



**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

«ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΥΩΝ:  
ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ»



ΚΡΗΤΙΚΑΚΗ ΜΑΡΙΑ

Φαρμακοποιός

Επιβλέπων καθηγητής: Γκίκας Ευάγγελος

Αθήνα 2022

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου Ευάγγελο Γκίκα, για την πολύτιμη βοήθεια και την καθοδήγηση του για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Ακόμη, εκφράζω τις ευχαριστίες μου στη διδακτορική φοιτήτρια Ιωάννα Μπάρλα για τις γνώσεις και την καθοδήγηση που μου προσέφερε, καθώς και για το χρόνο που αφιέρωσε για την πραγματοποίηση της εργασίας.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, την κυρία Παντερή και τον κύριο Ντότσικα , καθώς και στο στενό οικογενειακό και φιλικό μου περιβάλλον για την κατανόηση και τη στήριξή τους.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ABSTRACT</b>	<b>5</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>6</b>
<b>ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>7</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΚΟΛΙΣΤΙΝΗ</b>	<b>7</b>
1.1 Εισαγωγικά Στοιχεία για την Κολιστίνη	7
1.2 Μηχανισμός Δράσης	8
1.3 Εγκατάλειψη και επαναχρησιμοποίηση κολιστίνης	9
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ: ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ</b>	<b>11</b>
2.1 Βιοδείκτες	11
2.2 Μεταβολομική	13
2.2.1. Μεταβολίτες – Μεταβόλωμα	13
2.2.2 Προσεγγίσεις μεταβολομικής ανάλυσης	14
2.3 Αναλυτικές τεχνικές που εφαρμόζονται στη μεταβολομική ανάλυση	15
2.4 Φασματομετρία Μάζας	16
2.4.1 Μέρη που απαρτίζουν το φασματόμετρο μάζας:	17
2.4.2 Συνδυασμός υγροχρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας	18
2.4 Μεταβολομική και ανακάλυψη βιοδεικτών	18
2.5 Εφαρμογές μεταβολομικής στην ανακάλυψη βιοδεικτών για ασθένειες	19
2.6 Ανάλυση ορού & πλάσματος σε μεταβολομικές μελέτες	20
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΑΙ ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ QC ΣΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ</b>	<b>21</b>
3.1 Ανάπτυξη μεθοδολογίας	21
3.2 Χρήση δειγμάτων ελέγχου ποιότητας της μεθόδου (QC samples)	22
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΛΟΓΙΣΜΙΚΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΦΑΣΜΑΤΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ</b>	<b>24</b>
4.1 Προεπεξεργασία και στατιστική ανάλυση φασματικών δεδομένων	24
4.2 Λογισμικά επεξεργασίας	26
4.3 MZmine 2.51	27
4.4 statTarget	29
4.5 Πολυμεταβλητά δεδομένα και στατιστική ανάλυση	30
4.5.1 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA)	30
4.5.2 Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων, PLS	32
4.6 SIMCA 14.1	33
<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>36</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ-ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ</b>	<b>36</b>
5.1 Οργανολογία	36
5.2 Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν – Υλικά- Αντιδραστήρια	36
5.3 Μεθοδολογία	36
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΝΑΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΦΑΣΜΑΤΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ, ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ</b>	<b>39</b>

<b>6.1 Προεπεξεργασία φασματικών δεδομένων</b>	<b>39</b>
<b>6.2 Ταυτοποίηση των στατιστικά σημαντικών χαρακτηριστικών</b>	<b>51</b>
<b>6.3 Σχολιασμός και συμπεράσματα</b>	<b>55</b>
	<b>56</b>
6.3.1 Νεοπτερίνη	56
6.3.2 L-ισολευκυλο-L-προλίνη	57
6.3.3 Γαλακτοσυλογλυκερόλη	58
6.3.4 S-Αδενοσυλ-ομοκυστεΐνη	58
6.3.5 Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη(18:1(9Z))	58
6.3.6 Λοιποί πιθανοί βιοδείκτες	59
<b>ΕΠΙΛΟΓΟΣ</b>	<b>61</b>
<b>ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ</b>	<b>62</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>63</b>

## ABSTRACT

Colistin is a polypeptide antibiotic that effectively treats infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria, but its clinical use is limited due to nephrotoxicity. The purpose of the present study was to identify biomarkers of colistin-induced nephrotoxicity and to further characterize the mechanisms underlying this process by analysing plasma metabolites using untargeted metabolomic approach. Specifically, the mice groups were given the usual clinically administered dose (1 mg/kg) as well as this dose increased by 50% (1,5 mg/kg), in order to investigate the possible toxicity due to a small increase in the dose. The statistical analysis showed that the administered action of colistin has a significant effect on mice metabolism. Despite the small increase, the statistical differentiation of the groups proves the significant effect of the drug also at the level of the circulatory system. The results were evaluated based on the initial score ( $>0.95$ ) and on the fit score ( $>0.7$ ). Some metabolites that were identified and found at different concentrations between the two groups, have already been associated with nephrotoxicity in the literature. The main mechanisms that appear to be affected by increased colistin concentrations and are responsible for the nephrotoxicity that appears as an adverse effect are increase in oxidative stress, increased metabolism of S-adenosylmethionine (SAM) to homocysteine, increased tryptophan metabolism, possible effect on galactose metabolism, reduction of fatty acid oxidation. Therefore, colistin is thought to affect metabolism in several directions, dysregulating more than one biological pathway and causing locally assessed damage to renal function.

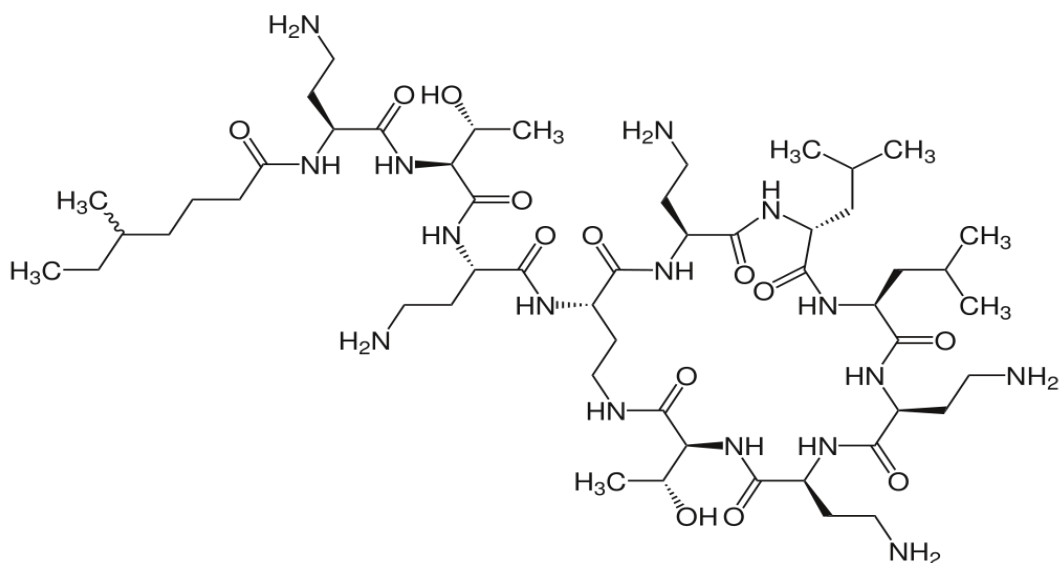
## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κολιστίνη είναι ένα πολυπεπτιδικό αντιβιοτικό που αντιμετωπίζει αποτελεσματικά τις λοιμώξεις που προκαλούνται από πολυανθεκτικά Gram-αρνητικά βακτήρια, αλλά η κλινική του χρήση είναι περιορισμένη λόγω νεφροτοξικότητας. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο εντοπισμός βιοδεικτών της νεφροτοξικότητας που προκαλείται από την κολιστίνη και ο περαιτέρω χαρακτηρισμός των μηχανισμών που διέπουν αυτή τη διαδικασία αναλύοντας τους μεταβολίτες του πλάσματος χρησιμοποιώντας μη στοχευμένη μεταβολομική προσέγγιση. Συγκεκριμένα, στις ομάδες ποντικών χορηγήθηκε η συνήθης κλινικά χορηγούμενη δόση (1 mg/kg) καθώς δόση αυξημένη κατά 50% (1,5 mg/kg), προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανή τοξικότητα που προκύπτει από μικρή αύξηση της δόσης. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι η χορηγούμενη δράση της κολιστίνης έχει σημαντική επίδραση στον μεταβολισμό των ποντικών. Παρά τη μικρή αύξηση, η στατιστική διαφοροποίηση των ομάδων αποδεικνύει τη σημαντική επίδραση του φαρμάκου και σε επίπεδο κυκλοφορικού συστήματος. Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με βάση το initial score (>0,95) και το fit score (>0,7). Ορισμένοι μεταβολίτες που εντοπίστηκαν και βρέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις μεταξύ των δύο ομάδων, έχουν ήδη συσχετιστεί με νεφροτοξικότητα στη βιβλιογραφία. Οι κύριοι μηχανισμοί που φαίνεται να επηρεάζονται από τις αυξημένες συγκεντρώσεις κολιστίνης και είναι υπεύθυνοι για τη νεφροτοξικότητα, που εμφανίζεται ως ανεπιθύμητη επίδραση, είναι η αύξηση του οξειδωτικού στρες, ο αυξημένος μεταβολισμός της S-αδενοσυλομεθειονίνης (SAM) σε ομοκυστεΐνη, ο αυξημένος μεταβολισμός της τρυπτοφάνης, η πιθανή επίδραση στη γαλακτόζη. μεταβολισμός, μείωση της οξείδωσης των λιπαρών οξέων. Επομένως, η κολιστίνη επηρεάζει το μεταβολισμό σε διάφορες κατευθύνσεις, απορρυθμίζοντας περισσότερες από μία βιολογικές οδούς και προκαλώντας τοπικά εκτιμώμενη βλάβη στη νεφρική λειτουργία.

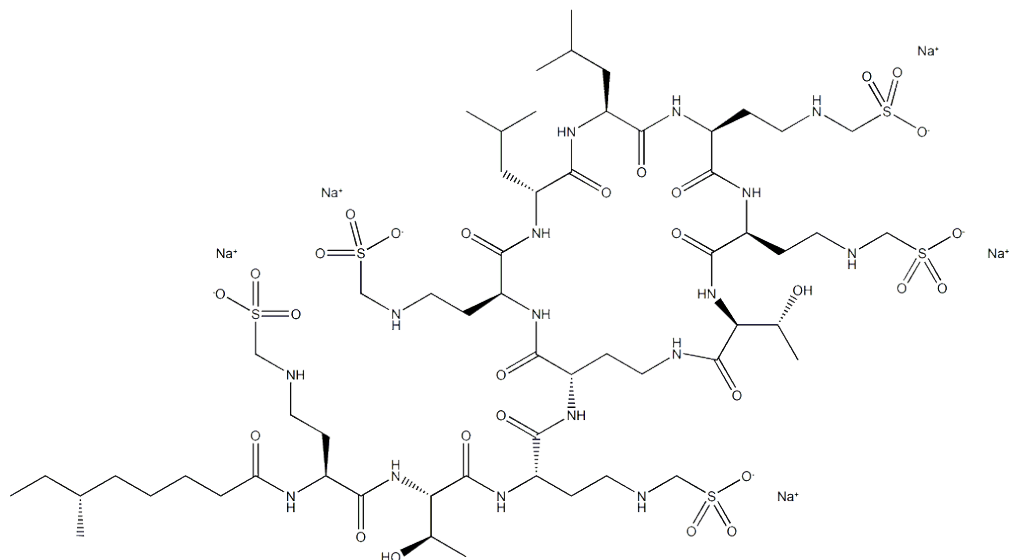
**ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**  
**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΚΟΛΙΣΤΙΝΗ**

**1.1 Εισαγωγικά Στοιχεία για την Κολιστίνη**

Η κολιστίνη απομονώθηκε για πρώτη φορά στην Ιαπωνία το 1949 από φιάλη ζυμώσεως που περιείχε το βακτήριο *Bacillus polymyxa* var. *colistinus* από τον Ιάπωνα επιστήμονα Κογατα και έγινε διαθέσιμη για κλινική χρήση το 1959<sup>1</sup>. Είναι επίσης γνωστή ως *πολυμυξίνη E* και αποτελεί ένα αντιβιοτικό που παράγεται από ορισμένα στελέχη του βακτηρίου *Paenibacillus polymyxa*. Ουσιαστικά, είναι ένα μείγμα των κυκλικών πολυπεπτιδίων κολιστίνης A και B και ανήκει στην τάξη πολυπεπτιδικών αντιβιοτικών γνωστών ως πολυμυξίνες. Είναι αποτελεσματική έναντι των περισσότερων αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Πρόκειται για ένα δεκαπεπτιδίο που χορηγείται είτε μετά από κατάλληλη χημική τροποποίηση ως προφάρμακο, με το όνομα μεθανοσουλφονική κολιστίνη (colistin methanesulfate CMS), που όταν χρησιμοποιείται ενδοφλεβίως, υδρολύεται *in vivo* στον ενεργό μεταβολίτη του, την κολιστίνη, είτε ως θειική κολιστίνη όταν χρησιμοποιείται από του στόματος<sup>2,3</sup>. Η δομή των μορίων φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί.



Εικόνα 1: Δομή Κολιστίνης

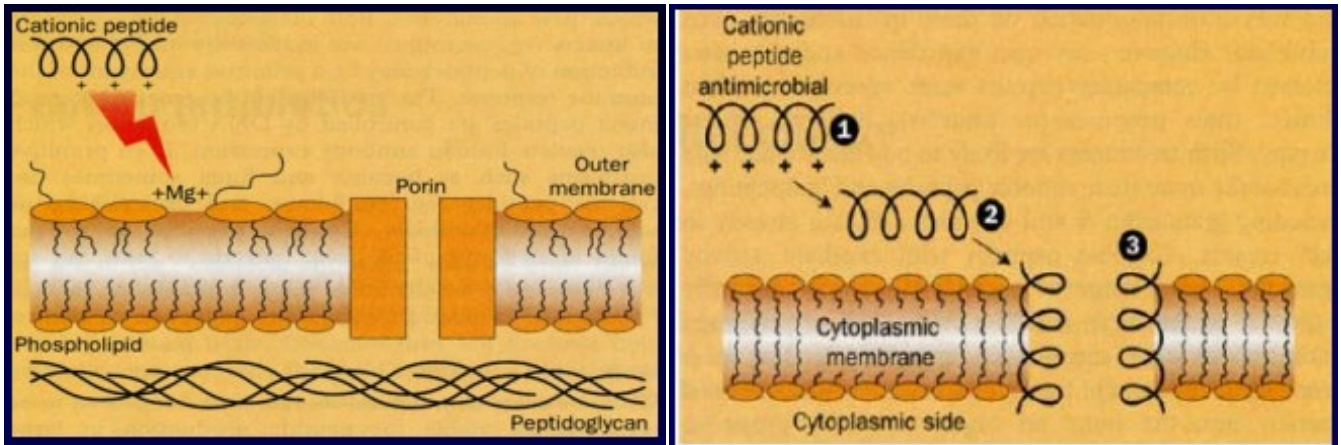


Εικόνα 2: Δομή μετά νατρίου της μεθανοσουλφονικής κολιστίνης (CMS)

## 1.2 Μηχανισμός Δράσης

Η κολιστίνη είναι ένα πολυκατιονικό πεπτίδιο και έχει υδρόφιλα και λιπόφιλα τμήματα. Λόγω του μεγάλου μοριακού βάρους και των κατιονικών ιδιοτήτων της στο φυσιολογικό pH, η κολιστίνη διέρχεται ελάχιστα μέσω των φυσιολογικών μεμβρανών και κατανέμεται κυρίως στον εξωκυττάριο χώρο. Οι κατιονικές της περιοχές αλληλεπιδρούν με την εξωτερική μεμβράνη των βακτηρίων και τη διαταράσσουν, ανταγωνιζόμενες τα κατιόντα των μεμβρανικών λιπιδίων και εκτοπίζοντας ιόντα μαγνησίου και ασβεστίου του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ οι υδρόφοβες περιοχές αγκυρώνονται στην μεμβράνη. Ουσιαστικά, οι υδρόφοβες/ υδρόφιλες περιοχές αλληλεπιδρούν με την μεμβράνη, ακριβώς όπως ένα κατιονικό απορρυπαντικό, διαλυτοποιώντας τη σε υδατικό περιβάλλον και αλλάζοντας τη διαπερατότητά της. Ως αποτέλεσμα, προκύπτει διαρροή του ενδοκυττάριου περιεχομένου. Αυτή η επίδραση είναι βακτηριοκτόνος<sup>4,5</sup>.





Εικόνα 3: Μηχανισμός Δράσης Κολιστίνης

### 1.3 Εγκατάλειψη και επαναχρησιμοποίηση κολιστίνης

Η κολιστίνη αποτελεί ένα παλιό αντιβιοτικό (εγκρίθηκε το 1965) , το οποίο εγκαταλείφθηκε πριν από δεκαετίες λόγω των υψηλών ποσοστών νεφροτοξικότητας και νευροτοξικότητας (ζάλη, παραισθησίες, οπτικές διαταραχές, αταξία) που προκαλεί. Ως εκ τούτου, αντικαταστάθηκε από άλλα αντιβιοτικά που ήταν αποτελεσματικά και θεωρήθηκαν ασφαλέστερα εκείνη την εποχή <sup>6</sup>.

Στα τέλη της δεκαετίας του 1950, τότε που η κολιστίνη εισήχθη στην κλινική πρακτική, οι περισσότερες από τις σύγχρονες απαιτήσεις για μελέτες φαρμακοκινητικής, ασφάλειας και αποτελεσματικότητας για ενήλικες, παιδιά και ειδικές ομάδες ασθενών δεν ήταν γνωστές. Ωστόσο, η κολιστίνη επανεισάγεται στην κλινική ιατρική εξαιτίας της έλλειψης αντιβιοτικών που να έχουν ανακαλυφθεί πρόσφατα και εξακολουθεί να χρησιμοποιείται ευρέως για τη θεραπεία ανθεκτικών αρνητικών κατά Gram λοιμώξεων. Η θεραπευτική παρακολούθηση της κολιστίνης θεωρείται αναγκαία επειδή η φαρμακοκινητική της είναι πολύ μεταβλητή και το θεραπευτικό της εύρος στενό. Παραμένει λοιπόν ένα από τα τελευταία γραμμές αντιβιοτικά για τα ανθεκτικά στελέχη σε πολλαπλά φάρμακα, όπως ανθεκτικά στις καρβαπενέμες, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* και *Acinetobacter baumannii* <sup>7</sup>. Μάλιστα, σε μελέτη ασθενών με πνευμονία οπού είχαν προσβληθεί από το βακτήριο *A. Baumannii*, υπήρξε θεραπεία στο 57% του πληθυσμού, ύστερα από χορήγηση της κολιστίνης. Ωστόσο, η κολιστίνη δεν έχει δράση έναντι των *Neisseria*, *Proteus*, *Serratia*, *Providencia*, *Brucella* και *Burkholderia cepacia* <sup>8-10</sup>.

Πρόσφατα η μεγαλύτερη μελέτη για την χρήση της ενδοφλέβιας κολιστίνης, έδειξε ότι η ένωση είναι πολύτιμο αντιβιοτικό με αποδεκτή νεφροτοξικότητα και σημαντική αποτελεσματικότητα η οποία εξαρτάται από την ημερήσια δοσολογία και την έκταση της μόλυνσης. Από τους 258 ασθενείς, στους οποίους χορηγείται η κολιστίνη για τουλάχιστον 72 ώρες, το 79,1 % των ασθενών θεραπευτήκαν, ενώ νεφροτοξικότητα παρουσίασε μόλις το 10%. Παράλληλα άλλη μελέτη για τον καθορισμό της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας της κολιστίνης έδειξε ευνοϊκή απόκριση στο 75% των ασθενών που συμμετείχαν σε αυτήν, ενώ κανένας από τους ασθενείς δεν εμφάνισε νεφρική ανεπάρκεια,

καταδεικνύοντας τη σημασία που έχει η τοξικολογική / φαρμακοκινητική υποβοήθηση για τους κλινικούς γιατρούς στο σχεδιασμό της θεραπείας, ώστε να μπορούν να αποφύγουν ανεπαρκείς ή ακατάλληλες στρατηγικές δοσολογίας<sup>9,11</sup>.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ: ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ**

### **2.1 Βιοδείκτες**

Σύμφωνα με τον FDA, ως βιοδείκτης ορίζεται ένα καθορισμένο χαρακτηριστικό που μετράται ως δείκτης φυσιολογικών διεργασιών, παθολόγων διεργασιών ή φαρμακολογικών αποκρίσεων σε κάποια έκθεση ή παρέμβαση, συμπεριλαμβανομένων των θεραπευτικών παρεμβάσεων<sup>12</sup>.

Στα παραδείγματα βιοδεικτών περιλαμβάνονται από καρδιακού παλμούς και αρτηριακή πίεση έως πιο πολύπλοκες εργαστηριακές εξετάσεις αίματος και άλλων ιστών. Η χρήση βιοδεικτών, και ιδίως εργαστηριακών βιοδεικτών, στην κλινική έρευνα είναι κάπως νεότερη

και οι καλύτερες προσεγγίσεις αυτής της πρακτικής εξακολουθούν να αναπτύσσονται και να βελτιώνονται<sup>13, 14</sup>.

Στη βιβλιογραφία εντοπίζονται διαφορετικά είδη βιοδεικτών, που αναλύονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1: Είδη βιοδεικτών

<b>Διαγνωστικοί βιοδείκτες</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>•για επιβεβαίωση της παρουσίας ασθένειας (και υποτύπων ασθενειών) ή κάποιας ιατρικής κατάστασης</li></ul>
<b>Βιοδείκτες παρακολούθησης</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>•για την αξιολόγηση της παρουσίας, της κατάστασης ή της έκτασης μιας ασθένειας ή ιατρικής κατάστασης</li><li>•για αξιολόγηση της ανταπόκρισης στην κλινική παρέμβαση</li></ul>
<b>Βιοδείκτες φαρμακοδυναμικής/απόκρισης</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>•για την αξιολόγηση της ανταπόκρισης σε μια ιατρική κατάσταση ή κλινική παρέμβαση</li></ul>
<b>Βιοδείκτες προδιάθεσης</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>•για τον προσδιορισμό της πιθανότητας ανάπτυξης ενός κλινικού συμβάντος (θετικό ή αρνητικό) μετά την έκθεση σε ιατρικό προϊόν ή περιβαλλοντικό παράγοντα</li></ul>
<b>Προγνωστικοί βιοδείκτες</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>•για τον εντοπισμό της πιθανότητας ενός κλινικού συμβάντος, ασθένειας, υποτροπής ή εξέλιξης σε ασθενείς που έχουν διαγνωστεί με ασθένεια ή πάσχουν από ιατρική κατάσταση</li></ul>
<b>Βιοδείκτες τοξικότητας/ κινδύνου</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>•για τη μέτρηση του κινδύνου ενός ατόμου να αναπτύξει μια ασθένεια ή ιατρική κατάσταση σε ασθενείς χωρίς τη νόσο ή την ιατρική κατάσταση</li></ul>
<b>Βιοδείκτες ασφάλειας</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>•για την πρόβλεψη τοξικών ανεπιθύμητων ενεργειών που προκαλούνται από έκθεση σε φάρμακα, ιατρικές παρεμβάσεις ή περιβαλλοντικούς παράγοντες</li></ul>

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια εύρεσης βιοδεικτών τοξικότητας και ειδικότερα τοξικότητας που προκαλείται από υψηλά επίπεδα κολιστίνης στο πλάσμα.

## 2.2 Μεταβολομική

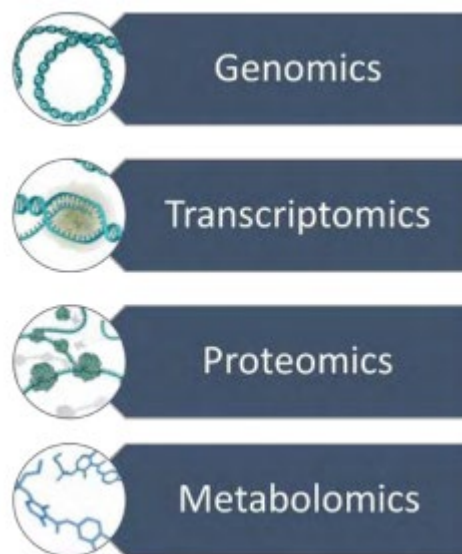
### 2.2.1. Μεταβολίτες – Μεταβόλωμα

Κατά τη δεκαετία του 1990 και ειδικά με την αποκρυπτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος σημειώθηκε επανάσταση στις τεχνικές και τις προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται στην μοριακή βιολογία και τη βιοχημεία, οδηγώντας στην ανάπτυξη των επονομαζόμενων τεχνικών «omics». Οι κυριότερες επιστημονικές περιοχές εφαρμογής των τεχνικών omics είναι στο γονιδίωμα η γενομική (genomics), στη διαδικασία μεταγραφής του DNA η μεταγραφομική (transcriptomics), στη μελέτη των πρωτεϊνών η πρωτεομική (proteomics), ενώ στη μελέτη του συνόλου του μεταβολισμού η μεταβολομική (metabolomics), οι οποίες έχουν πολλές εφαρμογές και παραλλαγές στο τρόπο προσέγγισης.

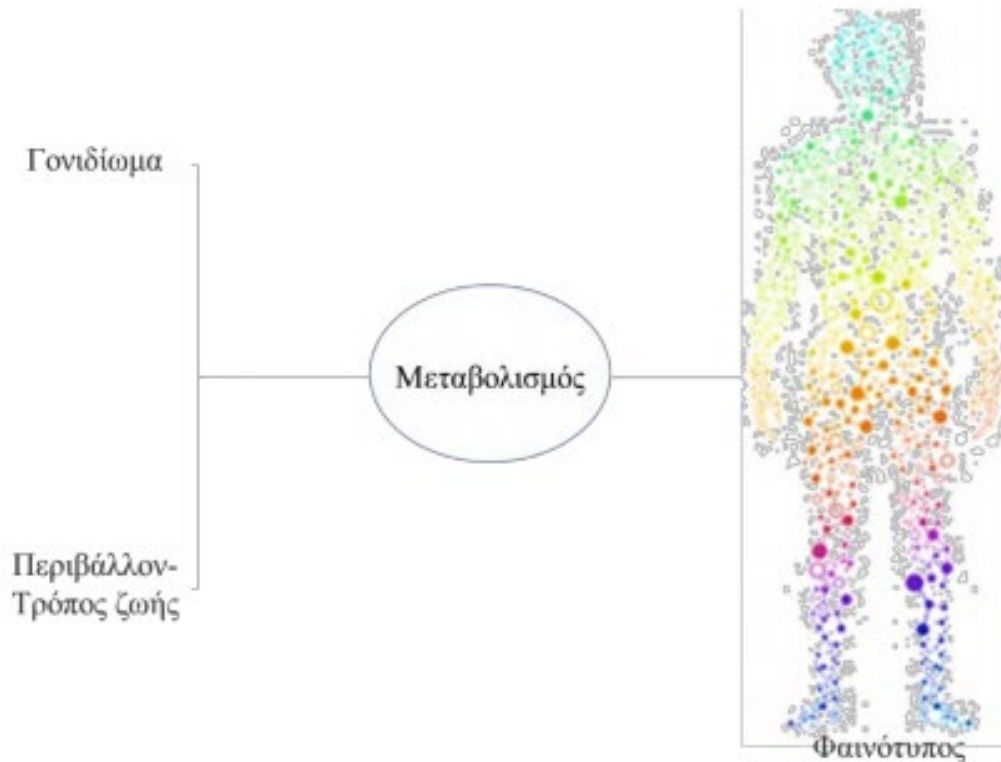
Αρχικά, εμφανίστηκαν οι όροι genomics/transcriptomics, καθώς μελετήθηκε το σύνολο των γονιδίων (genomics) και το σύνολο των μεταγράφων (transcriptomics) σε κύτταρα. Εξαιτίας της αναντιστοιχίας των επιπέδων του mRNA με τα επίπεδα των πρωτεϊνών που κωδικοποιεί, προέκυψε η ανάγκη προσδιορισμού του συνόλου των πρωτεϊνών στα εξεταζόμενα δείγματα (π.χ. κύτταρα, ιστούς) και εισήχθη η μελέτη του συνόλου των πρωτεϊνών (proteomics). Αργότερα, αναπτύχθηκε η μεταβολομική (metabolomics) προκειμένου να γίνουν πλήρως κατανοητά τα βιοχημικά μονοπάτια των υπό μελέτη συστημάτων.

