



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΝΕΦΡΩΝ ΑΠΟ  
ΜΥΕΣ ΜΕ ΝΕΦΡΙΤΙΔΑ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟ  
ΕΡΥΘΗΜΑΤΩΔΗ ΛΥΚΟ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ  
ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ NMR**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΙΩΑΝΝΑ ΤΣΙΑΡΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ

Επιβλέπων Καθηγητής: ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΜΙΚΡΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2021

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΝΕΦΡΩΝ ΑΠΟ  
ΜΥΕΣ ΜΕ ΝΕΦΡΙΤΙΔΑ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟ  
ΕΡΥΘΗΜΑΤΩΔΗ ΛΥΚΟ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ  
ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ NMR

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

*Τίτλος Προγράμματος-Ειδίκευση: «Φαρμακευτική Ανάλυση – Έλεγχος Ποιότητας»*

ΙΩΑΝΝΑ ΤΣΙΑΡΑ, ΧΗΜΙΚΟΣ

A.M: 181303

Επιβλέποντες Καθηγητές:

Εμμανουήλ Μικρός, Καθηγητής του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας ΕΚΠΑ

Ευάγγελος Γκίκας, Καθηγητής του Τομέα Αναλυτικής Χημείας ΕΚΠΑ

Τριμελής συμβουλευτική Επιτροπή:

1. Εμμανουήλ Μικρός, Καθηγητής του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας ΕΚΠΑ

2. Ευάγγελος Γκίκας, Καθηγητής του Τομέα Αναλυτικής Χημείας ΕΚΠΑ

3. Ιωάννης Ντότσικας, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας ΕΚΠΑ

*Στον αγαπημένο μου πατέρα, Παναγιώτη*



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερώς τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Εμμανουήλ Μικρό, για την πολύτιμη βοήθεια και την ουσιαστική καθοδήγησή του όλο το διάστημα εκπόνησης της παρούσας ερευνητικής εργασίας. Οι συμβουλές και η στήριξή του αποτέλεσαν για εμένα οδηγό καθόλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Γκίκα, για την άψογη συνεργασία μας, τις γνώσεις που μου μετέδωσε και την αμέριστη συμπαράστασή του στην διάρκεια όλων αυτών των μηνών. Επιπλέον, να ευχαριστήσω και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ντότσικα, μέλος της τριμελούς επιτροπής, για την βοήθειά του.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Δρ. Δήμητρα Μπενάκη για τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε κατά τη διάρκεια της πραγματοποίησης των πειραμάτων NMR, αλλά και για τη συνολική της στήριξη και βοήθεια όποτε τη χρειάστηκα.

Ακόμη, να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Μπούμπα και το εργαστήριο του στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών για την παροχή των δειγμάτων για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας, καθώς και τους υποψήφιους διδάκτορες Δώρα Μανωλάκου και Διονύση Νικολόπουλο για την άρτια συνεργασία μας.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις υποψήφιες διδάκτορες Κατερίνα Ηλιου και Κωνσταντίνα Τσέζου και το Δρ. Παναγιώτη Εφεντάκη για τη βοήθεια και τις συμβουλές τους, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για το όμορφο κλίμα συνεργασίας.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και σε όλους τους δικούς μου ανθρώπους που με στήριξαν και συνεχίζουν να με στηρίζουν καθημερινά και είναι πάντα δίπλα μου σε κάθε μου βήμα.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	iv
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	v
ABSTRACT.....	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	2
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....</b>	<b>7</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>7</b>
1.1 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟΣ ΕΡΥΘΗΜΑΤΩΔΗΣ ΛΥΚΟΣ.....	7
1.1.1  Επιδημιολογία.....	8
1.1.2  Παθογένεια - Παθοφυσιολογία.....	9
1.1.2.1  Γενετικοί Παράγοντες.....	10
1.1.2.2  Περιβαλλοντικοί – Εξωγενείς Παράγοντες.....	11
1.1.2.3  Επιγενετικοί Παράγοντες.....	12
1.1.3  Κλινική εικόνα και Κατηγοριοποίηση.....	14
1.1.4  Θεραπευτική Αντιμετώπιση.....	15
1.2  ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ.....	17
1.2.1  Μεταβολομική.....	17
1.2.2  Μεταβολομική και Αυτοάνοσα Νοσήματα.....	18
1.2.3  Μεταβολομική και Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος.....	19
1.2.4  Αναλυτικές Τεχνικές.....	20
1.2.4.1  Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).....	21
<b>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....</b>	<b>23</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....</b>	<b>24</b>
<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>24</b>
2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	24

2.1.1 Οργανολογία.....	24
2.1.2 Συλλογή Δειγμάτων.....	24
2.1.2.1 Πειραματόζωα.....	24
2.1.2.2 Δείγματα.....	25
2.1.3 Προετοιμασία Δειγμάτων.....	25
2.1.4 Ανάλυση με NMR.....	26
2.1.5 Επεξεργασία φασμάτων NMR.....	27
<b>2.2 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....</b>	<b>28</b>
2.2.1 Μέθοδοι Πολυπαραμετρικής Ανάλυσης.....	28
2.2.2 Επικύρωση των μοντέλων PLS-DA.....	29
2.2.3 Επιλογή των χαρακτηριστικών που συμβάλλουν στην ομαδοποίηση.....	30
2.2.4 Επικύρωση υποψήφιων βιοδεικτών.....	31
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....</b>	<b>32</b>
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>32</b>
3.1 Φάσματα NMR.....	32
3.2 Στατιστική Ανάλυση Δεδομένων NMR.....	36
3.2.1 Μελέτη χρονοσειράς υγιών προτύπων (Healthy) και προτύπων λύκου (SLE).....	38
3.2.2 Συγκριτική μελέτη υγιών προτύπων (Healthy) και προτύπων λύκου (SLE).....	61
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....</b>	<b>74</b>
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>74</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>81</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....</b>	<b>97</b>
Παράρτημα 1.....	97
Παράρτημα 2.....	111

## ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE, lupus) is a chronic inflammatory autoimmune disease which can affect most organ systems including skin, joints and the kidney. Lupus nephritis (LN) affects 40–70% of all SLE patients and is characterized by the glomerular deposition of immune complexes followed by recruitment of an inflammatory response. LN continues to be a major source of morbidity and mortality for SLE patients. Metabolism is considered to play a key role in autoimmune diseases. Metabolic changes in autoimmune diseases might be due to inflammation as well as being involved in autoimmune pathogenesis. The complex pathogenesis and heterogeneity of SLE poses many challenges in finding novel biomarkers for early diagnosis and monitoring of the disease.

Our goal is to assess the metabolic changes of inbred mice that spontaneously develop a disease similar to human systemic lupus erythematosus. Furthermore, we aim to identify metabolites associated with renal function as potential biomarkers for early-/late-onset lupus nephritis. Female F1 hybrids of NZB × NZW (NZBxNZW/F1) were subjected to nephrectomy at 1, 3 and 6 months of age. Female B6 mice were used as healthy controls. The kidneys were homogenized and extracted. A non-targeted <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR) based metabolomic approach was used to analyze the aqueous kidney extracts. At first, we performed a time series analysis on the samples of the F1 mice and then compared the lupus model with the healthy control group at the three different time points. Differential biomarker candidates were identified by using multivariate and univariate statistical analysis, and their diagnostic accuracy was evaluated. We observed significant differences in the metabolic profiles of SLE and healthy cohorts, and we were also able to distinguish between pre-puberty and nephritis stage of the lupus model. Our results demonstrate a disturbed amino acid metabolism, with  $\alpha$ -amino acids downregulated in SLE, and alterations in glycerophospholipid metabolism. We also found decreased levels of choline and uridine in nephritis stage compared to pre-puberty stage correlated with methylation pathways and probably epigenetic modulations. During the final trimester leading to nephritis we observed from univariate statistics that taurine, myo-inositol, ADP, ATP and NAD<sup>+</sup> were downregulated correlated with perturbed energy metabolism and kidney dysfunction characterizing the disease.

**Keywords:** SLE, lupus, <sup>1</sup>H NMR, metabolomics, kidney

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος (ΣΕΛ, λύκος) είναι μια χρόνια φλεγμονώδης αυτοάνοση ασθένεια που μπορεί να επηρεάσει τα περισσότερα συστήματα οργάνων όπως το δέρμα, τις αρθρώσεις και τους νεφρούς. Η νεφρίτιδα του Λύκου (ΝΛ) επηρεάζει το 40-70% των ασθενών με ΣΕΛ και χαρακτηρίζεται από τη σπειραματική εναπόθεση ανοσοσυμπλεγμάτων, ακολουθούμενη από τη δημιουργία φλεγμονώδους απόκρισης. Η ΝΛ εξακολουθεί να αποτελεί σημαντική πηγή νοσηρότητας και θνησιμότητας για τους ασθενείς με ΣΕΛ. Ο μεταβολισμός θεωρείται πλέον ότι παίζει βασικό ρόλο στις αυτοάνοσες ασθένειες. Οι μεταβολικές αλλαγές στις αυτοάνοσες ασθένειες μπορεί να οφείλονται στη φλεγμονή καθώς επίσης και να εμπλέκονται στην παθογένεση της αυτοανοσίας. Η σύνθετη παθογένεση και ετερογένεια του ΣΕΛ θέτει πολλές προκλήσεις στην εύρεση νέων βιοδεικτών για έγκαιρη διάγνωση και παρακολούθηση της νόσου.

Στόχος μας είναι να εκτιμήσουμε τις μεταβολικές αλλαγές σε μύες που αναπτύσσουν αυθόρμητα ένα φαινότυπο παρόμοιο με τον ανθρώπινο συστηματικό ερυθματώδη λύκο. Επιπλέον, στοχεύουμε στην ανίχνευση μεταβολιτών που σχετίζονται με τη νεφρική λειτουργία ως πιθανοί βιοδείκτες της πρώιμης ή/και όψιμης νεφρίτιδας λύκου. Θηλυκά υβρίδια F1 (NZBxNZW/F1) υποβλήθηκαν σε νεφρεκτομή σε ηλικία 1, 3 και 6 μηνών. Θηλυκοί μύες B6 χρησιμοποιήθηκαν ως υγιή πρότυπα. Οι νεφροί ομογενοποιήθηκαν και εκχυλίστηκαν. Πραγματοποιήθηκε μη στοχευμένη μεταβολομική μελέτη με τη χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ( $^1\text{H}$  NMR) για την ανάλυση των υδατικών εκχυλισμάτων των νεφρών. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ανάλυση χρονοσειράς στα δείγματα των μυών F1 και στη συνέχεια έγινε σύγκριση των προτύπων του λύκου με τα υγιή πρότυπα στα τρία διαφορετικά χρονικά σημεία. Οι υποψήφιοι βιοδείκτες ταυτοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας πολυπαραμετρική και μονοπαραμετρική στατιστική ανάλυση και η διαγνωστική τους ικανότητα αξιολογήθηκε. Παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα μεταβολικά προφίλ του ΣΕΛ και των υγιών προτύπων, ενώ ήταν δυνατός και ο διαχωρισμός του σταδίου προ-εφηβείας από το στάδιο νεφρίτιδας στα πρότυπα λύκου. Τα αποτελέσματά μας αποκαλύπτουν διαταραχές στο μεταβολισμό των αμινοξέων, με τα α-αμινοξέα να εντοπίζονται σε μειωμένα επίπεδα στο ΣΕΛ, και στο μεταβολισμό των γλυκεροφωσφολιπιδίων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα μειωμένα επίπεδα χολίνης και ουριδίνης στο στάδιο της νεφρίτιδας συγκριτικά με τον πρώτο μήνα. Οι μεταβολίτες αυτοί μπορούν συσχετισθούν με τα μονοπάτια της μεθυλίωσης και επιγενετικές μεταβολές. Τέλος κατά το τελευταίο τρίμηνο, όπως προκύπτει από τη μονοπαραμετρική ανάλυση, έχουμε μείωση στην ταυρίνη, τη μυο-ινοσιτόλη, το ADP, το ATP και το  $\text{NAD}^+$ , που συσχετίζονται με διαταραχή του ενεργειακού μεταβολισμού και νεφροπάθεια.

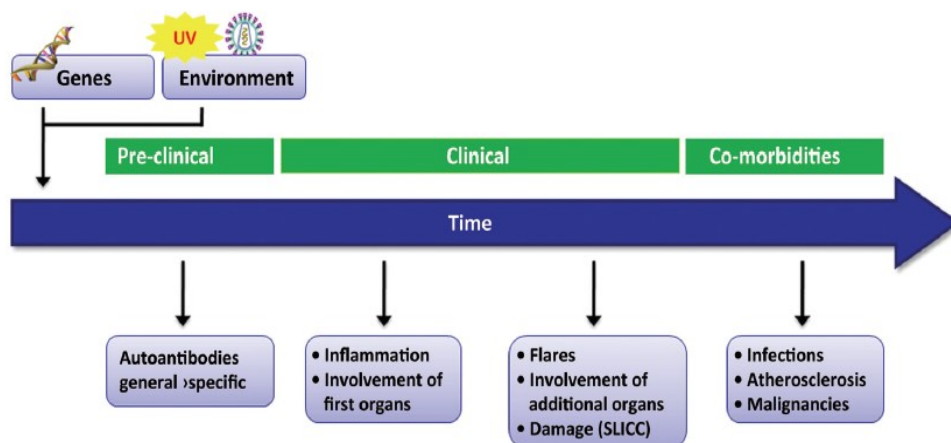
**Λέξεις-κλειδιά:** ΣΕΛ, λύκος,  $^1\text{H}$  NMR, μεταβολομική, νεφρός

### 1.1 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟΣ ΕΡΥΘΗΜΑΤΩΔΗΣ ΛΥΚΟΣ

Ο Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (ΣΕΛ) είναι η χρόνια αυτοάνοση συστημακή ασθένεια που προκαλείται από ένα συνδυασμό γενετικών, περιβαλλοντικών και ανοσολογικών παραγόντων. Χαρακτηρίζεται από ένα ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων και την παραγωγή πολυάριθμων αυτοαντισωμάτων, ενώ αποτελεί μία από τις ασθένειες με τη μεγαλύτερη ετερογένεια που αντιμετωπίζει η ιατρική κοινότητα. Αυτή η ετερογένεια παρουσιάζει τεράστιες προκλήσεις στη διάγνωση, την αντιμετώπιση και τις θεραπευτικές εξελίξεις της νόσου.

Η νόσος ξεκινά με μια προκλινική φάση που χαρακτηρίζεται από αυτοαντισώματα κοινά σε άλλες συστημακές αυτοάνοσες ασθένειες και προχωρά σε μία κλινικά εμφανή αυτοανοσοποιητική φάση, περισσότερο ειδική για την ασθένεια. Κατά τη διάρκεια της ασθένειας, υπάρχουν περίοδοι έξαρσης που διακόπτουν τις περιόδους ύφεσης, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται βλάβες σχετιζόμενες τόσο με την ασθένεια όσο και με τη θεραπεία, όπως αλωπεκία, σταθερό ερύθημα, γνωστική δυσλειτουργία, βαλβιδική καρδιακή νόσος, αγγειακή νέκρωση, ρήξη τένοντα, αρθροπάθεια Jaccoud και οστεοπόρωση. Οι πρόωρες βλάβες σχετίζονται ως επί το πλείστον με την ασθένεια, ενώ οι μετέπειτα βλάβες, δηλαδή οι λοιμώξεις, η αθηροσκλήρωση και οι κακοήθειες, συνήθως σχετίζονται με επιπλοκές λόγω της μακράς διάρκειας της νόσου και της ανοσοκατασταλτικής θεραπείας (Εικόνα 1.1 1) [1], [2].

Μεταξύ των διαφόρων οργάνων που επηρεάζονται στον ΣΕΛ, ο νεφρός φαίνεται να αποτελεί μία από τις πιο συνηθισμένες και ταυτόχρονα, πιο σοβαρές επιπλοκές. Η **νεφρίτιδα του λύκου (NL)** είναι μια φλεγμονή των νεφρών που προκαλείται από τον ΣΕΛ. Η φλεγμονή των νεφρών συμβαίνει στους νεφρώνες, τα όργανα των νεφρών που φιλτράρουν το αίμα. Οι ανωμαλίες στα ούρα ή τη νεφρική λειτουργία εμφανίζονται σε περίπου 25-50% των ασθενών, νωρίς κατά τη διάρκεια της νόσου [3].



*Εικόνα 1.1 1:* Η πορεία της νόσου του Συστηματικού Ερυθηματώδους Λύκου. SLICC, Systemic Lupus International Collaborating Clinics [1], [2].

### 1.1.1 Επιδημιολογία

Ο επιπολασμός του ΣΕΛ εκτιμάται να είναι 30-50 ανά 100000, γεγονός που αντιστοιχεί σε περίπου 500000 ασθενείς στην Ευρώπη και 250000 στις ΗΠΑ [4]. Ένα σταθερό εύρημα σε επιδημιολογικές μελέτες είναι ότι η καταγωγή, η φυλή και η εθνικότητα έχουν σημαντικές επιπτώσεις στις εκδηλώσεις του ΣΕΛ και τη σοβαρότητα της νόσου. Η αναλογία επίπτωσης της ΝΛ είναι υψηλότερη στους Ασιάτες (55%), Αφρικανούς (51%) και ισπανόφωνους (43%) ασθενείς σε σχέση με τους Καυκάσιους (14%). Η ΝΛ σχετίζεται επίσης με πιο σοβαρή νεφρική δυσλειτουργία, ακόμα και αυξημένη θνησιμότητα σε άτομα με αφρικανική γενεαλογία, ισπανόφωνους και ασιατικούς πληθυσμούς. Επιπλέον, συνηθέστερα συνδέεται με σοβαρή νεφρίτιδα στα παιδιά και λιγότερο στους ηλικιωμένους [5]. Οι παρατηρούμενες ανισότητες σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με τις γενετικές διαφορές και την έκθεση στο τοπικό περιβάλλον.

Όλες οι συγκριτικές μελέτες διαφόρων πληθυσμών αναφέρουν στατιστικά σημαντική απόκλιση στη διάκριση της νόσου έναντι του φύλου. Το 90% των ασθενών είναι γυναίκες και μάλιστα, συνήθως σε ηλικία τεκνοποίησης [4]. Η αναλογία των γυναικών προς τους άνδρες είναι 2:1 πριν την εφηβεία, ενώ κατά τη διάρκεια των ετών της αναπαραγωγικής ηλικίας φτάνει στα 8:1, και στα 2.3:1 για ασθενείς ηλικίας άνω των 60 ετών. Όσον αφορά την ηλικιακή διάκριση, παιδιά ηλικίας μερικών μόλις μηνών διαγιγνώσκονται με ΣΕΛ, αλλά λιγότερο από το 5% των ασθενών με λύκο είναι προεφηβικής ηλικίας. Παρόλο που η νόσος στα παιδιά τείνει να είναι περισσότερο απειλητική ως προς τα όργανα, τα ποσοστά θνησιμότητας είναι εκπληκτικά χαμηλά. Ο λύκος που αναπτύσσεται σε ασθενείς ηλικίας άνω των 50 ετών τείνει να είναι λιγότερο επικίνδυνος για τα

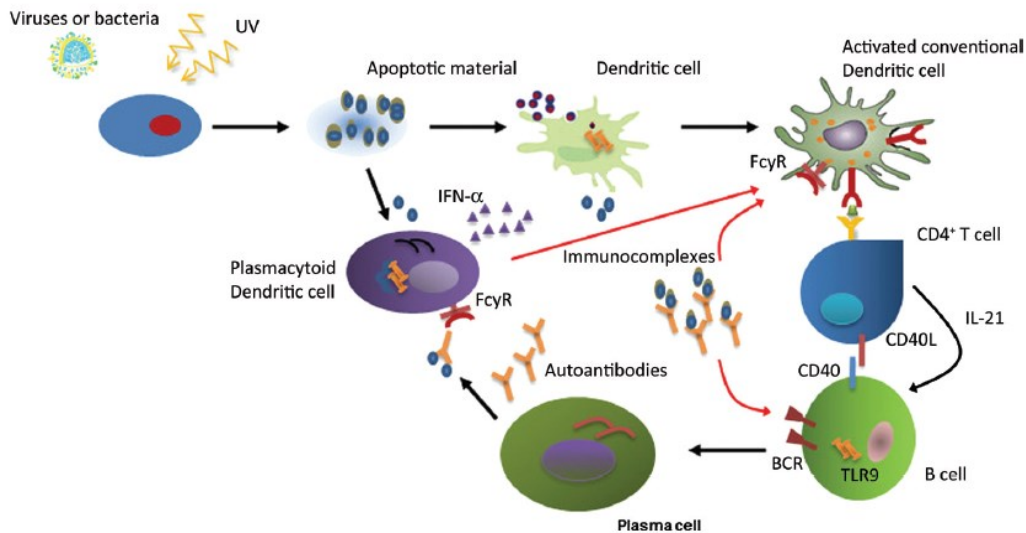
όργανα αλλά χαρακτηρίζεται από σημαντικούς μυοσκελετικούς πόνους, ενώ περιγράφεται με μια ήπια πορεία εξέλιξης [6].

### 1.1.2 Παθογένεια - Παθοφυσιολογία

Τα τελευταία χρόνια έχουν σημειωθεί σημαντικά βήματα για τη βελτίωση της κατανόησης της αιτιοπαθογένειας του ΣΕΛ. Ορισμένοι παράγοντες κινδύνου έχουν αναγνωριστεί και αποδειχθεί ότι συμβάλλουν στην προδιάθεση στην ασθένεια ή ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα προκαλώντας φλεγμονώδη απόκριση, η οποία τελικά θα οδηγήσει στην ανάπτυξη της νόσου. Η προδιάθεση για ΣΕΛ επηρεάζεται από γενετικούς παράγοντες, ενώ η επικράτηση του γυναικείου φύλου στην ασθένεια, μπορεί να εξηγηθεί, λόγω της συμβολής ορισμένων ορμονών. Περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως το κάπνισμα, η έκθεση στο υπεριώδες φως, ιικές μολύνσεις και ειδικά φάρμακα (π.χ. σουλφοναμίδες) είναι γνωστό ότι προκαλούν ΣΕΛ [7].

Η παθογένεια του ΣΕΛ είναι ιδιαίτερα σύνθετη, καθώς συμβάλουν διάφοροι μηχανισμοί του ανοσοποιητικού συστήματος. Με την υποκείμενη γενετική προδιάθεση και ως απάντηση σε διάφορες αιτίες, η ισορροπία του ανοσοποιητικού συστήματος μετατοπίζεται προς την αντίδραση κατά του εαυτού του, αντί για αυτο-ανοχή. Τα T και B κύτταρα ενεργοποιούνται, οδηγώντας στην παραγωγή αντισωμάτων και τον τελικό σχηματισμό ανοσολογικού συμπλέγματος. Τα εν λόγω συμπλέγματα κυκλοφορούν και εναποτίθενται σε κρίσιμους ιστούς, προκαλώντας τραυματισμό των οργάνων (Εικόνα 1.1 2).





**Εικόνα 1.1 2:** Στο συστηματικό ερυθηματώδη λύκο, όλα τα μονοπάτια οδηγούν στην παραγωγή της ιντερφερόνης α (IFNα) μέσω ενδογενών νουκλεϊκών οξέων. Η αυξημένη παραγωγή αυτοαντιγόνων κατά τη διάρκεια της απόπτωσης (σχετιζόμενη με την υπερϊώδη ακτινοβολία ή/και αυθόρμητη), καθώς και η ανεπαρκής ή καθυστερημένη κάθαρση των αποπτωτικών συγκριμάτων τους είναι σημαντικές για την έναρξη της αυτοάνοσης απόκρισης. Νουκλεοσώματα που περιέχουν ενδογενώς επικίνδυνους προσδέτες, οι οποίοι μπορούν να προσδεθούν σε υποδοχείς μοριακών προτύπων παθογόνων μικροοργανισμών, ενσωματώνονται σε αποπτωτικά κυστίδια που προάγουν την ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων (Dendritic cells, DCs) και B κυττάρων και την παραγωγή IFN και αυτοαντισωμάτων, αντιστοίχως. Οι υποδοχείς της επιφανείας των κυττάρων, όπως οι BCR (υποδοχέας B κυττάρου, B Cell Receptor) και FcRIIIa διευκολύνουν την ενδοκύττωση του νουκλεϊνικού οξέος που περιλαμβάνει ανοσοσυμπλέγματα και τη δέσμευση σε υποδοχείς του ενδοσώματος της φυσικής (ή έμφυτης) ανοσίας όπως οι TLRs (Toll-like receptors). Στα πρώιμα στάδια της νόσου, όταν τα αυτοαντισώματα και τα ανοσοσυμπλέγματα μπορεί να μην έχουν σχηματιστεί, αντιμικροβιακά πεπτίδια που απελευθερώνονται από ιστούς που έχουν υποστεί βλάβη, όπως τα LL37 και εξωκυτταρικές παγίδες ουδετερόφιλων (neutrophil extracellular traps, NETs), μπορεί να δεσμευτούν με νουκλεϊκά οξέα, αναστέλλοντας έτσι την αποικοδόμηση και κατ' επέκταση διευκολύνοντας την ενδοκύττωσή τους και τη διέγερση του TLR-7/9 σε πλασματοκυτταροειδή DCs. Αυξημένες ποσότητες ενδογενών νουκλεϊκών οξέων που προκύπτουν από απόπτωση διεγείρουν την παραγωγή IFN και προάγουν την αυτοανοσία, διακόπτοντας την αυτο-ανοχή μέσω της ενεργοποίησης και της προώθησης της ωρίμανσης των μυελοειδών DCs. Τα ανώριμα DCs προωθούν την ανοχή ενώ τα ενεργοποιημένα ώριμα DCs προωθούν την αυτοδραστικότητα. Η παραγωγή αυτοαντισωμάτων από τα B κύτταρα στον λύκο οδηγείται από τη διαθεσιμότητα ενδογενών αντιγόνων και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα βοηθητικά T κύτταρα, μέσω αλληλεπιδράσεων στην κυτταρική επιφάνεια (CD40L/CD40) και κυτταροκινών (IL21). Ανοσοσυμπλέγματα που περιέχουν χρωματίνη διεγείρουν έντονα τα B-λεμφοκύτταρα λόγω της διασύνδεσης BCR/TLR [1], [2].

### 1.1.2.1 Γενετικοί Παράγοντες

Ο ρόλος των διαφόρων γενετικών παραγόντων στην παθογένεια του ΣΕΛ είναι εμφανής από την υψηλή κληρονομικότητα (43,9%) και τον σχετικό κίνδυνο (5,87%), που εμφανίζονται στους συγγενείς πρώτου βαθμού των ασθενών με λύκο [8]. Κατά την τελευταία δεκαετία, έχουν

πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες συσχέτισης σε ολόκληρο το γονιδίωμα (Genome-wide association studies, GWAS) [9], με στόχο την κατανόηση της γενετικής βάσης της κληρονομικότητας του ΣΕΛ, αναγνωρίζοντας, μέχρι και σήμερα, πολυμορφισμούς (Single-Nucleotide Polymorphisms, SNPs) σε περισσότερους από εκατό γενετικούς τόπους (genetic loci) που σχετίζονται με την ασθένεια [10]–[15]. Μέρος αυτών των ευρημάτων στο ΣΕΛ επισημαίνει μια ισχυρή συσχέτιση με γενετικές παραλλαγές στην περιοχή των αντιγόνων HLA (Human Leukocyte Antigen), αλλά και σε περιοχές ανεξάρτητες του HLA που βρίσκονται μέσα ή κοντά σε γονίδια που εμπλέκονται λειτουργικά στο ανοσοποιητικό σύστημα, όπως την παραγωγή και σηματοδότηση ιντερφερόνης τύπου I (IFN), των B και T κυττάρων, καθώς και την απόπτωση και κάθαρση κυτταρικών καταλοίπων [16].

#### 1.1.2.2 Περιβαλλοντικοί – Εξωγενείς Παράγοντες

Σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε διδύμους [17], [18], το ποσοστό συμφωνίας δεν είναι ιδιαίτερα υψηλό στα διζυγωτικά δίδυμα (2-4%) ενώ στα μονοζυγωτικά κυμαίνεται από 14-24%, γεγονός που φανερώνει ότι η γενετική προδιάθεση από μόνη της δεν επαρκεί για να εξηγήσει την πυροδότηση της εκδήλωσης των κλινικών συμπτωμάτων στον ΣΕΛ. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που επιδρούν στην εμφάνιση της νόσου εκτιμώνται ότι αποτελούν περίπου το 56% [8]. Η έννοια του «εκθεσιώματος» (exposome) ουσιαστικά ορίστηκε το 2005 από τον Christopher Paul Wild [19] και αφορά το σύνολο των παραγόντων στους οποίους εκτίθεται ένας άνθρωπος από τη σύλληψή του ως τον θάνατό του. Σε συνδυασμό με την παραδοσιακή επιδημιολογική ταξινόμηση των δυνητικών εξωτερικών κινδύνων, όπως είναι οι φυσικοί, χημικοί, βιολογικοί, κοινωνικοί και πολιτιστικοί παράγοντες, η έννοια του εκθεσιώματος παρέχει ένα πιο ολοκληρωμένο πλαίσιο για τη βαθύτερη κατανόηση των εκθέσεων, τόσο εξωγενών όσο και ενδογενών. Ένα τέτοιο πλαίσιο λοιπόν, μπορεί να βελτιώσει την επισκόπηση και την κατανόηση των πιθανών ρόλων που διαδραματίζουν οι διάφορες εκθέσεις που σχετίζονται με την ανάπτυξη του ΣΕΛ [20].

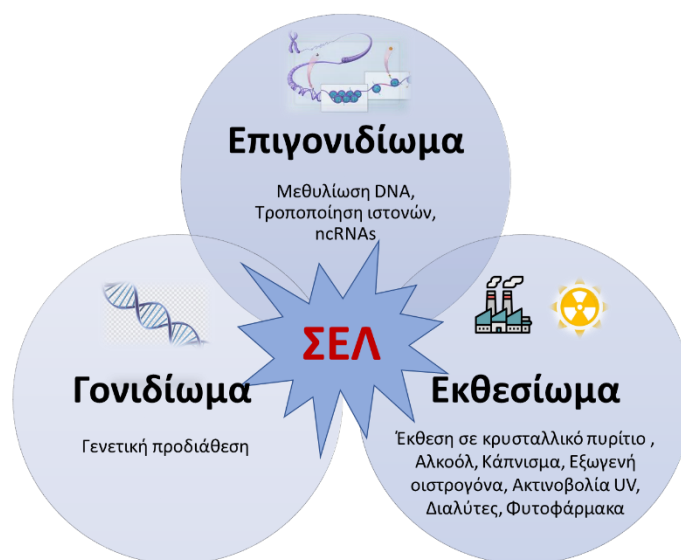
Ισχυρές επιδημιολογικές ενδείξεις έχουν παρατηρηθεί σχετικά με τη συσχέτιση του ΣΕΛ με διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η έκθεση σε κρυσταλλικό πυρίτιο [21]–[27], το κάπνισμα [28], [29] και τα εξωγενή οιστρογόνα (από του στόματος αντισυλληπτικά και μετεμμηνοπαυσιακές ορμόνες) [30], [31]. Η ελαφριά έως μέτρια κατανάλωση αλκοόλ φαίνεται να λειτουργεί αντίστροφα για την ασθένεια (μειωμένος κίνδυνος) [32]. Ακόμη, στοιχεία ερευνών δείχνουν πιθανές συσχετίσεις μεταξύ και άλλων εξωγενών παραγόντων όπως η υπεριώδης

ακτινοβολία (UVA και UVB) [33]–[38], οι διαλύτες [39] και τα φυτοφάρμακα [40], [41]. Ακόμη και σήμερα, υπάρχουν σημαντικά κενά γνώσης σχετικά με τους πιθανούς μηχανισμούς με τους οποίους αυτοί οι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν να εμπλέκονται στην παθογένεση του ΣΕΛ. Η επιγενετική ρύθμιση, μέσω της οποίας τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα οδηγούν σε βιοχημικές τροποποιήσεις, μπορεί να είναι πιθανός σύνδεσμος [42].

### 1.1.2.3 Επιγενετικοί Παράγοντες

Ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου μπορεί να επηρεάζεται από επιγενετικούς μηχανισμούς όπως είναι η μεθυλίωση του DNA, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών, όπως η ακετυλίωση και η μεθυλίωση, και τα μη-κωδικά RNAs (non-coding RNAs, ncRNAs). Ο όρος «επιγενετική» μπορεί να περιγραφεί ως η μελέτη των αναστρέψιμων κληρονομήσιμων αλλαγών στη λειτουργία των γονιδίων, που εμφανίζονται χωρίς κάποια μεταβολή στην αλληλουχία του ίδιου του DNA [43]. Η επιγενετική απορρύθμιση φαίνεται να παίζει κρίσιμο ρόλο στην παθογένεση του ΣΕΛ.

Η πρώτη απόδειξη του ρόλου της μεθυλίωσης του DNA στην ανάπτυξη του ΣΕΛ ήταν ότι παγκοσμίως σε όλους τους ασθενείς με ενεργό λύκο τα T λεμφοκύτταρα εμφανίζουν υπομεθυλιωμένο DNA [44]. Η κατάσταση μεθυλίωσης του DNA διαφόρων γονιδίων που εκφράζονται στα T κύτταρα έχει συνδεθεί με την παθογένεση και την ανάπτυξη του ΣΕΛ και αναλύεται εκτενώς σε πρόσφατες επισκοπήσεις [45]–[48]. Αν και οι τροποποιήσεις των ιστονών στο λύκο έχουν μελετηθεί λιγότερο από ότι η μεθυλίωση του DNA, υπάρχουν πολλές αναφορές που εντοπίζουν αλλαγές στη μεθυλίωση ή την ακετυλίωση των ιστονών H3 και H4 σε ασθενείς με ΣΕΛ [49]–[51]. Οι μελέτες αυτές αναφέρουν μείωση της ακετυλίωσης των ιστονών H3 και H4 σε παγκόσμιο επίπεδο, υποδεικνύοντας εκτεταμένες αλλαγές στην περιοχή της χρωματίνης, επηρεάζοντας έτσι την έκφραση πολλών γονιδίων [49]. Τα τελευταία χρόνια προκύπτουν όλο και περισσότερα επιστημονικά στοιχεία για το ρόλο των ncRNAs στη ρύθμιση των ανοσολογικών λειτουργιών και της αυτοανοσίας [52]–[55]. Η παρεκκλίνουσα έκφραση των lncRNAs (long non-coding RNAs, lncRNAs) ενδέχεται να συσχετίζεται με βλάβες οργάνων καθώς και με τη μεταβλητότητα των κλινικών εκδηλώσεων στην ασθένεια του ΣΕΛ. Τα αποτελέσματα αναλύσεων μικροσυστοιχίας δείχνουν διαφορετική έκφραση περίπου 8000 lncRNAs σε ασθενείς με ΣΕΛ σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες [56], [57] αναδεικνύοντας τη σημασία τους στην παθογένεση της νόσου.



**Εικόνα 1.1 3:** Το τρίπτυχο «Γονιδίωμα – Επιγονιδίωμα - Εκθεσίωμα». Οι επιγενετικοί μηχανισμοί φαίνεται να αντιπροσωπεύουν την αγνοούμενη σχέση μεταξύ της γενετικής προδιάθεσης και των περιβαλλοντικών παραγόντων που τελικά οδηγούν στην πυροδότηση της ασθένειας του ΣΕΛ.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει αρχίσει να λαμβάνει ένας νέος παράγοντας στην επιγενετική ρύθμιση της λειτουργίας των κυττάρων· ο κυτταρικός μεταβολισμός [58]. Οι μεταβολίτες είναι το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία των τροποποιήσεων της χρωματίνης, ρυθμίζοντας με αυτό τον τρόπο το γονιδίωμα. Εξαιρετικά ενδιαφέρον είναι ότι αυτή η αλληλεπίδραση μεταξύ των ρυθμιστών του μεταβολισμού και των επιγενετικών τροποποιήσεων είναι αμφίδρομη: ενώ ο μεταβολισμός ρυθμίζεται από μικρό-περιβαλλοντικά ερεθίσματα, μπορεί επίσης να αυτορυθμιστεί, μεταξύ άλλων, από την κυτταρική επιγενετική κατάσταση [59]. Στο ΣΕΛ, τα μειωμένα επίπεδα DNA μεθυλοτρανσφεράσης 1 (DNA methyltransferase 1, DNMT1) καθώς και η μειωμένη δραστηριότητά της, μπορούν να συσχετιστούν με την εμφάνιση δραστικών μορφών / δραστικών ριζών ειδών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS). Η αύξηση του οξειδωτικού στρες συμβάλλει στην πυροδότηση του λύκου μέσω της αναστολής της σηματοδότησης της οδού ERK (ρυθμιζόμενη από εξωκυτταρικά μηνύματα πρωτεϊνική κινάση, Extracellular Regulated Kinase) στα T κύτταρα, με αποτέλεσμα την απομεθυλίωση του DNA [58], [60]. Επίσης, τα μονοκύτταρα αποκρίνονται στο οξειδωτικό στρες, μέσω μεταβολικών – επιγενετικών αλληλεπιδράσεων, εξαρτώμενα από την κινάση mTOR (στόχος ραπαμυκίνης των θηλαστικών, mammalian target of rapamycin) [61]. Παρομοίως, ο mTOR ελέγχει τη δραστηριότητα των φαγοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των DCs, μέσω δέσμευσης

επιγενετικών μηχανισμών [62], [63]. Ο ρόλος του μεταβολισμού στην επιγενετική ρύθμιση του ΣΕΛ παραμένει ανεξερεύνητος, επομένως απαιτούνται περαιτέρω μελέτες μεταβολομικής - επιγενετικής.

### 1.1.3 Κλινική εικόνα και Κατηγοριοποίηση

Δεδομένου ότι ο λύκος παρουσιάζει εναλλασσόμενες περιόδους έξαρσης και ύφεσης, και λόγω της ετερογένειας και του εύρους των εκδηλώσεων του, η διάγνωση είναι πρόκληση ακόμη και για έμπειρους ρευματολόγους, ειδικά σε ασθενείς που παρουσιάζουν τα κλινικά συμπτώματα της νόσου αλλά δεν πληρούν τα κριτήρια ταξινόμησης τόσο του Αμερικανικού Κολλεγίου Ρευματολογίας (American College of Rheumatology, ACR) [64], [65] όσο και των Διεθνών Συνεργαζόμενων Κλινικών για το Συστηματικό Ερυθματώδη Λύκο (Systemic Lupus International Collaborating Clinics, SLICC) [66]. Σε αυτούς τους ασθενείς, η διάγνωση δε μπορεί να γίνει κατά την έναρξη της ασθένειας, αλλά πρέπει να υπάρξει παρακολούθηση για μεγάλο χρονικό διάστημα, ώστε να εκδηλωθούν νέα κλινικά συμπτώματα που θα οδηγήσουν σε σίγουρη διάγνωση. Λόγω του ότι αυτά τα κριτήρια έχουν κάποιους περιορισμούς και δεν κατατάσσουν τους περισσότερους ασθενείς που βρίσκονται στα πρώιμα στάδια της ασθένειας, μία ομάδα συνεργασίας του ACR και του Ευρωπαϊκού Συνδέσμου Ενάντια στις Ρευματοπάθειες (European League Against Rheumatism, EULAR) έχει αναπτύξει και επικυρώσει ένα νέο σύνολο κριτηρίων ταξινόμησης του ΣΕΛ σε διεθνή κλίμακα και με το μέγιστο συνδυασμό ευαισθησίας και ειδικότητας [67].

Η κύρια διαφοροποίηση των νέων κριτηρίων, τα οποία παρουσιάζονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα, εντοπίζεται στον ορισμό θετικού τεστ αντιπυρηνικών αντισωμάτων (antinuclear antibodies, ANA) ως κριτήριο εισόδου. Ακόμη, ο πυρετός ως σύμπτωμα συμπεριλαμβάνεται πλέον στα κριτήρια ταξινόμησης. Τέλος, τα συμπτώματα και εργαστηριακά ευρήματα ταξινομούνται σε 7 κλινικές και 3 εργαστηριακές υποομάδες. Σε κάθε σύμπτωμα έχει αποδοθεί ένα σκορ. Οι ασθενείς που συγκεντρώνουν περισσότερους από 10 βαθμούς με βάση τη συμπτωματολογία τους ταξινομούνται ως ΣΕΛ (Πίνακας 1.1 1).

**Πίνακας 1.1 1:** Κριτήρια κατάταξης 2019 του ACR και EULAR για το Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο [67].

<b>Κριτήριο Εισόδου</b>			
Αντιπυρηνικά Αντισώματα με τίτλο $\geq 1:80$ στα HEp-2 κύτταρα ή ένα ισοδύναμο θετικό τεστ			
<b>Πρόσθετα κριτήρια</b>			
Μην μετράτε ένα κριτήριο εάν μια διαφορετική εξήγηση είναι πιθανότερη από το συστηματικό ερυθηματώδη λύκο			
Αρκεί η εμφάνιση ενός κριτηρίου σε τουλάχιστον μία περίπτωση			
Απαιτείται τουλάχιστον ένα κλινικό κριτήριο			
Τα κριτήρια δε χρειάζεται να συμβαίνουν ταυτόχρονα			
Σε κάθε τομέα, μόνο το υψηλότερα σταθμισμένο κριτήριο υπολογίζεται ως προς τη συνολική βαθμολογία			
<b>Κλινικοί τομείς και κριτήρια</b>	<b>Βαρύτητα</b>	<b>Ανοσολογικοί τομείς και κριτήρια</b>	<b>Βαρύτητα</b>
<b>Σωματικά</b> Πυρετός	2	<b>Αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα</b> Αντικαρδιολιπινικά αντισώματα ή αντι-β2GPI αντισώματα ή αντιπηκτικό του λύκου	2
<b>Δερματικά</b> Μη ουλωτική Αλωπεκία	2	<b>Συμπλήρωμα πρωτεϊνών</b> Χαμηλή C3 ή χαμηλή C4 Χαμηλή C3 και χαμηλή C4	3
Στοματικά έλκη	2		
Υποξύς Δερματικός ή Δισκοειδής Λύκος	4		
Οξύς Δερματικός Λύκος	6		
<b>Μυοσκελετικά</b> Αρθροπάθειες	6	<b>Ειδικά Αντισώματα για ΣΕΛ</b> αντι-dsDNA αντισώματα ή αντι-Smith αντισώματα	6
<b>Νευροψυχιατρικά</b> Ψευδαίσθηση	2		
Ψύχωση	3		
Σπασμός	5		
<b>Ορογονίτιδα</b> Πλευρικό ή περικάρδιο διίδρωμα	5		
Οξεία περικαρδίτιδα	6		
<b>Αιματολογικά</b> Λευκοπενία	3		
Θρομβοπενία	4		
Αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία	4		
<b>Νεφρολογικά</b> Πρωτεϊνουρία $> 0.5$ g/24 h	4		
Βιοψία νεφρού κλάση II ή V νεφρίτιδα λύκου	8		
Βιοψία νεφρού κλάση III ή IV νεφρίτιδα λύκου	10		
Ταξινομήστε ως συστηματικό ερυθηματώδη λύκο με βαθμολογία 10 ή περισσότερο εάν πληρείται το κριτήριο εισόδου			

#### 1.1.4 Θεραπευτική Αντιμετώπιση

Οι θεραπευτικοί στόχοι στο ΣΕΛ είναι η καταστολή του υπερδραστήριου ανοσοποιητικού συστήματος και η πρόκληση ύφεσης ώστε να αποτραπεί μόνιμη βλάβη οργάνων. Οι τύποι των φαρμάκων που απαιτούνται εξαρτώνται από τα συμπτώματα. Γενικά, ασθενείς με ήπιες εκδηλώσεις λύκου (προσβολή δέρματος, βλεννογόνων και αρθρώσεων) αντιμετωπίζονται με ανθελονοσιακά ή τροποποιητικά της νόσου αντιρευματικά φάρμακα (disease-modifying antirheumatic drugs, DMARDs), μόνα τους ή σε συνδυασμό με από του στόματος γλυκοκορτικοειδή χαμηλής δόσης (glucocorticoids, GCs). Στις σοβαρές εκδηλώσεις της νόσου,





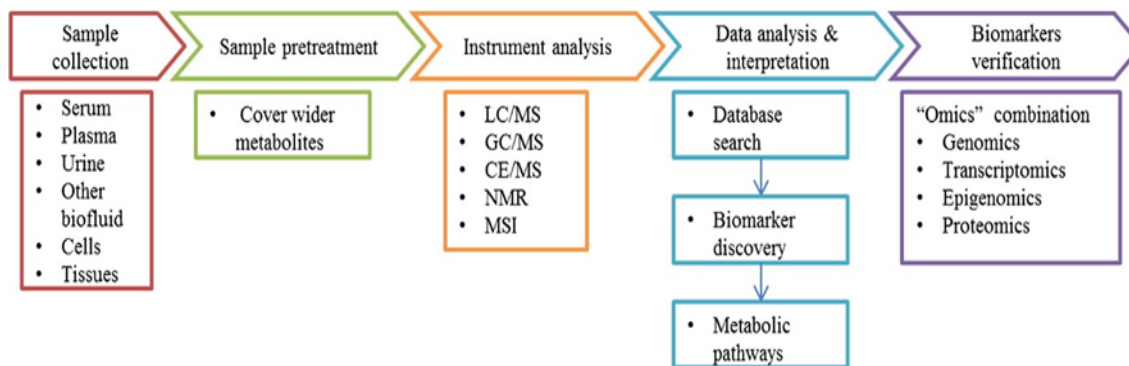
## 1.2 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

### 1.2.1 Μεταβολομική

Το μεταβόλωμα μπορεί να οριστεί ως το πλήρες σύνολο ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους (< 1500 Da), που παίζουν σημαντικό ρόλο στις μεταβολικές οδούς και τις κυτταρικές διεργασίες ενός βιολογικού συστήματος. Η μεταβολομική [70] έχει γίνει ένα ισχυρό εργαλείο στην έρευνα των ασθενειών και είναι ιδιαίτερα ελπιδοφόρα στην ανακάλυψη βιοδεικτών, δηλαδή μεταβολιτών που εντοπίζονται φυσιολογικά σε βιολογικά υγρά και ιστούς και σε μη φυσιολογικές συγκεντρώσεις υποδεικνύουν μία παθολογική κατάσταση. Το μεταβόλωμα αντανακλά διαταραχές του οργανισμού, όπως στην περίπτωση ασθενειών, τις επιπτώσεις των φαρμάκων ή των περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως ο τρόπος ζωής και η διατροφή. Κατά συνέπεια, η μεταβολομική προσφέρει μια ολιστική προσέγγιση προς την ανακάλυψη νέων διαγνωστικών και προγνωστικών βιοδεικτών αλλά και προς την κατανόηση των παθολογικών μηχανισμών σύνθετων ασθενειών. Δεδομένου ότι οι μεταβολές του μεταβολώματος μπορεί να εμφανιστούν πολύ νωρίς στην παθολογική διαδικασία, αναμένεται ότι οι μεταβολίτες - βιοδείκτες θα είναι σε θέση να διαγνώσουν την ασθένεια ακόμη και σε ασυμπτωματικό στάδιο, επιτρέποντας γρήγορες και πιο αποτελεσματικές θεραπείες, και κατά συνέπεια τη μείωση των ποσοστών θνησιμότητας.

