ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

<< Μελέτη του Μεταβολισμού των Πρώτων Ημερών Ζωής σε Νεογνά μέσω Φασματοσκοπίας NMR. >>

Ανδρικοπούλου Γ. Ανδριάνα

Προπτυχιακή Φοιτήτρια

Επιβλέπων Καθηγητής:

Γεώργιος Α. Σπυρούλιας

ΠΑΤΡΑ, 2026

UNIVERSITY OF PATRAS

SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

DEPARTMENT OF PHARMACY

DIPLOMA THESIS

<< Study of Metabolism During the First Days of Life in Neonates Using NMR Spectroscopy.>>

Andrikopoulou G. Andriana

Undergraduate Student

Supervisor:

Professor Georgios A. Spyroulias

PATRAS, 2026

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Γεώργιος Α. Σπυρούλιας

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Γεώργιος Α. Σπυρούλιας, Καθηγητής

Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Γεώργιος Πάϊρας, Καθηγητής

Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Φωτεινή Λάμαρη, Καθηγήτρια

Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μεταβολομική ορίζεται ως ο τομέας της επιστήμης που επικεντρώνεται στη μελέτη περίπλοκων μιγμάτων, μικρών μοριακών ενώσεων (μεταβολιτών) που υπάρχουν σε βιολογικά δείγματα. Μέσω της μελέτης των συγκεντρώσεων και των ροών των μεταβολιτών, εξάγονται συμπεράσματα αντίστοιχα για το μεταβολικό προφίλ, που σε σύγκριση με το γονιδίωμα ή το πρωτέωμα, είναι πιο κοντά στον βιολογικό φαινότυπο. Η ταχεία μέτρηση αρκετών εκατοντάδων έως χιλιάδων μεταβολιτών σε βιολογικά δείγματα, προσφέρει μια πολύτιμη οδό για την αποκάλυψη αλλοιωμένης βιοχημείας λόγω παραγόντων όπως η διατροφή, τα φάρμακα, η περιβαλλοντική έκθεση ή κάποια ασθένεια. Τα προφίλ των μεταβολιτών, αντικατοπτρίζουν το γενετικό προφίλ ενός ατόμου και τις περιβαλλοντικές εκθέσεις και ως εκ τούτου η μεταβολομική αντιπροσωπεύει μια σημαντική οδό για την εξατομικευμένη αξιολόγηση και θεραπεία του κινδύνου ασθενειών. Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) είναι η κύρια αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται στη μεταβολομική. Η τεχνική αυτή, προσφέρει εξαιρετική ευαισθησία, επαναληψιμότητα, είναι μη καταστρεπτική ενώ δεν χρειάζεται ιδιαίτερη προετοιμασία του δείγματος, δίνοντας έτσι πληροφορίες για την ακριβή περιγραφή του μεταβολικού προφίλ ενός οργανισμού.

Κατά την περίοδο που περιβάλει τον τοκετό, λαμβάνουν χώρα μεταβολικές προσαρμογές που διασφαλίζουν ότι τα υποστρώματα για την παραγωγή ενέργειας και την ανάπτυξη είναι διαθέσιμα στην άμεση μεταγεννητική περίοδο. Μετά την γέννηση, το νεογνό πρέπει να κάνει μια μετάβαση από την εξασφαλισμένη συνεχή διαπλακουντιακή παροχή γλυκόζης σε μια μεταβλητή οικονομία καυσίμου βασισμένη στο λίπος. Ένα φυσιολογικό υγιές βρέφος επιτυγχάνει αυτή την μετάβαση μέσω μιας σειράς καλά συντονισμένων μεταβολικών και ορμονικών προσαρμοστικών αλλαγών.

Σκοπός της παρούσας μελέτης τίθεται ο χαρακτηρισμός του μεταβολισμού νεογνών κατά τις πρώτες ημέρες ζωής τους, συγκεκριμένα κατά την πρώτη και τρίτη ημέρα ζωής, μέσω ανάλυσης NMR φασμάτων από δείγματα ούρων υγιών νεογνών. Τα δείγματα συλλέχθηκαν τα πρώτα εικοσιτετράωρα εξωμήτριας ζωής και αναλύθηκαν με την βοήθεια της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Μέσω της πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης που ακολούθησε, εντοπίζονται μεταβολές στα επίπεδα αρκετών μεταβολιτών που αντικατοπτρίζουν αντίστοιχες αλλαγές σε κύρια μεταβολικά μονοπάτια.

SUMMARY

Metabolomics is defined as the field of science that focuses on the study of complex mixtures of small molecular compounds (metabolites) present in biological samples. Through the study of metabolite concentrations and fluxes, conclusions are drawn about the metabolome, which, compared to the genome or proteome, is closer to the biological phenotype. The rapid measurement of several hundreds to thousands of metabolites in biological samples provides a valuable pathway for uncovering altered biochemistry due to factors such as diet, drugs, environmental exposure, or disease. Metabolite profiles reflect an individual's genetic profile and environmental exposures; therefore, metabolomics represents an important avenue for personalized risk assessment and treatment of diseases. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy is the main analytical technique used in metabolomics. This technique offers excellent sensitivity and reproducibility, is non-destructive, and requires minimal sample preparation, thus providing detailed information for the accurate characterization of an organism's metabolic profile.

During the perinatal period, metabolic adaptations occur to ensure that substrates for energy production and growth are available in the immediate postnatal period. After birth, the newborn must transition from a continuous placental supply of glucose to a variable, fat-based fuel economy. A healthy full-term infant achieves this transition through a series of well-coordinated metabolic and hormonal adaptive changes.

The aim of the present study is to characterize the metabolism of neonates during the first days of life, specifically on the first and third day, through the analysis of NMR spectra from urine samples of healthy newborns. The samples were collected during the first 24 hours of extrauterine life and analyzed using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. Through subsequent multivariate statistical analysis, changes in the levels of several metabolites are identified, reflecting corresponding alterations in major metabolic pathways.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 3
SUMMARY 4
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ 7
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ 8
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΟΙ ΟΡΟΙ 9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 11
1.1. Μεταβολισμός εμβρύων 11
1.1.1. Μεταβολικές και ορμονικές προσαρμογές από την εγκυμοσύνη στη νεογνική ζωή 11
1.1.2. Μεταβολική προσαρμογή του νεογνού: πηγές ενέργειας και εγκεφαλικές ανάγκες 13
1.1.3. Άμεσες μεταβολικές προσαρμογές μετά τη γέννηση 14
1.1.4. Τελειόμηνα νεογνά 15
1.1.5. Πρόωρα νεογνά και νεογνά διαβητικών μητέρων 16
1.2. Μεταβολομική 17
1.2.1. Εφαρμογές της Μεταβολομικής 18
1.2.2. Στάδια διεξαγωγής Μεταβολομικών μελετών 19
1.2.3. Αναλυτικές Τεχνικές 20
1.3. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) 22
1.3.1. Θεμελιώδεις αρχές 23
1.3.2. Χημική Μετατόπιση 25
1.3.3. Σταθερά σύζευξης (J-coupling) και πολλαπλότητα σημάτων 27
1.3.4. Φαινόμενο Nuclear Overhauser Effect (NOE) 28
1.3.5. Μονοδιάστατα και δισδιάστατα πειράματα NMR 28
1.3.6. Προεπεξεργασία φασματικών δεδομένων 30
1.3.7. Προεπεξεργασία αριθμητικών δεδομένων 32
1.4. Στατιστική Ανάλυση 33
1.4.1. Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών PCA (Principal Component Analysis) 34
1.4.2. Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων – Διακριτική Ανάλυση PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis) 36
1.4.3. Διασταυρούμενη επικύρωση CV (Cross-Validation) 37
2. ΣΚΟΠΟΣ 38

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ....39
3.1. Πληθυσμός Μελέτης....39
3.2. Συλλογή δειγμάτων....39
3.3. Προετοιμασία δειγμάτων για NMR ανάλυση....39
3.4. Καταγραφή και επεξεργασία NMR φασμάτων....40
3.5. Στατιστική ανάλυση....41
3.6. Pathway Analysis....42
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ....43
4.1. Ταυτοποίηση Μεταβολιτών....43
4.2. Πολυμεταβλητή Στατιστική Ανάλυση....47
4.3. Ανάλυση Μεταβολικών Μονοπατιών....52
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ....56
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ....60

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Ταυτοποιημένοι μεταβολίτες στα ^{1}H-NMR φάσματα δειγμάτων πλάσματος σε pH=7.4. s (singlet): μονή κορυφή, d (doublet): διπλή κορυφή, t (triplet): τριπλή κορυφή, q (quartet): τετραπλή κορυφή, dd (doublet of doublets): ζεύγος διπλών κορυφών, m (multiplet): πολλαπλή κορυφή. 45
Πίνακας 2. Οι παράμετροι της ακρίβειας, της ικανότητας προσαρμογής (R^2) και του παράγοντα πρόβλεψης (Q^2), κατόπιν διασταυρούμενης επικύρωσης, για τις 5 πρώτες κύριες συνιστώσες της PLS-DA. 51
Πίνακας 3. Τα μεταβολικά μονοπάτια που προέκυψαν από την Ανάλυση Εμπλουτισμού (Enrichment Analysis) και Ανάλυση Τοπολογίας Μονοπατιών (Pathway Topology Analysis) για τους στατιστικά σημαντικούς μεταβολίτες, σε αντιστοίχιση με τις παραμέτρους p-value και FDR. 55

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Αξιοποίηση θρεπτικών συστατικών από το αναπτυσσόμενο έμβρυο.....12
Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση των βασικών σταδίων της παρούσας μεταβολομικής μελέτης.....19
Εικόνα 3. Φασματόμετρο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) κατηγορίας 700 MHz.....21
Εικόνα 4. Ανίχνευση σύζευξης J και φαινομένου πυρηνικού Overhauser (NOE) σε μονοδιάστατα (1D) φάσματα NMR.....29
Εικόνα 5. Υπέρθεση όλων των 1D ^{1}H NOESY φασμάτων των δειγμάτων ούρων νεογνών στο πρόγραμμα ανάλυσης TopSpin.....43
Εικόνα 6. Κορυφές των σημαντικών μεταβολιτών της ανάλυσης σε 1D ^{1}H NOESY φάσμα ούρων στο πρόγραμμα TopSpin.....44
Εικόνα 7. Γραφική αναπαράσταση των Scree Plot ύστερα από PQN normalization των δειγμάτων.....47
Εικόνα 8. 2D διάγραμμα Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών, PCA σε δείγματα ούρων.....48
Εικόνα 9. 2D διάγραμμα Διαχωριστικής Ανάλυσης Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS DA).....49
Εικόνα 10. VIP scores της PLS-DA σε δείγματα ούρων.....50
Εικόνα 11. Γραφική απεικόνιση της ανάλυσης Cross Validation.....51
Εικόνα 12. Γράφημα μεταβολικών μονοπατιών που επηρεάζονται στα νεογνά, βάσει των στατιστικά σημαντικών μεταβολιτών που προέκυψαν από την πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση.....53
Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση του στατιστικά σημαντικού μεταβολικού μονοπατιού του μεταβολισμού γλυκίνης, σερίνης, θρεονίνης, όπως προέκυψε από την παρούσα μελέτη.....54

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΟΙ ΟΡΟΙ

NMR	Nuclear Magnetic Resonance
GLUT1, GLUT3	Glucose Transporter 1, Glucose Transporter 3
PEPCK	Phosphoenolpyruvate Carboxykinase
MS	Mass Spectrometry
GC-MS	Gas Chromatography–Mass Spectrometry
LC-MS	Liquid Chromatography–Mass Spectrometry
RF	Radiofrequency
FID	Free Induction Decay
ppm	Parts Per Million
DSS	4,4-Dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid
TSP	3-(Trimethylsilyl)propionic acid
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
ROESY	Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy
1D	One-Dimensional
2D	Two-Dimensional
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
COSY	Correlation Spectroscopy
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
FT	Fourier Transform
PCA	Principal Component Analysis

PLS-DA	Partial Least Squares Discriminant Analysis
PC	Principal Component
CV	Cross Validation
R^2	Συντελεστής Προσδιορισμού
Q^2	Δείκτης Προβλεπτικής Ικανότητας του Μοντέλου
SOPs	Πρότυπες Διαδικασίες Λειτουργίας
HMDB	Βάση Δεδομένων Ανθρώπινου Μεταβολομικού Προφίλ
BMRB	Τράπεζα Δεδομένων Βιολογικού Μαγνητικού Συντονισμού
PQN	Probabilistic Quotient Normalization
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
VIP	Variable Importance in Projection
FDR	False Discovery Rate
BHMT	Betaine–Homocysteine Methyltransferase
ROS	Αντιδραστικά Είδη Οξυγόνου

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

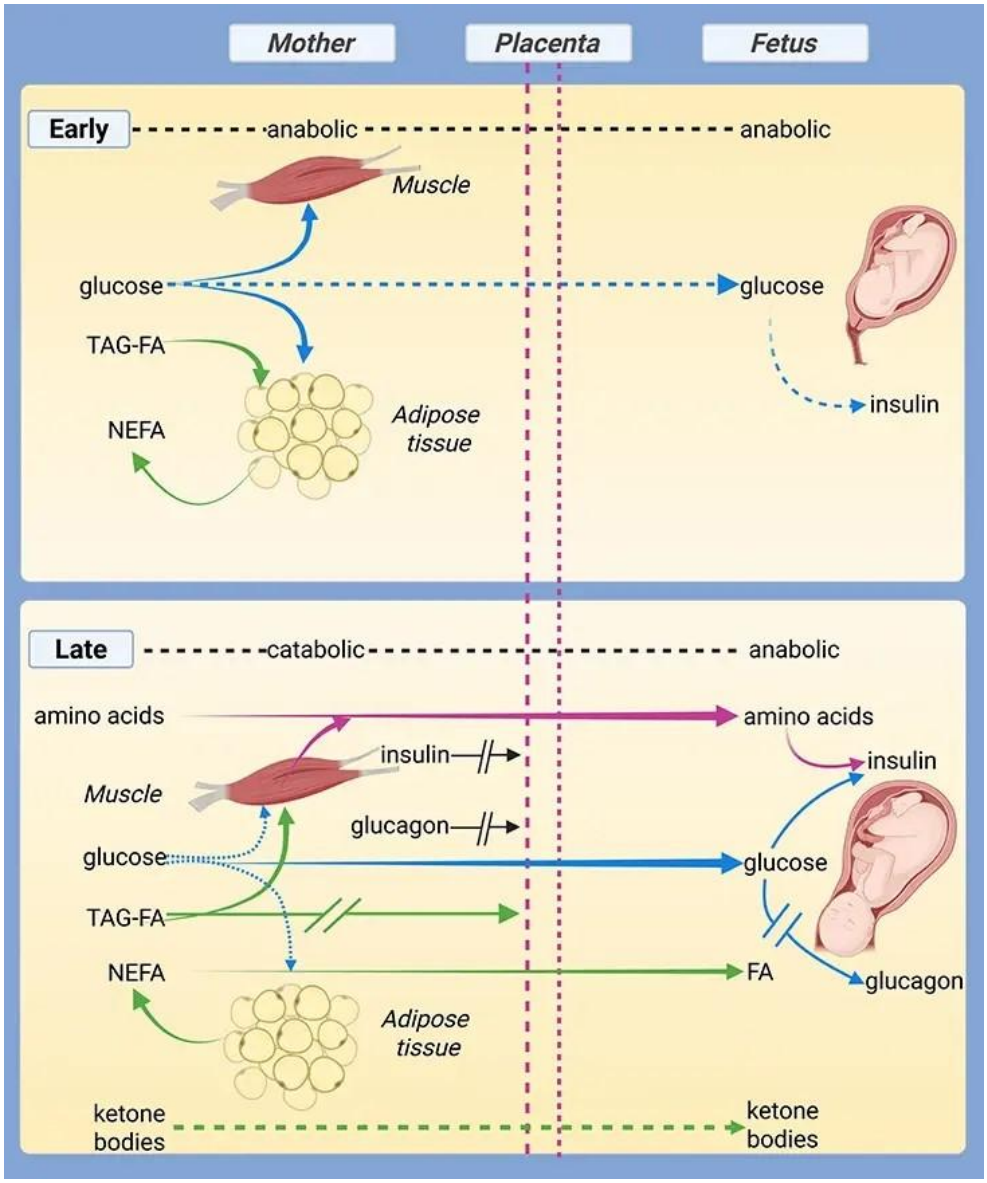
1.1. Μεταβολισμός εμβρύων

1.1.1. Μεταβολικές και ορμονικές προσαρμογές από την εγκυμοσύνη στη νεογνική ζωή

Η εγκυμοσύνη είναι μια δυναμική κατάσταση, με αυξημένες μεταβολικές απαιτήσεις. Μέσα σε λίγες εβδομάδες από τη σύλληψη, ένα νέο ενδοκρινικό όργανο, ο πλακούντας, έχει ήδη σχηματιστεί και εκκρίνει ορμόνες που επηρεάζουν τον μεταβολισμό όλων των θρεπτικών συστατικών. Αυτές οι προσαρμογές στον μεταβολισμό, εκτός από τις αλλαγές στην ανατομία και τη φυσιολογία της μητέρας, υποστηρίζουν την ανάπτυξη και την εξέλιξη του εμβρύου, υποστηρίζοντας παράλληλα την ομοιόσταση της μητέρας και προετοιμάζοντας το για τη γαλουχία.

Ανάλογα με το συγκεκριμένο θρεπτικό συστατικό, ο οργανισμός μπορεί να ενεργοποιεί διαφορετικούς μηχανισμούς προσαρμογής, όπως: (1) σχηματισμό νέων ιστών ή αποθήκευση στις μητρικές εφεδρείες, (2) μεταφορά και κατανομή του μεταξύ διαφόρων ιστών και (3) αύξηση της επαναχρησιμοποίησης ή της μεταβολικής δραστηριότητας. Για να υποστηριχθούν οι διεργασίες αυτές, ο τρόπος με τον οποίο αξιοποιούνται τα θρεπτικά συστατικά από τη διατροφή μπορεί να μεταβληθεί, είτε μέσω ενίσχυσης της απορρόφησης στο έντερο είτε μέσω περιορισμού των απωλειών από τους νεφρούς ή το γαστρεντερικό σύστημα.

Παρόλα αυτά, όπως παρουσιάζεται και στην **Εικόνα 1**, η γλυκόζη εξακολουθεί να αποτελεί τη βασική πηγή ενέργειας για το ανθρώπινο έμβρυο σε φυσιολογικές συνθήκες. Το ενδοκρινικό του περιβάλλον διαμορφώνεται σε σημαντικό βαθμό υπό την επίδραση της ινσουλίνης. Ήδη από την 8η εβδομάδα κύησης, το ήπαρ διαθέτει όλα τα απαραίτητα ένζυμα για τη σύνθεση γλυκογόνου, ενώ η αποθήκευσή του αρχίζει από τα πρώιμα στάδια της εγκυμοσύνης. Η συγκέντρωση του ηπατικού γλυκογόνου αυξάνεται σημαντικά, από περίπου 3,4 mg/g στις 8 εβδομάδες σε περίπου 50 mg/g προς το τέλος της κύησης (Platt & Deshpande, 2005). Πέρα από τη γλυκόζη, ενώσεις τριών ανθράκων, όπως το γαλακτικό, το πυροσταφυλικό και η αλανίνη, φαίνεται ότι λειτουργούν ως έμμεσες πρόδρομες ουσίες για τη σύνθεση εμβρυϊκού γλυκογόνου.



Εικόνα 1 Αξιοποίηση θρεπτικών συστατικών από το αναπτυσσόμενο έμβρυο. Αν και οι τρεις κατηγορίες θρεπτικών συστατικών-υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και λίπη-συμβάλλουν στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, η γλυκόζη θεωρείται η κύρια πηγή ενέργειας. Το πάχος των βελών αντιπροσωπεύει τη σχετική ροή, υποδεικνύοντας το μέγεθος και την σημασία της μεταφοράς θρεπτικών συστατικών και της μεταβολικής δραστηριότητας. Από όλα τα θρεπτικά συστατικά, η γλυκόζη τροφοδοτεί την ταχύτατη ανάπτυξη των μικροσκοπικών άκρων, των οργάνων και του εγκεφάλου που σχηματίζεται. Οι πρωτεΐνες χτίζουν την δύναμη και τα λίπη θωρακίζουν τον οργανισμό, αλλά η γλυκόζη αποτελεί το βασικό καύσιμο του μωρού, ρέοντας σταθερά για να καλύψει τις αυξανόμενες ενεργειακές ανάγκες (Rao et al., 2013).

Η διαδικασία με την οποία το νεογνό προσαρμόζεται επιτυχώς στην εξωμήτρια ζωή παρουσιάζει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά στη βιολογία του ανθρώπου. Ουσιαστικά, πρόκειται για μια ορμονική αντίδραση στο στρες, όπου η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη επιτελούν ρόλους αρκετά διαφορετικούς σε σύγκριση με τον ενήλικα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μεταβολικές διεργασίες όπως τη διάσπαση του ηπατικού γλυκογόνου, τη λιπόλυση, τη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων με παραγωγή κετονικών σωμάτων, καθώς και την πρωτεόλυση

που οδηγεί στη δημιουργία γαλακτικού και άλλων πρόδρομων ουσιών για γλυκονεογένεση. Παρότι τα απαραίτητα ένζυμα για τη γλυκονεογένεση αναπτύσσονται στο εμβρυϊκό ήπαρ ήδη κατά την κύηση, η ενδογενής παραγωγή γλυκόζης από το έμβρυο φαίνεται να παραμένει ανενεργή υπό φυσιολογικές συνθήκες κατά την ενδομήτρια ζωή (Kalhan et al., 1979).

Τα κετονικά σώματα και το γαλακτικό οξύ λειτουργούν ως εναλλακτικές πηγές ενέργειας, συμβάλλοντας στην εξοικονόμηση γλυκόζης και παίζοντας κρίσιμο ρόλο στην κάλυψη των ενεργειακών αναγκών του εγκεφάλου. Αφού εξασφαλιστεί επαρκής ενεργειακή υποστήριξη κατά την πρώιμη νεογνική φάση, το βρέφος καλείται να προσαρμοστεί στη σίτιση μέσω του εντέρου και στην αξιοποίηση των θρεπτικών συστατικών — από τα οποία πάνω από τα μισά είναι λίπη — ώστε να διατηρηθεί η συνεχής παροχή ενέργειας. Συνεπώς, η ομαλή μετάβαση στην εξωμήτρια ζωή περιλαμβάνει όχι μόνο μια άμεση καταβολική απόκριση, αλλά και την προσαρμογή στη νέα μορφή διατροφής (Platt & Deshpande, 2005).