Η μεταβολομική μελετάει οργανικά μόρια χαμηλού μοριακού βάρους (<1000 Da) , στα οποία περιλαμβάνονται αμινοξέα, βιταμίνες, λιπίδια, σάκχαρα, πολυόλες, οργανικά οξέα και άλλα. Μάλιστα τα λιπίδια αποτελούν μια υποκατηγορία της μεταβολομικής, που ονομάζεται lipidomics. Οι μεταβολίτες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στα βιολογικά συστήματα. Είναι αποτέλεσμα του ενδιάμεσου μεταβολισμού (intermediates) και προϊόντα των μεταβολικών διεργασιών του οργανισμού, ικανοποιούν πολλές βασικές ανάγκες του οργανισμού (π.χ ATP για την απελευθέρωση ενέργειας) και επηρεάζονται, τόσο από γενετικούς, όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Η σημασία της μεταβολομικής είναι μεγάλη, καθώς το μεταβόλωμα είναι πολύ ευαίσθητος αποδέκτης κάθε εσωτερικής και εξωτερικής αλλαγής. Οι μεταβολίτες και οι συγκεντρώσεις τους αντικατοπτρίζουν άμεσα τη βιοχημική δραστηριότητα και την κατάσταση των συστημάτων, με αποτέλεσμα η μεταβολομική να αντιπροσωπεύει καλύτερα (σε σχέση με τις υπόλοιπες omics τεχνικές) τον μοριακό φαινότυπο<sup>15</sup>.



Εικόνα 4:Κυριότερες "omics" τεχνικές



Εικόνα 5: Ο φαινότυπος ως αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης του γονιδιώματος με το περιβάλλον/ τρόπο ζωής. Η μελέτη του μεταβολισμού αποτελεί τη καλύτερη μέθοδο για τη μελέτη αυτής της σχέσης και την προσέγγιση του φαινοτύπου<sup>16</sup>.

### 2.2.2 Προσεγγίσεις μεταβολομικής ανάλυσης

Οι αναλυτικές προσεγγίσεις που ακολουθούνται στις μεταβολομικές μελέτες είναι: στοχευμένες (targeted) ή μη-στοχευμένες (untargeted ή non-target). Στη μη στοχευμένη ανάλυση εξετάζεται το σύνολο του μεταβολώματος και γίνεται προσπάθεια απόδοσης του μεγαλύτερου δυνατού αριθμού διαφορετικά εκφρασμένων μεταβολιτών, προς συνολική διερεύνηση και παρατήρηση των μεταβολικών αλλαγών, χωρίς πρότερη υπόθεση (hypothesis free). Αντίθετα, στη στοχευμένη ανάλυση εξετάζονται συγκεκριμένοι και περιορισμένοι σε αριθμό μεταβολίτες, που συμμετέχουν στο ίδιο ή σε συγκεκριμένα μεταβολικά μονοπάτια και επιλέγονται για να μελετηθούν, διότι διαθέτουν κάποια βιολογική σημασία βάσει της αρχικής υπόθεσης που ερευνάται (hypothesis driven).

Η μεταβολομική αποτελεί ραγδαία εξελισσόμενο πεδίο έρευνας με μεγάλο εύρος εφαρμογών. Εφαρμόζεται σε πολλούς τομείς της βιοϊατρικής έρευνας όπως τοξικολογικές

μελέτες, διατροφικές μελέτες, διερεύνηση συνεπειών των γενετικών τροποποιήσεων και των μεταβολικών νοσημάτων, τη διάγνωση του καρκίνου και νευρολογικών παθήσεων<sup>17</sup>.

### **2.3 Αναλυτικές τεχνικές που εφαρμόζονται στη μεταβολομική ανάλυση**

Οι μεταβολίτες έχουν μικρό μοριακό βάρος, αλλά διαφέρουν ως προς τα φησικοχημικά τους χαρακτηριστικά, για αυτό και δεν υπάρχει μόνο μία μέθοδος ανάλυσης, που να χρησιμοποιείται αποκλειστικά στην μεταβολομική. Στη μη στοχευμένη σάρωση εφαρμόζονται διαφορετικές αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό μεταβολιτών. Οι κυριότερες αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται στις μεταβολομικές μελέτες είναι η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) και η Φασματομετρία Μάζας (MS).

Μέσω της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) επιτυγχάνεται υψηλή επαναληψιμότητα και η μικρότερη δυνατή παρέμβαση στο δείγμα, σε σύγκριση με τις υπόλοιπες αναλυτικές τεχνικές που βρίσκουν εφαρμογή στη μεταβολομική. Το NMR αποτελεί μη επεμβατική τεχνική, κατά την οποία το δείγμα δεν καταστρέφεται και μπορεί να ξαναχρησιμοποιηθεί μετά την ανάλυση.

Σε μεταβολομικές μελέτες συχνά χρησιμοποιούνται συζευγμένες τεχνικές, όπως η GC-MS, η LC-MS και η UPLC-MS. Στη GC-MS, χρησιμοποιούνται τριχοειδείς στήλες, επιτυγχάνεται κατάλληλος χρωματογραφικός διαχωρισμός, με πλάτος κορυφών 2-5 sec και αναπαραγώγιμοι χρόνοι κατακράτησης. Ο κύριος περιορισμός της αεριοχρωματογραφίας είναι ότι μπορούν να αναλυθούν μόνο πτητικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους ή εκείνες που μπορούν να γίνουν πτητικές μέσω παραγωγοποίησης. Πολλοί από τους μεταβολίτες που βρίσκονται στον ορό και το πλάσμα πρέπει να παραγωγοποιηθούν πριν από την ανάλυση με GC-MS. Επομένως, η GC-MS συνήθως είναι μια επεμβατική μέθοδος για το εξεταζόμενο δείγμα, καθώς συχνά απαιτείται παραγωγοποίηση του δείγματος πριν την ανάλυσή του με στόχο την αύξηση της πτητικότητας & της σταθερότητάς του.

Στην ανάλυση μέσω LC-MS δεν απαιτείται παραγωγοποίηση και η συγκεκριμένη συζευγμένη τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί για θερμοευαίσθητες και μη-πτητικές ουσίες (σε αντίθεση με την GC-MS), δηλαδή για την ανάλυση ευρύτερου φάσματος μεταβολιτών. Εξέλιξη της τεχνικής LC-MS ως προς την βελτίωση της χρωματογραφικής διαχωριστικής ικανότητας αποτελεί η υγροχρωματογραφία υψηλής πίεσης συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (UPLC-MS). Η ανάλυση με UPLC στη μεταβολομική αύξησε τον αριθμό των μεταβολιτών που μπορούν να ανιχνευθούν σε σχέση με την απλή LC. Στη UPLC χρησιμοποιούνται μεγαλύτερες συνθήκες πίεσης (15,000 psi) και επιτρέπει το διαχωρισμό μορίων χαμηλού μοριακού βάρους, όπως οι μεταβολίτες, με μεγαλύτερη ευαισθησία. Επίσης, η σύζευξη του UPLC με φασματομέτρα μάζας υψηλής ακρίβειας μάζας παρέχει υψηλό χρωματογραφικό διαχωρισμό και χρησιμοποιείται ως πιθανό εργαλείο για ταυτοποίηση μεταβολιτών.

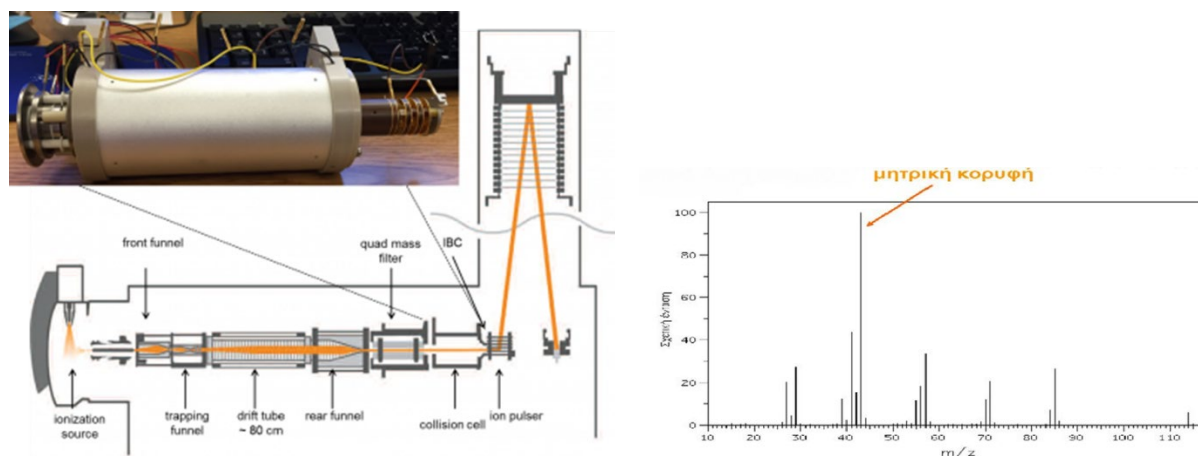
Με UPLC-MS αντίστροφης φάσης ανιχνεύονται μεταβολίτες μέτριας και υψηλής λιποφιλίας, συμπεριλαμβανομένων πολλών κατηγοριών λιπιδίων (γλυκερολιπίδια, φωσφολιπίδια, λιπαρά οξέα, χολικά οξέα και στερόλες). Οι πολικοί μεταβολίτες δεν συγκρατούνται

ικανοποιητικά σε στήλες αντίστροφης φάσης. Σε κάποιες περιπτώσεις, η GC-MS και η UPLC-MS αντίστροφης φάσης χρησιμοποιούνται ως συμπληρωματικές τεχνικές, καθώς κάθε μία ανιχνεύει διαφορετικούς μεταβολίτες και μόνο ένας περιορισμένος αριθμός κοινών μεταβολιτών εντοπίζεται και από τις δύο. Τα δείγματα συνήθως αναλύονται με θετικό (ESI<sup>+</sup>) και αρνητικό ιοντισμού (ESI<sup>-</sup>) στις μεταβολομικές μελέτες, καθώς παρέχουν συμπληρωματικά δεδομένα<sup>18,19</sup>.

Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται σε όλο και πιο αυξανόμενο βαθμό ο συνδυασμός MS με τη χρωματογραφία υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων γνωστή και ως HILIC. Με τη HILIC μπορούν να αναλυθούν πολικοί μεταβολίτες με φτωχή συγκράτηση σε στήλες αντίστροφης φάσης, ενώ η περισσότερη χρήση οργανικών διαλυτών σε σύγκριση με την χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, παρέχει αυξημένη ευαισθησία<sup>20</sup>.

## 2.4 Φασματομετρία Μάζας

Η φασματομετρία μάζας αποτελεί αναλυτική τεχνική, η οποία περιλαμβάνει τον ιοντισμό χημικών ενώσεων και εν συνεχεία την ανίχνευση των ιόντων αυτών βασιζόμενη στην αναλογία μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ). Με άλλα λόγια η φασματομετρία μάζας μετράει τόσο τη μάζα των αναλυόμενων ουσιών, αλλά και τυχόν θραυσμάτων ή προϊόντων προσθήκης εντός ενός δείγματος. Το φάσμα μάζας είναι το διάγραμμα της έντασης του σήματος των ιόντων συναρτήσει του λόγου μάζας/φορτίο ( $m/z$ ). Σε μια αδρή περιγραφή της διαδικασίας, το δείγμα (αέριο, υγρό ή στερεό) εισάγεται, ενώ ακολουθεί ο ιοντισμός (μπορεί να συμβεί και θραύση των μορίων) και η μεταφορά των ιόντων στην αέρια φάση αν αυτό δεν έχει ήδη συμβεί. Ακολουθεί ο διαχωρισμός τους με εφαρμογή διάφορων τεχνικών (π.χ. ενός μαγνητικού ή ενός ηλεκτρικού πεδίου, τετραπόλου, γραμμικής τροχιακής ή τετραπολικής παγίδας ιόντων κλπ), στον οποίο βασίζεται και ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους των ιόντων. Χρησιμοποιείται σε διάφορα επιστημονικά πεδία ενώ εφαρμόζεται τόσο σε απλά όσο και σε ιδιαίτερα σύνθετα δείγματα (metabolomics).



Εικόνα 6: Τρόπος λειτουργίας φασματομέτρου μάζας με αναλυτή χρόνου πτήσης και απεικόνιση φάσματος μάζας, όπου φαίνεται η σχετική ένταση συναρτήσει του λόγου μάζας/φορτίο



#### 2.4.1 Μέρη που απαρτίζουν το φασματομέτρο μάζας:

##### **(A) Πηγή ιονισμού**

Τα μόρια μπορούν να ιοντιστούν με τη χρήση διαφορετικών τεχνικών όπως:

i. Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI): Το όργανο διαθέτει ως πηγή σύστημα ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI). Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει περιληπτικά τη διαβίβαση του αναλύτη μέσα από τριχοειδή βελόνα στην οποία εφαρμόζεται ισχυρό ηλεκτρικό δυναμικό, με αποτέλεσμα τη δημιουργία φορτισμένων σταγονιδίων. Εξάτμιση του διαλύτη έχει ως συνέπεια τη δημιουργία ιόντων στην αέρια φάση λόγω πρόκλησης ισχυρών απωστικών δυνάμεων Coulomb μεταξύ των επιδιαλυτωμένων ιόντων και θραύση των σταγονιδίων σε ολόνα και μικρότερα. Τα ιόντα εν συνεχεία εισάγονται σε ένα τριχοειδές προκειμένου να επιτευχθεί εντονότερη αποδιαλύτωση και ακολουθούν πορεία υπό χαμηλή πίεση προς τον αναλυτή μάζας.

ii. Χημικός ιοντισμός σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI): Είναι τεχνική στενά συνδεδεμένη με τον ιοντισμό ESI. Όργανα τα οποία πραγματοποιούν τον ιοντισμό ESI, μπορούν εύκολα με μικρή τροποποίηση να λειτουργούν σαν APCI. Το έκλουσμα διαβιβάζεται σε έναν θερμαινόμενο σωλήνα και παράγεται αερόλυμα στο οποίο εφαρμόζεται ηλεκτρική εκκένωση, παράγοντας δραστικά ιόντα  $H_3O^+$  και  $N_2^+$ , τα οποία προκαλούν και ιοντισμό των αναλυτών.

iii. Ιοντισμό με πρόσκρουση ηλεκτρονίων, που έχουμε την παραγωγή ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας από ράβδο βολφραμίου ή ρηνίου, τα οποία επιταχύνονται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Το αποτέλεσμα είναι η εκτεταμένη θραύση του αναλύτη.

iv. Ιοντισμός εκφόρτισης laser (MALDI), ήπια τεχνική ιονισμού κατάλληλη για χαρακτηρισμό πρωτεϊνών αλλά και DNA.

##### **(B) Αναλυτής Μάζας**

Οι τεχνικές διαχωρισμού των ιόντων περιλαμβάνουν:

i. Φασματομετρία μάζας μαγνητικού τομέα: Τα ιόντα επιταχύνονται σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, ενώ στη συνέχεια διέρχονται μέσα από μαγνητικό πεδίο, όπου λόγω της επίδρασης του εκτρέπονται από την αρχική τους πορεία. Το μέγεθος της εκτροπής ορίζεται από το λόγο  $m/z$ .

ii. Τετράπολο: Εδώ χρησιμοποιούνται 2 κατοπτρικά ηλεκτρικά πεδία (αρνητικό και θετικό) που εφαρμοζόμενα σε σύστημα 4 παραλλήλων μεταλλικών ράβδων συντονίζουν τα αναλυόμενα ιόντα. Ο προσδιορισμός του λόγου  $m/z$  γίνεται μέσω του προσδιορισμού της συχνότητας της ταλάντωσής τους.

iii. Διαχωρισμός με βάση τον χρόνο πτήσης (TOF): Ο διαχωρισμός στο συγκεκριμένο αναλυτή επιτυγχάνεται σαν αποτέλεσμα του διαφορετικού χρόνου πτήσης των ιόντων (οι ελαφρύτερες ουσίες κινούνται ταχύτερα και φτάνουν πρώτες στον ανιχνευτή). Οι κορυφές που προκύπτουν στο φάσμα είναι ευρείες, πρόβλημα το οποίο αντιμετωπίζεται με τη χρήση ειδικού ηλεκτρικού κατόπτρου (reflectron), το οποίο αυξάνει τη διακριτική ικανότητα του οργάνου.

iv. Διαχωρισμός με τροχιακή παγίδα ιόντων (orbitrap): Το συγκεκριμένο σύστημα αξιοποιεί την «παγίδευση» παλμικών δεσμών ιόντων μέσα σε ένα τετρα-λογαριθμικό πεδίο. Το πεδίο αυτό δημιουργείται ανάμεσα σε ένα κεντρικό αξονικό ηλεκτρόδιο και σε ένα ομοαξονικό εξωτερικό ηλεκτρόδιο. Οι σταθερές τροχιές των ιόντων που προκύπτουν, συνδυάζουν την περιστροφή γύρω από το κεντρικό ηλεκτρόδιο με αρμονικές ταλαντώσεις κατά μήκος του. Το ηλεκτρικό πεδίο διατηρεί κοντά στο κεντρικό ηλεκτρόδιο τα ιόντα. Τα εξωτερικά ηλεκτρόδια χρησιμοποιούνται έπειτα σαν αποδέκτες-ανιχνευτές της «στιγμιαίας εικόνας» των αξονικών ταλαντώσεων. Η ψηφιοποιημένη εικόνα αξιοποιείται για τον υπολογισμό της συχνότητας των ταλαντώσεων, που εν συνεχεία μέσω των γρήγορων μετασχηματισμών Fourier (FFT) δίνει το τελικό φάσμα μάζας. Η ακρίβεια της όλης τεχνικής είναι πολύ υψηλή, φτάνοντας μέχρι και τα 5 δεκαδικά ψηφία <sup>21</sup>.

## **(Γ) Ανιχνευτής**

### 2.4.2 Συνδυασμός υγροχρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας

Πρόκειται για τον συνδυασμό του διαχωρισμού που επιτυγχάνεται με την υγροχρωματογραφία με τις δυνατότητες του MS, για ανάλυση μάζας. Το συζευγμένο σύστημα είναι ιδιαίτερα δημοφιλές στη χημική ανάλυση γιατί συνδυαστικά, βελτιώνονται οι δυνατότητες καθεμιάς από τις μεθόδους, απ' ότι αν αυτές εφαρμόζονταν ξεχωριστά. Πρέπει στο σημείο αυτό να τονιστεί πως η χρήση της LC δεν είναι συμβατή με οποιοδήποτε φασματόμετρο μάζας. Τα φασματόμετρα που χρησιμοποιούν ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό (ESI) ή χημικό ιονισμό σε ατμοσφαιρική πίεση (APCI), είναι συμβατά με HPLC, καθώς έχουν τη δυνατότητα ιοντισμού σε ατμοσφαιρική πίεση σε αντίθεση με την τεχνική ιονισμού με πρόσκρουση ηλεκτρονίων(EI) που απαιτεί δείγμα σε αέρια κατάσταση. Η MALDI παράγει ιόντα σε παλμούς γεγονός επίσης ασύμβατο με την υγροχρωματογραφία που απαιτεί συνεχές σήμα.

## **2.4 Μεταβολομική και ανακάλυψη βιοδεικτών**

Για να βελτιωθεί η κλινική πορεία των ασθενειών, απαιτούνται ακριβέστερες μέθοδοι διάγνωσης και γρήγορης αξιολόγησης. Η μεταβολομική προσφέρει νέες ευκαιρίες για την ανακάλυψη βιοδεικτών σε πολύπλοκες ασθένειες, καθώς εξηγεί βιοχημικούς μηχανισμούς, που μπορούν να συνδεθούν δευτερογενώς με παθοφυσιολογικά δεδομένα. Η συστηματική ανάλυση μεταβολιτών σε βιολογικά δείγματα έχει γίνει σημαντικό εργαλείο στην κλινική έρευνα, αλλά και στη διάγνωση ασθενειών και προσφέρει ολιστική προσέγγιση με την υπόσχεση κλινικής ενίσχυσης των διαγνωστικών πληροφοριών.

Η έγκαιρη διάγνωση είναι ο πιο αποτελεσματικός τρόπος αντιμετώπισης των ασθενειών. Η μεταβολομική αποτελεί μια ισχυρή πλατφόρμα για την ανακάλυψη νέων βιοδεικτών, καθώς και την αναγνώριση νέων παθολογικών βιοχημικών οδών με τη βελτίωση της έγκαιρης διάγνωσης. Οι μεταβολίτες αποτελούν βιοδείκτες ασθενειών σε αρχικά στάδια και βοηθούν στην καλύτερη κατανόηση της εξέλιξής τους. Επιπρόσθετα, πληροφορίες που προέρχονται από τη δημιουργία προφίλ μεταβολιτών (και όχι μόνο «απομονωμένων»

βιοδεικτών) δίνουν τη δυνατότητα ανακάλυψης εξατομικευμένων θεραπειών για την καλύτερη αντιμετώπιση ασθενειών.

Βελτιώσεις στις αναλυτικές τεχνολογίες και τη βιοπληροφορική επιτρέπουν τον ταχύ προσδιορισμό των συγκεντρώσεων χιλιάδων μεταβολιτών σε βιολογικά δείγματα, με αποτέλεσμα η μεταβολομική ανάλυση να εφαρμόζεται πλέον ακόμα και σε κλινικές μελέτες. Η τεχνολογία της μεταβολομικής είναι ακόμα σε εξέλιξη και πρόκειται για ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για τη διερεύνηση βιολογικών πορειών και ανακάλυψη κλινικών βιοδεικτών, ενισχύοντας τις προσπάθειες για βελτιστοποίηση τόσο της πρόληψης όσο και της θεραπείας της ασθένειας<sup>22</sup>.

## **2.5 Εφαρμογές μεταβολομικής στην ανακάλυψη βιοδεικτών για ασθένειες**

Όπως αναφέρθηκε η μεταβολομική διαθέτει τη δυνατότητα ολιστικής απεικόνισης της μεταβολικής εικόνας τους οργανισμού. Για το λόγο αυτό έχουν πραγματοποιηθεί μεταβολομικές μελέτες για σχεδόν κάθε ασθένεια, με σκοπό την εύρεση της υποκείμενης βιοχημείας της νόσου αλλά και με την προσδοκία της ανακάλυψης νέων βιοδεικτών, την βελτίωση της ειδικότητας ανακάλυψης των ασθενειών ή ακόμα και την βελτίωση της ευαισθησίας με την αναγνώριση της ασθένειας σε υποκλινικό επίπεδο. Μερικά, ενδεικτικά μόνο, παραδείγματα παρατίθενται στη συνέχεια.

Η νόσος Alzheimer αποτελεί κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως. Δυστυχώς, οι τρέχοντες βιοδείκτες για πρώιμο εντοπισμό της ασθένειας είναι περιορισμένοι, επειδή είναι είτε επεμβατικοί είτε δαπανηροί. Για το λόγο αυτό αναπτύχθηκε μη στοχευμένη μεταβολομική προσέγγιση για να εξετάσει τις μεταβολομικές διαφορές σε άτομα με διαφορετική γνωστική κατάσταση που σχετίζονται με την πρόοδο της ασθένειας<sup>23</sup>.

Η μη έγκαιρη διάγνωση του ηπατικού καρκίνου (HCC) αποτελεί έναν από τους πιο κύριους παράγοντες για την μικρή πιθανότητα επιβίωσης των ασθενών. Ως εκ τούτου, η αναγνώριση ευαίσθητων βιοδεικτών για έγκαιρη και ακριβή διάγνωση του HCC έχει μεγάλη σημασία. Οι Tan et al. χρησιμοποίησαν μη στοχευμένη μεταβολομική μεθοδολογία για να ανακαλύψουν βιοδείκτες για τον ηπατικό καρκίνο και να προσδιορίσουν τη χρησιμότητά τους στην πρώιμη διάγνωση του <sup>24</sup>.

Ακόμα, αξίζει να αναφερθεί ότι οι παραδοσιακοί κλινικοί βιοδείκτες της νεφρικής λειτουργίας δεν είναι αρκετά ευαίσθητοι και αυξάνονται σημαντικά με την παρουσία σημαντικών χρόνιων νεφρικών παθήσεων (CKD). Η μεταβολομική προσέγγιση εφαρμόστηκε για τη δημιουργία ενός μεταβολικού προφίλ του ορού αίματος ασθενών με CKD και των σημαντικών ενδογενών μεταβολιτών που συνέβαλαν στη διάκριση των CKD σε διαφορετικά στάδια. Με βάση αυτούς τους μεταβολίτες, στο μοντέλο για τη διάγνωση ασθενών με CKD επιτεύχθηκε ευαισθησία στο 100% και μπορεί να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για την έγκαιρη διάγνωση των CKD. Συμπερασματικά, η εφαρμογή της μεταβολομικής σε μελέτες

όπως χρόνιων νεφρικών παθήσεων, παρέχει στους ερευνητές την ευκαιρία να αποκτήσουν νέες ιδέες για τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς.

Στη βιβλιογραφία εντοπίζονται και άλλες μελέτες όπου με τη χρήση κατάλληλων βιοδεικτών σε κάθε περίπτωση μπορεί να γίνει έγκαιρη διάγνωση και σε άλλους τύπους καρκίνου (πχ. νεφρού<sup>25</sup>, οισοφάγου<sup>26</sup>), καθώς και σε πολλές άλλες περιπτώσεις. Ενδεικτικά με τη βοήθεια βιοδεικτών που ανακαλύφθηκαν μέσω της μεταβολομικής προβλέφθηκε η παρουσία άσθματος με μεγάλη ακρίβεια<sup>22,27</sup>.

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται συγκεντρωτικά ορισμένα παραδείγματα βιοδεικτών που εντοπίστηκαν με μεταβολομικές αναλύσεις και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην κλινική διάγνωση διαφόρων ασθενειών.

*Πίνακας 2: Παραδείγματα εφαρμογών μεταβολομικής στην ανακάλυψη βιοδεικτών για διάφορες ασθένειες*

<b>Βιοδείκτης</b>	<b>Βιολογικό υλικό</b>	<b>Ασθένεια</b>
χολίνη, διμεθυλαργινίνη, αργινίνη, βαλίνη, καρνιτίνη	Εγκεφαλονωτιαίο υγρό	Εξέλιξη νόσου Alzheimer <sup>23</sup>
Σφιγγομυελίνη, φωσφατιδυλοχολίνες	Πλάσμα αίματος	Ενδομητρίωση ωοθηκών <sup>28</sup>
ταυροχολικό οξύ, λυσοφωσφοαιθανολαμίνη 16: 0, λυσοφωσφατιδυλοχολίνη 22: 5), 1-μεθυλαδενοσίνη	Ορός αίματος	Πρώιμη διάγνωση ηπατικού καρκίνου (HCC) <sup>29</sup>
N-ακετυλογλουταμίνη, N-ακετυλογλυκίνη	Ούρα, ήπαρ	στεατοηπατίτιδα <sup>30</sup>
Ακυλοκαρνιτίνη, 1-μεθυλο-ισταμίνη	Ορός πλάσματος	Νόσος Parkinson <sup>31</sup>

## **2.6 Ανάλυση ορού & πλάσματος σε μεταβολομικές μελέτες**

Σε μελέτες βιοϊατρικής φύσεως, τα δείγματα που επιλέγονται για την προσέγγιση των μεταβολικών αποτυπωμάτων είναι κυρίως βιολογικά υγρά και εκχυλίσματα κυττάρων ή ιστών. Αυτά μπορεί να περιλαμβάνουν αίμα (ορός, πλάσμα), ούρα, κόπρανα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, λεμφικό υγρό, χολή, σάλιο, αμνιακό υγρό και ιστούς.