Μια επισκόπηση των βημάτων που πραγματοποιούνται σε μια μεταβολική μελέτη παρουσιάζεται στην [Εικόνα 1.2 1](#). Η μεταβολομική έρευνα εκτελείται κυρίως σε πολύπλοκα βιολογικά δείγματα, όπως αίμα, ούρα, κύτταρα ή εκχυλίσματα ιστών. Επομένως, απαιτούνται κατάλληλες αναλυτικές τεχνικές για το γρήγορο και ταυτόχρονο προσδιορισμό των διαφόρων ενώσεων. Η ευρεία κάλυψη του μεταβολώματος είναι ιδιαίτερα δύσκολη λόγω του πλήθους της διαφορετικότητας των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των μεταβολιτών. Έτσι, συχνά απαιτούνται περισσότερες από μία αναλυτικές τεχνικές ώστε να προκύψει ένα όσο το δυνατό πιο πλήρες μεταβολικό προφίλ. Τέλος, σημαντικό βήμα είναι η επαλήθευση των βιοδεικτών που προκύπτουν από τη μεταβολομική μελέτη με άλλες πιο αυστηρές και ευρύτερες "ομικές" τεχνολογίες.





**Εικόνα 1.2 1:** Μια τυπική μεταβολομική μελέτη. MS, φασματομετρία μάζας; NMR, φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού; MSI, φασματομετρική απεικόνιση μαζών; LC, υγρή χρωματογραφία; GC, αέρια χρωματογραφία; CE, τριχοειδής ηλεκτροφόρηση [71].

### 1.2.2 Μεταβολομική και Αυτοάνοσα Νοσήματα

Ο «ανοσομεταβολισμός», ένας όρος που χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 2011 [72], αποτελεί πλέον έναν από τους πιο συναρπαστικούς τομείς της μεταφραστικής έρευνας που επιδιώκει να βελτιώσει την κατανόησή μας για τις πολύπλευρες ανταλλαγές μεταξύ του μεταβολικού και του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα τελευταία χρόνια, έχουν πραγματοποιηθεί έρευνες με στόχο να αποκτήσουμε περισσότερες πληροφορίες σχετικά με το ρόλο του μεταβολισμού στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και την εξέλιξη της αυτοανοσίας [71], [73]–[76].

Σε κατάσταση ηρεμίας, τα ανοσοκύτταρα, όπως τα λεμφοκύτταρα, βασίζονται κυρίως σε καταβολικές αντιδράσεις όπως η οξείδωση λιπαρών οξέων (Fatty Acid Oxidation, FAO) και η οξειδωτική φωσφορυλίωση (Oxidative Phosphorylation, OXPHOS) για την κάλυψη των ενεργειακών τους απαιτήσεων, ενώ κατά την ενεργοποίησή τους, ταχύτατα στρέφονται στο μονοπάτι της γλυκόλυσης. Κατά συνέπεια, η στόχευση συγκεκριμένων μεταβολικών οδών ή μεταβολιτών θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη ρύθμιση των ανοσοκυττάρων που εμπλέκονται στην αυτοανοσία. Αυτές οι ανακαλύψεις ανοίγουν το δρόμο για την πιθανή χρήση μεταβολικών προϊόντων ως βιοδείκτες ή για νέες θεραπευτικές παρεμβάσεις σε χρόνιες φλεγμονώδεις και αυτοάνοσες ασθένειες.

### 1.2.3 Μεταβολομική και Συστηματικός Ερυθρηματώδης Λύκος

Μέχρι σήμερα δεν είναι πολλές οι έρευνες που έχουν αναλύσει το μεταβολικό προφίλ του ΣΕΛ γεγονός που αποδεικνύει την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση της χρησιμότητας της μεταβολομικής στην έρευνα της ασθένειας. Οι περισσότερες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε ορό/πλάσμα του αίματος [77]–[86] και αρκετά λιγότερες σε ούρα [87]–[89] και κόπρανα [90], [91].

Προηγούμενη μεταβολομική μελέτη σε δείγματα ορού αίματος ασθενών με ΣΕΛ [77] έδειξε μειωμένες συγκεντρώσεις βαλίνης, τυροσίνης, φαινυλαλανίνης, λυσίνης, ισολευκίνης, ιστιδίνης, γλουταμίνης, αλανίνης, κιτρικού οξέος, κρεατινίνης, κρεατίνης, πυροσταφυλικού οξέος, λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας, χοληστερόλης, γλυκερόλης, μυρμηκικού οξέος και αυξημένες συγκεντρώσεις N-ακετυλο γλυκοπρωτεΐνης καθώς και λιποπρωτεΐνης χαμηλής και πολύ χαμηλής πυκνότητας. Σε μία άλλη δημοσίευση λίγο αργότερα [78], τα κύρια ευρήματα επιδεικνύουν αυξημένο οξειδωτικό στρες και μειωμένη παραγωγή ενέργειας στο ΣΕΛ που επηρεάζει το μεταβολισμό των αμινοξέων και των λιπαρών οξέων. Παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων στο ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό γλουταθειόνη και σε όλους τους δότες μεθυλομάδας, συμπεριλαμβανομένων της κυστεΐνης, της μεθειονίνης και της χολίνης, και ακολούθως της φωσφοχολίνης. Οι μεταβολικοί δείκτες που ξεχώρισαν περιελάμβαναν αυξημένα επίπεδα προϊόντων υπεροξειδωσης λιπιδίων, MDA, γ-γλουταμυλ πεπτίδια, GGT, λευκοτριένιο B4 και 5-HEETE. Ένας άλλος μεταβολίτης που επηρεάζεται σημαντικά είναι η τρυπτοφάνη, με μειωμένα επίπεδα σε ασθενείς με ΣΕΛ σε σύγκριση με ομάδες ελέγχου [79]. Οι αλλαγές στα επίπεδα τρυπτοφάνης επιβεβαιώνονται και από άλλες μελέτες [92]–[94], γεγονός που φανερώνει ότι η οδός της κινουρενίνης επηρεάζεται ιδιαίτερα στην ασθένεια. Συγκριτική μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με ΣΕΛ και ασθενείς με ΝΛ, έδειξε ότι οι ασθενείς με νεφρίτιδα εμφάνιζαν αυξημένα επίπεδα λιπιδικών μεταβολιτών στον ορό του αίματος, κρεατινίνης και μειωμένες συγκεντρώσεις οξικού οξέος [80]. Οι μελέτες που ακολούθησαν επιβεβαιώνουν τη σημασία του μεταβολισμού των λιπιδίων στο ΣΕΛ, ενώ πρόσφατη μελέτη διερεύνησε και συνέκρινε το εντερικό μικροβίωμα με το μεταβολικό προφίλ του πλάσματος ασθενών με ΣΕΛ [86].

Οι περισσότερες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στα ούρα είχαν κύριο στόχο να μελετήσουν τις επιπλοκές στην ΝΛ, καθώς το μεταβόλωμα των ούρων μπορεί να μας δώσει χρήσιμες πληροφορίες για την κατάσταση των νεφρών. Μεταβολομική μελέτη που πραγματοποιήθηκε στα ούρα ασθενών έδειξε ότι οι συγκεντρώσεις μεταβολιτών, όπως το κιτρικό

οξύ και η ταυρίνη διέφεραν μεταξύ των διαφόρων τύπων νεφρίτιδας λύκου [87]. Επόμενη μελέτη έδειξε δραματική αύξηση αρκετών μεταβολιτών, οι οποίοι εμπλέκονται σε βασικές μεταβολικές οδούς, συμπεριλαμβανομένων του μεταβολισμού ενέργειας, του μεταβολισμού των νουκλεοτιδίων, του οξειδωτικού στρες και του μεταβολισμού που προέρχεται από το εντερικό μικροβίωμα [88]. Σε πολύ πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στα ούρα ασθενών με ΝΛ με τη χρήση φασματοσκοπίας  $^1\text{H-NMR}$ , αναγνωρίστηκε μια ομάδα τριών υποψηφίων βιοδεικτών για τη νεφρίτιδα λύκου: της β-αλανίνης, του 2,2-διμεθυλο-σουκινικού οξέος και της 3,4-διυδροξυ-φαινυλακεταλδεΐης [89].

#### 1.2.4 Αναλυτικές Τεχνικές

Οι κύριες αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται στη μεταβολομική περιλαμβάνουν την υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (LC-MS) ή συζευγμένη φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS), την αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (GC-MS), την υψηλής ή υπέρ-υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC/UPLC) σε συνδυασμό με ανιχνευτή υπεριώδους ή φθορισμού και την φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Κάθε αναλυτική τεχνική έχει τα δικά της πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής εξαρτάται κυρίως από το στόχο της μελέτης καθώς και τη φύση των δειγμάτων [95]. Ωστόσο, δεν υπάρχει μία και μόνο αναλυτική τεχνική ικανή να πραγματοποιήσει πλήρως την αναγνώριση και ποσοτικοποίηση όλων των μεταβολιτών σε ένα τυπικό βιολογικό δείγμα. Ως αποτέλεσμα, συχνά στις μεταβολομικές μελέτες χρησιμοποιούνται πολλαπλές αναλυτικές τεχνικές. Σήμερα, η LC-MS και η φασματοσκοπία NMR είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες αναλυτικές μέθοδοι στη μεταβολομική.

#### 1.2.4.1 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR) εκμεταλλεύεται τις μαγνητικές ιδιότητες των πυρήνων λόγω ιδιοπεριστροφής, οι οποίοι, παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου και κατάλληλης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων (4-900 MHz) απορροφούν. Η συχνότητα απρρόφησης του κάθε πυρήνα εξαρτάται από το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο και από το τοπικό χημικό περιβάλλον του, και ως συνέπεια η φασματοσκοπία NMR παρέχει πληροφορίες σε ατομικό επίπεδο.

Η φασματοσκοπία NMR αποτελεί ένα ισχυρό αναλυτικό εργαλείο που έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως στη χημεία για την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό της χημικής δομής οργανικών ενώσεων. Η φασματοσκοπία NMR βρίσκει εφαρμογή σε ένα ευρύ φάσμα ερευνητικών τομέων συμπεριλαμβανομένων της δομικής βιολογίας, της οργανικής χημείας, της ανόργανης χημείας, της βιοχημείας, της φυσικής, της βιολογίας, των πολυμερών και της ανακάλυψης φαρμάκων.

Σε σύγκριση με άλλες αναλυτικές προσεγγίσεις, η φασματοσκοπία NMR είναι ταχεία και με εξαιρετικά επαναλήψιμα αποτελέσματα στην έρευνα της μεταβολομικής. Με τη βοήθεια ανιχνευτών ροής-έγχυσης είναι δυνατή η ανάλυση εκατοντάδων δειγμάτων σε μια μέρα, ενώ η μη καταστροφική και μη επεμβατική φύση της, την καθιστά ιδανική τεχνική για χρήση σε μελέτες *in vivo* (magnetic resonance spectroscopy, MRS). Η γενική μεθοδολογία που ακολουθείται στην μεταβολομική με τη χρήση του NMR αφορά το συνδυασμό της συλλογής των φασματοσκοπικών δεδομένων και της πολυπαραμετρικής ανάλυσης με στόχο την εύρεση μοτίβων μέσα σε ομάδες φασμάτων και την παρακολούθηση μεταβολικών αλλαγών [96]. Με την εφαρμογή του NMR σε μεταβολομικές μελέτες βιολογικών δειγμάτων, είναι δυνατή η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση εκατοντάδων μεταβολιτών μέσα σε λίγα λεπτά, παρέχοντας μια ολοκληρωμένη εικόνα της κατάστασης του μεταβολισμού ενός οργανισμού σε μια δεδομένη χρονική περίοδο.

Η χαμηλή ευαισθησία είναι το εγγενές μειονέκτημα και η κύρια πρόκληση για την εφαρμογή του NMR στη βιοϊατρική έρευνα. Νέες τεχνολογίες και τεχνικές NMR αναδύονται συνεχώς με στόχο τη βελτίωση των οργανολογικών του περιορισμών. Η ευαισθησία και η διακριτική ικανότητα στο NMR συνδέονται στενά με την ισχύ του μαγνητικού πεδίου. Συγκεκριμένα, η ευαισθησία (αναλογία σήματος προς θόρυβο, signal-to-noise ratio, SNR) βελτιώνεται περίπου κατά έναν παράγοντα  $\sim B_0^{3/2}$  ( $B_0$ : εξωτερικό μαγνητικό πεδίο). Επιπροσθέτως, η διακριτική ικανότητα βελτιώνεται γραμμικά με την ισχύ του πεδίου για 1D NMR και με το τετράγωνο του πεδίου για 2D NMR. Επομένως, σημαντική είναι η ανάπτυξη

φασματομέτρων NMR υψηλών πεδίων ώστε να προκύπτουν καλύτερα αποτελέσματα. Σήμερα, μαγνήτες 950 MHz και 1 GHz είναι ευρέως εμπορικά διαθέσιμοι, ενώ μόλις ξεκίνησε η διανομή των πρώτων μαγνητών 1.2 GHz (μαγνητικό πεδίο έντασης 28.2 Tesla). Με αυτά τα μέσα θα αυξηθεί σημαντικά ο αριθμός των μεταβολιτών που μπορούν να ανιχνευθούν με απλή φασματοσκοπία 1D  $^1\text{H}$  NMR. Ακόμη, κρυογονικοί αισθητήρες (cryogenic probes) [97] και μικροαισθητήρες (microprobes) [98] έχουν ενισχύσει σημαντικά την ευαισθησία του NMR κατά τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Τέλος, η προσέγγιση δυναμικής πυρηνικής πόλωσης (Dynamic Nuclear Polarization, DNP) είναι μία από τις πιο αποτελεσματικές εξελίξεις [99] που χρησιμοποιείται με επιτυχία για την ενίσχυση της ευαισθησίας του NMR [100]–[105].

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Οι γονιδιωματικές, μεταγραφικές, και πρωτεωμικές αλλαγές έχουν μελετηθεί εκτενώς στην ασθένεια του ΣΕΛ. Ο μεταβολισμός είναι μία σχετικά νέα διάσταση που λαμβάνει όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον σε όλα τα πεδία έρευνας, συμπεριλαμβανομένης και της μελέτης των αυτοάνοσων νοσημάτων.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση με τη χρήση της φασματοσκοπίας  $^1\text{H}$  NMR στα υδατικά εκχυλίσματα νεφρών από μύες NZBxNZW/F1 που αναπτύσσουν αυθόρμητα την ασθένεια του λύκου και από υγιή πρότυπα μύων B6. Ελήφθησαν τα φασματοσκοπικά δεδομένα και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η στατιστική τους επεξεργασία με πολυπαραμετρικές και μονοπαραμετρικές μεθόδους ανάλυσης, ώστε να εξαχθούν βιοχημικές πληροφορίες σχετικά με το μεταβολικό προφίλ του νεφρού στις ομάδες μελέτης.

Από όσο γνωρίζουμε μέχρι σήμερα δεν έχει πραγματοποιηθεί κάποια μελέτη μη στοχευμένης μεταβολομικής ανάλυσης των νεφρών στην ασθένεια του ΣΕΛ. Προηγούμενες μελέτες σε δείγματα νεφρών ποντικών είχαν στόχο τη διερεύνηση μεταβολών στα αμινοξέα και τη γλυκόζη [106] και τα σφιγγολιπίδια [107] στο ΣΕΛ. Ο νεφρός αποτελεί ένα από τα κύρια τελικά όργανα-στόχους στην ασθένεια του λύκου, επομένως είναι καθοριστικής σημασίας τόσο για την παρακολούθηση της ασθένειας, όσο και για την αποτελεσματική διάγνωση και θεραπεία της νεφρίτιδας του λύκου, η ανάπτυξη πρώιμων προγνωστικών δεικτών της νεφρικής λειτουργίας.

Ακόμη, ένα μεγάλο πρόβλημα στις μεταβολομικές μελέτες είναι η τεράστια μεταβλητότητα που προκύπτει ως αποτέλεσμα των εξωτερικών ερεθισμάτων που δε σχετίζονται με τα στάδια της νόσου αλλά οφείλονται στη διατροφή, τον τρόπο ζωής, τη σωματική δραστηριότητα κ.α. Ο πειραματικός σχεδιασμός που ακολουθήθηκε στην παρούσα μελέτη με τη χρήση πειραματοζώων, μας επιτρέπει την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων για την πορεία της ασθένειας καθώς έχουμε εξασφαλίσει εξαιρετικά ελεγχόμενες συνθήκες.

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η εκτίμηση των μεταβολικών αλλαγών που εντοπίζονται σε πρότυπα μύων που αναπτύσσουν αυθόρμητα την ασθένεια του λύκου NZBxNZW/F1 και σε υγιή πρότυπα μύων B6, ώστε να προσδιοριστούν και να ταυτοποιηθούν μεταβολίτες – βιοδείκτες που σχετίζονται με την ασθένεια σε τρία χρονικά σημεία.

## 2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1.1 Οργανολογία

Η ανάλυση NMR πραγματοποιήθηκε σε φασματόμετρο Avance III 600 (Bruker, Γερμανία), εφοδιασμένο με αυτόματο δειγματολήπτη 60 θέσεων (B-ACS 60) και ανιχνευτή 5 mm PABBI 1H/D-BB σε θερμοκρασία 27 °C. Για τον έλεγχο και τη σταθεροποίηση της θερμοκρασίας χρησιμοποιήθηκε ψηφιακός ρυθμιστής BVT-3000 με ρυθμό ροής N<sub>2</sub> 535 L/h.

Η φυγοκέντρηση των δειγμάτων έγινε με μικροφυγόκεντρο Mikro 200R (Hettich Lab Technology, Γερμανία) για τα eppendorfs, και η εξάτμιξη των υπερκειμένων μέχρι ξηρού σε συσκευή GeneVac HT-4XEZ-2 Lyospeed ENABLED (Genevac Ltd, Ηνωμένο Βασίλειο).

### 2.1.2 Συλλογή Δειγμάτων

#### 2.1.2.1 Πειραματόζωα

#### Ζωικό πρότυπο ΣΕΛ

Το υβρίδιο NZBxNZW/F1 είναι το παλαιότερο κλασικό μοντέλο ποντικού για το λύκο, που προέρχεται από τη διασταύρωση των New Zealand Black (NZB) και New Zealand White (NZW) ποντικών. Τα ποντίκια NZB εμφανίζουν περιορισμένη αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία, ενώ τα ποντίκια NZW δεν παρουσιάζουν αυτοανοσία. Ωστόσο, τα F1 υβρίδιά τους αναπτύσσουν αυθόρμητα ένα φαινότυπο παρόμοιο με του ΣΕΛ στον άνθρωπο. Αυτός ο φαινότυπος περιλαμβάνει λεμφαδενοπάθεια, σπληνομεγαλία, αυξημένα αντιπυρηνικά αυτοαντισώματα (ANA), καθώς και σπειραματονεφρίτιδα που προκαλείται από το ανοσοσύμπλοκο (immune complex-mediated glomerulonephritis, ICGN), η οποία γίνεται εμφανής στην ηλικία των 5-6 μηνών, οδηγώντας τελικά σε νεφρική ανεπάρκεια και θάνατο στους 10-12 μήνες ζωής [108]. Επιπλέον, όπως και στους ανθρώπους, ο λύκος αναπτύσσεται κυρίως στα θηλυκά ποντίκια NZBxNZW/F1 με μικρότερο ποσοστό και σοβαρότητα στα αρσενικά· η ασθένεια εμφανίζεται στα θηλυκά γύρω στον έκτο μήνα της ηλικίας με θνησιμότητα 50% στους 8,5 μήνες και θνησιμότητα 90% στους 12,8 μήνες [109].

## Διαδικασία

Για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας θυσιάστηκαν θηλυκά NZBxNZW/F1 υβριδικά ποντίκια (n=6) στο στάδιο της προ-εφηβείας (ηλικίας 1 μήνα) κατά το οποίο απουσιάζουν οι ορμόνες του φύλου, στο στάδιο της προ-αυτοανοσίας (ηλικίας 3 μηνών) κατά το οποίο απουσιάζουν τα αυτοαντισώματα και στο στάδιο της νεφρίτιδας (ηλικίας 6 μηνών) ύστερα από μέτρηση πρωτεϊνουρίας. Στις αντίστοιχες ηλικίες των υβριδίων θυσιάστηκαν θηλυκά B6 ποντίκια (n=6) ως υγιή πρότυπα.

Τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν χορηγώντας αρχικά ήπια εισπνεόμενη αναισθησία μέσω ισοφλουρανίου με μάσκα προσώπου (5-10 s ανά ζώο) και στη συνέχεια με αναισθησία ενδοπεριτοναϊκά (ξυλαζίνη, κεταμίνη και αποστειρωμένο απιονισμένο νερό· 120  $\mu$ L διαλύματος ανά 20 g βάρους ποντικίου). Ακολούθησε αφαίρεση του αίματος μέσω της καρδιάς με έγχυση κρύου αλατούχου ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών ιόντων (phosphate-buffered saline, PBS) (30 mL ανά ζώο) και πραγματοποιήθηκε η συλλογή των οργάνων. Οι νεφροί απομονώθηκαν και φυλάχθηκαν στους -80 °C. Τα δείγματα παρελήφθησαν από το ερευνητικό εργαστήριο του Καθηγητή Δρ. Μπούμπα και το πειραματικό πρωτόκολλο πραγματοποιήθηκε από τους υποψήφιους διδάκτορες Δ. Μανωλάκου και Δ. Νικολόπουλο στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (Σωράνου Εφεσίου 4, 11527 Αθήνα).

### 2.1.2.2 Δείγματα

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε δύο ομάδες δειγμάτων: των νεφρών των υβριδίων (F1) και των υγιών προτύπων (B6). Συλλέχθηκαν εναλλάξ ο δεξιός ή αριστερός νεφρός κάθε ποντικίου σε τρεις διαφορετικές ηλικίες (1, 3, 6 μηνών). Στην κάθε ηλικία θυσιάστηκαν 6 μύες. Η μεταβολομική ανάλυση έγινε στα υδατικά εκχυλίσματα συνολικά 36 δειγμάτων.

### 2.1.3 Προετοιμασία Δειγμάτων

Η ομογενοποίηση των ιστών έγινε με τη βοήθεια ιγδίου τοποθετημένου σε ξηρό πάγο. Οι ομογενοποιημένοι ιστοί μεταφέρθηκαν σε παγωμένους και προζυγισμένους περιέκτες τύπου erpendorf, ζυγίστηκαν και φυλάχθηκαν στους -80 °C μέχρι τη διαδικασία της εκχύλισης.

Οι νεφροί εκχυλίστηκαν σε σύστημα τριών διαλυτών [110]. Οι παγωμένοι ιστοί μεταφέρθηκαν σε falcons των 15 mL. Προστέθηκαν παγωμένοι διαλύτες (-20 °C) CHCl<sub>3</sub>/MeOH σε αναλογία 2:1 και συνολικού όγκου 1 mL ανά 100 mg ιστού. Τα falcons τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων για 5 min. Ακολούθησε η προσθήκη απιονισμένου νερού (milli Q) (4 °C) ίσου



όγκου (1 mL/100 mg ιστού). Ακολούθησε ισχυρή περιδίνηση για 1 min για τη δημιουργία γαλακτώματος και παραμονή στον πάγο για 15 min. Στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκαν στα 5000 rpm για 20 min στους 4 °C. Η υδατική (άνω) φάση από κάθε δείγμα απομονώθηκε σε νέο σωλήνα falcon ενώ η λιπιδική (κάτω) φάση συλλέχθηκε σε erpendorf. Η διαδικασία επαναλήφθηκε βάζοντας εκ νέου ποσότητες διαλυτών και οι δύο φάσεις που απομονώθηκαν ενώθηκαν με αυτές της πρώτης εκχύλισης. Τόσο τα υδατικά όσο και τα οργανικά εκχυλίσματα αποθηκεύτηκαν στους -80 °C. Τέλος, 1100 µL από την υδατική φάση εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού σε συσκευή GeneVac. Όλη η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε και σε «τυφλά» δείγματα για τον έλεγχο επιμολύνσεων.

#### 2.1.4 Ανάλυση με NMR

Τα ξηρά υδατικά εκχυλίσματα των ιστών διαλυτοποιήθηκαν με 700 µL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών σε δευτεριωμένο νερό (D<sub>2</sub>O) σε pH=7.5 με περιδίνηση για 1min και φυγοκέντρηση στα 13000 rpm για 2 min στους 4 °C. 550 µL από κάθε δείγμα μεταφέρθηκαν σε σωληνάριο NMR διαμέτρου 5 mm. Το ρυθμιστικό διάλυμα περιελάμβανε 0.15 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/D<sub>2</sub>O, 0.2 mM NaN<sub>3</sub> ως αντιμικροβιακό παράγοντα και 0.01% 1,1,2,2- τριμεθυλσιλυλοπροπανοϊκό οξύ (TSP), ως εσωτερικό πρότυπο.

Τα φάσματα NMR ελήφθησαν σε φασματόμετρο Bruker Avance III 600 MHz σε θερμοκρασία 300 K (27 °C). Η βελτιστοποίηση της ομοιογένειας του πεδίου και των φασματικών παραμέτρων (χρόνος αποκατάστασης, αριθμός σαρώσεων) γίνεται χειροκίνητα για το πρώτο δείγμα και στη συνέχεια ο αυτοματισμός που ελέγχεται από το πρόγραμμα IconNMR v5.0.7 (Bruker Biospin, GmbH, Karlsruhe, Germany) αναλαμβάνει τη λήψη των φασμάτων και την επεξεργασία τους, την τοποθέτηση των δειγμάτων, την εξισορρόπηση της θερμοκρασίας (χρόνος αναμονής 5 λεπτών και έλεγχος σταθερότητας της θερμοκρασίας κατά 0.1 K), την ομοιογένεια του πεδίου και την βαθμονόμηση του παλμού 90 deg.

Τα φάσματα 1D <sup>1</sup>H NMR ελήφθησαν με την παλμική αλληλουχία 1D NOESY (noesygpr1D), με κορεσμό της κορυφής του νερού (water presaturation) (25 Hz) κατά τη διάρκεια της αποδιέγερσης και του χρόνου μίξης, με στόχο την εξάλειψη της κορυφής συντονισμού του νερού. Στο φάσμα 1D NOESY ελήφθησαν 128 σαρώσεις (ns=128), με ανάλυση 64k σημείων (TD=65536) για φασματικό εύρος SW=12335.526 Hz, με χρόνο αποδιέγερσης (relaxation delay) D1=10 s, χρόνο λήψης του φάσματος (acquisition time) 2.66 s και χρόνο μίξης (mixing time) D8=0.01 s.

Το ομοπυρηνικό 2D πείραμα J-resolved (Jres) έχει μικρή χρονική διάρκεια και έτσι ήταν εφικτή η λήψη του για κάθε δείγμα. Για το γρήγορο αυτό πείραμα χρησιμοποιήθηκε η παλμική αλληλουχία jresgpprqf. Τα φάσματα J-resolved ελήφθησαν με 4 σαρώσεις (NS=4) και ανάλυση 8k σημείων (TD=8192 για την F2, TD=40 για την F1) σε φασματικό εύρος 10000 Hz (SWH=10000.000 για την F2, SWH=78.125 για την F1) και χρόνο αποδιέγερσης D1=1 s.

Το φάσμα TOCSY διεξήχθη με 96 σαρώσεις, με ανάλυση 2k σημείων (TD=2048 για την F2, TD=200 για την F1) και φασματικό εύρος 9615 Hz (SWH=9615.385 για την F2), με χρόνο αποδιέγερσης D1=2 s και χρόνο λήψης AQ=0.1 s. Το  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  DEPT 135-HSQC φάσμα πραγματοποιήθηκε με 152 σαρώσεις σε φασματικό εύρος SWH=9615 Hz για την F2 και SWH=27165 Hz για την F1.

### 2.1.5 Επεξεργασία φασμάτων NMR

Για την ταυτοποίηση των μεταβολιτών στα φάσματα NMR των υδατικών εκχυλισμάτων των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα ειδικά λογισμικά Chenomx NMR Suite v. 8.5 και Topspin v. 4.08 (Bruker BioSpin GmbH). Συνδυαστικά, πολύτιμο εργαλείο αποτέλεσε η διαδικτυακή βάση δεδομένων HMDB (The Human Metabolome Database, HMDB) [111].

Η προετοιμασία των φασμάτων NMR ώστε να ακολουθήσει η στατιστική τους ανάλυση έγινε μέσω του ειδικού λογισμικού AMIX v. 3.9.14 με το οποίο πραγματοποιήθηκε η αναγωγή (data reduction ή bucketing) των δεδομένων σε ισαπέχοντα τμήματα (buckets). Το bucketing έγινε σε όλη την έκταση του φάσματος (0.70 – 9.70 ppm) χωρίζοντας το σε ισαπέχοντα τμήματα εύρους 0.005 ppm. Από κάθε φάσμα αφαιρέθηκε η περιοχή του νερού (4.78-4.65 ppm). Σε κάθε bucket έγινε ολοκλήρωση με βάση το άθροισμα των εντάσεων (sum of intensities) και κανονικοποίηση με την επιλογή «χωρίς κλιμάκωση» (no scaling). Στη συνέχεια αφαιρέθηκε και η περιοχή 4.60-5.05 ppm από όλα τα φάσματα λόγω κορυφών που οφείλονται σε μόλυνση και αναλύονται παρακάτω (3.2 Στατιστική Ανάλυση Δεδομένων NMR). Τέλος, η κανονικοποίηση των δεδομένων έγινε με βάση τη συνολική ένταση (total intensity) κάθε φάσματος με τη βοήθεια του EXCEL.

## 2.2 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

### 2.2.1 Μέθοδοι Πολυπαραμετρικής Ανάλυσης

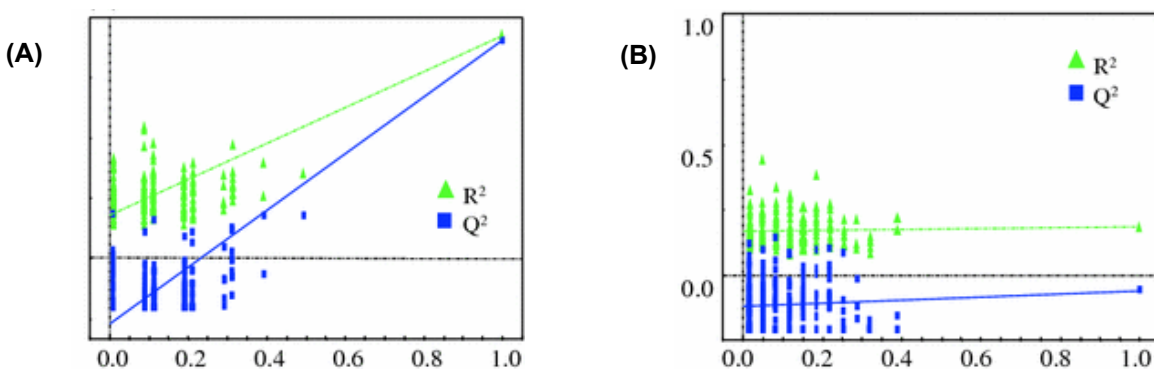
Η εξαγωγή χρήσιμων πληροφοριών από τα περίπλοκα δεδομένα NMR απαιτεί μεθόδους αναγνώρισης μοτίβων όπως η Πολυπαραμετρική Ανάλυση Δεδομένων (MultiVariate Data Analysis, MVDA). Οι πλέον χρησιμοποιούμενες μέθοδοι πολυπαραμετρικής ανάλυσης στον τομέα της μεταβολομικής είναι η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principle Components Analysis, PCA) και η Διακρίνουσα Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) συμπεριλαμβανομένων και των παραλλαγών της.

Η μέθοδος *PCA* ανήκει στις μη επιβλεπόμενες (unsupervised) πολυμεταβλητές τεχνικές και ο στόχος της είναι να φτάσει σε έναν γραμμικό μετασχηματισμό που να διατηρεί το μεγαλύτερο μέρος της διακύμανσης στα αρχικά δεδομένα σε όσο το δυνατόν λιγότερες διαστάσεις [112]. Η PCA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρατήρηση της τάσης διακριτοποίησης των ομάδων και της παρουσίας έκτροπων τιμών (outliers). Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται με τα διαγράμματα αντικειμένων (scores plot) και φορτίων (loadings plot), όπου διερευνούνται οι μεταβολίτες στους οποίους οφείλεται η διαφοροποίηση των ομάδων. Η μέθοδος *PLS-DA* [113] είναι επιβλεπόμενη (supervised) μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη βελτιστοποίηση του διαχωρισμού μεταξύ διαφορετικών ομάδων δειγμάτων, κάτι που επιτυγχάνεται συνδέοντας δύο πίνακες δεδομένων  $X$  (π.χ. ανεπεξέργαστα δεδομένα NMR) και  $Y$  (π.χ. ιδιότητα ομάδας). Αυτή η προσέγγιση στοχεύει στη μεγιστοποίηση της διακύμανσης μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών  $X$  και της αντίστοιχης εξαρτώμενης μεταβλητής  $Y$  πολυδιάστατων δεδομένων. Και από τη μέθοδο PLS-DA προκύπτουν εύκολα ερμηνεύσιμα score plots που απεικονίζουν τον διαχωρισμό μεταξύ διαφορετικών ομάδων και σε συνδυασμό με τα αντίστοιχα loading plots, λαμβάνουμε πληροφορίες για τη σχέση μεταξύ σημαντικών μεταβλητών που μπορεί να είναι συγκεκριμένες στην ομάδα ενδιαφέροντος. Η Ορθογώνια Διακρίνουσα Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis, *OPLS-DA*) [114] αποτελεί μία βελτιωμένη παραλλαγή της προηγούμενης μεθόδου. Αυτή η μέθοδος μπορεί να βελτιστοποιήσει τη σχέση μεταξύ των μεταβλητών του πίνακα  $X$  και  $Y$  και να αντισταθμίσει την επίδραση του δομημένου θορύβου μέσω περιστρεφόμενου συστήματος συντεταγμένων, μεγιστοποιώντας έτσι τη διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων (π.χ. ομάδα ελέγχου και ομάδα μελέτης). Στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων της μεθόδου OPLS-DA συνεισφέρει και το διάγραμμα S-plot, το οποίο

απεικονίζει σε διάγραμμα δύο διαστάσεων τη συνδιακύμανση (covariance) και τη συσχέτιση (correlation) μεταξύ των μεταβολιών.

## 2.2.2 Επικύρωση των μοντέλων PLS-DA

Ο μεταθετικός έλεγχος (permutation test) είναι μία μέθοδος εξωτερικής επικύρωσης χημειομετρικών μοντέλων και χρησιμοποιείται κυρίως στην επικύρωση του βαθμού προσαρμογής του μοντέλου PLS-DA. Παρατηρεί τη διαφορά μεταξύ του μοντέλου πολλαπλών τυχαίων μεταβλητών  $y$  και του μοντέλου των αρχικών μεταβλητών  $y$  αλλάζοντας τυχαία τη σειρά της μεταβλητής  $y$ . Στη συνέχεια, δημιουργείται μια γραμμή παλινδρόμησης μεταξύ των τυχαία παραγόμενων τιμών  $R^2$  και  $Q^2$  και των αρχικών αθροιστικών (cumulative) τιμών  $R^2$  και  $Q^2$ . το σημείο τομής μεταξύ της γραμμής παλινδρόμησης και ενός κατακόρυφου άξονα είναι ένας δείκτης για τον έλεγχο της ποιότητας του μοντέλου, όπου οι τυχαιοποιημένες τιμές  $R^2$  και  $Q^2$  αντιπροσωπεύουν τον βαθμό προσαρμογής του μοντέλου των τυχαιοποιημένων μεταβλητών  $y$  και την προγνωστική ικανότητα του μοντέλου, αντίστοιχα. Το μοντέλο επικύρωσης του μεταθετικού ελέγχου μπορεί να επαληθευτεί με τους ακόλουθους δύο τρόπους. Ο πρώτος είναι η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης· όσο μεγαλύτερη είναι η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης και όσο μικρότερη είναι η τομή μεταξύ της ευθείας παλινδρόμησης και του κατακόρυφου άξονα, τόσο καλύτερη είναι η προσαρμοστική και η προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου. Ο δεύτερος τρόπος είναι η διαφορά των τυχαιοποιημένων τιμών  $R^2$  και  $Q^2$ · όσο μικρότερη είναι η διαφορά μεταξύ των δύο τιμών, τόσο μικρότερη είναι η διαφορά μεταξύ των δεδομένων που περιγράφονται και προβλέπονται από το μοντέλο αντίστοιχα, και άρα είναι καλύτερη η ποιότητα του μοντέλου [115]. Ουσιαστικά λοιπόν, εάν η ικανότητα πρόβλεψης του αρχικού μοντέλου είναι μεγαλύτερη από την ικανότητα πρόβλεψης οποιουδήποτε μοντέλου τυχαίων μεταβλητών  $y$ , τότε το μοντέλο είναι καλής ποιότητας, διαφορετικά μπορεί ο διαχωρισμός των ομάδων να οφείλεται σε υπέρ-προσαρμογή ή σε τυχαία συσχέτιση (Εικόνα 2.2 1).



**Εικόνα 2.2 1:** Διάγραμμα μεταθετικού ελέγχου σε μοντέλο PLS-DA. Το διάγραμμα (A) δείχνει ένα έγκυρο και το διάγραμμα (B) ένα υπέρ-προσαρμοσμένο μοντέλο PLS-DA [116].

### 2.2.3 Επιλογή των χαρακτηριστικών που συμβάλλουν στην ομαδοποίηση

Επόμενο βήμα της στατιστικής ανάλυσης των δεδομένων είναι η εύρεση των μεταβολιτών στους οποίους οφείλεται ο παρατηρούμενος διαχωρισμός των ομάδων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται τα VIP (variable importance in projection) scores κάθε μεταβλητής τα οποία λαμβάνονται από το μοντέλο PLS-DA. Το διάγραμμα VIP περιγράφει την σχέση των VIP scores στον άξονα Y με την αντίστοιχη μεταβλητή στον άξονα X. Γενικά προτιμάται η τιμή VIP να είναι αρκετά υψηλή και επιλέγονται κυρίως οι τιμές που είναι μεγαλύτερες του 1. Όσο υψηλότερη είναι η τιμή VIP, τόσο πιο σημαντική είναι η συμμετοχή του μεταβολίτη στην διάκριση των ομάδων [117], [118].

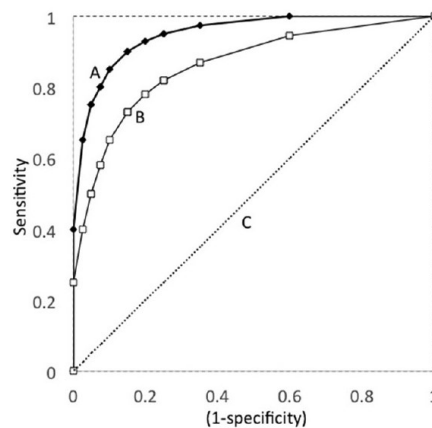
Για την εύρεση των στατιστικά σημαντικών μεταβολιτών χρησιμοποιείται και το S-plot, ένα διάγραμμα το οποίο απεικονίζει τη συνδιακύμανση και τη συσχέτιση μεταξύ των μεταβολιτών. Οι μεταβλητές που απέχουν περισσότερο από τον οριζόντιο άξονα του διαγράμματος είναι οι κύριες υπεύθυνες για τον διαχωρισμό, ενώ αυτές που απέχουν περισσότερο από τον κατακόρυφο άξονα είναι αυτές που συμβάλλουν περισσότερο στην ομαδοποίηση των δεδομένων [119].

Κατά τη στατιστική ανάλυση πραγματοποιούνται και μονοπαραμετρικές (univariate) μέθοδοι που μας παρέχουν τη δυνατότητα να μελετήσουμε τη σημαντικότητα του κάθε μεταβολίτη στην ομάδα ενδιαφέροντος. Η δοκιμασία t (t-test) εξετάζει αν οι μέσοι όροι ( $\mu$ ) των δύο ομάδων διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Για το t-test ισχύει ότι η μηδενική υπόθεση είναι  $H_0: \mu_{\text{group1}} = \mu_{\text{group2}}$  και η εναλλακτική υπόθεση είναι  $H_a: \mu_{\text{group1}} \neq \mu_{\text{group2}}$ . Μέτρο έκφρασης της σημαντικότητας είναι η τιμή p (p-value)· εάν η τιμή p για τη δοκιμή είναι μικρότερη από μια τιμή (συνήθως 0.05) που αντιστοιχεί σε οριζόμενη στάθμη εμπιστοσύνης, η μηδενική υπόθεση απορρίπτεται. Αντίθετα, αν η τιμή p είναι μεγαλύτερη από την ορισμένη τιμή τότε ισχύει η μηδενική υπόθεση και θεωρείται ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών για

τις δύο ομάδες. Επομένως, για  $p < 0.05$ , θεωρούμε ότι ο μεταβολίτης έχει την ικανότητα να συμβάλλει στη διαφοροποίηση των ομάδων [120]. Τέλος, κατά την μονοπαραμετρική στατιστική ανάλυση χρησιμοποιείται συχνά και η μέθοδος Ανάλυσης Διακύμανσης (Analysis Of Variance, ANOVA) προκειμένου να ελεγχθεί αν διαφέρουν οι μέσες τιμές περισσότερων από δύο πληθυσμών. Υπάρχουν δύο είδη ANOVA, η Ανάλυση Διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one-way ANOVA) και κατά δύο παράγοντες (two-way ANOVA). Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στην ανάλυση χρονοσειράς.

#### 2.2.4 Επικύρωση υποψήφιων βιοδεικτών

Η ανάπτυξη βιοδεικτών που είναι ειδικοί για ασθένειες είναι ιδιαίτερα σημαντική στις μεταβολομικές μελέτες. Η ανάλυση καμπύλης λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη (Receiver Operating Characteristic, ROC) είναι η πιο διαδεδομένη μεθοδολογία που χρησιμοποιείται στην επικύρωση βιοδεικτών όταν υπάρχουν δύο βιολογικές καταστάσεις (π.χ. υγιά και ασθενή πειραματόζωα) [121], [122]. Η καμπύλη ROC είναι η γραφική παράσταση της ευαισθησίας (αληθώς θετικό ποσοστό) συναρτήσει της ειδικότητας (ψευδώς θετικό ποσοστό) (Εικόνα 2.2 2). Το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη ROC που συμβολίζεται ως AUC (Area Under the Curve) αποτελεί έναν δείκτη διαχωρισμού των δύο εξεταζόμενων ομάδων. Όταν οι δύο αυτές κατανομές συμπίπτουν απόλυτα η τιμή του AUC είναι 0.5 και είναι η ελάχιστη που θα μπορούσε να πάρει. Αντίθετα, όταν η περιοχή αυτή έχει τιμή κοντά στο 1 τότε το μοντέλο ταξινόμησης είναι επιτυχημένο και χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα [123].



**Εικόνα 2.2 2:** Σύγκριση καμπυλών ROC με διαφορετικά AUC. Μοντέλο με (A) εξαιρετική διακριτική ικανότητα, (B) καλή διακριτική ικανότητα, (C) χωρίς διακριτική ικανότητα [124].

## 3.1 Φάσματα NMR

Με την φασματοσκοπία NMR μελετήθηκαν συνολικά 36 δείγματα, 18 υγιών προτύπων και 18 προτύπων λύκου σε ηλικίες 1, 3 και 6 μηνών. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται το σύνολο των μεταβολιτών που έχουν ανιχνευθεί και ταυτοποιηθεί, οι χημικές μετατοπίσεις καθώς και η πολλαπλότητα των κορυφών συντονισμού (Πίνακας 3.1 1). Επιπλέον, στην Εικόνα 3.1 1 και την Εικόνα 3.1 2 παρουσιάζονται χαρακτηριστικές περιοχές αντιπροσωπευτικού φάσματος 1D <sup>1</sup>H-NMR των υδατικών εκχυλισμάτων των νεφρών με την απόδοση των κορυφών.