1.1.2. Μεταβολική προσαρμογή του νεογνού: πηγές ενέργειας και εγκεφαλικές ανάγκες

Η εσωτερική παραγωγή γλυκόζης τις πρώτες ώρες μετά τη γέννηση υπολογίζεται περίπου στα 4–5 mg/kg/min, ενώ στα νεογνά της πρώτης ημέρας ζωής είναι δύο έως τρεις φορές υψηλότερη ανά μονάδα σωματικού βάρους σε σύγκριση με μεγαλύτερες ηλικίες. Παρατηρείται άμεση συσχέτιση μεταξύ της παραγωγής γλυκόζης και του εκτιμώμενου εγκεφαλικού βάρους, καθώς ο εγκέφαλος του νεογνού — που αντιστοιχεί περίπου στο 10–12% του συνολικού σωματικού βάρους — εμφανίζει ιδιαίτερα αυξημένες ανάγκες σε γλυκόζη.

Παρότι και άλλοι ιστοί μπορούν να αποθηκεύουν γλυκόζη κατά την περιγεννητική περίοδο, η κύρια πηγή της μέχρι να ξεκινήσει η σίτιση είναι το ήπαρ, μέσω της γλυκογονόλυσης και της γλυκονεογένεσης. Η είσοδος της γλυκόζης στον εγκέφαλο πραγματοποιείται με διευκολυνόμενη διάχυση μέσω ειδικών μεταφορέων, όπως οι GLUT1 και GLUT3, οι οποίοι υπάρχουν τόσο σε πρόωρα όσο και σε τελειόμηνα νεογνά.

Ωστόσο, η οξείδωση της γλυκόζης στο νηστικό νεογνό καλύπτει μόνο περίπου το 70% (Platt & Deshpande, 2005) των ενεργειακών αναγκών του εγκεφάλου, γεγονός που καθιστά απαραίτητη τη χρήση εναλλακτικών πηγών ενέργειας, όπως τα κετονικά σώματα και το γαλακτικό οξύ. Ο νεογνικός εγκέφαλος έχει αυξημένη ικανότητα να προσλαμβάνει και να αξιοποιεί κετονικά σώματα, σε ρυθμούς πολλαπλάσιους σε σχέση με τον εγκέφαλο μεγαλύτερων

παιδιών ή ενηλίκων. Μάλιστα, η παραγωγή και χρήση τους είναι ενεργές ακόμη και σε νεογνά που τρέφονται κανονικά, συμβάλλοντας σημαντικά στην ενεργειακή κάλυψη του εγκεφάλου, ιδιαίτερα μετά από σύντομη περίοδο νηστείας.

Το γαλακτικό οξύ αποτελεί επίσης σημαντικό καύσιμο κατά την άμεση νεογνική περίοδο. Μεταβολίζεται στον εγκέφαλο μέσω της δράσης της γαλακτικής αφυδρογονάσης, συμβάλλοντας στη μείωση της κατανάλωσης γλυκόζης. Αν και τα αποθέματά του είναι περιορισμένα, φαίνεται ότι παράγεται μέσω διεργασιών όπως η πρωτεόλυση, ενώ οι συγκεντρώσεις του είναι αυξημένες τις πρώτες 2–3 ώρες μετά τη γέννηση. Η παρουσία του πιθανώς εξηγεί γιατί τα νεογνά μπορούν να παραμένουν ασυμπτωματικά ακόμη και όταν εμφανίζουν παροδικά χαμηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα.

Στις πρώτες ώρες ζωής, οι ενεργειακές ανάγκες καλύπτονται κυρίως από τη γλυκόζη που προέρχεται από τη διάσπαση του γλυκογόνου και τη γλυκονεογένεση, ενώ το γαλακτικό συμβάλλει σε μικρότερο βαθμό. Μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα, αυξάνεται η αξιοποίηση των λιπών ως πηγής ενέργειας. Αυτή η μεταβολική μετάβαση αντανακλάται και στη μείωση του αναπνευστικού πηλίκου από τιμές 0,9–1,0 σε περίπου 0,7 (Platt & Deshpande, 2005).

1.1.3. Άμεσες μεταβολικές προσαρμογές μετά τη γέννηση

Κατά την άμεση περίοδο μετά τον τοκετό, παρατηρούνται ταχείες μεταβολές στον μεταβολισμό της γλυκόζης και στις ορμονικές συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα, κατά τη γέννηση τα επίπεδα γλυκόζης στο ομφάλιο φλεβικό αίμα αντιστοιχούν περίπου στο 80–90% αυτών της μητέρας. Στη συνέχεια, η γλυκόζη στο αίμα μειώνεται απότομα, φτάνοντας στο χαμηλότερο σημείο της περίπου μέσα στην πρώτη ώρα ζωής και κατόπιν αυξάνεται σταδιακά, ώστε να σταθεροποιηθεί γύρω στην τρίτη ώρα, ακόμη και χωρίς εξωτερική πρόσληψη τροφής.

Παράλληλα, παρατηρείται μείωση της ινσουλίνης στο πλάσμα και σημαντική αύξηση της γλυκαγόνης. Οι μεταβολές αυτές δεν φαίνεται να οφείλονται αποκλειστικά στα επίπεδα γλυκόζης, αλλά κυρίως στη στρεσογόνο επίδραση του τοκετού, η οποία συνοδεύεται από αυξημένη έκκριση κατεχολαμινών. Παρότι τα επίπεδα της αυξητικής ορμόνης επίσης αυξάνονται μετά τη γέννηση, δεν έχει αποδειχθεί ουσιαστικός ρόλος της στην άμεση μεταβολική προσαρμογή του νεογνού.

Το μοτίβο των μεταβολών στο μεταβολικό και ορμονικό περιβάλλον, κατά την μεταγεννητική περίοδο της ζωής του εμβρύου, διαφέρει ανάλογα με την κυητική ηλικία, τα χαρακτηριστικά της ενδομήτριας ανάπτυξης και τις πρακτικές σίτισης μετά τον τοκετό. Ωστόσο, τα δεδομένα για τις μεταβολικές αλλαγές και τα ενδιάμεσα μεταβολικά προϊόντα, για την μεταγενέστερη προσαρμογή του νεογνού, είναι ελλιπή σε σύγκριση με τις μεταβολές σε συγκεντρώσεις που εντοπίζονται στο αίμα αμέσως μετά την γέννηση. Η έρευνα και η ανάλυση δεσμεύεται από δεοντολογικά και βιοηθικά ζητήματα που προκύπτουν για τη συλλογή δειγμάτων από το ανθρώπινο νεογνό (Bowman et al., 2021).

1.1.4. Τελειόμηνα νεογνά

Σύμφωνα με μελέτες σε ανθρώπινα νεογνά και σε άλλα είδη θηλαστικών, κατά τα πρώτα 30–90 λεπτά μετά τη γέννηση παρατηρείται σημαντική πτώση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα, η οποία σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να προσεγγίσει ακόμη και μηδενικές τιμές. Στη συνέχεια, μέσω της ενεργοποίησης των μηχανισμών μεταβολικής προσαρμογής, τα επίπεδα της γλυκόζης αυξάνονται σταδιακά και σταθεροποιούνται εντός 12–24 ωρών μετά τη γέννηση, κυμαινόμενα μεταξύ 2,4 και 5 mmol/L, ακόμη και απουσία σίτισης. Ωστόσο, η μετέπειτα διατήρηση των επιπέδων γλυκόζης επηρεάζεται σε σημαντικό βαθμό από τις πρακτικές σίτισης που εφαρμόζονται κατά τις πρώτες ημέρες ζωής.

Κατά το αρχικό αυτό μεταβολικό στάδιο, η γλυκογονόλυση συμβάλλει μόνο κατά περίπου το ένα τρίτο στην ενδογενή παραγωγή γλυκόζης, ενώ έως και το 80% των ηπατικών αποθεμάτων γλυκογόνου καταναλώνεται μέσα στις πρώτες ώρες μετά τον τοκετό. Καθώς τα αποθέματα γλυκογόνου εξαντλούνται, η γλυκονεογένεση καθίσταται ο κύριος μηχανισμός διατήρησης της γλυκαιμικής ομοιόστασης, αναλαμβάνοντας την ενδογενή παραγωγή γλυκόζης.

Κατά την εμβρυϊκή ζωή, υπό φυσιολογικές συνθήκες, η γλυκονεογενετική ικανότητα είναι περιορισμένη, κυρίως λόγω της χαμηλής δραστικότητας της κυτοσολικής φωσφοενολοπυροσταφυλικής καρβοξυκινάσης (phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK), η οποία αποτελεί το ένζυμο που καθορίζει τον ρυθμό της γλυκονεογένεσης. Μετά τη γέννηση, παρατηρείται σημαντική αύξηση της δραστικότητας της PEPCK, γεγονός που σηματοδοτεί την ενεργοποίηση της γλυκονεογενετικής οδού. Η μεταβολική αυτή προσαρμογή ρυθμίζεται κυρίως από τη μείωση του λόγου ινσουλίνης προς γλυκαγόνη στο πλάσμα, η οποία ευνοεί τη σύνθεση γλυκόζης από μη υδατανθρακικά

υποστρώματα και συμβάλλει στη διατήρηση της γλυκαιμικής ομοιόστασης κατά τις πρώτες ώρες και ημέρες της ζωής.

Επιπλέον, τα τελειόμηνα νεογνά παρουσιάζουν υψηλότερες συγκεντρώσεις γλυκονεογενετικών προδρόμων, όπως η αλανίνη και το γαλακτικό οξύ, συγκριτικά με μεγαλύτερα παιδιά και ενήλικες. Η αυξημένη διαθεσιμότητα των υποστρωμάτων αυτών πιθανώς αντανακλά είτε τη σταδιακή μεταγεννητική ωρίμανση της δραστικότητας της PEPCK είτε την παροδική καταβολική κατάσταση που χαρακτηρίζει τη νεογνική περίοδο, κατά την οποία παρατηρείται αυξημένη κινητοποίηση ενεργειακών αποθεμάτων για την κάλυψη των μεταβολικών απαιτήσεων.

Κατά τις πρώτες ώρες μετά τη γέννηση, τα νεογνά εμφανίζουν χαμηλές συγκεντρώσεις κετονικών σωμάτων στο πλάσμα, γεγονός που αντανακλά την περιορισμένη ικανότητα ηπατικής κετογένεσης, παρά την επαρκή διαθεσιμότητα ελεύθερων λιπαρών οξέων. Ωστόσο, μετά τις πρώτες 12 ώρες ζωής, η κετογένεση ενεργοποιείται σημαντικά και κατά τη 2η και 3η ημέρα παρατηρείται αυξημένη παραγωγή κετονικών σωμάτων. Τα κετονικά σώματα αποτελούν σημαντική εναλλακτική πηγή ενέργειας για το νεογνό, συμβάλλοντας στην κάλυψη των ενεργειακών αναγκών και υποστηρίζοντας τη μεταβολική προσαρμογή κατά τη μετάβαση από την ενδομήτρια στην εξωμήτρια ζωή.

Η έναρξη της εντερικής σίτισης αποτελεί σημαντικό παράγοντα της μεταγεννητικής μεταβολικής προσαρμογής, καθώς επηρεάζει την ομοιόσταση της γλυκόζης και τον ενεργειακό μεταβολισμό. Τα θηλάζοντα νεογνά εμφανίζουν συνήθως χαμηλότερες συγκεντρώσεις γλυκόζης σε σύγκριση με εκείνα που σιτίζονται με γάλα φόρμουλας, αλλά παράλληλα παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα κετονικών σωμάτων, τα οποία λειτουργούν ως εναλλακτικό ενεργειακό υπόστρωμα. Η διαφοροποίηση αυτή αντανακλά τις φυσιολογικές μεταβολικές προσαρμογές που λαμβάνουν χώρα κατά τις πρώτες ημέρες ζωής.

1.1.5. Πρόωρα νεογνά και νεογνά διαβητικών μητέρων

Τα πρόωρα νεογνά παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο διαταραχών της γλυκαιμικής ομοιόστασης κατά τις πρώτες ημέρες ζωής, καθώς εμφανίζουν μεγαλύτερη πτώση των επιπέδων γλυκόζης μετά τη γέννηση σε σύγκριση με τα τελειόμηνα νεογνά. Η αυξημένη αυτή ευαλωτότητα αποδίδεται στα περιορισμένα αποθέματα γλυκογόνου, στην ανωριμότητα των μεταβολικών μηχανισμών και στη μειωμένη ικανότητα ενεργοποίησης της γλυκονεογένεσης. Επιπλέον, τα πρόωρα νεογνά εμφανίζουν περιορισμένη κετογένεση και μειωμένη παραγωγή κετονικών σωμάτων, γεγονός που υποδηλώνει ανεπαρκή

αξιοποίηση των λιπιδίων ως εναλλακτικής πηγής ενέργειας κατά τη διάρκεια της νηστείας. Η μεταβολική αυτή ανωριμότητα καθιστά τα πρόωρα περισσότερο ευάλωτα σε ενεργειακές διαταραχές κατά την πρώιμη νεογνική περίοδο. Η εφαρμογή της πρώιμης εντερικής σίτισης και, όπου απαιτείται, της ενδοφλέβιας χορήγησης γλυκόζης, συμβάλλει στη βελτίωση της μεταβολικής προσαρμογής και στη μείωση του κινδύνου υπογλυκαιμίας.

Τα νεογνά διαβητικών μητέρων αποτελούν ομάδα υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση υπογλυκαιμίας κατά τις πρώτες ώρες και ημέρες ζωής. Η αυξημένη αυτή ευαισθησία αποδίδεται κυρίως στον εμβρυϊκό υπερινσουλινισμό, ο οποίος αναπτύσσεται ως απάντηση στη χρόνια ενδομήτρια έκθεση σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης. Μετά τη γέννηση, η απότομη διακοπή της μητρικής παροχής γλυκόζης, σε συνδυασμό με τη διατήρηση υψηλών επιπέδων ινσουλίνης, οδηγεί σε αυξημένη κατανάλωση γλυκόζης και αυξημένο κίνδυνο υπογλυκαιμίας. Επιπλέον, στα νεογνά αυτά έχουν περιγραφεί διαταραχές στους μηχανισμούς αντιρρύθμισης της γλυκόζης και στην ηπατική παραγωγή γλυκόζης, οι οποίες ενδέχεται να επιτείνουν τη μεταβολική τους ευαλωτότητα. Η καλή γλυκαιμική ρύθμιση της μητέρας κατά την κύηση και τον τοκετό αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης νεογνικής υπογλυκαιμίας (Platt & Deshpande, 2005).

1.2. Μεταβολομική

Η μεταβολομική αποτελεί έναν από τους βασικούς κλάδους των τεχνολογιών «omics» και εστιάζει στη συνολική ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των μεταβολιτών μικρού μοριακού βάρους που βρίσκονται σε βιολογικά δείγματα, όπως το αίμα, τα ούρα και οι ιστοί (φυτικά και κυτταρικά εκχυλίσματα). Οι τέσσερις βασικές «omics» επιστήμες περιλαμβάνουν την Γονιδιωματική (Genomics), την Μεταγραφωμική (Transcriptomics), την Πρωτεωμική (Proteomics) και την Μεταβολομική (Metabolomics). Οι μεταβολίτες αποτελούν τα τελικά ή ενδιάμεσα προϊόντα των κυτταρικών μεταβολικών διεργασιών και αντικατοπτρίζουν τη λειτουργική κατάσταση ενός οργανισμού σε δεδομένη χρονική στιγμή, επηρεαζόμενοι τόσο από γενετικούς όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Η μεταβολομική παρέχει μια ολοκληρωμένη εικόνα του μεταβολικού φαινοτύπου και επιτρέπει την αναγνώριση μεταβολικών μεταβολών που σχετίζονται με φυσιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις. Για τον λόγο αυτό, αποτελεί πολύτιμο εργαλείο στη σύγχρονη βιοϊατρική έρευνα, συμβάλλοντας στην ανακάλυψη βιοδεικτών, στην κατανόηση των υποκείμενων βιοχημικών

μηχανισμών και στην αξιολόγηση της απόκρισης σε θεραπευτικές παρεμβάσεις (Dona et al., 2016).

1.2.1. Εφαρμογές της Μεταβολομικής

Η μεταβολομική έχει ευρεία εφαρμογή στη βιοϊατρική έρευνα, καθώς επιτρέπει τη συνολική αξιολόγηση των μεταβολικών αλλαγών που συνοδεύουν φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Έχει αξιοποιηθεί σε μελέτες που αφορούν τον άνθρωπο, τα πειραματόζωα και άλλους βιολογικούς οργανισμούς, συμβάλλοντας στην κατανόηση των βιοχημικών μηχανισμών που διέπουν τη λειτουργία των ζωντανών συστημάτων. Δεδομένου ότι οι μεταβολίτες αποτελούν τα τελικά προϊόντα των κυτταρικών διεργασιών και αντανακλούν άμεσα τη λειτουργική κατάσταση των κυττάρων και των ιστών, οι μεταβολικές διαταραχές που συνοδεύουν μια νόσο μπορούν να ανιχνευθούν μέσω της ανάλυσης του μεταβολομικού προφίλ.

Η προσέγγιση αυτή έχει συμβάλει σημαντικά στην αναγνώριση νέων βιοδεικτών για τη διάγνωση, την πρόγνωση και την παρακολούθηση της εξέλιξης διαφόρων νοσημάτων, όπως τα καρδιαγγειακά, τα νεφρικά και τα μεταβολικά νοσήματα, καθώς και ο καρκίνος (Nagana Gowda et al., 2025). Παράλληλα, η μεταβολομική συμβάλλει στην κατανόηση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών που διέπουν την εμφάνιση και εξέλιξη των ασθενειών, μέσω της διερεύνησης των μεταβολικών οδών που διαταράσσονται.

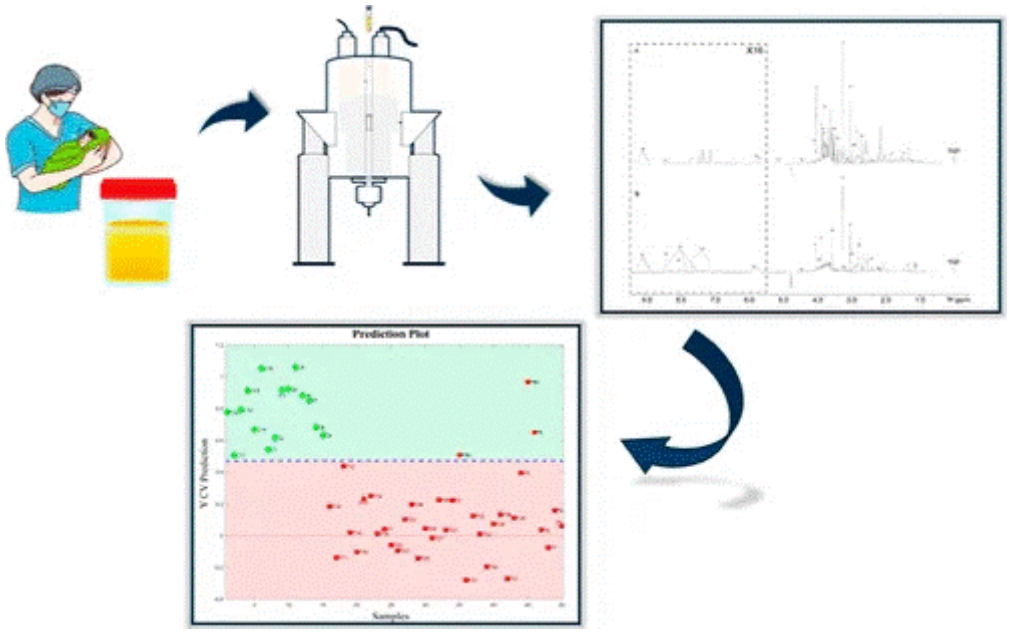
Επιπλέον, εφαρμόζεται ευρέως στη φαρμακευτική έρευνα, συμβάλλοντας στη μελέτη του μεταβολισμού και της τοξικότητας φαρμάκων, καθώς και στην αξιολόγηση της θεραπευτικής απόκρισης. Παράλληλα, επιτρέπει τη διερεύνηση της επίδρασης παραγόντων όπως η ηλικία, η διατροφή, ο τρόπος ζωής και το περιβάλλον στο μεταβολικό προφίλ ενός οργανισμού, παρέχοντας μια ολοκληρωμένη εικόνα της αλληλεπίδρασης μεταξύ γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Οι δυνατότητες αυτές καθιστούν τη μεταβολομική βασικό εργαλείο της σύγχρονης ιατρικής ακριβείας, υποστηρίζοντας την ανάπτυξη εξατομικευμένων προσεγγίσεων πρόληψης, διάγνωσης και θεραπείας.

Στη νεογνική περίοδο, η μεταβολομική έχει αναδειχθεί ως ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της μεταβολικής προσαρμογής κατά τις πρώτες ημέρες ζωής. Η ανάλυση του μεταβολομικού προφίλ επιτρέπει την αναγνώριση μεταβολικών μεταβολών που σχετίζονται με τη μετάβαση από την ενδομήτρια στην εξωμήτρια ζωή, καθώς και την ανίχνευση βιοδεικτών που ενδέχεται να

σχετίζονται με την ωρίμανση του νεογνού ή με νεογνικές παθολογικές καταστάσεις (Yang et al., 2019).

1.2.2. Στάδια διεξαγωγής Μεταβολομικών μελετών

Η διεξαγωγή μιας μεταβολομικής μελέτης προϋποθέτει προσεκτικό πειραματικό σχεδιασμό, ο οποίος καθορίζεται από το ερευνητικό ερώτημα και τους στόχους της μελέτης. Κατά το στάδιο αυτό επιλέγεται η κατάλληλη στρατηγική ανάλυσης, η οποία μπορεί να είναι είτε στοχευμένη (targeted) είτε μη στοχευμένη (untargeted). Η στοχευμένη προσέγγιση επικεντρώνεται στην ποσοτική ανάλυση προκαθορισμένων μεταβολιτών ή μεταβολικών οδών, ενώ η μη στοχευμένη αποσκοπεί στη συνολική διερεύνηση του μεταβολικού προφίλ και στην αναγνώριση όσο το δυνατόν περισσότερων μεταβολιτών.



