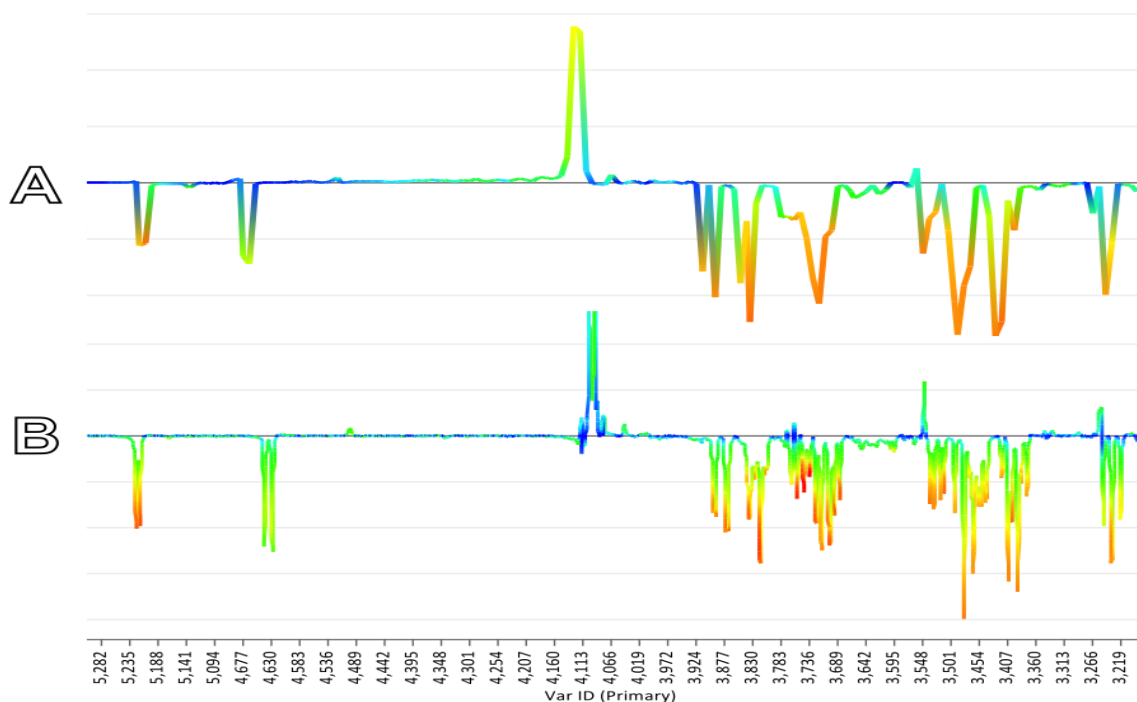


Σχήμα 9.4. S-line διάγραμμα μοντέλου OPLS-DA (διαίρεση 0,00035 ppm) σύγκρισης εβδομάδων αμνιοπαρακέντησης και μεγέθυνση περιοχών 0,8-2,7 ppm και 3,2-5,2 ppm. Σημ.: M4 βαλίνη, M17 γλουταμίνη, M27 γλυκόζη.

Στο σημείο αυτό κρίνεται σκόπιμο να παρουσιαστούν ακριβώς οι ίδιοι τύποι διαγραμμάτων (OPLS-DA και S-line) με αυτά που δόθηκαν παραπάνω, των δεδομένων που κατά την προεπεξεργασία διαιρέθηκαν σε μεγαλύτερες περιοχές χημικών μετατοπίσεων, εφαρμόζοντας αλγόριθμο μη σταθερού πλάτους με το λογισμικό ACD/NMR Processor. Το ψευδο-φάσμα NMR που κατασκευάστηκε σε αυτή τη περίπτωση φαίνεται στο Σχήμα 9.5. Είναι εμφανής η σημαντική απώλεια σε φασματική ανάλυση που δεν καθιστά εύκολο τον μετέπειτα προσδιορισμό των υπεύθυνων για τη διαφοροποίηση μεταβολιτών. Στο Σχήμα 9.6 παρουσιάζεται η ίδια περιοχή χημικών μετατοπίσεων, όπως προβάλλεται στο S-line διάγραμμα των δεδομένων, με διαίρεση 0.00035 ppm και 0.01 ppm, ώστε να γίνει αισθητό το μέγεθος της απώλειας σε φασματική ανάλυση. Παρατηρούμε ότι η πολλαπλότητα των κορυφών δεν είναι ορατή στην περίπτωση της διαίρεσης ανά 0,01 ppm και οι μικρές κορυφές, οι οποίες στη μικρότερη διαίρεση (0.00035 ppm) διακρίνονται, εδώ είναι αδύνατο να διαχωριστούν από τη βασική γραμμή. Ωστόσο, χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο διαίρεσης μη σταθερού πλάτους, χωρίς να έχει προηγηθεί η χρονοβόρα διαδικασία της ευθυγράμμισης των φασμάτων, είναι εύκολο να αποκτήσουμε μια πρώτη αίσθηση των δεδομένων. Ακόμα, αποτελεί έναν εύκολο και γρήγορο τρόπο για να ανακτήσουμε τα εμβάδα ολόκληρων κορυφών συγκεκριμένων μεταβολιτών, προκειμένου να πραγματοποιηθούν τυχόν επιθυμητές μονοπαραγοντικές στατιστικές αναλύσεις.



Σχήμα 9.5. S-line διάγραμμα μοντέλου OPLS-DA (0,01 ppm) σύγκρισης εβδομάδων αμνιοπαρακέντησης και μεγέθυνση περιοχών 0-2,9 ppm και 2,5-5,8 ppm.



Σχήμα 9.6. *S-line* διαγράμματα μοντέλου OPLS-DA περιοχής 3,2-5,2 ppm. **A.** αλγόριθμος μη σταθερού πλάτους διαίρεσης 0,01 ppm (ACD/NMR Processor) και **B.** αλγόριθμος σταθερού πλάτους 0.00035 ppm (MestReNova).

Αφαιρώντας τα δείγματα των αμνιακών υγρών που εμφανίζονται τόσο σημαντικά διαφοροποιημένα, προκειμένου να δημιουργηθεί ένας δειγματοχώρος απαλλαγμένος από την επιρροή της διαφορετικής εβδομάδας δειγματοληψίας, συνεχίστηκε ο έλεγχος συσχετίσεων με μια σειρά άλλων παραμέτρων. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν για συσχετίσεις με τη μήτρα δεδομένων των φασμάτων NMR ήταν ο δείκτης μάζας σώματος των μητέρων (Body Mass Index, BMI), η κατανάλωση συγκεκριμένων τροφίμων και η κατανάλωση συγκεκριμένων διατροφικών ομάδων τροφίμων.

Ο δείκτης μάζας σώματος αποτελεί μια γενική ένδειξη για τον εύκολο υπολογισμό του βαθμού παχυσαρκίας ενός ατόμου. Είναι το πιο ευρέως διαδεδομένο διαγνωστικό εργαλείο πιθανών προβλημάτων υγείας που σχετίζονται με το βάρος. Ο υπολογισμός του προκύπτει από τη σχέση:

$$\Delta M \Sigma = \frac{\text{βάρος (kg)}}{(\text{ύψος})^2 (\text{m}^2)} \quad (9.1)$$