*Πίνακας 3.1 1: Χημική μετατόπιση μεταβολιτών και πολλαπλότητα κορυφής.*

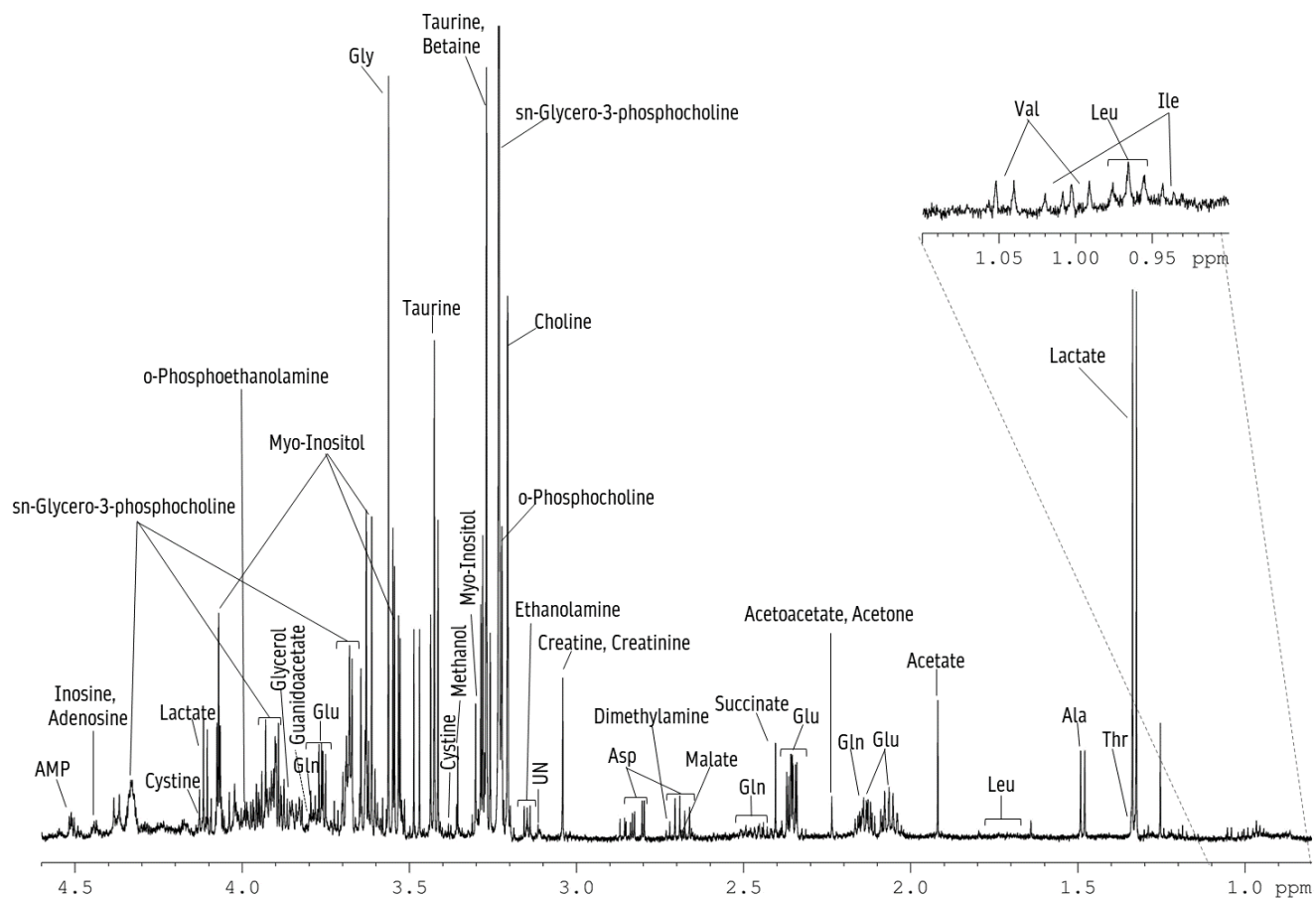
No	Metabolites	HMDB ID	KEGG ID	Chemical Shift (ppm) (Multiplicity)
<i>Amino Acids and derivatives</i>				
1	Alanine (Ala)	HMDB0000161	C00041	1.49 (d)
2	Aspartic Acid (Asp)	HMDB0000191	C00049	2.82 (dd); 2.68 (dd)
3	Betaine	HMDB0000043	C00719	3.90 (s); 3.27 (s)
4	Creatine	HMDB0000064	C00300	3.95 (s); 3.04 (s)
5	Creatinine	HMDB0000562	C00791	4.05 (s); 3.04 (s)
6	Cystine	HMDB0000192	C00491	4.11 (dd); 3.39(dd)
7	Glutamic Acid (Glu)	HMDB0000148	C00025	3.76 (q); 2.36 (m); 2.14 (m); 2.06 (m)
8	Glutamine (Gln)	HMDB0000641	C00064	3.78 (t); 2.47(m); 2.44 (m); 2.14 (m)
9	Glycine (Gly)	HMDB0000123	C00037	3.56 (s)
10	Guanidoacetic Acid	HMDB0000128	C00581	3.80 (s)
11	Histidine (His)	HMDB0000177	C00135	7.87 (bd); 7.09 (bs)
12	Isoleucine (Ile)	HMDB0000172	C00407	1.01 (d); 0.94 (t)
13	Leucine (Leu)	HMDB0000687	C00123	1.72 (m); 0.97 (d); 0.96 (d)
14	Phenylalanine (Phe)	HMDB0000159	C00079	7.44 (m); 7.38(m); 7.34 (m)
15	Taurine (Tau)	HMDB0000251	C00245	3.43 (t); 3.27 (t)
16	Threonine (Thr)	HMDB0000167	C00188	1.34 (d)
17	Tryptophan	HMDB0000929	C00078	7.55 (d)
18	Tyrosine (Tyr)	HMDB0000158	C00082	7.20 (d); 6.91 (d)
19	Valine (Val)	HMDB0000883	C00183	1.05 (d), 1.00 (d)
<i>Amines</i>				
20	Dimethylamine (DMA)*	HMDB0000087	C00543	2.72 (s)
21	Ethanolamine	HMDB0000149	C00189	3.83 (m); 3.15 (m)
22	O-Phosphoethanolamine (PE)	HMDB0000224	C00346	3.99 (m)



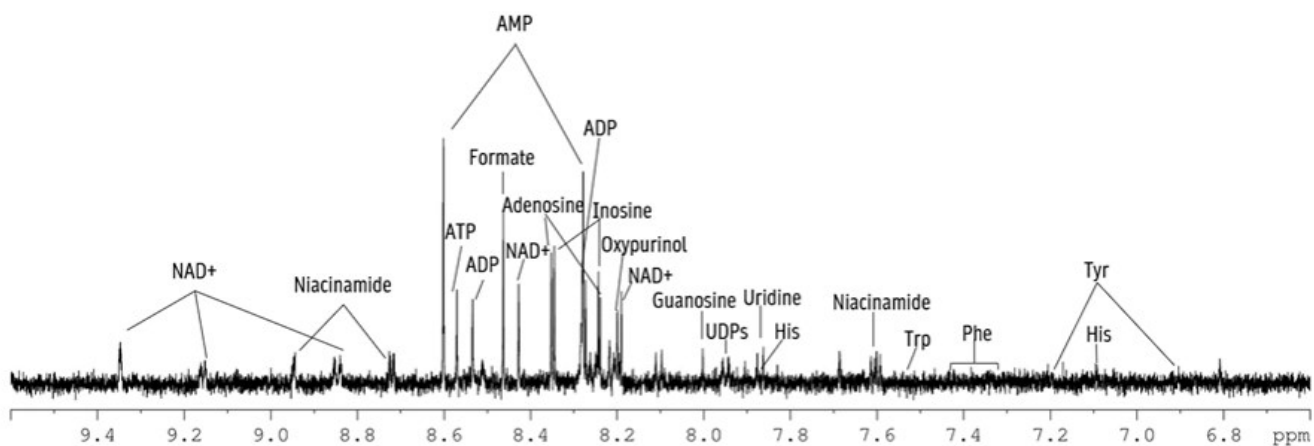
<i>Carbohydrates</i>				
23	Glucose	HMDB0000122	C00031	5.24 (d); 4.65 (d); 3.72 (m); 3.53 (t); 3.48 (t); 3.46 (m); 3.40 (m); 3.25 (dd)
24	Glycerol	HMDB0000131	C00116	3.66 (dd); 3.56 (dd)
<i>Ketone Bodies</i>				
25	Acetoacetic acid	HMDB0000060	C00164	2.23 (s)
<i>Cholines</i>				
26	Choline (Cho)	HMDB0000097	C00114	4.07 (m); 3.52 (m); 3.21 (s)
27	O-Phosphocholine (PC)	HMDB0001565	C00588	4.17 (m); 3.22 (s)
28	sn-Glycero-3-phosphocholine (GPC)	HMDB0000086	C00670	4.33 (m); 3.96 (m); 3.92 (m); 3.88(m); 3.69 (dd); 3.68 (m); 3.62 (dd); 3.23 (s)
<i>Purines, Pyrimidines</i>				
29	Adenosine	HMDB0000050	C00212	8.35 (s); 8.238 (s); 6.08 (d); 4.44 (m)
30	Adenosine diphosphate (ADP)	HMDB0001341	C00008	8.53 (s); 8.28 (s); 6.15 (d); 4.57 (m)
31	Adenosine monophosphate (AMP)	HMDB0000045	C00020	8.60 (s); 8.27 (s); 6.15 (d); 4.51 (m)
32	Adenosine triphosphate (ATP)	HMDB0000538	C00002	8.57 (s); 8.282 (s); 6.15 (d); 4.57(m)
33	Guanosine	HMDB0000133	C00387	8.00(s); 5.92(d)
34	Guanosine triphosphate (GTP)	HMDB0001273	C00044	5.94 (d)
35	Inosine	HMDB0000195	C00294	8.34 (s); 8.244 (s); 6.10 (d); 4.44 (m); 4.28 (m)
36	Niacinamide	HMDB0001406	C00153	8.95 (dd); 8.72 (dd); 8.26 (m); 7.60 (m)
37	Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD <sup>+</sup> )	HMDB0000902	C00003	9.35 (s); 9.16 (d); 8.85 (dt); 8.43 (s); 8.21 (td); 8.19 (s); 6.10 (d); 6.05 (d)
38	Oxypurinol	HMDB0000786	C07599	8.20 (s)
39	Uridine	HMDB0000296	C00299	7.87 (d); 5.92 (d); 5.91 (d)
40	Uridine Diphosphate (UDPs)	HMDB0000295	C00015	7.95 (d); 5.99 (d)
<i>Organic Acids</i>				
41	Acetic Acid	HMDB0000042	C00033	1.92(s)
42	Formic Acid	HMDB0000142	C00058	8.46 (s)
43	Fumaric Acid	HMDB0000134	C00122	6.52 (s)
44	Lactic Acid (Lac)	HMDB0000190	C00256	4.11 (q); 1.33 (d)
45	Malic Acid	HMDB0000156	C00149	4.30 (dd); 2.67 (dd); 2.37 (dd)
46	Succinic Acid	HMDB0000254	C00042	2.40 (s)
<i>Polyols</i>				
47	Myo-inositol	HMDB0000211	C00137	4.07 (t); 3.63 (t); 3.54 (dd); 3.29 (t)
<i>Alcohols</i>				
48	Acetone	HMDB0001659	C00207	2.23 (s)
49	Methanol	HMDB0001875	C00132	3.355 (s)

s: singlet (απλή)/ d: doublet (διπλή)/ t: triplet (τριπλή)/ dd: doublet of doublets (διπλή διπλών)/ td: triplet of doublets (τριπλή διπλών)/ m: multiple (πολλαπλή)/ bs: broad single (ευρεία απλή)/ bd: broad doublet (ευρεία διπλή). \*tentative





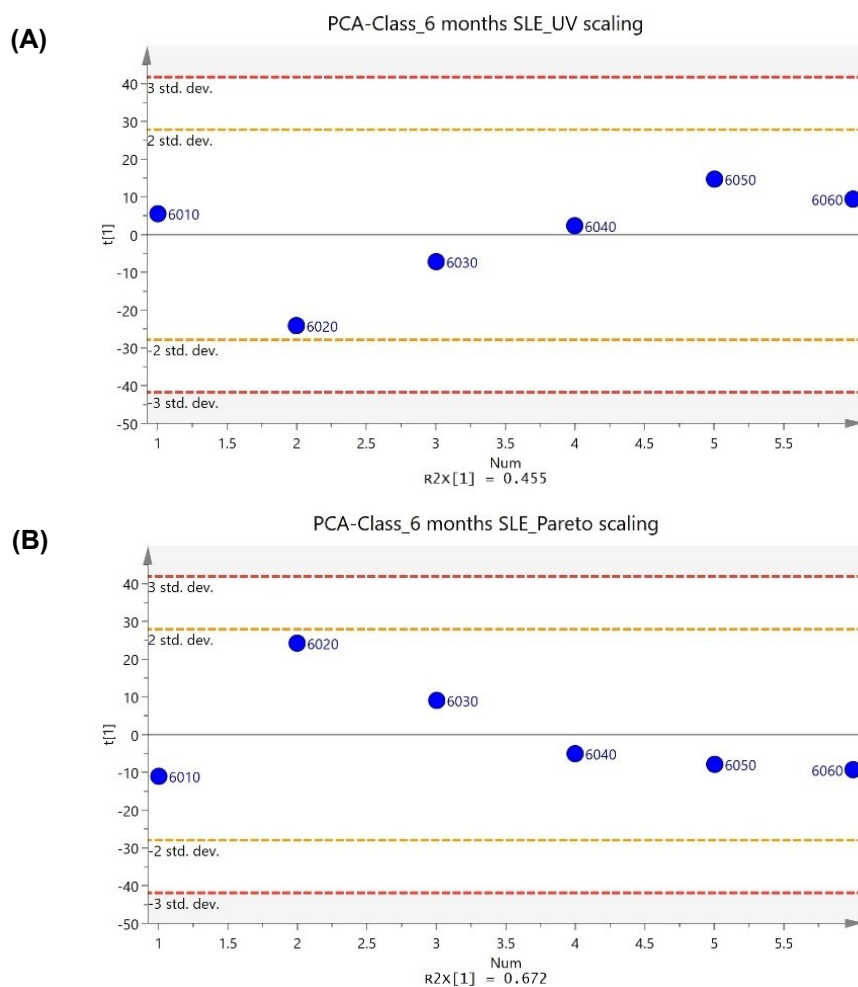
**Εικόνα 3.1 1:** Αλειφατική περιοχή (4.60-0.80 ppm) αντιπροσωπευτικού φάσματος 1D  $^1\text{H-NMR}$  των υδατικών εκχυλισμάτων των υγίων προτύπων ηλικίας 3 μηνών σε  $\text{D}_2\text{O}$ , pH 7.5, στους 305 K. Στο φάσμα φαίνεται η απόδοση των μεταβολιτών.



**Εικόνα 3.1 2:** Αρωματική περιοχή (9.60-6.60 ppm) αντιπροσωπευτικού φάσματος 1D  $^1\text{H-NMR}$  των υδατικών εκχυλισμάτων των υγίων προτύπων ηλικίας 3 μηνών σε  $\text{D}_2\text{O}$ , pH 7.5, στους 300 K. Στο φάσμα φαίνεται η απόδοση των μεταβολιτών. Το φάσμα παρουσιάζεται σε μεγέθυνση x4 σε σχέση με την αλειφαρική περιοχή.

### 3.2 Στατιστική Ανάλυση Δεδομένων NMR

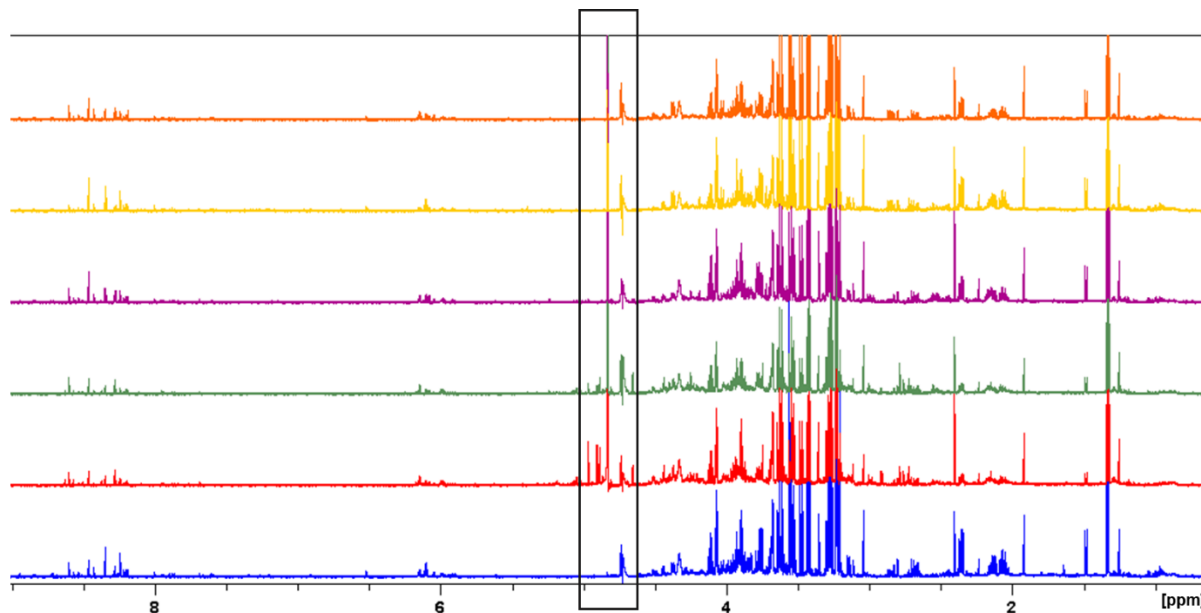
Αρχικά, στα δεδομένα που εξήχθησαν έπειτα από τη διαδικασία του bucketing, εφαρμόστηκε στην ομάδα των προτύπου λύκου (SLE) ηλικίας 6 μηνών το μοντέλο PCA-class της πολυπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης μέσω του λογισμικού SIMCA v. 14.1. Λόγω ορισμένων διαφορών που εντοπίζονταν μεταξύ των δειγμάτων αυτής της ομάδας - η διαφοροποίηση εμφανιζόταν κυρίως στα δείγματα 6020, 6030 συγκριτικά με τα δείγματα της υπόλοιπης ομάδας – ελέγχθηκε αν κάποιο από αυτά διαφοροποιείται σημαντικά (outlier).



**Εικόνα 3.2 1:** Διάγραμμα αντικειμένων PCA-class (A) με κλίμακα UV ( $R^2X_{(cum)} = 0.455$ ,  $Q^2_{(cum)} = 0.139$ ) και (B) με κλίμακα Pareto ( $R^2X_{(cum)} = 0.672$ ,  $Q^2_{(cum)} = 0.405$ ) για την ομάδα προτύπων λύκου ηλικίας 6 μηνών.

Όπως προκύπτει από τα μοντέλα της PCA-class (Εικόνα 3.2 1), τα δείγματα 6020 και 6030 είναι εντός των επιτρεπόμενων ορίων ( $\pm 2$  επί της τυπικής απόκλισης) της ομάδας, επομένως δεν επιλέχθηκε η αφαίρεσή τους. Οι ίδιες κορυφές που παρατηρούνται στα δείγματα νεφρών 6020 και 6030 εντοπίζονται και στα εκχυλίσματα των εγκεφάλων των αντιστοίχων δειγμάτων, γεγονός που

επιβεβαιώνει ότι προκειται για μόλυνση και γι αυτόν τον λόγο αυτή η περιοχή των φασμάτων αφαιρέθηκε από όλα τα δείγματα. Στα υπόλοιπα δείγματα η συγκεκριμένη περιοχή του φάσματος δεν περιέχει κορυφές συντονισμού. Γι αυτόν τον λόγο αφαιρέθηκε συνολικά η περιοχή 4.60-5.05 ppm από όλα τα φάσματα (Εικόνα 3.2 2).

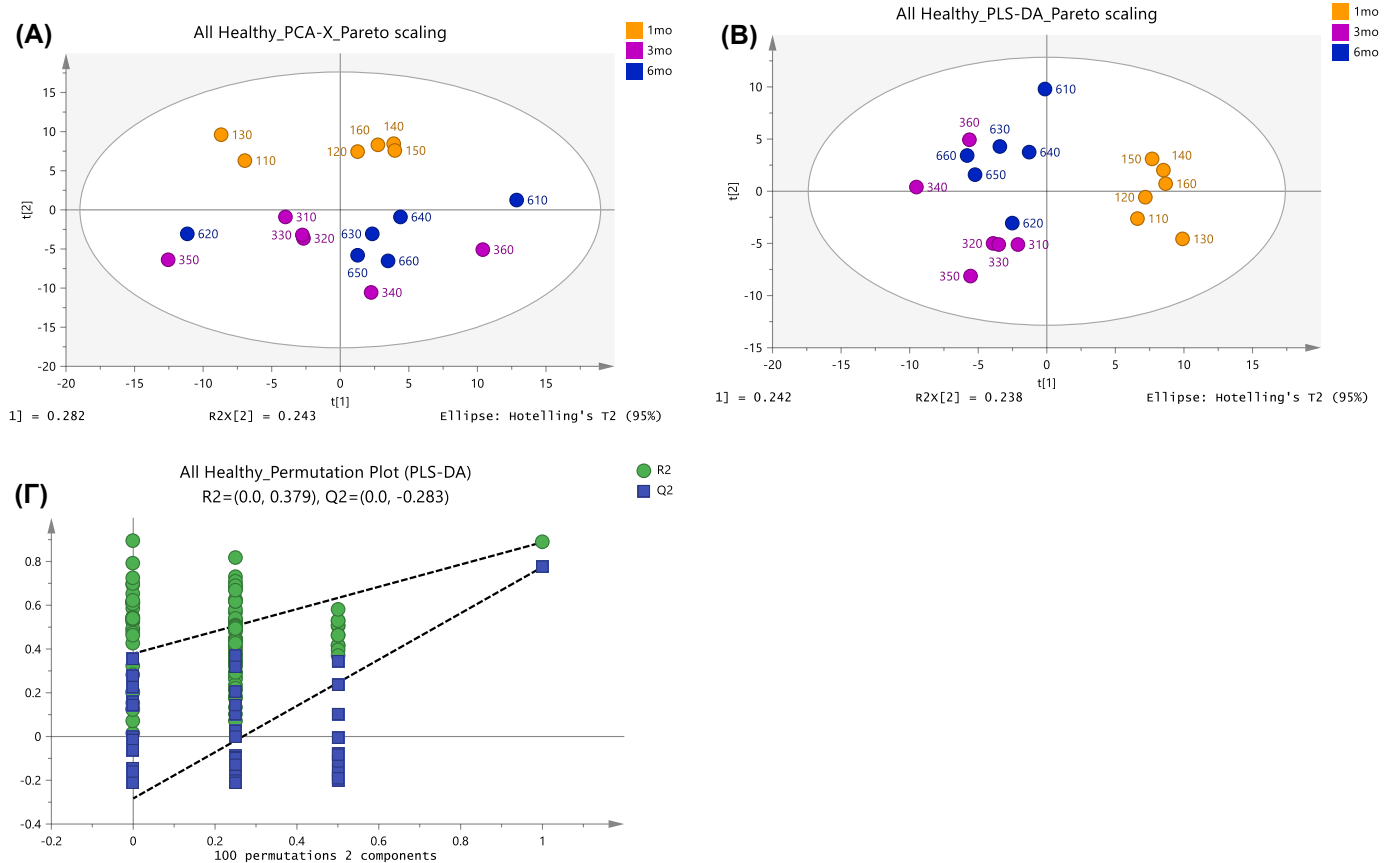


**Εικόνα 3.2 2:** Φάσματα 1D <sup>1</sup>H-NMR των υδατικών εκχυλισμάτων της ομάδας των προτύπων λύκου (SLE) ηλικίας 6 μηνών σε D<sub>2</sub>O, pH 7.5, στους 300 K, από όπου αφαιρέθηκε η επιλεγμένη περιοχή (4.60-5.05 ppm).

### 3.2.1 Μελέτη χρονοσειράς υγιών προτύπων (Healthy) και προτύπων λύκου (SLE)

#### 3.2.1.1 Πολυπαραμετρική Ανάλυση

Στα δεδομένα που εξήχθησαν έπειτα από τη διαδικασία του bucketing και της κανονικοποίησης, εφαρμόστηκε πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση μέσω του λογισμικού SIMCA v. 14.1. Πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις μεταξύ των διαφορετικών ηλικιών της ομάδας των υγιών προτύπων και των προτύπων λύκου ξεχωριστά. Τελικά έγινε επιλογή των καταλληλότερων μοντέλων (βάσει των αποτελεσμάτων διασταυρούμενης επικύρωσης (cross validation, CV), και από αυτά παρουσιάζονται παρακάτω τα αντίστοιχα διαγράμματα για τα υγιή πρότυπα (Εικόνα 3.2 3 έως Εικόνα 3.2 6) και τα πρότυπα λύκου (Εικόνα 3.2 7 έως Εικόνα 3.2 10).



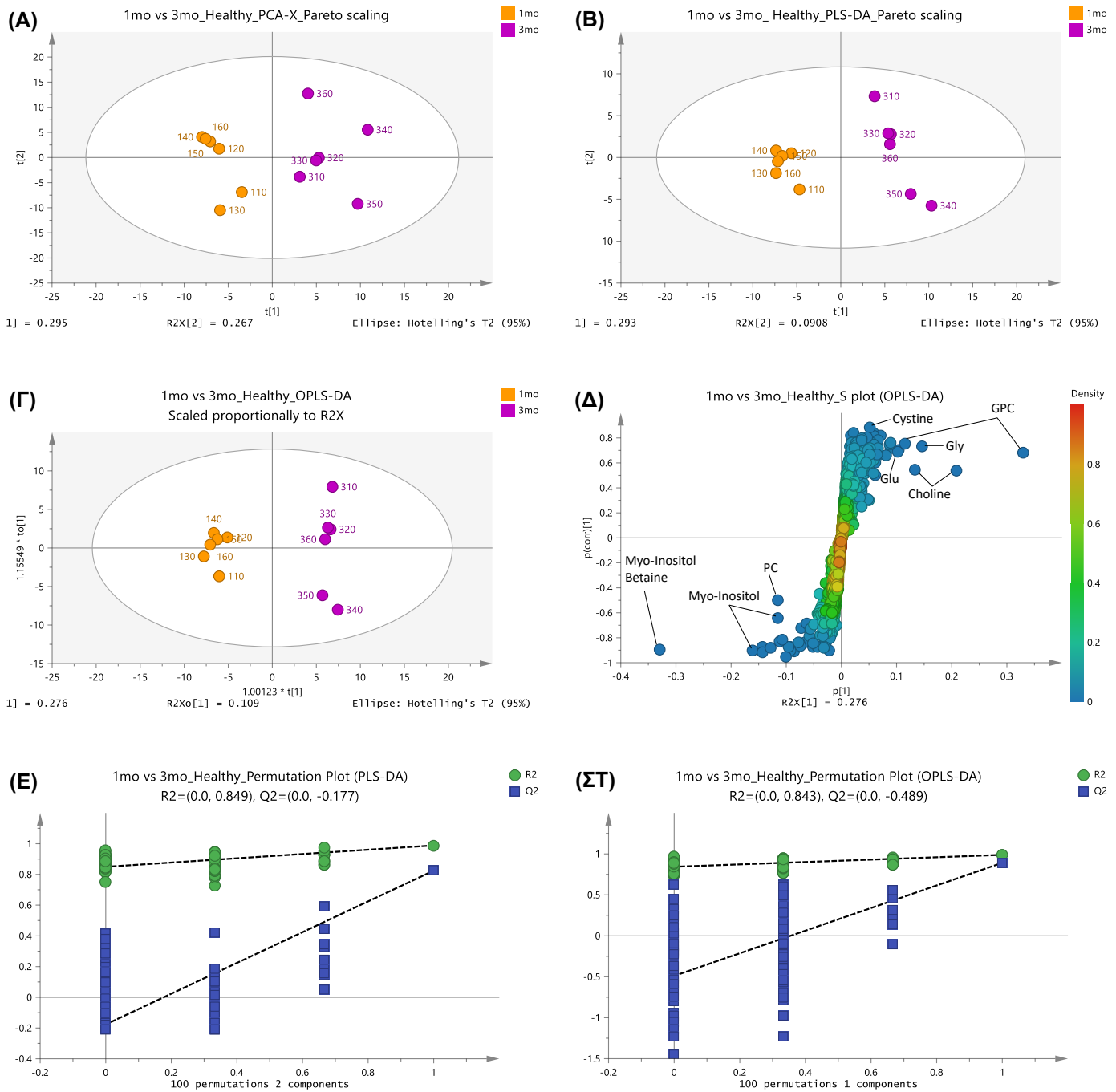
**Εικόνα 3.2 3:** Πολυπαραμετρική ανάλυση των μεταβολιτών πολικών εκχυλισμάτων νεφρών της ομάδας των υγιών προτύπων (Healthy) ηλικιών 1 μήνα (πορτοκαλί χρώμα), 3 μηνών (μωβ χρώμα) και 6 μηνών (μπλε χρώμα). (A) Διάγραμμα αντικειμένων PCA με κλίμακα Pareto με 6 κύριες συνιστώσες ( $R^2X_{(cum)}= 0.747$ ,  $Q^2_{(cum)}= 0.522$ ). (B) Διάγραμμα αντικειμένων PLS-DA με κλίμακα Pareto με 3 κύριες συνιστώσες ( $R^2X_{(cum)}= 0.534$ ,  $R^2Y_{(cum)}= 0.605$ ,  $Q^2_{(cum)}= 0.413$ ). (C) Μεταθετικός έλεγχος με 100 τυχαίες μεταθέσεις επιτρεπόμενες για το μοντέλο PLS-DA με κλίμακα Pareto.

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα PCA που περιλαμβάνει όλες τις ηλικίες των υγιών προτύπων (Εικόνα 3.2 3), έχει επιτευχθεί ένας καλός διαχωρισμός μεταξύ των ομάδων 1 μήνα με 3 μηνών και 1 μήνα με 6 μηνών· δεν επιτυγχάνεται όμως διαχωρισμός μεταξύ 3 μηνών με 6 μηνών. Η πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση συνεχίστηκε με την εφαρμογή της επιβλεπόμενης μεθόδου PLS-DA που επιβεβαιώνει την παρατήρηση αυτή.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν οι επιμέρους αναλύσεις ανά ζεύγη μηνών, 1-3, 3-6 και 1-6 για τα υγιή πρότυπα.

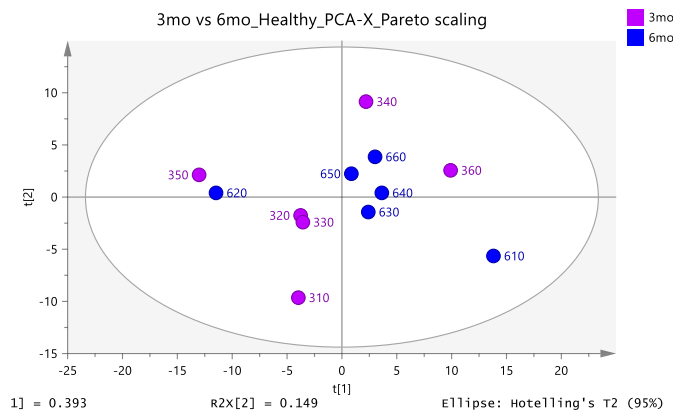
Από τις αναλύσεις των ηλικιών 1-3 (Εικόνα 3.2 4), παρατηρούμε μία πολύ καλή διαφοροποίηση των δύο ηλικιών από το διάγραμμα αντικειμένων PCA ενώ προκύπτει σαφής διαχωρισμός τους στα διαγράμματα PLS-DA και OPLS-DA με κλιμάκωση Pareto. Από τους μεταθετικούς ελέγχους (100 τυχαίες μεταθέσεις) για την επικύρωση των μοντέλων PLS-DA και OPLS-DA της πολυπαραμετρικής ανάλυσης, και τα δύο μοντέλα χαρακτηρίζονται αξιόπιστα.

Από το μοντέλο PLS-DA υπολογίστηκαν οι τιμές VIP, προκειμένου να εντοπιστούν οι μεταβολίτες εκείνοι που συμβάλλουν στον παρατηρούμενο διαχωρισμό των ομάδων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Παράρτημα 1 (Πίνακας Π.1 1). Ακολούθως, από το μοντέλο OPLS-DA κατασκευάστηκε το διάγραμμα S, στο οποίο φαίνονται οι μεταβολίτες που συμβάλλουν στη διαφοροποίηση των ηλικιών 1 μήνα και 3 μηνών στα υγιή πρότυπα.



**Εικόνα 3.2.4:** Πολυπαραμετρική ανάλυση των μεταβολιτών πολικών εκχυλισμάτων νεφρών της ομάδας των υγιών προτύπων (Healthy) ηλικιών 1 μήνα (πορτοκαλί χρώμα) και 3 μηνών (μωβ χρώμα). (A) Διάγραμμα αντικειμένων PCA με κλίμακα Pareto με 2 κύριες συνιστώσες ( $R^2X_{(cum)}=0.562$ ,  $Q^2_{(cum)}=0.172$ ). (B) Διάγραμμα αντικειμένων PLS-DA με κλίμακα Pareto με 2 κύριες συνιστώσες ( $R^2X_{(cum)}=0.384$ ,  $R^2Y_{(cum)}=0.989$ ,  $Q^2_{(cum)}=0.825$ ). (Γ) Διάγραμμα αντικειμένων OPLS-DA ( $R^2X_{(cum)}=0.384$ ,  $R^2Y_{(cum)}=0.989$ ,  $Q^2_{(cum)}=0.891$ ) με το αντίστοιχο (Δ) διάγραμμα S όπου αναγράφονται οι μεταβολίτες που συμβάλλουν στη διαφοροποίηση των ομάδων. (E) Μεταθετικός έλεγχος με 100 τυχαίες μεταθέσεις επιτρεπόμενες για το μοντέλο PLS-DA με κλίμακα Pareto και (ΣΤ) για το μοντέλο OPLS-DA.

Ακολουθήσε η επιμέρους ανάλυση των ηλικιών 3-6 μηνών. Από το παρακάτω διάγραμμα PCA (Εικόνα 3.2 5) επιβεβαιώνεται ότι τα δεδομένα των ηλικιών 3 μηνών και 6 μηνών δε διαχωρίζονται στην πολυπαραμετρική ανάλυση.

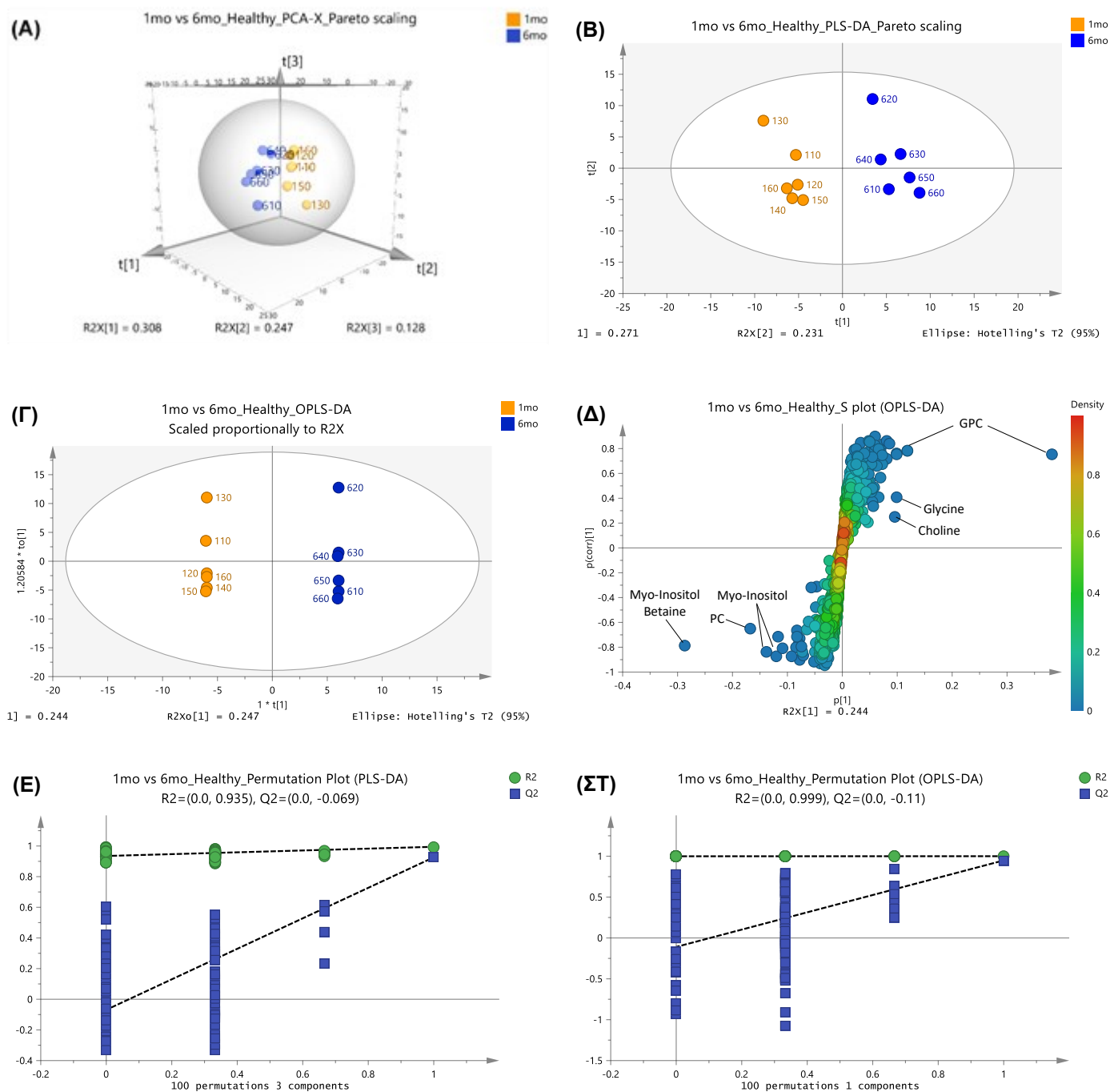


**Εικόνα 3.2 5:** Διάγραμμα αντικειμένων PCA με κλίμακα Pareto με 3 κύριες συνιστώσες ( $R^2X_{(cum)}= 0.668$ ,  $Q^2_{(cum)}= 0.254$ ) των ηλικιών 3 μηνών (μωβ χρώμα) και 6 μηνών (μπλε χρώμα) της ομάδας των υγιών προτύπων (Healthy).

Τέλος, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση των ηλικιών 1-6 μηνών (Εικόνα 3.2 6). Παρατηρούμε μία πολύ καλή διαφοροποίηση των δύο ηλικιών από το διάγραμμα αντικειμένων PCA ενώ προκύπτει σαφής διαχωρισμός τους στα διαγράμματα PLS-DA και OPLS-DA με κλιμάκωση Pareto. Από τους μεταθετικούς ελέγχους (100 τυχαίες μεταθέσεις) για την επικύρωση των μοντέλων PLS-DA και OPLS-DA της πολυπαραμετρικής ανάλυσης, και τα δύο μοντέλα μπορούν να χαρακτηριστούν αξιόπιστα.

Από το μοντέλο PLS-DA υπολογίστηκαν οι τιμές VIP, προκειμένου να εντοπιστούν οι μεταβολίτες εκείνοι που συμβάλλουν στον παρατηρούμενο διαχωρισμό των ομάδων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Παράρτημα 1 (Πίνακας Π.1 2). Ακολούθως, από το μοντέλο OPLS-DA κατασκευάστηκε το διάγραμμα S, στο οποίο φαίνονται οι μεταβολίτες που συμβάλλουν στη διαφοροποίηση των ηλικιών 1 μήνα και 6 μηνών στα υγιή πρότυπα.

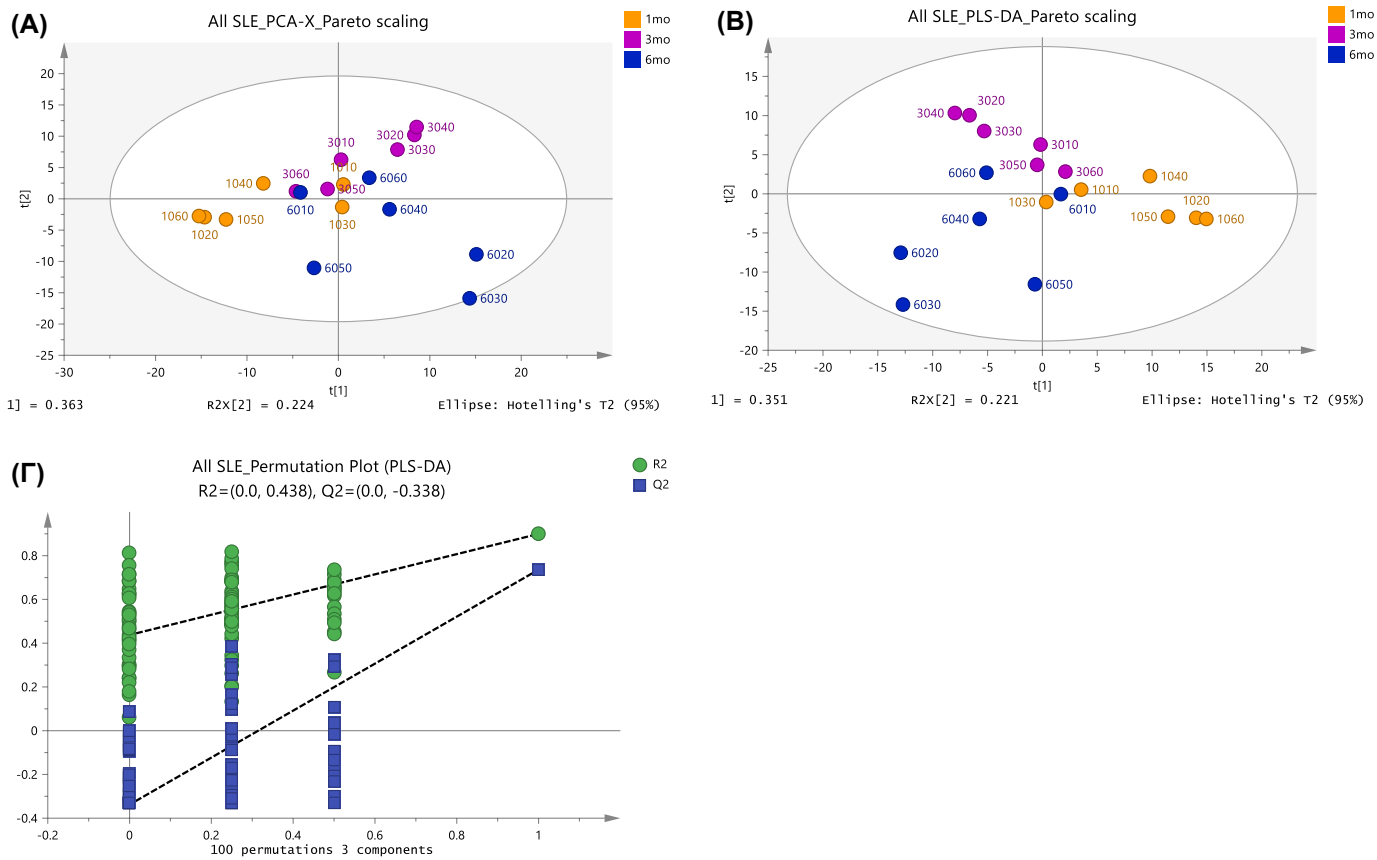




**Εικόνα 3.2.6:** Πολυπαραμετρική ανάλυση των μεταβολιτών πολικών εκχυλισμάτων νεφρών της ομάδας των υγιών προτύπων (Healthy) ηλικιών 1 μήνα (πορτοκαλί χρώμα) και 6 μηνών (μπλε χρώμα). (A) Διάγραμμα αντικειμένων PCA με κλίμακα Pareto με 4 κύριες συνιστώσες ( $R^2X_{(cum)} = 0.779$ ,  $Q^2_{(cum)} = 0.335$ ). (B) Διάγραμμα αντικειμένων PLS-DA με κλίμακα Pareto με 3 κύριες συνιστώσες ( $R^2X_{(cum)} = 0.627$ ,  $R^2Y_{(cum)} = 0.995$ ,  $Q^2_{(cum)} = 0.926$ ). (Γ) Διάγραμμα αντικειμένων OPLS-DA ( $R^2X_{(cum)} = 0.856$ ,  $R^2Y_{(cum)} = 1$ ,  $Q^2_{(cum)} = 0.948$ ) με το αντίστοιχο (Δ) διάγραμμα S όπου αναγράφονται οι μεταβολίτες που συμβάλλουν στη διαφοροποίηση των ομάδων. (E) Μεταθετικός έλεγχος με 100 τυχαίες μεταθέσεις επιτρεπόμενες για το μοντέλο PLS-DA με κλίμακα Pareto και (ΣΤ) για το μοντέλο OPLS-DA.

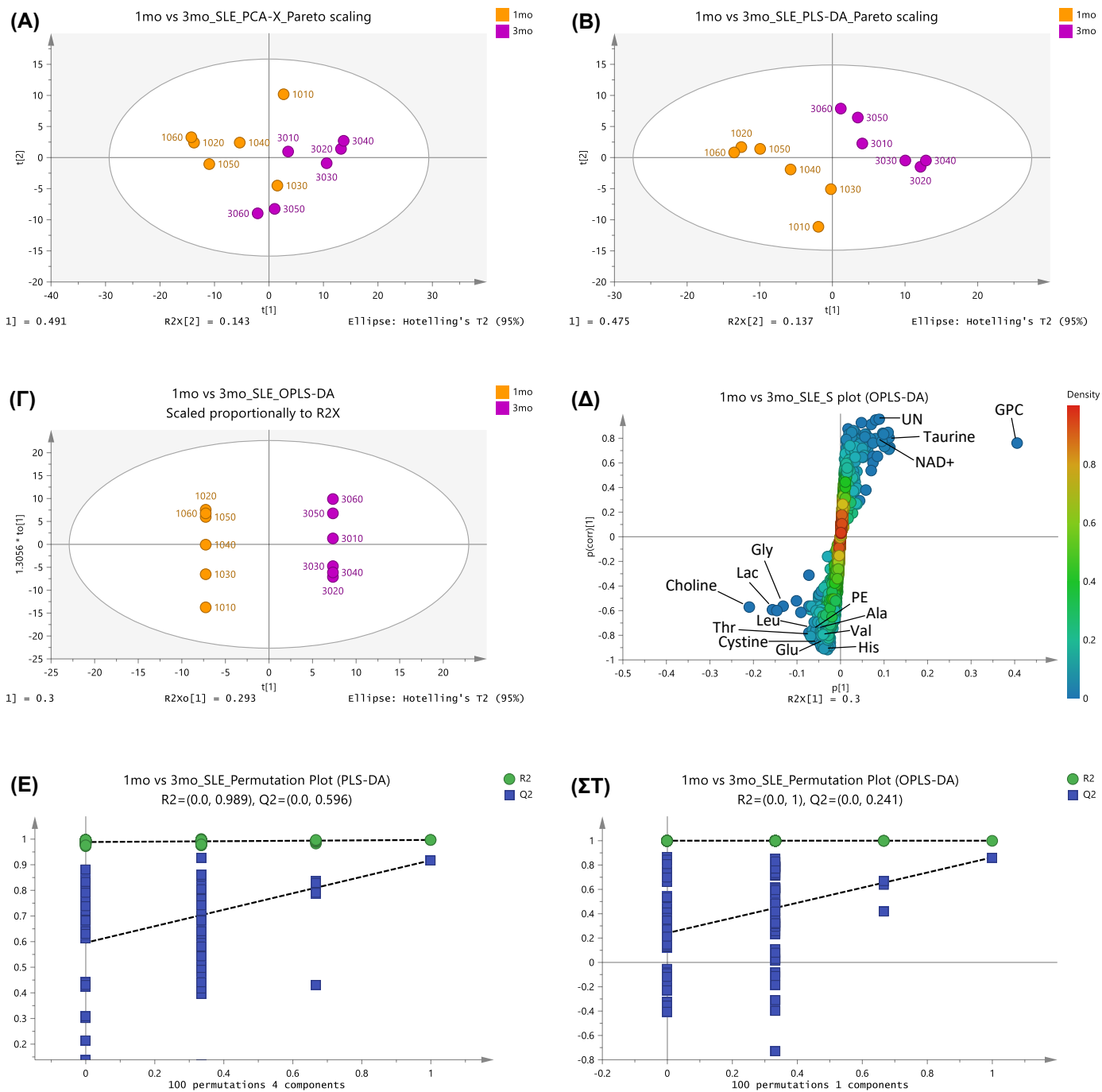
Η πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τον ίδιο τρόπο και για τις διαφορετικές ηλικίες των προτύπων λύκου (SLE), ώστε να διαπιστωθεί ποιοι μεταβολίτες συμβάλλουν στο διαχωρισμό κατά τα διαφορετικά χρονικά στάδια εξέλιξης της νόσου.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η ανάλυση για όλες τις ηλικίες των προτύπων λύκου (Εικόνα 3.2 7), όπου από το διάγραμμα PLS-DA φαίνεται η ηλικία του 1 μήνα να διαφοροποιείται από τις άλλες δύο ηλικίες. Η επικύρωση του μοντέλου PLS-DA πραγματοποιήθηκε με μεταθετικό έλεγχο 100 τυχαίων μεταθέσεων, και το μοντέλο θεωρείται αξιόπιστο.