Εικόνα 2 Σχηματική απεικόνιση των βασικών σταδίων της παρούσας μεταβολομικής μελέτης. Το πρωταρχικό βήμα είναι η δειγματοληψία ούρων από νεογνά τα πρώτα εικοσιτετράωρα εξωμήτριας ζωής. Ακολουθεί η κατάλληλη επεξεργασία και ανάλυση των δειγμάτων αυτών, μέσω φασματοσκοπίας NMR. Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών των νεογνών πραγματοποιείται με την βοήθεια κατάλληλων λογισμικών και τέλος, η στατιστική ανάλυση παρέχει τις απαραίτητες πληροφορίες για την κατανόηση τους (Spadavecchia et al., 2025).

Πρωταρχικό βήμα για μια μεταβολομική μελέτη είναι η συλλογή και η κατάλληλη διαχείριση των βιολογικών δειγμάτων σύμφωνα με τυποποιημένα πρωτόκολλα (Standard Operation Procedures, SOPs), ώστε να περιορίζεται η προ αναλυτική μεταβλητότητα και να διασφαλίζεται η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Τα δείγματα μπορεί να περιλαμβάνουν βιολογικά υγρά, ιστούς, κυτταρικά εκχυλίσματα ή άλλα βιολογικά υλικά, ανάλογα με το αντικείμενο της μελέτης.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται η αναλυτική μέτρηση των δειγμάτων μέσω κατάλληλων τεχνολογικών πλατφορμών, με σκοπό την καταγραφή του μεταβολικού τους προφίλ. Τα αριθμητικά δεδομένα που προκύπτουν υποβάλλονται σε διαδικασίες προ επεξεργασίας και κανονικοποίησης, ώστε να περιορίζονται οι τεχνικές πηγές μεταβλητότητας και να καθίστανται κατάλληλα για στατιστική ανάλυση.

Τέλος, εφαρμόζονται στατιστικές και βιοπληροφορικές μέθοδοι για την αναγνώριση μεταβολιτών ή μεταβολικών προτύπων που διαφοροποιούν τις υπό μελέτη ομάδες. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται μέσω της συσχέτισης των μεταβολιτών με συγκεκριμένες μεταβολικές οδούς, παρέχοντας πληροφορίες για τους βιολογικούς μηχανισμούς που διέπουν το υπό μελέτη φαινόμενο (Spadavecchia et al., 2025).

1.2.3. Αναλυτικές Τεχνικές

Η μεταβολομική στοχεύει στην ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση ενός μεγάλου αριθμού μικρών μορίων που συνθέτουν το μεταβολίωμα. Η ιδιαίτερα μεγάλη χημική ποικιλομορφία των μεταβολιτών, οι σημαντικές διαφορές στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και το ευρύ φάσμα συγκεντρώσεών τους στα βιολογικά δείγματα καθιστούν ιδιαίτερα απαιτητική την αναλυτική τους διερεύνηση. Επιπλέον, μικρές μεταβολές στη χημική δομή ενός μεταβολίτη μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά τη βιολογική του λειτουργία, γεγονός που καθιστά απαραίτητη τη χρήση αναλυτικών τεχνικών υψηλής ευαισθησίας, ακρίβειας και επαναληψιμότητας.

Οι δύο κυριότερες αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται στις μεταβολομικές μελέτες είναι η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) και η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS). Οι δύο τεχνικές θεωρούνται συμπληρωματικές, καθώς καθεμία παρουσιάζει διαφορετικά πλεονεκτήματα και περιορισμούς, ενώ σε

πολλές μελέτες χρησιμοποιούνται συνδυαστικά για την όσο το δυνατόν πληρέστερη αποτύπωση του μεταβολικού προφίλ.

Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Η φασματοσκοπία NMR αποτελεί μία από τις πλέον καθιερωμένες τεχνικές στη μεταβολομική, καθώς επιτρέπει την ταυτόχρονη ποιοτική και ποσοτική ανάλυση μεταβολιτών χωρίς να προκαλεί καταστροφή του δείγματος. Η τεχνική βασίζεται στις μαγνητικές ιδιότητες συγκεκριμένων ατομικών πυρήνων, κυρίως του υδρογόνου (^{1}H), παρέχοντας πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τη χημική δομή και τη συγκέντρωση των μεταβολιτών.

Η φασματοσκοπία NMR χαρακτηρίζεται από υψηλή αναπαραγωγιμότητα, ελάχιστες απαιτήσεις προετοιμασίας του δείγματος και δυνατότητα επαναλαμβανόμενων μετρήσεων στο ίδιο δείγμα. Επιπλέον, προσφέρει αξιόπιστη ποσοτικοποίηση και διευκολύνει την ταυτοποίηση άγνωστων μεταβολιτών. Ωστόσο, το βασικό της μειονέκτημα είναι η σχετικά χαμηλή ευαισθησία συγκριτικά με τη φασματομετρία μάζας, γεγονός που περιορίζει την ανίχνευση μεταβολιτών που βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις.

Εικόνα 3 Φασματόμετρο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) κατηγορίας 700 MHz. Το όργανο αποτελούμενο από τον υπεραγώγιμο μαγνήτη, την ηλεκτρονική κονσόλα και την κονσόλα χρήστη. Το δείγμα εισάγεται στον μαγνήτη μέσω πνευματικού συστήματος, ενώ ο κρυο-ανιχνευτής (cryoprobe) λειτουργεί σε χαμηλές θερμοκρασίες για τη βελτίωση της ευαισθησίας των μετρήσεων.

Φασματομετρία Μάζας (MS)

Η φασματομετρία μάζας αποτελεί σήμερα την πλέον διαδεδομένη αναλυτική τεχνική στη μεταβολομική, κυρίως λόγω της εξαιρετικά υψηλής ευαισθησίας και της δυνατότητας ανίχνευσης εκατοντάδων έως και χιλιάδων μεταβολιτών σε ένα μόνο δείγμα. Η τεχνική βασίζεται στον προσδιορισμό του λόγου μάζας προς φορτίο (m/z) των ιονισμένων μορίων, επιτρέποντας την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση μεγάλου αριθμού μεταβολιτών.

Στις περισσότερες εφαρμογές, η φασματομετρία μάζας συνδυάζεται με τεχνικές χρωματογραφικού διαχωρισμού, όπως η υγρή χρωματογραφία (LC-MS) και η αέρια χρωματογραφία (GC-MS), οι οποίες βελτιώνουν σημαντικά την ικανότητα διαχωρισμού πολύπλοκων βιολογικών δειγμάτων και αυξάνουν την αξιοπιστία της ανάλυσης. Η υψηλή ευαισθησία της MS επιτρέπει την ανίχνευση μεταβολιτών ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Ωστόσο, απαιτεί συνήθως πιο εκτεταμένη προετοιμασία του δείγματος σε σχέση με τη NMR και είναι καταστροφική μέθοδος, γεγονός που δεν επιτρέπει την επαναχρησιμοποίηση του δείγματος μετά την ανάλυση.

Συνολικά, η επιλογή της κατάλληλης αναλυτικής τεχνικής εξαρτάται από το ερευνητικό ερώτημα, το είδος του βιολογικού δείγματος και τους μεταβολίτες που πρόκειται να διερευνηθούν. Στη σύγχρονη μεταβολομική, η συνδυαστική αξιοποίηση της NMR και της MS αποτελεί τη βέλτιστη στρατηγική, καθώς επιτρέπει την ολοκληρωμένη και συμπληρωματική διερεύνηση του μεταβολώματος και αυξάνει την αξιοπιστία της ταυτοποίησης των μεταβολικών μεταβολών (Nagana Gowda et al., 2025).

1.3. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Η φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) αποτελεί μία από τις σημαντικότερες αναλυτικές τεχνικές στη μεταβολομική, καθώς παρέχει αξιόπιστες ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες για το μεταβολικό προφίλ πολύπλοκων βιολογικών δειγμάτων. Χάρη στον μη καταστροφικό χαρακτήρα της, την υψηλή επαναληψιμότητα των μετρήσεων και τις περιορισμένες απαιτήσεις προετοιμασίας των δειγμάτων, χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάλυση βιολογικών υγρών, ιστικών εκχυλισμάτων και κυτταρικών δειγμάτων.

Η εφαρμογή της στη μεταβολομική έχει συμβάλει καθοριστικά στην ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση μεταβολιτών, στην αναγνώριση μεταβολικών βιοδεικτών και στη διερεύνηση των βιοχημικών μηχανισμών που σχετίζονται με φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Παρά το γεγονός ότι η ευαισθησία της είναι μικρότερη σε σύγκριση με τη φασματομετρία μάζας (MS), η NMR προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως η υψηλή αναπαραγωγιμότητα, η δυνατότητα απόλυτης ποσοτικοποίησης και η διατήρηση της ακεραιότητας του δείγματος, γεγονός που την καθιστά αναπόσπαστο εργαλείο της σύγχρονης μεταβολομικής.

Στις επόμενες ενότητες παρουσιάζονται οι βασικές αρχές λειτουργίας της φασματοσκοπίας NMR, τα κύρια χαρακτηριστικά της τεχνικής, καθώς και οι εφαρμογές της στη μεταβολομική ανάλυση (Marion, 2013).

1.3.1. Θεμελιώδεις αρχές

Η φασματοσκοπία NMR αποτελεί μια τεχνική φασματοσκοπίας απορρόφησης που βασίζεται στις μαγνητικές ιδιότητες συγκεκριμένων ατομικών πυρήνων. Όταν οι πυρήνες αυτοί τοποθετηθούν σε ισχυρό και ομογενές εξωτερικό μαγνητικό πεδίο και διεγερθούν με ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία ραδιοσυχνοτήτων (radiofrequency, RF), απορροφούν ενέργεια και μεταβαίνουν μεταξύ διαφορετικών ενεργειακών καταστάσεων. Κατά την επάνοδό τους στην θερμοδυναμική κατάσταση ισορροπίας εκπέμπουν χαρακτηριστικά ηλεκτρομαγνητικά σήματα, τα οποία ανιχνεύονται και αποτελούν τη βάση για την καταγραφή του φάσματος NMR.

Η δυνατότητα ανίχνευσης ενός πυρήνα με τη μέθοδο NMR εξαρτάται από την ύπαρξη μη μηδενικής ιδιοστροφορμής (spin, $\vec{I}$). Οι πυρήνες που διαθέτουν μη μηδενικό spin εμφανίζουν πυρηνική μαγνητική ροπή (μ) και συμπεριφέρονται ως μικροσκοπικά μαγνητικά δίπολα όταν βρεθούν σε εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Η πυρηνική μαγνητική ροπή είναι ανάλογη της στροφορμής του πυρήνα και περιγράφεται από τη σχέση:

$$\mu=\gamma \vec{\mathbf{p}}$$

όπου γ είναι ο γυρομαγνητικός λόγος, χαρακτηριστική σταθερά για κάθε είδος πυρήνα και p η πυρηνική στροφορμή.

Για τον λόγο αυτό, μόνο ορισμένα ισότοπα είναι κατάλληλα για μελέτη με φασματοσκοπία NMR. Οι πυρήνες που χρησιμοποιούνται συχνότερα είναι οι ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N και ^{31}P, ενώ ισότοπα όπως τα ^{12}C και ^{16}O έχουν ιδιοστροφορμή $\vec{I}$ = 0 και

συνεπώς δεν εμφανίζουν σήμα και δεν είναι ανιχνεύσιμα με τη συγκεκριμένη τεχνική.

Όταν ένας πυρήνας με μη μηδενικό spin τοποθετείται σε εξωτερικό μαγνητικό πεδίο B_0, η προηγουμένως εκφυλισμένη ενεργειακή του κατάσταση διαχωρίζεται σε διακριτές ενεργειακές στάθμες (φαινόμενο Zeeman). Για τους πυρήνες με $\vec{I}$ = 1/2, όπως το ^{1}H, υπάρχουν δύο δυνατές καταστάσεις προσανατολισμού: η παράλληλη προς το μαγνητικό πεδίο, η οποία αντιστοιχεί στη χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη, και η αντιπαράλληλη, η οποία αντιστοιχεί στην υψηλότερη ενεργειακή στάθμη. Η ενεργειακή διαφορά μεταξύ των δύο καταστάσεων δίνεται από τη σχέση:

$$\Delta E = \frac{\gamma h B_0}{2\pi}$$

όπου:

- γ ο γυρομαγνητικός λόγος,
- h η σταθερά Planck,
- B_0 η ένταση του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου.

Η διαφορά αυτή είναι σχετικά μικρή, ωστόσο αυξάνεται όσο αυξάνεται η ένταση του μαγνητικού πεδίου, γεγονός που εξηγεί γιατί τα σύγχρονα φασματόμετρα NMR χρησιμοποιούν υπεραγώγιμους μαγνήτες πολύ υψηλής ισχύος.

Η ύπαρξη εξωτερικού μαγνητικού πεδίου δεν οδηγεί μόνο στον διαχωρισμό των ενεργειακών σταθμών, αλλά και στην εμφάνιση μεταπτωτικής κίνησης της μαγνητικής ροπής γύρω από τον άξονα του πεδίου B_0. Οι πυρήνες δεν παραμένουν ακίνητοι μέσα στο μαγνητικό πεδίο, αλλά εκτελούν μεταπτωτική κίνηση (precession) γύρω από τον άξονα του πεδίου B_0. Η γωνιακή ταχύτητα της κίνησης αυτής ονομάζεται συχνότητα Larmor και περιγράφεται από τη σχέση:

$$\omega_0 = \gamma B_0$$

ή ισοδύναμα,

$$\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$$

όπου:

- $\boldsymbol{\omega_0}$ είναι η γωνιακή συχνότητα (rad s^{-1}),
- $\boldsymbol{\nu_0}$ η συχνότητα συντονισμού (Hz).

Κάθε πυρήνας διαθέτει διαφορετικό γυρομαγνητικό λόγο και, κατά συνέπεια, διαφορετική συχνότητα Larmor. Για τον λόγο αυτό οι πυρήνες ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N και ^{31}P συντονίζονται σε διαφορετικές συχνότητες ακόμη και όταν βρίσκονται στο ίδιο μαγνητικό πεδίο.

Η εφαρμογή παλμού ραδιοσυχνοτήτων κατάλληλης συχνότητας προκαλεί την απορρόφηση ενέργειας από τους πυρήνες και τη μετάβασή τους στην υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση. Μετά τη λήξη του παλμού, οι πυρήνες επανέρχονται σταδιακά στη θερμοδυναμική κατάσταση ισορροπίας, εκπέμποντας ηλεκτρομαγνητικό σήμα. Το σήμα αυτό καταγράφεται ως σήμα ελεύθερης επαγόμενης απόσβεσης (Free Induction Decay, FID), το οποίο αποτελεί συνάρτηση του χρόνου. Στη συνέχεια, με την εφαρμογή του μετασχηματισμού Fourier, το FID μετατρέπεται σε φάσμα συχνοτήτων, από το οποίο προκύπτουν οι χαρακτηριστικές κορυφές των εξεταζόμενων πυρήνων. Η θέση των κορυφών στο φάσμα εξαρτάται από το τοπικό ηλεκτρονιακό περιβάλλον κάθε πυρήνα και εκφράζεται μέσω της χημικής μετατόπισης (chemical shift), η οποία αποτελεί μία από τις σημαντικότερες φασματικές παραμέτρους για την ερμηνεία των φασμάτων NMR, καθώς παρέχει πληροφορίες για το χημικό περιβάλλον των πυρήνων και αποτελεί τη βάση για την ταυτοποίηση των ενώσεων (Marion, 2013).

1.3.2. Χημική Μετατόπιση

Η χημική μετατόπιση (chemical shift, δ) αποτελεί μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους της φασματοσκοπίας NMR, καθώς αντανακλά το τοπικό ηλεκτρονιακό περιβάλλον κάθε πυρήνα και επιτρέπει την ταυτοποίηση και τον δομικό χαρακτηρισμό των χημικών ενώσεων. Αν και κάθε είδος πυρήνα χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένη συχνότητα Larmor, η πραγματική συχνότητα συντονισμού επηρεάζεται από την ηλεκτρονιακή πυκνότητα που περιβάλλει τον πυρήνα.

Η κίνηση των ηλεκτρονίων γύρω από τον πυρήνα δημιουργεί μικρά τοπικά μαγνητικά πεδία, τα οποία αντιτίθενται στο εφαρμοζόμενο εξωτερικό μαγνητικό πεδίο (B_0). Ως αποτέλεσμα, το πραγματικό μαγνητικό πεδίο που «αισθάνεται» ο πυρήνας διαφέρει ελαφρώς από το εφαρμοζόμενο πεδίο. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως διαμαγνητική θωράκιση (shielding**)** και οδηγεί σε μικρές μεταβολές της συχνότητας συντονισμού των πυρήνων.

Πυρήνες που περιβάλλονται από υψηλή ηλεκτρονιακή πυκνότητα είναι περισσότερο θωρακισμένοι (shielded), με αποτέλεσμα να συντονίζονται σε χαμηλότερες τιμές χημικής μετατόπισης (upfield). Αντίθετα, όταν η

ηλεκτρονιακή πυκνότητα μειώνεται λόγω της παρουσίας ηλεκτραρνητικών ατόμων, ακόρεστων δεσμών ή άλλων αποθωρακιστικών ομάδων, οι πυρήνες γίνονται αποθωρακισμένοι (deshielded) και εμφανίζονται σε υψηλότερες τιμές χημικής μετατόπισης (downfield). Επομένως, ακόμη και πυρήνες του ίδιου ισοτόπου μπορούν να συντονίζονται σε διαφορετικές συχνότητες, ανάλογα με το χημικό τους περιβάλλον.

Η χημική μετατόπιση εκφράζεται σε ppm (parts per million, μέρη ανά εκατομμύριο), γεγονός που επιτρέπει τη σύγκριση φασμάτων που έχουν ληφθεί σε φασματόμετρα διαφορετικής ισχύος. Ορίζεται από τη σχέση:

$$\delta = \frac{\nu_{signal} - \nu_{reference}}{\nu_{reference}} \times 10^6 \text{ (ppm)}$$

όπου:

- ν_{signal} είναι η συχνότητα συντονισμού του εξεταζόμενου πυρήνα,
- $\nu_{reference}$ είναι η συχνότητα συντονισμού της ουσίας αναφοράς.

Για τον υπολογισμό της χημικής μετατόπισης χρησιμοποιείται πάντοτε μία ουσία αναφοράς με σταθερή και γνωστή τιμή συντονισμού. Στα οργανικά διαλύματα ως πρότυπο χρησιμοποιείται συνήθως το τετραμεθυλοσιλάνιο (tetramethylsilane, TMS), του οποίου η χημική μετατόπιση ορίζεται συμβατικά στα 0 ppm. Στα υδατικά διαλύματα, όπου το TMS παρουσιάζει περιορισμένη διαλυτότητα, χρησιμοποιούνται συχνότερα τα πρότυπα DSS (4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid) και TSP (trimethylsilylpropionic acid).

Η χημική μετατόπιση αποτελεί μία από τις σημαντικότερες πηγές δομικών πληροφοριών στη φασματοσκοπία NMR. Η θέση κάθε κορυφής αντικατοπτρίζει το χημικό περιβάλλον του αντίστοιχου πυρήνα, επιτρέποντας την αναγνώριση χαρακτηριστικών λειτουργικών ομάδων και τη διάκριση διαφορετικών μεταβολιτών. Στη μεταβολομική, οι τιμές χημικής μετατόπισης χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με βάσεις δεδομένων φασμάτων για την ταυτοποίηση και την ποσοτική ανάλυση των μεταβολιτών που υπάρχουν σε πολύπλοκα βιολογικά δείγματα (Marion, 2013).

1.3.3. Σταθερά σύζευξης (J-coupling) και πολλαπλότητα σημάτων

Εκτός από τη χημική μετατόπιση, μία ακόμη σημαντική παράμετρος της φασματοσκοπίας NMR είναι η βαθμωτή ή spin–spin σύζευξη (scalar coupling ή J-coupling). Η αλληλεπίδραση αυτή πραγματοποιείται μεταξύ γειτονικών πυρήνων που διαθέτουν μη μηδενικό spin και συνδέονται μέσω ομοιοπολικών δεσμών. Η σύζευξη μεταδίδεται μέσω των ηλεκτρονίων των χημικών δεσμών και προκαλεί τη διάσπαση των σημάτων NMR σε πολλαπλές κορυφές (multiplets), παρέχοντας πολύτιμες πληροφορίες για τη συνδεσιμότητα και τη δομή των μορίων.

Η ισχύς της αλληλεπίδρασης περιγράφεται από τη σταθερά σύζευξης J (J-coupling constant), η οποία εκφράζεται σε Hz και αντιστοιχεί στη διαφορά συχνότητας μεταξύ δύο διαδοχικών κορυφών μιας πολλαπλής. Σε αντίθεση με τη χημική μετατόπιση, η σταθερά σύζευξης είναι ανεξάρτητη από την ένταση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου (B_0), ενώ επηρεάζεται από τη γεωμετρία του μορίου, τον αριθμό των δεσμών που παρεμβάλλονται μεταξύ των πυρήνων και τη στερεοχημεία του.

Οι συζεύξεις συμβολίζονται γενικά ως ^{n}J, όπου ο εκθέτης n αντιστοιχεί στον αριθμό των ομοιοπολικών δεσμών που μεσολαβούν μεταξύ των δύο αλληλεπιδρώντων πυρήνων. Οι συζεύξεις ενός δεσμού (^{1}J) εμφανίζουν συνήθως μεγαλύτερες τιμές από τις συζεύξεις δύο (^{2}J) ή τριών δεσμών (^{3}J), ενώ οι συζεύξεις μεγαλύτερης εμβέλειας (^{4}J, ^{5}J) είναι συνήθως σημαντικά ασθενέστερες.

Η πολλαπλότητα των κορυφών σε ένα μονοδιάστατο φάσμα ^{1}H NMR ερμηνεύεται, στις απλούστερες περιπτώσεις, με βάση τον κανόνα n + 1, σύμφωνα με τον οποίο ένας πυρήνας που αλληλεπιδρά με n ισοδύναμα γειτονικά πρωτόνια εμφανίζει σήμα αποτελούμενο από n + 1 κορυφές. Έτσι, ένα πρωτόνιο χωρίς γειτονικά πρωτόνια εμφανίζεται ως μονήρης κορυφή (singlet), ενώ παρουσία ενός, δύο ή τριών ισοδύναμων γειτονικών πρωτονίων παρατηρούνται αντίστοιχα διπλέτα (doublet), τριπλέτα (triplet) και τετραπλέτα (quartet).