Το αίμα και τα ούρα είναι τα πιο συχνά μελετημένα δείγματα. Η συλλογή δειγμάτων ούρων αποτελεί μη επεμβατική διαδικασία και η συλλογή δειγμάτων αίματος ελάχιστα επεμβατική, σε σύγκριση π.χ. με τη συλλογή εγκεφαλονωτιαίου υγρού και ιστών. Με την ανάλυση δειγμάτων ιστού μπορούν να εντοπιστούν μικρές μεταβολικές αλλαγές σε ένα συγκεκριμένο μέρος του σώματος (π.χ. νεφρός για νεφρικές ασθένειες). Το αίμα και τα ούρα είναι βιορευστά, που απεικονίζουν τις λειτουργίες και τους φαινοτύπους πολλών διαφορετικών τμημάτων του σώματος σε ένα μόνο δείγμα, ουσιαστικά το «μεταβολικό αποτύπωμα» των ιστών. Περιέχουν επίσης χιλιάδες μεταβολίτες και ως εκ τούτου παρέχεται ολιστικά η αποτύπωση της κατάστασης υγείας πολλών οργάνων του σώματος<sup>32</sup>.

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΑΙ ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ QC ΣΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ**

#### **3.1 Ανάπτυξη μεθοδολογίας**

Ένα δείγμα ορού ή πλάσματος είναι περίπλοκο μίγμα οργανικών και ανόργανων χημικών ουσιών χαμηλού μοριακού βάρους σε συνδυασμό με ενώσεις υψηλότερου μοριακού βάρους, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών και του RNA.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η προετοιμασία δειγμάτων ορού και πλάσματος για ανάλυση LC ή GC περιλαμβάνει βήμα αφαίρεσης των μορίων υψηλού μοριακού βάρους, το οποίο περιλαμβάνει την προσθήκη μείγματος οργανικού διαλύτη ή μείγματος διαλυτών για την καθίζησή τους, που ακολουθείται από φυγοκέντριση για τον διαχωρισμό του ιζήματος και του υπερκείμενου υγρού, που περιέχει τους μεταβολίτες. Αυτό περιγράφεται ως στάδιο αποπρωτεϊνοποίησης και έχει περιγραφεί πληθώρα μεθόδων σε μεταβολομικές εφαρμογές που περιλαμβάνουν διαφορετικούς διαλύτες ή μίγματα διαλυτών και θερμοκρασίες. Η μεθανόλη, σε αναλογία 3:1 (v/v) προς το δείγμα, έχει αποδειχθεί ότι είναι εξαιρετικά αποτελεσματική στην απομάκρυνση πρωτεϊνών σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ αποτελεί μέθοδο επιλογής καθώς είναι εξαιρετικά απλή στην εφαρμογή της. Ως εκ τούτου επιλέχθηκε στην παρούσα μελέτη. Επομένως, αν και το πρωτόκολλο εκχύλισης ορού και πλάσματος χρησιμοποιεί πολικούς διαλύτες (μεθανόλη, νερό) και άρα αναμένεται να απομονώνει πολικούς μεταβολίτες, τα δεδομένα έχουν δείξει ότι υπάρχει επίσης ένα ευρύ φάσμα μη πολικών μεταβολιτών (φωσφολιπίδια, λιπαρά οξέα), που ανιχνεύονται, ακόμη και χωρίς την εφαρμογή άπολων διαλυτών, όπως το χλωροφόρμιο. Συνεπώς, η μέθοδος διευκολύνει την ανίχνευση και επεξεργασία μεταβολιτών σε δείγματα ορού και πλάσματος.

Ο ορός και το πλάσμα περιέχουν υψηλά επίπεδα ενζύμων και πρωτεϊνών όπως η αλβουμίνη, επομένως η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται η προετοιμασία του δείγματος είναι σημαντική παράμετρος. Η βέλτιστη θερμοκρασία για τη δραστηριότητα των περισσότερων ενζύμων είναι 37 °C (θερμοκρασία σώματος). Οι μειωμένες θερμοκρασίες θα μειώσουν τη δραστηριότητα του ενζύμου, αν και η δραστηριότητα δεν αναστέλλεται πλήρως έως ότου επιτευχθούν θερμοκρασίες κάτω των -56 °C. Επομένως, η προετοιμασία του δείγματος στο στάδιο που περιλαμβάνει την προσθήκη διαλύτη για την κατακρήμνιση πρωτεϊνών θα πρέπει να εκτελείται σε θερμοκρασίες ακριβώς πάνω από το σημείο πήξης του νερού και συνιστάται η απόψυξη/προετοιμασία σε πάγο<sup>33</sup>.

Συνιστάται, η σειρά προετοιμασίας του δείγματος να τυχαιοποιείται από τη συλλογή δείγματος και να επανατυχαιοποιείται από τη σειρά ανάλυσης δείγματος για να διασφαλιστεί ότι δεν υπάρχουν συστηματικά σφάλματα (π.χ. για να διασφαλιστεί ότι η σειρά ανάλυσης δεν συσχετίζεται με τη σειρά προετοιμασίας του δείγματος).

Αξίζει να αναφερθεί ότι στη μελέτη HUSERMET αποδεικνύεται για πρώτη φορά ότι ο ρόλος των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (Quality Control QC) είναι ουσιαστικός σε μακροχρόνιες μεταβολομικές μελέτες που χρησιμοποιούν φασματομετρία μάζας. Χωρίς τη χρήση δειγμάτων QC, η επαναληψιμότητα των δεδομένων είναι σημαντικά χαμηλότερη και δεν επιτρέπει να γίνουν βιολογικές συγκρίσεις. Ακόμη η ανάλυση δειγμάτων με διαφορετικές αναλυτικές τεχνικές (GC-MS και UPLC-MS και φασματοσκοπία NMR, όπως εκτελείται στη

μελέτη HUSERMET) παρέχει επίσης συμπληρωματικά δεδομένα, με πολλούς μεταβολίτες να ανιχνεύονται μόνο σε μία ή δύο από αυτές<sup>19</sup>.

### **3.2 Χρήση δειγμάτων ελέγχου ποιότητας της μεθόδου (QC samples)**

Στη μεταβολομική, η χρήση δειγμάτων QC και η χρήση τους στη διαδικασία διασφάλισης ποιότητας παρέχει έναν μηχανισμό για την αξιολόγηση της ποιότητας και την εκτίμηση της αναλυτικής διακύμανσης των δεδομένων. Αποτελεί δηλαδή μια μεθοδολογία εσωτερικού ελέγχου ποιότητας. Το δείγμα QC πρέπει να αντιπροσωπεύει ποιοτικά και ποσοτικά ολόκληρη τη συλλογή δειγμάτων που περιλαμβάνονται στη μελέτη, παρέχοντας κατά μέσο όρο όλο το μεταβόλωμα που αναλύθηκε στη μελέτη. Τα δείγματα QC αναλύονται κατά διαστήματα κατά τη διάρκεια της αναλυτικής μελέτης για να εκτιμηθεί η διακύμανση που παρατηρείται στα δεδομένα καθ' όλη τη διάρκεια της προετοιμασίας του δείγματος, της συλλογής δεδομένων και της προ-επεξεργασίας δεδομένων. Η ανάλυση των δειγμάτων αυτών γίνεται παράλληλα με την ανάλυση των αγνώστων δειγμάτων και έχει ως σκοπό τον εντοπισμό και την αναίρεση κυρίως των συστηματικών αναλογικών σφαλμάτων. Οι επαναλαμβανόμενες ενέσεις πρέπει να παρέχουν πανομοιότυπα δεδομένα για κάθε ένεση, ωστόσο στην πραγματικότητα θα παρατηρηθεί αναλυτική διακύμανση και οι επαναλαμβανόμενες ενέσεις QC μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μέτρηση αυτής της διακύμανσης σε όλη την αναλυτική μελέτη.

Σε μη στοχευμένες μεταβολομικές εφαρμογές, τα QC εφαρμόζονται για να εκτιμηθεί και να διασφαλιστεί ότι η αναλυτική διαδικασία εκτελείται κατάλληλα και πληροί τα προκαθορισμένα κριτήρια. Υπάρχουν διάφοροι τύποι δειγμάτων QC. Το ιδανικό δείγμα QC είναι ένα συγκεντρωτικό δείγμα στο οποίο αναμιγνύονται ένα μικρό δείγμα από κάθε βιολογικό δείγμα της μελέτης. Το συγκεντρωτικό QC αντιπροσωπεύει τόσο τη μήτρα δείγματος (matrix) όσο και τη σύνθεση μεταβολιτών των δειγμάτων. Το συγκεντρωτικό μείγμα QC χρησιμοποιείται για την παραγωγή πολλαπλών δειγμάτων QC που μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατά τη διάρκεια της αναλυτικής μελέτης.

Εάν δεν είναι δυνατή η δημιουργία συγκεντρωτικού δείγματος QC λόγω περιορισμένων ποσοτήτων δείγματος ή εάν η μελέτη περιλαμβάνει χιλιάδες δείγματα που πρέπει να συλλεχθούν σε διάστημα αρκετών μηνών ή ετών, τότε θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί ένα εναλλακτικό δείγμα QC. Εάν πρόκειται για μεγάλο σετ μελέτης (με περισσότερα από 500 δείγματα) το QC μπορεί να παρασκευαστεί από την πρώτη παρτίδα δειγμάτων που συλλέχθηκαν. Ωστόσο, τα δείγματα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικά όλης της ομάδας μελέτης. Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα εμπορικά διαθέσιμο δείγμα QC, για παράδειγμα ανθρώπινος ορός μπορεί να αγοραστεί από εμπορικούς προμηθευτές. Η προετοιμασία των QC θα πρέπει να ακολουθεί την ίδια διαδικασία που πραγματοποιήθηκε κατά την προετοιμασία των βιολογικών δειγμάτων της μελέτης και ο αριθμός των κύκλων ψύξης-απόψυξης θα πρέπει να τυποποιείται μεταξύ του QC και των βιολογικών δειγμάτων μελέτης.

Εάν δεν είναι διαθέσιμο ούτε ένα συγκεντρωτικό QC ούτε μια εμπορική εναλλακτική λύση για παράδειγμα σε δείγματα με χαμηλό όγκο όπως δάκρυα ή χολή τότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα συνθετικό υποκατάστατο. Το συνθετικό υποκατάστατο πρέπει να περιλαμβάνει ένα κοκτέιλ μεταβολιτών που περιλαμβάνει πολλούς εκπροσώπους από κάθε κατηγορία μεταβολιτών που αναμένονται στα δείγματα της μελέτης και το συνθετικό QC πρέπει να παρασκευάζεται υπό ίδιες συνθήκες με τα δείγματα της μελέτης.

Τα δεδομένα από τα δείγματα QC χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση της ολίσθησης, τον διαχωρισμό δεδομένων υψηλής και χαμηλής ποιότητας, τη διόρθωση της

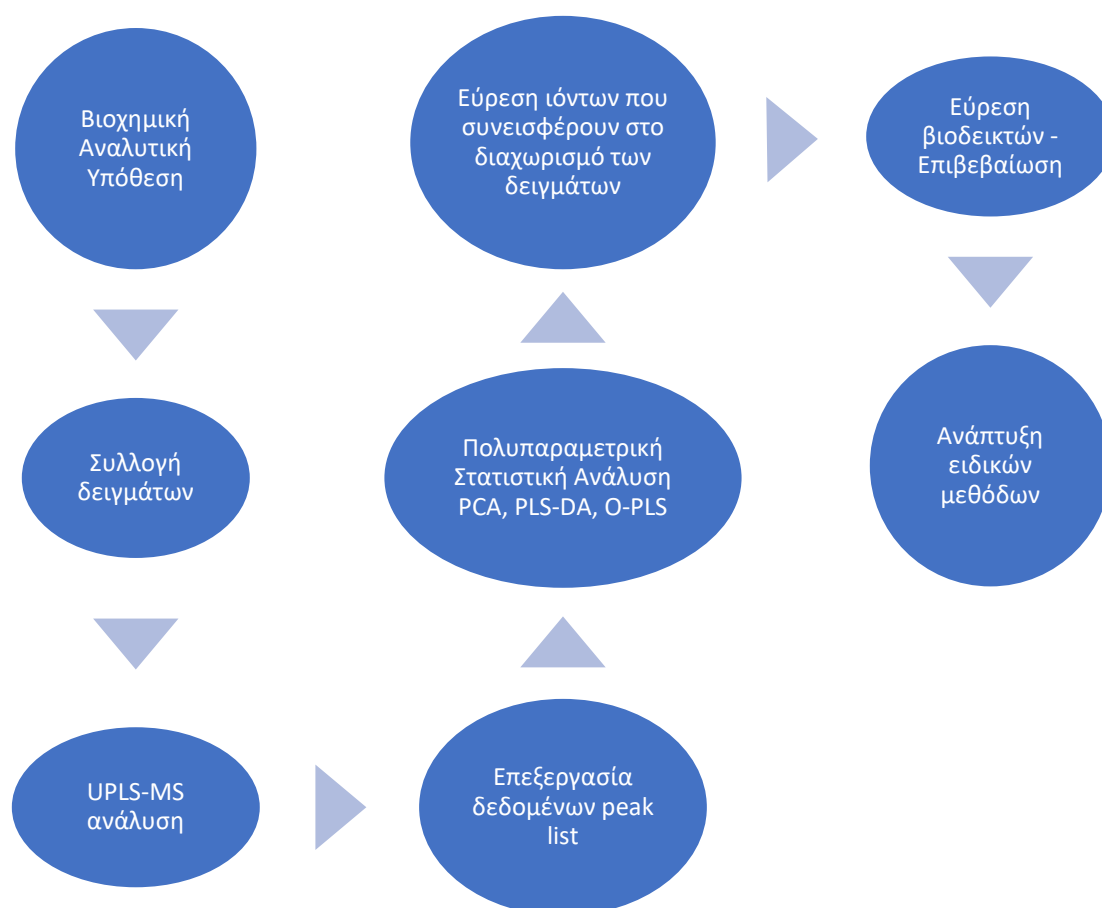
μετατόπισης στο σήμα και την ενσωμάτωση πολλαπλών αναλυτικών πειραμάτων. Δηλαδή, τα δείγματα QC αποτελούν ένα μέτρο της επαναληψιμότητας σε μια αναλυτική παρτίδα και επιτρέπουν την αφαίρεση μεταβολικών χαρακτηριστικών με υπερβολική μετατόπιση σήματος, χρόνου κατακράτησης ή ακριβούς μάζας, πριν από την ανάλυση δεδομένων όπως σε διαδικασία ποιοτικού ελέγχου.

Η τεχνική ανάλυσης δεδομένων PCA (Principal Component Analysis) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εκτιμηθεί γρήγορα η αναπαραγωγικότητα των δειγμάτων QC σε μια αναλυτική πορεία. Τα δείγματα QC χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της διακύμανσης όλων των μεταβολιών. Εάν η διακύμανση θεωρηθεί ότι είναι πολύ υψηλή (δηλαδή, 20% για δεδομένα LC-MS), τότε το χαρακτηριστικό αφαιρείται από την ανάλυση. Αυτό το βήμα επεξεργασίας πραγματοποιείται στην αρχή της διαδικασίας ανάλυσης δεδομένων<sup>34</sup>.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΛΟΓΙΣΜΙΚΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΦΑΣΜΑΤΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

### 4.1 Προεπεξεργασία και στατιστική ανάλυση φασματικών δεδομένων

Τα δείγματα που εξετάζονται στις μελέτες μεταβολομικής περιλαμβάνουν μεγάλο αριθμό μεταβολιτών (και γενικότερα «χημικής πληροφορίας»). Η χημική πολυπλοκότητα του δείγματος οδηγεί σε υψηλή πολυπλοκότητα στο φάσμα, δυσχεραίνοντας την ερμηνεία και την εξαγωγή χρήσιμων πληροφοριών από τα μεταβολικά προφίλ που προκύπτουν. Συνεπώς, αφού πραγματοποιηθεί η ανάλυση των δειγμάτων με κάποια από τις αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται, τα δεδομένα που συλλέχθηκαν υφίστανται προεπεξεργασία, ώστε να είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους, για να εξαχθεί χρήσιμη πληροφορία από αυτά, που να μπορεί να αξιοποιηθεί.

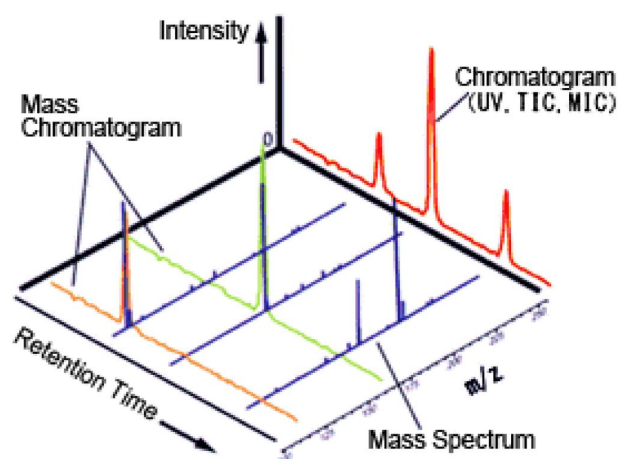


Εικόνα 7: Πορεία πραγματοποίησης μιας μεταβολομικής μελέτης

Στην εικόνα φαίνεται η ολική πορεία της μεταβολομικής ανάλυσης με χρήση UPLC-MS. Ξεκινώντας από μια αρχική ιδέα (π.χ. την ανακάλυψη βιοδεικτών κάποιας συγκεκριμένης ασθένειας), πρέπει τα δείγματα να συλλεχθούν σύμφωνα με αυστηρά προεπιλεγμένα κριτήρια, ώστε να εξαλειφθεί η πιθανότητα εισαγωγής μη απαραίτητων παραγόντων στατιστικού ή χημικού θορύβου.



Εφόσον ακολουθηθεί ενδεδειγμένη και αναλυτικός πειραματικός σχεδιασμός, τα δείγματα αναλύονται στο UPLC-MS με πλήρη σάρωση στο φασματοόμετρο μαζών και βαθμιδωτή έκλυση στο χρωματογράφο, ώστε να συλλεχθεί όσο πιο πλούσιο προφίλ είναι δυνατόν: να εκλυσθούν και να μετρηθούν όσο περισσότερες ενώσεις γίνεται. Το χρωματογράφημα μοιάζει με κύβο που έχει στις τρεις διαστάσεις του: το χρόνο, την κλίμακα  $m/z$  και την ένταση σήματος.



Εικόνα 8: Χρωματογράφημα όπου απεικονίζονται οι 3 διαστάσεις του (χρόνος,  $m/z$ , ένταση σήματος)

Τα δεδομένα εξετάζονται και μελετάται η σταθερότητα του συστήματος με κριτήρια τη σταθερότητα απόκρισης του ανιχνευτή και τη σταθερότητα των χρόνων συγκράτησης. Μελετώνται δείγματα ελέγχου ποιότητας και με κατάλληλους αλγόριθμους (QC-RLSC και QC-RFSC) είναι δυνατή η διόρθωση του σήματος όλων των μεταβολιτών που περιλαμβάνονται στα δείγματα σύμφωνα με τους μεταβολίτες στα δείγματα ελέγχου. Εφόσον οι μετρήσεις είναι ικανοποιητικές, τα δεδομένα αναλύονται με ειδικό λογισμικό το οποίο συρρικνώνει τις δύο διαστάσεις: χρόνο και κλίμακα  $m/z$ , σε μία, την ταυτότητα της κορυφής, δημιουργώντας ένα χρωματογράφημα για κάθε χαρακτηριστικό, οπότε παράγεται πίνακας που περιέχει τις εντάσεις σήματος από την ολοκλήρωση κάθε κορυφής σε κάθε δείγμα. Ο πίνακας εισάγεται για στατιστική ανάλυση με στόχο τη μελέτη τάσεων μεταξύ των δειγμάτων.

Ακολουθεί στάδιο προεπεξεργασίας (pre-treatment) κατά το οποίο γίνεται αναδιαμόρφωση των στηλών και των γραμμών του πίνακα. Σε αυτό το στάδιο επιλέγεται ποιος τύπος προεπεξεργασίας είναι καταλληλότερος για τα δεδομένα. Συνήθεις μέθοδοι προεπεξεργασίας δεδομένων είναι η μεσοστάθμιση (meancentering), η κανονικοποίηση (normalization) και διάφοροι τύποι κλιμάκωσης δεδομένων (scaling). Μέσω της κανονικοποίησης πραγματοποιείται προσπάθεια εξισορρόπησης του συνόλου των διαφορών, που παρατηρούνται στις συγκεντρώσεις, μεταξύ των δειγμάτων, εξαιτίας των διαφορετικών λόγων αραίωσης (πειραματικά σφάλματα). Μεταβολίτες που βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία στο εξεταζόμενο βιολογικό υγρό θα είναι υπεύθυνοι και για τις κυριότερες διαφορές που θα παρατηρούνται μεταξύ των δειγμάτων, επισκιάζοντας την επίδραση λιγότερο άφθονων μεταβολιτών που δίνουν κορυφές μικρότερης έντασης στο

φάσμα. Για την εξισορρόπηση τέτοιων διαφορών έντασης εφαρμόζονται διάφοροι τύποι κλιμάκωσης δεδομένων (π.χ. UV scaling, pareto scaling).

Έπειτα, μελετάται η αξιοπιστία του στατιστικού μοντέλου, η ικανότητα κατηγοριοποίησης των διαφορετικών ομάδων και πρόβλεψης των δειγμάτων. Εάν αυτά είναι ικανοποιητικά, μελετώνται οι βιοδείκτες/μεταβλητές που ευθύνονται για την ομαδοποίηση. Ο αναλυτής αναζητεί ποιες κορυφές έχουν διαφορετική συγκέντρωση στις ομάδες και συνεισφέρουν στην αναλυτική τους διαφοροποίηση.

Εφόσον οι δείκτες είναι αξιόπιστοι και επαναλήψιμοι, ακολουθεί μελέτη με επιπλέον τεχνικές για την εύρεση της δομής τους. Αυτό είναι συχνά το πιο δύσκολο τμήμα της μελέτης, όπου μπορεί να μην υπάρξει τελικό αποτέλεσμα. Η μελέτη ξεκινά με αναζήτηση σε τοπικές βιβλιοθήκες ή βιβλιοθήκες στο internet για εύρεση πιθανών μοριακών τύπων και δομών με βάση τη μετρούμενη μοριακή μάζα. Για να υπάρξει απόλυτη ταυτοποίηση πρέπει να αναλυθεί το δείγμα εμβολιασμένο με την υποψήφια ένωση και να παρατηρηθεί αύξηση σήματος και ταύτιση φασμάτων. Στο τέλος, οι επιβεβαιωμένοι βιοδείκτες πρέπει να τοποθετηθούν στη βιοσυνθετική οδό και να αποκαλυφθεί ο μηχανισμός αύξησης ή μείωσης της συγκέντρωσής τους στην κάθε περίπτωση <sup>15</sup>.

## 4.2 Λογισμικά επεξεργασίας

Για την επεξεργασία δεδομένων μεταβολομικής, μεγάλος αριθμός λογισμικών είναι διαθέσιμος, τόσο εμπορικά όσο και σε επίπεδο ελεύθερου λογισμικού. Η βασική πορεία επεξεργασίας δεδομένων για πολλά από αυτά τα λογισμικά αποτελείται από διάφορα στάδια, από το φιλτράρισμα και την ανίχνευση χαρακτηριστικών (feature detection) έως διαδικασίες ευθυγράμμισης (alignment), εξομάλυνσης (normalization) και ταυτοποίησης (identification). Σε κάθε στάδιο, διαφορετικές μέθοδοι μπορεί να είναι διαθέσιμες οι οποίες, με τη σειρά τους, έχουν αρκετές παραμέτρους που ποικίλλουν και μπορούν να μεταβάλλονται με συνεχή ή διακριτό τρόπο. Η ποιότητα των επεξεργασμένων δεδομένων εξαρτάται από τις ρυθμίσεις των παραμέτρων. Ο αριθμός των κορυφών που προκύπτουν από ένα συγκεκριμένο σύνολο παραμέτρων μπορεί να κυμαίνεται από μερικές εκατοντάδες έως αρκετές χιλιάδες. Βασικό ζήτημα αποτελεί το γεγονός ότι περισσότερες κορυφές δε συνεπάγονται απαραίτητα καλύτερα αποτελέσματα, με αποτέλεσμα να είναι απαραίτητη η διάκριση των αξιόπιστων υψηλού ενδιαφέροντος κορυφών στο σύνολο των δειγμάτων από αναξιόπιστες κορυφές, οργανολογικό ή χημικό θόρυβο, και άλλες μη ταυτοποιήσιμες κορυφές. Οι ρυθμίσεις των διαφόρων παραμέτρων όχι μόνο θα δώσουν διαφορετικό αριθμό κορυφών, αλλά πιθανότατα και διαφορετικές κορυφές.

Τα λογισμικά που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν τα εξής:

- Data Analysis (Bruker Daltonics, Βρέμη, Γερμανία)
- Compass HyStar (Bruker Daltonics, Βρέμη, Γερμανία)
- oTOF (Bruker Daltonics, Βρέμη, Γερμανία)
- Chromeleon™ Chromatography Data System (CDS) (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA ΗΠΑ)
- SIMCA 14.1 (Umetrics, Ουψάλα, Σουηδία)
- MZmine 2.51
- MyCompound ID

### 4.3 MZmine 2.51

Το MZmine 2.51 ενδείκνυται για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση δειγμάτων βιολογικών υγρών, μεταβολομικής ή και πρωτεομικής ανάλυσης, καθώς μπορεί να υποστηρίξει πλήρως την επεξεργασία φασμάτων υψηλής ανάλυσης. Το πλαίσιο εργασίας είναι ευέλικτο και το γραφικό περιβάλλον της εφαρμογής χαρακτηρίζεται «διαισθητικό», κάτι το οποίο επιτυγχάνεται αφού συγκεκριμένες μέθοδοι επεξεργασίας δεδομένων (π.χ. peak picking) συνδέονται με ενσωματωμένες μονάδες απεικόνισης, παρέχοντας τη δυνατότητα προεπισκόπησης κατά τη ρύθμιση των παραμέτρων. Επιπλέον, η χρήση οποιασδήποτε μεθόδου επεξεργασίας δεδομένων σε MZmine 2.51 δεν καταργεί τα αρχικά δεδομένα, δίνοντας στο χρήστη την επιλογή να επιστρέψει πίσω σε προηγούμενα αποτελέσματα ή ανεπεξέργαστα δεδομένα σε οποιοδήποτε στάδιο της επεξεργασίας των δεδομένων και να έχει πλήρη εποπτεία της επεξεργασίας καθ' όλη τη διάρκειά της. Κάθε βήμα επεξεργασίας δεδομένων μπορεί να εκτελεστεί πολλές φορές με διαφορετικές παραμέτρους και τα αποτελέσματα μπορούν να παρατηρηθούν και να συγκριθούν<sup>35</sup>.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, πριν γίνει εισαγωγή των μη επεξεργασμένων δεδομένων (raw data) το πρόγραμμα πραγματοποιήθηκε μετατροπή των δεδομένων από αρχεία με επέκταση .abf σε αρχεία με επέκταση .mzXML. Η ίδια διαδικασία επεξεργασίας ακολουθήθηκε τόσο για τη θετική όσο και για την αρνητική λειτουργία με μικρή διαφοροποίηση των παραμέτρων και έγινε αναζήτηση διαφορετικών adducts.