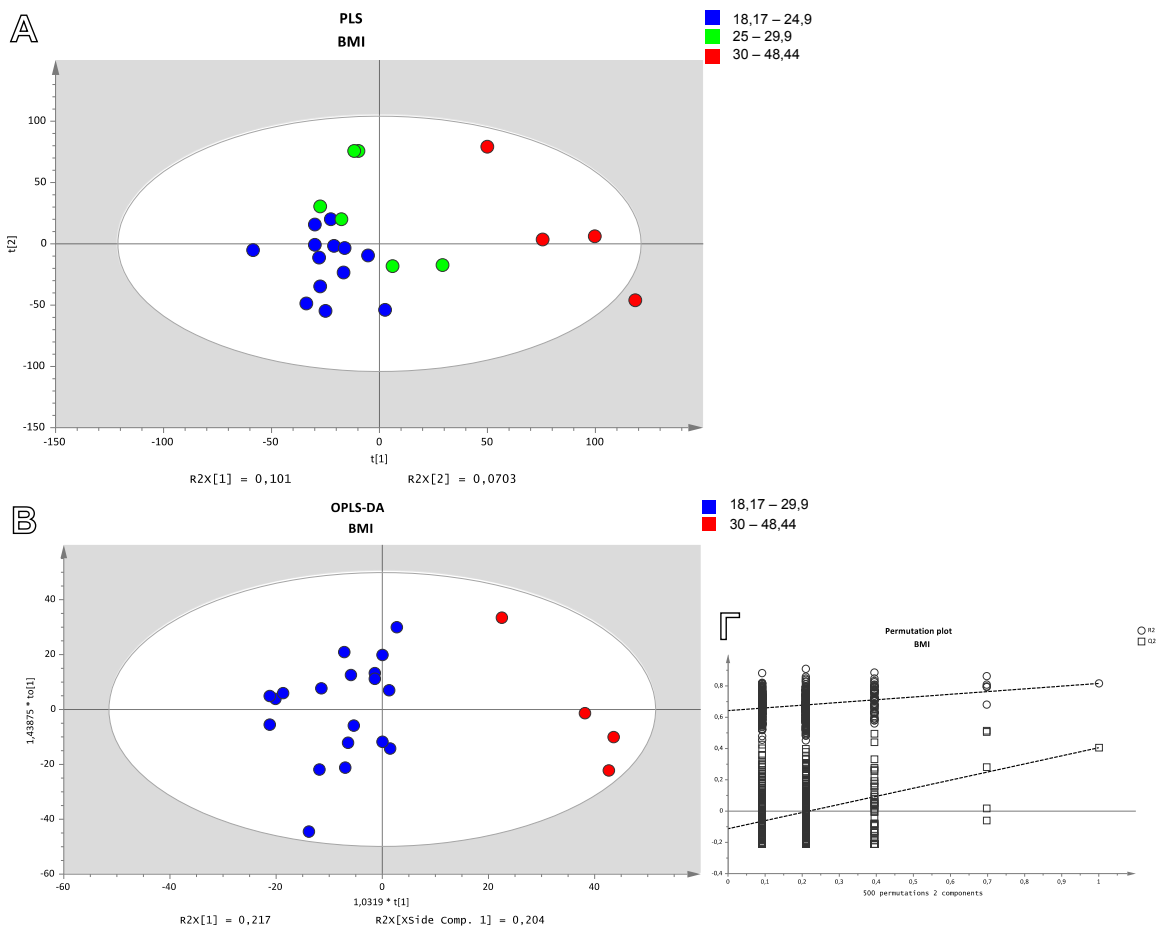
Παγκοσμίως κυριαρχεί η σύμβαση ότι άτομο με ΔΜΣ:

- μικρότερο από 18,5 είναι ελλιποβαρές,
- μεταξύ 18,5 και 24,9 είναι φυσιολογικού βάρους,
- μεταξύ 25 και 29,9 είναι υπέρβαρο και
- μεγαλύτερο από 30 πάσχει από παχυσαρκία.

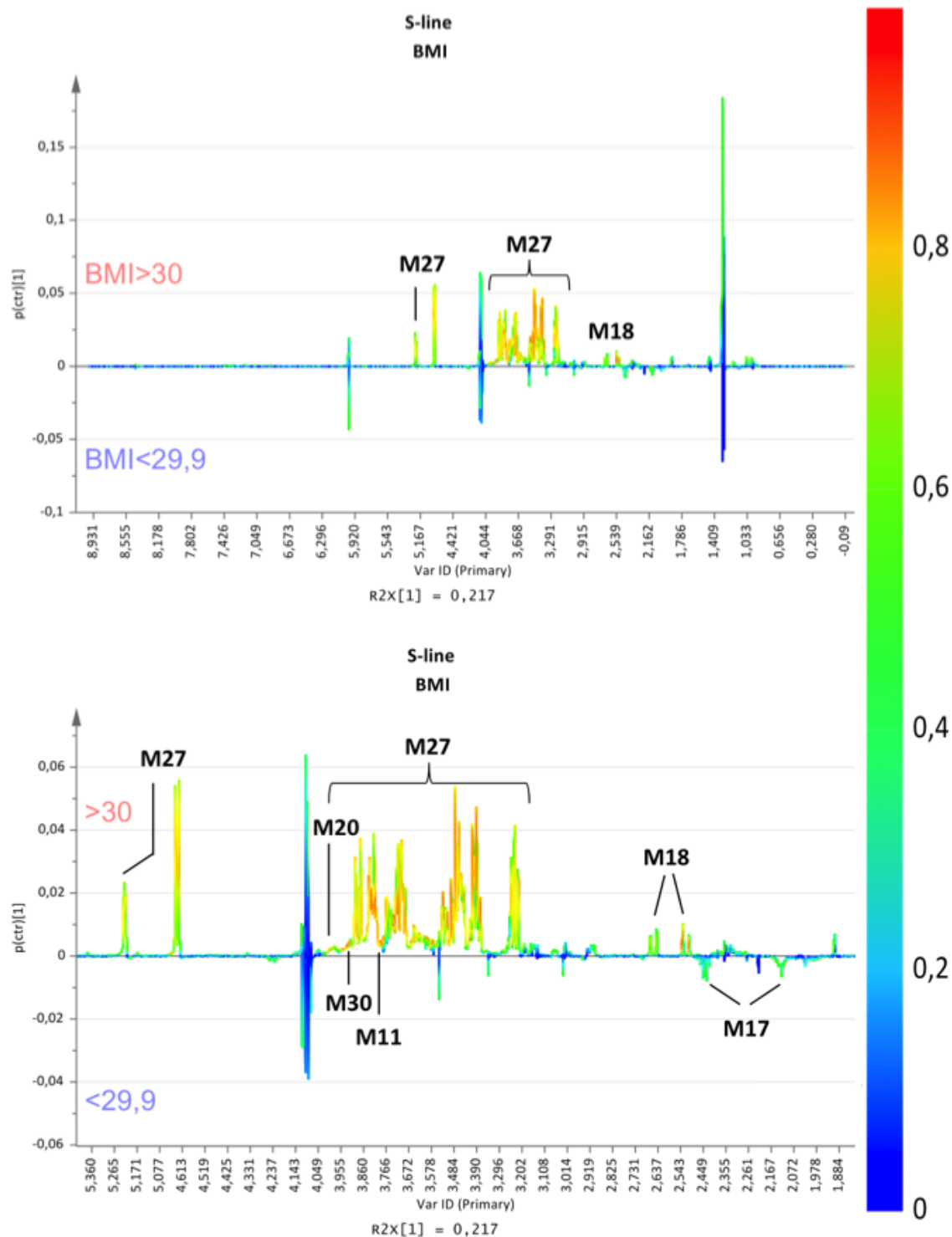
Αυτά τα στοιχεία ήταν διαθέσιμα για τις γυναίκες από τις οποίες έγινε η λήψη του αμνιακού υγρού και χρησιμοποιήθηκαν ώστε να ελεγχθεί η ύπαρξη συσχέτισης του με τα δεδομένα των φασμάτων του αμνιακού υγρού.

Ο έλεγχος επιτεύχθηκε και πάλι με τη δημιουργία μοντέλου PLS και συσχετίζοντας τη μήτρα δεδομένων των δειγμάτων αμνιακού υγρού με ανεξάρτητη μήτρα που περιείχε πληροφορίες των δεικτών μάζας σώματος των γυναικών. Το διάγραμμα συνιστωσών που οπτικοποιεί τις παρατηρήσεις φαίνεται στο Σχήμα 9.7Α. Στο διάγραμμα είναι εμφανής η συσχέτιση του δείκτη μάζας σώματος με τα δεδομένα που λήφθηκαν από την ανάλυση των αμνιακών τους υγρών με NMR. Πιο συγκεκριμένα παρατηρούμε ότι τα δείγματα των γυναικών που έχουν ΔΜΣ με τιμές μικρότερες από 24,9 εμφανίζονται αρκετά συγκεντρωμένα, ενώ των γυναικών με ΔΜΣ μεγαλύτερο από 30 (υπέρβαρες και παχύσαρκες) διαφοροποιούνται έντονα.

Χρησιμοποιώντας την παρατήρηση αυτή, διερευνήθηκε η αιτία που διαφοροποιεί τα δείγματα σε σχέση με το ΔΜΣ των γυναικών κατασκευάζοντας μοντέλο OPLS-DA (Σχήμα 9.7B). Με ανάλυση μετάθεσης (Σχήμα 9.7Γ) ελέγχεται η επικύρωση του μοντέλου OPLS-DA και, καθώς κρίνεται αποδεκτό, κατασκευάζεται διάγραμμα συντελεστών. Στο Σχήμα 9.8 παρουσιάζεται το ψευδο-φάσμα NMR και μεγέθυνση της περιοχής με τις υψηλότερες συσχετίσεις για το διαχωρισμό που μελετάται. Σημαντική αύξηση στα δείγματα των μητέρων με ΔΜΣ>30 παρατηρείται να έχουν οι μεταβολίτες κιτρικό οξύ, γλυκόζη, κρεατινίνη, τυροσίνη και αλανίνη. Αντίθετα, στις μητέρες με ΔΜΣ<29,9 εμφανίζεται ελαφρά αυξημένος ο μεταβολίτης γλουταμίνη.



Σχήμα 9.7. **A.** PLS διάγραμμα όπου διαφαίνεται η συσχέτιση της μήτρας των δεδομένων που λήφθηκαν από το NMR (διαίρεση 0,00035 ppm) με τον παράγοντα δείκτη μάζας σώματος των μητέρων. **B.** OPLS-DA μοντέλο δειγμάτων με BMI<29,9 (μπλε) και με BMI>30 (κόκκινα). **Γ.** Επικύρωση μοντέλου με ανάλυση μετάθεσης (permutation plot).