Ο κανόνας n + 1 εφαρμόζεται κυρίως σε απλά συστήματα πρώτης τάξης. Σε πιο πολύπλοκα μόρια, όπου υπάρχουν μη ισοδύναμοι πυρήνες ή αλληλοεπικάλυψη σημάτων, τα πρότυπα σχάσης μπορεί να αποκλίνουν από τον κανόνα αυτό και να απαιτούν πιο σύνθετη φασματική ανάλυση.

Η πληροφορία που προκύπτει από τη σταθερά σύζευξης και την πολλαπλότητα των κορυφών συμπληρώνει τη χημική μετατόπιση, επιτρέποντας την αναγνώριση της γειτνίασης των πυρήνων και τη διερεύνηση της μοριακής

δομής. Για τον λόγο αυτό, η J-coupling αποτελεί μία από τις βασικότερες παραμέτρους στην ερμηνεία των φασμάτων NMR και στην ταυτοποίηση οργανικών ενώσεων και μεταβολιτών (Dona et al., 2016).

1.3.4. Φαινόμενο Nuclear Overhauser Effect (NOE)

Το φαινόμενο Nuclear Overhauser Effect (NOE) αποτελεί μία σημαντική αλληλεπίδραση που αξιοποιείται στη φασματοσκοπία NMR για την εξαγωγή πληροφοριών σχετικά με τη χωρική διάταξη των ατόμων. Σε αντίθεση με τη βαθμωτή σύζευξη (J-coupling), η οποία μεταδίδεται μέσω ομοιοπολικών δεσμών, το NOE προκύπτει από διπολικές αλληλεπιδράσεις μέσω του χώρου μεταξύ πυρήνων που βρίσκονται σε μικρή χωρική απόσταση, ακόμη και όταν δεν συνδέονται άμεσα με χημικούς δεσμούς. Για τον λόγο αυτό, το φαινόμενο παρέχει πληροφορίες σχετικά με την τρισδιάστατη διάταξη των ατόμων και τη διαμόρφωση των μορίων σε διάλυμα.

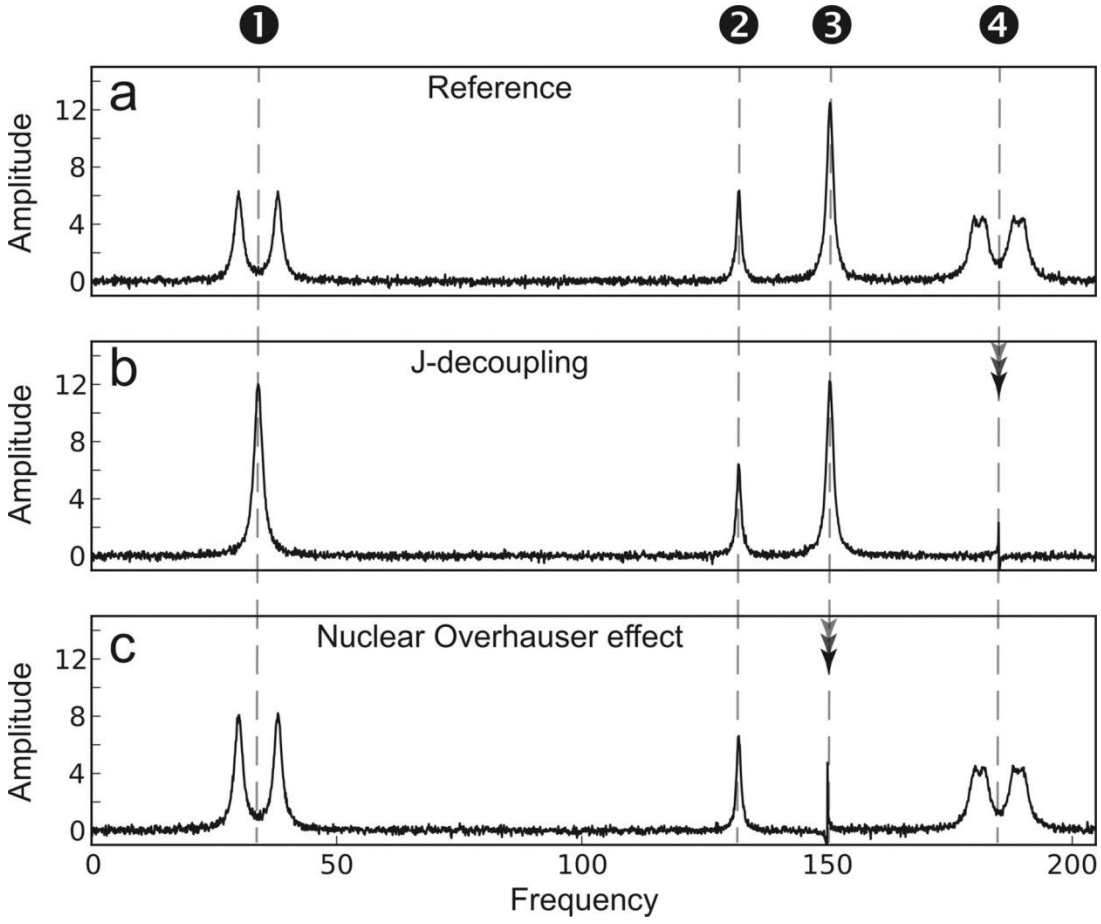
Το NOE αποτελεί τη βάση δισδιάστατων πειραμάτων NMR, όπως το NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) και το ROESY (Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy), τα οποία χρησιμοποιούνται για τη μελέτη χωρικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ πυρήνων και συμβάλλουν σημαντικά στον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής βιομορίων και των μοριακών αλληλεπιδράσεων (Marion, 2013).

1.3.5. Μονοδιάστατα και δισδιάστατα πειράματα NMR

Η φασματοσκοπία NMR περιλαμβάνει μονοδιάστατα (1D), δισδιάστατα (2D) και τρισδιάστατα (3D) πειράματα, τα οποία παρέχουν συμπληρωματικές πληροφορίες για τη δομή και τη σύσταση των μορίων. Τα μονοδιάστατα φάσματα, και ιδιαίτερα το ^{1}H NMR, αποτελούν τη βασική μορφή ανάλυσης και χρησιμοποιούνται για την καταγραφή της χημικής μετατόπισης, της έντασης και της πολλαπλότητας των σημάτων, επιτρέποντας την αναγνώριση και ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών.

Ωστόσο, σε πολύπλοκα δείγματα παρατηρείται συχνά αλληλεπικάλυψη σημάτων, γεγονός που δυσχεραίνει την ταυτοποίησή τους. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται δισδιάστατα (2D) πειράματα, τα οποία προσφέρουν επιπλέον πληροφορίες σχετικά με τις συσχετίσεις μεταξύ των πυρήνων. Τα COSY και

TOCSY αναδεικνύουν συσχετίσεις μεταξύ ομοπυρηνικών σημάτων μέσω δεσμών, ενώ τα ετεροπυρηνικά πειράματα HSQC και HMBC συσχετίζουν πυρήνες διαφορετικών στοιχείων (κυρίως ^{1}H και ^{13}C) μέσω ενός ή περισσότερων ομοιοπολικών δεσμών. Αντίστοιχα, το NOESY παρέχει πληροφορίες για γειτονικούς πυρήνες μέσω χώρου και χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση της τρισδιάστατης διάταξης των μορίων. Ο συνδυασμός 1D και 2D πειραμάτων επιτρέπει την ακριβέστερη ταυτοποίηση και τον δομικό χαρακτηρισμό των μεταβολιτών (Dona et al., 2016).



Εικόνα 4 Ανίχνευση σύζευξης J και φαινομένου πυρηνικού Overhauser (NOE) σε μονοδιάστατα (1D) φάσματα NMR. Στο φάσμα αναφοράς (Α) παρατηρούνται τέσσερα σήματα, εκ των οποίων τα 1 και 4 εμφανίζουν πολλαπλότητα λόγω σύζευξης J. Η συνεχής ακτινοβόληση του σήματος 4 (Β) προκαλεί την εξαφάνισή του και την απλοποίηση του σήματος 1, αποδεικνύοντας τη μεταξύ τους σύζευξη. Στο πείραμα NOE (Γ), ο κορεσμός του σήματος 3 μεταβάλλει την ένταση του σήματος 1 χωρίς αλλαγή της πολλαπλότητάς του, υποδεικνύοντας χωρική εγγύτητα των αντίστοιχων πυρήνων (Marion, 2013).

1.3.6. Προεπεξεργασία φασματικών δεδομένων

Η προεπεξεργασία των φασματικών δεδομένων αποτελεί κρίσιμο στάδιο στη μεταβολομική ανάλυση με φασματοσκοπία NMR, καθώς διασφαλίζει ότι τα φάσματα είναι ομοιόμορφα επεξεργασμένα και συγκρίσιμα μεταξύ των δειγμάτων. Η ορθή εφαρμογή των επιμέρους σταδίων προεπεξεργασίας είναι απαραίτητη για την αξιόπιστη ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών, καθώς και για τη μείωση των τεχνικών αποκλίσεων που προκύπτουν κατά τη συλλογή των δεδομένων. Αντίθετα, ελλιπής ή λανθασμένη προεπεξεργασία μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένη ερμηνεία των φασμάτων και, κατά συνέπεια, σε αναξιόπιστα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης.

Το πρώτο στάδιο της επεξεργασίας είναι ο μετασχηματισμός Fourier (Fourier Transform, FT), μέσω του οποίου το καταγεγραμμένο σήμα στο πεδίο του χρόνου (Free Induction Decay, FID) μετατρέπεται σε φάσμα στο πεδίο της συχνότητας. Πριν από τον μετασχηματισμό εφαρμόζονται συνήθως κατάλληλες συναρτήσεις αποδιαμόρφωσης (apodization functions), με στόχο τη βελτίωση του λόγου σήματος προς θόρυβο ή της φασματικής διακριτικής ικανότητας, ανάλογα με τις απαιτήσεις της ανάλυσης.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται η διόρθωση της φάσης (phase correction), η οποία αποσκοπεί στην επίτευξη συμμετρικών κορυφών καθαρού χαρακτήρα απορρόφησης σε ολόκληρο το φάσμα. Η διόρθωση περιλαμβάνει τόσο τη διόρθωση μηδενικής τάξης (zero-order phase correction, ph0), η οποία επηρεάζει ομοιόμορφα όλες τις συχνότητες, όσο και τη διόρθωση πρώτης τάξης (first-order phase correction, ph1), η οποία εξαρτάται από τη συχνότητα και διορθώνει σφάλματα που προκαλούνται από καθυστερήσεις κατά τη διάρκεια της ακολουθίας παλμών και της ανίχνευσης. Ακόμη και μικρές αποκλίσεις στη φάση μπορούν να οδηγήσουν σε σημαντικά σφάλματα στον υπολογισμό των επιφανειών των κορυφών και να επηρεάσουν όλα τα επόμενα στάδια της επεξεργασίας, όπως την ευθυγράμμιση των φασμάτων, την ομαδοποίηση των δεδομένων και την ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών. Παρότι τα περισσότερα σύγχρονα λογισμικά διαθέτουν δυνατότητα αυτόματης διόρθωσης φάσης, στη μεταβολομική συνιστάται ο χειροκίνητος έλεγχος όλων των φασμάτων και, όπου απαιτείται, η χειροκίνητη διόρθωση, ιδιαίτερα σε περιοχές που επηρεάζονται από το υπολειμματικό σήμα του νερού (Sussulini Editor, n.d.).

Ακολουθεί η διόρθωση της βασικής φασματικής γραμμής (baseline correction), με στόχο την απομάκρυνση τεχνουργημάτων που οφείλονται σε ηλεκτρονικές παραμορφώσεις, ατελή ψηφιακή επεξεργασία ή ανεπαρκή δειγματοληψία. Ιδανικά, οι περιοχές του φάσματος όπου δεν υπάρχουν κορυφές πρέπει να εμφανίζονται ως οριζόντιες γραμμές μηδενικής έντασης. Η σωστή

διόρθωση της γραμμής βάσης είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ακριβή ολοκλήρωση των κορυφών και την ποσοτικοποίηση μεταβολιτών χαμηλής συγκέντρωσης. Η διαδικασία πραγματοποιείται συνήθως με ημιαυτόματες μεθόδους, όπου αρχικά επιλέγονται χειροκίνητα αξιόπιστες περιοχές της γραμμής βάσης και στη συνέχεια εφαρμόζονται αλγόριθμοι προσαρμογής, όπως πολυωνυμικές συναρτήσεις, spline ή asymmetric least squares.

Ένα από τα σημαντικότερα στάδια της προεπεξεργασίας αποτελεί η βαθμονόμηση και ευθυγράμμιση των φασμάτων (spectral calibration and peak alignment). Κατά τη λήψη των φασμάτων είναι δυνατόν να εμφανιστούν μικρές μετατοπίσεις των κορυφών λόγω διαφοροποιήσεων του pH, της θερμοκρασίας, της συγκέντρωσης αλάτων ή μικρών μεταβολών στην ομοιογένεια του μαγνητικού πεδίου. Οι μετατοπίσεις αυτές καθιστούν μη συγκρίσιμες τις αντίστοιχες μεταβλητές μεταξύ των δειγμάτων και μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση. Η αρχική βαθμονόμηση πραγματοποιείται συνήθως ως προς την κορυφή του εσωτερικού προτύπου TSP στα 0,00 ppm. Ωστόσο, σε δείγματα ορού και πλάσματος το TSP μπορεί να αλληλεπιδράσει με τις πρωτεΐνες, προκαλώντας μεταβολές στη θέση και στο σχήμα της κορυφής του. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιείται συχνά ως κορυφή αναφοράς η διπλέτα της α-γλυκόζης περίπου στα 5,23–5,24 ppm. Για την περαιτέρω διόρθωση μικρών αποκλίσεων εφαρμόζονται εξειδικευμένοι αλγόριθμοι ευθυγράμμισης κορυφών οι οποίοι μετατοπίζουν επιλεκτικά τις κορυφές ώστε να αντιστοιχούν σε κοινές χημικές μετατοπίσεις μεταξύ όλων των δειγμάτων. Παρότι οι μέθοδοι αυτές βελτιώνουν σημαντικά τη συγκρισιμότητα των φασμάτων, παρουσιάζουν περιορισμούς σε περιοχές με έντονη επικάλυψη κορυφών.

Μετά την ευθυγράμμιση μπορεί να εφαρμοστεί η διαδικασία της ομαδοποίησης (binning ή bucketing). Κατά τη διαδικασία αυτή το φάσμα χωρίζεται σε μικρά διαστήματα χημικής μετατόπισης (bins), συνήθως εύρους 0,01–0,04 ppm, και κάθε διάστημα αντιπροσωπεύεται από το ολοκλήρωμα της αντίστοιχης περιοχής. Η ομαδοποίηση μειώνει τη διαστατικότητα των δεδομένων και περιορίζει την επίδραση μικρών αποκλίσεων στις χημικές μετατοπίσεις, διευκολύνοντας την επεξεργασία μεγάλων συνόλων δεδομένων. Ωστόσο, η επιλογή του μεγέθους των bins απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή, καθώς πολύ μεγάλα διαστήματα μπορεί να οδηγήσουν σε απώλεια φασματικής πληροφορίας ή σε συγχώνευση σημάτων διαφορετικών μεταβολιτών (Emwas et al., 2018).

Πριν από τη δημιουργία του τελικού πίνακα δεδομένων απομακρύνονται επίσης οι φασματικές περιοχές που δεν περιέχουν αξιόπιστη μεταβολική πληροφορία, όπως η περιοχή του υπολειμματικού σήματος του νερού (περίπου 4,40–5,00 ppm), πιθανές περιοχές που αντιστοιχούν σε ρύπους ή υπολείμματα διαλυτών, καθώς και η κορυφή της ουρίας στα δείγματα ούρων (περίπου 5,80

ppm). Η απομάκρυνση των περιοχών αυτών μειώνει την πιθανότητα εισαγωγής τεχνικού θορύβου και συμβάλλει στην αξιόπιστη συγκριτική ανάλυση των δειγμάτων.

Η επεξεργασία των φασμάτων πραγματοποιείται σήμερα με εξειδικευμένα λογισμικά, όπως τα TopSpin, MestReNova, NMRPipe, MNova, Chenomx NMR Suite και MVAPACK, τα οποία υποστηρίζουν τόσο τη μαζική αυτοματοποιημένη επεξεργασία μεγάλου αριθμού φασμάτων όσο και την ημιαυτόματη ή χειροκίνητη διόρθωση των επιμέρους σταδίων. Μετά την ολοκλήρωση της προεπεξεργασίας δημιουργείται ο πίνακας δεδομένων, στον οποίο κάθε γραμμή αντιστοιχεί σε ένα δείγμα και κάθε στήλη σε μία φασματική μεταβλητή ή μεταβολίτη. Ο πίνακας αυτός αποτελεί τη βάση για τα επόμενα στάδια κανονικοποίησης, κλιμάκωσης και πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης (Puchades-Carrasco et al., 2016).

1.3.7. Προεπεξεργασία αριθμητικών δεδομένων

Μετά την εξαγωγή των αριθμητικών δεδομένων από τα φασματικά αρχεία, απαιτείται κατάλληλη προεπεξεργασία πριν από την εφαρμογή στατιστικών και χημειομετρικών μεθόδων. Στόχος της διαδικασίας είναι η μείωση της επίδρασης τεχνικών σφαλμάτων, διαφορών στη συγκέντρωση των δειγμάτων και ανεπιθύμητης μεταβλητότητας, ώστε να αναδειχθούν οι βιολογικά σημαντικές διαφοροποιήσεις. Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εξαρτάται από το είδος των δεδομένων, το βιολογικό δείγμα και τη στατιστική προσέγγιση που θα εφαρμοστεί.

Ένα πρώτο στάδιο προεπεξεργασίας αποτελεί η κεντροποίηση (mean centering) των δεδομένων, κατά την οποία αφαιρείται η μέση τιμή κάθε μεταβλητής. Η διαδικασία αυτή απομακρύνει σταθερές μετατοπίσεις των δεδομένων και επιτρέπει στις πολυμεταβλητές μεθόδους ανάλυσης, όπως η PCA και η PLS, να επικεντρωθούν στη διακύμανση μεταξύ των δειγμάτων.

Καθώς οι μεταβολίτες υψηλής αφθονίας μπορούν να κυριαρχήσουν στα στατιστικά μοντέλα λόγω των μεγαλύτερων τιμών έντασης, εφαρμόζεται συχνά κλιμάκωση (scaling) των μεταβλητών. Οι κυριότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στη μεταβολομική είναι η αυτόματη κλιμάκωση (autoscaling ή unit variance scaling), η κλιμάκωση Pareto, η κλιμάκωση εύρους (range scaling) και η κλιμάκωση Vast.

Η αυτόματη κλιμάκωση εξισορροπεί τη συμβολή όλων των μεταβλητών, δίνοντας την ίδια βαρύτητα σε μεταβολίτες υψηλής και χαμηλής αφθονίας.

Ωστόσο, μπορεί να ενισχύσει τον θόρυβο ή τις μεταβλητές χαμηλής ποιότητας. Η κλιμάκωση Pareto αποτελεί μια πιο ήπια προσέγγιση, καθώς περιορίζει την επίδραση των μεταβλητών υψηλής έντασης χωρίς να εξισώνει πλήρως όλες τις μεταβλητές. Η κλιμάκωση εύρους βασίζεται στη διακύμανση μεταξύ της ελάχιστης και μέγιστης τιμής κάθε μεταβλητής, αλλά παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία στις ακραίες τιμές.

Επιπλέον, μπορούν να εφαρμοστούν μετασχηματισμοί δεδομένων, όπως ο λογαριθμικός μετασχηματισμός ή ο μετασχηματισμός δύναμης. Οι μέθοδοι αυτές χρησιμοποιούνται κυρίως για τη μείωση της ετεροσκεδαστικότητας, τη βελτίωση της κατανομής των δεδομένων και τον περιορισμό της επίδρασης πολύ υψηλών τιμών. Ο λογαριθμικός μετασχηματισμός είναι ιδιαίτερα χρήσιμος όταν οι σχέσεις μεταξύ των μεταβλητών είναι πολλαπλασιαστικές, ενώ ο μετασχηματισμός δύναμης αποτελεί εναλλακτική λύση όταν υπάρχουν προβλήματα με τιμές κοντά στο μηδέν.

Η κατάλληλη επιλογή συνδυασμού mean centering, scaling και μετασχηματισμού είναι σημαντική, καθώς επηρεάζει άμεσα την απόδοση και την ερμηνεία των επακόλουθων στατιστικών αναλύσεων. Στα δεδομένα μεταβολομικής, η προεπεξεργασία δεν αποτελεί απλή μαθηματική διόρθωση, αλλά καθοριστικό βήμα για την ανάδειξη των βιολογικά σχετικών προτύπων και την αξιόπιστη ανίχνευση πιθανών βιοδεικτών (van den Berg et al., 2006).

1.4. Στατιστική Ανάλυση

Μετά την ολοκλήρωση των διαδικασιών προεπεξεργασίας, τα φασματικά δεδομένα έχουν μετατραπεί σε μία αριθμητική μήτρα, όπου οι γραμμές αντιστοιχούν στα δείγματα και οι στήλες στις επιμέρους μεταβλητές που περιγράφουν το μεταβολικό προφίλ. Η μήτρα αυτή αποτελεί τη βάση για την εφαρμογή στατιστικών και χημειομετρικών μεθόδων, με στόχο την εξαγωγή βιολογικά σημαντικής πληροφορίας από τα σύνθετα δεδομένα μεταβολομικής.

Η στατιστική ανάλυση επιτρέπει την αναγνώριση προτύπων μεταξύ διαφορετικών ομάδων δειγμάτων, την αξιολόγηση των μεταβολικών διαφορών και τον προσδιορισμό των μεταβλητών που συνεισφέρουν περισσότερο στη διαφοροποίηση των υπό μελέτη καταστάσεων. Λόγω του μεγάλου αριθμού μεταβλητών που χαρακτηρίζει τα δεδομένα NMR και MS, η ανάλυση βασίζεται κυρίως σε πολυμεταβλητές χημειομετρικές προσεγγίσεις, οι οποίες μπορούν να αξιοποιήσουν ταυτόχρονα το σύνολο της διαθέσιμης πληροφορίας.