Τα κυριότερα βήματα που ακολουθήθηκαν κατά την επεξεργασία των δεδομένων είναι τα εξής:

#### 1) **Raw data methods**

- i. Raw data import: εισαγωγή ακατέργαστων δεδομένων στο πρόγραμμα. Το MZmine μπορεί να διαβάσει και να επεξεργαστεί δεδομένα τόσο χαμηλής (unit mass) όσο και υψηλής (exact mass) ανάλυσης, σε profile αλλά και centroid mode. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα centroid, καθώς θεωρήθηκε ότι συρρικνώνουν το μέγεθος των αρχείων χωρίς απώλεια πληροφορίας.
- ii. Data visualization:
  - 2D visualizer: εμφανίζει διάγραμμα δύο διαστάσεων, όπου ο άξονας X αντιστοιχεί στο χρόνο κατακράτησης (Rt) και ο άξονας Y στην τιμή  $m/z$ . Ο χρωματικός κώδικας για την απεικόνιση των σημείων στο επίπεδο ανταποκρίνεται στην ένταση των δεδομένων στη συγκεκριμένη περιοχή.
  - 3D visualizer: παρουσιάζει τρισδιάστατη γραφική παράσταση, όπου ο άξονας X αντιπροσωπεύει τον χρόνο κατακράτησης, άξονας Y την τιμή  $m/z$  και ο Z άξονας την ένταση του σήματος. Το διάγραμμα αυτό είναι η συλλογή όλων των πληροφοριών από τα ανεπεξέργαστα δεδομένα σε μια γραφική παράσταση.
- iii. Filtering-crop filter: περικοπή ακατέργαστων αρχείων δεδομένων (διαχωρισμός των λειτουργιών MS μεταξύ τους πχ MS1 (φάσματα πλήρους σάρωσης από MS2 (φάσματα δίδυμης φασματομετρίας μάζας MS/MS). Με τον αλγόριθμο αυτό διαχωρίστηκαν τα φάσματα bbCID σε χαμηλής και υψηλής ενέργειας πρόσκρουσης – τα πρώτα χρησιμοποιήθηκαν για την διαδικασία επιλογής κορυφών peak picking ενώ τα επόμενα για την διαδικασία σχολιασμού (annotation) των κορυφών.

- iv. Feature detection- mass detection: ανίχνευση μεμονωμένων ιόντων σε κάθε σάρωση (scan) και δημιουργία πίνακα μαζών (mass list) για κάθε σάρωση (scan). Χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος centroid mass detector καθώς είναι ο μόνος κατάλληλος για centroided δεδομένα. Στηρίζεται στην υπόθεση ότι κάθε σήμα πάνω από δεδομένο επίπεδο θορύβου είναι ανιχνεύσιμο ιόν και ιόν ενδιαφέροντος.
- v. Feature detection -ADAP chromatogram builder: αυτή η ενότητα συνδέει σημεία δεδομένων (data points) από λίστες μάζας (mass lists) και δημιουργεί χρωματογραφήματα. Συγκεκριμένα, λαμβάνει τις λίστες μαζών που δημιουργούνται για κάθε σάρωση MS και κατασκευάζει ένα χρωματογράφημα για κάθε μάζα που διατρέχει τις σαρώσεις. Ο αλγόριθμος λειτουργεί διατηρώντας μια ομάδα χρωματογραφημάτων που εκτείνεται πάνω από διαδοχικές σαρώσεις. Μόνο οι σαρώσεις MS επιπέδου 1 λαμβάνονται υπόψιν για την κατασκευή των χρωματογραφημάτων. Με την εφαρμογή του δημιουργείται μια λίστα κορυφών (peak list). Οι σημαντικότερες παράμετροι που ορίστηκαν ήταν:
  - group intensity threshold: Αυτή η παράμετρος είναι η τιμή της έντασης για την οποία εντάσεις μεγαλύτερες από αυτήν την τιμή μπορούν να συμβάλουν στη δημιουργία χρωματογραφικής κορυφής
  - ελάχιστη υψηλή ένταση (min highest intensity): σημεία κάτω από αυτή την ένταση δε θα συμπεριλαμβάνονται στο σχηματισμό νέου χρωματογραφήματος
  - όρια ανοχής m/z ( m/z tolerance): Η μέγιστη επιτρεπόμενη διαφορά μεταξύ δύο τιμών m/z που θα θεωρείται ίδια. Η τιμή καθορίζεται τόσο ως απόλυτη ανοχή (σε m/z) όσο και ως σχετική ανοχή (σε ppm). Το εύρος ανοχής υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το μέγιστο της απόλυτης και σχετικής ανοχής.

## 2) Feature list methods

- i. Feature detection- deconvolution: μετά την ανίχνευση των χρωματογραφημάτων του προηγούμενου βήματος πραγματοποιείται αποσυνέλιξη (deconvolution) των χρωματογραφημάτων σε μεμονωμένες κορυφές (αποδίδονται οι χρωματογραφικές κορυφές ισοβαρών σε διαφορετικά χρωματογραφήματα). Ο αλγόριθμος που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο noise amplitude και ορίστηκαν οι παράμετροι:
  - ελάχιστο ύψος κορυφής (min peak height): ως το ελάχιστο αποδεκτό ύψος (ένταση) μιας χρωματογραφικής κορυφής
  - πλάτος θορύβου (amplitude of noise): αυτή η τιμή είναι το πλάτος της έντασης του σήματος στην περιοχή του θορύβου
  - εύρος κορυφής σε λεπτά
- ii. Isotopes- isotopic peak grouper (Ισότοπα και ομαδοποίηση ισωτόπων): ανίχνευση ισωτοπικών κορυφών και ομαδοποίηση σε ισότοπα μοτίβα (isotope patterns). Δηλαδή όταν μια δομή ισωτόπου εντοπίζεται, οι πληροφορίες σχετικά με τις αναλογίες ισωτόπων αποθηκεύονται, και οι επιπλέον κορυφές που αντιστοιχούν σε ισότοπα αφαιρούνται από την peak list. Διατηρείται το επίπεδο φόρτισης του μορίου (charge state) με τον υψηλότερο αριθμό αναγνωρισμένων ισωτόπων.
- iii. Ταυτοποίηση – έλεγχος ιόντων προσθήκης (Identification- adduct search): αυτή η μέθοδος αναζητά κορυφές που οφείλονται σε ιόντα προσθήκης (adduct peaks) που εμφανίζονται ταυτόχρονα με άλλες κορυφές. Τα ιόντα προσθήκης αναγνωρίζονται

- καθώς έχουν καθορισμένη διαφορά μάζας από το μοριακό όν που αντιστοιχεί σε κάποιο ιοντικό είδος όπως  $K^+$ ,  $Na^+$  κλπ
- iv. Κανονικοποίηση - Βαθμονόμηση χρόνου κατακράτησης (Normalization- retention time calibration): η βαθμονόμηση του χρόνου κατακράτησης (retention time) αποσκοπεί στη μείωση της απόκλιση των χρόνων κατακράτησης (retention times) μεταξύ των χαρακτηριστικών (features) των καταχωρήσεων μιας λίστα χαρακτηριστικών (feature list). Αυτό πραγματοποιείται αναζητώντας κοινά χαρακτηριστικά σε αυτές τις λίστες με ορθή χρωματογραφική συμπεριφορά (well behaved peaks) και χρησιμοποιώντας τα ως πρότυπα βαθμονόμησης. Ως ελάχιστη τυπική ένταση (minimum standard intensity) ορίζεται το ελάχιστο ύψος της εκάστοτε χρωματογραφικής κορυφής που θα επιλεγεί ως κανονικοποιημένο πρότυπο.
  - v. Ευθυγράμμιση (Alignment) Αλγόριθμος join aligner: αυτή η μέθοδος ευθυγραμμίζει (aligns) τις εντοπισμένες κορυφές χρησιμοποιώντας ένα σκορ αντιστοίχισης (match score). Αυτή η βαθμολογία υπολογίζεται με βάση το λόγο  $m/z$  και τον χρόνο κατακράτησης κάθε κορυφής και το εύρος ανοχής, που ορίζεται από το χρήστη στο διάλογο ρύθμισης παραμέτρων (preset tolerance). Σημαντικοί παράμετροι σε αυτό το βήμα είναι:
    - Weight for  $m/z$ : βαθμολογία για τέλεια αντίστοιχη τιμή  $m/z$
    - Weight for RT: βαθμολογία για τέλεια αντίστοιχη τιμή  $t_R$
  - vi. Συμπλήρωση ελλειπουσών τιμών – συμπλήρωση χρωματογραφικών κορυφών Gap filling- peak finder: αυτή η μέθοδος συμπληρώνει τις κορυφές (gaps) που λείπουν στη feature list αναζητώντας μια κορυφή στα ανεπεξέργαστα δεδομένα (raw data). Ως intensity tolerance είναι η μέγιστη επιτρεπόμενη % απόκλιση από το αναμενόμενο σχήμα μιας χρωματογραφικής κορυφής.
  - vii. Απαλοιφή διπλότυπων (Filtering- duplicate): αυτή η μέθοδος αφαιρεί τις διπλές κορυφές (κορυφή με τον ίδιο χρόνο κατακράτησης και  $m/z$ ) από τη feature list .
  - viii. Εξαγωγή σε αρχείο csv (Export- export to csv file): αυτή η μέθοδος εξαγεί τις feature lists σε ένα αρχείο csv (τιμές διαχωρισμένες με κόμμα).

#### 4.4 statTarget

Κάθε μεγάλης κλίμακας μελέτη φασματομετρίας μάζας, βασισμένη στη μεταβολική μελέτη, απαιτεί τη μακροπρόθεσμη ανάλυση πολλαπλών παρτίδων βιολογικών δειγμάτων, η οποία συχνά συνοδεύεται από σημαντική μεταβολή της έντασης του σήματος τόσο μεταξύ όσο και εντός παρτίδων. Οι ανεπιθύμητες παραλλαγές μπορούν να οδηγήσουν σε κακή αναπαραγωγιμότητα εντός της ημέρας και μεταξύ των ημερών, γεγονός που αποτελεί εμπόδιο για την ανακάλυψη των διαφοροποιήσεων μεταξύ των δειγμάτων.

Η χρήση δειγμάτων ελέγχου ποιότητας και στρατηγικών επεξεργασίας δεδομένων στη διαδικασία διασφάλισης ποιότητας παρέχει τον μηχανισμό για την αξιολόγηση της ποιότητας και την αφαίρεση της αναλυτικής διακύμανσης των δεδομένων. Το statTarget αποτελεί ένα τέτοιο εργαλείο με εύχρηστο γραφικό περιβάλλον εργασίας και ενσωματωμένη σειρά αλγορίθμων, που αναπτύχθηκαν ειδικά για την αξιολόγηση της ποιότητας των δεδομένων και την αφαίρεση ανεπιθύμητων παραλλαγών για δεδομένα omics, βασισμένα σε φασματομετρία μάζας. Μάλιστα στο statTarget προστέθηκε, ένας νέος

αλγόριθμος τυχαίας διόρθωσης σήματος βασισμένος σε δένδρα αποφάσεων για ποιοτικό έλεγχο, ο οποίος μπορεί να αφαιρέσει την ανεπιθύμητη διολίσθηση μεταξύ και εντός παρτίδων σε επίπεδο χαρακτηριστικών. Η αξιολόγηση, που έγινε σε πραγματικά δείγματα, έδειξε ότι ο αλγόριθμος αυτός θα μπορούσε να βελτιώσει την ακρίβεια των δεδομένων και τη στατιστική ακρίβεια για τα δεδομένα μεταβολομικής και πρωτεομικής βασισμένα σε φασματομετρία μάζας. Επιπλέον, το statTarget προσφέρει τις ορθολογικές διαδικασίες για την απόδοση και την κανονικοποίηση δεδομένων, την μονοπαραμετρική και πολυπαραμετρική ανάλυση και την επιλογή χαρακτηριστικών. Συμπερασματικά, το statTarget επιτρέπει στη φιλική προς το χρήστη βελτίωση της ακρίβειας των δεδομένων για την αποκάλυψη των βιολογικών διαφορών, γεγονός που διευκολύνει σε μεγάλο βαθμό τόσο την ποσοτική επεξεργασία όσο και τη στατιστική ανάλυση δεδομένων που βασίζονται στη φασματομετρία μάζας<sup>36</sup>.

#### **4.5 Πολυμεταβλητά δεδομένα και στατιστική ανάλυση**

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα πολυμεταβλητά δεδομένα που έχουν προκύψει έπειτα από την επεξεργασία των φασμάτων, παρότι έχουν υποστεί προεπεξεργασία για να είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους, είναι δύσκολο να αναλυθούν αλλά και να αναπαρασταθούν γραφικά. Γι' αυτό απαιτείται η χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής, προκειμένου να ερμηνευτούν και να κατηγοριοποιηθούν τα μεταβολικά δεδομένα.

Συνεπώς, εφαρμόζονται πολυμεταβλητές τεχνικές για τη μείωση των διαστάσεων του προβλήματος, μέσω μείωσης των αρχικών μεταβλητών και διατήρησης ενός μικρότερου αριθμού νέων μεταβλητών. Με αυτόν τον τρόπο, αναδεικνύονται οι στατιστικά σημαντικές λανθάνουσες παράμετροι (latent variables) καθώς επίσης δημιουργούνται απλά γραφήματα, που βοηθούν στην ανάδειξη των συσχετίσεων στα δεδομένα και διευκολύνουν την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

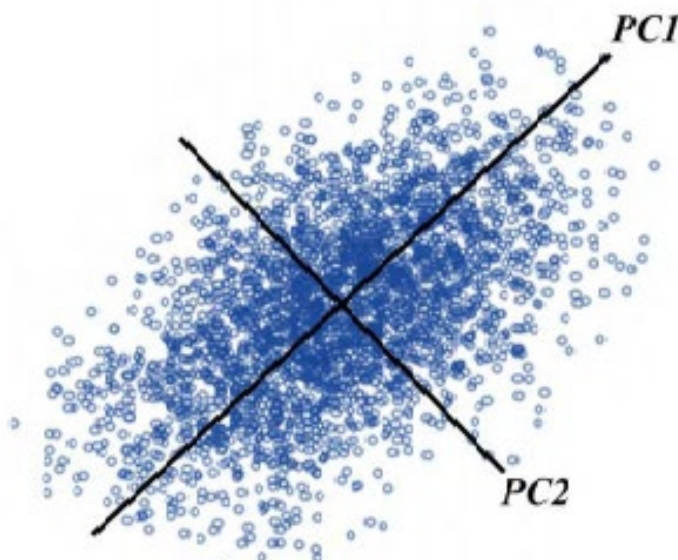
##### **4.5.1 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA)**

Η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA) είναι μη επιβλεπόμενη και ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος ανάλυσης πολυμεταβλητών δεδομένων που στοχεύει στη μείωση του αριθμού των αρχικών μεταβλητών, αλλά και την αντιπροσώπευσή τους από λιγότερες, αλλά ικανοποιητικά επεξηγηματικές, καινούργιες μεταβλητές (λανθάνουσες μεταβλητές – latent variables), οι οποίες έχουν προκύψει από γραμμικό συνδυασμό των αρχικών μεταβλητών, ενώ δεν σχετίζονται γραμμικά μεταξύ τους. Έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στους τομείς της αναγνώρισης προτύπων και της επεξεργασίας σήματος.

Ο αριθμός των νέων λανθανουσών μεταβλητών που προκύπτει είναι πολύ μικρότερος από τον αριθμό των αρχικών μεταβλητών. Η μετάβαση αυτή πραγματοποιείται με τέτοιο τρόπο ώστε, η πρώτη συνιστώσα να εξηγεί τη μέγιστη δυνατή διακύμανση που αναπτύσσεται μεταξύ των αρχικών μεταβλητών (δηλαδή ερμηνεύει το μεγαλύτερο ποσοστό μεταβλητότητας των δεδομένων), η δεύτερη, μη συσχετιζόμενη με την πρώτη, να εξηγεί ένα σημαντικό μέρος αυτής αλλά πάντα μικρότερο της πρώτης και ούτω καθεξής. Το τελικό αποτέλεσμα είναι μη συσχετισμένα διανύσματα κύριων συνιστωσών, που αποτελούν ένα

ορθογώνιο σύνολο βάσης. Στόχος της ανάλυσης είναι να διατηρηθεί ένας μικρός αριθμός κύριων συνιστωσών που θα εξηγεί, παράλληλα, ένα πολύ μεγάλο ποσοστό της μεταβλητότητας των δεδομένων. Στη συνέχεια, μέσω γραφικής αναπαράστασης των πρώτων κύριων συνιστωσών, επιτυγχάνεται η, αρχικά ανέφικτη, οπτικοποίηση των δεδομένων. Η επιλογή του αριθμού των συνιστωσών που θα αξιοποιηθούν γίνεται με διάφορους τρόπους, είτε μέσω κρημνογραφήματος, είτε ορίζοντας ένα ποσοστό συνολικής διακύμανσης που θέλουμε να εξηγείται από τις κύριες συνιστώσες, είτε εφαρμόζοντας διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation), είτε μέσω της μεθόδου bootstrap (δειγματοθέτηση), κ.α.<sup>37</sup>.

Είναι, λοιπόν, μια στατιστική διαδικασία που επιτρέπει τη σύνοψη περιεχομένων πληροφοριών σε μεγάλους πίνακες δεδομένων μέσω ενός μικρότερου συνόλου «συνοπτικών δεικτών» - λανθανουσών μεταβλητών που μπορούν να αναλυθούν και να οπτικοποιηθούν πιο εύκολα. Τα δεδομένα μπορούν να είναι μετρήσεις που περιγράφουν ιδιότητες δειγμάτων παραγωγής, χημικές ενώσεις ή αντιδράσεις, χρονικά σημεία διεργασίας μιας συνεχούς διαδικασίας, για παράδειγμα.



*Εικόνα 9: Αναπαράσταση των κατευθύνσεων των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών σε ένα σύνολο δεδομένων. Οι κύριες συνιστώσες αποτελούν γραμμικούς συνδυασμούς των αρχικών μεταβλητών, αλλά είναι ασυσχέτιστες μεταξύ τους.*

Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από την PCA, είναι σημαντικό να προσδιοριστεί ποιες από τις αρχικές μεταβλητές συνέβαλλαν στη διαμόρφωση κάθε μίας από τις πρώτες κύριες συνιστώσες και κατά πόσο. Δηλαδή, χρησιμοποιούνται οι συσχετίσεις μεταξύ των κυρίων συνιστωσών και των αρχικών μεταβλητών για να ερμηνευθεί κάθε συνιστώσα, εστιάζοντας στις μεταβλητές που έχουν την ισχυρότερη συσχέτιση με κάθε κύρια συνιστώσα. Τέτοιες σχέσεις αναπαρίστανται, γραφικά, μέσω του διαγράμματος των "loadings" (φορτία), όπου τα φορτία δείχνουν τη συνεισφορά κάθε μεταβλητής στη διαμόρφωση της εξεταζόμενης κύριας συνιστώσας. Συνολικά, σκοπός της ανάλυσης κυρίων συνιστωσών είναι να εξάγει τις πιο σημαντικές πληροφορίες από τον πίνακα δεδομένων, συμπιέζοντας το μέγεθος του συνόλου δεδομένων και διατηρώντας

μόνο τις σημαντικές πληροφορίες, προκειμένου να απλουστευτεί η περιγραφή του συνόλου των δεδομένων και να αναλυθεί η δομή των παρατηρήσεων και των μεταβλητών. Στη μεταβολομική ανάλυση, η PCA είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την αρχική προσέγγιση και διερεύνηση των δεδομένων, προς ανίχνευση τάσεων σε αυτά, αλλά και έκτροπων τιμών (outliers)<sup>16</sup>.

#### 4.5.2 Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων, PLS

Η ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares analysis, PLS) αποτελεί μία επιβλεπόμενη μέθοδο κατηγοριοποίησης, που όμως έχει προκύψει από την Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών. Πρόκειται, επίσης, για μέθοδο που επιτυγχάνει μείωση των αρχικών μεταβλητών και αντιπροσώπευσή τους από λιγότερες. Ωστόσο, οι νέες μεταβλητές που προκύπτουν (λανθάνουσες μεταβλητές) δεν εξηγούν πλέον τη διακύμανση, αλλά τη συνδιακύμανση του πίνακα των προβλεπουσών μεταβλητών με τον πίνακα απόκρισης των μεταβλητών<sup>38</sup>.

Στην μεταβολομική, η ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων συνδυάζεται, αρκετά συχνά, με την διαχωριστική ανάλυση (Partial Least Squares-Discriminant Analysis, PLS-DA). Στην PLS-DA ο πίνακας των μεταβλητών απόκρισης περιλαμβάνει μία κατηγορική μεταβλητή, που παίρνει δύο τιμές (0 & 1, ή -1 & 1, ή 1&2, κλπ) δηλώνοντας την κλάση των δειγμάτων (π.χ. ασθενείς και υγιείς). Συνεπώς, η PLS-DA χρησιμοποιεί την πληροφορία για την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων και βελτιώνει τον διαχωρισμό μεταξύ των δύο συγκρινόμενων ομάδων δειγμάτων. Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται τόσο για οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων, βάσει της κλάσης στην οποία ανήκουν τα δείγματα για την ανάδειξη μεταβολομικών διαφορών, όσο και για πρόβλεψη. Δηλαδή, εφόσον έχει δημιουργηθεί μία σχέση μεταξύ των προβλεπουσών μεταβλητών (μεταβολομικών δεδομένων) και της κατηγορικής μεταβλητής, μπορεί να γίνει πρόβλεψη της κλάσης στην οποία κατατάσσεται ένα τυχαίο δείγμα (δηλ. πρόβλεψη της τιμής της κατηγορικής μεταβλητής).

Ακόμα μία επιβλεπόμενη μέθοδος κατηγοριοποίησης, που προκύπτει από την τροποποίηση του αλγορίθμου της PLS, είναι η O-PLS (Orthogonal Partial Least Squares ή Orthogonal projections to latent structures). Η O-PLS διαχωρίζει τις προβλέπουσες μεταβλητές που σχετίζονται με τη μεταβλητή απόκρισης, από αυτές που δεν σχετίζονται με τη μεταβλητή απόκρισης. Δηλαδή, η μέθοδος χρησιμοποιεί ορθογώνια διόρθωση σήματος, για να απομακρύνει έναν αριθμό προβλεπόμενων μεταβλητών που διαφοροποιούν τα δείγματα χωρίς να σχετίζονται με την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων (έχουν μηδενική συσχέτιση με τη μεταβλητή απόκρισης), με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται μεγιστοποίηση της συνδιακύμανσης (των ανεξάρτητων μεταβλητών -μεταβολικών δεδομένων- και της κατηγορικής μεταβλητής), κατά μήκος της πρώτης λανθάνουσας μεταβλητής. Βάσει των παραπάνω, είναι προφανές πως η OPLS βοηθά στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων όταν υπάρχουν παράγοντες υπεύθυνοι για τη διαφοροποίηση των δειγμάτων της ίδιας ομάδας, διαφορετικά δεν διαθέτει κάποιο πλεονέκτημα έναντι της PLS.

Απαραίτητο βήμα μετά τη δημιουργία των στατιστικών μοντέλων, με τη χρήση επιβλεπόμενων μεθόδων κατηγοριοποίησης, είναι η αξιολόγηση τους και υπάρχουν



αρκετές στατιστικές προσεγγίσεις για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων τέτοιων μοντέλων<sup>16</sup>.

#### **4.6 SIMCA 14.1**

Το SIMCA 14.1 αποτελεί ένα ιδιαίτερα χρήσιμο πρόγραμμα ανάλυσης πολυμεταβλητών δεδομένων. Είναι αρκετά εύχρηστο για αυτό και προτιμάται σε μελέτες omics, όπως και στη συγκεκριμένη. Στη συνέχεια επεξηγούνται τα πιο σημαντικά διαγράμματα που παρέχει το συγκεκριμένο πρόγραμμα.

##### Summary of Fit Plot

Για κάθε συνιστώσα του μοντέλου σε ένα μοντέλο PLS, το πρόγραμμα Simca εμφανίζει δύο ράβδους (bars): το  $R^2$  και το  $Q^2$ .

Το  $R^2$  είναι το ποσοστό της διακύμανσης της ομάδας εκπαίδευσης (training set) - Y με PLS - που εξηγείται από το μοντέλο. Το  $R^2$  είναι μέτρο προσαρμογής, δηλαδή δείχνει πόσο καλά προσαρμόζεται το μοντέλο στα δεδομένα. Υψηλό  $R^2$  (κοντά στο 1) είναι απαραίτητη προϋπόθεση για ένα καλό μοντέλο, αλλά δεν είναι επαρκές. Υπάρχει περίπτωση τα μοντέλα να μην παρουσιάζουν ικανοποιητική ακρίβεια λόγω υπερπροσαρμογής (τα μοντέλα αυτά παρουσιάζουν σοβαρή αδυναμία πρόβλεψης και διαθέτουν μεγάλο  $R^2$ ). Αν το  $R^2$  είναι χαμηλό, δείχνει ότι υπάρχει χαμηλή αναπαραγωγικότητα (σημαντικός θόρυβος) στο σύνολο δεδομένων ή ότι για άλλους λόγους το X δεν εξηγεί το Y.

Το  $Q^2$  είναι το ποσοστό της διακύμανσης της ομάδας εκπαίδευσης (training set) - Y με PLS - που προβλέπεται από το μοντέλο σύμφωνα με τη διασταυρούμενη επικύρωση. Το  $Q^2$  δείχνει πόσο καλά το μοντέλο προβλέπει νέα δεδομένα. Ένα μεγάλο  $Q^2$  ( $Q^2 > 0,5$ ) δείχνει καλή προβλεψιμότητα. Αν το  $Q^2$  είναι χαμηλό, δείχνει όταν τα δεδομένα έχουν πολύ θόρυβο, ή όταν η σχέση X-> Y είναι «φτωχή», ή ότι το μοντέλο κυριαρχείται από μερικές διάσπαρτες ακραίες τιμές.

##### Scores Scatter Plot t1 vs t2

Τα scores t1, t2, κ.λπ., είναι νέες μεταβλητές, που συνοψίζουν τις μεταβλητές X. Τα scores είναι ορθογώνια, δηλαδή εντελώς ανεξάρτητα μεταξύ τους. Υπάρχουν τόσα διανύσματα scores όσες συνιστώσες υπάρχουν στο μοντέλο. Το score t1 (πρώτη συνιστώσα) εξηγεί τη μεγαλύτερη παραλλαγή του X χώρου, ακολουθούμενη από t2 κ.λπ.

Ως εκ τούτου, το διάγραμμα διασποράς (scatter plot) t1 έναντι t2 είναι ένα παράθυρο στο X χώρο, που δείχνει τη διεύθυνση των παρατηρήσεων X μεταξύ τους. Το διάγραμμα διασποράς δείχνει την πιθανή παρουσία έκτροπων τιμών, ομάδων, ομοιοτήτων και τάσεων στα δεδομένα. Σημαντική παράμετρος του διαγράμματος είναι η έλλειψη του Hotelling T<sup>2</sup>, το πολυδιάστατο ανάλογο του t-test. Οι παρατηρήσεις που βρίσκονται πολύ έξω από την έλλειψη είναι ακραίες και θεωρούνται έκτροπες τιμές. Εάν το score plot δείχνει ομάδες, βοηθά στην κατανόηση των διαφορών μεταξύ των ομάδων με μια ταξινόμηση SIMCA ή ένα PLS-DA/OPLS-DA.

### Loadings Scatter Plot

Τα loadings εκφράζουν πώς οι αρχικές μεταβλητές σχετίζονται με τα scores. Τα scores είναι γραμμικοί συνδυασμοί των αρχικών μεταβλητών. Το διάγραμμα PLS-DA loading weights scatter plot εμφανίζει τη σχέση μεταξύ των μεταβλητών. Οι μεταβλητές με τις μεγαλύτερες απόλυτες τιμές  $p_k$  κυριαρχούν στην προβολή. Οι μεταβλητές που εμφανίζονται κοντά η μία στην άλλη σχετίζονται μεταξύ τους, ενώ αυτές που είναι μακριά δε σχετίζονται.