**Εικόνα 3.2 7:** Πολυπαραμετρική ανάλυση των μεταβολιτών πολικών εκχυλισμάτων νεφρών της ομάδας των προτύπων λύκου (SLE) ηλικιών 1 μήνα (πορτοκαλί χρώμα), 3 μηνών (μωβ χρώμα) και 6 μηνών (μπλε χρώμα). (Α) Διάγραμμα αντικειμένων PCA με κλίμακα Pareto με 3 κύριες συνιστώσες ( $R^2X_{(cum)} = 0.686$ ,  $Q^2_{(cum)} = 0.463$ ). (Β) Διάγραμμα αντικειμένων PLS-DA με κλίμακα Pareto με 3 κύριες συνιστώσες ( $R^2X_{(cum)} = 0.668$ ,  $R^2Y_{(cum)} = 0.763$ ,  $Q^2_{(cum)} = 0.576$ ). (Γ) Μεταθετικός έλεγχος με 100 τυχαίες μεταθέσεις επιτρεπόμενες για το μοντέλο PLS-DA με κλίμακα Pareto.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν οι επιμέρους αναλύσεις ανά ζεύγη μηνών, 1-3, 3-6 και 1-6 για τα πρότυπα λύκου.



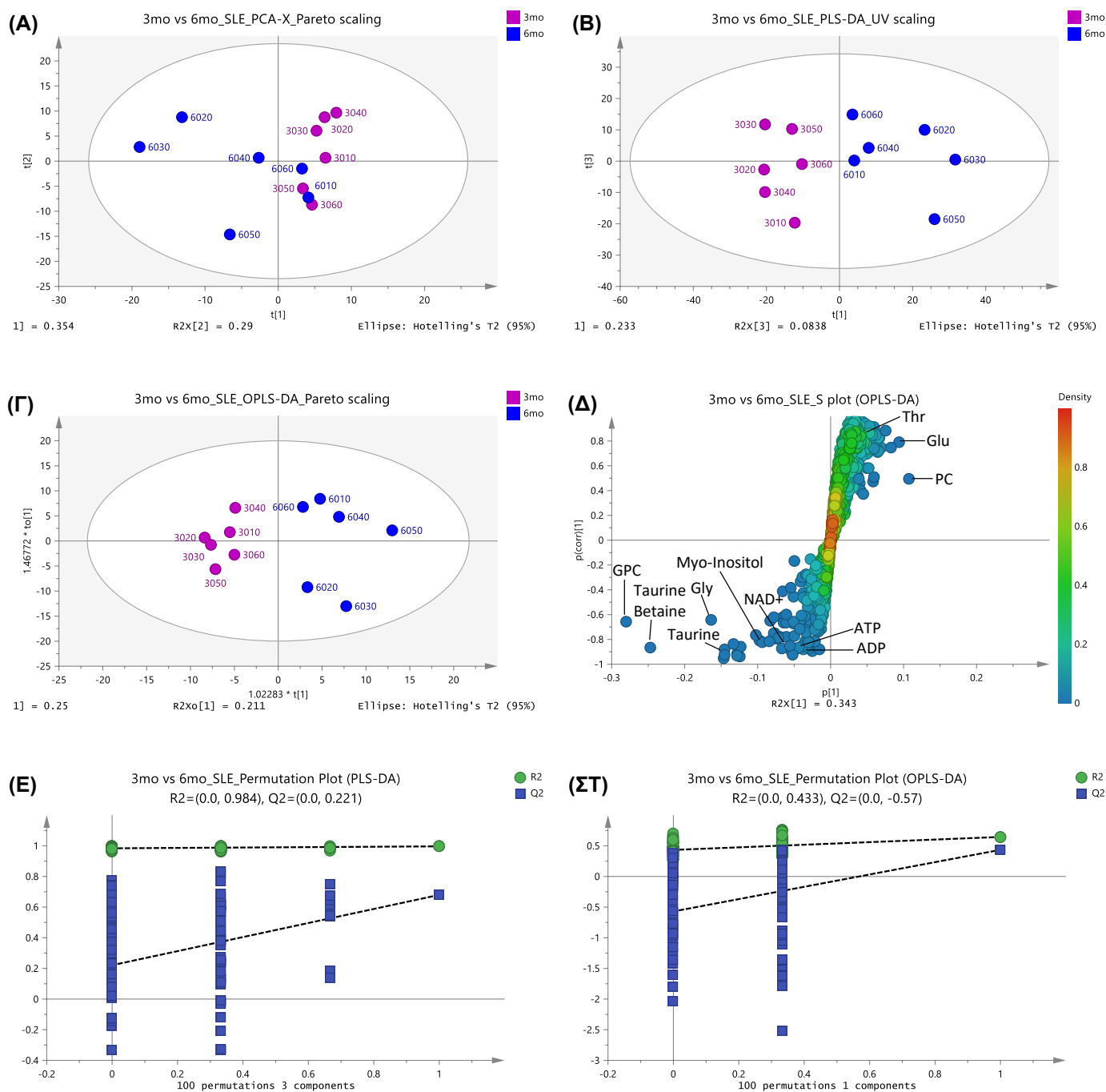
**Εικόνα 3.28:** Πολυπαραμετρική ανάλυση των μεταβολιτών πολικών εκχυλισμάτων νεφρών της ομάδας των προτύπων λύκου (SLE) ηλικιών 1 μήνα (πορτοκαλί χρώμα) και 3 μηνών (μωβ χρώμα). (Α) Διάγραμμα αντικειμένων PCA με κλίμακα Pareto με 2 κύριες συνιστώσες ( $R^2X_{(cum)}=0.634$ ,  $Q^2_{(cum)}=0.422$ ). (Β) Διάγραμμα αντικειμένων PLS-DA με κλίμακα Pareto με 4 κύριες συνιστώσες ( $R^2X_{(cum)}=0.768$ ,  $R^2Y_{(cum)}=0.997$ ,  $Q^2_{(cum)}=0.917$ ). (Γ) Διάγραμμα αντικειμένων OPLS-DA ( $R^2X_{(cum)}=0.880$ ,  $R^2Y_{(cum)}=1$ ,  $Q^2_{(cum)}=0.863$ ) με το αντίστοιχο (Δ) διάγραμμα S όπου αναγράφονται οι μεταβολίτες που συμβάλλουν στη διαφοροποίηση των ομάδων. (Ε) Μεταθετικός έλεγχος με 100 τυχαίες μεταθέσεις επιτρεπόμενες για το μοντέλο PLS-DA με κλίμακα Pareto και (ΣΤ) για το μοντέλο OPLS-DA.

Από τις παραπάνω αναλύσεις των ηλικιών 1-3 μηνών (Εικόνα 3.2 8), παρατηρούμε μία καλή διαφοροποίηση των δύο ηλικιών από το διάγραμμα αντικειμένων PCA ενώ προκύπτει σαφής διαχωρισμός τους στα διαγράμματα PLS-DA και OPLS-DA με κλιμάκωση Pareto. Από τους μεταθετικούς ελέγχους (100 τυχαίες μεταθέσεις) για την επικύρωση των μοντέλων PLS-DA και OPLS-DA της πολυπαραμετρικής ανάλυσης προκύπτει κακή προβλεπτική ικανότητα για τα δύο μοντέλα, επομένως δεν κρίνονται έγκυρα.

Από το μοντέλο PLS-DA υπολογίστηκαν οι τιμές VIP, προκειμένου να εντοπιστούν οι μεταβολίτες εκείνοι που συμβάλλουν στον παρατηρούμενο διαχωρισμό των ομάδων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Παράρτημα 1 (Πίνακας Π.1 3). Ακολούθως, από το μοντέλο OPLS-DA κατασκευάστηκε το διάγραμμα S, στο οποίο φαίνονται οι μεταβολίτες που συμβάλλουν στη διαφοροποίηση των ηλικιών 1 μήνα και 3 μηνών στα πρότυπα του λύκου.

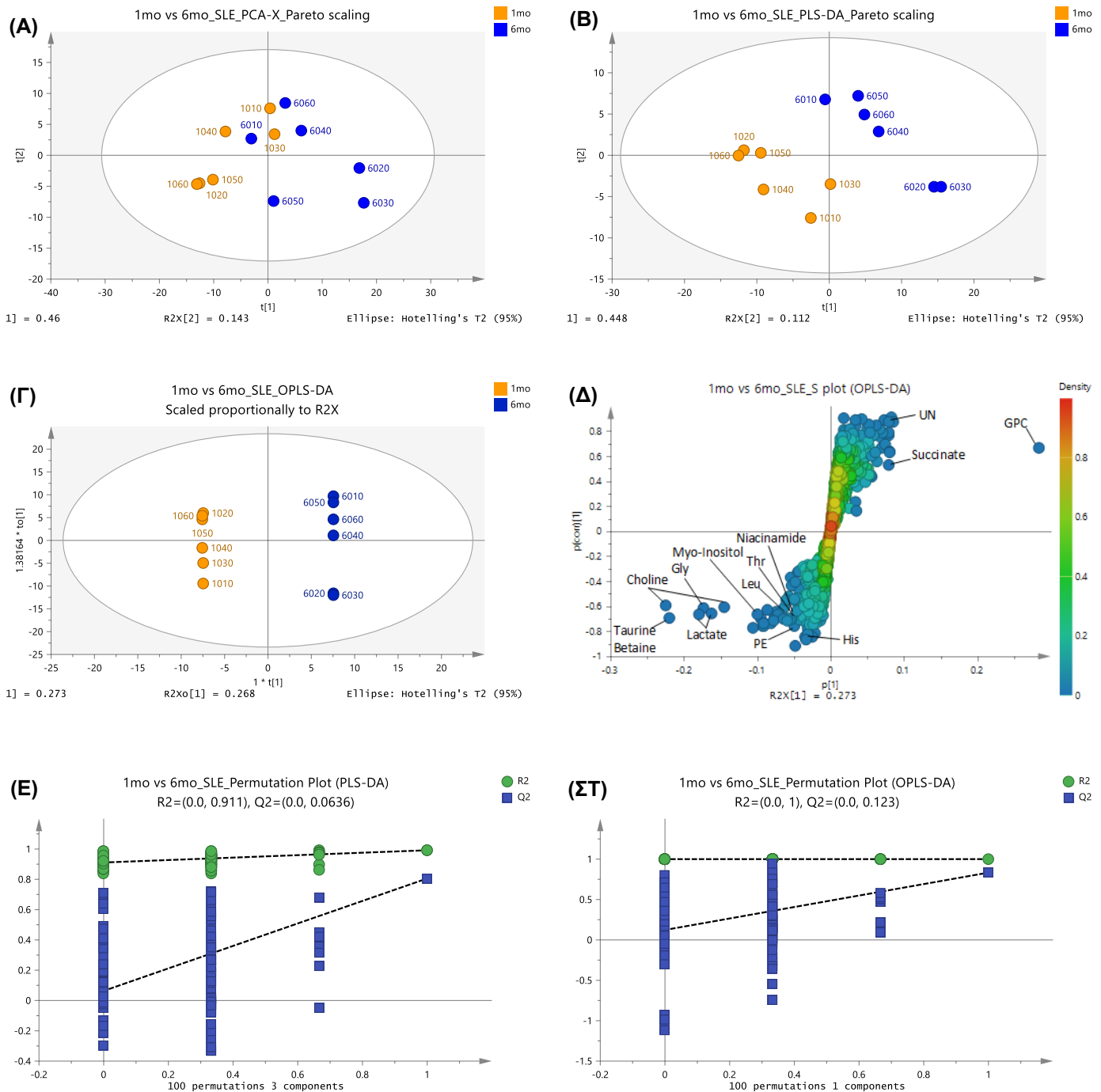
Συνεχίζουμε με την επιμέρους ανάλυση των ηλικιών 3-6 μηνών στα πρότυπα του λύκου (Εικόνα 3.2 9), όπου παρατηρούμε μία τάση διαφοροποίησης των δύο ηλικιών από το διάγραμμα αντικειμένων PCA ενώ προκύπτει σαφής διαχωρισμός τους στα διαγράμματα PLS-DA και OPLS-DA. Από τους μεταθετικούς ελέγχους (100 τυχαίες μεταθέσεις) για την επικύρωση των μοντέλων PLS-DA και OPLS-DA της πολυπαραμετρικής ανάλυσης, κανένα από τα δύο μοντέλα δεν κρίνεται έγκυρο.

Από το μοντέλο PLS-DA υπολογίστηκαν οι τιμές VIP, προκειμένου να εντοπιστούν οι μεταβολίτες εκείνοι που συμβάλλουν στον παρατηρούμενο διαχωρισμό των ομάδων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Παράρτημα 1 (Πίνακας Π.1 4). Ακολούθως, από το μοντέλο OPLS-DA κατασκευάστηκε το διάγραμμα S, στο οποίο φαίνονται οι μεταβολίτες που συμβάλλουν στη διαφοροποίηση των ηλικιών 3 μηνών και 6 μηνών στα πρότυπα του λύκου.



**Εικόνα 3.2 9:** Πολυπαραμετρική ανάλυση των μεταβολιτών πολικών εκχυλισμάτων νεφρών της ομάδας των προτύπων λύκου (SLE) ηλικιών 3 μηνών (μωβ χρώμα) και 6 μηνών (μπλε χρώμα). (Α) Διάγραμμα αντικειμένων PCA με κλίμακα Pareto με 2 κύριες συνιστώσες ( $R^2X_{(cum)}=0.644$ ,  $Q^2_{(cum)}=0.399$ ). (Β) Διάγραμμα αντικειμένων PLS-DA με κλίμακα UV με 3 κύριες συνιστώσες ( $R^2X_{(cum)}=0.418$ ,  $R^2Y_{(cum)}=0.996$ ,  $Q^2_{(cum)}=0.680$ ). (Γ) Διάγραμμα αντικειμένων OPLS-DA ( $R^2X_{(cum)}=0.460$ ,  $R^2Y_{(cum)}=0.860$ ,  $Q^2_{(cum)}=0.421$ ) με το αντίστοιχο (Δ) διάγραμμα S όπου αναγράφονται οι μεταβολίτες που συμβάλλουν στη διαφοροποίηση των ομάδων. (Ε) Μεταθετικός έλεγχος με 100 τυχαίες μεταθέσεις επιτρεπόμενες για το μοντέλο PLS-DA με κλίμακα UV και (ΣΤ) για το μοντέλο OPLS-DA.

Τέλος, ακολουθεί η ανάλυση των ηλικιών 1-6 μηνών για τα πρότυπα του λύκου.



**Εικόνα 3.2 10:** Πολυπαραμετρική ανάλυση των μεταβολιτών πολικών εκχυλισμάτων νεφρών της ομάδας των προτύπων λύκου (SLE) 1 μήνα (πορτοκαλί χρώμα) και 6 μηνών (μπλε χρώμα). (Α) Διάγραμμα αντικειμένων PCA με κλίμακα Pareto με 3 κύριες συνιστώσες ( $R^2X_{(cum)} = 0.725$ ,  $Q^2_{(cum)} = 0.395$ ). (Β) Διάγραμμα αντικειμένων PLS-DA με κλίμακα Pareto 3 κύριες συνιστώσες ( $R^2X_{(cum)} = 0.641$ ,  $R^2Y_{(cum)} = 0.992$ ,  $Q^2_{(cum)} = 0.806$ ). (Γ) Διάγραμμα αντικειμένων OPLS-DA ( $R^2X_{(cum)} = 0.902$ ,  $R^2Y_{(cum)} = 1$ ,  $Q^2_{(cum)} = 0.833$ ) με το αντίστοιχο (Δ) διάγραμμα S όπου αναγράφονται οι μεταβολίτες που συμβάλλουν στη διαφοροποίηση των ομάδων. (Ε) Μεταθετικός έλεγχος με 100 τυχαίες μεταθέσεις επιτρεπόμενες για το μοντέλο PLS-DA με κλίμακα UV και (ΣΤ) για το μοντέλο OPLS-DA.

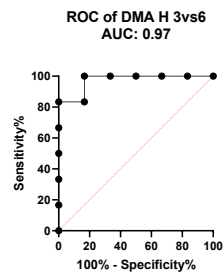
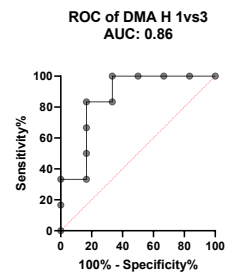
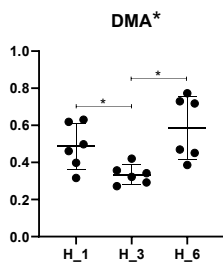
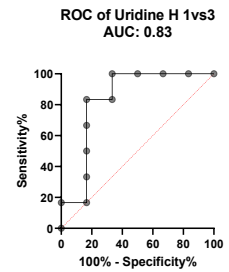
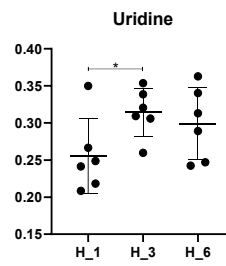
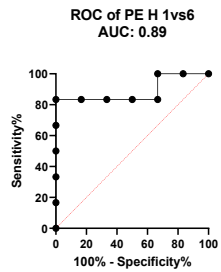
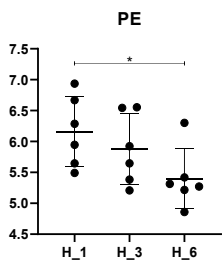
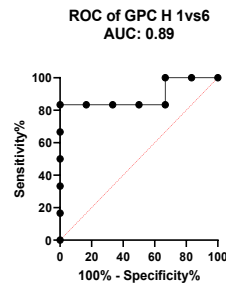
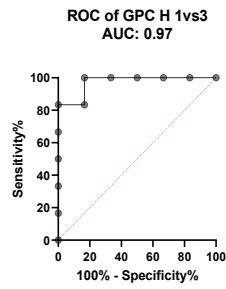
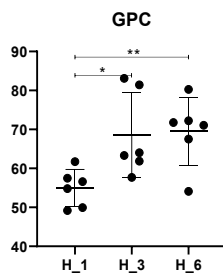
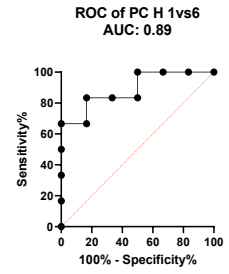
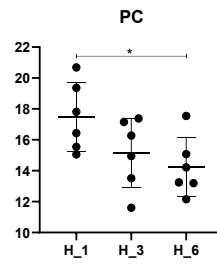
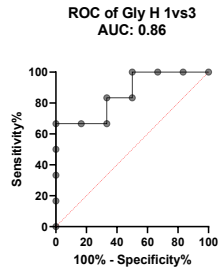
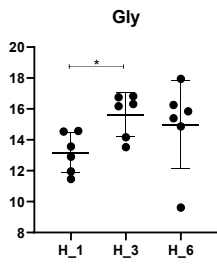
Παρατηρούμε μία πολύ καλή διαφοροποίηση των δύο ηλικιακών ομάδων από το διάγραμμα αντικειμένων PCA ενώ προκύπτει σαφής διαχωρισμός τους στα διαγράμματα PLS-DA και OPLS-DA με κλιμάκωση Pareto (Εικόνα 3.2 10). Από τους μεταθετικούς ελέγχους (100 τυχαίες μεταθέσεις) για την επικύρωση των μοντέλων PLS-DA και OPLS-DA της πολυπαραμετρικής ανάλυσης, και τα δύο μοντέλα μπορούν να χαρακτηριστούν αξιόπιστα.

Από το μοντέλο PLS-DA υπολογίστηκαν οι τιμές VIP, προκειμένου να εντοπιστούν οι μεταβολίτες εκείνοι που συμβάλλουν στον παρατηρούμενο διαχωρισμό των ηλικιακών ομάδων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Παράρτημα 1 (Πίνακας Π.1 5). Ακολούθως, από το μοντέλο OPLS-DA κατασκευάστηκε το διάγραμμα S, στο οποίο φαίνονται οι μεταβολίτες που συμβάλλουν στη διαφοροποίηση των ηλικιών 1 μήνα και 6 μηνών στα πρότυπα του λύκου.

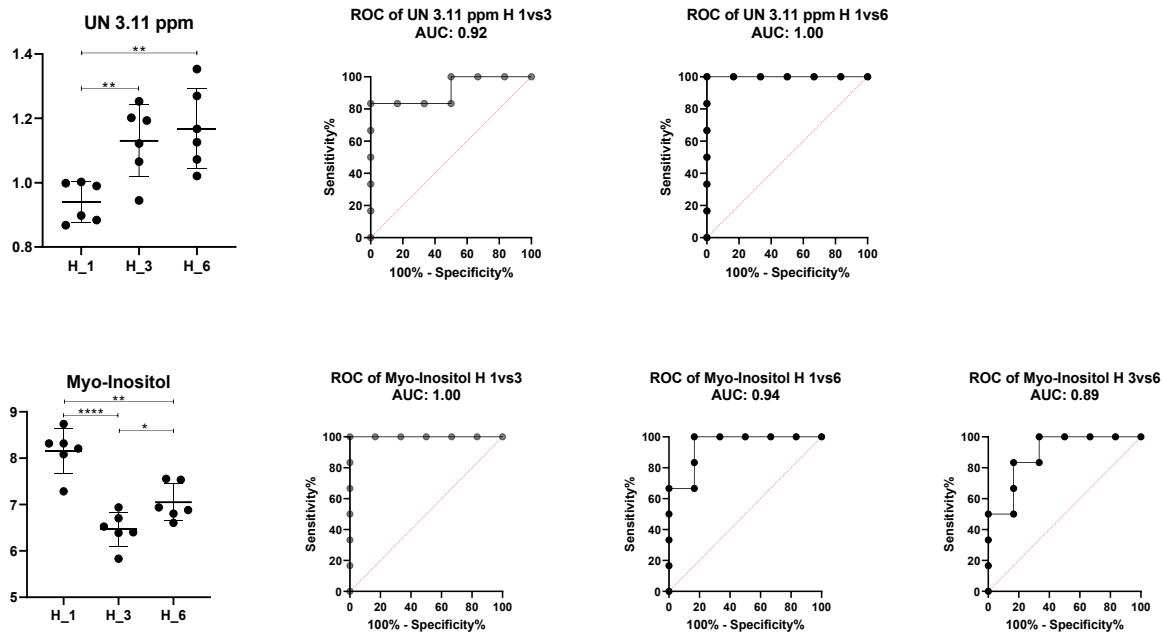
### 3.2.1.2 Μονοπαραμετρική Ανάλυση

Ακολούθησε μονοπαραμετρική στατιστική ανάλυση της διακύμανσης των σχετικών μεταβολών των συγκεντρώσεων των μεταβολιτών μέσω του λογισμικού GraphPad Prism 8.3.0, ώστε να διαπιστωθεί αν είναι στατιστικά σημαντικές οι διαφορές των μεταβολιτών που φαίνονται να συνεισφέρουν στο διαχωρισμό των ηλικιακών ομάδων τόσο στα υγιή πρότυπα, όσο και στα πρότυπα του λύκου.

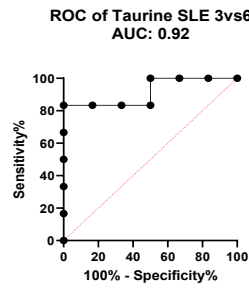
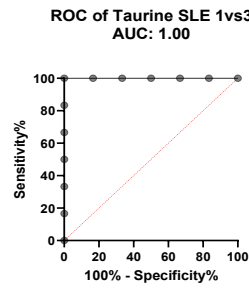
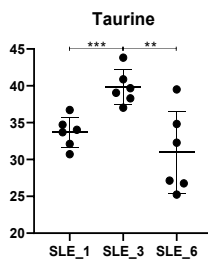
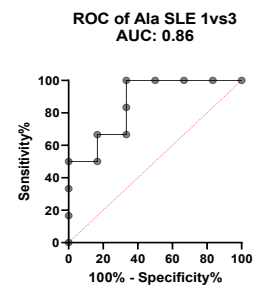
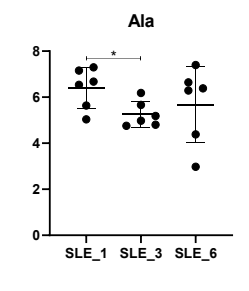
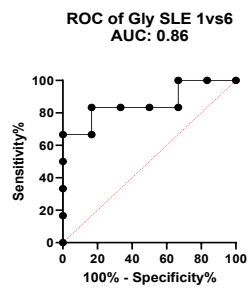
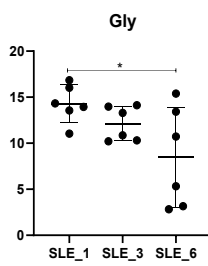
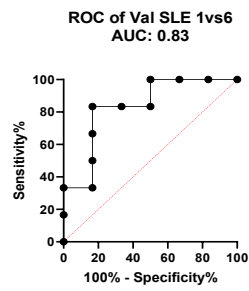
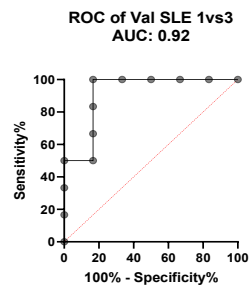
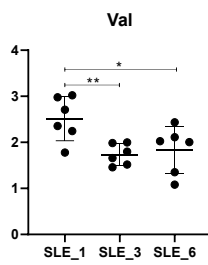
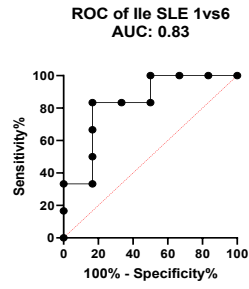
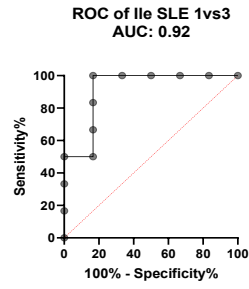
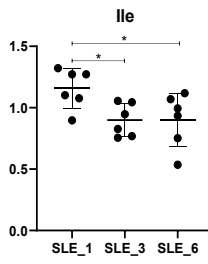
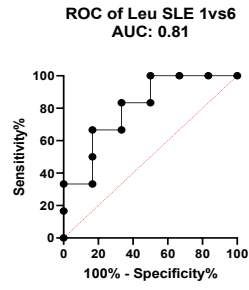
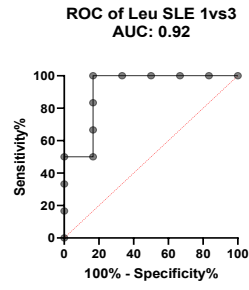
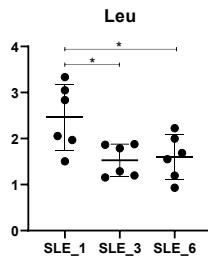
Αρχικά πραγματοποιήθηκε έλεγχος κανονικότητας (normality test) της κατανομής των τιμών του κάθε μεταβολίτη με τις μεθόδους Shapiro-Wilk και Kolmogorov-Smirnov με  $\alpha=0.05$ . Ακολούθησε έλεγχος ύπαρξης έκτροπων τιμών με τις μεθόδους ROUT (Q=1%) και Grubbs ( $\alpha=0.05$ ). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία t με τη διόρθωση Welch (Welch's t-test) που χρησιμοποιείται στις περιπτώσεις τιμών με άνισες διακυμάνσεις. Τέλος, κατασκευάστηκαν τα θηκογράμματα καθώς και τα αντίστοιχα ROC curves για την αξιολόγηση των υποψήφιων βιοδεικτών, τα οποία παρουσιάζονται παρακάτω για τους στατιστικά σημαντικούς μεταβολίτες όπως αυτοί προέκυψαν από την ανάλυση χρονοσειράς για τα υγιή (Εικόνα 3.2 11) και για τα πρότυπα λύκου (Εικόνα 3.2 12).

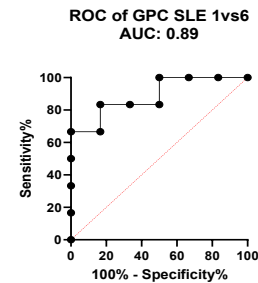
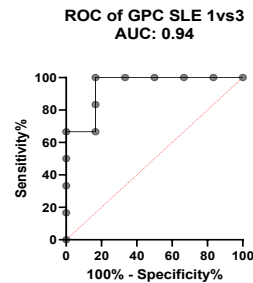
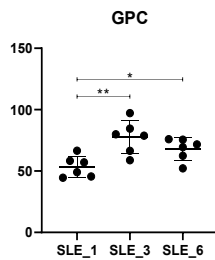
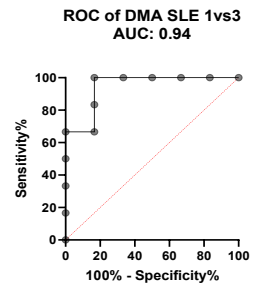
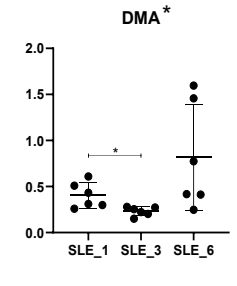
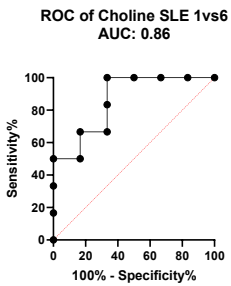
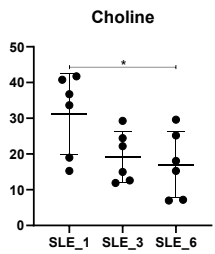
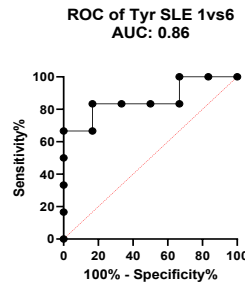
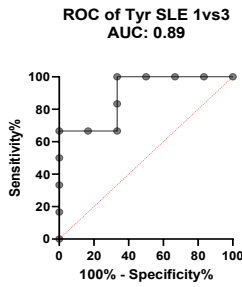
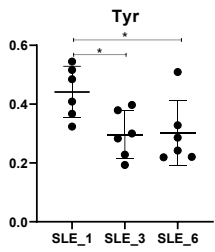
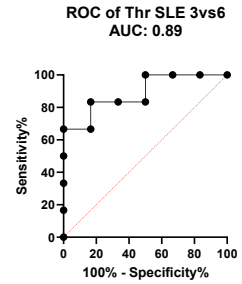
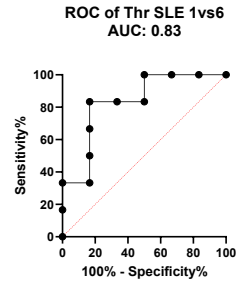
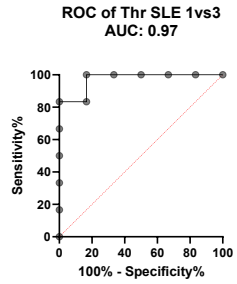
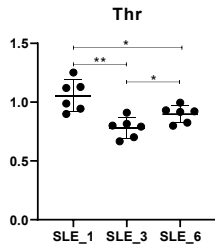
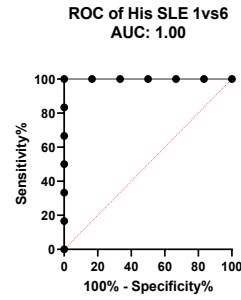
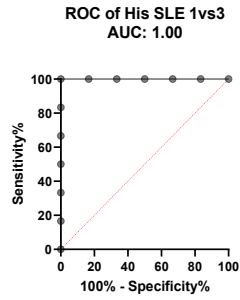
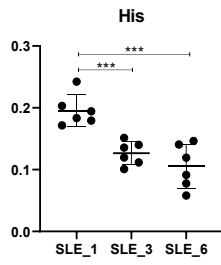


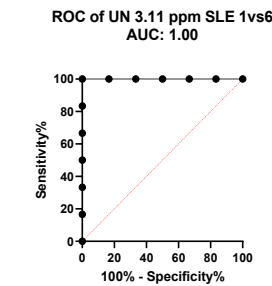
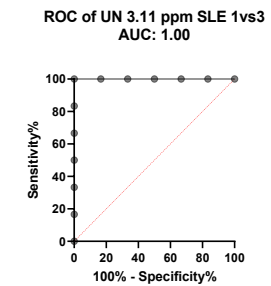
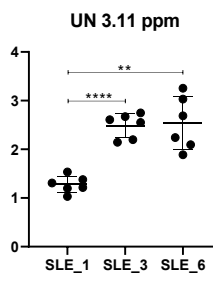
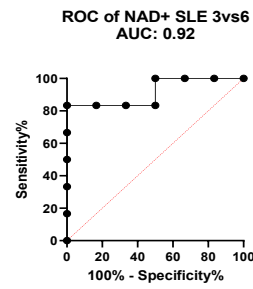
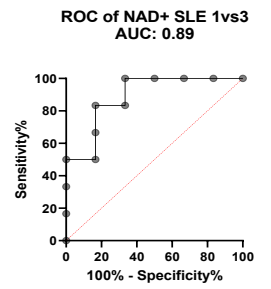
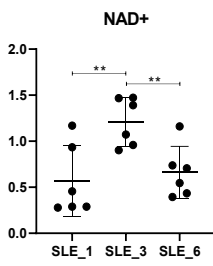
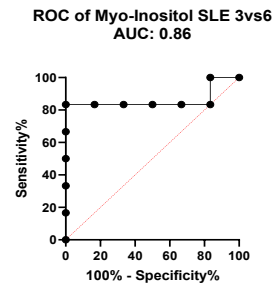
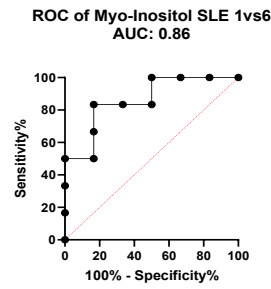
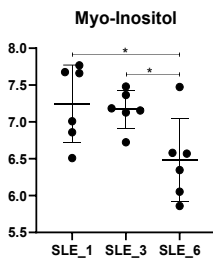
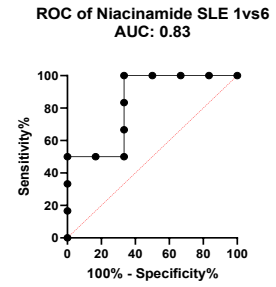
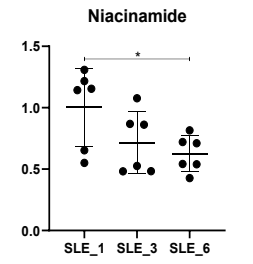
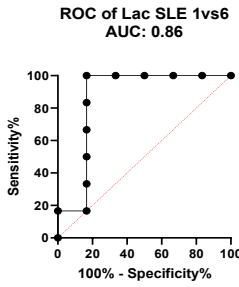
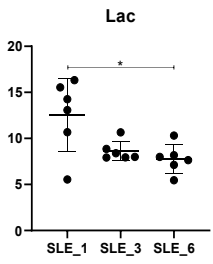
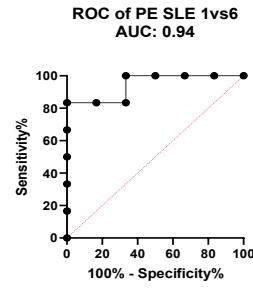
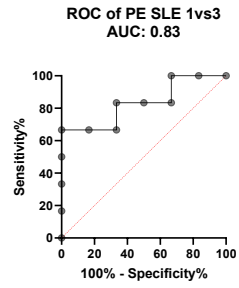
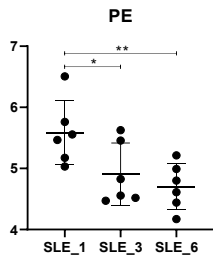


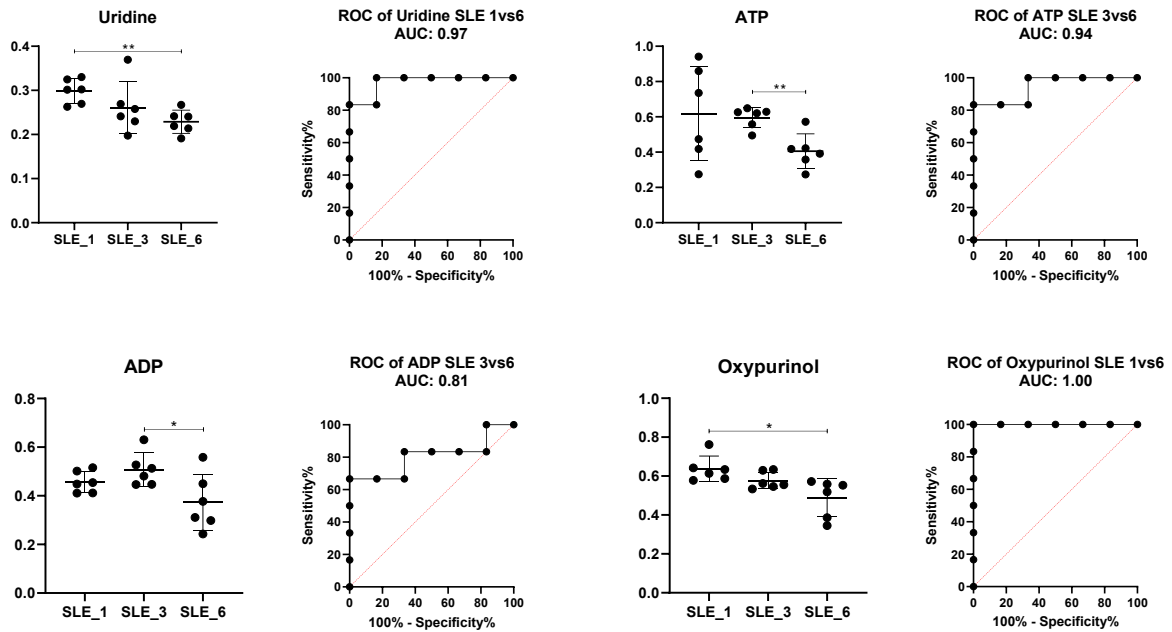


**Εικόνα 3.2 11:** Αντιπροσωπευτικά θηκογράμματα και καμπύλες ROC για επιλεγμένους μεταβολίτες, οι οποίοι παρουσιάζουν στατιστική σημασία (Welch's t-test) στην ανάλυση χρονοσειράς της ομάδας των υγιών προτύπων (H). Οι τιμές p μικρότερες από 0.05 θεωρήθηκαν σημαντικές. (\*\*\*\* $p \leq 0.0001$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \* $p \leq 0.05$ ). \*tentative









**Εικόνα 3.2 12:** Αντιπροσωπευτικά θηκογράμματα και καμπύλες ROC για επιλεγμένους μεταβολίτες, οι οποίοι παρουσιάζουν στατιστική σημασία (Welch's t-test) στην ανάλυση χρονοσειράς της ομάδας των προτύπων λύκου (SLE). Οι τιμές p μικρότερες από 0.05 θεωρήθηκαν σημαντικές. (\*\*\*p ≤ 0.0001; \*\*p ≤ 0.001; \*p ≤ 0.01; \*tentative

## Συνολική Αξιολόγηση Αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα τις πολυπαραμετρικής και μονοπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης συνοψίζονται παρακάτω για τα υγιή (Πίνακας 3.2 1) και τα πρότυπα λύκου (Πίνακας 3.2 2), αντίστοιχα. Δεδομένου ότι τα μοντέλα της πολυπαραμετρικής ανάλυσης τόσο της ομάδας των υγιών προτύπων όσο και των προτύπων λύκου στα ζεύγη ηλικιών 1-3 μηνών και 3-6 μηνών δεν κρίνονται αξιόπιστα έπειτα από τους μεταθετικούς ελέγχους, δημιουργήθηκε ο Πίνακας 3.2 3 με τα z-scores όλων των μεταβολιτών για την ανάλυση των ηλικιών 1-6 μηνών τόσο για την ομάδα των υγιών προτύπων όσο και των προτύπων λύκου.

Ο Πίνακας 3.2 3, εκτός από την πληροφορία για τις τιμές των z-scores και τη στατιστική σημαντικότητα, βοηθά στην οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων με τη χρήση χρωματικού κώδικα, όπου τα κόκκινα κελιά ανήκουν στους μεταβολίτες που εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα, ενώ τα μπλε σε αυτούς που εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα στην κάθε ομάδα.

**Πίνακας 3.2 1:** Μεταβολίτες στους οποίους παρατηρείται στατιστικά σημαντική μεταβολή με την ηλικία στα υγιή πρότυπα. Ανά ζεύγη μηνών, 1-3, 3-6 και 1-6, σημειώνεται η μεταβολή από το S plot (τα σύμβολα ↑ και ↓ δηλώνουν αύξηση και μείωση αντίστοιχα, των επιπέδων του μεταβολίτη), η τιμή p, η τιμή VIP και το fold change. Η τιμή p προέκυψε από το Welch's t-test. Η τιμή VIP προήλθε από την επιβλεπόμενη πολυπαραμετρική ανάλυση (PLS-DA).

Class	Metabolites	Healthy											
		1mo vs 3mo				3mo vs 6mo				1mo vs 6mo			
		S plot	P value	VIP	Fold change (3mo/1mo)	S plot	P value	VIP	Fold change (6mo/3mo)	S plot	P value	VIP	Fold change (6mo/1mo)
Amino Acids	Glycine (Gly)	↑3mo	0.01	5.8	1.2	-	-	-	-	-	-	-	-
Amines	Dimethylamine (DMA)*	↓3mo	0.03	1.7	0.7	↑6mo	0.01	-	1.8	-	-	-	-
	O-Phosphoethanolamine (PE)	-	-	-	-	-	-	-	-	↓6mo	0.03	2.0	0.9
Cholines	O-Phosphocholine (PC)	-	-	-	-	-	-	-	-	↓6mo	0.02	7.0	0.8
	sn-Glycero-3-phosphocholine (GPC)	↑3mo	0.03	13	1.2	-	-	-	-	↑6mo	0.01	16	1.3
Pyrimidines	Uridine	↑3mo	0.04	1.6	1.2	-	-	-	-	-	-	-	-
Polyols	Myo-Inositol	↓3mo	<0.0001	6.9	0.8	↑6mo	0.02	-	1.1	↓6mo	0.002	4.5	0.9
	UN	↑3mo	0.007	1.3	1.2	-	-	-	-	↑6mo	0.005	1.7	1.2

\*tentative

**Πίνακας 3.2 2:** Μεταβολίτες στους οποίους παρατηρείται στατιστικά σημαντική μεταβολή με την ηλικία στα πρότυπα λύκου. Ανά ζεύγη μηνών, 1-3, 3-6 και 1-6, σημειώνεται η μεταβολή από το S plot (τα σύμβολα ↑ και ↓ δηλώνουν αύξηση και μείωση αντίστοιχα, των επιπέδων του μεταβολίτη), η τιμή p, η τιμή VIP και το fold change. Η τιμή p προέκυψε από το Welch's t-test. Η τιμή VIP προήλθε από την επιβλεπόμενη πολυπαραμετρική ανάλυση (PLS-DA).

Class	Metabolites	SLE											
		1mo vs 3mo				3mo vs 6mo				1mo vs 6mo			
		S plot	P value	VIP	Fold change (3mo/1mo)	S plot	P value	VIP	Fold change (6mo/3mo)	S plot	P value	VIP	Fold change (6mo/1mo)
Amino Acids and derivatives	Alanine (Ala)	↓3mo	0.03	2.2	0.8	-	-	-	-	-	-	-	-
	Glycine (Gly)	-	-	-	-	-	-	-	-	↓6mo	0.05	7.2	0.6
	Histidine (His)	↓3mo	0.0004	1.0	0.6	-	-	-	-	↓6mo	0.001	1.1	0.5
	Isoleucine (Ile)	↓3mo	0.01	1.1	0.8	-	-	-	-	↓6mo	0.05	1.0	0.8
	Leucine (Leu)	↓3mo	0.02	2.1	0.6	-	-	-	-	↓6mo	0.04	1.7	0.6
	Taurine (Tau)	↑3mo	0.001	4.0	1.2	↓6mo	0.01	1.8	0.8	-	-	-	-
	Threonine (Thr)	↓3mo	0.003	1.8	0.7	↑6mo	0.03	1.5	1.1	↓6mo	0.04	1.2	0.9
	Tyrosine (Tyr)	↓3mo	0.01	0.9	0.7	-	-	-	-	↓6mo	0.01	0.8	0.7
Valine (Val)	↓3mo	0.01	1.5	0.7	-	-	-	-	↓6mo	0.04	1.2	0.7	
Amines	Dimethylamine (DMA)*	↓3mo	0.03	1.4	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-
	O-Phosphoethanolamine (PE)	↓3mo	0.05	1.6	0.9	-	-	-	-	↓6mo	0.01	2.0	0.8
Cholines	Choline (Cho)	-	-	-	-	-	-	-	-	↓6mo	0.04	6.0	0.5
	sn-Glycero-3-phosphocholine (GPC)	↑3mo	0.01	17	1.5	-	-	-	-	↑6mo	0.02	12	1.3
Purines, Pyrimidines	ADP	-	-	-	-	↓6mo	0.04	1.5	0.7	-	-	-	-
	ATP	-	-	-	-	↓6mo	0.003	1.7	0.7	-	-	-	-
	Niacinamide	-	-	-	-	-	-	-	-	↓6mo	0.03	1.4	0.7
	NAD <sup>+</sup>	↑3mo	0.01	0.9	2.4	↓6mo	0.01	1.5	0.5	-	-	-	-
	Oxypurinol	-	-	-	-	-	-	-	-	↓6mo	0.01	1.2	0.8
Uridine	-	-	-	-	-	-	-	-	↓6mo	0.001	0.9	0.8	
Organic Acids	Lactic Acid (Lac)	-	-	-	-	-	-	-	-	↓6mo	0.03	6.8	0.6
Polyols	Myo-Inositol	-	-	-	-	↓6mo	0.03	1.6	0.9	↓6mo	0.04	2.6	0.9
	UN	↑3mo	<0.0001	3.7	2	-	-	-	-	↑6mo	0.002	3.3	2

\*tentative

**Πίνακας 3.2 3:** Τα z-scores όλων των μεταβολιτών της ανάλυσης των ηλικιών 1-6 μηνών στα υγιή πρότυπα (H) και τα πρότυπα λύκου (SLE). Με υπογράμμιση δηλώνονται οι στατιστικά σημαντικοί μεταβολίτες, σύμφωνα με το Welch's t-test.