Οι στατιστικές μέθοδοι που εφαρμόζονται στη μεταβολομική διακρίνονται κυρίως σε μη επιβλεπόμενες και επιβλεπόμενες προσεγγίσεις. Οι μη επιβλεπόμενες μέθοδοι χρησιμοποιούνται για την εξερεύνηση της δομής των δεδομένων χωρίς προηγούμενη γνώση των ομάδων, την οπτικοποίηση των μεταβολικών προτύπων και τον εντοπισμό πιθανών ακραίων τιμών ή συστηματικών αποκλίσεων. Αντίθετα, οι επιβλεπόμενες μέθοδοι αξιοποιούν τη γνωστή ταξινόμηση των δειγμάτων με σκοπό τη δημιουργία μοντέλων διάκρισης ή πρόβλεψης μεταξύ διαφορετικών βιολογικών καταστάσεων.

Στις επόμενες ενότητες παρουσιάζονται οι βασικότερες μέθοδοι στατιστικής ανάλυσης που χρησιμοποιούνται στη μεταβολομική, όπως η ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA), η ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων για διακριτική ανάλυση (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA), καθώς και διαδικασίες αξιολόγησης της αξιοπιστίας και της εγκυρότητας των παραγόμενων μοντέλων (Ren et al., 2015).

1.4.1. Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών PCA (Principal Component Analysis)

Για την ανάλυση των πολυδιάστατων δεδομένων μεταβολομικής εφαρμόζονται μέθοδοι πολυμεταβλητής ανάλυσης, οι οποίες επιτρέπουν τη μείωση της πολυπλοκότητας των δεδομένων και την ανάδειξη προτύπων μεταξύ των δειγμάτων. Η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA) αποτελεί την πλέον διαδεδομένη μη επιβλεπόμενη μέθοδο.

Η μέθοδος εφαρμόζεται ευρέως σε δεδομένα NMR μεταβολομικής, καθώς επιτρέπει τη διαχείριση μεγάλου αριθμού μεταβλητών που προκύπτουν από την επεξεργασία των φασμάτων και τη μετατροπή τους σε αριθμητική μήτρα. Μέσω της PCA επιτυγχάνεται η προβολή των αρχικών δεδομένων σε έναν χώρο μειωμένων διαστάσεων, διευκολύνοντας την οπτικοποίηση και την ερμηνεία σύνθετων μεταβολικών προφίλ.

Βασικός στόχος της PCA είναι η μείωση του αριθμού των αρχικών μεταβλητών, χωρίς σημαντική απώλεια της περιεχόμενης πληροφορίας. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της δημιουργίας νέων μεταβλητών, οι οποίες ονομάζονται κύριες συνιστώσες (principal components, PC). Οι κύριες συνιστώσες αποτελούν γραμμικούς συνδυασμούς των αρχικών μεταβλητών και είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους, ενώ κάθε μία περιγράφει διαφορετικό ποσοστό της συνολικής διακύμανσης των δεδομένων. Η πρώτη κύρια συνιστώσα περιλαμβάνει το μεγαλύτερο ποσοστό της μεταβλητότητας, ενώ η συνεισφορά των επόμενων συνιστωσών μειώνεται σταδιακά. Με τον τρόπο αυτό, ένα σύνολο δεδομένων με

μεγάλο αριθμό μεταβλητών μπορεί να αναπαρασταθεί σε έναν περιορισμένο αριθμό διαστάσεων, διατηρώντας τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά του.

Η επιλογή του κατάλληλου αριθμού κύριων συνιστωσών αποτελεί σημαντικό στάδιο στην αξιολόγηση του μοντέλου PCA. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιείται συχνά το διάγραμμα scree plot, στο οποίο απεικονίζεται το ποσοστό της διακύμανσης που εξηγείται από κάθε κύρια συνιστώσα. Η επιλογή των συνιστωσών βασίζεται στη διατήρηση ικανοποιητικού ποσοστού της αρχικής πληροφορίας, αποφεύγοντας παράλληλα την εισαγωγή περιττής πολυπλοκότητας στο μοντέλο.

Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων της PCA πραγματοποιείται κυρίως μέσω των διαγραμμάτων scores και loadings. Το διάγραμμα scores απεικονίζει τη θέση των δειγμάτων στον χώρο που δημιουργούν οι κύριες συνιστώσες και επιτρέπει την αξιολόγηση πιθανών τάσεων ομαδοποίησης, διαφοροποιήσεων μεταξύ πειραματικών ομάδων και την ανίχνευση πιθανών ακραίων δειγμάτων (outliers). Η PCA, καθώς δεν χρησιμοποιεί πληροφορίες σχετικά με την κατηγορία ή την ομάδα προέλευσης των δειγμάτων, παρέχει μια αντικειμενική εικόνα της φυσικής κατανομής των δεδομένων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αρχική διερεύνηση της ποιότητας του συνόλου δεδομένων.

Αντίστοιχα, το διάγραμμα loadings παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη συμβολή των αρχικών μεταβλητών στη διαμόρφωση των κύριων συνιστωσών. Στη μεταβολομική ανάλυση, οι μεταβλητές αυτές αντιστοιχούν συνήθως σε φασματικές περιοχές ή μεταβολίτες και η αξιολόγηση των συντελεστών επιτρέπει τον εντοπισμό εκείνων που συνεισφέρουν περισσότερο στον διαχωρισμό ή στην παρατηρούμενη διαφοροποίηση μεταξύ των δειγμάτων. Οι μεταβλητές με θετική ή αρνητική συσχέτιση μεταξύ τους μπορούν να υποδείξουν κοινά ή αντίθετα πρότυπα μεταβολικής μεταβολής.

Στα δεδομένα NMR μεταβολομικής, η PCA χρησιμοποιείται κυρίως ως διερευνητικό εργαλείο για την αξιολόγηση των μεταβολικών προφίλ, την αναγνώριση πιθανών διαφορών μεταξύ ομάδων και τον εντοπισμό τεχνικών ή βιολογικών αποκλίσεων. Παράλληλα, μπορεί να συμβάλει στην αξιολόγηση της επίδρασης διαφορετικών σταδίων προεπεξεργασίας, όπως η κανονικοποίηση και η κλιμάκωση, καθώς οι επιλογές αυτές μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τη διαμόρφωση των κύριων συνιστωσών και την τελική ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Παρόλο που η PCA αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο εξερεύνησης δεδομένων, δεν χρησιμοποιείται για τη βελτιστοποίηση διαχωρισμού προκαθορισμένων ομάδων, καθώς δεν λαμβάνει υπόψη πληροφορίες σχετικά με την κατηγορία των δειγμάτων. Για τον λόγο αυτό, σε επόμενα στάδια εφαρμόζονται επιβλεπόμενες μέθοδοι, όπως η PLS-DA (Debik et al., 2022).

1.4.2. Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων – Διακριτική Ανάλυση PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis)

Σε αντίθεση με την PCA, η PLS-DA ανήκει στις επιβλεπόμενες μεθόδους πολυμεταβλητής ανάλυσης και αξιοποιεί την πληροφορία σχετικά με την κατηγορία ή την κατάσταση των υπό μελέτη δειγμάτων. Η μέθοδος αποτελεί επέκταση της ανάλυσης PLS (Partial Least Squares), η οποία αναπτύχθηκε με σκοπό τη δημιουργία μοντέλων σε περιπτώσεις όπου ο αριθμός των μεταβλητών είναι μεγάλος σε σχέση με τον αριθμό των δειγμάτων, όπως συχνά συμβαίνει στα δεδομένα μεταβολομικής.

Η PLS-DA βασίζεται στη δημιουργία λανθανουσών μεταβλητών (latent variables), οι οποίες αποτελούν γραμμικούς συνδυασμούς των αρχικών μεταβλητών και επιλέγονται με τρόπο ώστε να μεγιστοποιείται η συσχέτιση μεταξύ του μεταβολικού προφίλ των δειγμάτων και της προκαθορισμένης ομάδας στην οποία ανήκουν. Με αυτόν τον τρόπο, επιτυγχάνεται ο βέλτιστος δυνατός διαχωρισμός μεταξύ διαφορετικών κατηγοριών δειγμάτων, διευκολύνοντας την αναγνώριση μεταβολικών διαφορών που σχετίζονται με το υπό μελέτη βιολογικό φαινόμενο.

Όπως και στην PCA, η PLS-DA επιτρέπει την απεικόνιση των δειγμάτων μέσω των scores των λανθανουσών συνιστωσών, ενώ τα loadings παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη συνεισφορά των αρχικών μεταβλητών στη δημιουργία του μοντέλου. Επιπλέον, η σημαντικότητα των μεταβλητών μπορεί να αξιολογηθεί μέσω δεικτών όπως τα VIP (Variable Importance in Projection) scores, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στη μεταβολομική για την ανάδειξη των μεταβολιτών που συμβάλλουν περισσότερο στον διαχωρισμό των ομάδων.

Παρά τη σημαντική εφαρμογή της PLS-DA στην ανάλυση μεταβολομικών δεδομένων, η επιβλεπόμενη φύση της μεθόδου αποτελεί ταυτόχρονα περιορισμό, καθώς μπορεί να οδηγήσει σε υπερπροσαρμογή (overfitting) του μοντέλου, ιδιαίτερα όταν ο αριθμός των μεταβλητών υπερβαίνει σημαντικά τον αριθμό των δειγμάτων. Για τον λόγο αυτό, η αξιολόγηση της απόδοσης των μοντέλων μέσω διαδικασιών επικύρωσης (cross-validation) είναι απαραίτητη ώστε να διασφαλίζεται η αξιοπιστία και η προβλεπτική τους ικανότητα (Ren et al., 2015).

1.4.3. Διασταυρούμενη επικύρωση CV (Cross-Validation)

Η διασταυρούμενη επικύρωση (CV) αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο αξιολόγησης της αξιοπιστίας των επιβλεπόμενων μοντέλων πολυμεταβλητής ανάλυσης, καθώς επιτρέπει την εκτίμηση της ικανότητάς τους να προβλέπουν νέα, άγνωστα δεδομένα. Η ανάγκη εφαρμογής της προκύπτει κυρίως λόγω του κινδύνου overfitting, κατά τον οποίο ένα μοντέλο προσαρμόζεται υπερβολικά στα δεδομένα εκπαίδευσης, συμπεριλαμβάνοντας τυχαίες διακυμάνσεις ή θόρυβο, με αποτέλεσμα τη μειωμένη προβλεπτική του ικανότητα.

Η συχνότερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι η k-fold cross-validation, κατά την οποία το σύνολο των δεδομένων χωρίζεται σε k υποσύνολα. Σε κάθε επανάληψη, ένα από αυτά χρησιμοποιείται ως σύνολο ελέγχου (test set), ενώ τα υπόλοιπα k-1 υποσύνολα χρησιμοποιούνται για την κατασκευή του μοντέλου (training set). Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι όλα τα υποσύνολα να έχουν χρησιμοποιηθεί ως δεδομένα ελέγχου, παρέχοντας μια συνολική εκτίμηση της απόδοσης του μοντέλου.

Η αξιολόγηση της απόδοσης των μοντέλων πραγματοποιείται μέσω παραμέτρων όπως η ακρίβεια ταξινόμησης (accuracy), ο συντελεστής προσαρμογής (R^2) και ο συντελεστής προβλεπτικής ικανότητας (Q^2). Υψηλές τιμές των παραμέτρων αυτών υποδηλώνουν καλύτερη προσαρμογή και μεγαλύτερη αξιοπιστία του μοντέλου. Ωστόσο, η ερμηνεία τους πρέπει να γίνεται με προσοχή, καθώς ιδιαίτερα σε δεδομένα μεταβολομικής με μεγάλο αριθμό μεταβλητών και περιορισμένο αριθμό δειγμάτων, η πιθανότητα εμφάνισης υπερπροσαρμογής είναι αυξημένη. Για τον λόγο αυτό, η επικύρωση αποτελεί απαραίτητο στάδιο πριν την εξαγωγή βιολογικών συμπερασμάτων από τα πολυμεταβλητά μοντέλα (Debik et al., 2022).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζει στην μεταβολομική ανάλυση δειγμάτων βιολογικών υγρών νεογνών, μέσω φασματοσκοπίας NMR. Συγκεκριμένα, αναλύθηκαν ούρα τα οποία συλλέχθηκαν από υγιή, τελειόμηνα νεογνά κατά τις πρώτες ημέρες εξωμήτριας ζωής με στόχο τη διερεύνηση των μεταβολικών μεταβολών που λαμβάνουν χώρα κατά την πρώιμη μεταγεννητική περίοδο.

Η μεταβολομική διαδραματίζει ολοένα και σημαντικότερο ρόλο στη νεογνολογία, καθώς επιτρέπει την ολοκληρωμένη ανάλυση του μεταβολικού προφίλ και την αναγνώριση βιολογικών διαφορών μεταξύ ομάδων δειγμάτων. Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών και η διερεύνηση των μεταβολών στα επίπεδά τους μπορούν να προσφέρουν πολύτιμες πληροφορίες για τους υποκείμενους βιολογικούς μηχανισμούς, την ανακάλυψη νέων βιοδεικτών και την καλύτερη κατανόηση φυσιολογικών ή παθολογικών καταστάσεων.

Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε σύγκριση του μεταβολιώματος νεογνών της 1^{ης} ημέρας εξωμήτριας ζωής με εκείνο νεογνών της 3^{ης} ημέρας ζωής, με σκοπό την ταυτοποίηση των μεταβολιτών που διαφοροποιούνται κατά το διάστημα αυτό και τη διερεύνηση της συμμετοχής τους σε μεταβολικά μονοπάτια.

Η επιλογή των ούρων ως το καταλληλότερο βιολογικό υγρό προς ανάλυση βασίστηκε στη μη επεμβατική και εύκολη διαδικασία συλλογής τους, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό στον νεογνικό πληθυσμό, καθώς και στο ότι αντανακλούν μεγάλο μέρος των μεταβολικών διεργασιών του οργανισμού. Για τον λόγο αυτό, η συλλογή ούρων έγινε σε υγιή τελειόμηνα νεογνά, χωρίς ιστορικό νόσου.

Για την επίτευξη των παραπάνω στόχων και για την καλύτερη ανάκτηση πληροφοριών του μεταβολισμού από τα διαθέσιμα δεδομένα, τα δείγματα ούρων αναλύθηκαν σε φασματόμετρο NMR υψηλής ευαισθησίας 700MHz/ 16,4 Tesla.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Πληθυσμός Μελέτης

Ο πληθυσμός της παρούσας μελέτης αποτελείται από 60 νεογνά, αγόρια και κορίτσια. Η ιατρική παρακολούθηση και η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Νεογνολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Πατρών, «Παναγία η Βοήθεια». Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε το πρώτο εικοσιτετράωρο μετά τον τοκετό και ύστερα το τρίτο εικοσιτετράωρο, για τις ανάγκες της συγκεκριμένης μελέτης. Για την συμμετοχή του κάθε νεογνού ελήφθη γραπτή ενήμερη συγκατάθεση από τους γονείς. Εφόσον το ενδιαφέρον της εργασίας εστιάζει στο μεταβολικό προφίλ των νεογνών και στις μεταβολές του, τα δείγματα ταξινομήθηκαν σε ομάδες ανεξαρτήτου φύλου. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν τα δείγματα του λήφθηκαν το πρώτο εικοσιτετράωρο εξωμήτριας ζωής, ενώ η δεύτερη ομάδα αποτελείται από δείγματα του τρίτου εικοσιτετραώρου ζωής.

3.2. Συλλογή δειγμάτων

Όλα τα δείγματα συλλέχθηκαν στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατρών. Κατά την μεταφορά και αποθήκευση αυτών, ακολουθήθηκαν πιστά οι Τυποποιημένες Διαδικασίες Λειτουργίας (SOPs). Για την λήψη των ούρων χρησιμοποιήθηκε αυτοκόλλητος νεογνικός ουροσυλλέκτης μιας χρήσεως. Τα δείγματα ούρων φυγοκεντρούνται στα 2500 x g για 10 λεπτά στους 4^{o}C. Το υπερκείμενο διαχωρίζεται σε τρία μέρη του 1ml σε cryovials των 2ml και τα δείγματα αποθηκεύονται στους -80^{o}C, μέχρι την προετοιμασία τους για την ανάλυση στον φασματογράφο NMR.

3.3. Προετοιμασία δειγμάτων για NMR ανάλυση

Τα βήματα για την προετοιμασία είναι βασισμένα στο πρωτόκολλο ανάλυσης μέσω φασματοσκοπίας NMR των Bernini et al. (Bernini et al., 2011). Αρχικά, μετά τη φύλαξη των δειγμάτων στους -80^{o}C, αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου επανέλθουν στην αρχική υγρή τους κατάσταση. Ύστερα, ακολουθεί ανάδευση 540 μL από τα δείγματα με 60 μL ρυθμιστικού διαλύματος

φωσφορικού καλίου (1.5M KH_2PO_4 σε 100% D_2O, 10mM DSS 2mM NaN_3, pH=7.4). Τέλος, τα δείγματα αναδεύτηκαν με τη χρήση vortex και ποσότητα 590 μL μεταφέρθηκαν σε ειδικό σωληνάριο NMR διαμέτρου 5mm.

3.4. Καταγραφή και επεξεργασία NMR φασμάτων

Μετά την προετοιμασία των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε η καταγραφή των φασμάτων NMR στο Εργαστήριο Μοριακής Προσομοίωσης και Φασματοσκοπίας NMR του Πανεπιστημίου Πατρών. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε φασματογράφο υψηλής ανάλυσης Bruker Avance III HD 700 MHz, εξοπλισμένο με κρυογονικά ψυχόμενη κεφαλή ανίχνευσης (5 mm $^{1}H/^{13}C/^{15}N/D$ Z-gradient probe), η οποία εξασφαλίζει υψηλή ευαισθησία και βελτιωμένο λόγο σήματος προς θόρυβο (signal-to-noise ratio). Τα δείγματα ούρων μετρήθηκαν σε θερμοκρασία 298 K και κατά την απόκτηση των φασμάτων εφαρμόστηκε καταστολή του σήματος του νερού. Για κάθε δείγμα καταγράφηκαν μονοδιάστατα φάσματα ^{1}H-NOESY-presat και δισδιάστατα ομοπυρηνικά φάσματα ^{1}H *J-resolved*. Τα μονοδιάστατα φάσματα χρησιμοποιήθηκαν για τη στατιστική ανάλυση και την ποσοτική αξιολόγηση των μεταβολιτών, ενώ τα δισδιάστατα φάσματα συνέβαλαν στην ασφαλέστερη ταυτοποίηση και επιβεβαίωση των μεταβολιτών.

Έπειτα από την καταγραφή των φασμάτων, ακολούθησε η κατάλληλη επεξεργασία τους, ώστε να καταστούν αξιοποιήσιμα και συγκρίσιμα. Τα φάσματα ευθυγραμμίστηκαν μέσω του λογισμικού TopSpin 4.5.0 (Bruker BioSpin), ενώ τυχόν αλλοιώσεις της φάσεως και της βασικής φασματικής γραμμής εξαλείφθηκαν επίσης. Και οι δύο διαδικασίες ήταν μη αυτοματοποιημένες. Η ευθυγράμμιση των φασμάτων έγινε σύμφωνα με την μονή κορυφή που εμφανίζει το εσωτερικό πρότυπο DSS στα 0.00 ppm. Προκειμένου οι φασματικές πληροφορίες να μετατραπούν σε μορφή κατάλληλη για βιοστατιστική ανάλυση, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό AMIX (Bruker BioSpin). Με την βοήθεια του συγκεκριμένου λογισμικού, πραγματοποιήθηκε ο κατακερματισμός ή «bucketing» των φασμάτων-δηλαδή η ολοκλήρωση μικρών φασματικών παραθύρων-σε τμήματα εύρους 0.02 ppm. Επιπλέον, απαλείφθηκαν οι περιοχές συντονισμού του νερού και της ουρίας στα 4.61ppm έως 5.164ppm και 5.50ppm έως 6.24ppm αντίστοιχα. Τέλος, η ταυτοποίηση των μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού Chenomx Profiler 8.1 (Chenomx Inc., Canada), καθώς και με τη συμβολή των διαδικτυακών βάσεων δεδομένων HMDB (Human Metabolome Database) και BMRB (Biological Magnetic Resonance Data Bank), σε συνδυασμό με δεδομένα από τη σχετική βιβλιογραφία.

3.5. Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση δεδομένων μεταβολομικής αξιοποιήθηκε το διαδικτυακά διαθέσιμο λογισμικό MetaboAnalyst 6.0 (Pang et al., 2021). Πρόκειται για ένα εύχρηστο εργαλείο ανάλυσης και επεξεργασίας μεγάλης ποικιλίας τύπων μεταβολομικών δεδομένων που προσφέρει τη δυνατότητα διάφορων μορφών κανονικοποίησης (processing και normalization) δεδομένων, στατιστικής ανάλυσης (univariate & multivariate), οπτικοποίησης (plots, heatmaps), ταυτοποίησης μεταβολιτών και ανάλυσης τους σε μεταβολικούς οδούς. Η πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση που ακολουθήθηκε περιλάμβανε τη μέθοδο της μη επιβλεπόμενης Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών (PCA) καθώς και την επιβλεπόμενη Διαχωριστική Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS-DA), όπου για την κατηγοριοποίηση τους, λαμβάνεται υπόψιν και η παράμετρος της ομάδα στην οποία ανήκουν τα δείγματα. Η αξιολόγηση της επαναληψιμότητας και της ευαισθησία των μοντέλων της εκτίμησης με PLS-DA πραγματοποιήθηκε μέσω της διαδικασίας διασταυρούμενης επικύρωσης δέκα τμημάτων (10-fold cross validation) με έλεγχο των παραμέτρων ακρίβειας, ικανότητας προσαρμογής μοντέλου (R^2) και ικανότητα πρόβλεψης (Q^2).