### Ανάλυση τυχαίων μεταθέσεων, Permutation Test

Η ανάλυση τυχαίων μεταθέσεων είναι μία ακόμη μέθοδος αξιολόγησης των μοντέλων πρόβλεψης. Συγκεκριμένα, αποτελεί μέτρο αξιολόγησης των διαγνωστικών παραμέτρων  $Q^2$  (δείκτης αξιολόγησης της ικανότητας πρόβλεψης του μοντέλου) και  $R^2$  (δείκτης για την εκτίμηση της προσαρμογής του μοντέλου). Κατά την ανάλυση τυχαίων μεταθέσεων πραγματοποιούνται τυχαίες ανακατατάξεις των τιμών της κατηγορικής μεταβλητής και υπολογίζονται νέα μοντέλα, βάσει των ανακαταταγμένων δεδομένων. Εάν οι τιμές  $Q^2$  και  $R^2$ , αυτών των μοντέλων, είναι μικρότερες από τις πραγματικές  $Q^2$  και  $R^2$  τιμές, τότε το αρχικό μοντέλο θεωρείται αξιόπιστο. Σε αντίθετη περίπτωση (νέες τιμές πρόβλεψης μεγαλύτερες ή ίσες των αρχικών τιμών), το μοντέλο θεωρείται μη αξιόπιστο και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή συμπερασμάτων.

### S-Plot

Τα S-Plots παρέχουν οπτικοποίηση της προβλεπτικής συνιστώσας των αναλύσεων OPLS και OPLS-DA για διευκόλυνση της ερμηνείας του μοντέλου. Τα διαγράμματα είναι διαθέσιμα μόνο για μοντέλα DA με δύο κλάσεις.

Το S-Plot χρησιμοποιείται δηλαδή για να οπτικοποιήσει τόσο τη συνδιακύμανση όσο και τη συσχέτιση μεταξύ των μεταβλητών X. Ουσιαστικά είναι διάγραμμα διασποράς των διανυσμάτων  $p[1]$  vs  $p(\text{corr})$ . Αυτό το διάγραμμα παίρνει συχνά το σχήμα του γράμματος «S», εκτός εάν οι μεταβλητές X κλιμακώνονται σε διακύμανση μονάδας (UV). Οι μεταβλητές X που βρίσκονται πολύ έξω στα «φτερά» του S, συνδυάζουν υψηλή επιρροή στο μοντέλο και ταυτόχρονα υψηλή αξιοπιστία.

### VIP Plot

Η γραφική παράσταση VIP (Variable Importance for the Projection) συνοψίζει τη σημασία των μεταβλητών τόσο για την εξήγηση της μεταβλητής X όσο και για τη συσχέτιση με τη μεταβλητή Y. Η SIMCA υπολογίζει την επιρροή κάθε όρου του μοντέλου ( $x_k$ ) στη μεταβλητή Y, που ονομάζεται VIP. Η τιμή VIP είναι το σύνολο της συνεισφοράς των VIN (variable influence) όλων των διαστάσεων του μοντέλου.

Το άθροισμα των τετραγώνων όλων των VIP είναι ίσο με τον αριθμό των όρων του μοντέλου. Επομένως, ο μέσος όρος VIP είναι ίσος με 1. Τιμές VIP μεγαλύτερες από 1 υποδεικνύουν «σημαντικές» μεταβλητές X και τιμές χαμηλότερες από 0,5 υποδηλώνουν «ασήμαντες» μεταβλητές X. Το διάστημα μεταξύ 1 και 0,5 είναι μια γκριζα περιοχή, όπου το επίπεδο σημασίας εξαρτάται από το μέγεθος του συνόλου δεδομένων. Το διάγραμμα VIP

ταξινομείται από υψηλές σε χαμηλές τιμές και εμφανίζει διαστήματα εμπιστοσύνης για τις τιμές VIP, συνήθως στο επίπεδο 95%.

### Scaling

Οι μεταβλητές μπορεί να χρειαστεί να μετασχηματιστούν πριν από την ανάλυση για να μπορέσουν να ακολουθήσουν κανονική κατανομή. Τα αποτελέσματα εξαρτώνται από την κλιμάκωση που θα επιλεγεί ως καταλληλότερη. Η απλούστερη επιλογή είναι η κλιμάκωση UV scaling, όπου σε όλες τις μεταβλητές δίνεται ίση βαρύτητα. Η κλιμάκωση Pareto (Pareto scaling), που χρησιμοποιείται συχνά σε μεταβολομικές αναλύσεις, κλιμακώνει τα δεδομένα διαιρώντας κάθε μεταβλητή με την τετραγωνική ρίζα της τυπικής απόκλισης. Η μοναδιαία κλιμάκωση διαιρεί κάθε μεταβλητή με την τυπική απόκλιση έτσι ώστε κάθε μεταβλητή να έχει διακύμανση ίση με 1.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ-ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

#### **5.1 Οργανολογία**

- Dionex UltiMate 3000 RSLC (Thermo Fischer Scientific, Dreieich, Γερμανία)
- Φασματοόμετρο μάζας Maxis Impact QTOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) εξοπλισμένο με πηγή ηλεκτροψεκασμού
- Συσκευή φυγοκέντρησης NEYA 16R (REMI, Mumbai, India) στα 10000 rpm, 5 λεπτά, 4°C
- Αποδιαλύτωση - συγκέντρωση με συσκευή φυγοκέντρησης υπό κενό HyperVAC-LITE centrifugal vacuum concentration (Hanil Scientific Inc, Gimpo, Κορέα)
- Kit λύσης ομογενοποίησης ιστών CKMix (Bertin Corp.) // ομογενοποιητής : CRYOLYS EVOLUTION (Bertin Instruments, Γαλλία)
- Συσκευή παραγωγής υπερκάθαρου H<sub>2</sub>O Milli-Q (Millipore Direct-Q UV, Bedford, MA, ΗΠΑ)

#### **5.2 Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν – Υλικά- Αντιδραστήρια**

- μυρμηκικό αμμώνιο (*Fischer Scientific*)
- οξικό αμμώνιο (*Fischer Scientific*)
- μυρμηκικό οξύ (*Sigma-Aldrich, Steinheim, Γερμανία*)
- μεθανόλη (*MeOH*), χλωροφόρμιο (*Fluka, Buchs, Ελβετία*)
- υπερκάθαρο νερό

#### **5.3 Μεθοδολογία**

Αρχικά, παρελήφθησαν 15 δείγματα πλάσματος ποντικών, θηλυκού και αρσενικού φύλου. Σε πέντε ποντίκια χορηγήθηκε κολιστίνη σε επίπεδο 1mg/kg, που θεωρήθηκε ως κανονική (θεραπευτική) δόση, στα άλλα πέντε χορηγήθηκε κολιστίνη υψηλής (τοξικής) δόσης 1,5 mg/kg ενώ τα τελευταία πέντε δείγματα ήταν τα δείγματα ελέγχου (control samples). Τα δείγματα αίματος είχαν υποστεί διαδικασία αφαίρεσης των έμμορφων συστατικών και συλλογή του δείγματος σε vacutainers με EDTA με σκοπό να απομονωθεί το πλάσμα. Τα δείγματα παρελήφθησαν σε πάγο και 100 μL από το κάθε δείγμα πλάσματος μεταφέρθηκαν σε νέα Eppendorfs. Στη συνέχεια, σε κάθε Eppendorf προστίθενται 300 μL μεθανόλης και τα δείγματα αναδεύονται με συσκευή Vortex (1 min). Ακολουθεί

φυγοκέντρηση αυτών για 10 λεπτά, ώστε να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες και το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται με πιπέτα σε νέα Eppendorf. Τα δείγματα τοποθετούνται στην κατάψυξη (-80°C).

Την επόμενη μέρα αφού τα δείγματα ξεπάγωσαν, πραγματοποιήθηκε πάλι φυγοκέντρηση για 10 λεπτά και 200μL από το υπερκείμενο υγρό κάθε δείγματος μεταφέρθηκαν με πιπέτα από τα Eppendorfs σε vials (φιαλίδια) αυτόματου δειγματολήπτη, αφού πρώτα τοποθετήθηκαν inserts σε κάθε vial για μείωση του όγκου τους. Επιπλέον, παρασκευάστηκε δείγμα QC στο οποίο προστέθηκαν 40μL από κάθε δείγμα.

Τα vials αναλύθηκαν με τη βοήθεια UPLC/QTOF-MS με θετικό και αρνητικό ESI και πραγματοποιήθηκε μη-στοχευμένη (non-targeted) ανάλυση με χρήση της λειτουργίας brad band collision induced dissociation (bbCID).

Παρακάτω αναφέρονται οι χρωματογραφικές συνθήκες, που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανάλυση :

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν : Thermo Fischer Scientific , Acclaim RSL C18 στήλη (2.1 x 100 mm, 2.2 μm) και η θερμοκρασία στήλης ήταν 30°C.

Οι κινητές φάσεις αντίστοιχα ήταν:

▪ **στο θετικό ιοντισμό (+):**

(A) H<sub>2</sub>O:MeOH 90:10 (v/v) (B) MeOH τροποποιημένη και στα δύο με 5mM οξικό αμμώνιο & 0.01% μυρμηκικό οξύ

▪ **στον αρνητικό ιοντισμό (-):**

(A) H<sub>2</sub>O:MeOH 90:10 (B) MeOH οξινισμένη και στα δύο με 5mM οξικό αμμώνιο

Ο τύπος έκλουσης ήταν βαθμιδωτός. Αναλυτικότερα το πρόγραμμα έκλουσης φαίνεται παρακάτω.

- 0-1min: 1% B, 200μL/min
- 1-2min: 39% B, 200μL/min
- 2-13min: 99.9% B, 200μL/min
- 13-15min: 1% B, 480μL/min

*Συνθήκες ιοντισμού:*

ESI(+): τάση τριχοειδούς 2500V

ESI (-): τάση τριχοειδούς 3000V

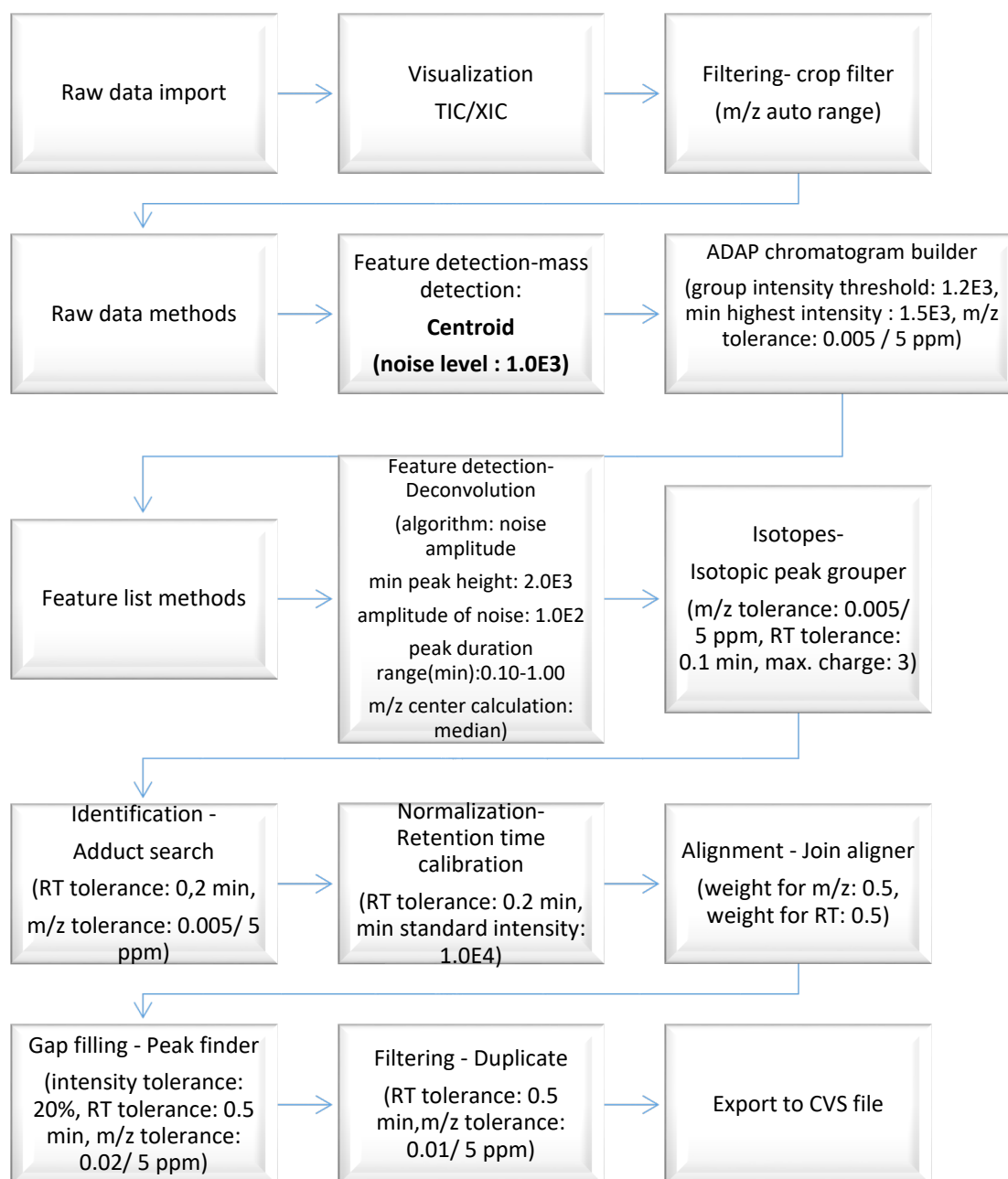
- ✚ Ενέργεια συγκρούσεων : MS: 4V, bbCID: 25V (24-36V)
- ✚ Δυναμικό τελικού ηλεκτροδίου (End plate offset): 500V
- ✚ Ροή αζώτου νεφελοποιητή (N<sub>2</sub>): 2 bar
- ✚ Αέριο ξήρανσης (N<sub>2</sub>): 10 L min<sup>-1</sup>
- ✚ Θερμοκρασία ξήρανσης : 200°C

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΝΑΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΦΑΣΜΑΤΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ, ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

### **6.1 Προεπεξεργασία φασματικών δεδομένων**

Αρχικά, παρουσιάζονται τα βήματα για την προετοιμασία των φασμάτων στο mzMine 2.51, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία λίστας χαρακτηριστικών (mz\_rt).

Στο mzMine τα δείγματα θετικού ιοντισμού έδωσαν 565 κορυφές- features (mz\_tr) , ενώ τα δείγματα αρνητικού ιοντισμού 142. Επομένως, ο αρνητικός ιοντισμός δίνει πιο λιγότερη πληροφορία, γεγονός που δικαιολογείται, καθώς οι περισσότεροι μεταβολίτες ιοντίζονται θετικά.

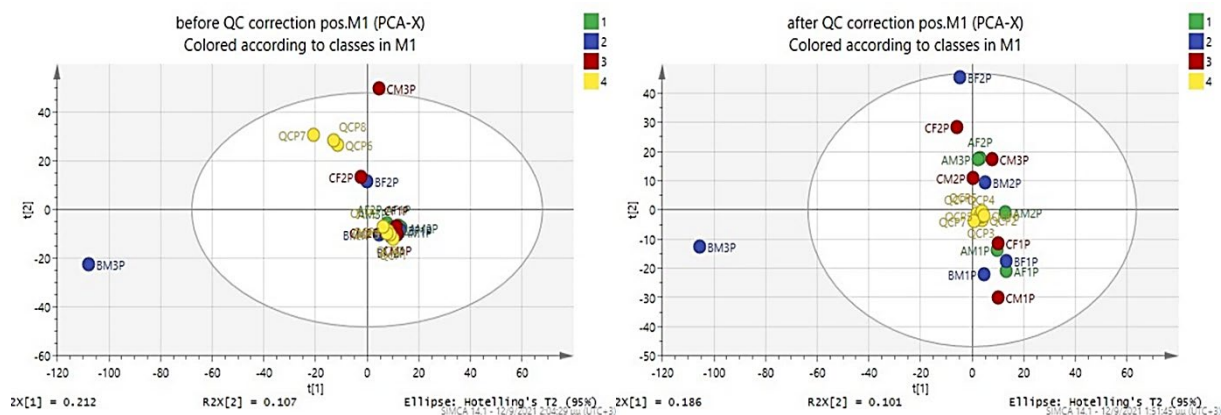


Εικόνα 10: Βήματα επεξεργασίας δεδομένων που ακολουθήθηκαν στο mzMine

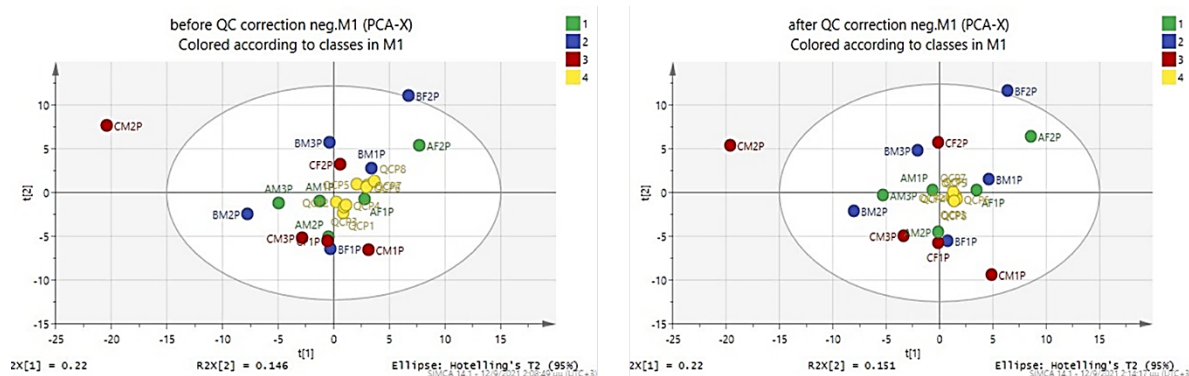
Ακολούθησε η διόρθωση της ολίσθησης του σήματος με τον αλγόριθμο LOWESS μέσω του statTarget. Τα διορθωμένα δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν σε μοντέλα PCA για να διερευνηθεί εάν έχει πραγματοποιηθεί σωστά η διόρθωση. Αξιολογήθηκε η διασπορά της ομάδας των QC πριν και μετά την χρήση του αλγορίθμου.

Αποτελέσματα διόρθωσης σήματος:

Όπως παρατηρείται στις αντίστοιχες εικόνες (εικόνες 11,12), τόσο στο θετικό αλλά και στον αρνητικό ιοντισμό, η επεξεργασία των δεδομένων με statTarget προσέφερε σημαντική βελτίωση στην εξομάλυνση της διακύμανσης και ομαδοποίηση των δειγμάτων QC. Δηλαδή η απόδοση των δειγμάτων QC σε μια στενή συστάδα στο κέντρο του διαγράμματος PCA αποδεικνύει την επιτυχή διόρθωση, καθώς τα δεδομένα αυτά προέρχονται από ένα μόνο δείγμα που αποτελείται από συνένωση μικρών ποσοτήτων από κάθε δείγμα και έτσι δεν πρέπει να εμφανίζει καμία στατιστική διαφοροποίηση στην πολυπαραμετρική ανάλυση.



Εικόνα 11: Δείγματα θετικού ιοντισμού πριν και μετά από τη διόρθωση σήματος με statTarget



Εικόνα 12: Δείγματα αρνητικού ιοντισμού πριν και μετά από τη διόρθωση σήματος με statTarget



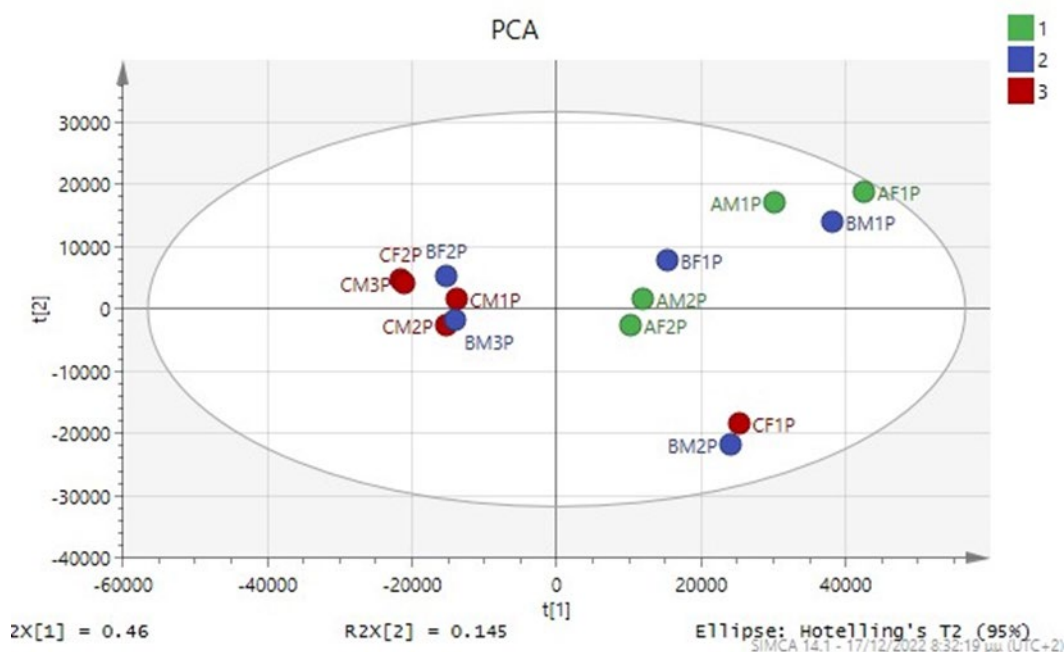
Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε SIMCA 14.1. Παρακάτω παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα διαγράμματα που δημιουργήθηκαν για το θετικό και αρνητικό ιοντισμό.

### Στατιστική επεξεργασία δειγμάτων: Δεδομένα θετικού ιοντισμού

#### PCA

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε ανάλυση PCA για τη διερεύνηση τάσεων διάκρισης και πιθανών ακραίων τιμών μεταξύ των δειγμάτων των ομάδων που έλαβαν κολιστίνη και των δειγμάτων ελέγχου (Control samples), ενώ στη συνέχεια τα μοντέλα PLS-DA αναπτύχθηκαν για τον προσδιορισμό των πιο διαφοροποιημένων χαρακτηριστικών.

Η PCA έδωσε 4 κύριες συνιστώσες και οδήγησε στην απεικόνιση των δειγμάτων όπως φαίνεται στην εικόνα 13. Κατά την απεικόνιση ενός δισδιάστατου score plot στη SIMCA, σχεδιάζεται μια έλλειψη εμπιστοσύνης βασισμένη στο μοντέλο του Hotelling T<sub>2</sub>, με προεπιλεγμένο επίπεδο εμπιστοσύνης 0,05. Από την PCA παρατηρείται ότι οι ομάδες δε διαχωρίζονται ικανοποιητικά.



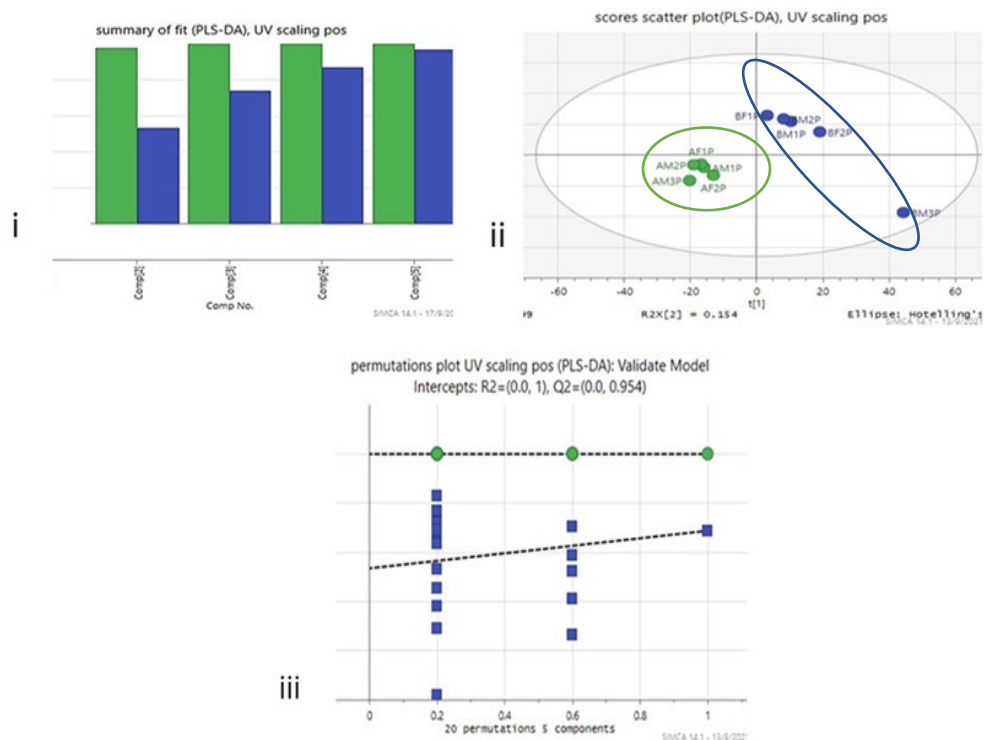
Εικόνα 13: Scores scatter plot PCA θετικού ιοντισμού

#### PLS-DA

Έπειτα, παρουσιάζονται τα PLS-DA διαγράμματα που προέκυψαν με UV scaling. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα summary of fit, που φαίνεται στην εικόνα 14i, το μοντέλο αποτελείται από 5 συνιστώσες και για την κάθε μία υπάρχουν δύο μπάρες: το R<sup>2</sup> (πράσινο χρώμα) και το Q<sup>2</sup> (μπλε χρώμα). Το R<sup>2</sup> δείχνει πόσο καλά ταιριάζει το μοντέλο με τα δεδομένα, ενώ το Q<sup>2</sup> δείχνει πόσο καλά το μοντέλο προβλέπει νέα δεδομένα. Οι τιμές που προέκυψαν για το συγκεκριμένο μοντέλο είναι R<sup>2</sup> = 0,625 και Q<sup>2</sup> = 0,969, άρα το μοντέλο έχει καλή ικανότητα πρόβλεψης.