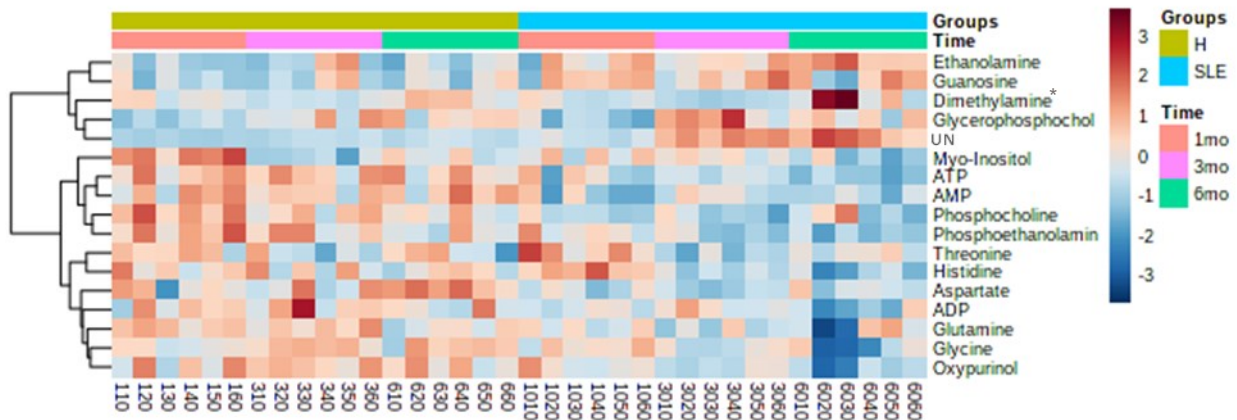
Class	Metabolites	1mo vs 6mo	
		H	SLE
Amino Acids and derivatives	Alanine (Ala)	0.6	-0.8
	Aspartic Acid (Asp)	1.0	0.1
	Creatine/Creatinine	-1.2	<b>3.7</b>
	Glutamic Acid (Glu)	1.1	-1.1
	Glutamine (Gln)	-2.0	-1.4
	Glycine (Gly)	1.4	<b>-2.9</b>
	Histidine (His)	-0.6	<b>-3.5</b>
	Isoleucine (Ile)	-0.5	<b>-1.2</b>
	Leucine (Leu)	-0.2	<b>-1.2</b>
	Taurine (Tau)	0.1	-1.3
	Threonine (Thr)	-0.7	<b>-1.2</b>
	Tyrosine (Tyr)	-0.6	<b>-1.6</b>
	Valine (Val)	0.3	<b>-1.5</b>
Amines	Dimethylamine (DMA)*	0.8	<b>3.0</b>
	Ethanolamine	0.3	0.8
	O-Phosphoethanolamine (PE)	<b>-1.3</b>	<b>-1.7</b>
Cholines	Choline (Cho)	0.6	<b>-1.2</b>
	O-Phosphocholine (PC)	<b>-1.5</b>	0.5
	sn-Glycero-3-phosphocholine (GPC)	<b>3.0</b>	<b>1.7</b>
Purines, Pyrimidines	Adenosine	1.2	0.8
	Adenosine diphosphate (ADP)	-0.3	-1.9
	Adenosine triphosphate (ATP)	-0.4	-0.8
	Adenosine monophosphate (AMP)	0.0	0.1
	Guanosine	0.4	-0.3
	Inosine	0.5	-0.7
	Niacinamide	0.4	<b>-1.2</b>
	NAD+	0.8	0.3
	Oxypurinol	0.0	<b>-2.2</b>
	Uridine	0.9	<b>-2.5</b>
Organic Acids	Acetic Acid	-0.6	-0.6
	Formic Acid	-0.3	0.8
	Fumaric Acid	-0.4	-0.9
	Lactic Acid (Lac)	-0.2	<b>-1.2</b>
	Succinic Acid	0.6	1.1
Polyols	Myo-Inositol	<b>-2.3</b>	<b>-1.5</b>
	Acetoacetate/Acetone	-0.2	-0.3
	UN	<b>3.6</b>	<b>7.3</b>

\*tentative



### 3.2.1.3 Ανάλυση Διασποράς με δύο παράγοντες (two-way ANOVA) και Heatmap

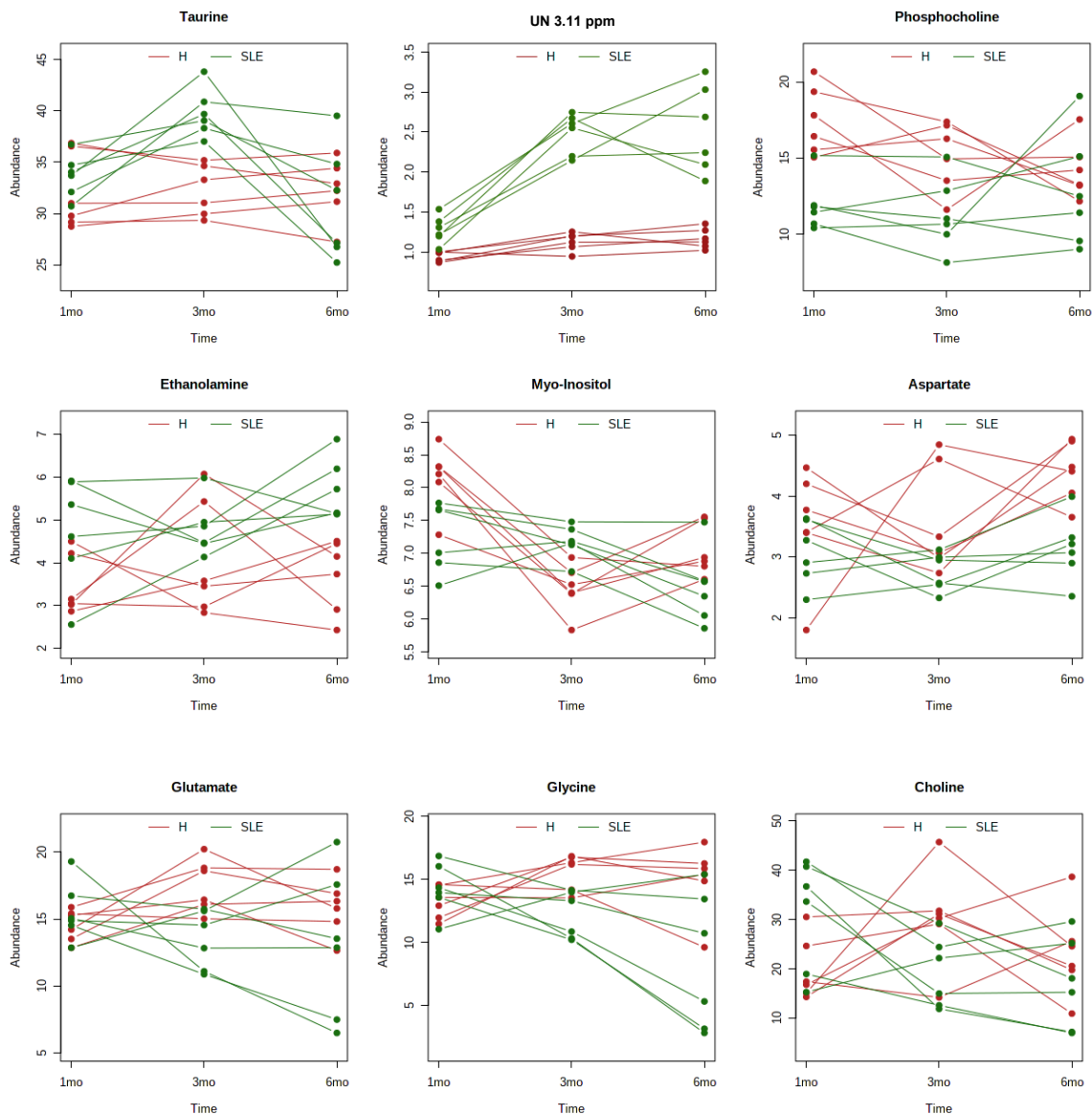
Στη συνέχεια, δημιουργήθηκε το αντίστοιχο heatmap (Εικόνα 3.2 12) με τους στατιστικά σημαντικότερους μεταβολίτες όπως αυτοί προέκυψαν από την ανάλυση διασποράς με δύο παράγοντες (two-way ANOVA) εντός των δειγμάτων (within subject) χωρίς αλληλεπίδραση, μέσω της διαδικτυακής πλατφόρμας MetaboAnalyst 4.0 [125]. Τα αποτελέσματα από την two-way ANOVA βρίσκονται στο Παράρτημα 1 (Πίνακας Π.1 6). Τα δεδομένα εισήχθησαν χωρίς κανονικοποίηση και χρησιμοποιήθηκε η αυτόματη κλιμακοθέτηση που προσφέρει η πλατφόρμα. Η απόσταση ορίστηκε ως Ευκλείδεια, και αλγόριθμος ομαδοποίησης ο Ward.

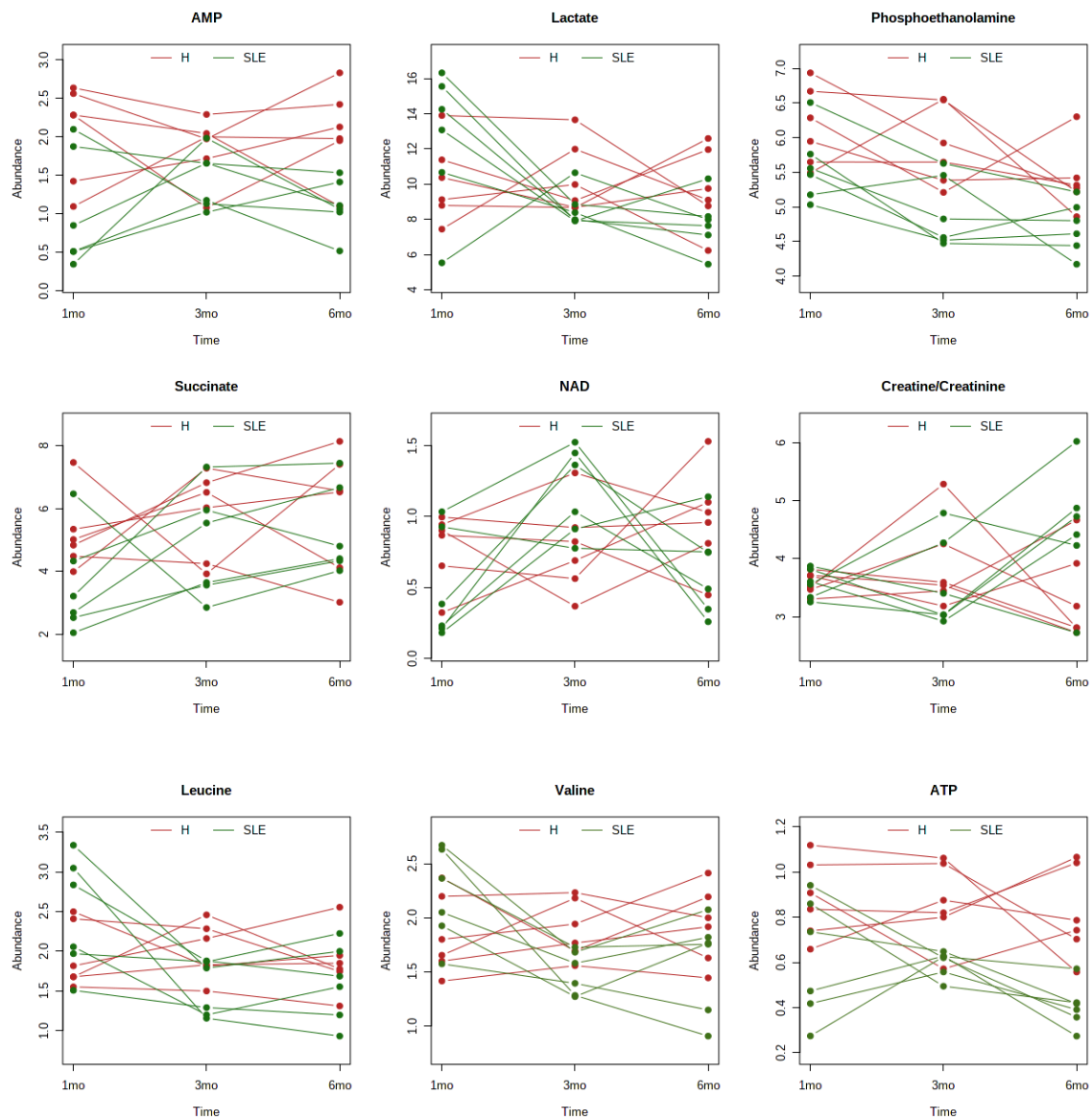


**Εικόνα 3.2 13:** Heatmap των στατιστικά σημαντικότερων μεταβολιτών, όπως προέκυψαν από την two-way ANOVA, για τις δύο βιολογικές καταστάσεις (Healthy και SLE) στις 3 διαφορετικές ηλικίες (1, 3, 6 μηνών). Η κάθε σειρά παριστάνει δεδομένα για έναν συγκεκριμένο μεταβολίτη και κάθε στήλη παριστάνει ένα πειραματόζωο. Διαφορετικά χρώματα αντιστοιχούν στο διαφορετικό επίπεδο έντασης των μεταβολιτών. Τα κόκκινα και μπλε χρώματα αντιπροσωπεύουν αυξημένα και μειωμένα επίπεδα μεταβολιτών, αντίστοιχα. \*tentative

### 3.2.1.4 Πολυπαραμετρική Στατιστική Προσέγγιση Bayes (MEBA)

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε η πολυπαραμετρική στατιστική προσέγγιση Bayes (Multivariate Empirical Bayes Approach, MEBA) [126] μέσω της διαδικτυακής πλατφόρμας MetaboAnalyst 4.0 [125], για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών των οποίων η έκφραση ποικίλει περισσότερο σε κάθε χρονικό σημείο ανάπτυξης των δύο διαφορετικών βιολογικών καταστάσεων (Health vs SLE), υπολογίζοντας την τιμή Hotelling-T<sup>2</sup>. Παρακάτω δίνονται τα σχετικά διαγράμματα (Εικόνα 3.2 14) για τους 18 μεταβολίτες με τις μεγαλύτερες τιμές Hotelling-T<sup>2</sup> (Πίνακας 3.2 4) [126].





**Εικόνα 3.2 14:** Μεταβολίτες με διακριτές χρονικές μεταβολές, όπως προσδιορίζονται από το MEBA μεταξύ των υγιών προτύπων (H) και των προτύπων λύκου (SLE) στις ηλικίες 1, 3 έως 6 μηνών.

**Πίνακας 3.2 4:** Μεταβολίτες κατά σειρά αυξανόμενης τιμής Hotelling-T<sup>2</sup>, όπως προσδιορίζονται από το MEBA, μεταξύ των υγιών προτύπων (H) και των προτύπων λύκου (SLE) στις ηλικίες 1, 3 έως 6 μηνών.

No	Metabolite	Hotelling-T <sup>2</sup>
1	Taurine	40.063
2	UN 3.11 ppm	28.429
3	Phosphocholine	27.034
4	Ethanolamine	24.601
5	Myo-Inositol	17.286
6	Aspartate	17.063
7	Glutamate	16.259
8	Glycine	13.252
9	Choline	11.856
10	AMP	10.039
11	Lactate	10.036
12	Phosphoethanolamine	9.475
13	Succinate	7.335
14	NAD <sup>+</sup>	4.397
15	Creatine/Creatinine	4.336
16	Leucine	4.169
17	Valine	3.890
18	ATP	3.389

Το αποτέλεσμα του MEBA είναι μια κατάταξη όλων των μεταβολιτών που εμφανίζουν διαφορές στο χρονικό τους προφίλ. Καθώς αυτή η μέθοδος κατατάσσει όλους τους μεταβολίτες, είναι δύσκολο να προσδιοριστεί ποια τιμή Hotelling T<sup>2</sup> δείχνει ότι ο συγκεκριμένος μεταβολίτης αλλάζει ουσιαστικά, από εκείνους των οποίων η χρονική αλλαγή είναι αμελητέα. Επίσης, λόγω του ότι η μέθοδος αυτή λαμβάνει υπόψιν όλα δείγματα, ορισμένοι μεταβολίτες που έχουν βρεθεί στατιστικά σημαντικοί προηγουμένως, εδώ εμφανίζουν χαμηλές τιμές Hotelling T<sup>2</sup> καθώς η επαναληψιμότητα των μετρήσεων εντός της ηλικιακής ομάδας είναι χαμηλή. Παρά τα προαναφερθέντα μειονεκτήματα, η προσέγγιση ιεράρχησης φαίνεται να συμφωνεί στην πλειοψηφία των μεταβολιτών με τα αποτελέσματα της προηγούμενης στατιστικής ανάλυσης.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε *Ανάλυση Μεταβολικών Μονοπατιών* (Pathway Analysis) μέσω του MetaboAnalyst [125] των 12 στατιστικά σημαντικών μεταβολιτών που προέκυψαν από την ανάλυση των ηλικιών 1 μήνα (στάδιο προ-εφηβείας) και 6 μηνών (στάδιο νεφρίτιδας) της ομάδας των προτύπων λύκου. Η ανάλυση αυτή παρουσιάζεται στο Παράρτημα 1 (*Συμπληρωματική Ανάλυση 1*).

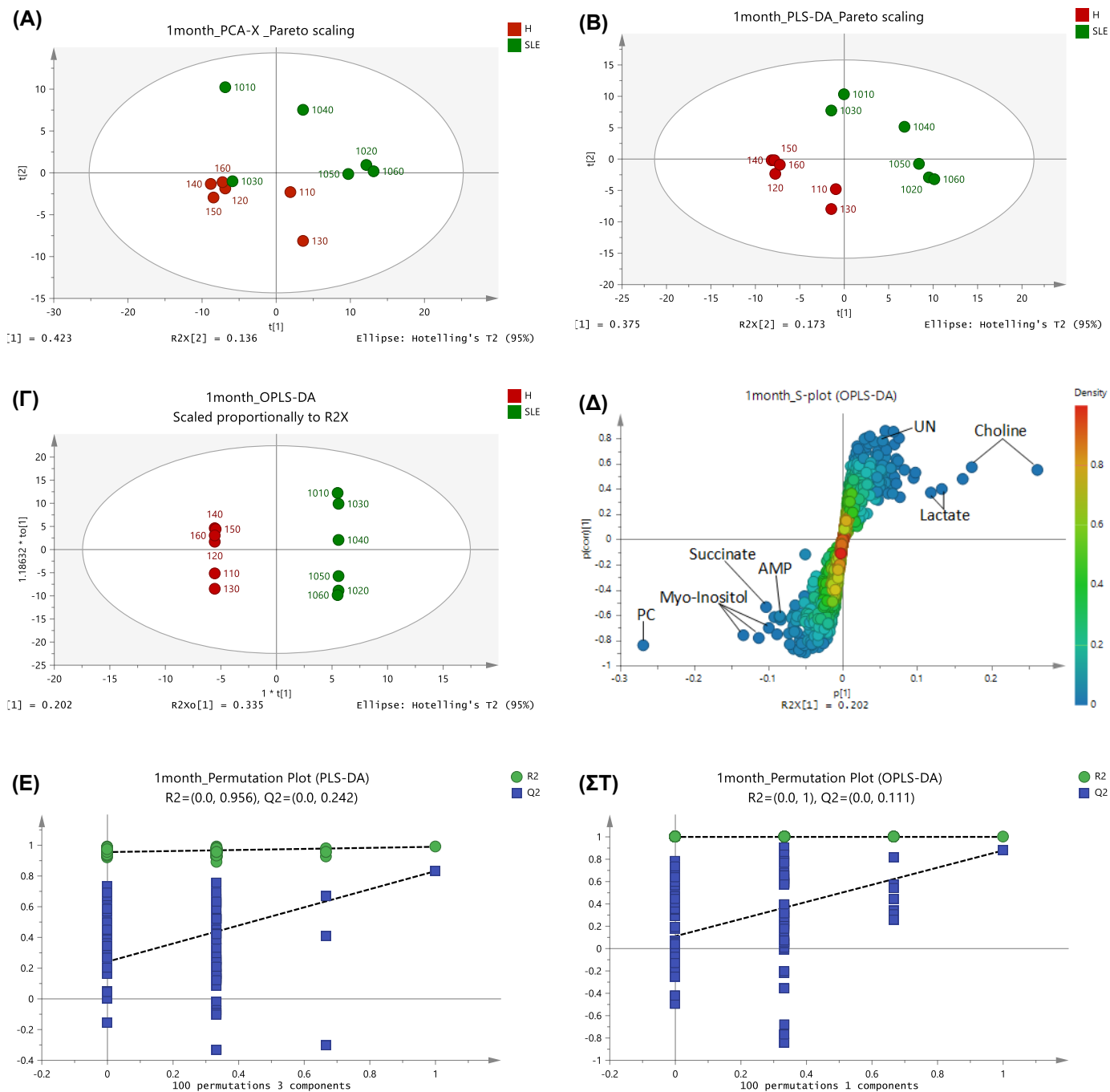
### 3.2.2 Συγκριτική μελέτη υγιών προτύπων (Healthy) και προτύπων λύκου (SLE)

#### *3.2.2.1 Πολυπαραμετρική Ανάλυση*

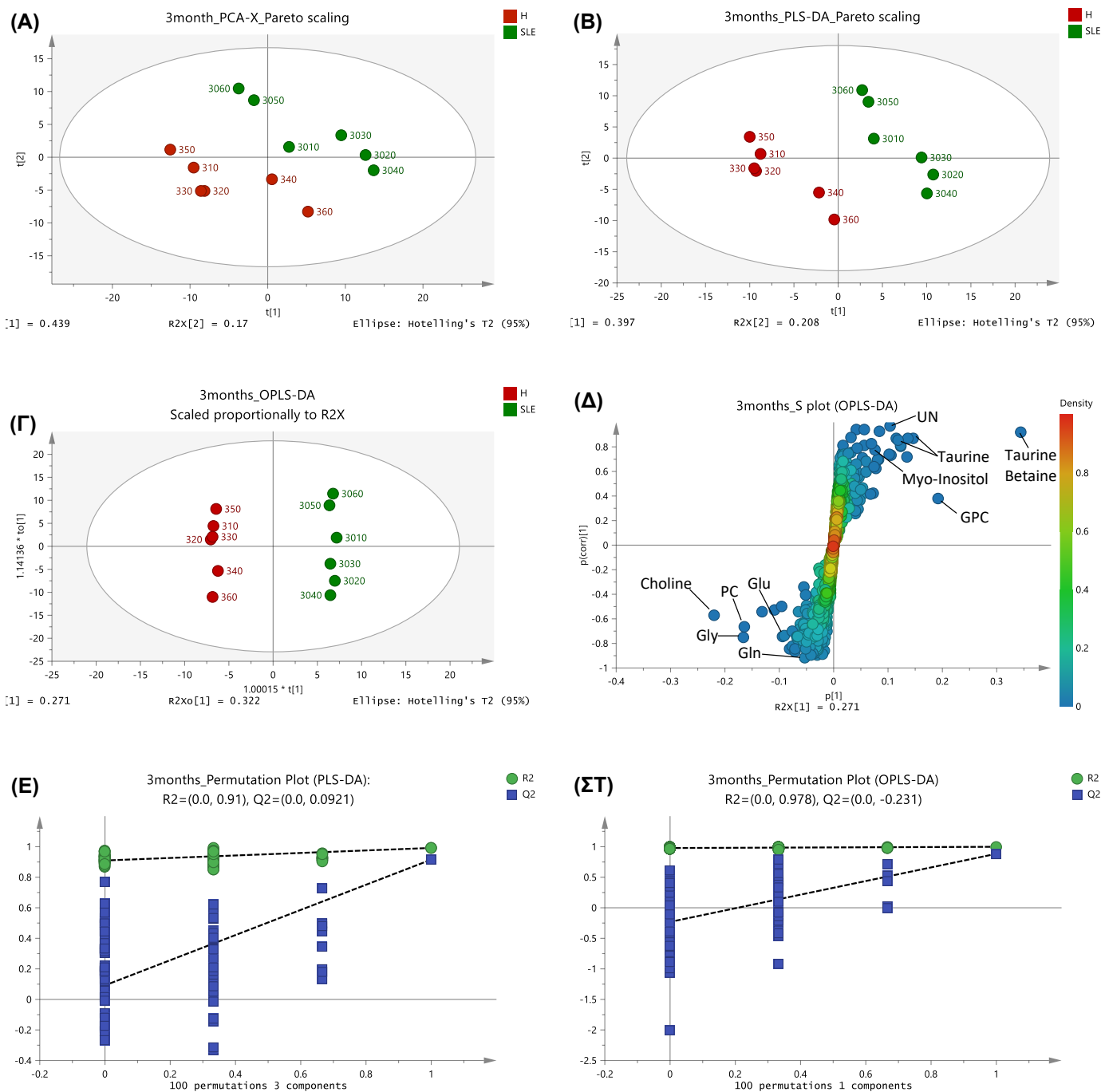
Στα ίδια δεδομένα εφαρμόστηκε πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση μέσω του λογισμικού SIMCA v. 14.1. Πραγματοποιήθηκαν οι αναλύσεις της ομάδας των υγιών προτύπων και των προτύπων λύκου στις ηλικίες 1 μήνα (*Εικόνα 3.2 15*), 3 μηνών (*Εικόνα 3.2 16*) και 6 μηνών (*Εικόνα 3.2 17*). Τελικά έγινε επιλογή των καταλληλότερων μοντέλων (βάσει των αποτελεσμάτων διασταυρούμενης επικύρωσης (cross validation, CV), και από αυτά παρουσιάζονται παρακάτω τα αντίστοιχα διαγράμματα.

Και για τις τρεις ηλικίες παρατηρούμε από τα αντίστοιχα διαγράμματα αντικειμένων PCA μία τάση διαφοροποίησης της ομάδας των προτύπων λύκου από την ομάδα των υγιών προτύπων, ενώ προκύπτει σαφής διαχωρισμός τους στα διαγράμματα PLS-DA και OPLS-DA. Από τους μεταθετικούς ελέγχους (100 τυχαίες μεταθέσεις) για την επικύρωση των μοντέλων PLS-DA και OPLS-DA της πολυπαραμετρικής ανάλυσης, όλα τα μοντέλα κρίνονται οριακά αξιόπιστα.

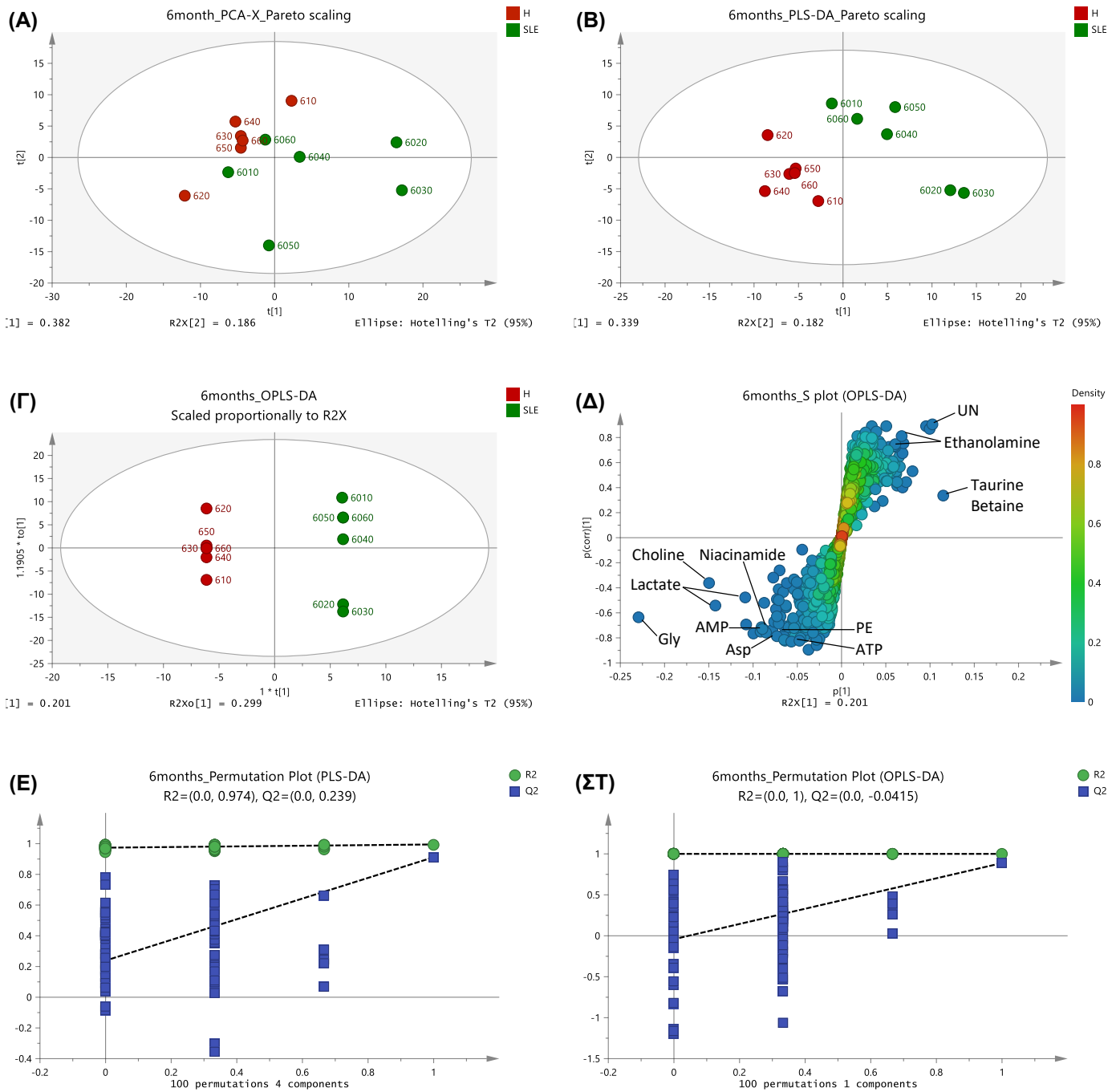
Από τα μοντέλα PLS-DA υπολογίστηκαν οι τιμές VIP, προκειμένου να εντοπιστούν οι μεταβολίτες εκείνοι που συμβάλλουν στον παρατηρούμενο διαχωρισμό της ομάδας των προτύπων του λύκου από την ομάδα των υγιών προτύπων στις τρεις διαφορετικές ηλικίες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Παράρτημα 2 για την ηλικία 1 μήνα (*Πίνακας Π.2 1*), 3 μηνών (*Πίνακας Π.2 2*) και 6 μηνών (*Πίνακας Π.2 3*). Ακολούθως, από τα μοντέλα OPLS-DA κατασκευάστηκαν τα αντίστοιχα διαγράμματα S, στα οποία φαίνονται οι μεταβολίτες που συμβάλλουν στη διαφοροποίηση των δύο ομάδων στην κάθε ηλικία.



**Εικόνα 3.2 15:** Πολυπαραμετρική ανάλυση των μεταβολιτών πολικών εκχυλισμάτων νεφρών της ομάδας των υγιών προτύπων H (κόκκινο χρώμα) και των προτύπων λύκου SLE (πράσινο χρώμα) ηλικίας 1 μήνα. (Α) Διάγραμμα αντικειμένων PCA με κλίμακα Pareto με 2 κύριες συνιστώσες ( $R^2X_{(cum)} = 0.559$ ,  $Q^2_{(cum)} = 0.258$ ). (Β) Διάγραμμα αντικειμένων PLS-DA με κλίμακα Pareto με 3 κύριες συνιστώσες ( $R^2X_{(cum)} = 0.631$ ,  $R^2Y_{(cum)} = 0.990$ ,  $Q^2_{(cum)} = 0.832$ ). (Γ) Διάγραμμα αντικειμένων OPLS-DA ( $R^2X_{(cum)} = 0.801$ ,  $R^2Y_{(cum)} = 1$ ,  $Q^2_{(cum)} = 0.878$ ) με το αντίστοιχο (Δ) διάγραμμα S όπου αναγράφονται οι μεταβολίτες που συμβάλλουν στη διαφοροποίηση των ομάδων. (Ε) Μεταθετικός έλεγχος με 100 τυχαίες μεταθέσεις επιτρεπόμενες για το μοντέλο PLS-DA με κλίμακα Pareto και (ΣΤ) για το μοντέλο OPLS-DA.



**Εικόνα 3.2 16:** Πολυπαραμετρική ανάλυση των μεταβολιτών πολικών εκχυλισμάτων νεφρών της ομάδας των υγιών προτύπων Η (κόκκινο χρώμα) και των προτύπων λύκου SLE (πράσινο χρώμα) ηλικίας 3 μηνών. (Α) Διάγραμμα αντικειμένων PCA με κλίμακα Pareto με 2 κύριες συνιστώσες ( $R^2X_{(cum)}= 0.608$ ,  $Q^2_{(cum)}= 0.390$ ). (Β) Διάγραμμα αντικειμένων PLS-DA με κλίμακα Pareto με 3 κύριες συνιστώσες ( $R^2X_{(cum)}= 0.665$ ,  $R^2Y_{(cum)}= 0.992$ ,  $Q^2_{(cum)}= 0.915$ ). (Γ) Διάγραμμα αντικειμένων OPLS-DA ( $R^2X_{(cum)}= 0.712$ ,  $R^2Y_{(cum)}= 0.998$ ,  $Q^2_{(cum)}= 0.884$ ) με το αντίστοιχο (Δ) διάγραμμα S όπου αναγράφονται οι μεταβολίτες που συμβάλλουν στη διαφοροποίηση των ομάδων. (Ε) Μεταθετικός έλεγχος με 100 τυχαίες μεταθέσεις επιτρεπόμενες για το μοντέλο PLS-DA με κλίμακα Pareto και (ΣΤ) για το μοντέλο OPLS-DA.



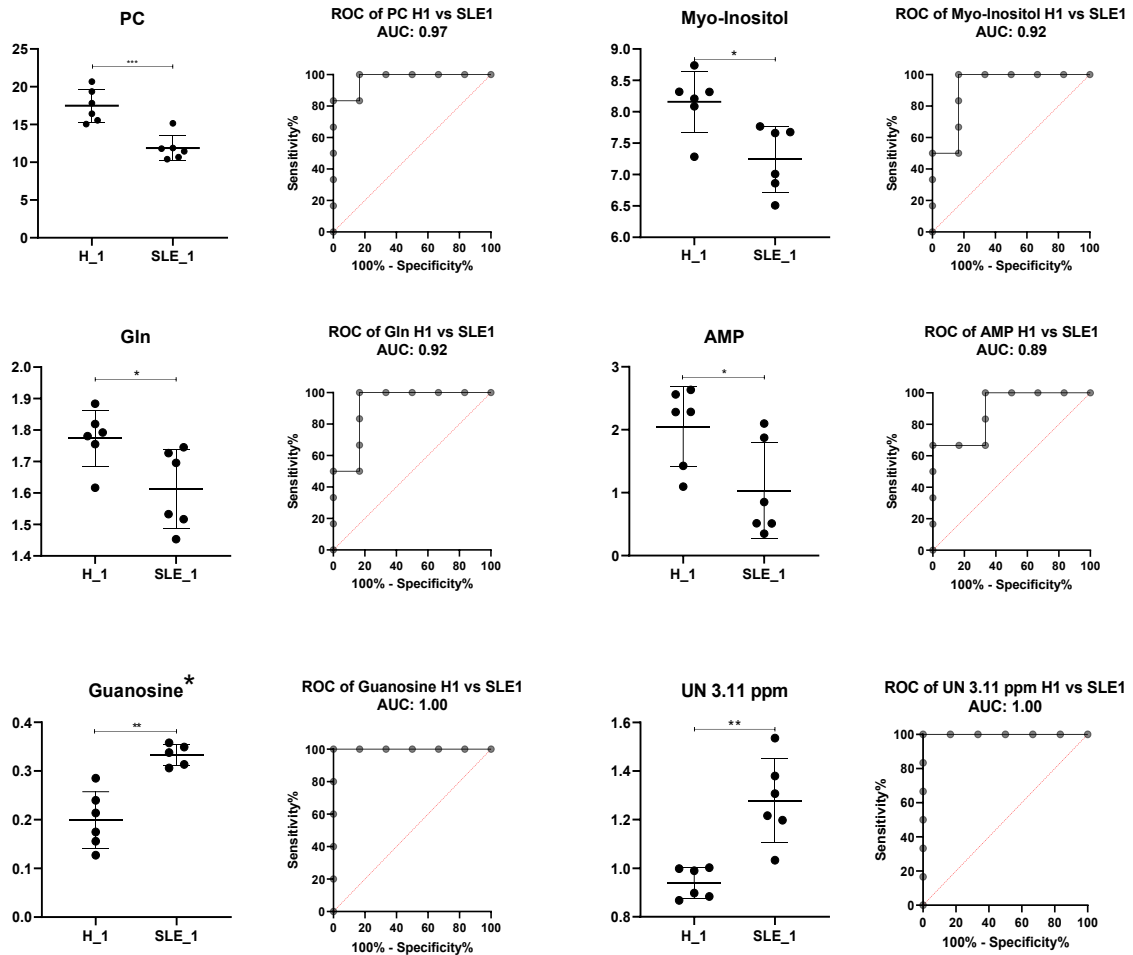
**Εικόνα 3.2.17:** Πολυπαραμετρική ανάλυση των μεταβολιτών πολικών εκχυλισμάτων νεφρών της ομάδας των υγιών προτύπων Η (κόκκινο χρώμα) και των προτύπων λύκου SLE (πράσινο χρώμα) ηλικίας 6 μηνών. (Α) Διάγραμμα αντικειμένων PCA με κλίμακα Pareto με 2 κύριες συνιστώσες ( $R^2_{X(cum)}=0.568$ ,  $Q^2_{(cum)}=0.227$ ). (Β) Διάγραμμα αντικειμένων PLS-DA με κλίμακα Pareto με 4 κύριες συνιστώσες ( $R^2_{X(cum)}=0.725$ ,  $R^2_{Y(cum)}=0.995$ ,  $Q^2_{(cum)}=0.912$ ). (Γ) Διάγραμμα αντικειμένων OPLS-DA ( $R^2_{X(cum)}=0.878$ ,  $R^2_{Y(cum)}=1$ ,  $Q^2_{(cum)}=0.888$ ) με το αντίστοιχο (Δ) διάγραμμα S όπου αναγράφονται οι μεταβολίτες που συμβάλλουν στη διαφοροποίηση των ομάδων. (Ε) Μεταθετικός έλεγχος με 100 τυχαίες μεταθέσεις επιτρεπόμενες για το μοντέλο PLS-DA με κλίμακα Pareto και (ΣΤ) για το μοντέλο OPLS-DA.



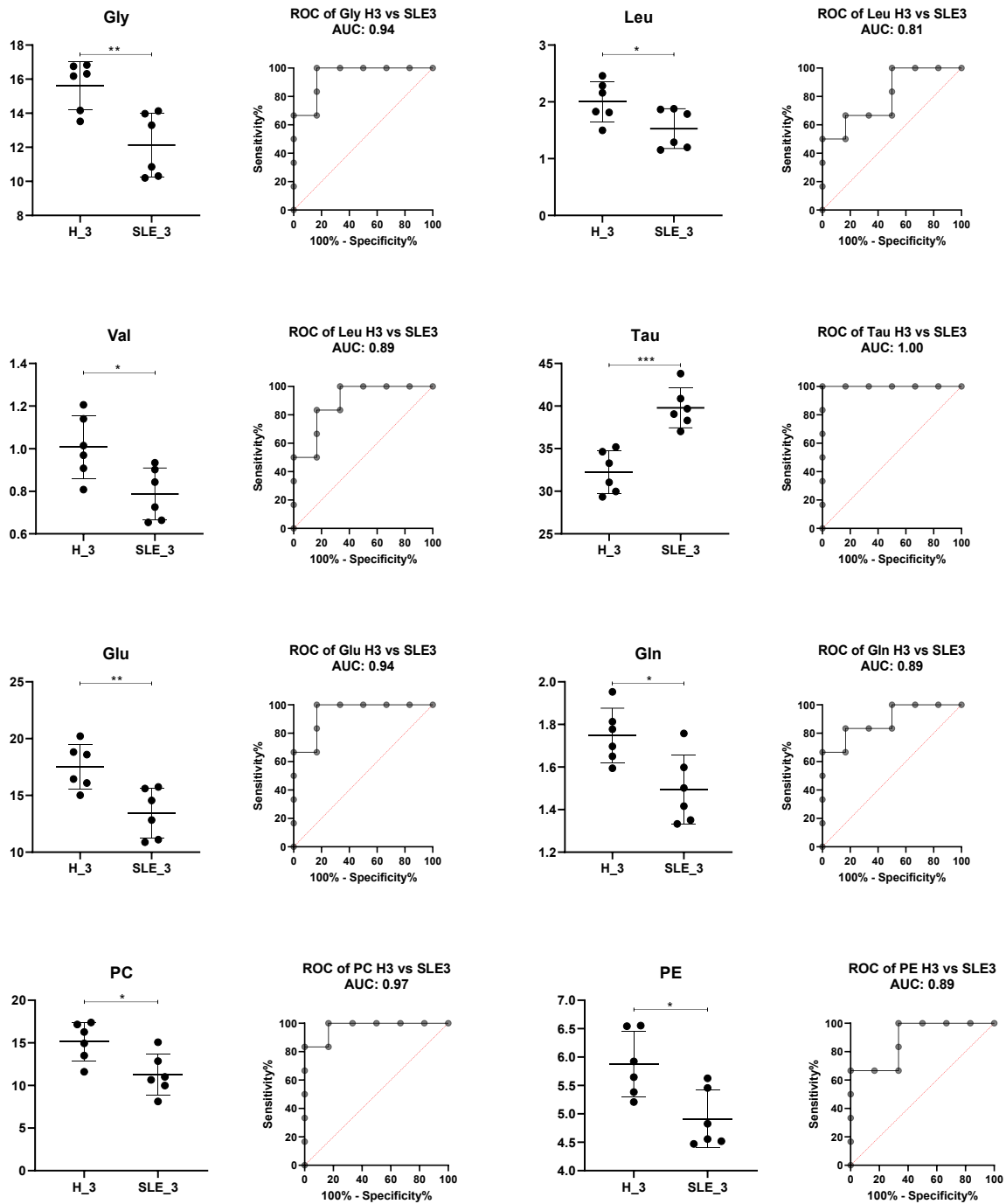
### 3.2.2.2 Μονοπαραμετρική Ανάλυση

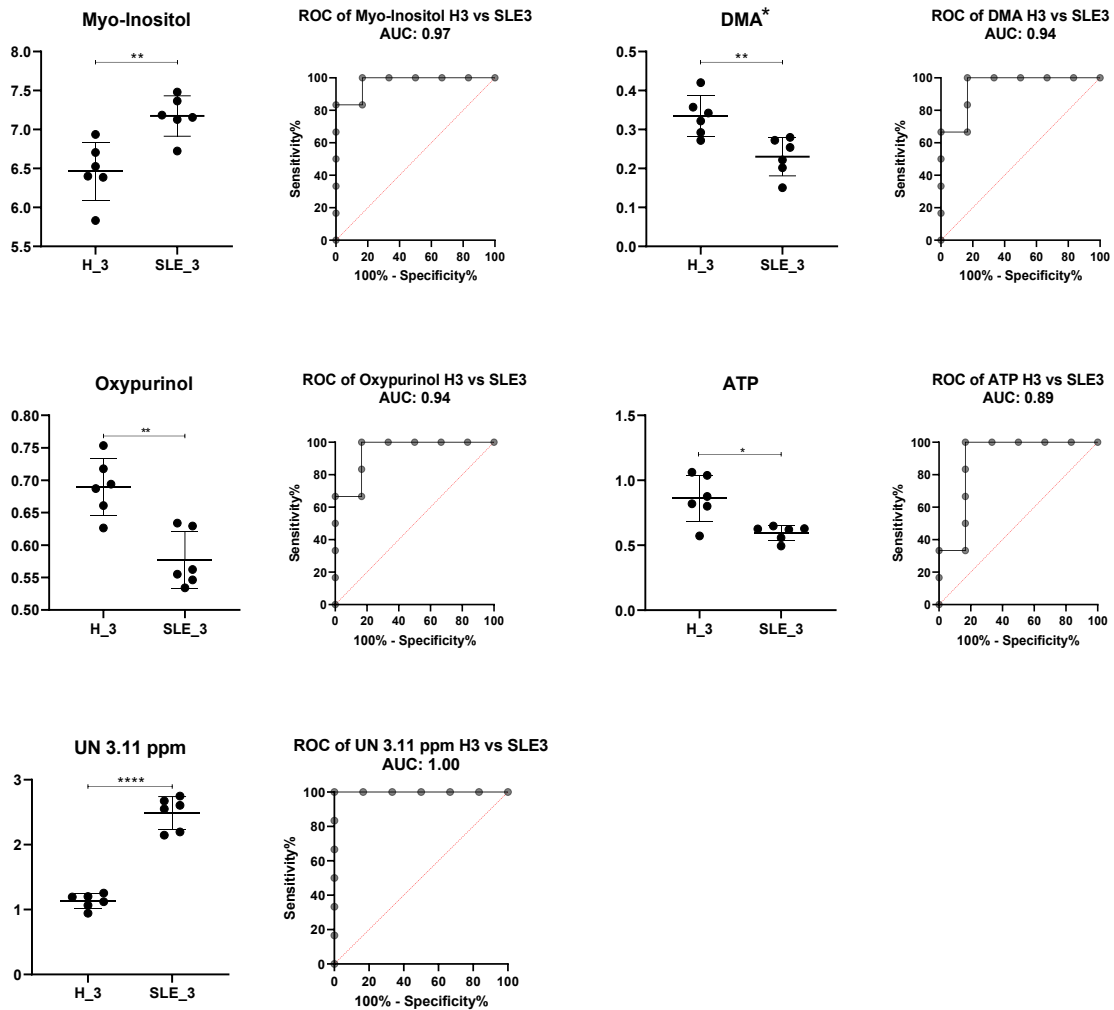
Ακολούθησε μονοπαραμετρική στατιστική ανάλυση της διακύμανσης των σχετικών μεταβολών των συγκεντρώσεων των μεταβολιτών μέσω του λογισμικού GraphPad Prism 8.3.0, ώστε να διαπιστωθεί αν είναι στατιστικά σημαντικές οι διαφορές των μεταβολιτών που φαίνονται να συνεισφέρουν στο διαχωρισμό της ομάδας των υγιών προτύπων και της ομάδας των προτύπων λύκου, στις τρεις διαφορετικές ηλικίες.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε έλεγχος κανονικότητας (normality test) της κατανομής των τιμών του κάθε μεταβολίτη με τις μεθόδους Shapiro-Wilk και Kolmogorov-Smirnov με  $\alpha=0.05$ . Ακολούθησε έλεγχος ύπαρξης έκτροπων τιμών με τις μεθόδους ROUT (Q=1%) και Grubbs ( $\alpha=0.05$ ). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία t με τη διόρθωση Welch (Welch's t-test) που χρησιμοποιείται στις περιπτώσεις τιμών με άνισες διακυμάνσεις. Τέλος, κατασκευάστηκαν τα θηκογράμματα καθώς και τα αντίστοιχα ROC curves των μεταβολιτών, τα οποία παρουσιάζονται παρακάτω για τους στατιστικά σημαντικούς μεταβολίτες όπως αυτοί προέκυψαν από τις αναλύσεις της ομάδας των υγιών προτύπων και των προτύπων λύκου στην ηλικία 1 μήνα (Εικόνα 3.2 18), 3 μηνών (Εικόνα 3.2 19) και 6 μηνών (Εικόνα 3.2 20).