Για τα δεδομένα της παρούσας μελέτης, ως καταλληλότερη μέθοδος κανονικοποίησης επιλέχθηκε η PQN (Probabilistic Quotient Normalization), δίνοντας πιο αξιόπιστα μοντέλα πρόβλεψης σε σχέσεις με άλλες μεθόδους. Συγκεκριμένα, η PQN απέδωσε μοντέλα χωρίς σημαντική επικάλυψη (overlapping) των στατιστικών περιοχών, συγκριτικά με τις άλλες μεθόδους κανονικοποίησης, ενώ και το ποσοστό των δειγμάτων που αποκλίνουν από την περιοχή εμπιστοσύνης (outliers) ήταν αρκετά μικρό. Ακόμα ένας παράγοντας για την επιλογή της PQN, αποτέλεσε ο καλύτερος διαχωρισμός των στατιστικά σημαντικών μεταβολιτών σε όλο το φάσμα της ανάλυσης. Ως PQN ορίζεται η επεξεργασία των δεδομένων που ξεκινά με μια ολοκληρωτική ομαλοποίηση κάθε φάσματος, ακολουθούμενη από τον υπολογισμό ενός φάσματος αναφοράς (διάμεσος ή γραμμή βάσης). Για κάθε μεταβλητή ενδιαφέροντος υπολογίζεται το πηλίκο ενός δεδομένου φάσματος δοκιμής και του φάσματος αναφοράς και εκτιμάται η διάμεσος όλων των πηλίκων. Όλες οι μεταβλητές του φάσματος δοκιμής διαιρούνται στη συνέχεια με το διάμεσο πηλίκο.

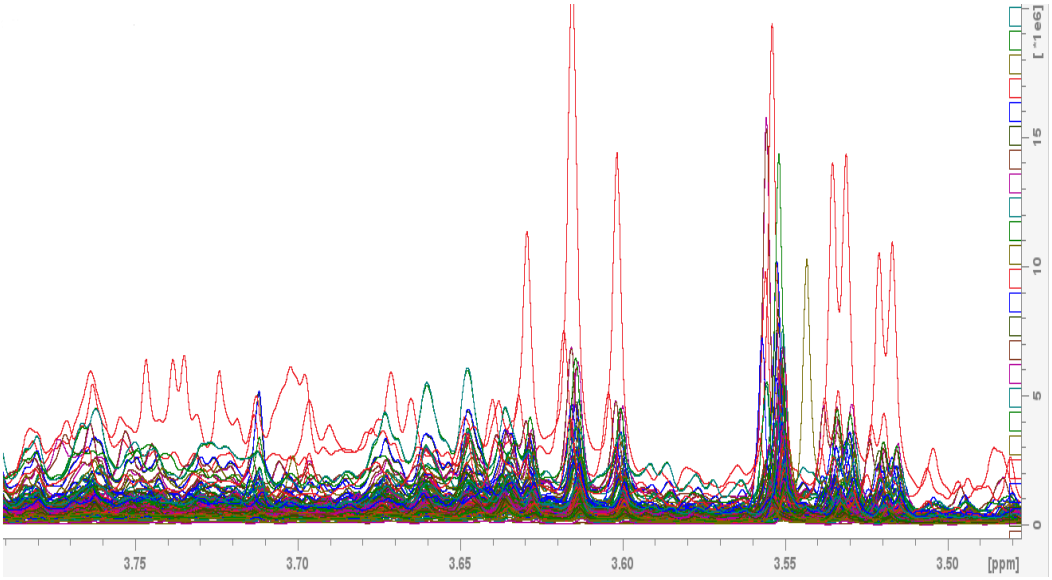
3.6. Pathway Analysis

Για τους μεταβολίτες που παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές πραγματοποιήθηκε ανάλυση μεταβολικών μονοπατιών (Pathway Analysis), με σκοπό τη διερεύνηση των μεταβολικών οδών που επηρεάζονται μεταξύ των συγκρινόμενων ομάδων. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού MetaboAnalyst, με χρήση των ονομάτων των στατιστικά σημαντικών μεταβολιτών, όπως καταγράφονται στις βάσεις δεδομένων HMDB (Human Metabolome Database) και KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Ως βιβλιοθήκη αναφοράς επιλέχθηκαν τα μεταβολικά μονοπάτια του οργανισμού Homo sapiens, ενώ για την αξιολόγηση του εμπλουτισμού των μεταβολιτών και της τοπολογίας των μεταβολικών μονοπατιών εφαρμόστηκαν το υπεργεωμετρικό τεστ (Hypergeometric test) και η μέθοδος relative betweenness centrality**,** αντίστοιχα**.**

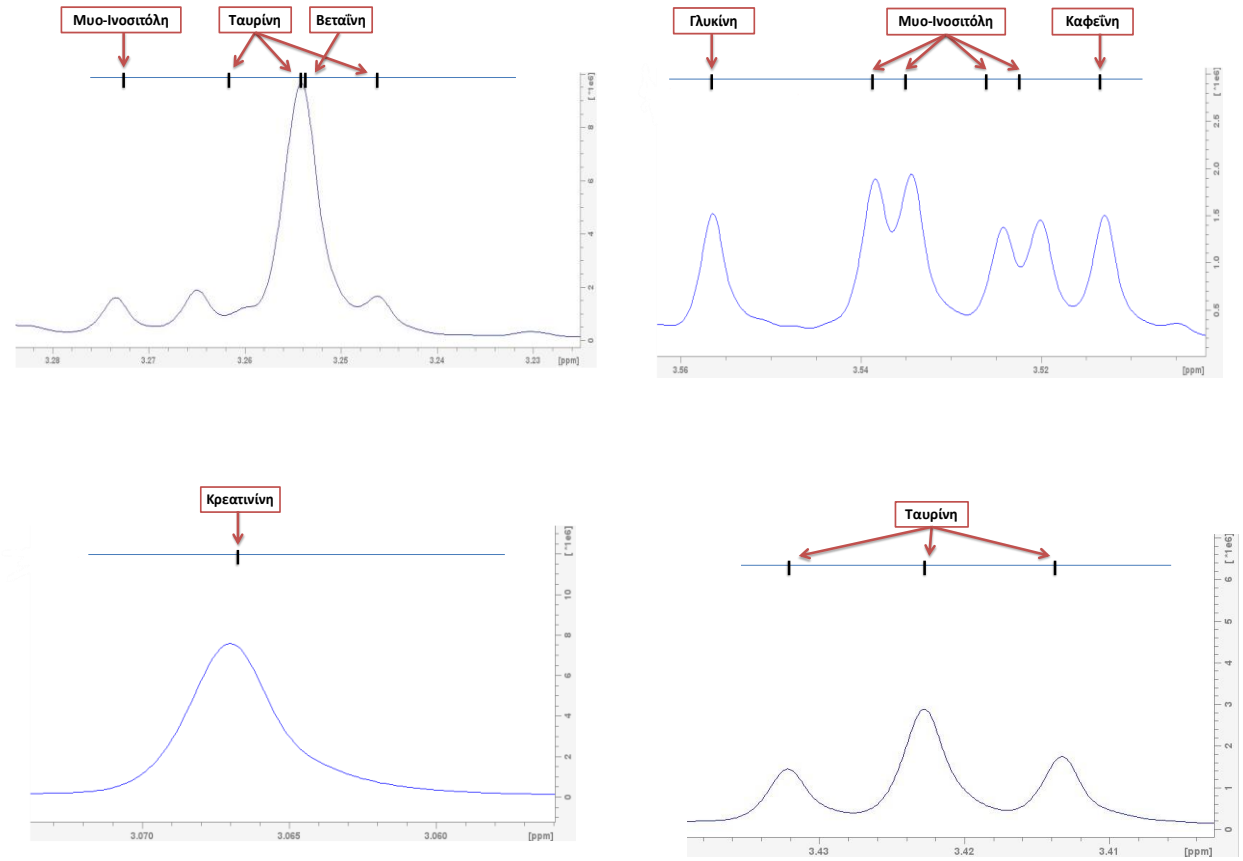
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Ταυτοποίηση Μεταβολιτών

Για την διεξαγωγή της παρούσας εργασίας αξιοποιήθηκαν τόσο τα μονοδιάστατα πρωτονιακά 1D ^{1}H NOESY όσο και τα δισδιάστατα *J-resolved* φάσματα για κάθε ένα από τα 120 δείγματα ούρων. Τα φάσματα αυτά-συνδυαστικά-αποτέλεσαν την βάση για την αναγνώριση των μεταβολιτών στα υπό ερεύνηση δείγματα. Αρχικά, το σύνολο των κορυφών στο 1D ^{1}H NOESY, χαρακτηρίζεται ως προς τις αντίστοιχες πολλαπλότητές του (singlets, doublets, triplets, multiplets) με τη βοήθεια του φάσματος *J-resolved*. Στις περιπτώσεις όπου το πρότυπο μιας κορυφής μπορεί να αντιστοιχεί σε περισσότερους από έναν μεταβολίτες, η ταυτοποίησή της απαιτεί την αξιοποίηση δισδιάστατων (2D) φασμάτων NMR. Ειδικότερα, το φάσμα ^{1}H–^{1}H *J-res* παρέχει πληροφορίες σχετικά με τις συζεύξεις μεταξύ γειτονικών πρωτονίων, επιτρέποντας την επιβεβαίωση των αναμενόμενων συσχετίσεων και διευκολύνοντας τη διάκριση μεταβολιτών με παρόμοια πρότυπα συντονισμού. Ταυτόχρονα, με την αξιοποίηση του λογισμικού Chenomx αλλά και βιβλιογραφικών δεδομένων, πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση 66 μεταβολιτών στα ούρα των νεογνών.



Εικόνα 5 Υπέρθεση όλων των 1D ^{1}H NOESY φασμάτων των δειγμάτων ούρων νεογνών στο πρόγραμμα ανάλυσης TopSpin.



Εικόνα 6 Κορυφές των σημαντικών μεταβολιτών της ανάλυσης σε 1D ^{1}H NOESY φάσμα ούρων στο πρόγραμμα TopSpin.α. Στην πρώτη εικόνα εμφανίζεται μονή (s) κορυφή μυο-ινοσιτόλης, τριπλή (t) κορυφή ταυρίνης και μονή (s) βεταΐνης που ενισχύει την ένταση της τριπλής. β. Στην δεύτερη εικόνα παρουσιάζεται μονή (s) κορυφή γλυκίνης, δυο σετ διπλών (dd) κορυφών και μια μονή (s) για την καφεΐνη. γ. Στην τρίτη εικόνα εμφανίζεται μια μονή (s) κορυφή για την κρεατινίνη και τέλος δ. Στην τέταρτη εικόνα εμφανίζεται η τριπλή (t) κορυφή της ταυρίνης.

Στον **Πίνακα 1** που ακολουθεί, παρουσιάζονται αναλυτικά οι ταυτοποιημένοι μεταβολίτες, έπειτα από την ανάλυση όλων των φασμάτων, μαζί με τις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων τους και την αντίστοιχη πολλαπλότητα των κορυφών τους.

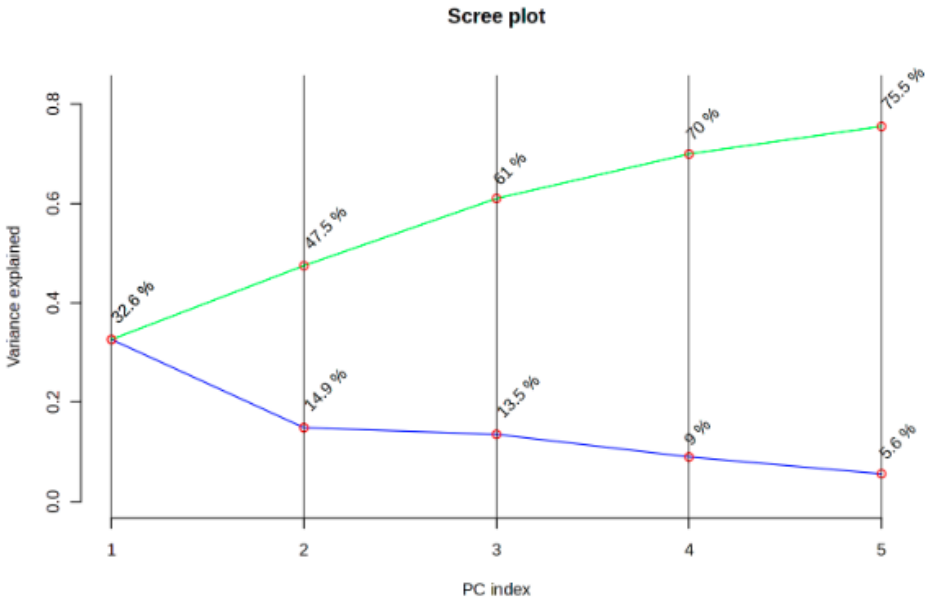
Πίνακας 1: Ταυτοποιημένοι μεταβολίτες στα ^{1}H-NMR φάσματα δειγμάτων πλάσματος σε pH=7.4. s (singlet): μονή κορυφή, d (doublet): διπλή κορυφή, t (triplet): τριπλή κορυφή, q (quartet): τετραπλή κορυφή, dd (doublet of doublets): ζεύγος διπλών κορυφών, m (multiplet): πολλαπλή κορυφή.

	Μεταβολίτης	Χημική μετατόπιση (ppm) (πολλαπλότητα κορυφών)
1.	1-Μεθυλονικοτιναμίδιο	9.27 (s) 8.96 (d) 8.88 (d) 8.17 (t) 4.47(s)
2.	Τριγωνελλίνη	9.11 (s) 8.83 (d) 8.82 (d)
3.	Μονοφωσφορική Ινοσίνη IMP	8.55 (s)
4.	Ιππουρικό οξύ	8.53 (s) 7.82 (d) 7.63 (t) 7.54 (t)
5.	Κινολινικό οξύ	8.46 (d) 8.00 (d) 7.46 (t)
6.	Μυρμηκικό οξύ	8.44 (s)
7.	Ιμιδαζόλη	8.28 (s) 7.32 (s)
8.	Υποξανθίνη	8.21 (s) 8.18 (s)
9.	Οξυπουρινόλη	8.21 (s)
10.	Ανσερίνη	7.98 (s) 7.01 (s)
11.	Ισταμίνη	7.95 (s)
12.	Καφεΐνη	7.89 (s) 3.95 (s) 3.51 (s) 3.33 (s)
13.	Ξανθοσίνη	7.87 (s) 4.39 (q)
14.	1,7-Διμεθυλοξανθίνη	7.85 (s) 3.92 (s) 3.30 (s)
15.	Ινδόλη-3-γαλακτικό οξύ	7.75 (d) 7.49 (d) 7.25 (t) 7.15 (t) 4.34 (q)
16.	Πυριδοξίνη	7.66 (s) 2.46 (s)
17.	2-φουροϊκό οξύ	7.59 (s)
18.	Θυμίνη	7.34 (s) 1.84 (s)
19.	3-Υδροξυμανδελικό οξύ	6. 97 (d) 4.91 (s)
20.	Ομοβανιλλικό οξύ	6.93 (s) 6.86 (d) 6.75 (d) 3.87 (s)
21.	5-Υδροξυϊνδόλιο-3-οξεικό οξύ	6.81 (d) 6.80 (d)
22.	Θυμόλη	6.77 (s)
23.	Αλαπτονικό / Ομογεντισινικό οξύ	6.68 (t) 6.69 (s)
24.	Φουμαρικό οξύ	6.52 (s)
25.	Αδενοσίνη	8.22 (s) 6.06 (d)
26.	Τριφωσφορική Γουανοσίνη	5.94 (d)
27.	Ουριδίνη	5.91 (d) 5.88 (d)
28.	Γουανοσίνη	7.99 (s) 5.89 (d)
29.	Ξανθοσίνη	7.87 (s) 5.84 (d) 4.38 (q)
30.	Ουρακίλη	5.80 (d)

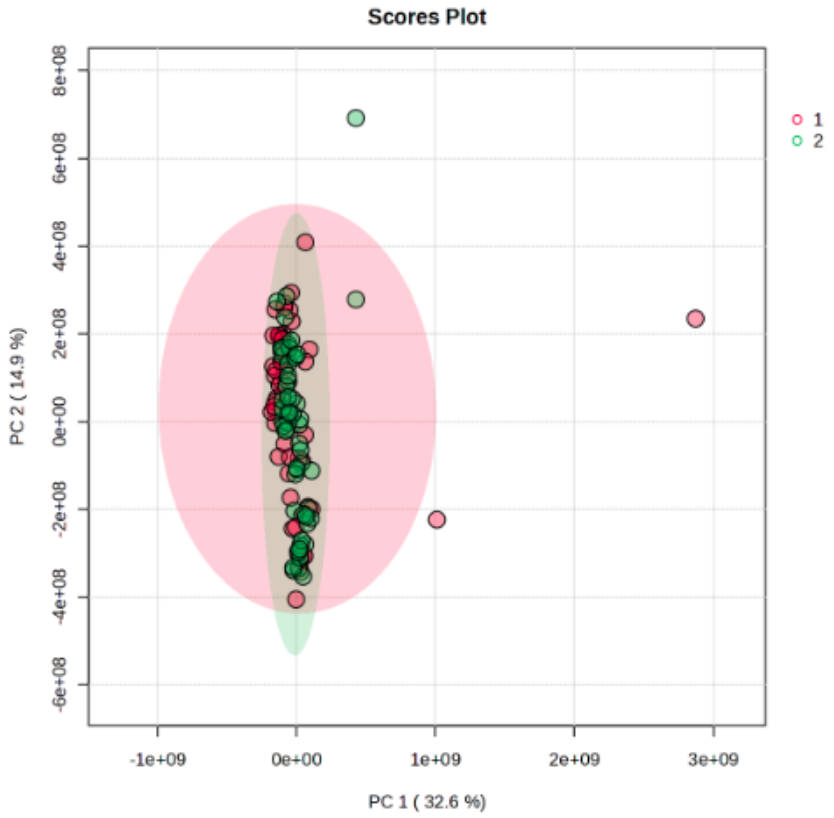
31.	cis-Ακονιτικό οξύ	5.69 (s) 3.11 (s)
32.	Ουριδινοδιφωσφορική-N-ακετυλογλυκοζαμίνη	5.51 (q)
33.	Κιτρακονικό οξύ	5.51 (s) 1.91 (s)
34.	1,6-Ανυδρο-β-D-γλυκόζη	5.45 (s)
35.	Γαλακτόζη	5.26 (d) 4.58 (d) 4.45 (d) 4.09 (t) 3.98 (d) 3.93 (d) 3.85 (dd) 3.80 (dd) 3.75 (t) 3.64 (q) 3.48 (t)
36.	Κελλοβιόζη	5.23 (d) 4.67 (d)
37.	Μαννόζη	5.18 (s) 4.89 (s)
38.	Ασκορβικό οξύ	4.51 (d) 4.02 (t)
39.	Τρυγικό οξύ	4.33 (s)
40.	Γαλακταρικό οξύ	4.23 (s)
41.	Κρεατινίνη	4.13 (s) 3.07 (s)
42.	1,7-Διμεθυλοξανθίνη	3.92 (s) 3.29 (s)
43.	Μυο-ινοσιτόλη	4.06 (t) 3.61 (t) 3.53 (q) 3.27 (t)
44.	Θρεονικό οξύ	3.96 (q) 3.69 (q)
45.	Βεταΐνη	3.89 (s) 3.25 (s)
46.	Αιθανολαμίνη	3.82 (t)
47.	Αιθυλενογλυκόλη	3.68 (s)
48.	Γλυκίνη	3.56 (s)
49.	Ταυρίνη	3.42 (t) 3.25 (t)
50.	Μεθανόλη	3.34 (s)
51.	Μηλονικό οξύ	3.11 (s)
52.	Κρεατίνη	3.03 (s)
53.	DSS	2.91 (t) 1.75 (m) 0.62 (t) 0.00 (s)
54.	N,N-Διμεθυλογλυκίνη	2.91 (s)
55.	Σαρκοσίνη	3.60 (s) 2.72 (s)
56.	Αλανίνη	3.78 (q) 1.47 (d)
57.	Θρεονίνη	4.28 (m) 3.58 (d) 1.32 (d)
58.	N,N- Διμεθυλοφορμαμίδιο	2.86 (s)
59.	Διμεθυλαμίνη	2.72 (s)
60.	Πυροσταφυλικό οξύ	2.36 (s)
61.	Ακετόνη	2.22 (s)
62.	Υδροξυακετόνη	2.16 (s)
63.	UDP-N- Ακετυλογλυκοζαμίνη	2.08 (s)
64.	Μεθυλοηλεκτρικό οξύ	1.08 (d)
65.	Προπιονικό οξύ	1.04 (t)
66.	2-Υδροξυϊσοβαλυρικό οξύ	0.82 (d)

4.2. Πολυμεταβλητή Στατιστική Ανάλυση

Μέσω της μη επιβλεπόμενης Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών (PCA), πραγματοποιήθηκε μια αρχική κατανομή και ομαδοποίηση των δειγμάτων στο δειγματικό χώρο με βάση τις διαφορές και τις συσχετίσεις των μεταβολιτών των νεογνών. Όπως εμφανίζεται και στην **Εικόνα 5** και **Εικόνα 6**, η PCA δεν ανέδειξε κάποια ιδιαίτερη τάση ομαδοποίησης των δύο ομάδων. Με ροζ χρώμα απεικονίζονται τα δείγματα των νεογνών κατά το πρώτο εικοσιτετράωρο ζωής, ενώ με πράσινο τα δείγματα του τρίτου εικοσιτετράωρου εξωμήτριας ζωής. Η πληροφορία που αντιπροσωπεύουν οι δύο πρώτες συνιστώσες της ανάλυσης φτάνει το 47,5 % της συνολικής πληροφορίας. Δύο δείγματα από την πρώτη ομάδα των νεογνών εμφανίζουν απόκλιση από την περιοχή 95 % στατιστικής εμπιστοσύνης, η οποία εμφανίζεται με ροζ χρώμα.