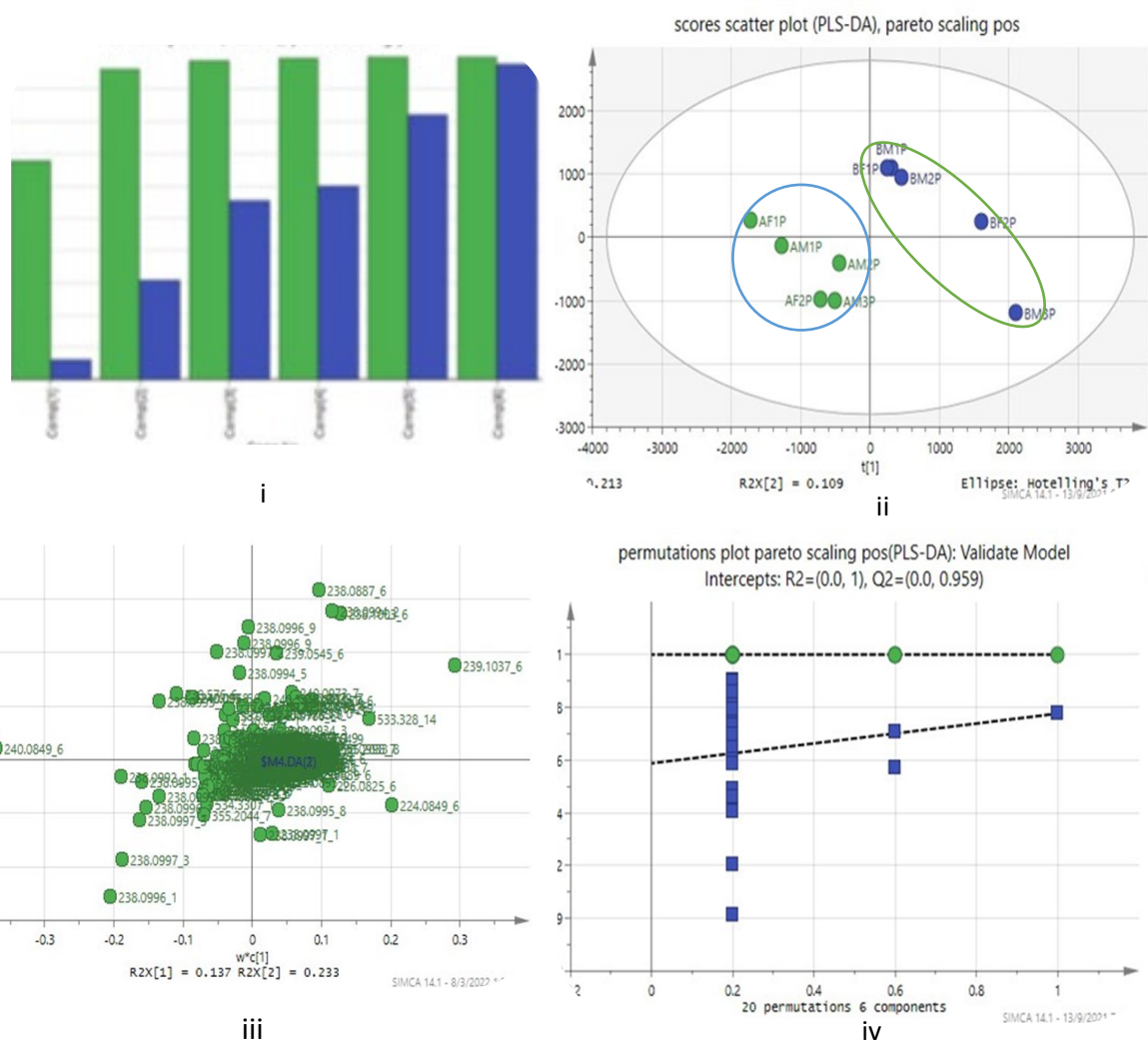
Στην διάγραμμα της PLS-DA παρατηρείται καλός διαχωρισμός των δειγμάτων που έλαβαν χαμηλή και τοξική δόση κολιστίνης, A και B αντίστοιχα.

Το permutation test χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθεί αν υπάρχει υπερπροσαρμογή σχετικά με την τιμή του  $Q^2$ . Οι τιμές  $Q^2$  και  $R^2$  του μοντέλου είναι μικρότερες από τις πραγματικές  $Q^2$  και  $R^2$  τιμές, άρα το αρχικό μοντέλο θεωρείται αξιόπιστο.



Εικόνα 14: PLS-DA plots UV scaling (i) Summary of fit (ii) Scores scatter plot (iii) Permutations plot (20 permutations)

Στη συνέχεια δημιουργήθηκαν PLS-DA διαγράμματα με Pareto scaling. Το διάγραμμα summary of fit με Pareto scaling (εικόνα 15 (i)) αποτελείται από 6 συνιστώσες και οι τιμές που προέκυψαν για αυτό το μοντέλο είναι:  $R^2 = 0,809$ ,  $Q^2 = 0,978$ . Με pareto scaling παρατηρείται επίσης καλός διαχωρισμός μεταξύ των δύο ομάδων, όπως φαίνεται στην εικόνα 15 (ii). Στο permutations plot οι τιμές  $Q^2$  και  $R^2$  του μοντέλου είναι μικρότερες από τις πραγματικές  $Q^2$  και  $R^2$  τιμές, άρα το αρχικό μοντέλο θεωρείται επίσης αξιόπιστο. Επομένως, το μοντέλο που προκύπτει με Pareto scaling ταιριάζει περισσότερο με τα δεδομένα και έχει καλύτερη ικανότητα πρόβλεψης από το UV scaling.

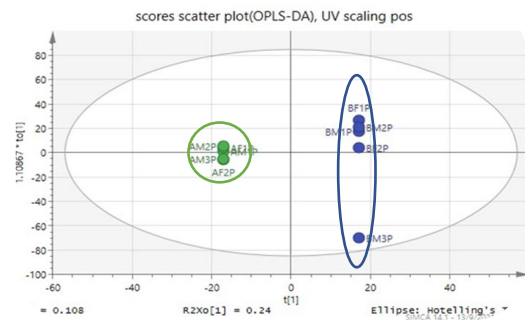
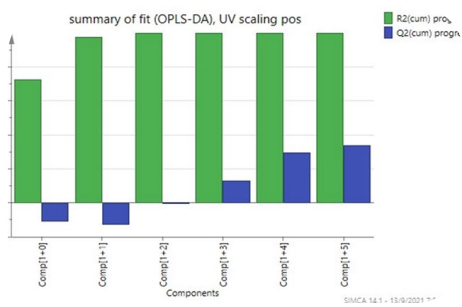


Εικόνα 15: PLS-DA Pareto scaling (i) Summary of fit (ii) Scores scatter plot (iii) Loading weights scatter plot (iv) Permutations plot (20 permutations)

**OPLS-DA**

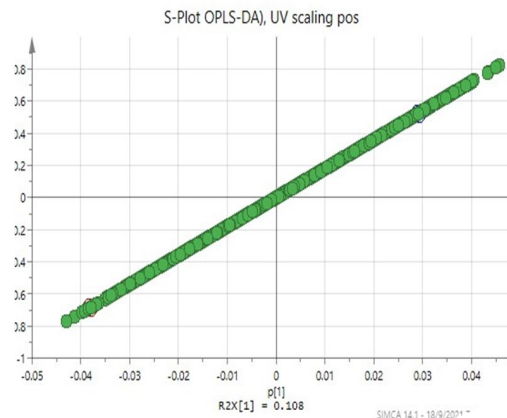
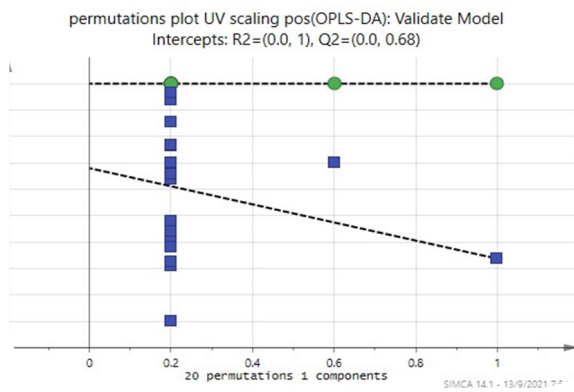
Όπως αναφέρθηκε, η OPLS διαχωρίζει τις προβλέπουσες μεταβλητές που σχετίζονται με τη μεταβλητή απόκριση, από αυτές που δεν σχετίζονται με τη μεταβλητή απόκριση και βοηθά στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων όταν υπάρχουν παράγοντες υπεύθυνοι για τη διαφοροποίηση των δειγμάτων της ίδιας ομάδας, διαφορετικά δεν διαθέτει κάποιο πλεονέκτημα έναντι της PLS. Το μοντέλο OPLS-DA εξετάστηκε τόσο με UV scaling, αλλά και με Pareto scaling.

Στην εικόνα 16 (iv) οι μεταβλητές X κλιμακώνονται σε UV, για αυτό και το S-Plot δεν έχει στη συγκεκριμένη περίπτωση το χαρακτηριστικό σχήμα του γράμματος «S».



i

ii



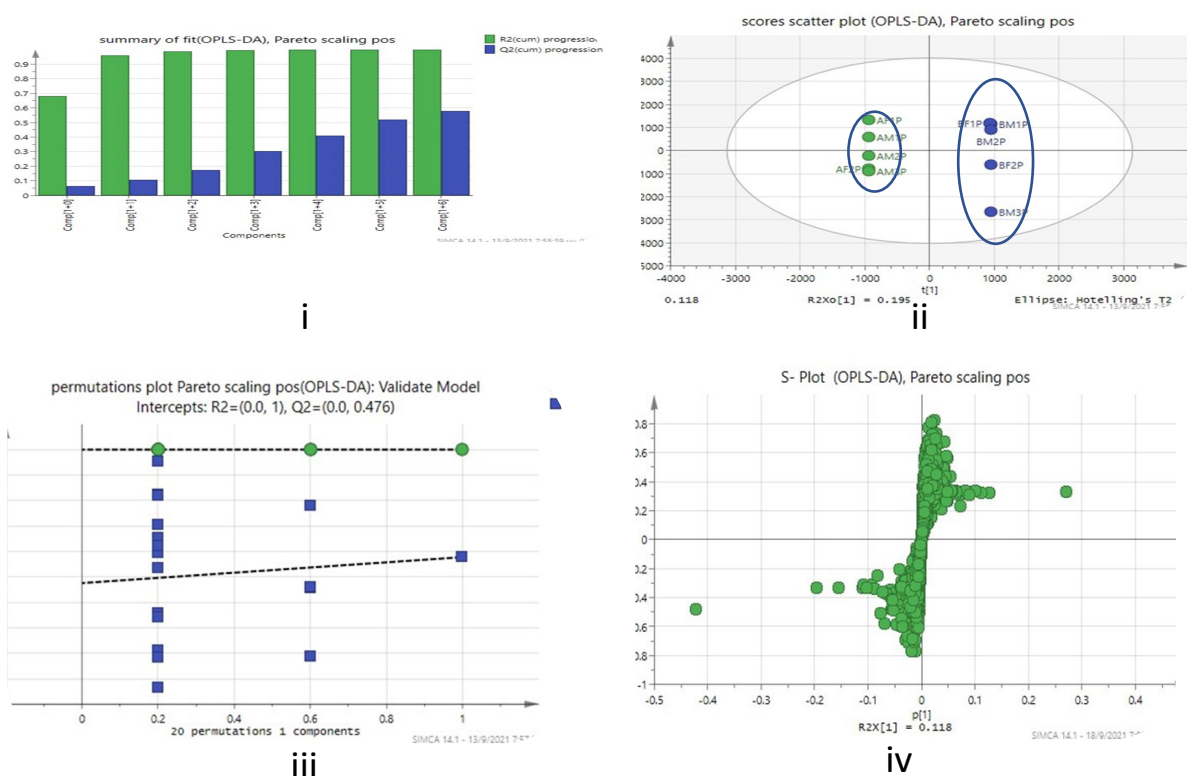
iii

iv

Εικόνα 16: OPLS-DA UV scaling (i) Summary of fit (ii) Scores scatter plot (iii) Permutations plot (20 permutations) (iv) S-Plot

Το διάγραμμα 17 (iv) έχει το σχήμα του γράμματος «S». Οι μεταβλητές που φαίνεται ότι βρίσκονται πολύ έξω στα «φτερά» του S, συνδυάζουν υψηλή επιρροή μοντέλου με υψηλή αξιοπιστία.

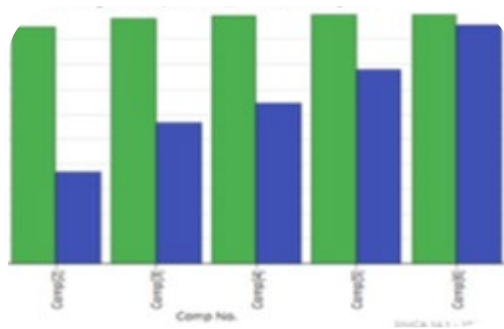
Οι ομάδες φαίνονται να διαχωρίζονται καλά στα αντίστοιχα scores scatter plot, αλλά τελικά απορρίφθηκε η χρήση του OPLS-DA, διότι έδωσε πολύ χαμηλές τιμές  $Q^2$ .



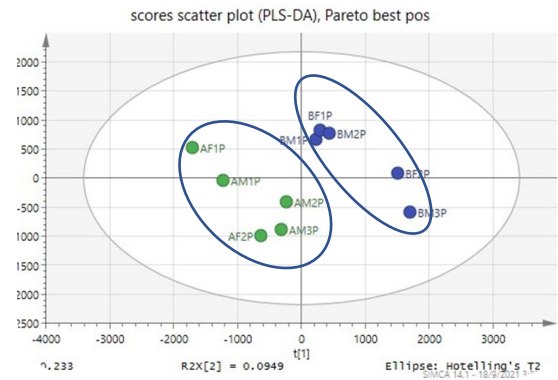
Εικόνα 17: OPLS-DA Pareto scaling (i) Summary of fit (ii) Scores scatter plot (iii) Permutations plot (20 permutations) (iv) S-Plot

### Δημιουργία sparse PLS-DA

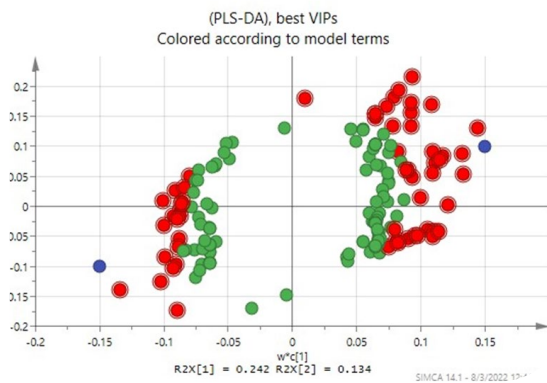
Σε μια προσπάθεια να καταστεί η ανάλυση πιο αυστηρή, μόνο οι μεταβλητές με βαθμολογία VIP υψηλότερη από 1 θεωρήθηκαν ως πιθανοί βιοδείκτες, καθώς φάνηκε ότι ασκούσαν μεγαλύτερη επίδραση στην ταξινόμηση μιας ομάδας και υποβλήθηκαν για περαιτέρω διερεύνηση. Επιλέχθηκαν δηλαδή τα VIP scores >1 και αξιοποιήθηκαν για τη δημιουργία νέων μοντέλων επιβλεπόμενης ταξινόμησης, όπου χρησιμοποιήθηκε Pareto scaling. Στα νέα μοντέλα παρατηρείται μικρή βελτίωση του R<sup>2</sup> σε σχέση με το αρχικό Pareto scaling (R<sup>2</sup>= 0,834, Q<sup>2</sup>= 0,959) και καλός διαχωρισμός των δύο ομάδων στην PLS-DA. Συνολικά, οι παρατηρήσεις που προέκυψαν από την PLS-DA έδειξαν την επίδραση της κολιστίνης στο μεταβολικό προφίλ του πλάσματος των μυών.



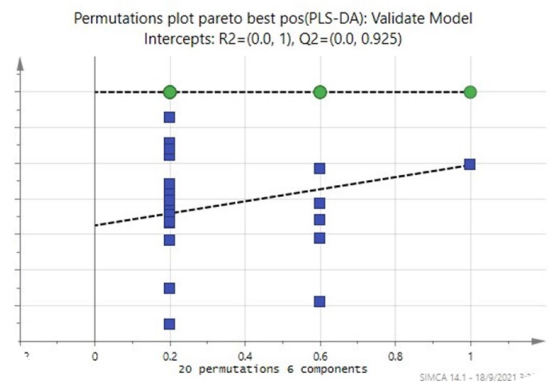
i



ii



iii



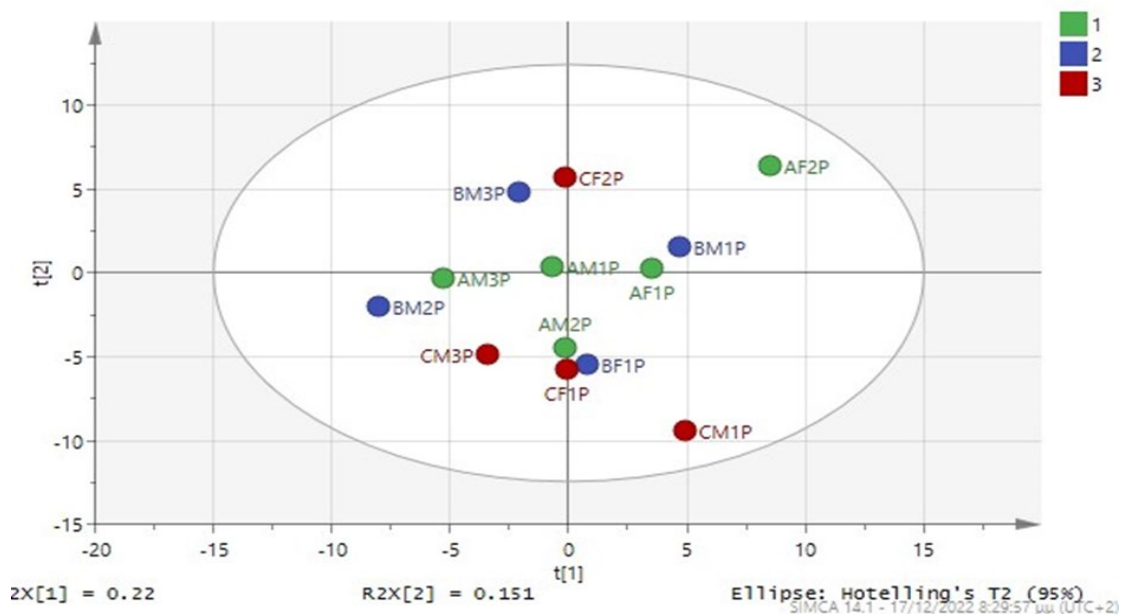
iv

Εικόνα 18: PLS-DA plot Pareto scaling, VIP scores>1 (i) Summary of fit (ii) Scores scatter plot (iii) Loadings scatter plot (με κόκκινο χρώμα φαίνονται τα αποτελέσματα της general list με VIP score>1) (iv) Permutations plot (20 permutations)

## Στατιστική επεξεργασία δειγμάτων: Δεδομένα αρνητικού ιοντισμού

### PCA

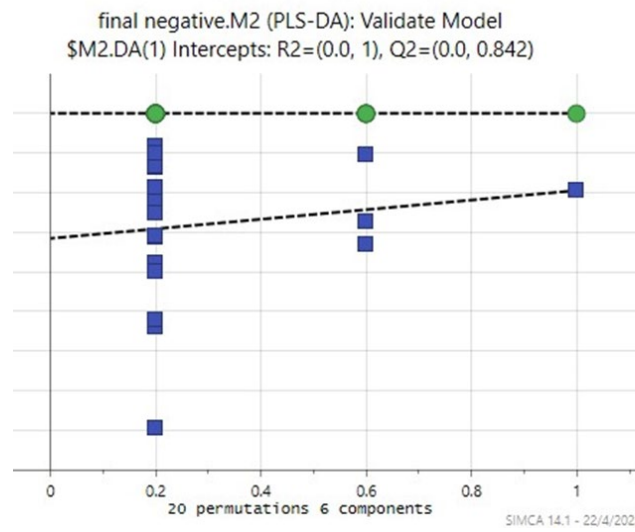
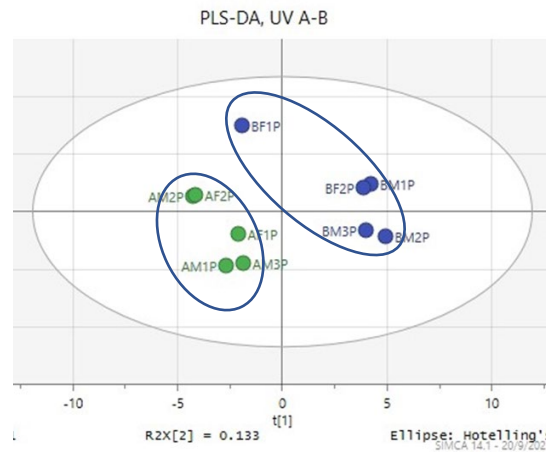
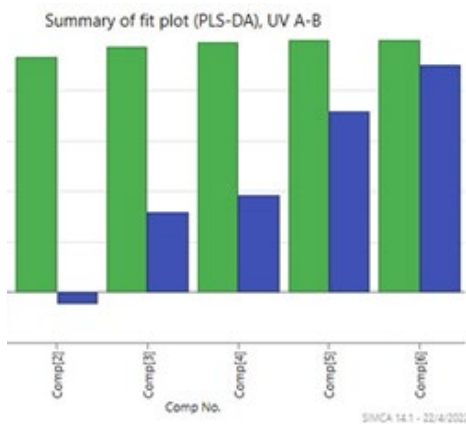
Η PCA έδωσε 6 κύριες συνιστώσες και φαίνεται στην εικόνα 19. Από την PCA παρατηρείται ότι οι ομάδες δε διαχωρίζονται καλά.



Εικόνα 19: Scores scatter plot PCA αρνητικού ιοντισμού

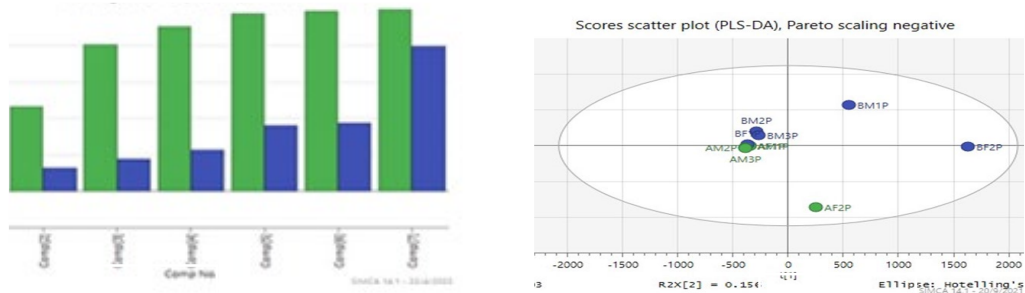
### PLS-DA

Στην εικόνα 20 φαίνονται τα διαγράμματα PLS-DA με UV scaling και προκύπτουν οι τιμές  $R^2 = 0,811$  και  $Q^2 = 0,903$ . Το μοντέλο παρουσιάζει καλές τιμές  $R^2$  και  $Q^2$  και συνεπώς καλό διαχωρισμό μεταξύ των ομάδων (εικόνα 20 (ii)). Στο permutations plot οι τιμές  $Q^2$  και  $R^2$  του μοντέλου είναι μικρότερες από τις πραγματικές τιμές, άρα το αρχικό μοντέλο θεωρείται αξιόπιστο. Τα διαγράμματα που προκύπτουν με UV κλιμάκωση είναι καλύτερα ως προς το διαχωρισμό των ομάδων και τις τιμές  $Q^2$  και  $R^2$ , από εκείνα που προκύπτουν με Pareto scaling (εικόνα 21). Συγκεκριμένα οι τιμές  $R^2$  και  $Q^2$  είναι 0,984 και 0,799 αντίστοιχα. Οπότε στον αρνητικό ιοντισμό επιλέγεται το UV scaling.

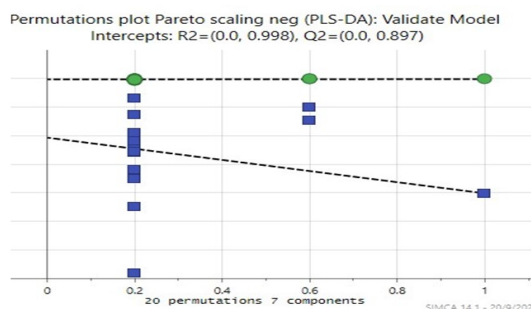


Εικόνα 20: PLS-DA plots UV scaling (i) Summary of fit (ii) Scores scatter plot (iii) Permutations plot (20 permutations)





i



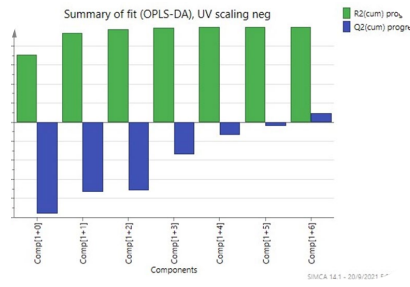
ii

iii

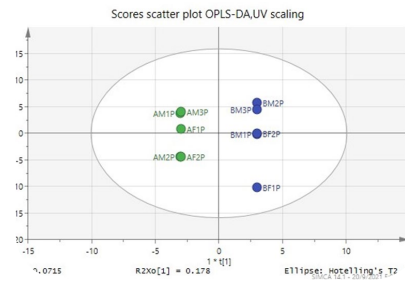
Εικόνα 21: PLS-DA plots Pareto scaling (i) Summary of fit (ii) Scores scatter plot (iii) Permutations plot (20 permutations)

### **OPLS-DA**

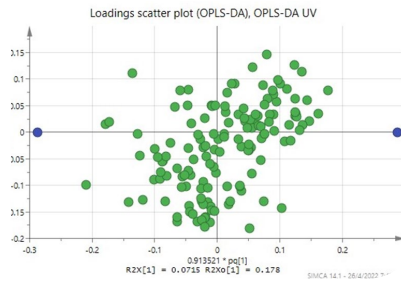
Με OPLS-DA τόσο με UV scaling αλλά και με Pareto scaling (εικόνες 22,23) δεν προέκυψαν ικανοποιητικά αποτελέσματα και διαγράμματα. Ο διαχωρισμός των ομάδων δεν ήταν καλός και οι τιμές  $Q^2$  πολύ χαμηλές (UV scaling:  $R^2= 0,904$ ,  $Q^2= 0,0935$ , Pareto scaling:  $R^2= 0,996$ ,  $Q^2= 0,54$ ).



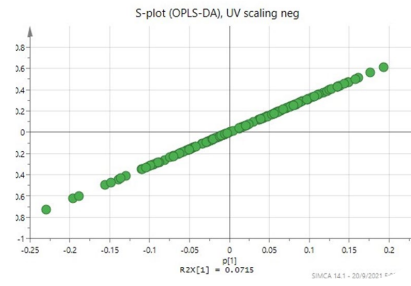
i



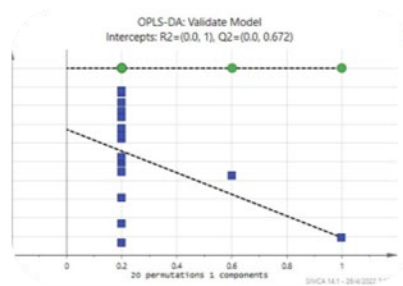
ii



iii

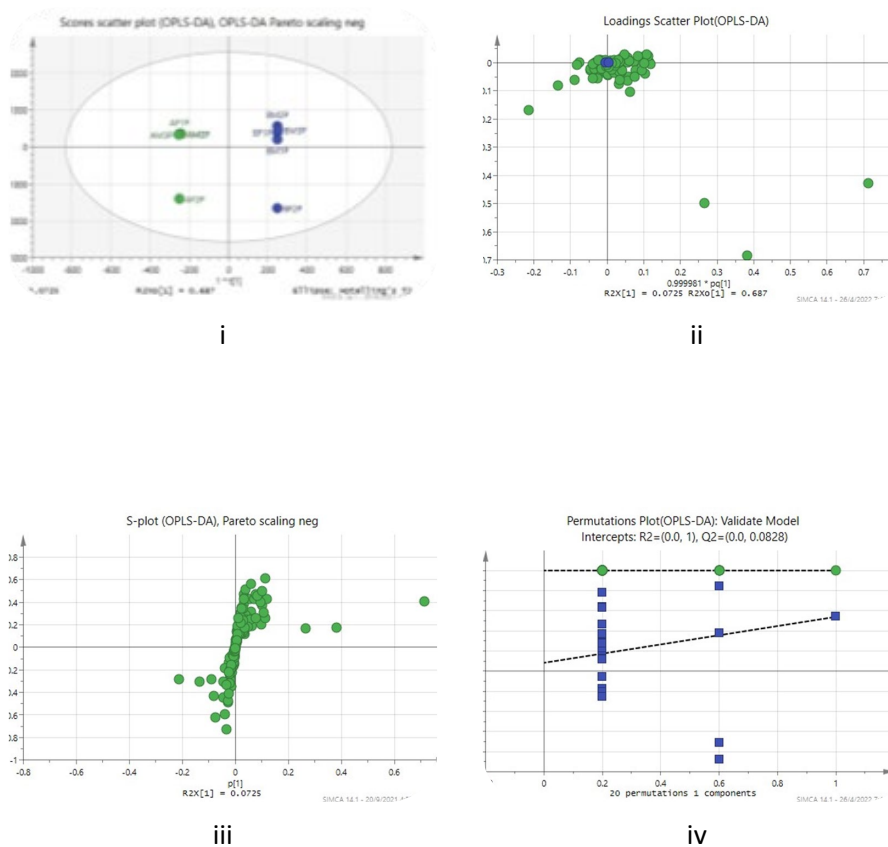


iv



v

Εικόνα 22: OPLS-DA plots UV scaling (i) Summary of fit (ii) Scores scatter plot (iii) Loadings scatter plot (iv) S-plot (v) Permutations plot (20 permutations)



Εικόνα 23: OPLS-DA plots Pareto scaling (i) Scores scatter plot (ii) Loadings scatter plot (iii) S-plot (iv) Permutations plot (20 permutations)

## 6.2 Ταυτοποίηση των στατιστικά σημαντικών χαρακτηριστικών

Τα κύρια χαρακτηριστικά (primary features) του θετικού και αρνητικού ιονισμού ( $VIP > 1$ ) εξήχθησαν ως χρωματογραφήματα ιόντων (IC) χρησιμοποιώντας το λογισμικό DataAnalysis (Bruker Daltonics, Βρέμη, Γερμανία) και αφαιρέθηκαν τα φάσματα υποβάθρου. Καθώς πολλές από τις διακριτές μεταβλητές δε μπορούσαν να αναγνωριστούν ως μεταβολίτες, το «καθαρισμένα» φάσματα χαμηλής και υψηλής ενέργειας φασματοποίησης μελετήθηκαν όχι μόνο με τη χρήση της βάσης δεδομένων HMDB 5.0, αλλά παράλληλα και με τη χρήση της ηλεκτρονικής βιβλιοθήκης MyCompoundID (University of Alberta). Το MyCompoundID περιλαμβάνει εκτός από τους ενδογενείς μεταβολίτες, τα προβλεπόμενα προϊόντα μεταβολισμού τους.