Σχήμα 9.8. S-line διάγραμμα μοντέλου OPLS-DA (0,00035 ppm) σύγκρισης ΔΜΣ<29,9 με ΔΜΣ>30 των μητέρων και μεγεθυμένη περιοχή 1,8-5,3 ppm (κάτω). Σημ.: **M11** αλανίνη, **M17** γλουταμίνη, **M18** κιτρικό οξύ, **M20** κρεατινίνη, **M27** γλυκόζη, **M30** τυροσίνη.

Ο έλεγχος συσχετίσεων ως προς τις διατροφικές συνήθειες των γυναικών βασίστηκε σε βιβλιογραφικά ευρεθείσα ταξινόμηση [18]. Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μελέτη είναι δυνατό να διακριθούν τρεις μεγάλες ομάδες τροφίμων (food groups):

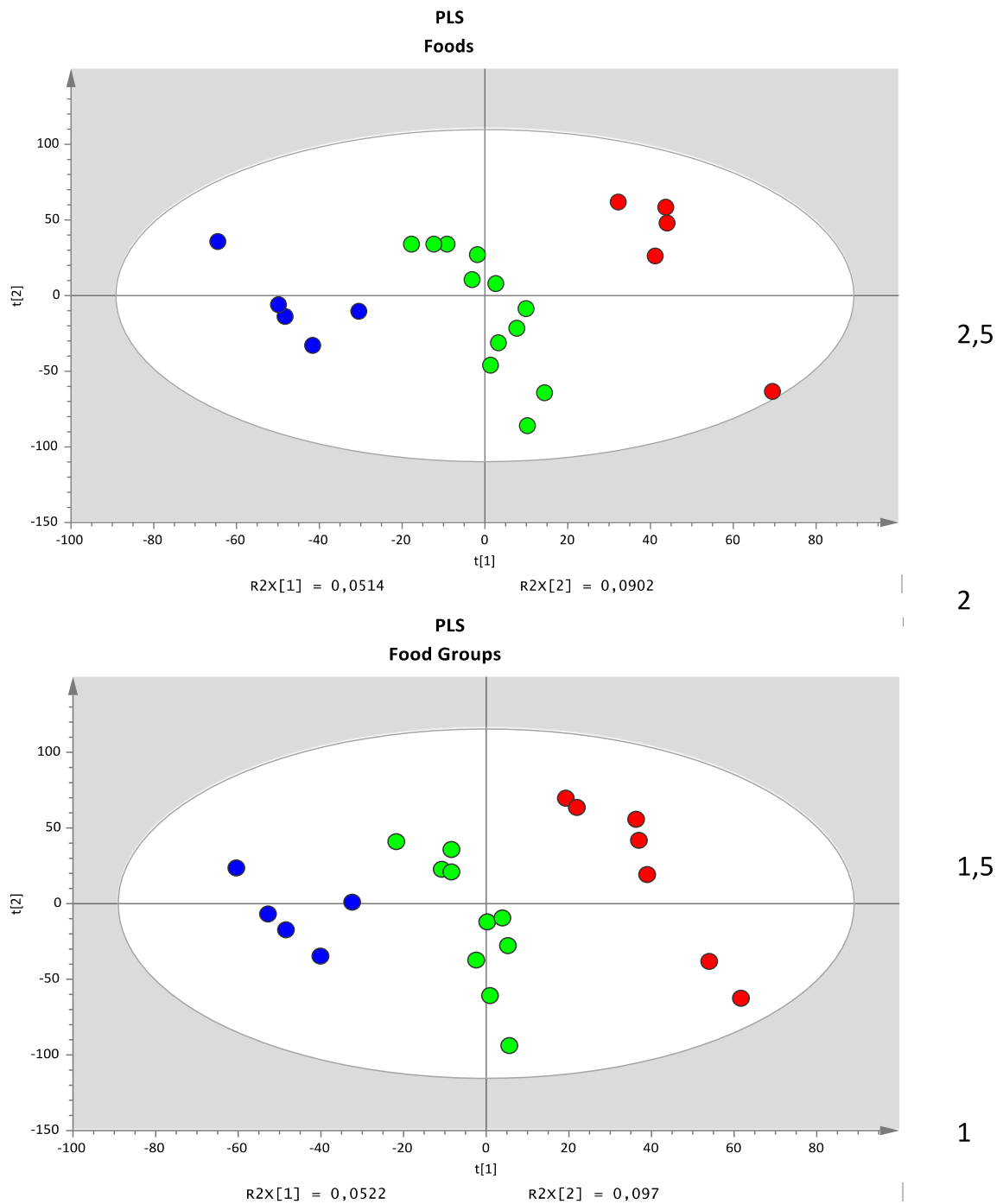
- ομάδα τροφίμων 1: λαχανικά, προϊόντα ολικής άλεσης, ψάρι.
- ομάδα τροφίμων 2: φρούτα
- ομάδα τροφίμων 3: προϊόντα κρέατος, λευκά ψωμιά, βούτυρο.

Η τελευταία ομάδα θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως η πιο ανθυγιεινή, ενώ οι ομάδες 1 και 2 αντιπροσωπεύουν περισσότερο υγιεινούς τύπους διατροφής ατόμων με διαφορετικές διατροφικές συνήθειες.

Επιπλέον, μια ακόμη ταξινόμηση δημιουργήθηκε, βασιζόμενη σε συγκεκριμένα τρόφιμα και την κατανάλωση τους ή όχι από τα υποκείμενα της μελέτης, σύμφωνα με τις φυσιολογικές τους διατροφικές συνήθειες. Η ταξινόμηση αυτή (foods) έγινε ως εξής:

- ομάδα 1: δημητριακά
- ομάδα 2: προϊόντα κρέατος
- ομάδα 3: φρούτα και λαχανικά

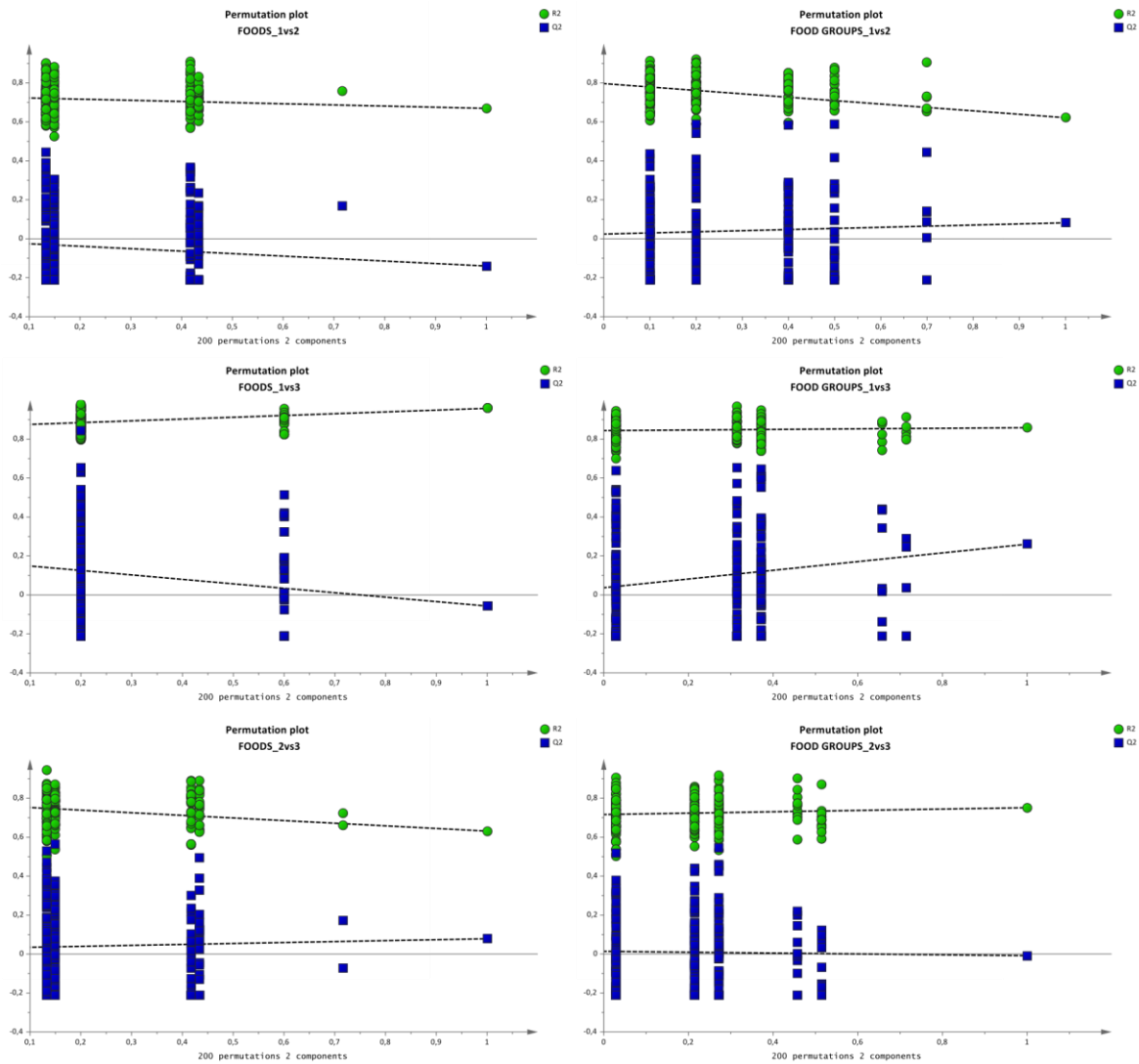
Κατά τον έλεγχο ύπαρξης συσχετίσεων ως προς τις παραπάνω ομάδες με μοντέλα PLS, φάνηκε να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της μήτρας δεδομένων NMR των δειγμάτων αμνιακού υγρού με τις ανεξάρτητη μήτρες που περιέχουν πληροφορίες των διατροφικών ομάδων των γυναικών. Τα διάγραμμα συνιστωσών που οπτικοποιούν τις παρατηρήσεις φαίνονται στο Σχήμα 9.9. Στα δύο διαγράμματα είναι εμφανής η συσχέτιση των διατροφικών ομάδων με τα δεδομένα που λήφθηκαν από την ανάλυση των αμνιακών υγρών με NMR. Κατά την διερεύνηση των διαφοροποιήσεων των δειγμάτων σε σχέση με τις διατροφικές ομάδες ή τα μεμονωμένα τρόφιμα κατασκευάστηκαν σταυρωτά μοντέλα OPLS-DA (ομάδες 1-2, 1-3, 2-3). Ωστόσο, τα μοντέλα αυτά δεν κατέστη δυνατό να επικυρωθούν προκειμένου να προχωρήσουμε στον προσδιορισμό των μεταβλητών που οδηγούν στις διαφοροποιήσεις μεταξύ των ομάδων. Στο Σχήμα 9.10 παρουσιάζονται τα μη αποδεκτά διαγράμματα ανάλυσης μετάθεσης και η διερεύνηση αυτή σταμάτησε στο σημείο αυτό.