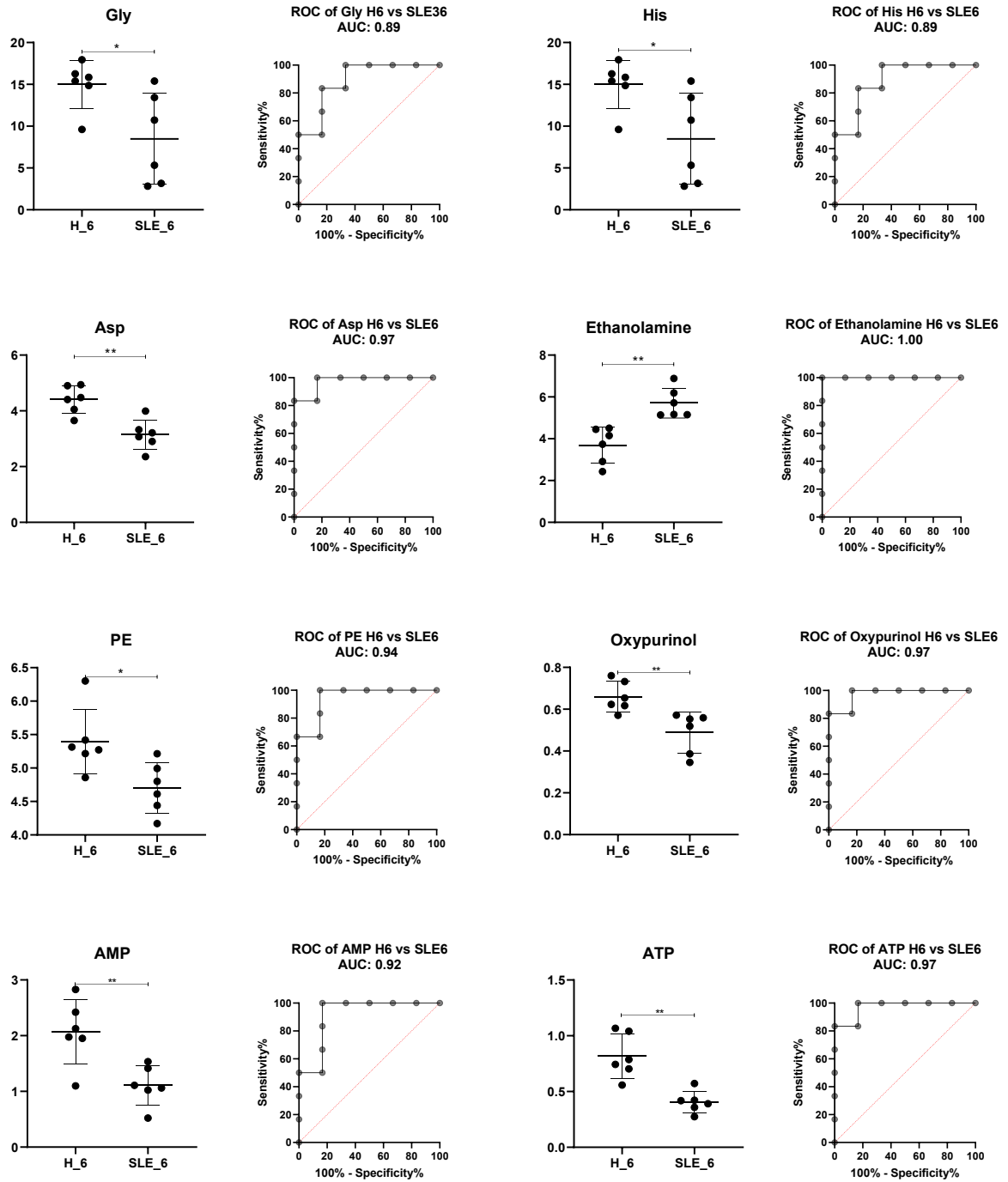


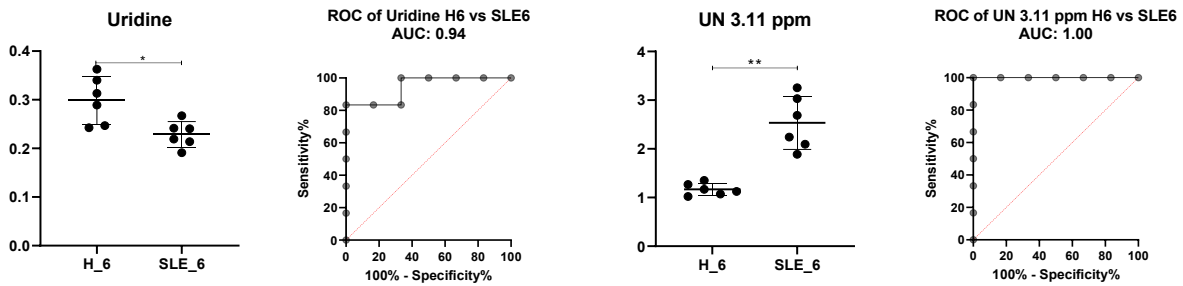
**Εικόνα 3.2 18:** Αντιπροσωπευτικά θηκογράμματα και καμπύλες ROC για επιλεγμένους μεταβολίτες, οι οποίοι παρουσιάζουν στατιστική σημασία (Welch's t-test) στην ανάλυση της ομάδας των υγιών προτύπων και των προτύπων λύκου στην ηλικία 1 μήνα. Οι τιμές p μικρότερες από 0.05 θεωρήθηκαν σημαντικές. (\*\* $p \leq 0.001$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \* $p \leq 0.05$ ). \*από τη guanosine έχει αφαιρεθεί η τιμή του δείγματος 1010 ως έκτροπη από τη μέθοδο ROUT και τη μέθοδο Grubbs του GraphPad Prism.





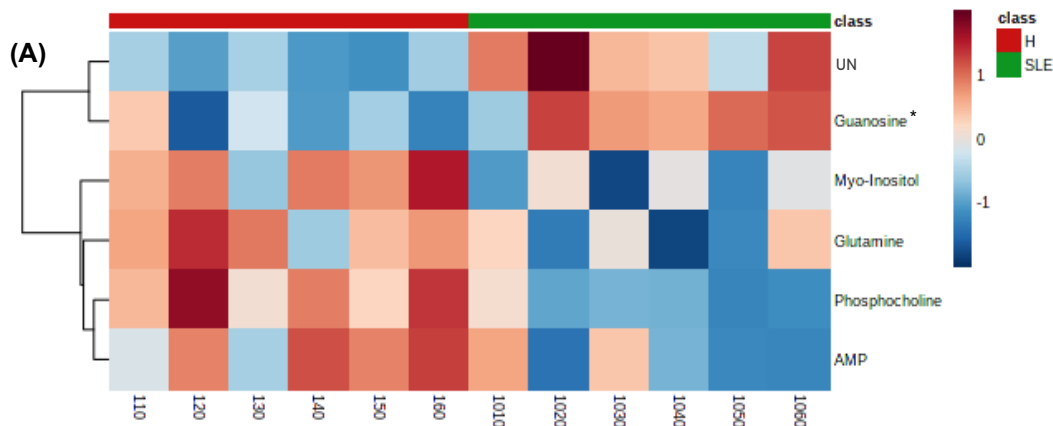
**Εικόνα 3.2 19:** Αντιπροσωπευτικά θηκογράμματα και καμπύλες ROC για επιλεγμένους μεταβολίτες, οι οποίοι παρουσιάζουν στατιστική σημασία (Welch's t-test) στην ανάλυση της ομάδας των υγιών προτύπων και των προτύπων λύκου στην ηλικία 3 μηνών. Οι τιμές p μικρότερες από 0.05 θεωρήθηκαν σημαντικές. (\*\* $p \leq 0.001$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \* $p \leq 0.05$ ). \*tentative

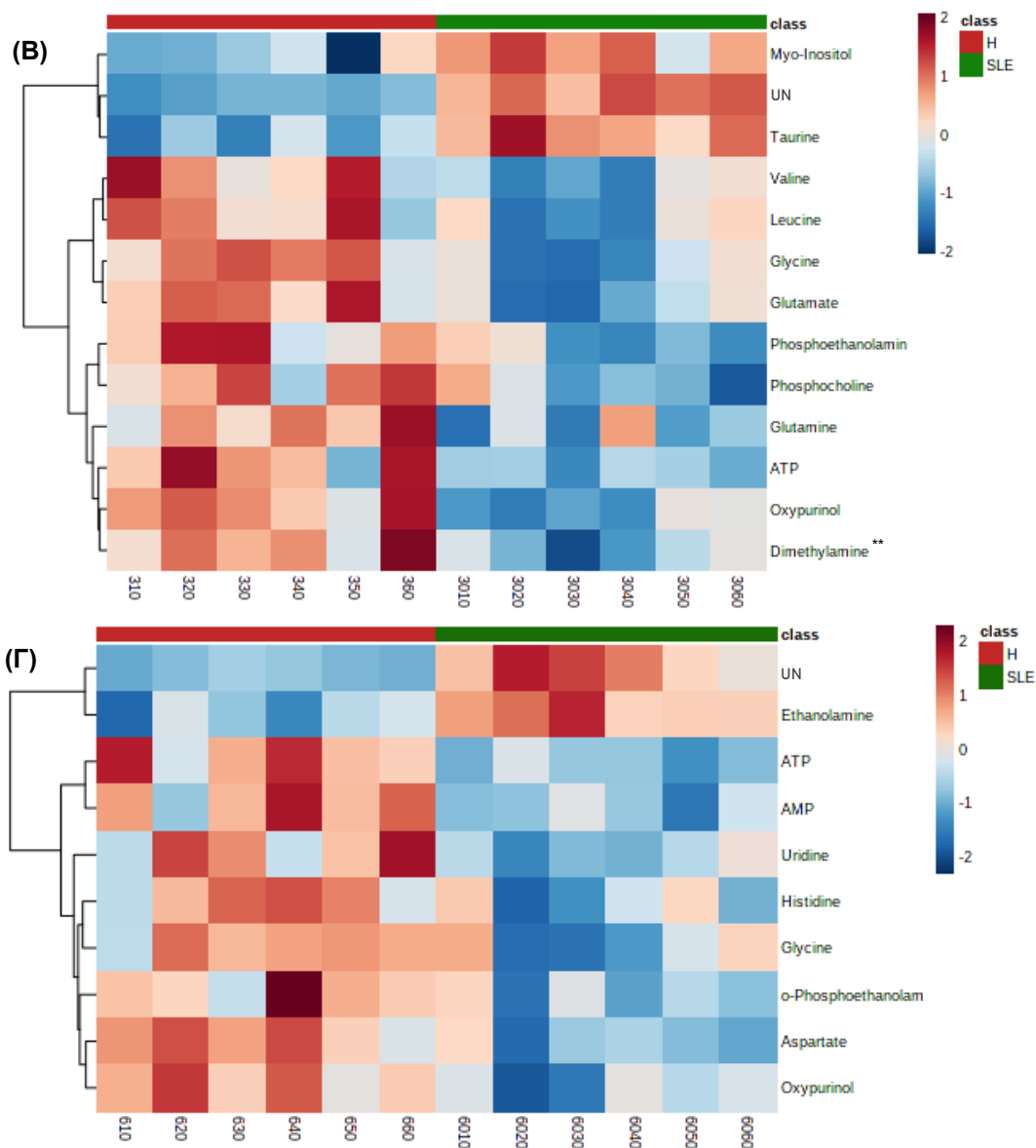




**Εικόνα 3.2 20:** Αντιπροσωπευτικά θηκογράμματα και καμπύλες ROC για επιλεγμένους μεταβολίτες, οι οποίοι παρουσιάζουν στατιστική σημασία (Welch’s t-test) στην ανάλυση της ομάδας των υγιών προτύπων και των προτύπων λύκου στην ηλικία 6 μηνών. Οι τιμές p μικρότερες από 0.05 θεωρήθηκαν σημαντικές. (\*\*  $p \leq 0.01$ ; \* $p \leq 0.05$ ).

Στη συνέχεια, από τα αποτελέσματα των t-test δημιουργήθηκαν τα αντίστοιχα heatmaps (Εικόνα 3.2 21) με τους στατιστικά σημαντικότερους μεταβολίτες μέσω της διαδικτυακής πλατφόρμας MetaboAnalyst 4.0 [125]. Τα δεδομένα εισήχθησαν χωρίς κανονικοποίηση και χρησιμοποιήθηκε η αυτόματη κλιμακοθέτηση που προσφέρει η πλατφόρμα. Η απόσταση ορίστηκε ως Ευκλείδεια, και ο αλγόριθμος ομαδοποίησης ήταν ο Ward.





**Εικόνα 3.2 21:** Heatmaps των στατιστικά σημαντικότερων μεταβολιτών, όπως προέκυψαν από την ανάλυση των πολικών εκχυλισμάτων νεφρών της ομάδας των υγιών προτύπων Η και των προτύπων λύκου SLE ηλικίας (Α) 1 μήνα, (Β) 3 μηνών και (Γ) 6 μηνών. Η κάθε σειρά παριστάνει δεδομένα για έναν συγκεκριμένο μεταβολίτη και κάθε στήλη παριστάνει ένα πειραματόζωο. Διαφορετικά χρώματα αντιστοιχούν στο διαφορετικό επίπεδο έντασης των μεταβολιτών. Τα κόκκινα και μπλε χρώματα αντιπροσωπεύουν αυξημένα και μειωμένα επίπεδα μεταβολιτών, αντίστοιχα. \*από τη guanosine έχει αφαιρεθεί η τιμή του δείγματος 1010 ως έκτροπη και έγινε εκτίμηση της με τη μέθοδο Bayesian PCA (BPCA) από το MetaboAnalyst, \*\*tentative.

Πραγματοποιήθηκε ακόμη *Ανάλυση Μεταβολικών Μονοπατιών* (Pathway Analysis) μέσω του MetaboAnalyst [125] των 9 στατιστικά σημαντικών μεταβολιτών που προέκυψαν από την ανάλυση της ομάδας των υγιών προτύπων και των προτύπων λύκου στην ηλικία των 6 μηνών (στάδιο νεφρίτιδας). Η ανάλυση αυτή παρουσιάζεται στο Παράρτημα 2 (*Συμπληρωματική Ανάλυση 2*).

### **Συνολική Αξιολόγηση Αποτελεσμάτων**

Τα αποτελέσματα τις πολυπαραμετρικής και μονοπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης των ομάδων υγιών προτύπων (H) και προτύπων λύκου (SLE) στις ηλικίες 1 μήνα, 3 μηνών και 6 μηνών συνοψίζονται παρακάτω (*Πίνακας 3.2 5*).



**Πίνακας 3.2 5:** Μεταβολίτες στους οποίους παρατηρείται στατιστικά σημαντική μεταβολή μεταξύ των ομάδων υγιών προτύπων (H) και προτύπων λύκου (SLE) στις ηλικίες 1 μήνα, 3 μηνών και 6 μηνών. Στην κάθε ηλικία σημειώνεται η μεταβολή από το S plot (τα σύμβολα ↑ και ↓ δηλώνουν αύξηση και μείωση αντίστοιχα, των επιπέδων του μεταβολίτη στα SLE), η τιμή p, η τιμή VIP και το fold change. Η τιμή p προέκυψε από το Welch’s t-test. Η τιμή VIP προήλθε από την επιβλεπόμενη πολυπαραμετρική ανάλυση (PLS-DA).

Class	Metabolites	1mo				3mo				6mo			
		S plot	P value	VIP	Fold change (SLE/H)	S plot	P value	VIP	Fold change (SLE/H)	S plot	P value	VIP	Fold change (SLE/H)
Amino Acids and derivatives	Aspartic Acid (Asp)	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	0.002	2.4	0.7
	Glutamic Acid (Glu)	-	-	-	-	↓	0.01	3.9	0.8	-	-	-	-
	Glutamine (Gln)	↓	0.03	0.84	0.9	↓	0.01	1.3	0.9	-	-	-	-
	Glycine (Gly)	-	-	-	-	↓	0.005	7.0	0.8	↓	0.03	9.5	0.6
	Histidine (His)	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	0.03	0.8	0.7
	Leucine (Leu)	-	-	-	-	↓	0.04	1.6	0.8	-	-	-	-
	Taurine (Tau)	-	-	-	-	↑	0.0003	6.1	1.2	-	-	-	-
	Valine (Val)	-	-	-	-	↓	0.02	1.2	0.8	-	-	-	-
Amines	Dimethylamine (DMA)*	-	-	-	-	↓	0.01	1.2	0.7	-	-	-	-
	Ethanolamine	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	0.001	2.5	1.5
	O-Phosphoethanolamine (PE)	-	-	-	-	↓	0.01	2.3	0.8	↓	0.02	2.1	0.9
Cholines	O-Phosphocholine (PC)	↓	0.001	11	0.7	↓	0.02	6.9	0.7	-	-	-	-
Purines, Pyrimidines	AMP	↓	0.03	3.8	0.5	-	-	-	-	↓	0.01	3.6	0.5
	ATP	-	-	-	-	↓	0.01	1.5	0.7	↓	0.003	2.0	0.5
	Guanosine	↑	0.002	0.8	1.7	-	-	-	-	-	-	-	-
	Oxypurinol	-	-	-	-	↓	0.001	1.3	0.8	↓	0.01	1.7	0.7
	Uridine	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	0.02	1.0	0.8
Polyols	Myo-Inositol	↓	0.01	5.6	0.9	↑	0.004	3.4	1.1	-	-	-	-
	UN	↑	0.004	2.2	1.4	↑	<0.0001	4.3	2.2	↑	0.001	4.3	2.2

\*tentative

Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε μεταβολομική ανάλυση με τη χρήση της φασματοσκοπίας  $^1\text{H-NMR}$  για τον προσδιορισμό του μεταβολικού προφίλ των υδατικών εκχυλισμάτων των νεφρών από μύες που αυθόρμητα εμφανίζουν την ασθένεια του ΣΕΛ. Από όσο γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη μελέτη μη στοχευμένης μεταβολομικής ανάλυσης των νεφρών στο ΣΕΛ. Προηγούμενες μελέτες έγιναν σε εκχυλίσματα νεφρών ποντικών όπου μελετήθηκαν οι μεταβολές στα αμινοξέα και τη γλυκόζη [106] και σε δείγματα νεφρικού φλοιού από ποντίκια όπου πραγματοποιήθηκε στοχευμένη ανάλυση σφιγγολιπιδίων [107], ενώ αρκετές μελέτες έχουν αναλύσει το μεταβολικό προφίλ ορού ή πλάσματος και ούρων ασθενών. Περίπου το 50-60% των ασθενών με ΣΕΛ αναπτύσσουν νεφρικές ανωμαλίες, ωστόσο η παθογένεση της νεφρίτιδας του λύκου (ΝΛ) δεν είναι πλήρως κατανοητή. Σε φλεγμονώδεις καταστάσεις, ο φυσιολογικός κύκλος εργασιών κυτταρικής και ακυτταρικής βιομάζας στους ιστούς διακόπτεται, γεγονός που καθιστά δυνατό να προσδιοριστούν συγκεκριμένοι μεταβολίτες, οι οποίοι παρέχουν πιο διαφανείς ενδείξεις για την καταστροφή του ιστού. Στην παρούσα εργασία, η μεταβολομική ανάλυση ανέδειξε τα παρακάτω ευρήματα.

Αρχικά, τα μεταβολικά προφίλ των δειγμάτων των νεφρών επέτρεψαν τη διαφοροποίηση των ομάδων προτύπου ΣΕΛ (SLE) από τα υγιή πρότυπα (H) των μυών. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι η μιτοχondριακή δυσλειτουργία έχει αναφερθεί ότι αναπτύσσεται στο μοντέλο του λύκου MRL/lpr σε νεαρή ηλικία, πριν ακόμη από την εκδήλωση των αυτοαντισωμάτων και της βλάβης των νεφρών [127]. Επομένως, έχει σημασία να εντοπίσουμε τις μεταβολικές αλλαγές και στο δικό μας μοντέλο, NZBxNZW/F1, από τα πρώιμα στάδια. Συνολικά 18 μεταβολίτες άλλαξαν σημαντικά στην ομάδα SLE και στα τρία χρονικά στάδια της μελέτης. Κατά το στάδιο της προεφηβείας (ηλικία 1 μήνα) κατά το οποίο απουσιάζουν οι ορμόνες του φύλου, παρατηρείται σημαντική μείωση των επιπέδων *φωσφοχολίνης (phosphocholine)*, η οποία εντοπίζεται και κατά το στάδιο προ-αυτοανοσίας (3 μήνες), όπου απουσιάζουν τα αυτοαντισώματα. Η φωσφοχολίνη χρησιμεύει ως πρόδρομος για την παραγωγή της φωσφατιδυλοχολίνης (phosphatidylcholine), η οποία αποτελεί βασικό συστατικό της δομής των κυτταρικών μεμβρανών. Η μειωμένη συγκέντρωση φωσφοχολίνης στο ΣΕΛ μπορεί να σχετίζεται με την αυξημένη χρήση της φωσφατιδυλοχολίνης σε εξασθενημένα κύτταρα και μεμβρανικά οργανίδια υπό σοβαρή

οξειδωτική και συστηματική φλεγμονώδη κατάσταση. Συνεχίζοντας στο μεταβολικό μονοπάτι των φωσφολιπιδίων, από την ανάλυση προκύπτει μείωση των επιπέδων και της **φωσφοαιθανολαμίνης (phosphoethanolamine)** στις ηλικίες των τριών και έξι μηνών (στάδιο της νεφρίτιδας), η οποία στους έξι μήνες συνοδεύεται από σημαντική αύξηση της αιθανολαμίνης (ethanolamine). Η αιθανολαμίνη είναι το βασικό συστατικό της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης (phosphatidylethanolamine), ενός βασικού φωσφολιπιδίου στις κυτταρικές μεμβράνες των ζωικών οργανισμών. Η αιθανολαμίνη προάγει τον πολλαπλασιασμό πολλών επιθηλιακών κυττάρων στα θηλαστικά ασκώντας επιδράσεις στο μονοπάτι σηματοδότησης του mTOR και στη μιτοχονδριακή λειτουργία [128]. Ο mTOR χρησιμεύει ως αισθητήρας της μιτοχονδριακής ομοιόστασης στα T κύτταρα [129] και είναι ενεργοποιημένος σε ασθενείς με ΣΕΛ [130]. Επομένως, έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον να μελετηθεί η συσχέτιση της αιθανολαμίνης με το μηχανισμό παθογένεσης στο ΣΕΛ. Η φωσφοαιθανολαμίνη, παράγωγο της αιθανολαμίνης, συνδέεται με το μεταβολισμό των σφινγγολιπιδίων (sphingolipid metabolism), η διαταραχή του οποίου έχει συσχετιστεί με τη νεφρίτιδα λύκου [107]. Η **διμεθυλαμίνη (dimethylamine)** - μη επιβεβαιωμένος μεταβολίτης στα 2.72 ppm - εμφανίζει χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης στο στάδιο της προ-αυτοανοσίας. Πρόκειται για μία δευτεροταγή αμίνη που βρίσκεται σε αφθονία στα ούρα, όπου χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσής της έχουν εντοπιστεί σε προχωρημένο στάδιο Χρόνιας Νεφρικής Νόσου (Chronic Kidney Disease, CKD) [131].

Στην κατηγορία των αμινοξέων, πέντε αμινοξέα, η **λευκίνη (leucine)**, η **βαλίνη (valine)**, το **γλουταμικό οξύ (glutamic acid)**, η **γλουταμίνη (glutamine)** και η **γλυκίνη (glycine)** εμφανίζονται μειωμένα στα πρότυπα λύκου στο στάδιο προ-αυτοανοσίας, με τη γλυκίνη να μειώνεται αισθητά και κατά το στάδιο της νεφρίτιδας. Μαζί με τη γλυκίνη, το **ασπαρτικό οξύ (aspartic acid)** και η **ιστιδίνη (histidine)** εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα συγκέντρωσης στο στάδιο της νεφρίτιδας. Τα μειωμένα επίπεδα των γλυκογονικών αμινοξέων (όπως η γλυκίνη, η γλουταμίνη, το γλουταμικό οξύ, η βαλίνη και η ιστιδίνη) καθώς και των κετογονικών αμινοξέων (όπως η λευκίνη), παρέχουν ενδείξεις μεταβολών στην παραγωγή ενέργειας, με αποτέλεσμα τη χρήση μεταβολιτών εκτός της γλυκόζης ως πηγής ενέργειας, όπως τα αμινοξέα και οι κετονομάδες. Πιο συγκεκριμένα, η γλουταμίνη χρησιμοποιείται άμεσα για την παραγωγή ενέργειας μέσω της αναπλήρωσης του κύκλου Krebs [132]. Μελέτη που έγινε σε μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με ΣΕΛ κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η ανεπάρκεια σε γλουταμίνη μπορεί να συμβάλει στη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στην ασθένεια [133]. Η ιστιδίνη, ένα απαραίτητο αμινοξύ, είναι γνωστή για τις αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές της ιδιότητες. Η μείωση της στον ορό του

αίματος έχει συσχετιστεί στενά με τη σπατάλη πρωτεϊνικής ενέργειας, τη φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες [134]. Η **ταυρίνη (taurine)** βρέθηκε αυξημένη στους τρεις μήνες· η ταυρίνη μπορεί να επηρεάσει διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες των νεφρών, συμπεριλαμβανομένων της νεφρικής ροής του αίματος, της πειραματικής διήθησης και του ρυθμού της, της ωσμορυθμίσσης, της επαναρρόφησης και της έκκρισης ιόντων και της σύνθεσης των ούρων [135]. Τα υψηλά επίπεδα ταυρίνης στον τρίτο μήνα, όπως προέκυψαν από την ανάλυσή μας, οφείλονται πιθανώς στην έλλειψη νεφρικής απέκκρισης με αποτέλεσμα τη συσσώρευσή της στους νεφρούς. Ο μεταβολισμός της ταυρίνης εμπλέκεται στην ανάπτυξη του ΣΕΛ ενισχύοντας την παραγωγή IFN τύπου I με τη μεσολάβηση των πλασματοκυτταροειδών δενδριτικών κυττάρων (pDCs) [136]. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των αμινοξέων είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες μεταβολομικής στον ορό του αίματος ασθενών με ΣΕΛ [77], [78], [80], [84].

Η **μυο-ινοσιτόλη (myo-inositol)** εμφανίζεται σε μειωμένα επίπεδα τον πρώτο μήνα ενώ αυξάνεται κατά το στάδιο προ-αυτοανοσίας στα πρότυπα SLE σε σύγκριση με τα υγιή πρότυπα. Η μυο-ινοσιτόλη έχει καθιερωθεί ως ένας σημαντικός παράγοντας που προάγει την ανάπτυξη και επιβίωση των κυττάρων [137]. Μπορεί να συντεθεί ενδογενώς από τη D-γλυκόζη στον εγκέφαλο, τους νεφρούς και το ήπαρ αρουραίων [138] ενώ στον άνθρωπο, αυτή η ενδογενής βιοσύνθεση της ινοσιτόλης είναι ακόμα πιο σημαντική στους νεφρούς [139]. Η μυο-ινοσιτόλη μπορεί να θεωρηθεί ως υποψήφιος βιοδείκτης για δομική βλάβη στα νεφρικά σωληνάρια [140], ενώ έχει χαρακτηριστεί και ως ουραιμική τοξίνη [141]. Επιπλέον, οι ανωμαλίες στον μεταβολισμό της ινοσιτόλης σχετίζονται με την αντίσταση στην ινσουλίνη και με μακροχρόνιες μικροαγγειακές επιπλοκές του διαβήτη, υποστηρίζοντας έτσι έναν ρόλο της ινοσιτόλης ή των παραγώγων της στον μεταβολισμό της γλυκόζης [142]. Η μυο-ινοσιτόλη έχει βρεθεί αυξημένη στα ούρα ασθενών με ΣΕΛ [88], ενώ έχει συνδεθεί και με το νευροψυχιατρικό λύκο [143].

Στον μεταβολισμό των πουρινών, το **ATP** και η **οξυπουρινόλη (oxypurinol)** εμφανίζονται σε μειωμένες συγκεντρώσεις κατά τον τρίτο και έκτο μήνα στα πρότυπα SLE, ενώ το **AMP** ακολουθεί την ίδια τάση κατά τον πρώτο και έκτο μήνα. Μάλιστα κατά το στάδιο της νεφρίτιδας, το AMP και το ATP βρέθηκαν σε υποδιπλάσιες συγκεντρώσεις σε σχέση με τα υγιή πρότυπα. Η **γουανοσίνη (guanosine)** φαίνεται να αυξάνεται κατά το στάδιο της προ-εφηβείας, ενώ στη συνέχεια δεν παρουσιάζει κάποια μεταβολή. Τόσο ο πολλαπλασιασμός όσο και η απόπτωση των κυττάρων είναι διεργασίες που εξαρτώνται από την ενέργεια. Η ενέργεια με τη μορφή ATP παρέχεται μέσω της γλυκόλυσης και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Τα T κύτταρα στο λύκο είναι γνωστό ότι εκδηλώνουν συνεχή εξάντληση του ATP, γεγονός που μειώνει την φυσιολογική

απόπτωση και αντιθέτως οδηγεί στη νέκρωση των T κυττάρων, διεγείροντας έτσι τη φλεγμονή στην ασθένεια [144]. Η αλλοπουρινόλη και το κύριο μεταβολικό της προϊόν, η οξυπουρινόλη, είναι ανάλογα της υποξανθίνης και της ξανθίνης, αντίστοιχα. Και οι δύο αναστέλλουν το ένζυμο οξειδάση της ξανθίνης και παρεμποδίζουν τη μετατροπή της υποξανθίνης και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ. Αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου αυτού στους ασθενείς με ΣΕΛ οδηγεί σε αύξηση του ουρικού οξέος (υπερουριχαιμία), το οποίο επιδεινώνει τη φλεγμονή και τη νεφρική δυσλειτουργία και οδηγεί σε αρτηριακή υπέρταση [145]. Η *ουριδίνη (uridine)* εμφανίζει μειωμένη συγκέντρωση κατά το στάδιο της νεφρίτιδας. Η ουριδίνη σχετίζεται στενά με την ομοιόσταση του οργανισμού, ρυθμίζοντας την ομοιόσταση της γλυκόζης, τον μεταβολισμό των λιπιδίων και τον μεταβολισμό των αμινοξέων [146]. Μειωμένα επίπεδα ουριδίνης έχουν αναφερθεί και σε μία μεταβολομική μελέτη [147] που πραγματοποιήθηκε στον ορό του αίματος ασθενών με ΣΕΛ. Η ασθένεια του ΣΕΛ έχει συσχετιστεί με υπερδραστήρια μεταβολική οδό φωσφορικής πεντόζης (pentose phosphate pathway, PPP)· η 5-φωσφορική ριβόζη που παράγεται από το υπερδραστήριο PPP μεταβολίζεται σε ριβόζη 1,5-διφωσφορικό αντί για πυροφωσφορικό φωσφοριβύλιο, που οδηγεί σε μειωμένη βιοσύνθεση αμινοξέων, πυριμιδινών και πουρινών [148].

Η παρούσα μεταβολομική μελέτη μας έδωσε ακόμη τη δυνατότητα να μελετήσουμε τα διαφορετικά στάδια εξέλιξης της νόσου λαμβάνοντας υπόψη την ικανότητα διάκρισης του σταδίου προ-εφηβείας (1 μήνας) από το πιο σοβαρό στάδιο νεφρίτιδας λύκου (6 μήνες). Συνολικά 12 μεταβολίτες άλλαξαν σημαντικά στην ομάδα SLE κατά τα στάδια αυτά, οι περισσότεροι από τους οποίους συμφωνούν με τα αποτελέσματα της συγκριτικής ανάλυσης των ομάδων H και SLE στις τρεις διαφορετικές ηλικίες. Επιπλέον, η *ισολευκίνη (isoleucine)*, η *τυροσίνη (tyrosine)*, το *γαλακτικό οξύ (lactic acid)*, η *χολίνη (choline)* και το *νικοτιναμίδιο (niacinamide)* δείχνουν μειωμένα επίπεδα συγκεντρώσεων στο στάδιο της νεφρίτιδας. Η μείωση των αμινοξέων και της χολίνης είναι αναμενόμενα σύμφωνα με τα προηγούμενα ευρήματά μας. Συγκεκριμένα για την τυροσίνη, μειωμένα επίπεδα της έχουν βρεθεί σε ασθενείς με νεφρική νόσο τελικού σταδίου λόγω μειωμένης μετατροπής της φαινυλαλανίνης σε τυροσίνη στους νεφρούς [149]. Η χολίνη, ως δότης μεθυλομάδας, είναι επίσης πιθανό να περιστελλεί και άλλους μοριακούς μηχανισμούς που εξαρτώνται από τη μεθυλίωση, συμπεριλαμβανομένων της μεθυλίωσης του DNA και των ιστονών και το μεταβολισμό των λιπιδίων. Η μείωση των επιπέδων του γαλακτικού οξέος υποδηλώνει διαταραγμένο μεταβολισμό της γλυκόζης με μειωμένη αερόβια γλυκολυτική δραστηριότητα. Το NAD<sup>+</sup> αποτελεί ένα σημαντικό υπόστρωμα στη γλυκόλυση. Μπορεί να δημιουργηθεί de novo από την τρυπτοφάνη, ένα απαραίτητο αμινοξύ. Το νικοτιναμίδιο (βιταμίνη B3) και το ασπαρτικό οξύ

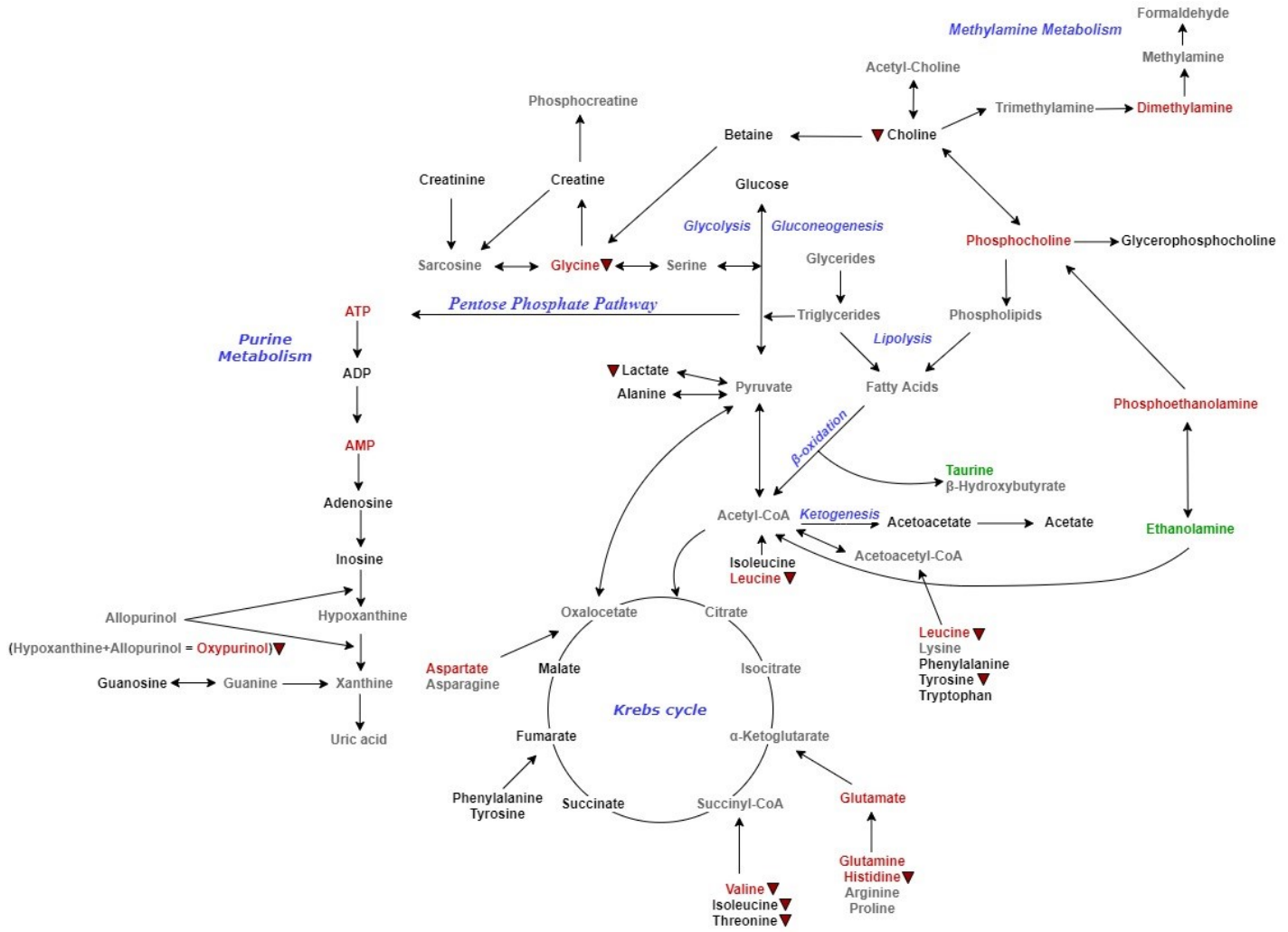
είναι επίσης πρόδρομοι του  $\text{NAD}^+$ , καθιστώντας το μόριο αυτό κεντρικό σε πολλές μεταβολικές οδούς. Τα μονοκύτταρα στο λύκο εμφανίζουν μειωμένη γλυκόλυση και έτσι λιγότερα μόρια άνθρακα εισάγονται στον κύκλο του Krebs και στην παραγωγή γαλακτικού οξέος [150]. Η χαμηλή λοιπόν γλυκολυτική δραστηριότητα φαίνεται να έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του νικοτιναμιδίου μέσω του  $\text{NAD}^+$ .

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον στα αποτελέσματά μας παρουσιάζει ο *άγνωστος (unkown)* μεταβολίτης στα **3.11 ppm**, ο οποίος φαίνεται να συμβάλει έντονα στο διαχωρισμό της ομάδας SLE από την ομάδα H και στις τρεις διαφορετικές ηλικίες, παρουσιάζοντας μάλιστα στατιστικά σημαντική αύξηση στην ομάδα του λύκου. Και από την μελέτη χρονοσειράς, ο μεταβολίτης αυτός εμφανίζει υψηλή τιμή VIP στην πολυπαραμετρική ανάλυση των ηλικιών 1 μήνα με 6 μηνών, και εντοπίζεται σε διπλάσια επίπεδα στο στάδιο της νεφρίτιδας, όπως προκύπτει από τη μονοπαραμετρική ανάλυση.

Από τη μονοπαραμετρική ανάλυση είχαμε ακόμη τη δυνατότητα να παρατηρήσουμε στατιστικά σημαντικές διαφορές του σταδίου προ-αυτοανοσίας (3 μήνες) από την πιο σοβαρή ομάδα νεφρίτιδας λύκου (6 μήνες). Είναι σημαντικό να αναφερθούμε στην *ταυρίνη*, η οποία ενώ κατά το στάδιο προ-αυτοανοσίας είναι αυξημένη στα πρότυπα SLE σε σύγκριση με τα πρότυπα H, από την ανάλυση χρονοσειράς στα πρότυπα SLE δείχνει σημαντική μείωση από το στάδιο προ-αυτοανοσίας προς το στάδιο της νεφρίτιδας. Το εύρημα αυτό φαίνεται να συμφωνεί με μία άλλη μεταβολομική μελέτη που πραγματοποιήθηκε στα ούρα ασθενών με ΝΛ, με στόχο να εντοπίσει τους μεταβολίτες που διαφοροποιούν τις κλάσεις III/IV και V στην ΝΛ [87]. Η ταυρίνη βρέθηκε στα ούρα των ασθενών κλάσης III/IV (η κλάση αυτή αποτελεί τη σοβαρότερη μορφή νεφρίτιδας του λύκου) σε ιδιαιτέρως μειωμένες συγκεντρώσεις. Η ταυρίνη είναι γνωστό ότι δρα ως αντιοξειδωτικό σε μια ποικιλία in vitro και in vivo συστημάτων, και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της νεφρικής δυσλειτουργίας [151]. Επομένως, είναι πιθανό οι νεφροί υπό τη σοβαρή κατάσταση της νεφρίτιδας, να χρησιμοποιήσαν όλη τη διαθέσιμη ταυρίνη σε μια προσπάθεια διαχείρισης ή επιδιόρθωσης της παθολογίας των νεφρών. Άλλοι μεταβολίτες που εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα στο στάδιο της νεφρίτιδας στα πρότυπα του λύκου είναι το *ATP*, το *ADP*, το *NAD<sup>+</sup>* και η *μυο-ινοσιτόλη*, με την τελευταία μάλιστα να παρουσιάζει αύξηση στην αντίστοιχη ηλικία των υγιών προτύπων, και η *θρεονίνη (threonine)* που εκδηλώνει μία όχι ιδιαίτερα σημαντική αύξηση κατά το στάδιο αυτό.



Τέλος, δημιουργήθηκε ένα σχεδιάγραμμα των μεταβολικών οδών, στις οποίες συμμετέχουν οι σημαντικοί μεταβολίτες όπως προέκυψαν από τη σύγκριση της ομάδας των προτύπων λύκου (SLE) με την ομάδα των υγιών προτύπων (H) και στις τρεις ηλικίες. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται και η μεταβολή τους στην κατάσταση της ασθένειας. Ακόμη, αναφέρονται ορισμένοι από τους μεταβολίτες που βρέθηκαν στατιστικά σημαντικοί κατά την ανάλυση χρονοσειράς των προτύπων SLE ηλικίας 1 και 6 μηνών (Διάγραμμα 1).



Green: Increased metabolites in SLE

Red: Decreased metabolites in SLE

1mo vs 6mo SLE: Decreased metabolites at 6mo ▼

**Διάγραμμα 1:** Σχηματική αναπαράσταση των μεταβολικών οδών που μεταβάλλονται στα πρότυπα του λύκου (SLE). Με πράσινο και με κόκκινο χρώμα συμβολίζονται οι μεταβολίτες που εμφανίζουν υψηλότερα και χαμηλότερα επίπεδα στα πρότυπα SLE σε σύγκριση με τα υγιή πρότυπα (H), αντίστοιχα. Με το ▼ συμβολίζονται οι μεταβολίτες που βρέθηκαν σε μειωμένα επίπεδα στην ηλικία των 6 μηνών στα πρότυπα SLE συγκριτικά με την ηλικία 1 μήνα του ίδιου προτύπου. Οι υπόλοιποι μεταβολίτες που έχουν αναγνωρισθεί στα δείγματα παρουσιάζονται με μαύρο χρώμα.

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση  $^1\text{H-NMR}$  στα υδατικά εκχυλίσματα των νεφρών από μύες NZBxNZW/F1 που αυθόρμητα εμφανίζουν την ασθένεια του ΣΕΛ. Από την πολυπαραμετρική ανάλυση προέκυψε ικανοποιητικός διαχωρισμός της ομάδας των προτύπων λύκου (SLE) από την ομάδα των υγιών προτύπων (H), αλλά και του σταδίου προ-εφηβείας από το σοβαρό στάδιο νεφρίτιδας λύκου στη μελέτη χρονοσειράς των προτύπων SLE. Διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια εντοπίστηκαν με βάση τους μεταβολίτες που διαφοροποιήθηκαν στις εξεταζόμενες ομάδες, τα οποία πιθανώς σχετίζονται με την παθογένεση στο ΣΕΛ και τις νεφρικές επιπλοκές στην ΝΛ. Τα ευρήματά μας αποκάλυψαν σημαντικές μεταβολικές διαταραχές στο μεταβολισμό των αμινοξέων, όπου τα α-αμινοξέα εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα στο ΣΕΛ. Η ταυρίνη βρίσκεται σε αυξημένα επίπεδα κατά το στάδιο της προ-αυτοανοσίας αλλά μειώνεται σημαντικά το τελευταίο τρίμηνο που οδηγούμαστε προς το στάδιο της νεφρίτιδας. Άλλοι μεταβολίτες που εμφανίζονται σε μειωμένα επίπεδα κατά το διάστημα αυτό, όπως προέκυψε από τη μελέτη χρονοσειράς, είναι η μυο-ινοσιτόλη, το ATP, το ADP και το  $\text{NAD}^+$ , οι οποίοι σχετίζονται με τον ενεργειακό μεταβολισμό και την νεφρική λειτουργία. Διαπιστώνουμε ακόμη διαταραχή στο μεταβολισμό των γλυκεροφωσφολιπιδίων, ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα μειωμένα επίπεδα της χολίνης αλλά και της ουριδίνης κατά το στάδιο της νεφρίτιδας συγκριτικά με τον πρώτο μήνα, που πιθανώς συνδέονται και με επιγενετικούς μοριακούς μηχανισμούς στην ασθένεια μέσω μονοπατιών μεθυλίωσης.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] D. T. B. George Bertsias, Ricard Cervera, “Systemic Lupus Erythematosus: Pathogenesis and Clinical Features.” [Online]. Available: [https://www.eular.org/myuploaddata/files/sample chapter20\\_mod 17.pdf](https://www.eular.org/myuploaddata/files/sample%20chapter20_mod%2017.pdf).
- [2] G. K. Bertsias, J. E. Salmon, and D. T. Boumpas, “Therapeutic opportunities in systemic lupus erythematosus: State of the art and prospects for the new decade,” *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 69, no. 9, pp. 1603–1611, Sep-2010, doi: 10.1136/ard.2010.135186.
- [3] C. P. Mavragani and H. M. Moutsopoulos, “Lupus nephritis: Current issues,” *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 62, no. 9, pp. 795–798, 2003, doi: 10.1136/ard.62.9.795.
- [4] T. Dörner and R. Furie, “Novel paradigms in systemic lupus erythematosus,” *The Lancet*, vol. 393, no. 10188. Lancet Publishing Group, pp. 2344–2358, 08-Jun-2019, doi: 10.1016/S0140-6736(19)30546-X.
- [5] L. Ortega, D. Schultz, O. Lenz, V. Pardo, and G. Contreras, “Review: Lupus nephritis: pathologic features, epidemiology and a guide to therapeutic decisions,” *Lupus*, vol. 19, no. 5, pp. 557–574, Apr. 2010, doi: 10.1177/0961203309358187.
- [6] Daniel J. Wallace, *Lupus: The Essential Clinician’s Guide (Oxford American Rheumatology Library)*, 1st ed. New York, USA: Oxford University Press, Inc, 2008.
- [7] J. S. Cunha, ; Katarzyna Gilek-Seibert, and K. Gilek-Seibert, *Systemic Lupus Erythematosus: A Review of the Clinical Approach to Diagnosis and Update on Current Targeted Therapies*, vol. 99, no. 12. 2016, pp. 23–27.
- [8] C. F. Kuo *et al.*, “Familial aggregation of systemic lupus erythematosus and coaggregation of autoimmune diseases in affected families,” *JAMA Intern. Med.*, vol. 175, no. 9, pp. 1518–1526, Sep. 2015, doi: 10.1001/jamainternmed.2015.3528.
- [9] J. MacArthur *et al.*, “The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog),” *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, no. D1, pp. D896–D901, Jan. 2017, doi: 10.1093/nar/gkw1133.
- [10] C. D. Langefeld *et al.*, “Transancestral mapping and genetic load in systemic lupus erythematosus,” *Nat. Commun.*, vol. 8, Jul. 2017, doi: 10.1038/ncomms16021.