Στη διαδικασία ταυτοποίησης υποβλήθηκαν 51 στατιστικά σημαντικά χαρακτηριστικά, εκ των οποίων τελικά ταυτοποιήθηκαν τα 26 .

Η συνολική περίληψη των πιο διαφοροποιημένων μεταβολιτών μεταξύ των ομάδων A και B παρουσιάζεται στον Πίνακα 3. Η ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε στα features με  $VIP > 1$  στο θετικό και αρνητικό ιοντισμό. Χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτρονική βιβλιοθήκη MyCompoundID (MCID) και για την ταυτοποίηση έχουν ληφθεί υπόψη τόσο η μη μεταβολική αντίδραση (no reaction) όσο και η μία μεταβολική αντίδραση. Το initial score και το fit score σχετίζονται με την αποτελεσματικότητα της ταυτοποίησης. Το initial score αξιολογεί τη σχετικότητα μεταξύ του θεωρητικού τύπου και του πειραματικού m/z και το fit score αξιολογεί την αντιστοίχιση μεταξύ φασμάτων αναφοράς και των πειραματικού ή in-silico MSMS φασμάτων. Το σύμβολο ( $\uparrow$ ) αντιπροσωπεύει αυξημένα επίπεδα μεταβολιτών στα δείγματα της ομάδας B που έλαβε υψηλή δόση κολιστίνης σε σχέση με την ομάδα A που έλαβε κανονική δόση κολιστίνης και το σύμβολο ( $\downarrow$ ) αντιπροσωπεύει μειωμένα επίπεδα μεταβολιτών στα δείγματα της ομάδας B σε σχέση με την ομάδα A.

Συνολικά εξετάστηκε το 68% των features που προέκυψαν από τις general lists θετικού και αρνητικού ιοντισμού της SIMCA και πληρούσαν τις προϋποθέσεις ( $VIP > 1$ ) και το 51% αυτών ταυτοποιήθηκαν. Από τους 26 μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν, οι 21 είναι προϊόντα μεταβολισμού των μεταβολιτών.

Η πλειοψηφία των ταυτοποιημένων μεταβολιτών είναι πρωτογενείς ή δευτερογενείς ενδογενείς μεταβολίτες. Από τα αποτελέσματα του αρνητικού ιοντισμού προέκυψε μικρότερη πληροφορία σε σχέση με το θετικό ιοντισμό, γεγονός που είναι δικαιολογημένο, καθώς ότι οι περισσότεροι μεταβολίτες ιοντίζονται θετικά.

Πίνακας 3: Πίνακας ταυτοποίησης μεταβολιτών

Precursor Mass exp.	ESI polarity	RT	αύξηση/μείωση μεταβολίτη σε δλ	Vip	Formula	Compound	HMDB	Initial score	Fit score	reactions of metabolism	Precursor type	Precursor mass theo.	Error (mDa)
256.0920	pos	3.83	↑	1.69	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	Propionylcarnitine	HMDB00824	1	0.39	no reaction	[M+K] <sup>+</sup>	217.1314	-0.003
238.5763	pos	4.34	↓	1.61	unknown								
278.0352	pos	3.57	↑	1.51	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>7</sub> S	DOPA sulfate	HMDB02028	1	0.47	no reaction	[M+H] <sup>+</sup>	277.0256	0.002
254.0949	pos	5.04	↑	1.51	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	Neopterin	HMDB00845	1	0.75	no reaction	[M+H] <sup>+</sup>	253.0811	0.006
231.9944	pos	1.2	↑	1.49	unknown								
229.1555	pos	1.65	↑	1.43	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	L-isoleucyl-L-proline	HMDB11174	1	0.79	no reaction	[M+H] <sup>+</sup>	228.1474	0.0001
278.2337	pos	5.97	↑	1.40	unknown								
163.0342	pos	6.76	↑	1.39	unknown								
222.0898	pos	6.78	↑	1.37	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	5-Methyldeoxycytidine	HMDB02224	1	0.43	[-H <sub>2</sub> O]	[M-H] <sup>-</sup>	241.1063	0.001
189.0503	pos	6.75	↑	1.35	unknown								
254.0947	pos	3.78	↑	1.34	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	Galactosylglycerol	HMDB06790	1	0.71	no reaction	[M] <sup>+</sup>	254.1002	-0.005
152.0292	pos	6.77	↑	1.33	unknown								
90.0557	pos	0.81	↑	1.32	unknown								
123.3980	pos	2.27	↑	1.32	unknown								
239.1498	pos	4.34	↓	1.30	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	Homoanserine	HMDB05767	1	0.42	[-O]	[M+H] <sup>+</sup>	254.1379	-0.0005
479.1954	pos	6.73	↑	1.29	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	Enterodiol	HMDB05056	1	0.61	[+C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> ]	[M+H] <sup>+</sup>	302.1518	0.004
252.0795	pos	11.71	↑	1.28	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	Threonolactone	HMDB00940	1	0.43	[+C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> N <sub>5</sub> ]	[M+H] <sup>+</sup>	118.0266	0.007
181.0611	pos	6.8	↑	1.28	unknown								
219.1752	pos	12.43	↑	1.24	unknown								
515.1538	pos	6.72	↑	1.22	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> S	S-Adenosylhomocysteine	HMDB00939	1	0.74	[+C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ]	[M-H] <sup>-</sup>	384.1216	-0.003
513.1561	pos	6.72	↑	1.21	C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	5-Methyltetrahydrofolic acid	HMDB01396	1	0.67	[+NH]	[M+K] <sup>+</sup>	459.1866	-0.005
256.0920	pos	4.78	↑	1.20	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>4</sub>	Bicine	HMDB11727	1	0.32	[+C <sub>4</sub> H <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O]	[M-H] <sup>-</sup>	163.0845	-0.002
238.5763	pos	0.44	↓	1.16	unknown								
240.0794	pos	4.99	↑	1.15	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	Ribothymidine	HMDB00884	1	0.49	[-H <sub>2</sub> O]	[M] <sup>+</sup>	258.0852	0.005
240.5575	pos	3.56	↑	1.15	unknown								
594.3725	pos	8.18	↓	1.14	unknown								
477.1932	pos	6.76	↑	1.08	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	Deoxyypyridinoline	HMDB00569	1	0.64	[+C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O]	[M+Na] <sup>+</sup>	412.1958	-0.002
499.1758	pos	6.75	↑	1.08	C <sub>22</sub> H <sub>36</sub> O <sub>5</sub>	Bisnorcholic acid	HMDB02082	1	0.55	[+SO <sub>3</sub> ]	[M+K] <sup>+</sup>	380.2563	-0.0005
244.1917	pos	14.25	↑	1.07	unknown								
550.3468	pos	7.77	↓	1.06	C <sub>26</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>7</sub> F	LysoPC(18:1(9Z))	HMDB02815	0.988	0.67	[+CO]	[M+H] <sup>+</sup>	521.3481	-0.004
278.0551	pos	6.77	↑	1.05	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	5-Methylcytidine	HMDB00982	1	0.32	[-H <sub>2</sub> O]	[M+K] <sup>+</sup>	257.1012	0.001

238.1733	pos	6.79	↓	1.03	unknown								
497.1779	pos	6.76	↑	1.03	C19H34O15	Isoglobotriaose	HMDB06598	1	0.31	[ -CO]	[M+Na]+	502.1898	-0.006
313.1865	pos	4.82	↓	1.03	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	11b-Hydroxyprogesterone	HMDB04031	1	0.30	[ -H <sub>2</sub> O]	[M-H]-	332.1988	0.006
240.0968	pos	3.8	↓	1.02	unknown								
238.0756	pos	6.7	↑	1.01	unknown								
280.0329	pos	3.58	↑	1.01	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	Citramalic acid	HMDB00426	1	0.23	[ +C <sub>4</sub> H <sub>3</sub> N <sub>3</sub> ]	[M+K]+	148.0372	-0.0001
172.9801	neg	3.42	↓	2.09	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O <sub>6</sub> P	Phosphoglycolic acid	HMDB00816	1	0.91	[ +O]	[M+H]+	155.9824	-0.004
514.2478	neg	12.79	↑	1.96	unknown								
255.2158	neg	13.76	↑	1.91	unknown								
514.2488	neg	11.52	↑	1.59	C <sub>16</sub> H <sub>31</sub> O <sub>3</sub>	16-hydroxy hexadecanoic acid	HMDB06294	1	0.60	[ +C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>8</sub> P]	[M+H]+	271.2273	-0.005
123.9999	neg	0.79	↑	1.56	unknown								
353.1628	neg	11.78	↓	1.47	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	Dimethylglycine	HMDB00092	1	0.32	[ +C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> ]	[M+H]+	103.0633	0.006
215.0182	neg	0.81	↑	1.44	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	(R)-2,3-Dihydroxy-isovalerate	HMDB12141	1	0.52	[ +SO <sub>3</sub> ]	[M+H]+	134.0579	-0.004
594.1992	neg	13.05	↑	1.40	unknown								
514.9479	neg	12.8	↑	1.38	unknown								
296.5982	neg	13.01	↑	1.37	unknown								
515.0162	neg	13.36	↑	1.32	unknown								
337.0156	neg	9.32	↑	1.30	unknown								
514.2509	neg	13.33	↑	1.22	C <sub>16</sub> H <sub>31</sub> O <sub>3</sub>	16-hydroxy hexadecanoic acid	HMDB06294	1	0.58	[ +C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>8</sub> P]	[M+H]+	271.2273	-0.003
71.0091	neg	0.82	↑	1.16	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	L-Lactic acid	HMDB00190	1	0.34	[ -H <sub>2</sub> O]	[M-H]-	90.0317	-0.005

### 6.3 Σχολιασμός και συμπεράσματα

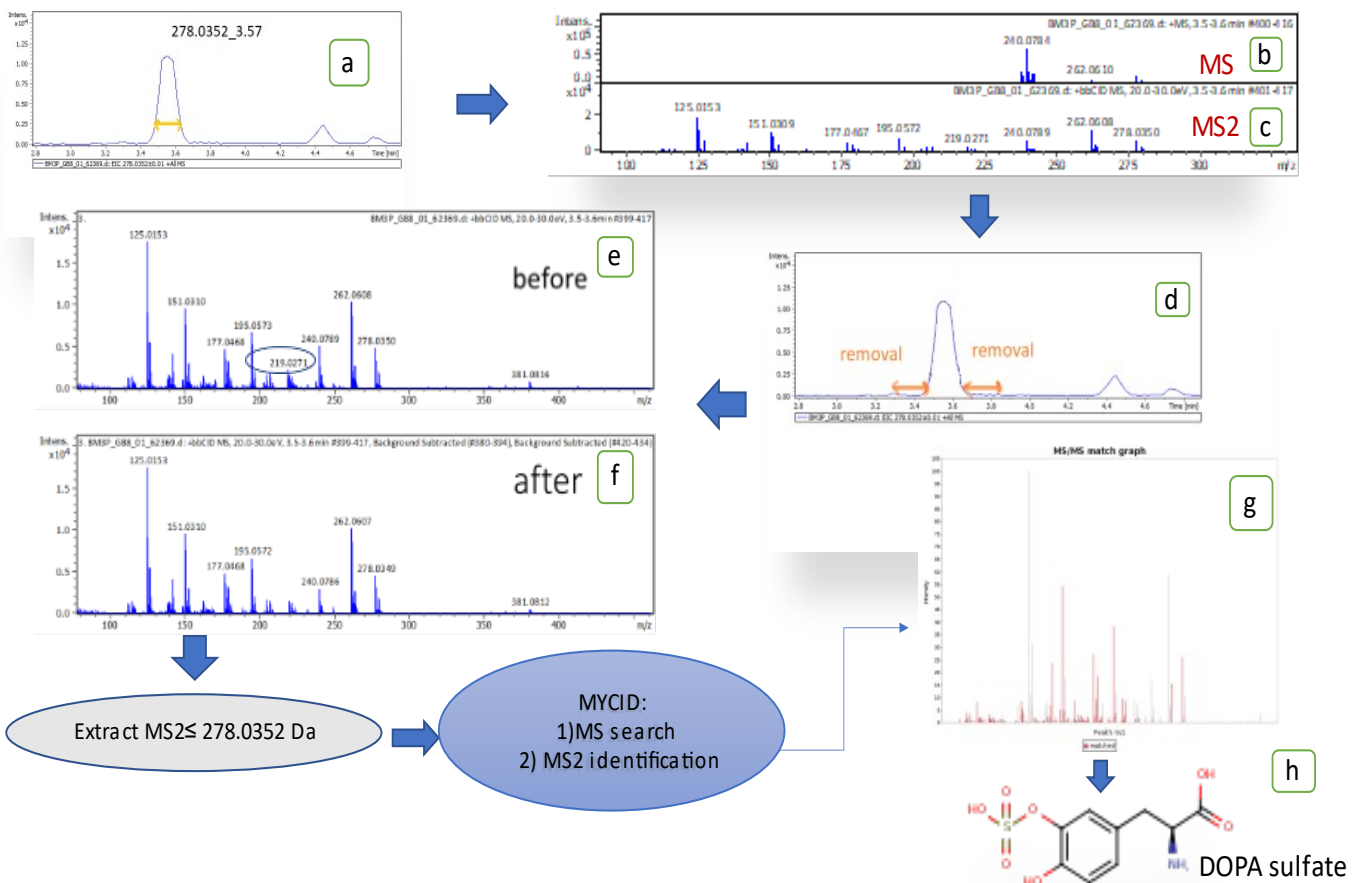
Η στατιστική ανάλυση έδειξε πως η χορηγούμενη δράση κολιστίνης έχει σημαντική επίδραση στο μεταβόλωμα των μυών. Στα πλαίσια της μελέτης αυτή, στις ομάδες των μυών χορηγήθηκε η συνήθως κλινικά χορηγούμενη δόση καθώς και η δόση αυτή αυξημένη κατά 50%, ώστε να φανεί η πιθανή τοξικότητα που οφείλεται σε μικρή αύξηση της δόσης. Παρά την μικρή αύξηση, η στατιστική διαφοροποίηση των ομάδων αποδεικνύει την σημαντική επίδραση του φαρμάκου και σε επίπεδο κυκλοφορικού συστήματος.

Κατά τη διαδικασία της ταυτοποίησης των μεταβολιτών, παρατηρήθηκε ότι σημαντικός αριθμός των features δε μπορούσε να αποδοθεί σε ήδη γνωστούς μεταβολίτες. Ωστόσο, αυτά τα features παρατηρήθηκε ότι αντιστοιχούν σε πραγματικές και αξιόπιστες κορυφές με αναπαραγώγιμο σήμα, ακρίβεια μάζας και χρόνο κατακράτησης. Επιπλέον, ανήκουν στις πιο διακριτές μεταβλητές και, ως εκ τούτου, η ύπαρξή τους δεν θα μπορούσε να αγνοηθεί καθώς μπορεί να ανήκουν στο «σκοτεινό μεταβόλωμα»<sup>39</sup>.

Με σκοπό την απόδοση μεγαλύτερου αριθμού features σε μεταβολίτες, ερευνήθηκε με τη βοήθεια της βιβλιοθήκης MCID αν πιθανώς προϊόντα μεταβολιτών που προέκυψαν από αντίδραση μεταβολισμού ενός σταδίου αντιστοιχούν στα μη ταυτοποιημένα features. Δηλαδή μέσω τη βοήθεια της βιβλιοθήκης, διαπιστώθηκε αν υπήρχε συσχέτιση μεταξύ του δεδομένου m/z των features με μεταβολίτες που έχουν υποβληθεί σε ενδογενείς ενζυματικές αντιδράσεις προσθήκης ή απώλειας χημικών ομάδων, που είναι γνωστές ότι εμπλέκονται στο μεταβολισμό.

Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με βάση το initial score (>0,95), που αντιστοιχεί στην πρόβλεψη του μοριακού τύπου και με το fit score (>0,7), που αντιστοιχεί στην ομοιότητα μεταξύ του πειραματικού και του MS2 φάσματος αναφοράς, όπου στη συγκεκριμένη μελέτη, θεωρήθηκε το καθαρισμένο φάσμα υψηλής ενέργειας θραυσματοποίησης. Στις περιπτώσεις που εμφανίστηκαν παραπάνω από μία πιθανές αντιστοιχήσεις των features σε μεταβολίτες, ελήφθη υπόψη η βιολογική τους δράση. Η διαδικασία ταυτοποίησης περιγράφεται στην εικόνα 24.

Κάποιοι μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν και εντοπίστηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στις δύο ομάδες έχουν ήδη συσχετιστεί με νεφροτοξικότητα στη βιβλιογραφία.



Εικόνα 24: Γραφική αναπαράσταση της ροής εργασιών ταυτοποίησης μεταβολιτών, χρησιμοποιώντας το παράδειγμα του feature 278.0352\_3.57 (a) Extracted ion chromatogram,  $m/z = 278.0352$ ,  $tR = 3.57$  (b,c) αναφέρονται σε φάσματα MS και MS2, αντίστοιχα, που αντιστοιχούν σε αυτήν την περιοχή κορυφής. (d) η περιοχή που αφαιρέθηκε ως φάσμα υποβάθρου (e,f) αντιπροσωπεύουν τα φάσματα MS και MS2 πριν και μετά την αφαίρεση φάσματος υποβάθρου, αντίστοιχα. (g) Γράφημα αντιστοίχισης MSMS που ελήφθη από το MCID, κατά τη διαδικασία ταυτοποίησης. (h) η δομική αναπαράσταση του DOPA sulfate

### 6.3.1 Νεοπτερίνη

Η νεοπτερίνη ανήκει στην κατηγορία των οργανικών ενώσεων που είναι γνωστές ως βιοπτερίνες. Αυτές οι ενώσεις είναι συνένζυμα που περιέχουν ένα παράγωγο 2-αμινοπτεριδιν-4-όνης και συντίθενται σε πολλά μέρη του σώματος, συμπεριλαμβανομένης της επίφυσης. Είναι ένα στερεό μόριο, που είναι διαλυτό στο νερό και αποτελεί προϊόν καταβολισμού της τριφωσφορικής γουανοσίνης (GTP). Η νεοπτερίνη συντίθεται από τριφωσφορική γουανοσίνη σε μακροφάγα και μονοκύτταρα με την ενεργοποίηση της τριφωσφορικής κυκλοϋδρολάσης γουανοσίνης. Στους ανθρώπους, εμπλέκεται στη βιοσύνθεση της πτερίνης και συμμετέχει ως πρόδρομη ουσία στη βιοσύνθεση της βιοπτερίνης, η οποία είναι ουσιαστικός συμπαράγοντας στη σύνθεση νευροδιαβιβαστών. Επιπλέον, έχει αναγνωριστεί ως σουραιμική τοξίνη σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Ομάδα



Εργασίας Ουραιμικής Τοξίνης ( European Uremic Toxin Working Group)<sup>40</sup>. Οι περισσότερες ουραιμικές τοξίνες είναι μεταβολικά απόβλητα και φυσιολογικά απεκκρίνονται μέσω των ούρων ή των κοπράνων. Μπορεί να προκαλέσουν βλάβη στα νεφρά, το συκώτι και την καρδιά, αλλά και αλλαγές στην ψυχική κατάσταση, όπως σύγχυση, μειωμένη αντίληψη, διέγερση, ψύχωση, επιληπτικές κρίσεις και κώμα. Οι ουραιμικές τοξίνες όπως η νεοπτερίνη μεταφέρονται στους νεφρούς μέσω μεταφορέων οργανικών ιόντων (ιδιαίτερα μέσω OAT3). Αυξημένα επίπεδα νεοπτερίνης προκύπτουν από την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένου του κακοήθους καρκίνου, της απόρριψης αλλομοσχεύματος, της ιογενούς λοίμωξης και των αυτοάνοσων διαταραχών, καθώς η δραστηριότητα του ενζύμου ενισχύεται σημαντικά από την ιντερφερόνη (IFN)- $\gamma$  και άλλες κυτοκίνες<sup>41</sup>.

Η μέτρηση της συγκέντρωσης νεοπτερίνης επιτρέπει την εκτίμηση της έκτασης του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από το ανοσοποιητικό σύστημα, σχετίζεται επομένως με τη δραστηριότητα και την έκταση μιας δεδομένης ασθένειας και χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της πορείας της νόσου. Καθώς η απέκκριση νεοπτερίνης λαμβάνει χώρα πριν εμφανιστούν κλινικά συμπτώματα, η βιοχημική παρακολούθηση των επιπέδων νεοπτερίνης έχει γίνει αποδεκτή ως ισχυρός δείκτης για την κλινική βαρύτητα ορισμένων ασθενειών. Συγκεκριμένα, οι αυξημένες συγκεντρώσεις νεοπτερίνης είναι από τους καλύτερους προγνωστικούς παράγοντες δυσμενούς έκβασης σε ασθενείς με λοίμωξη HIV, σε καρδιαγγειακές παθήσεις και σε διάφορους τύπους καρκίνου.

Στην παρούσα μελέτη, η νεοπτερίνη ανιχνεύθηκε στα δείγματα πλάσματος και των δύο ομάδων. Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα νεοπτερίνης σε όλα τα δείγματα της ομάδας Β, που έλαβε υψηλή δόση κολιστίνης, ήταν σημαντικά αυξημένα σε σχέση με τα δείγματα της ομάδας Α. Τα υψηλά επίπεδα νεοπτερίνης στο πλάσμα υποδηλώνουν έντονο οξειδωτικό στρες που προκαλείται από το ανοσοποιητικό σύστημα όταν χορηγείται τοξική δόση κολιστίνης και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης νεφροτοξικότητας της κολιστίνης, ακόμα και πριν εμφανιστούν κλινικά συμπτώματα στους ασθενείς.

### 6.3.2 L-ισολευκυλο-L-προλίνη

Η L-ισολευκυλο-L-προλίνη είναι ένα διπεπτίδιο που αποτελείται από ισολευκίνη και προλίνη. Είναι προϊόν ατελούς διάσπασης των πρωτεϊνών ή του πρωτεϊνικού καταβολισμού. Στη μελέτη των Jeong et al., που είχε σκοπό τον εντοπισμό βιοδεικτών νεφροτοξικότητας, που προκαλείται από την κολιστίνη χρησιμοποιώντας μη στοχευμένη μεταβολομική προσέγγιση, παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα των αμινοξέων, όπως η φαινυλαλανίνη, η τρυπτοφάνη, η ισολευκίνη, η λευκίνη και η τυροσίνη στα ούρα της ομάδας που έλαβε κολιστίνη ήταν σημαντικά υψηλότερα από εκείνα της ομάδας ελέγχου, υποδηλώνοντας ότι η κολιστίνη προκάλεσε εγγύς σωληναριακή βλάβη<sup>42</sup>. Στην παρούσα μελέτη η L-ισολευκυλο-L-προλίνη είναι αυξημένη στα δείγματα της ομάδας Β. Οι αυξημένες συγκεντρώσεις στα δείγματα πλάσματος υποδηλώνουν ότι θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης νεφροτοξικότητας, αφού μπορεί να ανιχνεύσει σε πρώιμο στάδιο την ύπαρξη τοξικών δόσεων κολιστίνης στο πλάσμα, όπου η L-ισολευκυλο-L-προλίνη υπάρχει ως διμερές, ακόμα και πριν διασπαστεί στα αμινοξέα ισολευκίνη και προλίνη, που εντοπίστηκαν στα ούρα.

### 6.3.3 Γαλακτοσυλογλυκερόλη

Η γαλακτοσυλογλυκερόλη είναι ένα ενδιάμεσο στο μεταβολισμό της γαλακτόζης και των γλυκερολιπιδίων. Στο μεταβολισμό της γαλακτόζης, η γαλακτοσυλογλυκερόλη παράγεται αναστρέψιμα από την D-γαλακτόζη και τη γλυκερόλη από το ένζυμο άλφα-γαλακτοσιδάση. Στη συνέχεια μετατρέπεται σε γλυκερίνη μέσω του ενζύμου βήτα-γαλακτοσιδάση<sup>43</sup>. Ο μεταβολίτης βρέθηκε αυξημένος στα δείγματα της ομάδας Β. Στη βιβλιογραφία δεν εντοπίστηκε συσχέτιση της αυξημένης συγκέντρωσης του μεταβολίτη με νεφροτοξικότητα.

### 6.3.4 S-Αδενοσυλ-ομοκουστεΐνη

Η S-Αδενοσυλ-L-ομοκουστεΐνη (SAH) σχηματίζεται από την απομεθυλίωση της S-αδενοσυλ-L-μεθειονίνης (SAM) και είναι επίσης ο άμεσος πρόδρομος της συνολικής ομοκουστεΐνης που παράγεται στο σώμα. Η αντίδραση καταλύεται από υδρολάση της S-αδενοσυλομοκουστεΐνης και είναι αναστρέψιμη με την ισορροπία που ευνοεί τον σχηματισμό SAH. Η SAH είναι το προϊόν όλων των αντιδράσεων μεθυλίωσης που περιλαμβάνουν τη S-αδενοσυλομεθειονίνη (SAM) ως δότη μεθυλίου. Η αναστολή αυτών των διαδικασιών που προκαλούνται από το SAM από το SAH είναι ένας αποδεδειγμένος μηχανισμός μεταβολικής αλλοίωσης. Επειδή η μετατροπή της SAH σε ομοκουστεΐνη είναι αναστρέψιμη, με την ισορροπία να ευνοεί τον σχηματισμό της SAH, οι αυξήσεις της ομοκουστεΐνης στο πλάσμα συνοδεύονται από αύξηση της SAH στις περισσότερες περιπτώσεις. Διαταραχές στην οδό διαμεθυλίωσης που υποδεικνύονται από μη φυσιολογικές τιμές SAH, SAM ή την αναλογία τους, έχουν αναφερθεί σε πολλές νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η άνοια, η κατάθλιψη και η νόσος του Parkinson<sup>44</sup>.