Σχήμα 9.9. PLS διαγράμματα συσχέτισης της μήτρας των δεδομένων που λήφθηκαν από το NMR (διαίρεση 0,00035 ppm) με τους παράγοντες που αφορούν τις διατροφικές συνήθειες των μητέρων. Σημ.: συσχέτιση με μεμονωμένα τρόφιμα – πάνω διάγραμμα, συσχέτιση με ομάδες τροφίμων – κάτω διάγραμμα.

Μεμονωμένα τρόφιμα

Ομάδες τροφίμων



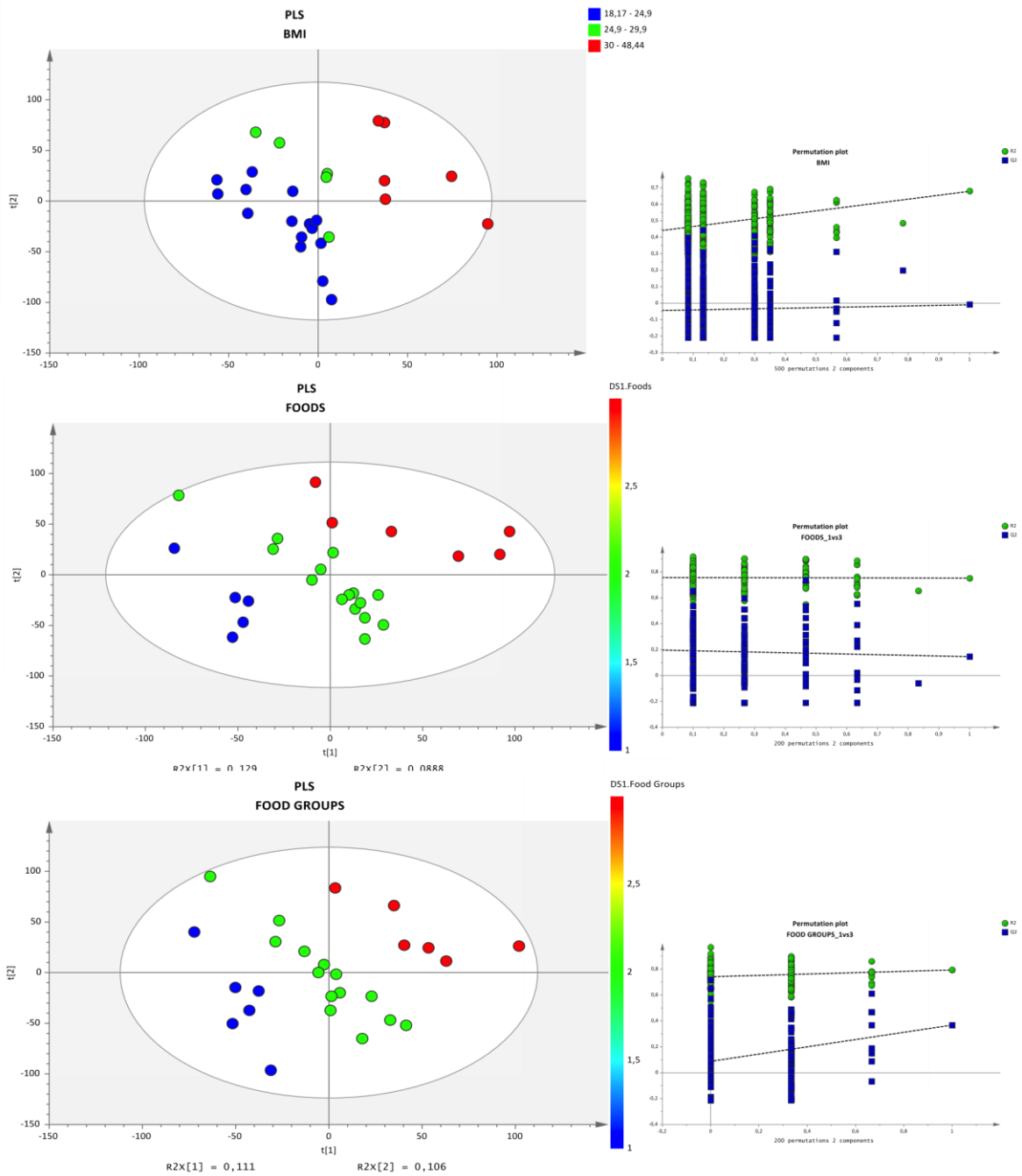
Σχήμα 9.10. Απορριπτικές αναλύσεις μεταθέσεων των σταθρωτών μοντέλων OPLS-DA των ομάδων 1,2,3 τόσο για τον έλεγχο συσχέτισης με μεμονωμένα τρόφιμα, όσο και για τον έλεγχο συσχέτισης με ομάδες τροφίμων.

9.1.3. Υπόστρωμα ορού αίματος

Στα δείγματα των ορών αίματος που λήφθηκαν από τις ίδιες μητέρες ελέγχθηκε η ύπαρξη συσχετίσεων με τους παράγοντες δείκτης μάζας σώματος, μεμονωμένα τρόφιμα και ομάδες τροφίμων. Για τον σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν μοντέλα PLS, όπως ακριβώς συνέβη με τα αμνιακά υγρά. Και για τους τρεις αυτούς παράγοντες τα μοντέλα που δημιουργήθηκαν έδειξαν συσχέτιση αυτών με τα δεδομένα του NMR για τους ορούς αίματος, διαιρεμένα κατά 0,00035 ppm (Σχήμα 9.11). Διευρύνοντας τον έλεγχο των συσχετίσεων δημιουργήθηκαν μοντέλα OPLS-DA για σύγκριση των εξής ομάδων:

- $\Delta M\Sigma < 30$ και $\Delta M\Sigma > 30$,
- ομάδα μεμονωμένων τροφίμων 1 και ομάδα μεμονωμένων τροφίμων 2,
- ομάδα μεμονωμένων τροφίμων 1 και ομάδα μεμονωμένων τροφίμων 3,
- ομάδα μεμονωμένων τροφίμων 2 και ομάδα μεμονωμένων τροφίμων 3,
- ομάδα τροφίμων 1 και ομάδα τροφίμων 2,
- ομάδα τροφίμων 1 και ομάδα τροφίμων 3 και
- ομάδα τροφίμων 2 και ομάδα τροφίμων 3.