- [11] L. Chen, D. L. Morris, and T. J. Vyse, “Genetic advances in systemic lupus erythematosus: An update,” *Current Opinion in Rheumatology*, vol. 29, no. 5. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 423–433, 01-Sep-2017, doi: 10.1097/BOR.0000000000000411.
- [12] J. Bentham *et al.*, “Genetic association analyses implicate aberrant regulation of innate and adaptive immunity genes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus,” *Nat. Genet.*, vol. 47, no. 12, pp. 1457–1464, Dec. 2015, doi: 10.1038/ng.3434.
- [13] D. L. Morris *et al.*, “Genome-wide association meta-analysis in Chinese and European individuals identifies ten new loci associated with systemic lupus erythematosus,” *Nat. Genet.*, vol. 48, no. 8, pp. 940–946, Aug. 2016, doi: 10.1038/ng.3603.
- [14] K. B. Hanscombe *et al.*, “Genetic fine mapping of systemic lupus erythematosus MHC associations in Europeans and African Americans,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 27, no. 21, pp. 3813–3824, Nov. 2018, doi: 10.1093/hmg/ddy280.
- [15] C. M. Lanata *et al.*, “Genetic contributions to lupus nephritis in a multi-ethnic cohort of systemic lupus erythematosus patients,” 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0199003.
- [16] Y. Ghodke-Puranik and T. B. Niewold, “Immunogenetics of systemic lupus erythematosus: A comprehensive review,” *Journal of Autoimmunity*, vol. 64. Academic Press, pp. 125–136, 01-Nov-2015, doi: 10.1016/j.jaut.2015.08.004.
- [17] D. Deafen *et al.*, “A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus,” *Arthritis Rheum.*, vol. 35, no. 3, pp. 311–318, 1992, doi: 10.1002/art.1780350310.
- [18] C. J. Ulf-Møller, A. J. Svendsen, L. N. Viemose, and S. Jacobsen, “Concordance of autoimmune disease in a nationwide Danish systemic lupus erythematosus twin cohort,” *Semin. Arthritis Rheum.*, vol. 47, no. 4, pp. 538–544, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.semarthrit.2017.06.007.
- [19] C. P. Wild, “Complementing the genome with an ‘exposome’: The outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology,” *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, vol. 14, no. 8. pp. 1847–1850, Aug-2005, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-05-0456.
- [20] H. C. B. Leffers, T. Lange, C. Collins, C. J. Ulf-Møller, and S. Jacobsen, “The study of interactions between genome and exposome in the development of systemic lupus erythematosus,” *Autoimmunity Reviews*, vol. 18, no. 4. Elsevier B.V., pp. 382–392, 01-Apr-

2019, doi: 10.1016/j.autrev.2018.11.005.

- [21] C. G. Parks *et al.*, “Occupational exposure to crystalline silica and risk of systemic lupus erythematosus: A population-based, case-control study in the southeastern United States,” *Arthritis Rheum.*, vol. 46, no. 7, pp. 1840–1850, 2002, doi: 10.1002/art.10368.
- [22] C. G. Parks, G. S. Cooper, L. A. Nylander-French, J. F. Storm, and J. D. Archer, “Assessing Exposure to Crystalline Silica from Farm Work: A Population-based Study in the Southeastern United States,” *Ann. Epidemiol.*, vol. 13, no. 5, pp. 385–392.
- [23] C. G. Parks, G. S. Cooper, L. A. Nylander-French, J. F. Storm, and J. D. Archer, “Assessing exposure to crystalline silica from farm work: A population-based study in the southeastern United States,” *Ann. Epidemiol.*, vol. 13, no. 5, pp. 385–392, May 2003, doi: 10.1016/S1047-2797(03)00007-3.
- [24] J. M. Brown, A. J. Archer, J. C. Pfau, and A. Holian, “Silica accelerated systemic autoimmune disease in lupus-prone New Zealand mixed mice,” *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 131, no. 3, pp. 415–421, Mar. 2003, doi: 10.1046/j.1365-2249.2003.02094.x.
- [25] C. D. Lucas, N. Amft, and P. T. Reid, “Systemic lupus erythematosus complicating simple silicosis,” *Occup. Med. (Chic. Ill.)*, vol. 64, no. 5, pp. 387–390, 2014, doi: 10.1093/occmed/kqu060.
- [26] M. A. Bates *et al.*, “Silica Triggers Inflammation and Ectopic Lymphoid Neogenesis in the Lungs in Parallel with Accelerated Onset of Systemic Autoimmunity and Glomerulonephritis in the Lupus-Prone NZBWF1 Mouse,” *PLoS One*, vol. 10, no. 5, p. e0125481, May 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0125481.
- [27] K. M. Pollard, “Silica, silicosis, and autoimmunity,” *Front. Immunol.*, vol. 7, no. MAR, p. 97, Mar. 2016, doi: 10.3389/fimmu.2016.00097.
- [28] K. H. Costenbader *et al.*, “Cigarette Smoking and the Risk of Systemic Lupus Erythematosus: A Meta-Analysis,” *Arthritis and Rheumatism*, vol. 50, no. 3. *Arthritis Rheum*, pp. 849–857, Mar-2004, doi: 10.1002/art.20049.
- [29] S. U. Takvorian, J. F. Merola, and K. H. Costenbader, “Cigarette smoking, alcohol consumption and risk of systemic lupus erythematosus,” *Lupus*, vol. 23, no. 6, pp. 537–544, 2014, doi: 10.1177/0961203313501400.

- [30] J. Sanchez-Guerrero, E. W. Karlson, M. H. Liang, D. J. Hunter, F. E. Speizer, and G. A. Colditz, "Past use of oral contraceptives and the risk of developing systemic lupus erythematosus," *Arthritis Rheum.*, vol. 40, no. 5, pp. 804–808, 1997, doi: 10.1002/art.1780400505.
- [31] K. H. Costenbader, D. Feskanich, M. J. Stampfer, and E. W. Karlson, "Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women," *Arthritis Rheum.*, vol. 56, no. 4, pp. 1251–1262, Apr. 2007, doi: 10.1002/art.22510.
- [32] J. Wang, H. F. Pan, D. Q. Ye, H. Su, and X. P. Li, "Moderate alcohol drinking might be protective for systemic lupus erythematosus: A systematic review and meta-analysis," *Clinical Rheumatology*, vol. 27, no. 12. *Clin Rheumatol*, pp. 1557–1563, 2008, doi: 10.1007/s10067-008-1004-z.
- [33] R. Caricchio, L. McPhie, and P. L. Cohen, "Ultraviolet B Radiation-Induced Cell Death: Critical Role of Ultraviolet Dose in Inflammation and Lupus Autoantigen Redistribution," *J. Immunol.*, vol. 171, no. 11, pp. 5778–5786, Dec. 2003, doi: 10.4049/jimmunol.171.11.5778.
- [34] P. A. Fraser *et al.*, "Glutathione S-transferase M null homozygosity and risk of systemic lupus erythematosus associated with sun exposure: a possible gene-environment interaction for autoimmunity.," *J. Rheumatol.*, vol. 30, no. 2, 2003.
- [35] G. S. Wang *et al.*, "Ultraviolet B exposure of peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus inhibits DNA methylation," *Lupus*, vol. 18, no. 12, pp. 1037–1044, 2009, doi: 10.1177/0961203309106181.
- [36] Z. Wu, X. Li, H. Qin, X. Zhu, J. Xu, and W. Shi, "Ultraviolet B enhances DNA hypomethylation of CD4+ T cells in systemic lupus erythematosus via inhibiting DNMT1 catalytic activity," *J. Dermatol. Sci.*, vol. 71, no. 3, pp. 167–173, Sep. 2013, doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.04.022.
- [37] M. Barbhaiya and K. H. Costenbader, "Ultraviolet radiation and systemic lupus erythematosus," *Lupus*, vol. 23, no. 6, pp. 588–595, May 2014, doi: 10.1177/0961203314530488.
- [38] M. Zhang *et al.*, "Ultraviolet B decreases DNA methylation level of CD4+ T cells in patients with systemic lupus erythematosus," *Inflammopharmacology*, vol. 25, no. 2, pp. 203–210,

- Apr. 2017, doi: 10.1007/s10787-017-0321-8.
- [39] G. S. Cooper *et al.*, “Occupational and environmental exposures and risk of systemic lupus erythematosus: Silica, sunlight, solvents,” *Rheumatology*, vol. 49, no. 11, pp. 2172–2180, Jul. 2010, doi: 10.1093/rheumatology/keq214.
- [40] C. G. Parks *et al.*, “Insecticide use and risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in the Women’s Health Initiative Observational Study,” *Arthritis Care Res. (Hoboken)*, vol. 63, no. 2, pp. 184–194, Feb. 2011, doi: 10.1002/acr.20335.
- [41] C. G. Parks and A. J. De Roos, “Pesticides, chemical and industrial exposures in relation to systemic lupus erythematosus,” *Lupus*, vol. 23, no. 6. SAGE Publications Ltd, pp. 527–536, 2014, doi: 10.1177/0961203313511680.
- [42] E. C. Somers and B. C. Richardson, “Environmental exposures, epigenetic changes and the risk of lupus,” *Lupus*, vol. 23, no. 6, pp. 568–576, May 2014, doi: 10.1177/0961203313499419.
- [43] A. Bird, “Perceptions of epigenetics,” *Nat. 2007 4477143*, vol. 447, no. 7143, pp. 396–398, May 2007, doi: 10.1038/nature05913.
- [44] B. Richardson, L. Scheinbart, J. Strahler, L. Gross, S. Hanash, and M. Johnson, “Evidence for impaired t cell dna methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis,” *Arthritis Rheum.*, vol. 33, no. 11, pp. 1665–1673, 1990, doi: 10.1002/art.1780331109.
- [45] H. Long, H. Yin, L. Wang, M. E. Gershwin, and Q. Lu, “The critical role of epigenetics in systemic lupus erythematosus and autoimmunity,” *Journal of Autoimmunity*, vol. 74. Academic Press, pp. 118–138, 01-Nov-2016, doi: 10.1016/j.jaut.2016.06.020.
- [46] M. Teruel and A. H. Sawalha, “Epigenetic Variability in Systemic Lupus Erythematosus: What We Learned from Genome-Wide DNA Methylation Studies HHS Public Access,” *Curr Rheumatol Rep*, vol. 19, no. 6, p. 32, 2017, doi: 10.1007/s11926-017-0657-5.
- [47] R. Mazzone *et al.*, “The emerging role of epigenetics in human autoimmune disorders,” *Clinical Epigenetics*, vol. 11, no. 1. BioMed Central Ltd., pp. 1–15, 26-Feb-2019, doi: 10.1186/s13148-019-0632-2.
- [48] B. Richardson, “Epigenetically Altered T Cells Contribute to Lupus Flares,” *Cells*, vol. 8,

no. 2, p. 127, Feb. 2019, doi: 10.3390/cells8020127.

- [49] N. Hu *et al.*, “Abnormal histone modification patterns in lupus CD4+ T cells.,” *J. Rheumatol.*, vol. 35, no. 5, 2008.
- [50] L. Zhang, Y. Dai, W. Peng, J. Lu, Y. Zhang, and L. Wang, “Genome-wide analysis of histone H3 lysine 4 trimethylation in peripheral blood mononuclear cells of minimal change nephrotic syndrome patients,” *Am. J. Nephrol.*, vol. 30, no. 6, pp. 505–513, Dec. 2009, doi: 10.1159/000243811.
- [51] Z. Zhang, L. Song, K. Maurer, M. A. Petri, and K. E. Sullivan, “Global H4 acetylation analysis by ChIP-chip in systemic lupus erythematosus monocytes,” *Genes Immun.*, vol. 11, no. 2, pp. 124–133, Mar. 2010, doi: 10.1038/gene.2009.66.
- [52] W. Sui, F. Liu, J. Chen, M. Ou, and Y. Dai, “Microarray technology for analysis of microRNA expression in renal biopsies of lupus nephritis patients,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 1134, pp. 211–220, 2014, doi: 10.1007/978-1-4939-0326-9\_16.
- [53] S. K. Chauhan, V. V. Singh, R. Rai, M. Rai, and G. Rai, “Differential microRNA Profile and Post-Transcriptional Regulation Exist in Systemic Lupus Erythematosus Patients with Distinct Autoantibody Specificities,” *J. Clin. Immunol.*, vol. 34, no. 4, pp. 491–503, May 2014, doi: 10.1007/s10875-014-0008-5.
- [54] J.-Q. Chen *et al.*, “MicroRNA expression profiles identify disease-specific alterations in systemic lupus erythematosus and primary Sjögren’s syndrome,” *PLoS One*, vol. 12, no. 3, p. e0174585, Mar. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0174585.
- [55] M. Honarpisheh, P. Köhler, E. von Rauchhaupt, and M. Lech, “The involvement of microRNAs in modulation of innate and adaptive immunity in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis,” *Journal of Immunology Research*, vol. 2018. Hindawi Limited, 2018, doi: 10.1155/2018/4126106.
- [56] Q. Luo *et al.*, “Integrative analysis of long non-coding RNAs and messenger RNA expression profiles in systemic lupus erythematosus,” *Mol. Med. Rep.*, vol. 17, no. 3, pp. 3489–3496, Mar. 2018, doi: 10.3892/mmr.2017.8344.
- [57] C. N. Zhao, Y. M. Mao, L. N. Liu, X. M. Li, D. G. Wang, and H. F. Pan, “Emerging role of lncRNAs in systemic lupus erythematosus,” *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 106. Elsevier Masson SAS, pp. 584–592, 01-Oct-2018, doi: 10.1016/j.biopha.2018.06.175.

- [58] Z. Oaks and A. Perl, “Metabolic control of the epigenome in systemic Lupus erythematosus,” *Autoimmunity*, vol. 47, no. 4, pp. 256–264, 2014, doi: 10.3109/08916934.2013.834495.
- [59] G. Rinaldi, M. Rossi, and S.-M. Fendt, “Metabolic interactions in cancer: cellular metabolism at the interface between the microenvironment, the cancer cell phenotype and the epigenetic landscape,” *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, vol. 10, no. 1, p. e1397, Jan. 2018, doi: 10.1002/wsbm.1397.
- [60] Y. Li, G. Gorelik, F. M. Strickland, and B. C. Richardson, “Oxidative Stress, T Cell DNA Methylation, and Lupus,” *Arthritis Rheumatol.*, vol. 66, no. 6, pp. 1574–1582, Jun. 2014, doi: 10.1002/art.38427.
- [61] Y. Sohrabi *et al.*, “mTOR-Dependent Oxidative Stress Regulates oxLDL-Induced Trained Innate Immunity in Human Monocytes,” *Front. Immunol.*, vol. 9, no. JAN, p. 3155, Jan. 2019, doi: 10.3389/fimmu.2018.03155.
- [62] L. Shi *et al.*, “TSC1/mTOR-controlled metabolic-epigenetic cross talk underpins DC control of CD8+ T-cell homeostasis,” *PLoS Biol.*, vol. 17, no. 8, p. e3000420, Aug. 2019, doi: 10.1371/journal.pbio.3000420.
- [63] V. E. B. Hipolito *et al.*, “Enhanced translation expands the endo-lysosome size and promotes antigen presentation during phagocyte activation,” *PLoS Biol.*, vol. 17, no. 12, p. e3000535, 2019, doi: 10.1371/journal.pbio.3000535.
- [64] E. M. Tan *et al.*, “The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus,” *Arthritis Rheum.*, vol. 25, no. 11, pp. 1271–1277, 1982, doi: 10.1002/art.1780251101.
- [65] M. C. Hochberg, “Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus,” *Arthritis and rheumatism*, vol. 40, no. 9. *Arthritis Rheum*, p. 1725, 1997, doi: 10.1002/art.1780400928.
- [66] M. Petri *et al.*, “Derivation and validation of the systemic lupus international collaborating clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus,” *Arthritis Rheum.*, vol. 64, no. 8, pp. 2677–2686, Aug. 2012, doi: 10.1002/art.34473.
- [67] M. Aringer *et al.*, “2019 European League Against Rheumatism/ American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus,” *Ann Rheum Dis*,

vol. 78, pp. 1151–1159, 2019, doi: 10.1136/annrheumdis-2018-214819.

- [68] G. Bertsias, A. Fanouriakis, and D. T. Boumpas, “Treatment of Systemic Lupus Erythematosus,” in *Kelley and Firestein’s Textbook of Rheumatology*, Elsevier, 2017, pp. 1368-1388.e5.
- [69] G. Murphy and D. A. Isenberg, “New therapies for systemic lupus erythematosus — past imperfect, future tense,” *Nature Reviews Rheumatology*, vol. 15, no. 7. Nature Publishing Group, pp. 403–412, 01-Jul-2019, doi: 10.1038/s41584-019-0235-5.
- [70] O. Fiehn, “Metabolomics - The link between genotypes and phenotypes,” *Plant Mol. Biol.*, vol. 48, no. 1–2, pp. 155–171, 2002, doi: 10.1023/A:1013713905833.
- [71] J. Kang, L. Zhu, J. Lu, and X. Zhang, “Application of metabolomics in autoimmune diseases: Insight into biomarkers and pathology,” *Journal of Neuroimmunology*, vol. 279, no. C. Elsevier B.V., pp. 25–32, 2015, doi: 10.1016/j.jneuroim.2015.01.001.
- [72] D. Mathis and S. E. Shoelson, “Immunometabolism: An emerging frontier,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 11, no. 2. pp. 81–83, Feb-2011, doi: 10.1038/nri2922.
- [73] J. Freitag, L. Berod, T. Kamradt, and T. Sparwasser, “Immunometabolism and autoimmunity,” *Immunology and Cell Biology*, vol. 94, no. 10. Nature Publishing Group, pp. 925–934, 01-Nov-2016, doi: 10.1038/icb.2016.77.
- [74] C. Stathopoulou, D. Nikoleri, and G. Bertsias, “Immunometabolism: An overview and therapeutic prospects in autoimmune diseases,” *Immunotherapy*, vol. 11, no. 9. Future Medicine Ltd., pp. 813–829, 16-May-2019, doi: 10.2217/imt-2019-0002.
- [75] A. Perl, “Review: Metabolic Control of Immune System Activation in Rheumatic Diseases,” *Arthritis and Rheumatology*, vol. 69, no. 12. John Wiley and Sons Inc., pp. 2259–2270, 01-Dec-2017, doi: 10.1002/art.40223.
- [76] J. P. Rhoads, A. S. Major, and J. C. Rathmell, “Fine tuning of immunometabolism for the treatment of rheumatic diseases,” *Nature Reviews Rheumatology*, vol. 13, no. 5. Nature Publishing Group, pp. 313–320, 01-May-2017, doi: 10.1038/nrrheum.2017.54.
- [77] X. Ouyang, Y. Dai, J. L. Wen, and L. X. Wang, “<sup>1</sup>H NMR-based metabolomic study of metabolic profiling for systemic lupus erythematosus,” *Lupus*, vol. 20, no. 13, pp. 1411–1420, Nov. 2011, doi: 10.1177/0961203311418707.



- [78] T. Wu *et al.*, “Metabolic Disturbances Associated with Systemic Lupus Erythematosus,” *PLoS One*, vol. 7, no. 6, p. e37210, Jun. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0037210.
- [79] A. A. Bengtsson *et al.*, “Metabolic profiling of systemic lupus erythematosus and comparison with primary Sjögren’s syndrome and systemic sclerosis,” *PLoS One*, vol. 11, no. 7, pp. 1–15, Jul. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0159384.
- [80] A. Guleria *et al.*, “NMR based serum metabolomics reveals a distinctive signature in patients with Lupus Nephritis,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–11, Oct. 2016, doi: 10.1038/srep35309.
- [81] B. Yan *et al.*, “Serum metabolomic profiling in patients with systemic lupus erythematosus by GC/MS,” *Mod. Rheumatol.*, vol. 26, no. 6, pp. 914–922, Nov. 2016, doi: 10.3109/14397595.2016.1158895.
- [82] J. Li, X. W. Xie, H. Zhou, B. Wang, M. J. Zhang, and F. Y. Tang, “Metabolic profiling reveals new serum biomarkers of lupus nephritis,” *Lupus*, vol. 26, no. 11, pp. 1166–1173, Oct. 2017, doi: 10.1177/0961203317694256.
- [83] T. H. Shin *et al.*, “Analysis of the free fatty acid metabolome in the plasma of patients with systemic lupus erythematosus and fever,” *Metabolomics*, vol. 14, no. 1, Jan. 2018, doi: 10.1007/s11306-017-1308-6.
- [84] A. Guleria *et al.*, “NMR-Based Serum Metabolomics Reveals Reprogramming of Lipid Dysregulation Following Cyclophosphamide-Based Induction Therapy in Lupus Nephritis,” *J. Proteome Res.*, vol. 17, no. 7, pp. 2440–2448, Jul. 2018, doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00192.
- [85] Y. Li, L. Liang, X. Deng, and L. Zhong, “Lipidomic and metabolomic profiling reveals novel candidate biomarkers in active systemic lupus erythematosus,” *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, vol. 12, no. 3, pp. 857–866, 2019.
- [86] Bellocchi *et al.*, “Identification of a Shared Microbiomic and Metabolomic Profile in Systemic Autoimmune Diseases,” *J. Clin. Med.*, vol. 8, no. 9, p. 1291, Aug. 2019, doi: 10.3390/jcm8091291.
- [87] L. E. Romick-Rosendale *et al.*, “Identification of urinary metabolites that distinguish membranous lupus nephritis from proliferative lupus nephritis and focal segmental glomerulosclerosis,” *Arthritis Res. Ther.*, vol. 13, no. 6, Dec. 2011, doi: 10.1186/ar3530.

- [88] B. Yan *et al.*, “Urinary metabolomic study of systemic lupus erythematosus based on gas chromatography/mass spectrometry,” *Biomed. Chromatogr.*, vol. 30, no. 11, pp. 1877–1881, Nov. 2016, doi: 10.1002/bmc.3734.
- [89] S. Kalantari, S. Chashmnia, M. Nafar, Z. Zakeri, and M. Parvin, “Metabolomics approach reveals urine biomarkers and pathways associated with the pathogenesis of lupus nephritis,” *Iran. J. Basic Med. Sci.*, vol. 22, no. 11, pp. 1288–1295, 2019, doi: 10.22038/IJBMS.2019.38713.9178.
- [90] Q. Zhang *et al.*, “Fecal Metabolomics and Potential Biomarkers for Systemic Lupus Erythematosus,” *Front. Immunol.*, vol. 10, no. MAY, p. 976, May 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.00976.
- [91] R. Yan *et al.*, “Fecal Metabolites Were Altered, Identified as Biomarkers and Correlated With Disease Activity in Patients With Systemic Lupus Erythematosus in a GC-MS-Based Metabolomics Study,” *Front. Immunol.*, vol. 11, Sep. 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.02138.
- [92] B. Widner *et al.*, “Enhanced tryptophan degradation in systemic lupus erythematosus,” *Immunobiology*, vol. 201, no. 5, pp. 621–630, 2000, doi: 10.1016/S0171-2985(00)80079-0.
- [93] Z. Y. Xiang, A. G. Tang, Y. P. Ren, Q. X. Zhou, and X. B. Luo, “Simultaneous determination of serum tryptophan metabolites in patients with systemic lupus erythematosus by high performance liquid chromatography with fluorescence detection,” *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 48, no. 4, pp. 513–517, Apr. 2010, doi: 10.1515/CCLM.2010.105.
- [94] K. Åkesson *et al.*, “Kynurenine pathway is altered in patients with SLE and associated with severe fatigue,” *Lupus Sci. Med.*, vol. 5, no. 1, 2018, doi: 10.1136/lupus-2017-000254.
- [95] A. H. M. Emwas, “The strengths and weaknesses of NMR spectroscopy and mass spectrometry with particular focus on metabolomics research,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 1277, pp. 161–193, 2015, doi: 10.1007/978-1-4939-2377-9\_13.
- [96] J. K. Nicholson and I. D. Wilson, “High resolution proton magnetic resonance spectroscopy of biological fluids,” *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, vol. 21, no. 4–5, Pergamon, pp. 449–501, 01-Jan-1989, doi: 10.1016/0079-6565(89)80008-1.
- [97] H. C. Keun *et al.*, “Cryogenic probe <sup>13</sup>C NMR spectroscopy of urine for metabolomic

- studies,” *Anal. Chem.*, vol. 74, no. 17, pp. 4588–4593, Sep. 2002, doi: 10.1021/ac025691r.
- [98] J. H. Grimes and T. M. O’Connell, “The application of micro-coil NMR probe technology to metabolomics of urine and serum,” *J. Biomol. NMR*, vol. 49, no. 3–4, pp. 297–305, Apr. 2011, doi: 10.1007/s10858-011-9488-2.
- [99] J. H. Ardenkjær-Larsen *et al.*, “Increase in signal-to-noise ratio of >10,000 times in liquid-state NMR,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 18, pp. 10158–10163, Sep. 2003, doi: 10.1073/pnas.1733835100.
- [100] A.-H. Emwas, M. Saunders, C. Ludwig, and U. L. Günther, “Determinants for Optimal Enhancement in Ex Situ DNP Experiments,” *Appl. Magn. Reson*, vol. 34, no. 3–4, pp. 483–494, Aug. 2008, doi: 10.1007/s00723-008-0120-x.
- [101] S. E. Day *et al.*, “Detecting tumor response to treatment using hyperpolarized <sup>13</sup>C magnetic resonance imaging and spectroscopy,” *Nat. Med.*, vol. 13, no. 11, pp. 1382–1387, Nov. 2007, doi: 10.1038/nm1650.
- [102] C. Ludwig *et al.*, “Application of ex situ dynamic nuclear polarization in studying small molecules,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 12, no. 22, pp. 5868–5871, May 2010, doi: 10.1039/c002700f.
- [103] J. Kurhanewicz *et al.*, “Analysis of cancer metabolism by imaging hyperpolarized nuclei: Prospects for translation to clinical research,” *Neoplasia*, vol. 13, no. 2, pp. 81–97, 2011, doi: 10.1593/neo.101102.
- [104] L. Lumata, C. Yang, M. Ragavan, N. Carpenter, R. J. DeBerardinis, and M. E. Merritt, “Hyperpolarized <sup>13</sup>C Magnetic Resonance and Its Use in Metabolic Assessment of Cultured Cells and Perfused Organs,” in *Methods in Enzymology*, vol. 561, Academic Press Inc., 2015, pp. 73–106.
- [105] K. V. Kovtunov *et al.*, “Hyperpolarized NMR Spectroscopy: d-DNP, PHIP, and SABRE Techniques,” *Chemistry - An Asian Journal*, vol. 13, no. 15. John Wiley and Sons Ltd, pp. 1857–1871, 06-Aug-2018, doi: 10.1002/asia.201800551.
- [106] J. J. Alexander, C. Zwingmann, A. Jacob, and R. Quigg, “Alteration in kidney glucose and amino acids are implicated in renal pathology in MRL/lpr mice,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1772, no. 10, pp. 1143–1149, Oct. 2007, doi: 10.1016/j.bbadis.2007.07.002.

- [107] T. K. Nowling *et al.*, “Renal glycosphingolipid metabolism is dysfunctional in lupus nephritis,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 26, no. 6, pp. 1402–1413, Jun. 2015, doi: 10.1681/ASN.2014050508.
- [108] A. N. Theofilopoulos and F. J. Dixon, “Murine Models of Systemic Lupus Erythematosus,” *Adv. Immunol.*, vol. 37, no. C, pp. 269–390, Jan. 1985, doi: 10.1016/S0065-2776(08)60342-9.
- [109] F. J. Dixon, B. S. Andrews, R. A. Eisenberg, P. J. McConahey, A. N. Theofilopoulos, and C. B. Wilson, “Etiology and pathogenesis of a spontaneous lupus-like syndrome in mice,” *Arthritis Rheum.*, vol. 21, no. 1 S, pp. S64–S67, Jun. 1978, doi: 10.1002/art.1780210909.
- [110] D. Benaki and E. Mikros, “NMR-based metabolic profiling procedures for biofluids and cell and tissue extracts,” in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1738, Humana Press Inc., 2018, pp. 117–131.
- [111] D. S. Wishart *et al.*, “HMDB 4.0: The human metabolome database for 2018,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, no. D1, pp. D608–D617, Jan. 2018, doi: 10.1093/nar/gkx1089.
- [112] I. T. Jolliffe, *Principal Component Analysis*. NY, USA: Springer: New York, 1986.
- [113] M. Barker and W. Rayens, “Partial least squares for discrimination,” *J. Chemom.*, vol. 17, no. 3, pp. 166–173, Mar. 2003, doi: 10.1002/cem.785.
- [114] J. Trygg and S. Wold, “Orthogonal projections to latent structures (O-PLS),” *J. Chemom.*, vol. 16, no. 3, pp. 119–128, 2002, doi: 10.1002/cem.695.
- [115] B. Worley and R. Powers, “Multivariate Analysis in Metabolomics,” *Curr. Metabolomics*, vol. 1, no. 1, pp. 92–107, 2013, doi: 10.2174/2213235X11301010092.
- [116] J. F. Wu and Y. Wang, “Multivariate analysis of metabolomics data,” in *Plant Metabolomics: Methods and Applications*, Springer Netherlands, 2015, pp. 105–122.
- [117] G. Musumarra, V. Barresi, D. F. Condorelli, C. G. Fortuna, and S. Scirè, “Potentialities of multivariate approaches in genome-based cancer research: identification of candidate genes for new diagnostics by PLS discriminant analysis,” *J. Chemom.*, vol. 18, no. 34, pp. 125–132, Mar. 2004, doi: 10.1002/cem.846.
- [118] D. K. Trivedi, “The Application of SIMCA P+ in Shotgun Metabolomics Analysis of ZIC® HILIC-MS Spectra of Human Urine - Experience with the Shimadzu IT-T of and Profiling

- Solutions Data Extraction Software,” *J. Chromatogr. Sep. Tech.*, vol. 03, no. 06, 2012, doi: 10.4172/2157-7064.1000145.
- [119] S. Wiklund *et al.*, “Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models,” *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 1, pp. 115–122, Jan. 2008, doi: 10.1021/ac0713510.
- [120] B. Xi, H. Gu, H. Baniasadi, and D. Raftery, “Statistical analysis and modeling of mass spectrometry-based metabolomics data,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 1198, pp. 333–353, 2014, doi: 10.1007/978-1-4939-1258-2\_22.
- [121] K. H. Zou, W. J. Hall, and D. E. Shapiro, “Smooth non-parametric receiver operating characteristic (ROC) curves for continuous diagnostic tests,” *Stat. Med.*, vol. 16, no. 19, pp. 2143–2156, Oct. 1997, doi: 10.1002/(SICI)1097-0258(19971015)16:19<2143::AID-SIM655>3.0.CO;2-3.
- [122] M. S. Pepe, “Limitations of the Odds Ratio in Gauging the Performance of a Diagnostic, Prognostic, or Screening Marker,” *Am. J. Epidemiol.*, vol. 159, no. 9, pp. 882–890, May 2004, doi: 10.1093/aje/kwh101.
- [123] J. Xia, D. I. Broadhurst, M. Wilson, and D. S. Wishart, “Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: An introductory tutorial,” *Metabolomics*, vol. 9, no. 2, pp. 280–299, 2013, doi: 10.1007/s11306-012-0482-9.
- [124] R. Aggarwal and P. Ranganathan, “Understanding diagnostic tests - Part 3: Receiver operating characteristic curves,” *Perspect. Clin. Res.*, vol. 9, no. 3, pp. 145–148, Jul. 2018, doi: 10.4103/picr.PICR\_87\_18.
- [125] J. Chong *et al.*, “MetaboAnalyst 4.0: Towards more transparent and integrative metabolomics analysis,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, no. W1, pp. W486–W494, Jul. 2018, doi: 10.1093/nar/gky310.
- [126] Y. C. Tai and T. P. Speed, “A multivariate empirical Bayes statistic for replicated microarray time course data,” *Ann. Stat.*, vol. 34, no. 5, pp. 2387–2412, Oct. 2006, doi: 10.1214/009053606000000759.
- [127] Z. Oaks *et al.*, “Mitochondrial Dysfunction in the Liver and Antiphospholipid Antibody Production Precede Disease Onset and Respond to Rapamycin in Lupus-Prone Mice,” *Arthritis Rheumatol.*, vol. 68, no. 11, pp. 2728–2739, Nov. 2016, doi: 10.1002/art.39791.

- [128] H. Yang, X. Xiong, T. Li, and Y. Yin, "Ethanolamine enhances the proliferation of intestinal epithelial cells via the mTOR signaling pathway and mitochondrial function," *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.*, vol. 52, no. 5, pp. 562–567, May 2016, doi: 10.1007/s11626-016-0002-8.
- [129] B. N. Desai, B. R. Myers, and S. L. Schreiber, "FKBP12-rapamycin-associated protein associates with mitochondria and senses osmotic stress via mitochondrial dysfunction," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 7, pp. 4319–4324, Apr. 2002, doi: 10.1073/pnas.261702698.
- [130] D. R. Fernandez *et al.*, "Activation of Mammalian Target of Rapamycin Controls the Loss of TCR $\zeta$  in Lupus T Cells through HRES-1/Rab4-Regulated Lysosomal Degradation," *J. Immunol.*, vol. 182, no. 4, pp. 2063–2073, Feb. 2009, doi: 10.4049/jimmunol.0803600.
- [131] C.-N. Hsu, G.-P. Chang-Chien, S. Lin, C.-Y. Hou, P.-C. Lu, and Y.-L. Tain, "Association of Trimethylamine, Trimethylamine N-oxide, and Dimethylamine with Cardiovascular Risk in Children with Chronic Kidney Disease," *J. Clin. Med.*, vol. 9, no. 2, p. 336, Jan. 2020, doi: 10.3390/jcm9020336.
- [132] Z. Y. Tsun and R. Possemato, "Amino acid management in cancer," *Seminars in Cell and Developmental Biology*, vol. 43. Academic Press, pp. 22–32, 01-Jul-2015, doi: 10.1016/j.semcdb.2015.08.002.
- [133] H. T. Lee *et al.*, "Alterations of oxygen consumption and extracellular acidification rates by glutamine in PBMCs of SLE patients," *Mitochondrion*, vol. 44, pp. 65–74, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.mito.2018.01.002.
- [134] M. Watanabe *et al.*, "Consequences of low plasma histidine in chronic kidney disease patients: Associations with inflammation, oxidative stress, and mortality," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 87, no. 6, pp. 1860–1866, Jun. 2008, doi: 10.1093/ajcn/87.6.1860.
- [135] R. W. Chesney, X. Han, and A. B. Patters, "Taurine and the renal system," in *Journal of Biomedical Science*, 2010, vol. 17, no. SUPPL. 1, p. S4, doi: 10.1186/1423-0127-17-S1-S4.
- [136] J. Li *et al.*, "Taurine Metabolism Aggravates the Progression of Lupus by Promoting the Function of Plasmacytoid Dendritic Cells," *Arthritis Rheumatol.*, vol. 72, no. 12, pp. 2106–2117, Dec. 2020, doi: 10.1002/art.41419.
- [137] H. Eagle, V. I. Oyama, M. Levy, and A. Freeman, "Myo-inositol as an essential growth

- factor for normal and malignant human cells in tissue culture,” *Science (80-. )*, vol. 123, no. 3202, pp. 845–847, 1956, doi: 10.1126/science.123.3202.845-a.
- [138] G. Hauser and V. N. Finelli, “The Biosynthesis of Free and Phosphatide Myo-inositol from Glucose by Mammalian Tissue Slices\*,” 1963.
- [139] M. L. Croze and C. O. Soulage, “Potential role and therapeutic interests of myo-inositol in metabolic diseases,” *Biochimie*, vol. 95, no. 10. Elsevier, pp. 1811–1827, 01-Oct-2013, doi: 10.1016/j.biochi.2013.05.011.
- [140] K. Xia *et al.*, “Discovery of systematic responses and potential biomarkers induced by ochratoxin A using metabolomics,” *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.*, vol. 31, no. 11, pp. 1904–1913, Nov. 2014, doi: 10.1080/19440049.2014.957249.
- [141] T. Niwa, N. Yamamoto, K. Maeda, K. Yamada, T. Ohki, and M. Mori, “Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of polyols in urine and serum of uremic patients. Identification of new deoxyalditols and inositol isomers,” *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 277, no. C, pp. 25–39, Jan. 1983, doi: 10.1016/S0378-4347(00)84820-3.
- [142] M. L. Croze, A. Géloën, and C. O. Soulage, “Abnormalities in myo-inositol metabolism associated with type 2 diabetes in mice fed a high-fat diet: Benefits of a dietary myo-inositol supplementation,” *Br. J. Nutr.*, vol. 113, no. 12, pp. 1862–1875, Jun. 2015, doi: 10.1017/S000711451500121X.
- [143] A. G. Del Castillo *et al.*, “Increased myo-inositol in parietal white and gray matter as a biomarker of poor prognosis in neuropsychiatric lupus: A case report,” *Lupus*, vol. 23, no. 10, pp. 1073–1078, Sep. 2014, doi: 10.1177/0961203314534303.
- [144] P. Gergely *et al.*, “Mitochondrial hyperpolarization and ATP depletion in patients with systemic lupus erythematosus,” *Arthritis Rheum.*, vol. 46, no. 1, pp. 175–190, Jan. 2002, doi: 10.1002/1529-0131(200201)46:1<175::AID-ART10015>3.0.CO;2-H.
- [145] M. Sheikh, S. Movassaghi, M. Khaledi, and M. Moghaddassi, “Hyperuricemia in systemic lupus erythematosus: is it associated with the neuropsychiatric manifestations of the disease?,” *Rev. Bras. Reumatol. (English Ed.)*, vol. 56, no. 6, pp. 471–477, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.rbre.2015.07.011.

- [146] Y. Zhang, S. Guo, C. Xie, and J. Fang, "Uridine Metabolism and Its Role in Glucose, Lipid, and Amino Acid Homeostasis," *BioMed Research International*, vol. 2020. Hindawi Limited, 2020, doi: 10.1155/2020/7091718.
- [147] J. Saegusa *et al.*, "GC/MS-based metabolomics detects metabolic alterations in serum from SLE patients," *Clinical and Experimental Rheumatology*, vol. 32, no. 1. p. 148, 2014.
- [148] D. Rojo *et al.*, "Ranking the impact of human health disorders on gut metabolism: Systemic lupus erythematosus and obesity as study cases," *Sci. Rep.*, vol. 5, Feb. 2015, doi: 10.1038/srep08310.
- [149] Y. Boirie, R. Albright, M. Bigelow, and K. S. Nair, "Impairment of phenylalanine conversion to tyrosine in end-stage renal disease causing tyrosine deficiency," *Kidney Int.*, vol. 66, no. 2, pp. 591–596, 2004, doi: 10.1111/j.1523-1755.2004.00778.x.
- [150] R. Phillips, R. Lomnitzer, A. A. Wadee, and A. R. Rabson, "Defective monocyte function in patients with systemic lupus erythematosus," *Clin. Immunol. Immunopathol.*, vol. 34, no. 1, pp. 69–76, 1985, doi: 10.1016/0090-1229(85)90008-X.
- [151] H. Trachtman and J. A. Sturman, "Taurine: A therapeutic agent in experimental kidney disease," *Amino Acids*, vol. 11, no. 1, pp. 1–13, 1996, doi: 10.1007/BF00805717.



# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

## Παράρτημα 1

Μελέτη χρονοσειράς υγιών προτύπων (Healthy) και προτύπων λύκου (SLE)

**Πίνακας Π.1 1:** Μεταβολίτες που συμβάλλουν στον διαχωρισμό των διαφορετικών ηλικιών 1 μήνα και 3 μηνών της ομάδας των υγιών προτύπων (Healthy) κατά σειρά μειούμενης τιμής VIP.

No	Metabolite	S plot	VIP Value	Variation (S plot)
1	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.2325	13.3449	↑3mo
2	Myo-Inositol+Betaine	3.2675	13.2053	↑1mo
3	Choline	3.2075	9.16539	↑3mo
4	Myo-Inositol	3.6275	6.87493	↑1mo
5	Myo-Inositol+Glycerol	3.5475	6.11145	↑1mo
6	Glycine	3.5625	5.83613	↑3mo
7	Choline	3.2025	5.82027	↑3mo
8	Betaine+Aspartic Acid	3.8975	5.73975	↑1mo
9	Myo-Inositol	3.5425	5.4984	↑1mo
10	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.2275	4.88027	↑3mo
11	Myo-Inositol	3.6125	4.79398	↑1mo
12	O-Phosphocholine	3.2225	4.77711	↑1mo
13	Myo-Inositol	3.2875	4.51439	↑1mo
14	Myo-Inositol+Taurine+Betaine	3.2725	4.43757	↑1mo
15	Myo-Inositol	3.5275	4.27057	↑1mo
16	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6775	4.19911	↑3mo
17	sn-Glycero-3-phosphocholine +Glycerol	3.6725	4.0982	↑3mo
18	Myo-Inositol	3.3025	4.06653	↑1mo
19	Myo-Inositol	4.0725	3.84639	↑1mo
20	Myo-Inositol+ Choline	3.5325	3.82994	↑1mo
21	Glutamic Acid	2.3525	3.68131	↑3mo
22	Glutamic Acid	2.3575	3.61508	↑3mo
23	Choline+Myo-Inositol	4.0675	3.59829	↑1mo
24	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6875	3.5586	↑3mo
25	Myo-Inositol+Glycerol	3.6425	3.28785	↑1mo
26	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6825	3.27932	↑3mo
27	UN	2.6525	3.18152	↑1mo
28	Guanidoacetate+Glycerol+Alanine	3.7925	3.14019	↑1mo
29	UN	3.3625	3.08883	↑1mo
30	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.9175	2.88452	↑3mo
31	sn-Glycero-3-phosphocholine	4.3325	2.80592	↑3mo
32	Guanidoacetate+Glycerol	3.7975	2.79815	↑1mo

33	Glutamic Acid	2.3425	2.70777	↑3mo
34	Choline	3.5225	2.70175	↑3mo
35	Myo-Inositol+sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6225	2.69505	↑3mo
36	Glutamic Acid	3.7575	2.65959	↑3mo
37	Myo-Inositol+Glycerol	3.6475	2.62182	↑1mo
38	Glutamic Acid+Glutamine	3.7625	2.62014	↑3mo
39	sn-Glycero-3-phosphocholine +Creatine+Inosine	3.9275	2.53109	↑3mo
40	sn-Glycero-3-phosphocholine+Aspartic Acid	3.9075	2.50575	↑3mo
41	sn-Glycero-3-phosphocholine	4.3275	2.4273	↑3mo
42	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.9225	2.42703	↑3mo
43	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.8825	2.40846	↑3mo
44	sn-Glycero-3-phosphocholine	4.3375	2.39915	↑3mo
45	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.2375	2.39035	↑3mo
46	Myo-Inositol	3.5525	2.38379	↑1mo
47	sn-Glycero-3-phosphocholine +Asp	3.9125	2.31532	↑3mo
48	sn-Glycero-3-phosphocholine +Asp	3.8925	2.30705	↑3mo
49	Aspartic Acid+Malic Acid	2.6625	2.29366	↑1mo
50	Choline	3.5125	2.28333	↑3mo
51	Glutamic Acid	3.7525	2.26729	↑3mo
52	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6975	2.26288	↑3mo
53	sn-Glycero-3-phosphocholine	4.3225	2.23827	↑3mo
54	Choline	3.2125	2.20854	↑3mo
55	Glutamic Acid+Malic Acid	2.3725	2.17614	↑3mo
56	UN	3.4875	2.15463	↑3mo
57	Glutamic Acid	2.0775	2.15124	↑3mo
58	UN	3.3725	2.13527	↑1mo
59	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6925	2.12859	↑3mo
60	UN	3.4675	2.09838	↑3mo
61	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.8725	2.08381	↑3mo
62	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.9575	2.07605	↑3mo
63	Cystine	4.1075	1.98986	↑3mo
64	Glutamic Acid+Glutamine	2.1275	1.95461	↑3mo
65	Cystine	3.4075	1.94773	↑3mo
66	Methanol	3.3575	1.90406	↑3mo
67	Glutamic Acid	2.0525	1.87865	↑3mo
68	Choline	4.0575	1.86461	↑3mo
69	sn-Glycero-3-phosphocholine	4.3425	1.81987	↑3mo
70	UN	1.2525	1.78081	↑3mo
71	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.9525	1.76991	↑3mo
72	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.9325	1.74793	↑3mo
73	Myo-Inositol	4.0775	1.73188	↑1mo
74	Sn-GPC	3.9425	1.6988	↑3mo
75	Glutamic Acid	2.3475	1.65539	↑3mo

76	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.9025	1.63721	↑3mo
77	Lactic Acid	4.1175	1.61748	↑3mo
78	Glutamic Acid+Glutamine	2.1425	1.603	↑3mo
79	Succinic Acid	2.4025	1.59812	↑3mo
80	Cystine	3.4025	1.58665	↑3mo
81	Glutamic Acid+Glutamine	2.1175	1.57785	↑3mo
82	sn-Glycero-3-phosphocholine +Malic Acid	4.3175	1.56459	↑3mo
83	Glutamine	2.4175	1.5645	↑3mo
84	Creatinine + UN	4.0525	1.5631	↑3mo
85	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.8775	1.53642	↑3mo
86	Glutamic Acid	2.0625	1.52943	↑3mo
87	UN	3.8025	1.52597	↑1mo
88	Glutamic Acid	2.0675	1.52128	↑3mo
89	Lactate+Cystine	4.1125	1.49001	↑3mo
90	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6025	1.47587	↑3mo

*Πίνακας Π.1 2:* Μεταβολίτες που συμβάλλουν στον διαχωρισμό των διαφορετικών ηλικιών 1 μήνα και 6 μηνών της ομάδας των υγιών προτύπων (Healthy) κατά σειρά μειούμενης τιμής VIP.