Επομένως, όταν υπάρχει σε επαρκώς υψηλά επίπεδα, η S-αδενοσυλ-ομοκουστεΐνη μπορεί να δράσει ως ανοσοτοξίνη και μετατοξίνη. Μια ανοσοτοξίνη διαταράσσει, περιορίζει τη λειτουργία ή καταστρέφει τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Μια μετατοξίνη είναι ένας ενδογενής μεταβολίτης που προκαλεί δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία σε χρόνια υψηλά επίπεδα. Χρόνια υψηλά επίπεδα S-αδενοσυλομοκουστεΐνης σχετίζονται με ανεπάρκεια υδρολάσης S-αδενοσυλομοκουστεΐνης (SAH) και ανεπάρκεια απαμινάσης αδενοσίνης<sup>45</sup>. Στη συγκεκριμένη μελέτη τα αυξημένα επίπεδα S-Αδενοσυλ-ομοκουστεΐνης στην ομάδα Β, υποδηλώνουν δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία των ποντικών λόγω νεφροτοξικότητας και καθιστούν το μεταβολίτη καλό βιοδείκτη νεφροτοξικότητας που προκαλείται από κολιστίνη.

### 6.3.5 Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη(18:1(9Z))

Η LysoPC(18:1(9Z)) είναι ένα λυσοφωσφολιπίδιο (LyP), δηλαδή ένα μονογλυκεροφωσφολιπίδιο στο οποίο ένα τμήμα φωσφορυλοχολίνης καταλαμβάνει μια θέση υποκατάστασης γλυκερίνης. Οι λυσοφωσφατιδυλοχολίνες μπορούν να έχουν διαφορετικούς συνδυασμούς λιπαρών οξέων ποικίλου μήκους και κορεσμού που συνδέονται στη θέση C-1 (sn-1). Τα λιπαρά οξέα που περιέχουν 16, 18 και 20 άνθρακες είναι τα πιο κοινά. Η LysoPC(18:1(9Z)), συγκεκριμένα, αποτελείται από μία αλυσίδα ελαϊκού οξέος στη θέση C-1. Η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη βρίσκεται σε μικρές ποσότητες στους

περισσότερους ιστούς και σχηματίζεται με υδρόλυση της φωσφατιδυλοχολίνης από το ένζυμο φωσφολιπάση A2. Στο πλάσμα του αίματος σημαντικές ποσότητες λυσοφωσφατιδυλοχολίνης σχηματίζονται από ένα συγκεκριμένο ενζυμικό σύστημα, τη λεκιθίνη:ακυλοτρανσφεράση χοληστερόλης (LCAT), το οποίο εκκρίνεται από το ήπαρ. Το ένζυμο καταλύει τη μεταφορά των λιπαρών οξέων της θέσης sn-2 της φωσφατιδυλοχολίνης στην ελεύθερη χοληστερόλη στο πλάσμα, με σχηματισμό εστέρων χοληστερόλης και λυσοφωσφατιδυλοχολίνης.

Στο αίμα ή στο πλάσμα, τα LPC δεσμεύονται κυρίως στη λευκωματίνη και σε μικρότερο βαθμό με τις λιποπρωτεΐνες. Η φλεγμονή, η κυτταρική βλάβη και άλλες παθοφυσιολογικές καταστάσεις μπορούν να αλλάξουν ριζικά την αναλογία ελεύθερου LPC προς δεσμευμένο στην αλβουμίνη μέσω αυξημένης παραγωγής LPC ή μειωμένων επιπέδων λευκωματίνης στο πλάσμα. Συγκεκριμένα, τα χαμηλότερα επίπεδα λευκωματίνης (υπολευκωματιναιμία) οδηγούν σε χαμηλότερα επίπεδα LPC στο αίμα. Η υπολευκωματιναιμία είναι τυπική για ασθενείς με σήψη, εγκαύματα ή σοβαρά τραύματα, όπου τα επίπεδα λευκωματίνης είναι 50-80 % χαμηλότερα από αυτά που παρατηρούνται σε υγιή άτομα. Μειωμένα επίπεδα LPC έχουν παρατηρηθεί σε μια σειρά από άλλες φλεγμονώδεις καταστάσεις πέρα από τη σήψη, συμπεριλαμβανομένης της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, του διαβήτη, της σχιζοφρένειας, του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών, της νόσου Alzheimer, της πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης, της γήρανσης, του άσθματος και της ηπατικής κίρρωσης, όπου συσχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο θνησιμότητας.

Τα LPC έχουν μια σειρά από προστατευτικά ή αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα. Υψηλότερα επίπεδα LPC επάγουν έκφραση κυκλοοξυγενάσης-2 και ενδοθηλιακής συνθάσης νιτρικού οξειδίου (eNOS) σε ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία και τα δύο μπορούν να έχουν αγγειοπροστατευτικά αποτελέσματα είτε μέσω παραγωγής προστακυκλίνης είτε νιτρικού οξειδίου <sup>46</sup>.

Είναι ενδιαφέρον ότι οι περισσότερες από τις πρόσφατες μελέτες, σε αντίθεση με παλαιότερες μελέτες, βρήκαν χαμηλότερα επίπεδα LPC στο πλάσμα που σχετίζονται με δυσμενή έκβαση της νόσου. Όντας το πιο άφθονο λυσοφωσφολιπίδιο στο πλάσμα, είναι υψίστης σημασίας να κατανοήσουμε τις φυσιολογικές λειτουργίες του και να ρίξουμε φως στη ασύμφωνη βιβλιογραφία που σχετίζεται με την έρευνά του. Τα LPC θα πρέπει να αναγνωρίζονται ως σημαντικοί ομοιοστατικοί μεσολαβητές που εμπλέκονται σε όλα τα στάδια της αγγειακής φλεγμονής. Στα δείγματα της ομάδας Β στη συγκεκριμένη μελέτη, τα επίπεδα της LysPC(18:1(9Z)) φαίνονται μειωμένα σε σχέση με την ομάδα Α. Η παρατήρηση αυτή δικαιολογεί την πιθανή χρήση της ως βιοδείκτη νεφροτοξικότητας, καθώς διαπιστώνεται μείωση της συγκέντρωσής της σε δείγματα πλάσματος όπου υπάρχει παθολογική βλάβη.

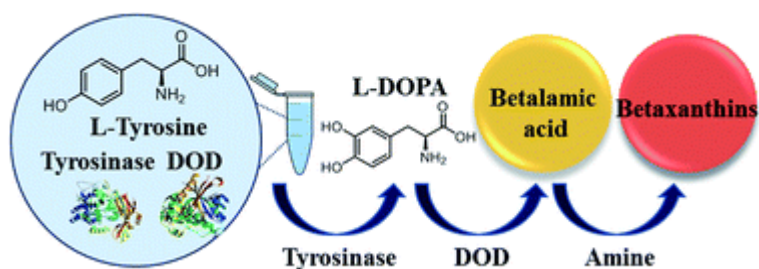
### 6.3.6 Λοιποί πιθανοί βιοδείκτες

Αξίζει να αναφερθεί ότι και ορισμένοι ακόμα μεταβολίτες που είχαν χαμηλότερη ακρίβεια μάζας έχουν συσχετιστεί με νεφροτοξικότητα στη βιβλιογραφία. Για παράδειγμα, σε μελέτη των Jeong et al. σε δείγματα ούρων τα επίπεδα των ακυλοκαρνιτινών βραχείας αλυσίδας (όπως ακετυλοκαρνιτίνη, προπιονυλοκαρνιτίνη, βουτυρυλοκαρνιτίνη) αυξήθηκαν σημαντικά μετά από αγωγή με μεθανοσουλφονική κολιστίνη μιας εβδομάδας <sup>42</sup>. Οι καρνιτίνες παίζουν κρίσιμο ρόλο στην παραγωγή ενέργειας. Μεταφέρουν λιπαρά οξέα

μακράς αλυσίδας στα μιτοχόνδρια, ώστε να μπορούν να οξειδωθούν για να παράγουν ενέργεια. Επίσης, μεταφέρουν τις τοξικές ενώσεις που παράγονται από αυτό τα μιτοχόνδρια για να αποτρέψουν τη συσσώρευσή τους. Οι ακυλοκαρνιτίνες, επομένως, αντιπροσωπεύουν βιοδείκτες ελαττωματικής οξείδωσης λιπαρών οξέων και έχουν συσχετιστεί με τοξικότητα και σε μελέτη δειγμάτων πλάσματος ασθενών με οξεία νεφρική βλάβη <sup>47</sup>. Στη συγκεκριμένη μελέτη εντοπίστηκαν αυξημένα επίπεδα προπιονυλοκαρνιτίνης στα δείγματα που έλαβαν αυξημένη δόση κολιστίνης σε σχέση με τα δείγματα που έλαβαν κανονική δόση.

Ακόμα, το 5-μεθυλοτετραϋδροφολικό οξύ (5-MTHF) είναι η πιο βιολογικά δραστική μορφή της βιταμίνης B, γνωστή ως φολικό οξύ. Το 5-MTHF λειτουργεί, σε συνεργασία με τη βιταμίνη B12, ως δότης ομάδας μεθυλίου, που εμπλέκεται στη μετατροπή του αμινοξέος ομοκυστεΐνη σε μεθειονίνη. Η δωρεά ομάδας μεθυλίου (CH<sub>3</sub>) είναι ζωτικής σημασίας για πολλές σωματικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένης της σύνθεσης σεροτονίνης, μελατονίνης και DNA. Θεραπευτικά, το 5-MTHF είναι καθοριστικό για τη μείωση των επιπέδων ομοκυστεΐνης, την πρόληψη των ελαττωμάτων του νευρικού σωλήνα και τη βελτίωση της αγγειακής ενδοθηλιακής λειτουργίας. Οπότε τα αυξημένα επίπεδα 5-MTHF που παρατηρούνται στα δείγματα της ομάδας B, υποδηλώνουν προσπάθεια του οργανισμού να μειώσει τα επίπεδα ομοκυστεΐνης και φανερώνουν τη χρησιμότητά του ως βιοδείκτη <sup>48</sup>.

Η τρυπτοφάνη είναι ένα απαραίτητο αμινοξύ για τον οργανισμό που δε μπορεί να συντεθεί από το σώμα και, ως αποτέλεσμα, ενσωματώνεται σε πρωτεΐνες ή διασπάται για παραγωγή ενέργειας και μεταβολικών ενδιάμεσων. Ο μεταβολισμός της τρυπτοφάνης σχετίζεται με τη γήρανση και παράγει μεταβολίτες που ελέγχουν φλεγμονές, ρυθμίζουν την ενεργειακή ομοιόσταση και επηρεάζουν τη συμπεριφορά. Η τυροσινάση είναι ένα ένζυμο που καταλύει το σχηματισμό L-Dopa από τυροσίνη. Το κυνoureνικό οξύ και το ξανθουρενικό οξύ είναι μεταβολίτες της τρυπτοφάνης και συγκεκριμένα το κυνoureνικό οξύ είναι ένας από τους λίγους γνωστούς ενδογενείς αναστολείς υποδοχέων αμινοξέων και έχει ένα ευρύ φάσμα ανταγωνιστικών ιδιοτήτων όταν υπάρχει σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του φυσιολογικού. Στη μελέτη, υπήρξε σημαντική αύξηση των επιπέδων θειικής ντοπαμίνης στην ομάδα B, που έλαβε υψηλή δόση κολιστίνης. Τα αυξημένα επίπεδα θειικής ντοπαμίνης στο πλάσμα ποντικών που παρατηρήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη, σε συνδυασμό με τα αυξημένα επίπεδα τρυπτοφάνης και κυνoureνικού οξέος στα ούρα των αρουραίων που έλαβαν μεθανοσουλφονική κολιστίνη, που εντοπίστηκε στη βιβλιογραφία <sup>42</sup>, υποδεικνύουν ότι η κολιστίνη προκάλεσε διαταραχές του το μονοπάτι του μεταβολισμού της τρυπτοφάνης.



Εικόνα 25: Αντίδραση μεταβολισμού τυροσίνης

## ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Η κολιστίνη είναι ένα πολυπεπτιδικό αντιβιοτικό, που αντιμετωπίζει αποτελεσματικά τις λοιμώξεις που προκαλούνται από πολυανθεκτικά Gram-αρνητικά βακτήρια, αλλά η κλινική του χρήση είναι περιορισμένη κυρίως λόγω νεφροτοξικότητας. Έτσι, εφαρμόστηκε μια μελέτη μη στοχευμένης μεταβολομικής ανάλυσης με υγροχρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας, για τη διερεύνηση της επίδρασης της δόσης κολιστίνης στο κυκλοφορικό σύστημα.. Για τη μελέτη μεταβολομικής, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα πλάσματος που ελήφθησαν από ποντίκια, που υποβλήθηκαν σε αγωγή με τοξική δόση κολιστίνης (ομάδα Β, 1,5 mg κολιστίνης/kg), που υποβλήθηκαν σε αγωγή με θεραπευτική δόση κολιστίνης (ομάδα Α, 1 mg/kg), καθώς και δείγματα ελέγχου. Αποφασίστηκε ότι έχει ενδιαφέρον η σύγκριση των δειγμάτων μεταξύ ομάδας Α και Β (κανονικής και υψηλής δόσης) για να διαπιστωθεί αν είναι εφικτό στην πράξη να εντοπιστούν σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις μεταβολιτών σε δείγματα που έχουν λάβει κολιστίνη σε θεραπευτική και υψηλή δόση αντίστοιχα.

Τα συμπεράσματα της μελέτης είναι ότι οι δύο ομάδες των μυών μπορούν να διαχωριστούν με βάση τα στατιστικά μας μοντέλα. Από τα στατιστικά μοντέλα έχουν προκύψει 51 χαρακτηριστικές μεταβλητές από τις οποίες ταυτοποιήθηκαν 26 πιθανοί μεταβολίτες. Ορισμένοι από αυτούς, έχουν ήδη συσχετιστεί στη βιβλιογραφία με τοξικότητα και συγκεκριμένα με οξεία νεφρική δυσλειτουργία.

Οι ταυτοποιημένοι βιοδείκτες αποκάλυψαν μια πιθανή εξήγηση του μηχανισμού που προκαλεί την νεφρική τοξικότητα της κολιστίνης, αλλά και την επίδραση.. Είναι σημαντική παρατήρηση πως αρκετοί από τους μεταβολίτες που προσδιορίστηκαν, στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί ως διαφοροποιημένοι σε δείγματα ούρων και όχι πλάσματος.

Οι κυριότεροι μηχανισμοί που φαίνεται να επηρεάζονται από τις αυξημένες συγκεντρώσεις κολιστίνης και οφείλονται για τη νεφροτοξικότητα που εμφανίζει ως ανεπιθύμητη ενέργεια είναι οι εξής:

- Αύξηση του οξειδωτικού στρες
- Αύξηση μεταβολισμού S-αδενοσυλομεθειονίνης (SAM) σε ομοκυστεΐνη
- Αύξηση μεταβολισμού τρυπτοφάνης
- Πιθανή επίδραση στο μεταβολισμό της γαλακτόζης
- Ελάττωση οξείδωσης λιπαρών οξέων

Επομένως, θεωρείται ότι η κολιστίνη επηρεάζει το μεταβολισμό σε διάφορες κατευθύνσεις, απορυθμίζοντας περισσότερες από μία βιολογικές οδούς και προκαλώντας τοπικά εκτιμώμενη βλάβη στη νεφρική λειτουργία.

## **ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ**

Η μεταβολομική προσφέρει μεγάλες δυνατότητες βελτίωσης της διάγνωσης ασθενειών, θεραπευτικής αγωγής και φροντίδας ασθενών. Την τελευταία δεκαετία, η μεταβολομική έχει ήδη αποδειχθεί χρήσιμη για τον χαρακτηρισμό αρκετών παθολογικών καταστάσεων και προσφέρει υποσχέσεις ως κλινικό εργαλείο. Στην εποχή της εξατομικευμένης ιατρικής, που χρησιμοποιούνται όλο και πιο συγκεκριμένες για τον ασθενή στοχευμένες θεραπείες, είναι επιτακτική η ανάγκη ανακάλυψης ολοένα και νέων, αξιόπιστων και ευαίσθητων βιοδεικτών για την παρακολούθηση ασθενειών και την ανάπτυξη θεραπειών κατά τη διάρκεια της νόσησης.

Ακόμα, η αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών καθιστά ιδιαίτερα δύσκολη της αντιμετώπιση ορισμένων ανθεκτικών βακτηρίων και για αυτό το λόγο είναι επιτακτική η ανάγκη αξιοποίησης γνωστών αντιβιοτικών, όπως η κολιστίνη, που κυρίως για λόγους εμφάνισης νεφροτοξικότητας δε χρησιμοποιείται ιδιαίτερα σήμερα στην κλινική πρακτική. Σε μελλοντικές μελέτες, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί στοχευμένη ανάλυση των μεταβολιτών που ανήκουν στα μονοπάτια που βρέθηκαν να έχουν διαταραχθεί, να εφαρμοστεί η ανάλυση σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων και να γίνει συσχέτιση των αποτελεσμάτων με αντίστοιχες μεταβολομικές μελέτες σε δείγματα ήπατος και ούρων.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Koyama Y, Kurosasa A, Tsuchiya A, Takakuta K. A new antibiotic “colistin” produced by spore-forming soil bacteria. *J Antibiot.* 1950;3(9):457-458.
2. Antachopoulos C, Iosifidis E. Colistin Use in Neonates and Children With Infections Due to Carbapenem-resistant Bacteria. *Pediatr Infect Dis J.* 2017;36(9):905-907. doi:10.1097/INF.0000000000001655
3. Polymyxin E (Colistin) | The Antimicrobial Index Knowledgebase - TOKU-E. KnowledgeBase.
4. Grégoire N, Aranzana-Climent V, Magréault S, Marchand S, Couet W. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Colistin. *Clin Pharmacokinet.* 2017;56(12):1441-1460. doi:10.1007/s40262-017-0561-1
5. Silpak Biswas; Jean-Michel Brunel; Jean-Christophe Dubus; Martine Reynaud-Gaubert; Jean-Marc Rolain. *Colistin: An Update on the Antibiotic of the 21st Century.*; 2012.
6. Spapen H, Jacobs R, Gorp V Van, Troubleyn J, Honoré PM. Renal and neurological side effects of colistin in critically ill patients. *Ann Intensive Care.* 2011;1(1):14. doi:10.1186/2110-5820-1-14
7. Bergen PJ, Bulman ZP, Landersdorfer CB, et al. Optimizing Polymyxin Combinations Against Resistant Gram-Negative Bacteria. *Infect Dis Ther.* 2015;4(4):391. doi:10.1007/S40121-015-0093-7
8. Falagas ME, Grammatikos AP, Michalopoulos A. Potential of old-generation antibiotics to address current need for new antibiotics. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2008;6(5):593-600. doi:10.1586/14787210.6.5.593
9. Heybeli C, Oktan MA, Çavdar Z. Rat models of colistin nephrotoxicity: previous experimental researches and future perspectives. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* April 2019. doi:10.1007/s10096-019-03546-7
10. Loho T, Dharmayanti A. Colistin: an antibiotic and its role in multiresistant Gram-negative infections. *Acta Med Indones.* 2015;47(2):157-168.
11. Falagas ME, Rafailidis PI, Ioannidou E, et al. Colistin therapy for microbiologically documented multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections: a retrospective cohort study of 258 patients. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35(2):194-199. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.10.005
12. DDT Glossary | FDA. <https://www.fda.gov/drugs/drug-development-tool-ddt-qualification-programs/ddt-glossary>. Accessed October 27, 2022.
13. Strimbu K, Tavel JA. What are Biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS.* 2010;5(6):463. doi:10.1097/COH.0B013E32833ED177
14. Biomarkers In Risk Assessment: Validity And Validation (EHC 222, 2001). <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm>. Accessed August 11, 2021.
15. Fiehn O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 2002 481. 2002;48(1):155-171. doi:10.1023/A:1013713905833
16. Γεωργακοπούλου Ιωάννα - Βιολόγος. «Μεταβολομική ανάλυση βιολογικών υγρών

- για την ανίχνευση βιοδεικτών, μέσω Φασματοσκοπίας NMR». 2018.  
[https://nemertes.lis.upatras.gr/jspui/bitstream/10889/11512/6/Nemertes\\_Georgakopoulou%28phar%29.pdf](https://nemertes.lis.upatras.gr/jspui/bitstream/10889/11512/6/Nemertes_Georgakopoulou%28phar%29.pdf). Accessed August 9, 2021.
17. Metabolomics Research Introduction, Applications, Sample Types and Handling. Center for Innovative Technology - a molecular omics resource.  
<https://www.vanderbilt.edu/cit/introduction-metabolomics-research/>. Accessed October 27, 2022.
  18. Zhang A, Sun H, Wang P, Han Y, Wang X. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *Analyst*. 2012;137(2):293-300. doi:10.1039/C1AN15605E
  19. Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc*. 2011;6(7):1060-1083. doi:10.1038/NPROT.2011.335
  20. Qing G, Yan J, He X, Li X, Liang X. Recent advances in hydrophilic interaction liquid interaction chromatography materials for glycopeptide enrichment and glycan separation. *TrAC Trends Anal Chem*. 2020;124:115570. doi:10.1016/J.TRAC.2019.06.020
  21. David G. Watson. *Pharmaceutical Analysis* 5th edition. 2020:394-395.
  22. Zhang A, Sun H, Yan G, Wang P, Wang X. Metabolomics for Biomarker Discovery: Moving to the Clinic. *Biomed Res Int*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/354671
  23. Ibáñez C, Simó C, Martín-Álvarez PJ, et al. Toward a Predictive Model of Alzheimer's Disease Progression Using Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry Metabolomics. *Anal Chem*. 2012;84(20):8532-8540. doi:10.1021/AC301243K
  24. Chen F, Xue J, Zhou L, Wu S, Chen Z. Identification of serum biomarkers of hepatocarcinoma through liquid chromatography/mass spectrometry-based metabolomic method. *Anal Bioanal Chem*. 2011;401(6):1899. doi:10.1007/S00216-011-5245-3
  25. Lin L, Huang Z, Gao Y, Yan X, Xing J, Hang W. LC-MS based serum metabolomic analysis for renal cell carcinoma diagnosis, staging, and biomarker discovery. *J Proteome Res*. 2011;10(3):1396-1405. doi:10.1021/PR101161U
  26. Xu J, Chen Y, Zhang R, et al. Global and Targeted Metabolomics of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Discovers Potential Diagnostic and Therapeutic Biomarkers\* □ *S. Mol Cell Proteomics*. 2013;12:1306-1318. doi:10.1074/mcp.M112.022830
  27. Pang Z, Wang G, Wang C, Zhang W, Liu J, Wang F. Serum Metabolomics Analysis of Asthma in Different Inflammatory Phenotypes: A Cross-Sectional Study in Northeast China. *Biomed Res Int*. 2018;2018. doi:10.1155/2018/2860521
  28. Vouk K, Hevir N, Ribić-Pucelj M, et al. Discovery of phosphatidylcholines and sphingomyelins as biomarkers for ovarian endometriosis. *Hum Reprod*. 2012;27(10):2955-2965. doi:10.1093/HUMREP/DES152
  29. Tan Y, Yin P, Tang L, et al. Metabolomics study of stepwise hepatocarcinogenesis from the model rats to patients: Potential biomarkers effective for small hepatocellular carcinoma diagnosis. *Mol Cell Proteomics*. 2012;11(2). doi:10.1074/MCP.M111.010694



30. Bradford BU, O'Connell TM, Han J, et al. Metabolomic profiling of a modified alcohol liquid diet model for liver injury in the mouse uncovers new markers of disease. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;232(2):236-243. doi:10.1016/J.TAAP.2008.06.022
31. Burté F, Houghton D, Lowes H, et al. metabolic profiling of Parkinson's disease and mild cognitive impairment. *Mov Disord.* 2017;32(6):927-932. doi:10.1002/MDS.26992
32. Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, Everett JR. Metabonomics: metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids: Concepts in Magnetic Resonance: an Educational Journal: Vol 12, No 5. *Concepts Magn Reson an Educ J.* 2000;12(5):289-320. [https://dl.acm.org/doi/10.1002/1099-0534\(2000\)12:5%253C289::AID-CMR3%253E3.0.CO;2-W](https://dl.acm.org/doi/10.1002/1099-0534(2000)12:5%253C289::AID-CMR3%253E3.0.CO;2-W). Accessed August 9, 2021.
33. Effect of Temperature on Enzymatic Reaction - Creative Enzymes. [https://www.creative-enzymes.com/resource/effect-of-temperature-on-enzymatic-reaction\\_50.html](https://www.creative-enzymes.com/resource/effect-of-temperature-on-enzymatic-reaction_50.html). Accessed November 4, 2022.
34. University of Birmingham and Birmingham Metabolomics Training Center. The application of quality control samples. Future Learn. <https://www.futurelearn.com/info/courses/metabolomics/0/steps/10703>. Accessed August 10, 2021.
35. Katajamaa M, Miettinen J, Oresic M. MZmine: toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. *Bioinformatics.* 2006;22(5):634-636. doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTK039
36. Luan H, Ji F, Chen Y, Cai Z. statTarget: A streamlined tool for signal drift correction and interpretations of quantitative mass spectrometry-based omics data. *Anal Chim Acta.* 2018;1036:66-72. doi:10.1016/J.ACA.2018.08.002
37. Petridis D. *Analysis of Multivariate Techniques.*; 2016. <https://repository.kallipos.gr/handle/11419/2126>. Accessed January 20, 2022.
38. Wold S, Sjöström M, Eriksson L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemom Intell Lab Syst.* 2001;58(2):109-130. doi:10.1016/S0169-7439(01)00155-1
39. Jones OAH. Illuminating the dark metabolome to advance the molecular characterisation of biological systems. *Metabolomics.* 2018;14(8). doi:10.1007/S11306-018-1396-Y
40. Duranton F, Cohen G, De Smet R, et al. Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(7):1258-1270. doi:10.1681/ASN.2011121175
41. Sucher R, Schroecksnadel K, Weiss G, Margreiter R, Fuchs D, Brandacher G. Neopterin, a prognostic marker in human malignancies. *Cancer Lett.* 2010;287(1):13-22. doi:10.1016/J.CANLET.2009.05.008
42. Jeong ES, Kim G, Moon KS, et al. Characterization of urinary metabolites as biomarkers of colistin-induced nephrotoxicity in rats by a liquid chromatography/mass spectrometry-based metabolomics approach. *Toxicol Lett.* 2016;248:52-60. doi:10.1016/J.TOXLET.2016.02.018
43. Wei W, Qi D, Zhao HZ, Lu ZX, Lv F, Bie X. Synthesis and characterisation of galactosyl glycerol by  $\beta$ -galactosidase catalysed reverse hydrolysis of galactose and glycerol. *Food Chem.* 2013;141(3):3085-3092. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2013.05.145

44. Wagner C, Koury MJ. S-Adenosylhomocysteine: a better indicator of vascular disease than homocysteine? *Am J Clin Nutr.* 2007;86(6):1581-1585. doi:10.1093/AJCN/86.5.1581
45. Kredich NM, Hershfield MS. S-adenosylhomocysteine toxicity in normal and adenosine kinase-deficient lymphoblasts of human origin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(5):2450-2454. doi:10.1073/PNAS.76.5.2450
46. Knuplez E, Marsche G. An Updated Review of Pro- and Anti-Inflammatory Properties of Plasma Lysophosphatidylcholines in the Vascular System. *Int J Mol Sci.* 2020;21(12):1-18. doi:10.3390/IJMS21124501
47. Sun J, Shannon M, Ando Y, et al. Serum metabolomic profiles from patients with acute kidney injury: A pilot study. *J Chromatogr B.* 2012;893-894:107-113. doi:10.1016/J.JCHROMB.2012.02.042
48. 5-Methyltetrahydrofolate. *Altern Med Rev.* 2006;11(4):330-337.