Δυστυχώς, τα παραπάνω μοντέλα OPLS-DA δεν κατέστη δυνατό να επικυρωθούν από τις αναλύσεις μετάθεσης που πραγματοποιήθηκαν, κι αυτό δεν μας επιτρέπει να εμβαθύνουμε στην εύρεση των μεταβολιτών που διαφοροποιούν τις παραπάνω ομάδες στο υπόστρωμα ορού αίματος. Ενδεικτικά παρουσιάζονται στο Σχήμα 9.11 τρία μοντέλα της ανάλυσης μετάθεσης, ένα για κάθε παράγοντα που ελέγχθηκε.



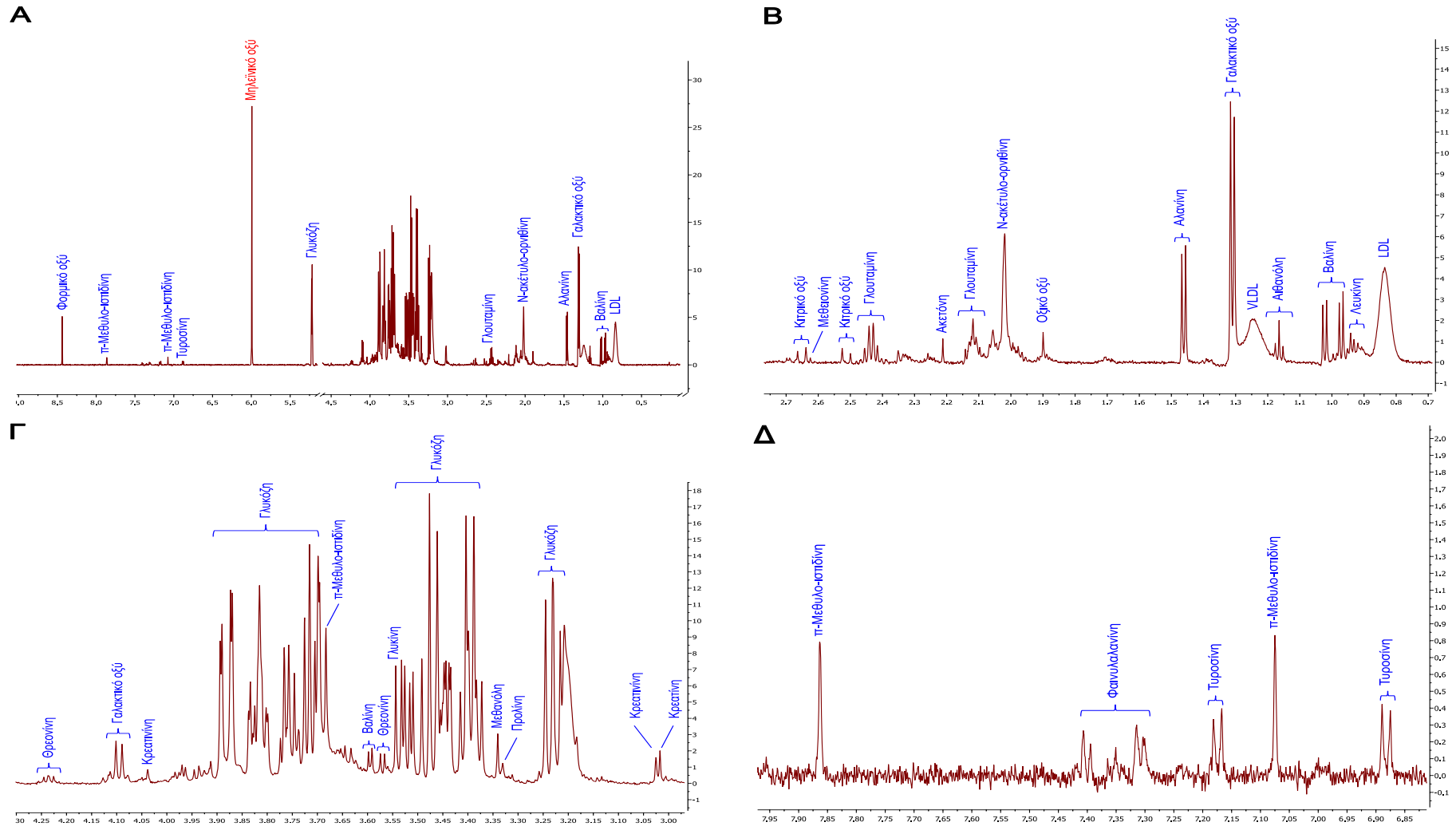
Σχήμα 9.11 PLS διαγράμματα συσχέτισης της μήτρας των δεδομένων που λήφθηκαν από τον NMR (διαίρεση 0,00035 ppm) με τους παράγοντες ΔΜΣ, ομάδες μεμονωμένων τροφίμων και ομάδες τροφίμων. Δεξιά παρουσιάζονται ενδεικτικές απορριπτικές αναλύσεις μεταθέσεων των μοντέλων OPLS-DA. Σημ.: συσχέτιση με ΔΜΣ – πάνω διάγραμμα, συσχέτιση με μεμονωμένα τρόφιμα – μεσαίο διάγραμμα, συσχέτιση με ομάδες τροφίμων – κάτω διάγραμμα.

9.2. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ

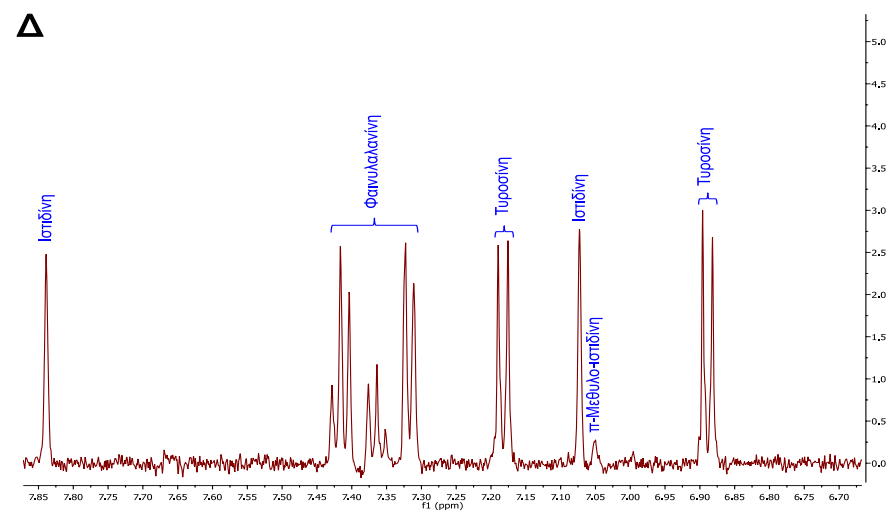
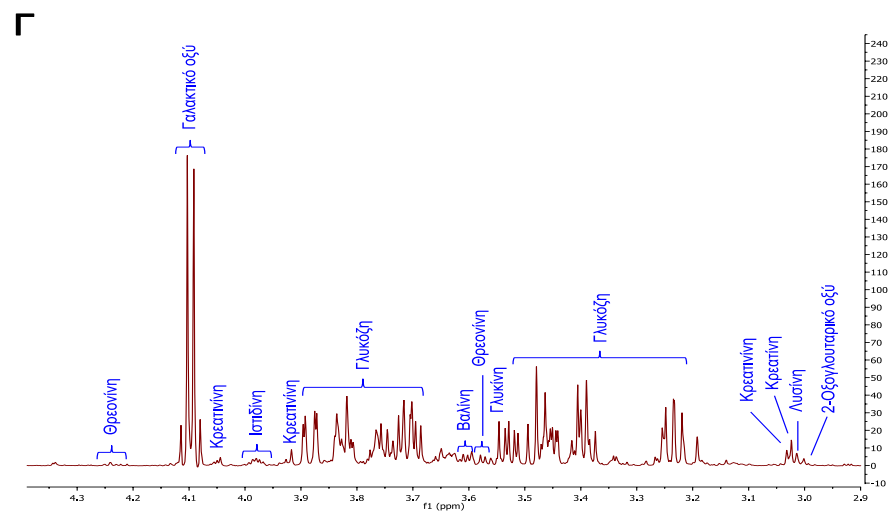
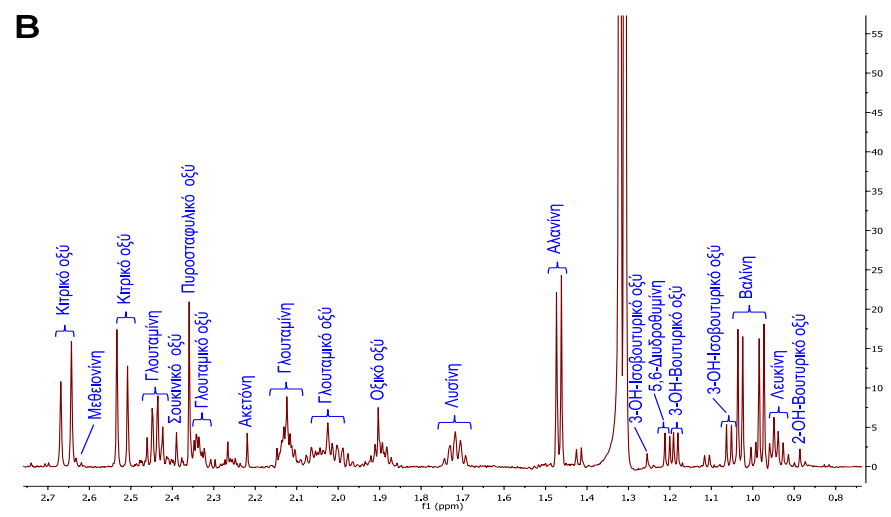
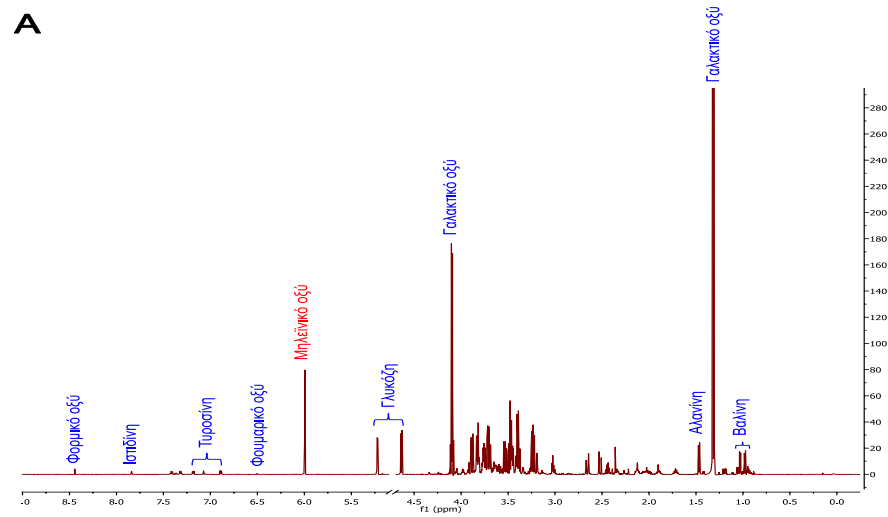
Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών, στα δύο υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη, έγινε με χρήση του λογισμικού Chenomx NMR Suite, και πιο συγκεκριμένα του εργαλείου Chenomx Profiler. Περαιτέρω επιβεβαίωση των ευρισκόμενων μεταβολιτών επιτεύχθηκε μέσω σύγκρισης των απορροφήσεων τους με απορροφήσεις προτύπων ενώσεων. Φάσματα προτύπων ενώσεων υπάρχουν καταχωρημένα σε ελεύθερες βάσεις δεδομένων του διαδικτύου. Οι βάσεις φασμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία αυτή είναι οι ακόλουθες:

- Human Metabolome Database (HMDB)
- Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB)
- Spectral Database for Organic Compounds (SDBS)
- NMR Shift Database (NMRShiftDB)
- Madison Metabolomics Consortium Database (MMCD)

Τελικά κατέστη δυνατό να ταυτοποιηθούν 35 μεταβολίτες στον ορό του αίματος και 39 στο αμνιακό υγρό, ενώ συνολικά και στα δύο υποστρώματα ταυτοποιήθηκαν 47 μεταβολίτες. Στο Σχήμα 9.1 παρατίθεται ένα τυπικό φάσμα ορού αίματος με επισημασμένες τις απορροφήσεις των κυριότερων μεταβολιτών που ταυτοποιήθηκαν. Το Σχήμα 9.2 αποτελεί την αντίστοιχη αναπαράσταση για ένα τυπικό δείγμα αμνιακού υγρού της μελέτης.



Σχήμα 9.1. Φάσμα ^1H NMR 600 MHz δειγμάτων ορού αίματος και οι κυριότεροι μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν. **A.** ολόκληρη η φασματική περιοχή 0-9 ppm, **B.** μεγεθυμένη περιοχή 0.7–2.2 ppm, **Γ.** μεγεθυμένη περιοχή 3.0–4.3 ppm, **Δ.** μεγεθυμένη περιοχή 6.8–7.9 ppm.



Σχήμα 9.2. Φάσμα ^1H NMR 600 MHz δείγματος αμνιακού υγρού και οι κυριότεροι μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν. **A.** ολόκληρη η φασματική περιοχή 0–9 ppm, **B.** μεγεθυμένη περιοχή 0.8–2.7 ppm, **Γ.** μεγεθυμένη περιοχή 2.9–4.4 ppm, **Δ.** μεγεθυμένη περιοχή 6.7–7.9 ppm.

Πίνακας 9.1. Μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν στα δύο υποστρώματα με φασματοσκοπία $^1\text{H NMR}$ και οι χημικές μετατοπίσεις αυτών. Με έντονη γραμματοσειρά αναγράφονται οι περιοχές όπου καθίσταται δυνατό να εφαρμοστεί η ολοκλήρωση της κορυφής για κάθε μεταβολίτη.

ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ			ΑΜΝΙΑΚΟ ΥΓΡΟ		
	Μεταβολίτες	Χημικές μετατοπίσεις (ppm)		Μεταβολίτες	Χημικές μετατοπίσεις (ppm)
M1	Λιποπρωτεΐνη χαμηλής Πυκνότητας	0.87	M36	2-OH-ισοβαλερικό οξύ	0.82
M2	Λευκίνη	0.92	M37	Πανθοθενικό οξύ	0.89, 0.93
M3	3-OH-3-μεθυλοβαλερικό οξύ	0.93	M38	2-OH-βουτυρικό οξύ	0.89
M4	Βαλίνη	0.98 , 1.03, 3.60	M39	2-OH-βαλερικό οξύ	0.9
M5	Ισολευκίνη	0.94, 1.00	M2	Λευκίνη	0.94, 0.95
M6	Αιθανόλη	1.17, 3.64	M4	Βαλίνη	0.98 , 1.03, 3.60
M7	3-OH-βουτυρικό οξύ	1.19, 2.38	M5	Ισολευκίνη	0.93, 1.00
M8	Λιποπρωτεΐνη πολύ χαμηλής Πυκνότητας	1.26	M40	3-OH-ισοβουτυρικό οξύ	1.06
M9	Θρεονίνη	1.32, 3.58, 4.24	M7	3-OH-βουτυρικό οξύ	1.19, 2.29
M10	Γαλακτικό οξύ	1.32 , 4.10	M41	5,6-Διυδροθυμίνη	1.21 , 3.18
M11	Αλανίνη	1.47	M9	Θρεονίνη	1.32, 3.58, 4.24
M12	Οξικό οξύ	1.91	M10	Γαλακτικό οξύ	1.32 , 4.10
M13	N-ακέτυλο-ορνιθίνη	2.03 , 3.02, 7.96	M11	Αλανίνη	1.47 , 3.78
M14	Ακετόνη	2.22	M12	Οξικό οξύ	1.9
M15	Πυροσταφυλικό οξύ	2.36	M13	N-ακέτυλο-ορνιθίνη	2.03 , 3.02, 7.96
M16	Σουκινικό οξύ	2.39	M14	Ακετόνη	2.22
M17	Γλουταμίνη	2.11, 2.45 , 3.78	M42	Ακετοξικό οξύ	2.27
M18	Κιτρικό οξύ	2.52 , 2.68	M43	Γλουταμικό οξύ	2.32 , 2.35
M19	Μεθειονίνη	2.13 , 2.63	M15	Πυροσταφυλικό οξύ	2.36
M20	Κρεατίνη	3.02 , 3.92	M16	Σουκινικό οξύ	2.39
M21	Κρεατινίνη	3.03, 4.04	M17	Γλουταμίνη	2.45 , 2.13
M22	Διμέθυλο-σουλφόνη	3.14	M18	Κιτρικό οξύ	2.52 , 2.62
M23	Προλίνη	2.34, 3.33	M19	Μεθειονίνη	2.12 , 2.63
M24	Μεθανόλη	3.35	M44	2-Οξογλουταρικό οξύ	2.44, 3.00
M25	Γλυκίνη	3.55	M45	Λυσίνη	1.72 , 3.02 , 3.75
M26	Ασκορβικό οξύ	4.50	M20	Κρεατίνη	3.02 , 3.92
M27	Γλυκόζη	4.64 , 5.23	M21	Κρεατινίνη	3.03, 4.04
M28	Μανόζη	5.18	M22	Διμέθυλο-σουλφόνη	3.14
M29	Μηλεϊνικό οξύ	6.00	M24	Μεθανόλη	3.34
M30	Τυροσίνη	6.89, 7.18	M25	Γλυκίνη	3.55
M31	Καρνοσίνη	7.03, 7.94	M27	Γλυκόζη	3.89 , 4.64 , 5.23
M32	π -Μεθυλο-ιστιδίνη	3.69, 7.08 , 7.86	M28	Μανόζη	4.89 , 5.17
M33	Φαινυλαλανίνη	7.31, 7.36, 7.42	M29	Μηλεϊνικό οξύ	6.00
M34	Ξανθίνη	7.86	M46	Φουμαρικό οξύ	6.51
M35	Φορμικό οξύ	8.44	M30	Τυροσίνη	6.89, 7.18
			M32	π -Μεθυλο-ιστιδίνη	7.05 , 7.92
			M47	Ιστιδίνη	7.07 , 7.84
			M33	Φαινυλαλανίνη	7.32, 7.36, 7.42
			M35	Φορμικό οξύ	8.44

ΚΕΦ. 10 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η παρούσα εργασία στοχεύει στη μελέτη της ανάλυσης μεταβολικού προφίλ αμνιακού υγρού και ορού αίματος γυναικών που βρίσκονται στο δεύτερο τρίμηνο της εγκυμοσύνης τους με την τεχνολογία του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και τη συσχέτιση των υποστρωμάτων με παράγοντες που σχετίζονται με τη διατροφή των υποκειμένων. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν ειδικά λογισμικά προεπεξεργασίας των φασμάτων (ACD/NMR Processor και MestReNova), πολυπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης (SIMCA 13) και ταυτοποίησης των απορροφήσεων δεδομένων NMR (Chenomx NMR Suite).