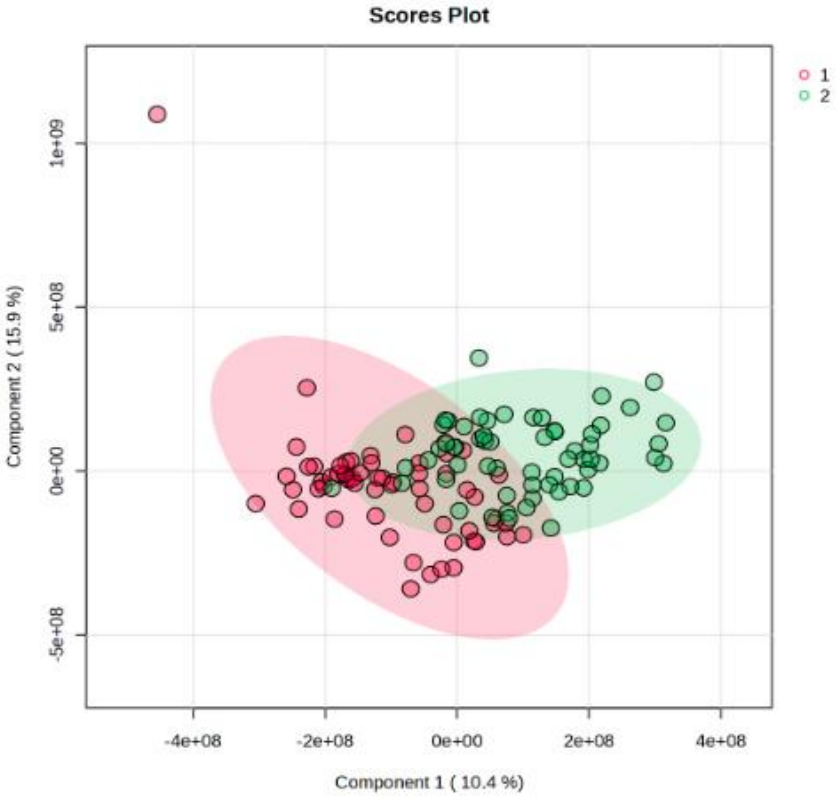


Εικόνα 7 Γραφική αναπαράσταση των Scree Plot ύστερα από PQN normalization των δειγμάτων. Η πράσινη γραμμή απεικονίζει το άθροισμα ενώ η μπλε δείχνει την διακύμανση σε κάθε συνιστώσα (PC) ξεχωριστά.



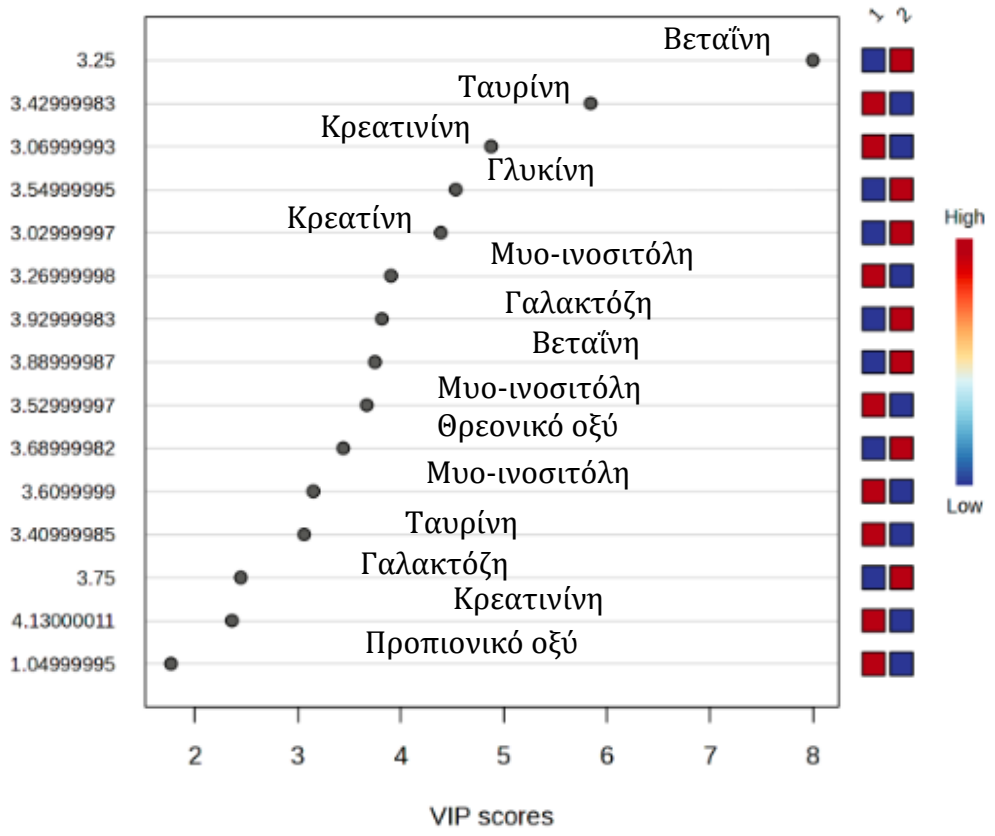
Εικόνα 8 2D διάγραμμα Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών, PCA σε δείγματα ούρων. Η πρώτη συνιστώσα επεξηγεί το 32.6% της συνολικής πληροφορίας ενώ η δεύτερη συνιστώσα το 14.9%. Το πράσινο χρώμα απεικονίζει τα δείγματα της τρίτης ημέρας ζωής των νεογνών, ενώ το κόκκινο τα δείγματα της πρώτης ημέρας ζωής νεογνών.

Στη συνέχεια, εφαρμόζοντας την επιβλεπόμενη Διαχωριστική Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS-DA) πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός και ομαδοποίηση των δύο εξεταζόμενων ομάδων όπως φαίνεται στην **Εικόνα 9** . Οι πρώτες λανθάνουσες συνιστώσες (Component 1 και 2) αντιπροσωπεύουν το 26,3 % της συνολικής πληροφορίας των δεδομένων. Δύο δείγματα αποκλίνουν από την περιοχή 95 % εμπιστοσύνης του διαγράμματος, ένα από την κάθε ομάδα της μελέτης αντίστοιχα.



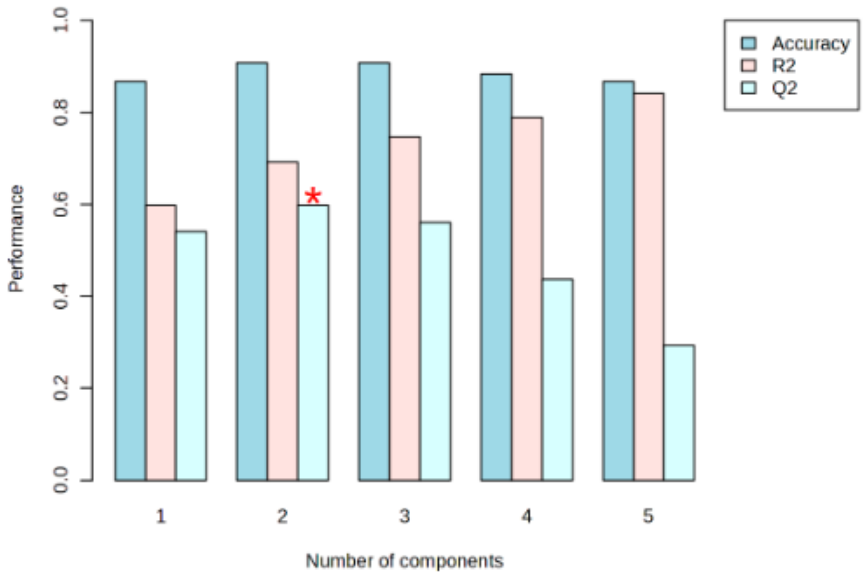
Εικόνα 9 2D διάγραμμα Διαχωριστικής Ανάλυσης Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS DA). Η πρώτη λανθάνουσα μεταβλητή εξηγεί το 10.4% της συνολικής πληροφορίας ενώ η δεύτερη λανθάνουσα μεταβλητή το 15,9%. Το πράσινο χρώμα απεικονίζει τα δείγματα του τρίτου εικοσιτετράωρου ζωής των νεογνών, ενώ το κόκκινο τα δείγματα του πρώτου εικοσιτετράωρου.

Μέσω των VIP scores από την PLS-DA ανάλυση, καταγράφηκαν οι περιοχές κατακερματισμού (buckets) και άρα οι μεταβολίτες αντίστοιχα, που έχουν σημαντική στατιστική σημασία για την ταξινόμηση των ομάδων όπως παρούσας έρευνα. Οι στατιστικοί σημαντικοί μεταβολίτες εμφανίζονται σε όλη την περιοχή του φάσματος, ιδιαίτερα στην περιοχή 3-4 ppm, αποφεύγοντας περιοχές "θορύβου", όπως παρουσιάζονται στην επόμενη **Εικόνα 10**.



Εικόνα 10 VIP scores της PLS-DA σε δείγματα ούρων. Δεξιά της εικόνας φαίνεται η μεταβολή των επιπέδων μεταξύ των δύο ομάδων. Το κόκκινο χρώμα σηματοδοτεί την υψηλότερη τιμή ενώ το μπλε χρώμα την χαμηλότερη.

Το μοντέλο της PLS-DA αξιολογήθηκε μέσω της διασταυρούμενης επικύρωσης (10-fold cross validation) καθώς παρουσίασε ακρίβεια 91%, ικανότητα προσαρμογής R^2=0,69 ενώ η ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου βρέθηκε ίση με Q^2=0,59 για την δεύτερη λανθάνουσα συνιστώσα. Στον παρακάτω **Πίνακα 2** παρατίθενται οι παράμετροι για τις πέντε πρώτες κύριες συνιστώσες αντίστοιχα.



Εικόνα 11 Γραφική απεικόνιση της ανάλυσης Cross Validation. Τα διαγράμματα αυτά είναι εξαιρετικά κρίσιμα για την αξιοπιστία και την αξιολόγηση των μοντέλων πρόβλεψης.

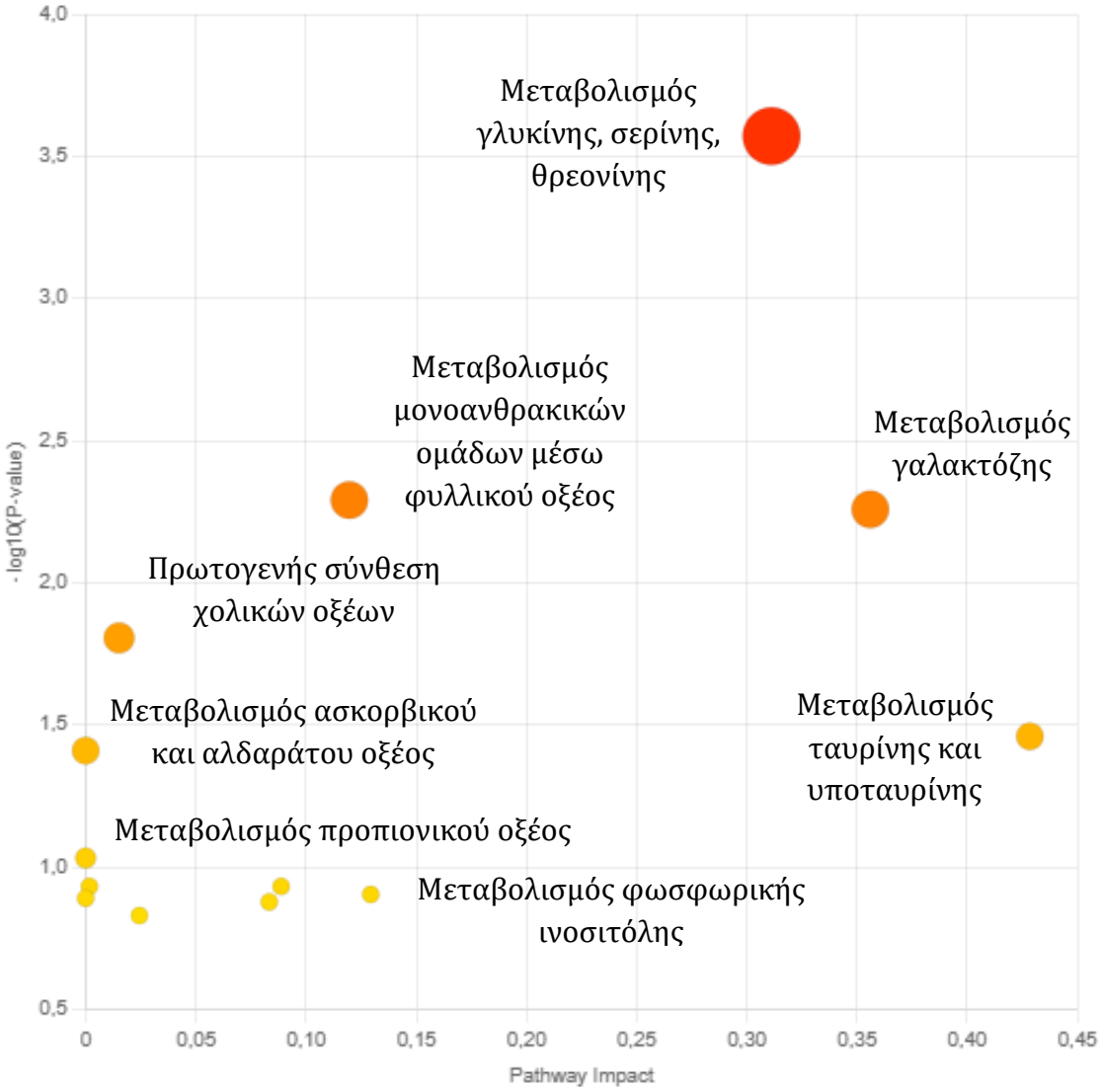
Πίνακας 2 : Οι παράμετροι της ακρίβειας, της ικανότητας προσαρμογής (R^2) και του παράγοντα πρόβλεψης (Q^2), κατόπιν διασταυρούμενης επικύρωσης, για τις 5 πρώτες κύριες συνιστώσες της PLS-DA.

Παράμετρος	Συνιστώσα 1η	Συνιστώσα 2η	Συνιστώσα 3η	Συνιστώσα 4η	Συνιστώσα 5η
Ακρίβεια	0.87	0.91	0.91	0.88	0.87
R^2	0.59	0.69	0.75	0.79	0.84
Q^2	0.54	0.59	0.56	0.44	0.29

4.3. Ανάλυση Μεταβολικών Μονοπατιών

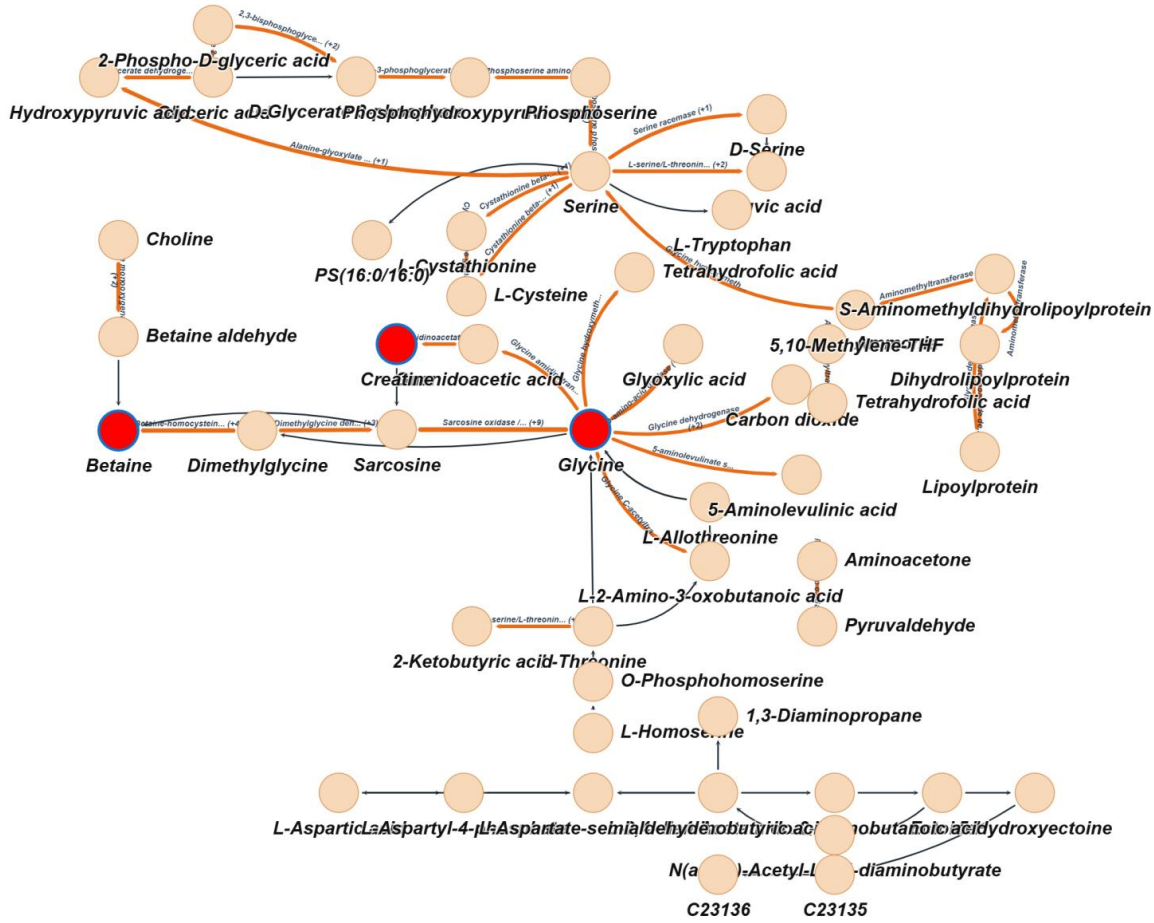
Για τους μεταβολίτες που αναδείχθηκαν ως στατιστικά σημαντικοί από τη στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε Ανάλυση Μεταβολικών Μονοπατιών (Pathway Analysis), με σκοπό τη διερεύνηση των βιολογικών διεργασιών στις οποίες συμμετέχουν και την ερμηνεία των μεταβολικών διαφοροποιήσεων που παρατηρήθηκαν μεταξύ των υπό μελέτη ομάδων. Η ανάλυση βασίστηκε στην Ανάλυση Εμπλουτισμού (Enrichment Analysis) και στην Ανάλυση Τοπολογίας Μονοπατιών (Pathway Topology Analysis), χρησιμοποιώντας ως δεδομένα εισόδου τα επίσημα ονόματα των ταυτοποιημένων μεταβολιτών σύμφωνα με τη βάση δεδομένων HMDB.

Τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε διάγραμμα μεταβολικών μονοπατιών, όπου κάθε κύκλος αντιστοιχεί σε ένα μεταβολικό μονοπάτι. Η χρωματική ένταση κάθε κύκλου αντανακλά τη στατιστική σημαντικότητα του αντίστοιχου μονοπατιού, όπως αυτή προκύπτει από την Ανάλυση Εμπλουτισμού, ενώ το μέγεθός του αντιπροσωπεύει την τοπολογική του επίδραση (pathway impact), η οποία υπολογίζεται βάσει της θέσης και της σημασίας των εμπλεκόμενων μεταβολιτών στο δίκτυο του μονοπατιού. Για κάθε μεταβολικό μονοπάτι υπολογίστηκε η τιμή p (p-value), ενώ για τον έλεγχο των πολλαπλών συγκρίσεων εφαρμόστηκε διόρθωση του ρυθμού ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (False Discovery Rate, FDR), ώστε να περιοριστεί η πιθανότητα εμφάνισης ψευδώς στατιστικά σημαντικών ευρημάτων (**Πίνακας 3**).



Εικόνα 12 Γράφημα μεταβολικών μονοπατιών που επηρεάζονται στα νεογνά, βάσει των στατιστικά σημαντικών μεταβολιτών που προέκυψαν από την πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση.

Το μεταβολικό μονοπάτι του μεταβολισμού γλυκίνης, σερίνης, θρεονίνης αξιολογήθηκε ως το πιο στατιστικά σημαντικό, καθώς παρουσιάζει 3/33 hits, όπως εμφανίζεται και στην **Εικόνα 13** και είναι το μοναδικό που εμφανίζει p-value<0.05 κατόπιν FDR διόρθωσης. Στη συνέχεια, ακολουθούν το μεταβολικό μονοπάτι μονό-ανθρακικών ομάδων μέσω φυλλικού οξέος αλλά και ο μεταβολισμός της γαλακτόζης.



Εικόνα 13 Σχηματική απεικόνιση του στατιστικά σημαντικού μεταβολικού μονοπατιού του μεταβολισμού γλυκίνης, σερίνης, θρεονίνης, όπως προέκυψε από την παρούσα μελέτη.

Πίνακας 3 : Τα μεταβολικά μονοπάτια που προέκυψαν από την Ανάλυση Εμπλουτισμού (Enrichment Analysis) και Ανάλυση Τοπολογίας Μονοπατιών (Pathway Topology Analysis) για τους στατιστικά σημαντικούς μεταβολίτες, σε αντιστοίχιση με τις παραμέτρους p-value και FDR.

Μεταβολικό Μονοπάτι	**Μεταβολίτης**	**p-value**	**FDR**
Μεταβολισμός γλυκίνης, σερίνης, θρεονίνης	Βεταΐνη, Γλυκίνη, Κρεατίνη	2.6874E-4	0.021
Μεταβολισμός μονοανθρακικών ομάδων μέσω φυλλικού οξέος	Βεταΐνη, Γλυκίνη	0.005	0.147
Μεταβολισμός γαλακτόζης	Γαλακτόζη, Μυο-ινοσιτόλη	0.006	0.147
Πρωτογενής σύνθεση χολικών οξέων	Γλυκίνη, Ταυρίνη	0.016	0.313
Μεταβολισμός ταυρίνης και υποταυρίνης	Ταυρίνη	0.035	0.519
Μεταβολισμός ασκορβικού και αλδαράτου οξέος	Ταυρίνη	0.039	0.519
Μεταβολισμός προπιονικού οξέος	Ταυρίνη	0.093	0.885
Μεταβολισμός φωσφωρικής ινοσιτόλης	Ταυρίνη	0.125	0.885

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση των μεταβολικών μεταβολών που πραγματοποιούνται κατά τη μετάβαση από την πρώτη στην τρίτη ημέρα ζωής των νεογνών, μέσω μεταβολομικής ανάλυσης δειγμάτων ούρων με φασματοσκοπία ^{1}H-NMR.

Αρχικά, στην PCA ανάλυση, παρατηρείται μερική επικάλυψη (overlapping) των δειγμάτων που υποδηλώνει ότι το συνολικό μεταβολικό προφίλ των νεογνών παραμένει σε μεγάλο βαθμό παρόμοιο μεταξύ της πρώτης και της τρίτης ημέρας ζωής. Το γεγονός αυτό είναι αναμενόμενο, καθώς η προσαρμογή στην εξωμήτρια ζωή αποτελεί μια σταδιακή και δυναμική διαδικασία και όχι μια απότομη μεταβολική μετάβαση. Ωστόσο, η ύπαρξη επικάλυψης δεν αποκλείει την παρουσία βιολογικά σημαντικών διαφορών, καθώς μπορούν να επιβεβαιωθούν μέσω των επόμενων στατιστικών αναλύσεων. Η PLS-DA ανάλυση βελτίωσε τον διαχωρισμό των δειγμάτων και μείωσε την επικάλυψη, σε σχέση με την εικόνα που προέκυψε μετά από την αρχική ανάλυση με PCA. Η αξιολόγηση του μοντέλου PLS-DA μέσω διασταυρούμενης επικύρωσης έδειξε ότι η βέλτιστη απόδοση επιτυγχάνεται με τις δύο πρώτες συνιστώσες (Ακρίβεια = 0,91, R^2 = 0,69, Q^2 = 0,59). Οι τιμές αυτές υποδηλώνουν ικανοποιητική προσαρμογή και καλή προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου, ενώ η μείωση του Q^2 μετά τη δεύτερη συνιστώσα υποδεικνύει πιθανή υπερπροσαρμογή. Οι μεταβολίτες με τα υψηλότερα VIP scores ήταν αυτοί που συνέβαλαν περισσότερο στη διαφοροποίηση των δύο χρονικών σημείων. Συγκεκριμένα, η βεταΐνη, η ταυρίνη, η κρεατίνη και η κρεατινίνη, η γλυκίνη, η μυο-ινοσιτόλη, η γαλακτόζη, το θρεονικό οξύ και το προπιονικό οξύ βρέθηκαν ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των νεογνών.