No	Metabolite	S plot	VIP Value	Variation (S plot)
1	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.2325	15.8141	↑6mo
2	Myo-Inositol+Betaine	3.2675	11.9169	↑1mo
3	O-Phosphocholine	3.2225	6.96051	↑1mo
4	Myo-Inositol	3.6275	5.71266	↑1mo
5	Myo-Inositol+Glycerol	3.5475	4.97712	↑1mo
6	sn-Glycero-3-phosphocholine +Glycerol	3.6725	4.94139	↑6mo
7	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6775	4.93893	↑6mo
8	Betaine	3.8975	4.81666	↑1mo
9	Myo-Inositol	3.5425	4.52052	↑1mo
10	Glycine	3.5625	4.13557	↑6mo
11	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6875	4.09504	↑6mo
12	Myo-Inositol+Glycerol	3.6825	4.08049	↑6mo
13	Choline	3.2075	3.97289	↑6mo
14	Myo-Inositol	3.5275	3.81246	↑1mo
15	sn-Glycero-3-phosphocholine+Aspartic Acid	3.8925	3.56317	↑6mo
16	Myo-Inositol	3.5325	3.49658	↑1mo
17	Myo-Inositol	3.2875	3.4093	↑1mo
18	Myo-Inositol	3.6125	3.3968	↑1mo
19	sn-Glycero-3-phosphocholine	4.3325	3.32684	↑6mo
20	sn-Glycero-3-phosphocholine+Aspartic Acid	3.9075	3.3262	↑6mo
21	Myo-Inositol	4.0675	3.26018	↑1mo
22	Guanidoacetate+Glycerol	3.7975	3.23131	↑1mo

23	Myo-Inositol	4.0725	3.22654	↑1mo
24	sn-Glycero-3-phosphocholine+Aspartic Acid	3.9125	3.17824	↑6mo
25	UN	2.6525	3.10816	↑1mo
26	UN	3.3625	3.02014	↑1mo
27	Myo-Inositol+sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6225	2.99301	↑6mo
28	sn-Glycero-3-phosphocholine	4.3275	2.99258	↑6mo
29	Myo-Inositol+Glycerol	3.6425	2.9239	↑1mo
30	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.9175	2.89891	↑6mo
31	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.2375	2.89725	↑6mo
32	sn-Glycero-3-phosphocholine	4.3375	2.8926	↑6mo
33	UN	3.4875	2.75362	↑6mo
34	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6925	2.72242	↑6mo
35	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.9025	2.70062	↑6mo
36	sn-Glycero-3-phosphocholine	4.3225	2.62902	↑6mo
37	UN	1.2525	2.51951	↑1mo
38	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.9225	2.47226	↑6mo
39	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.8825	2.46398	↑6mo
40	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.9575	2.43863	↑6mo
41	Glutamic Acid+Glutamine	3.7725	2.3878	↑6mo
42	Myo-Inositol+Betaine	3.2725	2.33174	↑1mo
43	Taurine	3.4275	2.32083	↑6mo
44	sn-Glycero-3-phosphocholine	4.3425	2.27311	↑6mo
45	UN	3.4675	2.26629	↑6mo
46	Methanol	3.3575	2.24961	↑6mo
47	Glutamic Acid	2.3525	2.23881	↑6mo
48	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.2275	2.23057	↑6mo
49	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6975	2.22306	↑6mo
50	Glutamic Acid	2.3575	2.2199	↑6mo
51	Glutamic Acid+Glutamine	3.7625	2.09443	↑6mo
52	Glutamic Acid	3.7525	2.08901	↑6mo
53	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.8725	2.06463	↑6mo
54	UN	3.3725	2.05678	↑1mo
55	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.9525	2.03239	↑6mo
56	O-Phosphoethanolamine	3.9925	2.00024	↑1mo
57	UN	2.6425	1.99973	↑1mo
58	UN	3.2175	1.9862	↑1mo
59	Guanidoacetate+Glycerol	3.7925	1.97716	↑1mo
60	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.8775	1.97467	↑6mo
61	Aspartic Acid	2.7975	1.97325	↑6mo
62	Cystine	4.1075	1.9468	↑6mo
63	Choline	3.2025	1.94679	↑6mo
64	Taurine	3.4225	1.93462	↑1mo
65	Glutamic Acid	3.7575	1.92039	↑6mo

66	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.9425	1.91177	↑6mo
67	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6325	1.88576	↑6mo
68	O-Phosphoethanolamine	3.9825	1.85923	↑1mo
69	O-Phosphoethanolamine	3.9875	1.8439	↑1mo
70	UN	3.4725	1.83923	↑6mo
71	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.9675	1.82945	↑6mo
72	UN	1.2975	1.82155	↑1mo
73	Alanine	1.4925	1.80201	↑6mo
74	Aspartic Acid	2.8025	1.79782	↑6mo
75	Leucine	1.7075	1.76053	↑1mo
76	Glutamic Acid	2.0825	1.74697	↑1mo
77	Cystine	3.4075	1.73659	↑6mo
78	Succinic Acid	2.4025	1.71686	↑6mo
79	Glutamic Acid+Glutamine+Alanine	3.7675	1.71175	↑6mo
80	Leucine	1.7025	1.6956	↑1mo
81	Leucine	1.6975	1.69187	↑1mo
82	UN	2.8675	1.68227	↑1mo
83	Myo-Inositol	3.5525	1.67625	↑1mo
84	Leucine	1.6925	1.6705	↑1mo
85	UN	3.3825	1.66971	↑6mo
86	sn-Glycero-3-phosphocholine +Malic Acid	4.3175	1.66092	↑6mo
87	O-Phosphoethanolamine	4.0025	1.65572	↑1mo
88	<b>UN</b>	3.1125	1.64645	↑6mo
89	UN	3.8025	1.64332	↑1mo
90	Glutamine+Glycerol+Alanine	3.7825	1.64019	↑6mo

**Πίνακας Π.1 3:** Μεταβολίτες που συμβάλλουν στον διαχωρισμό των διαφορετικών ηλικιών 1 μήνα και 3 μηνών της ομάδας των προτύπων λύκου (SLE) κατά σειρά μειούμενης τιμής VIP.

No	Metabolite	S plot	VIP Value	Variation (S plot)
1	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.2325	16.8003	↑3mo
2	Choline	3.2075	8.66728	↑1mo
3	Lactate	1.3375	6.48546	↑1mo
4	Lactate	1.3225	6.02047	↑1mo
5	Choline	3.2025	5.4687	↑1mo
6	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6775	4.73923	↑3mo
7	Sn-GPC+Glycerol	3.6725	4.63998	↑3mo
8	Taurine	3.4275	4.62267	↑3mo
9	Taurine	3.4125	4.55437	↑3mo
10	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6875	4.19934	↑3mo
11	Taurine	3.4225	4.19382	↑3mo
12	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6825	4.16664	↑3mo
13	Glycine	3.5625	4.16294	↑1mo
14	Taurine	3.2575	4.14919	↑3mo
15	Taurine	3.4375	4.02633	↑3mo
16	Taurine	3.2775	3.97948	↑3mo
17	Threonine+Lactate	1.3275	3.79462	↑1mo
18	sn-Glycero-3-phosphocholine	4.3275	3.77893	↑3mo
19	sn-Glycero-3-phosphocholine	4.3325	3.75543	↑3mo
20	UN	3.1125	3.70275	↑3mo
21	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.2375	3.50573	↑3mo
22	sn-Glycero-3-phosphocholine	4.3375	3.41043	↑3mo
23	sn-Glycero-3-phosphocholine	4.3225	3.3835	↑3mo
24	Methanol	3.3525	3.33998	↑3mo
25	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6225	3.09395	↑3mo
26	Taurine	3.2825	3.09317	↑3mo
27	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6325	3.06228	↑3mo
28	Inosine +UN	3.8525	3.0044	↑1mo
29	Betaine+Aspartic Acid	3.8975	2.99273	↑1mo
30	Myo-Inositol+Betaine	3.2675	2.97969	↑1mo
31	Methanol	3.3575	2.95329	↑3mo
32	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.2275	2.92084	↑3mo
33	Glutamic Acid+Glutamine	2.1425	2.81734	↑1mo
34	Lactate	4.1025	2.80525	↑1mo
35	Inosine +UN	3.8575	2.80082	↑1mo
36	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.9175	2.79619	↑3mo
37	Choline	3.5225	2.74264	↑1mo
38	Lactate	4.1175	2.65453	↑1mo
39	Inosine +UN	3.8475	2.65194	↑1mo

40	Guanidoacetate+Glycerol	3.7975	2.6095	↑1mo
41	NAD+	8.4275	2.58852	↑3mo
42	sn-Glycero-3-phosphocholine	4.3425	2.50806	↑3mo
43	Choline+Myo-Inositol	4.0625	2.47615	↑1mo
44	Lactate+Threonine	1.3325	2.4593	↑1mo
45	Succinic Acid	2.4025	2.43349	↑3mo
46	sn-Glycero-3-phosphocholine +Malic Acid	4.3175	2.3924	↑3mo
47	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.9575	2.38315	↑3mo
48	sn-Glycero-3-phosphocholine +Creatine+Inosine	3.9275	2.34993	↑3mo
49	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.8825	2.33884	↑3mo
50	Glutamic Acid+Glutamine	3.7625	2.33709	↑1mo
51	Choline	3.5125	2.30742	↑1mo
52	Glutamic Acid	3.7525	2.29805	↑1mo
53	sn-Glycero-3-phosphocholine +Aspartic Acid	3.8925	2.295	↑3mo
54	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6925	2.26388	↑3mo
55	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.9525	2.25642	↑3mo
56	Inosine	8.2425	2.25329	↑1mo
57	Alanine	1.4925	2.16011	↑1mo
58	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.9025	2.14338	↑3mo
59	Leucine	0.9675	2.13231	↑1mo
60	NAD+	9.3475	2.11483	↑3mo
61	Choline+Myo-Inositol	4.0675	2.11226	↑1mo
62	Glutamic Acid	3.7575	2.10935	↑1mo
63	Choline+Myo-Inositol	4.0725	2.07839	↑1mo
64	Myo-Inositol+ Choline	3.5325	2.06826	↑1mo
65	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6975	2.05986	↑3mo
66	Choline	4.0575	2.0597	↑1mo
67	sn-Glycero-3-phosphocholine+O-Phosphocholine	3.6025	2.05139	↑3mo
68	Inosine +UN	3.8425	2.03983	↑1mo
69	Adenosine	8.3525	2.0313	↑3mo
70	Glutamic Acid	2.3575	2.02657	↑1mo
71	Alanine	1.4775	2.00947	↑1mo
72	UN	3.1175	1.98365	↑3mo
73	NAD+	8.1925	1.95332	↑3mo
74	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.9425	1.94639	↑3mo
75	Lactate	4.0925	1.94306	↑1mo
76	Inosine	8.3425	1.93493	↑1mo
77	O-Phosphoethanolamine	3.8375	1.92253	↑1mo
78	Choline	3.5175	1.89822	↑1mo
79	UN	3.7325	1.89432	↑1mo
80	Glutamic Acid	2.0625	1.8926	↑1mo
81	UN	2.6525	1.88842	↑1mo
82	Glutamic Acid	2.0525	1.878	↑1mo

83	sn-Glycero-3-phosphocholine +Aspartic Acid	3.9125	1.86647	↑3mo
84	Glutamic Acid	2.3525	1.8394	↑1mo
85	Threonine	1.3425	1.83856	↑1mo
86	Myo-Inositol+ Choline	3.5275	1.83418	↑1mo
87	NAD+	6.0525	1.83304	↑3mo
88	UN	3.4875	1.82477	↑3mo
89	Glutamic Acid	2.0775	1.82182	↑1mo
90	UN	3.7375	1.8205	↑1mo

**Πίνακας Π.1 4:** Μεταβολίτες που συμβάλλουν στον διαχωρισμό των διαφορετικών ηλικιών 3 μηνών και 6 μηνών της ομάδας των προτύπων λύκου (SLE) κατά σειρά μειούμενης τιμής VIP.

No	Metabolite	S plot	VIP Value	Variation (S plot)
1	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.2325	9.20937	↑3mo
2	Taurine+Betaine	3.2675	9.1645	↑3mo
3	Taurine	3.4225	6.18868	↑3mo
4	Taurine	3.4275	6.06453	↑3mo
5	Taurine	3.4125	5.96777	↑3mo
6	Glycine	3.5625	5.80041	↑3mo
7	Myo-Inositol+ Taurine	3.2775	5.64642	↑3mo
8	Myo-Inositol+Taurine+Betaine	3.2725	5.44045	↑3mo
9	Taurine	3.2575	5.31499	↑3mo
10	Taurine	3.2825	5.23156	↑3mo
11	Taurine	3.4375	5.07534	↑3mo
12	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.2275	4.56321	↑3mo
13	Myo-Inositol	3.6275	4.4355	↑3mo
14	Myo-Inositol+sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6125	3.83479	↑3mo
15	Myo-Inositol+Glycerol	3.5475	3.79253	↑3mo
16	Myo-Inositol	3.2875	3.65571	↑3mo
17	Choline+Myo-Inositol	4.0725	3.36668	↑3mo
18	Choline+Myo-Inositol	4.0675	3.35779	↑3mo
19	Myo-Inositol+ Choline	3.5325	3.35575	↑3mo
20	Glutamic Acid	3.7475	3.31859	↑6mo
21	Myo-Inositol	3.5425	3.07096	↑3mo
22	Glycerol+Glutamine	3.7875	3.0365	↑6mo
23	Lactic Acid	1.3375	2.98819	↑3mo
24	Glutamic Acid+Glutamine	3.7725	2.87937	↑6mo
25	O-Phosphocholine	3.2225	2.77756	↑6mo
26	Myo-Inositol+ Choline	3.5275	2.76293	↑3mo
27	Dimethylamine	2.7225	2.7499	↑6mo
28	NAD+	8.4275	2.70651	↑3mo
29	Creatine+Creatinine	3.0425	2.70332	↑6mo



30	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6775	2.55734	↑3mo
31	UN	3.1875	2.49594	↑6mo
32	Glutamic Acid+Glutamine	2.1625	2.48559	↑6mo
33	Myo-Inositol+sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6325	2.46486	↑3mo
34	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6875	2.46458	↑3mo
35	Taurine	3.4325	2.44634	↑3mo
36	Myo-Inositol+Glycerol	3.6425	2.4416	↑3mo
37	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.9325	2.42358	↑6mo
38	sn-Glycero-3-phosphocholine +Glycerol	3.6725	2.40469	↑3mo
39	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.2375	2.40216	↑3mo
40	UN	3.1975	2.39455	↑6mo
41	Lactic Acid	1.3225	2.38893	↑3mo
42	Glutamine+Glycerol+Alanine	3.7825	2.33996	↑6mo
43	Inosine	4.2725	2.3275	↑6mo
44	NAD+	9.3475	2.31965	↑3mo
45	Glutamine	2.1725	2.30954	↑6mo
46	Glutamic Acid+Glutamine	2.1525	2.30019	↑6mo
47	Myo-Inositol+Glycerol	3.6825	2.28195	↑3mo
48	Inosine	4.2775	2.27865	↑6mo
49	UN	4.4025	2.25043	↑6mo
50	NAD+	8.1925	2.19197	↑3mo
51	Choline	3.2075	2.14376	↑3mo
52	UN	3.0475	2.01099	↑6mo
53	O-Phosphoethanolamine	3.1425	1.99724	↑6mo
54	Inosine+Adenosine	4.4425	1.99341	↑6mo
55	UN	4.2325	1.9924	↑6mo
56	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6975	1.97587	↑3mo
57	NAD+	6.0525	1.96697	↑3mo
58	Taurine	3.4175	1.95751	↑3mo
59	Inosine	4.2825	1.95028	↑6mo
60	O-Phosphoethanolamine	3.1525	1.93	↑6mo

**Πίνακας Π.1 5:** Μεταβολίτες που συμβάλλουν στον διαχωρισμό των διαφορετικών ηλικιών 1 μήνα και 6 μηνών της ομάδας των προτύπων λύκου (SLE) κατά σειρά μειούμενης τιμής VIP.

No	Metabolite	S plot	VIP Value	Variation (S plot)
1	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.2325	11.7879	↑6mo
2	Choline	3.2075	9.32712	↑1mo
3	Taurine+Betaine	3.2675	9.14625	↑1mo
4	Lactic Acid	1.3375	7.45803	↑1mo
5	Glycine	3.5625	7.20246	↑1mo
6	Lactic Acid	1.3225	6.74803	↑1mo
7	Choline	3.2025	5.99972	↑1mo
8	Myo-Inositol+Taurine+Betaine	3.2725	4.41319	↑1mo
9	Threonine+Lactic Acid	1.3275	4.15825	↑1mo
10	Myo-Inositol	3.6275	3.93092	↑1mo
11	Choline+Myo-Inositol	4.0725	3.85331	↑1mo
12	Choline+Myo-Inositol	4.0675	3.80803	↑1mo
13	Myo-Inositol+ Choline	3.5325	3.78606	↑1mo
14	sn-Glycero-3-phosphocholine+Betaine+Aspartic Acid	3.8975	3.59705	↑1mo
15	Methanol	3.3525	3.50964	↑6mo
16	Methanol	3.3575	3.43906	↑6mo
17	Myo-Inositol+Glycerol	3.5475	3.40697	↑1mo
18	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6775	3.34738	↑6mo
19	sn-Glycero-3-phosphocholine +Glycerol	3.6725	3.33582	↑6mo
20	sn-Glycero-3-phosphocholine	4.3325	3.29093	↑6mo
21	Succinic Acid	2.4025	3.27899	↑6mo
22	<b>UN</b>	3.1125	3.26984	↑6mo
23	sn-Glycero-3-phosphocholine	4.3275	3.26198	↑6mo
24	Myo-Inositol+ Choline	3.5275	3.22003	↑1mo
25	Lactic Acid	4.1175	3.18714	↑1mo
26	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6825	3.06682	↑6mo
27	Lactic Acid	4.1025	3.05546	↑1mo
28	sn-Glycero-3-phosphocholine +Creatine+Inosine	3.9275	3.02413	↑6mo
29	Choline+Myo-Inositol	4.0625	2.9906	↑1mo
30	sn-Glycero-3-phosphocholine	4.3225	2.90177	↑6mo
31	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6875	2.87506	↑6mo
32	sn-Glycero-3-phosphocholine	4.3375	2.82528	↑6mo
33	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.9325	2.74434	↑6mo
34	Myo-Inositol	3.2875	2.67543	↑1mo
35	Creatine+Creatinine	3.0425	2.62625	↑6mo
36	Myo-Inositol	3.5425	2.60743	↑1mo
37	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.9175	2.56903	↑6mo
38	Choline	3.5225	2.52066	↑1mo
39	Glutamic Acid+Glutamine	2.1625	2.5036	↑6mo

40	Lactic Acid+Threonine	1.3325	2.47757	↑1mo
41	Myo-Inositol+Glycerol	3.6425	2.44448	↑1mo
42	Myo-Inositol+sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6225	2.42016	↑6mo
43	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.9425	2.41215	↑6mo
44	Myo-Inositol	3.6125	2.3904	↑1mo
45	Glycerol	3.7875	2.33528	↑6mo
46	Myo-Inositol+Glycerol	3.6475	2.3128	↑1mo
47	sn-Glycero-3-phosphocholine	2.1725	2.3123	↑6mo
48	Threonine	4.3425	2.3096	↑6mo
49	Myo-Inositol	4.0775	2.28609	↑1mo
50	Taurine	3.4225	2.27776	↑1mo
51	Glutamic Acid	3.7475	2.24184	↑6mo
52	Taurine	3.2825	2.22424	↑1mo
53	Guanidoacetate+Glycerol	3.7975	2.21539	↑1mo
54	<b>UN</b>	3.1175	2.19219	↑6mo
55	Glutamine	2.1775	2.15229	↑6mo
56	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.9475	2.14874	↑6mo
57	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.8825	2.13668	↑6mo
58	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.9575	2.12412	↑6mo
59	sn-Glycero-3-phosphocholine +O-Phosphocholine	3.6025	2.11881	↑6mo
60	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.2375	2.11608	↑6mo
61	sn-Glycero-3-phosphocholine +Malic Acid	4.3175	2.10278	↑6mo
62	Glutamic Acid+Glutamine	2.1425	2.08205	↑1mo
63	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.9525	2.06994	↑6mo
64	O-Phosphoethanolamine	3.9925	2.03668	↑1mo
65	UN	3.1975	2.02411	↑6mo
66	Inosine+Adenosine	4.4375	2.0192	↑6mo
67	Inosine +UN	3.8525	2.00527	↑1mo
68	Myo-Inositol+ Taurine	3.2775	2.00355	↑1mo
69	UN	2.6525	1.99777	↑1mo
70	UN	4.4025	1.98912	↑6mo
71	Lactic Acid+UN	4.1275	1.96161	↑1mo
72	sn-Glycero-3-phosphocholine	4.3475	1.96152	↑6mo
73	Glutamic Acid+Glutamine	3.7725	1.96072	↑6mo
74	sn-Glycero-3-phosphocholine +Betaine+Aspartic Acid	3.8925	1.95944	↑6mo
75	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.9225	1.92929	↑6mo
76	Leucine	0.9675	1.92853	↑1mo
77	UN	4.2325	1.88876	↑6mo
78	Choline	3.5125	1.88392	↑1mo
79	Taurine	3.4125	1.87172	↑1mo
80	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6925	1.85958	↑6mo
81	Inosine +UN	3.8475	1.85164	↑1mo
82	Choline	3.5175	1.82696	↑1mo

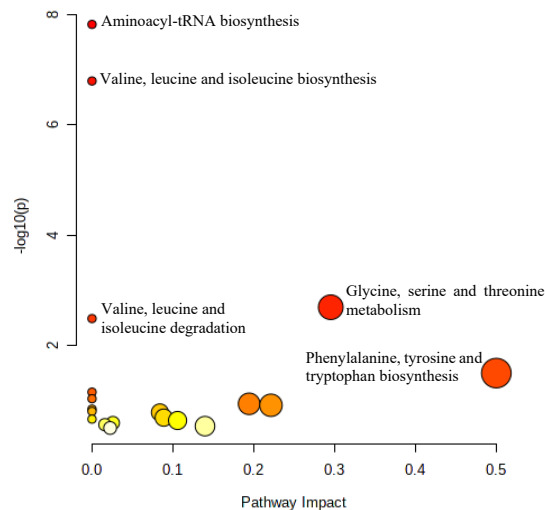
83	Glutamic Acid	2.3575	1.82183	↑1mo
84	Inosine +UN	3.8575	1.81901	↑1mo
85	Choline	4.0575	1.79671	↑1mo
86	Ethanolamine	3.8275	1.78131	↑1mo
87	Ethanolamine	3.8325	1.74863	↑1mo
88	Glutamine	2.1875	1.73816	↑6mo
89	sn-Glycero-3-phosphocholine+Malic Acid	4.3125	1.72157	↑6mo
90	Glutamic Acid+Glutamine	2.1675	1.71939	↑6mo

*Πίνακας II.1 6:* Ανάλυση διασποράς με δύο παράγοντες (two-way ANOVA) εντός των δειγμάτων (within subject) χωρίς αλληλεπίδραση στη μελέτη χρονοσειράς υγιών προτύπων (Healthy) και προτύπων λύκου (SLE).

Metabolite	Groups (F.val)	Groups (raw.p)	Groups (adj.p)	Time (F.val)	Time (raw.p)	Time (adj.p)
<b>UN</b>	71.2	1E-09	4E-08	15.8	2E-05	0.0006
ATP	29.1	6E-06	0.0001	2.20	0.1	0.235
O-Phosphoethanolamine	19.9	9E-05	0.001	8.12	0.001	0.009
AMP	19.2	0.0001	0.001	0.11	0.9	0.9
O-Phosphocholine	18.2	0.0002	0.001	1.12	0.3	0.4
Ethanolamine	17.0	0.0003	0.002	1.13	0.3	0.4
Oxypurinol	15.3	0.0005	0.002	2.96	0.1	0.2
Aspartic Acid	14.7	0.0006	0.003	2.76	0.1	0.2
Guanosine	8.63	0.006	0.03	0.13	0.9	0.9
Glutamine	8.11	0.008	0.03	2.37	0.1	0.2
ADP	7.98	0.008	0.03	3.46	0.04	0.2
Glycine	7.59	0.01	0.03	1.66	0.2	0.3
Histidine	3.24	0.08	0.2	7.89	0.002	0.009
Myo-Inositol	1.87	0.18	0.4	10.3	0.0004	0.004
sn-Glycero-3-phosphocholine	0.38	0.54	0.8	12.5	0.0001	0.002
Dimethylamine	0.02	0.88	0.9	7.80	0.002	0.009
Threonine	0.003	0.96	1.0	8.61	0.001	0.009

## Συμπληρωματική Ανάλυση 1

Ανάλυση Μεταβολικών Μονοπατιών (Pathway Analysis) μέσω του MetaboAnalyst των 12 στατιστικά σημαντικών μεταβολιτών που προέκυψαν από την ανάλυση των ηλικιών 1 μήνα (στάδιο προ-εφηβείας) και 6 μηνών (στάδιο νεφρίτιδας) της ομάδας των προτύπων λύκου. Ως Μέθοδος Εμπλουτισμού (Enrichment Method) των μεταβολιτών επιλέχθηκε το υπεργεωμετρικό τεστ (Hypergeometric test), ενώ για την Ανάλυση Τοπολογίας (Topology Analysis) ορίστηκε η παράμετρος Relative-betweenness Centrality. Επιλέχθηκε η βιβλιοθήκη της KEGG για *mus musculus*. Πέντε μεταβολικά μονοπάτια φαίνεται πως διαταράσσονται σημαντικά ( $p < 0.05$ ), με σημαντικότερα εκείνα της βιοσύνθεσης αμινοκύκλο-tRNA ( $p = 1.50E-8$ ) και της βιοσύνθεσης της βαλίνης, λευκίνης και ισολευκίνης ( $p = 1.60E-7$ ).



**Εικόνα Π.1 1:** Ανάλυση μονοπατιών των μεταβολιτών που μεταβάλλονται στα πρότυπα λύκου στην ανάλυση των ηλικιών 1-6 μηνών. Πέντε μεταβολικά μονοπάτια όπως φαίνονται στο διάγραμμα διαταράσσονται σημαντικά ( $p < 0.05$ ).

*Πίνακας Π.1 7: Αποτελέσματα της Ανάλυσης Μονοπατιών.*

	Total	Expected	Hits	Raw p	-log10(p)	Holm adjust	FDR	Impact
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	48	0.38	7	1.50E-08	7.82E+00	1.26E-06	1.26E-06	0.00
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	8	0.06	4	1.60E-07	6.80E+00	1.32E-05	6.70E-06	0.00
Glycine, serine and threonine metabolism	34	0.27	3	2.01E-03	2.70E+00	1.65E-01	5.64E-02	0.30
Valine, leucine and isoleucine degradation	40	0.32	3	3.24E-03	2.49E+00	2.62E-01	6.80E-02	0.00
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	4	0.03	1	3.15E-02	1.50E+00	1.00E+00	5.30E-01	0.50
Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	9	0.07	1	6.96E-02	1.16E+00	1.00E+00	9.75E-01	0.00
Phenylalanine metabolism	12	0.10	1	9.19E-02	1.04E+00	1.00E+00	1.00E+00	0.00
Nicotinate and nicotinamide metabolism	15	0.12	1	1.14E-01	9.45E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.19
Histidine metabolism	16	0.13	1	1.21E-01	9.18E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.22
Pantothenate and CoA biosynthesis	19	0.15	1	1.42E-01	8.48E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.00
beta-Alanine metabolism	21	0.17	1	1.56E-01	8.08E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.00
Pyruvate metabolism	22	0.18	1	1.62E-01	7.89E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.08
Glutathione metabolism	28	0.22	1	2.02E-01	6.94E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.09
Porphyrin and chlorophyll metabolism	30	0.24	1	2.15E-01	6.67E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.00
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	32	0.25	1	2.28E-01	6.42E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.11
Glycerophospholipid metabolism	36	0.29	1	2.53E-01	5.97E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.03
Pyrimidine metabolism	39	0.31	1	2.71E-01	5.67E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.02
Tyrosine metabolism	42	0.33	1	2.89E-01	5.40E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.14
Primary bile acid biosynthesis	46	0.37	1	3.12E-01	5.06E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.02

## Παράρτημα 2

Συγκριτική μελέτη υγιών προτύπων (Healthy) και προτύπων λύκου (SLE)

**Πίνακας Π.2 1:** Μεταβολίτες που συμβάλλουν στον διαχωρισμό των ομάδων υγιών προτύπων Η και προτύπων λύκου SLE στην ηλικία 1 μήνα. Τα βέλη ↑ και ↓ δείχνουν αύξηση και μείωση των επιπέδων του μεταβολίτη στην ομάδα SLE συγκριτικά με την ομάδα Η.

No	Metabolite	S plot	VIP Value	Variation (S plot)
1	O-Phosphocholine	3.2225	11.1753	↓
2	Choline	3.2075	10.8522	↑
3	Choline	3.2025	7.20256	↑
4	Betaine	3.2675	6.71735	↑
5	Myo-Inositol	3.6275	5.55006	↓
6	Lactic Acid	1.3375	5.51087	↑
7	Lactic Acid	1.3225	4.89454	↑
8	Myo-Inositol+Glycerol	3.5475	4.68364	↓
9	Succinic Acid	2.4025	4.27711	↓
10	Myo-Inositol	3.5425	4.13347	↓
11	UN	3.4675	4.04258	↑
12	UN	3.4875	3.91636	↑
13	AMP	8.6025	3.83268	↓
14	Myo-Inositol	3.2875	3.67453	↓
15	Myo-Inositol	3.6125	3.55225	↓
16	UN	4.0175	3.54409	↓
17	Niacinamide	8.2775	3.48659	↓
18	Choline	3.5225	3.44703	↑
19	Glycine	3.5625	3.18665	↑
20	Ethanolamine	3.8325	3.13333	↑
21	Choline	3.5125	3.09245	↑
22	Myo-Inositol	3.3025	3.0315	↓
23	Betaine+Aspartic Acid	3.8975	3.01106	↑
24	Ethanolamine	3.8275	2.99228	↑
25	O-Phosphoethanolamine	3.8375	2.99033	↑
26	UN	3.3625	2.97049	↓
27	Lactic Acid	4.1175	2.88826	↑
28	UN	4.3725	2.86977	↓
29	sn-Glycero-3-phosphocholine+UN	3.9025	2.86098	↑
30	Cystine	3.4075	2.84186	↑
31	UN	4.3625	2.78171	↓
32	Threonine+Lactic Acid	1.3275	2.76272	↑
33	AMP	4.5075	2.75991	↓

34	O-Phosphocholine	4.1725	2.75578	↓
35	AMP	4.5125	2.71256	↓
36	UN	2.6525	2.70135	↓
37	Inosine	8.2425	2.69553	↑
38	Lactic Acid	4.1025	2.67058	↑
39	UN	4.0225	2.66586	↓
40	Ethanolamine	3.1475	2.65769	↓
41	UN	4.0275	2.61484	↓
42	ATP+AMP	6.1475	2.61004	↓
43	AMP	4.5175	2.57015	↓
44	UN	4.0125	2.56153	↓
45	Aspartic Acid+Malic Acid	2.6625	2.54283	↓
46	Choline	3.5175	2.53404	↑
47	Taurine	3.4225	2.5246	↑
48	O-Phosphocholine	4.1675	2.48645	↓
49	AMP	4.5025	2.48073	↓
50	Taurine	3.4325	2.43587	↑
51	AMP+ATP	6.1425	2.43191	↓
52	sn-Glycero-3-phosphocholine	4.3575	2.41348	↓
53	UN	3.4725	2.38091	↑
54	Inosine	8.3425	2.38012	↑
55	O-Phosphocholine	4.1775	2.36564	↓
56	Choline	4.0625	2.34691	↑
57	O-Phosphocholine	3.5875	2.31769	↓
58	UN	3.4825	2.27391	↑
59	sn-Glycero-3-phosphocholine+Aspartic Acid	3.9075	2.23499	↑
60	<b>UN</b>	3.1125	2.2259	↑
61	Inosine +UN	3.8525	2.22378	↑
62	Guanidoacetic Acid+Glycerol	3.7975	2.20647	↓
63	Ethanolamine	3.1575	2.19039	↑
64	Choline	4.0575	2.18847	↑
65	Choline	3.2125	2.17243	↑
66	Guanidoacetic Acid+Glycerol+Alanine	3.7925	2.16358	↓
67	O-Phosphocholine+UN	4.1625	2.15893	↓
68	Succinic Acid	2.4075	2.14477	↓
69	Inosine	8.3475	2.13665	↑
70	O-Phosphocholine	4.1825	2.11781	↓
71	Glutamic Acid+Glutamine	2.1425	2.11057	↑
72	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.2325	2.10444	↓
73	Inosine +UN	3.8575	2.09837	↑
74	Inosine +UN	3.8475	2.0909	↑
75	ATP+ADP+AMP	6.1525	2.09005	↓
76	Ethanolamine	3.8225	2.08366	↑



77	sn-Glycero-3-phosphocholine+O-Phosphocholine	3.6025	2.08125	↓
78	AMP	6.1375	2.07621	↓
79	Lactic Acid+UN	4.1275	2.07091	↑
80	UN	1.2775	2.06682	↓
81	UN	1.2975	2.04422	↓
82	UDPs	5.9975	2.04236	↓
83	Lactic Acid+Threonine	1.3325	2.01689	↑
84	UN	1.2875	2.0147	↓
85	UN	4.3675	1.99285	↓
86	UN	3.3725	1.97964	↓
87	UN+O-Phosphocholine	3.5925	1.97229	↓
88	Alanine	1.4925	1.97215	↑
89	Methanol	3.3575	1.96856	↑
90	sn-Glycero-3-phosphocholine+UN	3.7025	1.94689	↑

**Πίνακας Π.2 2:** Μεταβολίτες που συμβάλλουν στον διαχωρισμό των ομάδων υγιών προτύπων Η και προτύπων λύκου SLE στην ηλικία 3 μηνών. Τα βέλη ↑ και ↓ δείχνουν αύξηση και μείωση των επιπέδων του μεταβολίτη στην ομάδα SLE συγκριτικά με την ομάδα Η.

No	Metabolite	S plot	VIP Value	Variation (S plot)
1	Taurine+Betaine	3.2675	14.1294	↑
2	Choline	3.2075	9.29355	↓
3	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.2325	7.86977	↑
4	Glycine	3.5625	6.96411	↓
5	O-Phosphocholine	3.2225	6.89334	↓
6	Taurine	3.4225	6.0456	↑
7	Taurine	3.4125	5.64303	↑
8	Choline	3.2025	5.58676	↓
9	Myo-Inositol+Taurine+Betaine	3.2725	5.48997	↑
10	Taurine	3.4275	5.10565	↑
11	sn-Glycero-3-phosphocholine + Betaine+Aspartic Acid	3.8975	5.01943	↑
12	Taurine	3.2575	4.89614	↑
13	Taurine	3.4375	4.78698	↑
14	Lactic Acid	1.3375	4.50133	↓
15	Taurine	3.2825	4.35099	↑
16	<b>UN</b>	3.1125	4.30658	↑
17	Myo-Inositol+Taurine	3.2775	4.19678	↑
18	Lactic Acid	1.3225	3.96934	↓
19	Glutamic Acid	2.3575	3.90439	↓
20	Glutamic Acid	2.3525	3.80096	↓
21	Methanol	3.3525	3.493	↑
22	Myo-Inositol	3.6125	3.4147	↑
23	Glutamic Acid+Glutamine	3.7625	3.36109	↓

24	Myo-Inositol+Glycerol	3.5475	3.31716	↑
25	Myo-Inositol	3.6275	3.20008	↑
26	Glutamic Acid	3.7575	3.19367	↓
27	Glutamic Acid	2.3425	3.16371	↓
28	Myo-Inositol	3.5425	3.16178	↑
29	Myo-Inositol	3.2875	3.03797	↑
30	Glutamic Acid	3.7525	2.97723	↓
31	Glutamic Acid+Glutamine	2.1425	2.97005	↓
32	UN	3.4875	2.94905	↑
33	Methanol	3.3575	2.89628	↑
34	Inosine +UN	3.8575	2.81588	↓
35	Glutamic Acid	2.0775	2.791	↓
36	UN	3.4675	2.77102	↑
37	Glutamic Acid+Malic Acid	2.3725	2.7444	↓
38	Choline	3.5225	2.74261	↓
39	Glutamic Acid	2.0525	2.73312	↓
40	UN	4.0225	2.59952	↓
41	Choline+Myo-Inositol	2.0625	2.58723	↓
42	Lactic Acid	4.1025	2.56224	↓
43	Myo-Inositol	3.3025	2.47387	↑
44	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.9025	2.44601	↑
45	Glutamic Acid	2.0675	2.39008	↓
46	Taurine	3.4325	2.34251	↑
47	Glutamic Acid+Malic Acid	2.3625	2.33113	↓
48	<b>UN</b>	3.1175	2.32511	↑
49	Glutamic Acid+Glutamine	2.1275	2.32402	↓
50	UN	3.2175	2.30906	↓
51	Inosine +UN	3.8525	2.30285	↓
52	Glutamic Acid+Glutamine	2.1325	2.28206	↓
53	Lactate+Cystine	4.1175	2.27407	↓
54	Guanidoacetic Acid+Glycerol	3.7975	2.27328	↓
55	UN	4.0175	2.2724	↓
56	O-Phosphoethanolamine	3.9925	2.264	↓
57	Inosine +UN	3.8475	2.24416	↓
58	Glutamic Acid	2.3475	2.24399	↓
59	Choline	4.0575	2.23021	↓
60	Glutamine	2.4175	2.21657	↓
61	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6325	2.21072	↑
62	UN	4.0275	2.19765	↓
63	Succinic Acid	2.4025	2.19513	↓
64	Taurine	3.4175	2.17963	↑
65	Glutamic Acid	2.3675	2.1642	↓
66	Choline	3.5125	2.14847	↓

67	Glutamic Acid+Glutamine	2.1225	2.12666	↓
68	Choline+Myo-Inositol	4.0625	2.10828	↓
69	UN	1.2525	2.10444	↑
70	O-Phosphocholine	4.1725	2.09725	↓
71	Threonine+Lactic Acid	1.3275	2.09048	↓
72	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.6875	2.07382	↑
73	Glutamic Acid+Glutamine	2.1175	2.0615	↓
74	Glutamic Acid	2.0575	2.04378	↓
75	UN	4.0125	2.02531	↓
76	Glutamic Acid	3.7475	2.0207	↓
77	Choline	3.2125	1.99848	↓
78	Niacinamide	8.2775	1.99582	↓
79	O-Phosphoethanolamine	3.9875	1.96538	↓
80	Myo-Inositol+Glycerol	3.6825	1.95761	↑
81	UN+O-Phosphocholine	3.5975	1.94603	↓
82	NAD+	8.4275	1.94384	↑
83	Creatinine + UN	4.0525	1.93651	↓
84	Glutamic Acid+Glutamine+Alanine	3.7675	1.93406	↓
85	Glutamic Acid	2.0425	1.91458	↓
86	sn-Glycero-3-phosphocholine	4.3275	1.90953	↑
87	O-Phosphocholine	4.1775	1.89574	↓
88	AMP	8.6025	1.87564	↓
89	UN	4.3675	1.83815	↓
90	Glutamic Acid	2.0375	1.83356	↓

**Πίνακας Π.2 3:** Μεταβολίτες που συμβάλλουν στον διαχωρισμό των ομάδων υγιών προτύπων Η και προτύπων λύκου SLE στην ηλικία 6 μηνών. Τα βέλη ↑ και ↓ δείχνουν αύξηση και μείωση των επιπέδων του μεταβολίτη στην ομάδα SLE συγκριτικά με την ομάδα Η.

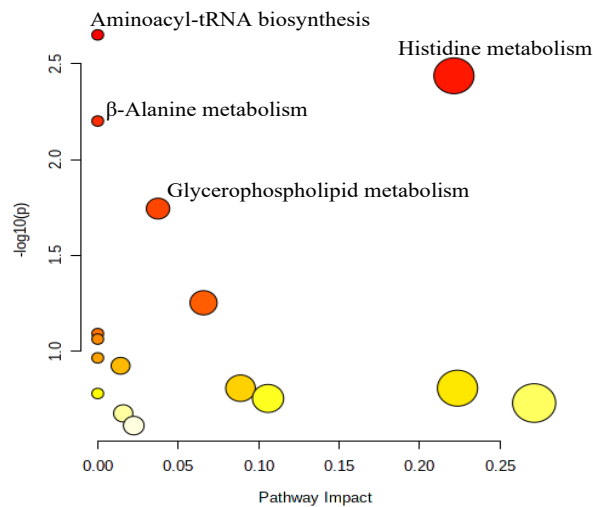
No	Metabolite	S plot	VIP Value	Variation (S plot)
1	Glycine	3.5625	9.51678	↓
2	Choline	3.2075	6.19241	↓
3	Lactic Acid	1.3375	5.93546	↓
4	Taurine+Betaine	3.2675	4.76855	↑
5	Lactic Acid	1.3225	4.51066	↓
6	Myo-Inositol	3.6275	4.49331	↓
7	UN	3.1125	4.26527	↑
8	Methanol	3.3525	4.13666	↑
9	Choline+Myo-Inositol	4.0725	4.1231	↓
10	Methanol	3.3575	3.96755	↑
11	Choline+Myo-Inositol	4.0675	3.80827	↓
12	Myo-Inositol+Glycerol	3.5475	3.76032	↓
13	Myo-Inositol	3.5325	3.70651	↓

14	AMP	8.6025	3.62052	↓
15	Threonine+Lactic Acid	1.3275	3.61027	↓
16	UN	4.0225	3.53248	↓
17	Creatine+Creatinine	3.0425	3.34208	↑
18	Niacinamide	8.2775	3.22189	↓
19	Choline	3.2025	3.20938	↓
20	UN	4.0175	3.1527	↓
21	Myo-Inositol	3.6125	3.09525	↓
22	Myo-Inositol+ Taurine	3.2775	3.0476	↓
23	Myo-Inositol+Glycerol	3.6475	3.03395	↓
24	Myo-Inositol	3.2875	3.0256	↓
25	UN	3.4675	3.0246	↑
26	Myo-Inositol+ Choline	3.5275	2.9431	↓
27	Taurine	3.4275	2.93997	↓
28	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.2275	2.93075	↓
29	Ethanolamine	3.1475	2.91986	↑
30	O-Phosphocholine	3.2225	2.88153	↓
31	UN	3.4875	2.8754	↑
32	sn-Glycero-3-phosphocholine +Creatine+Inosine	3.9275	2.87133	↑
33	Lactic Acid	4.1175	2.86171	↓
34	<b>UN</b>	3.1175	2.81348	↑
35	ATP+AMP	6.1475	2.72632	↓
36	Myo-Inositol+Betaine	3.2725	2.72255	↓
37	UN	3.1975	2.72252	↑
38	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.9325	2.70092	↑
39	AMP	4.5125	2.69953	↓
40	Aspartic Acid	2.7975	2.69534	↓
41	Aspartic Acid	2.8025	2.65745	↓
42	Glutamic Acid	3.7475	2.64392	↑
43	Betaine+Aspartic Acid	3.8975	2.61633	↑
44	Myo-Inositol	3.5425	2.60387	↓
45	Lactic Acid	4.1025	2.59705	↓
46	Glutamic Acid	2.3575	2.5798	↓
47	O-Phosphoethanolamine	3.1525	2.53458	↑
48	Ethanolamine	3.1375	2.53404	↑
49	O-Phosphoethanolamine	3.1425	2.4992	↑
50	Inosine+Adenosine	4.4375	2.48977	↑
51	UN	4.0275	2.48288	↓
52	UN	1.2525	2.45427	↑
53	Aspartic Acid	2.6925	2.35025	↓
54	Inosine	4.2725	2.30969	↑
55	Myo-Inositol	4.0775	2.30661	↓
56	ATP+ADP+AMP	6.1525	2.25586	↓

57	Myo-Inositol+Glycerol	3.6425	2.24927	↓
58	Glutamic Acid+Glutamine	3.7625	2.24146	↓
59	Glutamic Acid	2.3525	2.23542	↓
60	UN	4.2325	2.2296	↑
61	Aspartic Acid+Malic Acid	2.6625	2.22522	↓
62	UN	4.0125	2.21596	↓
63	Ethanolamine	3.1575	2.20727	↑
64	AMP+ATP	6.1425	2.16649	↓
65	Aspartic Acid	2.8325	2.16367	↓
66	Aspartic Acid	2.7025	2.16217	↓
67	UN	3.0475	2.16063	↑
68	Glutamic Acid+Glutamine	2.1625	2.14073	↑
69	UN	3.1875	2.12909	↑
70	Adenosine	8.2375	2.12361	↓
71	O-Phosphoethanolamine	3.9925	2.11169	↓
72	Aspartic Acid	2.8275	2.10857	↓
73	UN	3.4475	2.10469	↑
74	Glutamic Acid	2.3425	2.0893	↓
75	Glutamine	2.1725	2.08216	↑
76	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.9475	2.07354	↑
77	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.9225	2.06105	↑
78	Choline+Myo-Inositol	4.0625	2.04953	↓
79	Glutamic Acid+Glutamine	2.1425	2.03933	↓
80	ATP	8.5675	1.98433	↓
81	Glutamine	2.4175	1.96332	↓
82	UN	4.4125	1.96008	↑
83	Inosine	4.2775	1.95531	↑
84	NAD+	8.4275	1.95207	↓
85	Aspartic Acid	2.6775	1.94988	↓
86	AMP	4.5075	1.94339	↓
87	UN	3.4525	1.90992	↑
88	Glycerol+Glutamine	3.7875	1.90275	↑
89	NAD+	9.3475	1.88546	↓
90	sn-Glycero-3-phosphocholine	3.2325	1.8497	↓

## Συμπληρωματική Ανάλυση 2

Ανάλυση Μεταβολικών Μονοπατιών (Pathway Analysis) μέσω του MetaboAnalyst των 9 στατιστικά σημαντικών μεταβολιτών που προέκυψαν από την ανάλυση της ομάδας των υγιών προτύπων και των προτύπων λύκου στην ηλικία των 6 μηνών (στάδιο νεφρίτιδας). Ως Μέθοδος Εμπλουτισμού (Enrichment Method) των μεταβολιτών επιλέχθηκε το υπεργεωμετρικό τεστ (Hypergeometric test), ενώ για την Ανάλυση Τοπολογίας (Topology Analysis) ορίστηκε η παράμετρος Relative-betweenness Centrality. Επιλέχθηκε η βιβλιοθήκη της KEGG για *mus musculus*. Τέσσερα μεταβολικά μονοπάτια φαίνεται πως διαταράσσονται σημαντικά ( $p < 0.05$ ) με σημαντικότερο εκείνο της βιοσύνθεσης αμινοάκυλο-tRNA ( $p = 0.002$ ).



**Εικόνα Π.2 1:** Ανάλυση μονοπατιών των μεταβολιτών που μεταβάλλονται στα πρότυπα λύκου σε σύγκριση με τα υγιή πρότυπα στην ηλικία των 6 μηνών. Τέσσερα μεταβολικά μονοπάτια όπως φαίνονται στο διάγραμμα διαταράσσονται σημαντικά ( $p < 0.05$ ).

*Πίνακας Π.2 4: Αποτελέσματα της Ανάλυσης Μονοπατιών.*

	Total	Expected	Hits	Raw p	-log10(p)	Holm adjust	FDR	Impact
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	48	0.29	3	2.23E-03	2.65E+00	1.88E-01	1.53E-01	0.00
Histidine metabolism	16	0.10	2	3.65E-03	2.44E+00	3.03E-01	1.53E-01	0.22
beta-Alanine metabolism	21	0.13	2	6.29E-03	2.20E+00	5.16E-01	1.76E-01	0.00
Glycerophospholipid metabolism	36	0.22	2	1.80E-02	1.74E+00	1.00E+00	3.78E-01	0.04
Purine metabolism	66	0.39	2	5.58E-02	1.25E+00	1.00E+00	9.38E-01	0.07
Arginine biosynthesis	14	0.08	1	8.08E-02	1.09E+00	1.00E+00	1.00E+00	0.00
Nicotinate and nicotinamide metabolism	15	0.09	1	8.64E-02	1.06E+00	1.00E+00	1.00E+00	0.00
Pantothenate and CoA biosynthesis	19	0.11	1	1.08E-01	9.66E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.00
Sphingolipid metabolism	21	0.13	1	1.19E-01	9.24E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.01
Glutathione metabolism	28	0.17	1	1.56E-01	8.07E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.09
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	28	0.17	1	1.56E-01	8.07E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.22
Porphyrin and chlorophyll metabolism	30	0.18	1	1.66E-01	7.80E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.00
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	32	0.19	1	1.76E-01	7.54E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.11
Glycine, serine and threonine metabolism	34	0.20	1	1.86E-01	7.30E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.27
Pyrimidine metabolism	39	0.23	1	2.11E-01	6.76E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.02
Primary bile acid biosynthesis	46	0.27	1	2.44E-01	6.12E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.02