Τα δείγματα που μελετήθηκαν είναι δείγματα αμνιακού υγρού και ορού αίματος, είκοσι εννέα (29) γυναικών σε μονήρη κύηση, που υποβλήθηκαν σε αμνιοπαρακέντηση με στόχο τον προγεννητικό έλεγχο, μεταξύ 17^{ης} και 24^{ης} εβδομάδας της κύησης τους.

Η προκατεργασία των δειγμάτων παρέμεινε όσο το δυνατόν απλούστερη κατά περίπτωση υποστρώματος και στοχευμένη στην διατήρηση των φυσικών συστατικών των δειγμάτων κατά το δυνατόν αναλλοίωτα, ώστε να επιτευχθεί η ολιστική ανάλυση τους με τα βέλτιστα δυνατά αποτελέσματα.

Αρχικά στα πλαίσια της προκατεργασίας, σημαντική παρατήρηση αποτελεί η υπεροχή του δινάτριου άλατος του μηλεϊνικού οξέος ως εσωτερικό πρότυπο, έναντι ενώσεων που χρησιμοποιούνται παραδοσιακά στις αναλύσεις με NMR (TSP, TMS κ.α.). Η χρήση του αίρει τα μειονεκτήματα των αλληλεπιδράσεων με ενώσεις των μελετώμενων δειγμάτων σε μελέτες μεταβολομικής, μεταβάλλοντας τις συγκεντρώσεις του προτύπου.

Στο επίπεδο της προεπεξεργασίας υπογραμμίζεται η σημασία της διαίρεσης των φασμάτων σε όσο το δυνατόν μικρότερες περιοχές χημικών μετατοπίσεων, ώστε να διατηρηθεί μια φασματική ανάλυση που να επιτρέπει την παρατήρηση μεταβολιτών αρκετά χαμηλών συγκεντρώσεων. Όπως φάνηκε, το λογισμικό MestReNova είναι κατάλληλο για το σκοπό αυτό, καθώς παρέχει δυνατότητα διαίρεσης μέχρι 0,00033 ppm. Από την άλλη μεριά, το λογισμικό ACD/NMR Processor με τον παραστατικό τρόπο που προβάλλει τις διαιρεμένες περιοχές χημικών μετατοπίσεων επιτρέπει την

εμβαδομέτρηση συγκεκριμένων κορυφών, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν σε περαιτέρω μονοπαραγοντικές στατιστικές αναλύσεις.

Η ξεκάθαρη συσχέτιση των αμνιακών υγρών με την εβδομάδα λήψης τους αποτελεί μια ιδιαίτερα χρήσιμη παρατήρηση για τον πειραματικό σχεδιασμό των μετέπειτα διερευνήσεων στο συγκεκριμένο υπόστρωμα.

Συσχέτιση του υποστρώματος του αμνιακού υγρού με το Δείκτη Μάζας Σώματος των μητέρων σε μεταβολομική μελέτη δεν υπάρχει καταγεγραμμένο στη βιβλιογραφία, με βάση όσα είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε.

Η αδυναμία επικύρωσης των συσχετίσεων τόσο των αμνιακών υγρών, όσο και των ορών αίματος με τις ομάδες που δημιουργήθηκαν βάσει των διατροφικών συνηθειών των γυναικών, θεωρείται πολύ πιθανό να οφείλεται στον περιορισμένο σχετικά πλήθος δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της εργασίας αυτής. Για αυτόν ακριβώς το λόγο, έχει ήδη προγραμματιστεί η ανάλυση μιας ακόμα διαθέσιμης σειράς όμοιων δειγμάτων με την ίδια τεχνική και με τις ίδιες παραμέτρους. Η τεχνική NMR, εξαιτίας της εξαιρετικής αναπαραγωγιμότητας που κατέχει, επιτρέπει τέτοιου είδους συμπληρωματικές μελέτες, που όχι μόνο επιβεβαιώνουν τις αρχικές παρατηρήσεις, αλλά, επιπλέον, ισχυροποιούν στατιστικά το αποτέλεσμα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ

- 1 Nelson, T.R., Gilliest, R.J., Powell, D.A., Schrader, M.C., Manchester, D.K., Pretorius, D.H., *Prenatal Diagnosis*, 1987, **7**, 363-372.
- 2 Bock, J.L., *Clin. Chem.*, 1994, **40**, 56-61.
- 3 Graça, G., Duarte, I.F., Goodfellow, B.J., Barros, A.S., Carreira, I.M., Couceiro, A.B., Spraul, M., and Gil, A.M., *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 8367–8375.
- 4 <http://emedtravel.files.wordpress.com/2013/02/amniocentesis.jpg> (τελευταία επίσκεψη Μάιος 2014).
- 5 Αργυρόπουλος, Ν., Βαρέλλα, Ε., Κουτούλη – Αργυροπούλου, Ε., Λίτινας, Κ., Μαλαμίδου – Ξενικάκη, Ε., Μαρούλης, Α., Σπυρούδης, Σ., Τσολερίδης, Κ., Χατζηαντωνίου – Μαρούλη, Κ., και Χατζημιχαλάκης, Φ., Σημειώσεις Πειραματικής Οργανικής Χημείας, Α. Γενικό μέρος, Υπηρεσία δημοσιευμάτων Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη, 1997, 291-293.
- 6 Bharti, S.K., Roy, and R., *Trend. Anal. Chem.*, 2012, **35**, 5-26.
- 7 Schreiber, E., *NMR Spectroscopy, User Guide*, Pub. N°. 01-999343-00, Rev. B 1207, Varian NMR Systems with VnmrJ Software.
- 8 Beckonert, O., Keun, H.C., Ebbels, T.M.D., Bundy, J., Holmes, E., Lindon, J.C., and Nicholson, J., *Nature Protocols*, 2007, **vol. 2**, **no. 11**, 2692-2703.
- 9 Weckwerth, W., *Metabolomics Methods and Protocols*, Humana press, New Jersey USA, 2007, 228-238.
- 10 Ross, A., Schlotterbeck, G., Dieterle, F., and Senn, H., in *The Handbook of Metabonomics and Metabolomics*, eds. Lindon, J.C., Nicholson, J.K., and Holmes, E., Elsevier Science B.V., Amsterdam, 2007, pp. 55-112 (Chapter 3).
- 11 Smolinska, A., Blanchet, L., Buydens, L.M.C., and Wijmenga, *Anal. Chim. Acta*, 2012, **750**, 82-97.
- 12 ACD/NMR Processor software, Academic Edition, Help topics.
- 13 Giskeødegård, G.F., Bloemberg, T.G., Postma, G., Sitter, B., Tessem, M.B., Gribbestad, I.S., Bathen, T.F., and Buydens, L.M., *Anal. Chim. Acta*, 2010, **683**, 1-11.
- 14 MestReNova Manual, Mesterlab Research, 2014, 572-580.

- 15 Craig, A., Cloarec, O., Holmes, E., Nicholson, J.K., and Lindon, J.C., *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 2262-2267.
- 16 Akira, K., Masu, S., Imachi, M., Mitome, H., Hashimoto, M., and Hashimoto, T., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2008, **46**, 550-556.
- 17 Goodacre, R., Broadhurst, D., Smilde, A.K., Kristal, B.S., Baker, J.D., Beger, R., Bessant, C., Connor, S., Capuani, G., Craig, A., Ebbels, T., Kell, D.B., Manetti, C., Newton, J., Paternostro, G., Somorjai, R., Sjöström, M., Trygg, J., and Wulfert, F., *Metabolomics*, 2007, **3**, 231-241.
- 18 O'Sullivan, A., Gibney, M.J., and Brennan, L., *Am. J. Clin. Nutr.*, 2011, **93**, 314-321.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΜΝΙΑΚΟΥ ΥΓΡΟΥ ΚΑΙ ΟΡΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ – ΧΡΥΣΟΒΑΛΑΝΤΟΥ ΧΑΤΖΗΩΑΝΝΟΥ

Τα τελευταία χρόνια, μελετώντας τα επίπεδα συγκεκριμένων μεταβολιτών στο αίμα γυναικών ευρισκόμενων σε κύηση και σε βιολογικά υγρά που σχετίζονται με το έμβρυο, έχουν διαπιστωθεί αλληλεπιδράσεις μεταξύ του μεταβολισμού των μητέρων και των εμβρύων. Ωστόσο, μέχρι σήμερα, απουσιάζει από τη διεθνή βιβλιογραφία κάποια μελέτη που να εξετάζει το ρόλο των διατροφικών συνηθειών της μητέρας στη σύνθεση του αμνιακού υγρού. Προς αυτή την κατεύθυνση, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί το πεδίο της μεταβολομικής ως ένα εξαιρετικό αναλυτικό εργαλείο. Προσδιορίζοντας μια σειρά μεταβολιτών στα βιολογικά υγρά και σε συνδυασμό με την πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση, δύναται να εμπλουτίσει και να διευρύνει τις γνώσεις μας γύρω από τη βιοχημεία του αμνιακού υγρού.

Η παρούσα μελέτη αποσκοπεί στο να εντοπίσει τυχόν συσχετίσεις μεταξύ των διατροφικών συνηθειών των μητέρων και του μεταβολικού προφίλ τόσο του αμνιακού υγρού όσο και του ορού αίματος αυτών, όπως προκύπτουν από την ανάλυση με χρήση της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Οι 29 γυναίκες από τις οποίες λήφθηκαν τα βιολογικά αυτά υγρά διένυαν το δεύτερο τρίμηνο της κύησης τους (17^η – 24^η εβδομάδα) και υποβλήθηκαν σε αμνιοπαρακέντηση, στα πλαίσια προγεννητικού ελέγχου. Οι διατροφικές πληροφορίες προήλθαν από ερωτηματολόγια που συμπληρώθηκαν από τις μητέρες και αξιολογήθηκαν από εξειδικευμένο διαιτολόγο.

Η επιλογή της τεχνικής NMR στη συγκεκριμένη εργασία βασίστηκε στην αξιοπιστία που αυτή εμφανίζει σε μεταβολομικές μελέτες και στο γεγονός ότι επιτρέπει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό ενός μεγάλου εύρους διαφορετικών τύπων μεταβολιτών. Η ολιστική μεταβολομική προσέγγιση επιτεύχθηκε με χρήση

φασματογράφου NMR 600 MHz (Varian) και εφαρμόζοντας παλμό CPMG, προκειμένου να επιτευχθεί καταστολή των απορροφήσεων των πρωτεϊνών.

Όλα τα φάσματα NMR που λήφθηκαν υποβλήθηκαν σε στοίχιση ως προς την ένωση αναφοράς που επιλέχθηκε (δινάτριο άλας του μηλεϊνικού οξέος), σε διόρθωση της φάσης και της βασικής γραμμής τους, σε στοίχιση των επιμέρους περιοχών τους και τελικά σε υποδιαίρεση τους κατά 0,01 ppm με αλγόριθμο διαίρεσης μη σταθερού πλάτους (λογισμικό ACD/NMR Processor) και κατά 0,00035 ppm με αλγόριθμο διαίρεσης σταθερού πλάτους (λογισμικό MestReNova). Το λογισμικό SIMCA 13 χρησιμοποιήθηκε για την πολυπαραμετρική στατιστική επεξεργασία των δεδομένων. Τέλος, για την ταυτοποίηση των μεταβολιτών που καταγράφηκαν με το NMR, έγινε χρήση του λογισμικού Chenomx NMR Suite.

Δημιουργώντας μοντέλα PLS κατέστη δυνατός ο εντοπισμός συσχετίσεων μεταξύ του μεταβολικού προφίλ του αμνιακού υγρού και της εβδομάδας αμνιοπαρακέντησης, καθώς και του Δείκτη Μάζας Σώματος των γυναικών με επικυρωμένα στατιστικά μοντέλα. Πιο συγκεκριμένα, στο αμνιακό υγρό που λήφθηκε σε εβδομάδα κύησης πέραν της 20^{ης}, εμφανίζεται αυξημένος ο μεταβολίτης γλουταμίνη, ενώ μειώνονται σημαντικά οι μεταβολίτες βαλίνη και γλυκόζη. Από τη συσχέτιση με το ΔΜΣ των γυναικών προέκυψε η παρατήρηση ότι στο αμνιακό υγρό των γυναικών με ΔΜΣ μεγαλύτερο του 30, οι μεταβολίτες κιτρικό οξύ, γλυκόζη, κρεατινίνη, τυροσίνη και αλανίνη παρουσιάζονται αυξημένοι, ενώ μειώνεται ο μεταβολίτης γλουταμίνη.

Επιπλέον, εντοπίστηκαν συσχετίσεις του μεταβολικού προφίλ τόσο του αμνιακού υγρού, όσο και του ορού αίματος με την κατανάλωση συγκεκριμένων τροφίμων, αλλά και ομάδων τροφίμων, χωρίς να επιτευχθεί επικύρωση των στατιστικών μοντέλων, κάτι που θεωρείται ότι οφείλεται στον περιορισμένο διαθέσιμο δειγματοχώρο. Για τον λόγο αυτό, ήδη προγραμματίζονται περαιτέρω αναλύσεις, με την ίδια τεχνική και τις ίδιες συνθήκες και παραμέτρους σε δείγματα που συλλέγονται.

ABSTRACT

NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY ANALYSIS OF THE METABOLIC PROFILE OF AMNIOTIC FLUID AND BLOOD SERUM

ANASTASIA – CHRYSOVALANTOU CHATZIOANNOU

Recent studies of certain metabolite levels in maternal blood and fetal biological fluids have increased our knowledge concerning the interactions between the maternal and fetal metabolism. Nevertheless, hitherto no study has examined the role of maternal habitual diet on human amniotic fluid composition. Towards this direction, the field of metabolomics could be used as an excellent analytical tool. Identification of a range of metabolites in biological fluids in combination with multivariate statistical analysis may enrich and extend our understanding of the amniotic fluid biochemistry.

This study aimed to identify correlations between maternal dietary habits and metabolic profiles of both amniotic fluid and blood serum derived from the NMR analysis. Blood serum and amniotic fluid samples were obtained from 29 women that underwent amniocentesis for prenatal diagnosis (17th – 21th gestational week). Dietary assessment was carried out by questionnaires completed by mothers and evaluated by qualified registered dietician.

NMR was selected in this study due to the reliability exhibited on NMR-based metabolomics studies and because it enables the simultaneous determination of a wide range of different metabolites. The holistic approach was accomplished utilizing a 600 MHz Varian NMR spectrometer and by applying CPMG pulse to suppress protein signals of the samples.

All NMR spectra were referenced to the chosen reference compound (sodium maleate dibasic), phase and baseline corrected, aligned and reduced into spectral bins of 0.01 ppm (intelligent binning with ACD/NMR Processor software) and 0.00035 ppm (standard binning with MestReNova software). The SIMCA 13 software was used

to implement multivariate statistical analysis. The identification of metabolites recorded with the NMR was performed with the Chenomx NMR Suite software.

PLS models were created to detect correlations between the metabolic profile of amniotic fluid and the gestational week of amniocentesis and the body mass index of women and resulted in validated statistical models. In particular, the amniotic fluid obtained at a gestational week beyond 20th appears the metabolite glutamine at higher levels, while metabolites valine and glucose were significantly reduced. From the correlation with the BMI of women showed that the amniotic fluid of women with BMI greater than 30, the metabolites citric acid, glucose, creatinine, alanine and tyrosine were exhibited increased, while metabolite glutamine was reduced.

Furthermore, correlations were identified between the metabolic profile of both matrices with the consumption of specific foods and specific food groups. However, validation of those statistical models could not be achieved, which is probably due to the limited available number of samples. Therefore, further analysis in samples collected is already programmed, by keeping the same analytical platform, the same conditions and parameters, in order to extract additional findings.

«Η ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας συγχρηματοδοτήθηκε μέσω του Έργου «Υποτροφίες ΙΚΥ» από πόρους του ΕΠ «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (ΕΚΤ) του ΕΣΠΑ, 2007-2013».

«Το έργο συγχρηματοδοτείται στα πλαίσια του ΕΠΕΑΕΚ από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο και Εθνικούς πόρους»

«The project is co-financed within Op. Education by the ESF (European Social Fund) and National Resources»



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΕΑΕΚ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ
ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΤΑΜΕΙΟ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ




Η ΠΑΙΔΕΙΑ ΣΤΗΝ ΚΟΡΥΦΗ
Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Εκπαίδευσης και Αρχικής
Επαγγελματικής Κατάρτισης