Η βεταΐνη αποτελεί παράγωγο της χολίνης και συμμετέχει σε δύο βασικές βιολογικές λειτουργίες: μεταφέρει μία μεθυλομάδα στην ομοκυστεΐνη μέσω του ενζύμου Betaine-Homocysteine Methyltransferase (BHMT), οδηγώντας στον σχηματισμό: μεθειονίνης και διμεθυλογλυκίνης, ενώ λειτουργεί επίσης ως οργανικός ωσμολύτης (Davies et al., 1988). Σύμφωνα με το διάγραμμα VIP scores, η βεταΐνη εμφανίζεται αυξημένη στην δεύτερη ομάδα δειγμάτων δηλαδή στο τρίτο εικοσιτετράωρο ζωής. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται μέσω δεδομένων από την βιβλιογραφία, καθώς έχει περιγραφεί ότι τα ανθρώπινα νεογνά παρουσιάζουν φυσιολογικά απέκκριση βεταΐνης στα ούρα, πιθανόν λόγω ανωριμότητας της νεφρικής λειτουργίας και διαφορών στον μεταβολισμό της κατά τις πρώτες ημέρες ζωής, όπως αυξημένη πρόσληψη από το μητρικό γάλα και αυξημένος μεταβολισμός χολίνης (Borodina et al., 2020). Το ίδιο παρατηρείται και για την γλυκίνη που πέρα από τη σύνθεση πρωτεϊνών, είναι

ζωτικής σημασίας για την ταχεία παραγωγή κολλαγόνου και τη σύνθεση σερίνης στα βρέφη. Ο μεταβολισμός της γλυκίνης στα βρέφη είναι κρίσιμος για την ταχεία ανάπτυξη, καθώς λειτουργεί ως ένα, υπό όρους, απαραίτητο αμινοξύ (Jahoor et al., 2006). Εμφανίζεται ως αυξανόμενος μεταβολίτης κατά το τρίτο εικοσιτετράωρο ζωής, εύρημα που εξηγείται καθώς η βεταΐνη και η γλυκίνη ανήκουν στο ίδιο μεταβολικό μονοπάτι, στον μεταβολισμό γλυκίνης, σερίνης, θρεονίνης (Swanson et al., 2015).

Στη συνέχεια, η ταυρίνη είναι ένα οργανικό οξύ που περιέχει θείο, με διάφορες βιολογικές λειτουργίες : ανάπτυξη εγκεφάλου και αμφιβληστροειδούς, ωρίμανση νευρικού συστήματος, ρύθμιση της οσμωτικότητας των κυττάρων, αντιοξειδωτική προστασία, σύζευξη χολικών οξέων, ρύθμιση ασβεστίου, προστασία μιτοχονδρίων. Τα έμβρυα και τα βρέφη εξαρτώνται από την ταυρίνη που παρέχεται από τις μητέρες μέσω του πλακούντα ή του μητρικού γάλακτος (Tochitani, 2022). Οι συγκεντρώσεις σε πολλά θηλαστικά βρέθηκαν να είναι οι υψηλότερες κατά τις πρώτες ημέρες της γαλουχίας και μειώθηκαν σε μια συγκεκριμένη σταθερή συγκέντρωση μετά την πρώτη εβδομάδα. Αυτό, σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, συμβαίνει λόγω αυξημένης χρήσης από τον οργανισμό σε βιολογικές διαδικασίες όπως την ανάπτυξη σημαντικών οργάνων, σύνθεση χολικών αλάτων και προστασία από οξειδωτικό στρες. Στην παρούσα έρευνα, οι συγκεντρώσεις της ταυρίνης βρέθηκαν υψηλότερες κατά το πρώτο εικοσιτετράωρο εξωμήτριας ζωής και στην συνέχεια μειώθηκαν όπως ακριβώς υποστηρίζεται από άλλες βιβλιογραφικές πηγές. Ακολούθως, η κρεατινίνη παράγεται σταθερά ως μέρος των φυσιολογικών μυϊκών κυττάρων, καθώς αποτελεί τελικό προϊόν του μεταβολισμού της κρεατίνης, που αποτελεί βιοδραστική ένωση του μητρικού γάλακτος, και της φωσφοκρεατίνης. Τα νεογέννητα λαμβάνουν την πρόσληψη κρεατίνης μέσω της διατροφής από το μητρικό γάλα, γεγονός που εξηγεί την αυξημένη συγκέντρωση της κατά την τρίτη ημέρα ζωής, όπου η σίτιση έχει σταθεροποιηθεί, ενώ ανεπάρκεια της οδηγεί σε νευρολογικές διαταραχές (Catherwood & Stearns, 1937; Mihatsch et al., 2024). Η κρεατινίνη αντίθετα, είναι πιο σύνθετη και σύμφωνα με την παρούσα ανάλυση, εμφανίζει μείωση της συγκέντρωσης από την πρώτη στην τρίτη ημέρα ζωής. Η μείωση μπορεί να αποδοθεί στην απομάκρυνση της μητρικής κρεατινίνης, στη σταδιακή αύξηση του GFR, στη βελτίωση της νεφρικής κάθαρσης, στη φυσιολογική προσαρμογή του νεφρού στην εξωμήτρια ζωή. Η βιβλιογραφία αναφέρει ότι η νεφρική λειτουργία μεταβάλλεται δυναμικά κατά τις πρώτες ημέρες μετά τη γέννηση, γεγονός που αντικατοπτρίζεται και στις μεταβολές της κρεατινίνης (Ávila et al., 2025; Sulemanji & Vakili, 2013).

Ακολούθως, η γαλακτόζη είναι ένα σημαντικό θρεπτικό συστατικό σε φυσιολογικά νεογνά και χρησιμεύει ως υπόστρωμα για την παραγωγή ενέργειας και την αποθήκευση καυσίμων, καθώς και ως ρυθμιστής της αφομοίωσης των υδατανθράκων. Η κυρίαρχη πηγή γαλακτόζης είναι η λακτόζη που υπάρχει στο ανθρώπινο γάλα ή σε τεχνητά γάλατα. Παρόλο που το έμβρυο μπορεί να

λαμβάνει γαλακτόζη μέσω του πλακούντα, κατά την περίοδο της ταχείας μεταγεννητικής ανάπτυξης το γάλα παρέχει την μοναδική ή κύρια πηγή διατροφής, παρέχοντας μεγάλες ποσότητες γαλακτόζης. Αυτό εξηγεί και το γεγονός της αυξημένης συγκέντρωσης του μεταβολίτη στο τρίτο εικοσιτετράωρο ζωής (Kliegman & Sparks, 1985). Εν συνεχεία, η μυο-ινοσιτόλη είναι ένα απαραίτητο θρεπτικό συστατικό ζωτικής σημασίας για τον μεταβολισμό, την ανάπτυξη και τη νευρολογική ανάπτυξη των βρεφών, με υψηλή συγκέντρωση στο ανθρώπινο γάλα και στους ιστούς, όπως ο εγκέφαλος. Έχει περιγραφεί, ότι είναι ένα συστατικό που είναι πιο εμφανές κατά τα πρώτα στάδια της γαλουχίας, όταν οι νευρωνικές συνδέσεις σχηματίζονται ταχέως στον εγκέφαλο του βρέφους, εύρημα που επιβεβαιώνεται και στην συγκεκριμένη ανάλυση, καθώς εμφανίζεται αυξημένη συγκέντρωση στην πρώτη ημέρα εξωμήτριας ζωής (Brown et al., 2009; Paquette et al., 2023; Wang et al., 2020).

Το θρεονικό οξύ αποτελεί δείκτη οξειδωτικού stress καθώς είναι κύριο προϊόν της οξειδωτικής αποδόμησης του ασκορβικού οξέος (βιταμίνη C). Όταν αυξάνεται η παραγωγή αντιδραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), η βιταμίνη C καταναλώνεται ως αντιοξειδωτικό και μετατρέπεται σε θρεονικό οξύ. Η παρούσα έρευνα υποστηρίζει ότι το θρεονικό οξύ αυξάνεται κατά την εξωμήτρια ζωή (μεγαλύτερη συγκέντρωση στο τρίτο εικοσιτετράωρο), γεγονός που συμφωνεί με βιβλιογραφικές πηγές που υποστηρίζουν ότι αυξημένη συγκέντρωση θρεονικού οξέος πιθανόν αντανακλά εντονότερη οξείδωση της βιταμίνης C, ενδέχεται να αντανακλά αυξημένη κατανάλωση ασκορβικού οξέος και ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών που προέρχονται από μεταβολές κατά την διάρκεια του τοκετού (Angioni et al., 2023). Τέλος, το προπιονικό οξύ είναι ενδιάμεσος μεταβολίτης του ενεργειακού μεταβολισμού. Παράγεται κυρίως από τον καταβολισμό: των αμινοξέων βαλίνης, ισολευκίνης, μεθειονίνης, θρεονίνης και των λιπαρών οξέων με περιττό αριθμό ατόμων άνθρακα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες μετατρέπεται σε προπιονυλο-CoA και στη συνέχεια σε μεθυλομαλονυλο-CoA και τελικά σε ηλεκτρυλο-CoA (succinyl-CoA), το οποίο εισέρχεται στον κύκλο του Krebs. Σύμφωνα με τα ευρήματα της μελέτης, το προπιονικό οξύ είναι αυξημένο την πρώτη ημέρα εξωμήτριας ζωής και μειώνεται κατά την ανάπτυξη του νεογνού, το τρίτο εικοσιτετράωρο. Η μείωση του προπιονικού οξέος από την πρώτη προς την τρίτη ημέρα ζωής ενδέχεται να αντανακλά τη φυσιολογική ωρίμανση του ενεργειακού μεταβολισμού κατά την προσαρμογή στην εξωμήτρια ζωή. Παρότι η σημαντική συσσώρευση προπιονικού οξέος έχει συσχετιστεί με μεταβολικές διαταραχές, όπως η προπιονική οξυαιμία, οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στην παρούσα μελέτη πιθανότατα αντικατοπτρίζουν φυσιολογικές αναπτυξιακές διεργασίες και όχι παθολογικό μεταβολισμό (Bouillon et al., 2024; Wolf et al., n.d.; Wu et al., 2023).

Η ανάλυση μεταβολικών μονοπατιών έδειξε ότι οι σημαντικότεροι μεταβολίτες συμμετέχουν κυρίως στον μεταβολισμό της γλυκίνης, της σερίνης και της θρεονίνης, στο μονοπάτι μονό-ανθρακικών ομάδων μέσω φυλλικού οξέος, καθώς και στον μεταβολισμό της γαλακτόζης. Τα μονοπάτια αυτά σχετίζονται με τη σύνθεση αμινοξέων, την παραγωγή ενέργειας και τη μεταβολική προσαρμογή των νεογνών κατά τις πρώτες ημέρες ζωής.

Η μελέτη παρουσιάζει βασικά πλεονεκτήματα, όπως η μη επεμβατική συλλογή ούρων, η χρήση της ^{1}H-NMR μεταβολομικής, ο σχεδιασμός paired δειγμάτων μεταξύ 1ης και 3ης ημέρας ζωής, καθώς και η εφαρμογή πολυμεταβλητής ανάλυσης και ανάλυσης μεταβολικών μονοπατιών. Ωστόσο, υπάρχουν και ορισμένοι περιορισμοί, όπως το σχετικά μικρό μέγεθος δείγματος, η αξιολόγηση μόνο δύο χρονικών σημείων και η ανάλυση ενός μόνο βιολογικού υγρού. Επιπλέον, η μικρότερη ευαισθησία της ^{1}H-NMR σε σχέση με τεχνικές όπως η LC-MS, καθώς και η πιθανή επίδραση παραγόντων όπως η διατροφή, το φύλο και η ηλικία κύησης, ενδέχεται να επηρεάζουν τα αποτελέσματα. Η απουσία εξωτερικής επικύρωσης και η πιθανότητα ψευδώς θετικών ή αρνητικών συσχετίσεων αποτελούν επίσης σημαντικούς περιορισμούς.

Τα αποτελέσματα συμβάλλουν στην καλύτερη κατανόηση της φυσιολογικής μεταβολικής προσαρμογής του νεογνού και μπορούν να αποτελέσουν βάση για τη δημιουργία φυσιολογικών μεταβολικών προτύπων και την αναζήτηση μελλοντικών βιοδεικτών νεογνικών παθήσεων. Μελλοντικές μελέτες με μεγαλύτερα και πολυκεντρικά δείγματα, περισσότερα χρονικά σημεία παρακολούθησης, συνδυασμό ^{1}H-NMR και LC-MS/MS, καθώς και συσχέτιση με κλινικούς δείκτες, θα ενισχύσουν την κατανόηση της νεογνικής μεταβολικής προσαρμογής.

Συνολικά, η μελέτη ανέδειξε ότι το μεταβολικό προφίλ των ούρων μεταβάλλεται σημαντικά κατά τις πρώτες ημέρες της ζωής, αντανακλώντας την ταχεία προσαρμογή του νεογνού στην εξωμήτρια ζωή. Η μεταβολομική ανάλυση με ^{1}H-NMR αποτελεί ένα υποσχόμενο εργαλείο για τη μελέτη της φυσιολογικής ανάπτυξης και την πιθανή αναγνώριση πρώιμων βιοδεικτών νεογνικών διαταραχών.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Angioni, S., Congiu, F., Vitale, S. G., D'Alterio, M. N., Noto, A., Monni, G., Santoru, M. L., Fanos, V., Murgia, F., & Atzori, L. (2023). Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS) Metabolites Analysis in Endometriosis Patients: A Prospective Observational Translational Study. *Journal of Clinical Medicine*, *12*(3). https://doi.org/10.3390/jcm12030922

Ávila, M., Mora Sánchez, M. G., Bernal Amador, A. S., & Paniagua, R. (2025). The Metabolism of Creatinine and Its Usefulness to Evaluate Kidney Function and Body Composition in Clinical Practice. In *Biomolecules* (Vol. 15, Number 1). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/biom15010041

Borodina, I., Kenny, L. C., McCarthy, C. M., Paramasivan, K., Pretorius, E., Roberts, T. J., Van Der Hoek, S. A., & Kell, D. B. (2020). The biology of ergothioneine, an antioxidant nutraceutical. *Nutrition Research Reviews*, *33*(2), 190–217. https://doi.org/10.1017/S0954422419000301

Bouillon, G. A., Xie, Z., Nielsen, D. S., Wiese, M., & Nauta, A. (2024). Propionate Production by Infant Fecal Microbiota Is Inversely Correlated with the Protein Glycation Level of Supplemented Infant Formula Ex Vivo. *Nutrients* , *16*(23). https://doi.org/10.3390/nu16234047

Bowman, C. E., Arany, Z., & Wolfgang, M. J. (2021). Regulation of maternal–fetal metabolic communication. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 78, Number 4, pp. 1455–1486). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. https://doi.org/10.1007/s00018-020-03674-w

Brown, L. D., Cheung, A., Harwood, J. E. F., & Battaglia, F. C. (2009). Inositol and mannose utilization rates in term and late-preterm infants exceed nutritional intakes. *Journal of Nutrition*, *139*(9), 1648–1652. https://doi.org/10.3945/jn.109.109108

Catherwood, R., & Stearns, G. (1937). CREATINE AND CREATININE EXCRETION IN INFANCY. *Journal of Biological Chemistry*, *119*(1), 201–214. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)74447-5

Davies, S. E. C., Chalmers, R. A., Randall ', E. W., & Iles, R. A. (1988). Betaine metabolism in human neonates and developing rats. In *CIinica Chimica AC&* (Vol. 178).

Debik, J., Sangermani, M., Wang, F., Madssen, T. S., & Giskeødegård, G. F. (2022). Multivariate analysis of NMR-based metabolomic data. In *NMR in*

Biomedicine (Vol. 35, Number 2). John Wiley and Sons Ltd. https://doi.org/10.1002/nbm.4638

Dona, A. C., Kyriakides, M., Scott, F., Shephard, E. A., Varshavi, D., Veselkov, K., & Everett, J. R. (2016). A guide to the identification of metabolites in NMR-based metabonomics/metabolomics experiments. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *14*, 135–153. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2016.02.005

Emwas, A. H., Saccenti, E., Gao, X., McKay, R. T., dos Santos, V. A. P. M., Roy, R., & Wishart, D. S. (2018). Recommended strategies for spectral processing and post-processing of 1D 1 H-NMR data of biofluids with a particular focus on urine. In *Metabolomics* (Vol. 14, Number 3). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/s11306-018-1321-4

Jahoor, F., Badaloo, A., Reid, M., & Forrester, T. (2006). *Glycine production in severe childhood undernutrition 1-3*.

Kalhan, S. C., D'Angelo, L. J., Savin, S. M., & Adam, P. A. J. (1979). Glucose production in pregnant women at term gestation. Sources of glucose for human fetus. *Journal of Clinical Investigation*, *63*(3), 388–394. https://doi.org/10.1172/JCI109314

Kliegman, R. M., & Sparks, J. W. (1985). Perinatal galactose metabolism. In *THE JOURNAL OF PEDIATRICS DECEMBER* (Vol. 107, Number 6).

Marion, D. (2013). An introduction to biological NMR spectroscopy. In *Molecular and Cellular Proteomics* (Vol. 12, Number 11, pp. 3006–3025). https://doi.org/10.1074/mcp.O113.030239

Mihatsch, W. A., Stahl, B., & Braun, U. (2024). The Umbilical Cord Creatine Flux and Time Course of Human Milk Creatine across Lactation. *Nutrients*, *16*(3). https://doi.org/10.3390/nu16030345

Nagana Gowda, G. A., Zhu, W., & Raftery, D. (2025). NMR-based metabolomics: Where are we now and where are we going? In *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* (Vols. 150–151). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2025.101564

Paquette, A. F., Carbone, B. E., Vogel, S., Israel, E., Maria, S. D., Patil, N. P., Sah, S., Chowdhury, D., Kondratiuk, I., Labhart, B., Morrow, A. L., Phillips, S. C., Kuang, C., Hondmann, D., Pandey, N., & Biederer, T. (2023). The human milk component myo-inositol promotes neuronal connectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *120*(30). https://doi.org/10.1073/pnas.2221413120

Platt, M. W., & Deshpande, S. (2005). Metabolic adaptation at birth. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, *10*(4), 341–350. https://doi.org/10.1016/j.siny.2005.04.001

Puchades-Carrasco, L., Palomino-Schätzlein, M., Pérez-Rambla, C., & Pineda-Lucena, A. (2016). Bioinformatics tools for the analysis of NMR metabolomics studies focused on the identification of clinically relevant biomarkers. *Briefings in Bioinformatics*, *17*(3), 541–552. https://doi.org/10.1093/bib/bbv077

Rao, P. N. S., Shashidhar, A., & Ashok, C. (2013). In utero fuel homeostasis: Lessons for a clinician. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, *17*(1), 60–68. https://doi.org/10.4103/2230-8210.107851

Ren, S., Hinzman, A. A., Kang, E. L., Szczesniak, R. D., & Lu, L. J. (2015). Computational and statistical analysis of metabolomics data. In *Metabolomics* (Vol. 11, Number 6, pp. 1492–1513). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/s11306-015-0823-6

Spadavecchia, A., Zoccarato, M., Tedone, G., Biolatti, M., Dell'Oste, V., Leone, A., Cossard, A., Sozzi, M., Bresesti, I., Bertino, E., Gobetto, R., Coscia, A., & Gallo, A. (2025). 1H NMR Urinary Metabolomics Profiling of Newborns with Congenital Human Cytomegalovirus Infection: Insights into Metabolic Alterations. *Journal of Proteome Research*, *24*(4), 2112–2120. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5c00017

Sulemanji, M., & Vakili, K. (2013). Neonatal renal physiology. *Seminars in Pediatric Surgery*, *22*(4), 195–198. https://doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2013.10.008

Sussulini Editor, A. (n.d.). *Advances in Experimental Medicine and Biology 965 Proteomics, Metabolomics, Interactomics and Systems Biology Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications*. Retrieved http://www.springer.com/series/15040

Swanson, M. A., Coughlin, C. R., Scharer, G. H., Szerlong, H. J., Bjoraker, K. J., Spector, E. B., Creadon-Swindell, G., Mahieu, V., Matthijs, G., Hennermann, J. B., Applegarth, D. A., Toone, J. R., Tong, S., Williams, K., & Van Hove, J. L. K. (2015). Biochemical and molecular predictors for prognosis in nonketotic hyperglycinemia. *Annals of Neurology*, *78*(4), 606–618. https://doi.org/10.1002/ana.24485

Tochitani, S. (2022). Taurine: A Maternally Derived Nutrient Linking Mother and Offspring. In *Metabolites* (Vol. 12, Number 3). MDPI. https://doi.org/10.3390/metabo12030228

van den Berg, R. A., Hoefsloot, H. C. J., Westerhuis, J. A., Smilde, A. K., & van der Werf, M. J. (2006). Centering, scaling, and transformations: Improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics*, *7*. https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-142

Wang, X., Yue, H., Li, S., Guo, J., Guan, Z., Qin, J., Zhu, Z., Niu, B., Cui, M., & Wang, J. (2020). The effects of inositol metabolism in pregnant women on offspring in the north and south of China. *Medical Science Monitor*, *26*. https://doi.org/10.12659/MSM.921088

Wolf, B., Edward Hsia, Y., Sweetman, L., JolIa, L., Gravel, R., Harris, D. J., & Nyhan, W. L. (n.d.). *Propionic acidemia: A clinical update*.

Wu, S., Ren, L., Li, J., Shen, X., Zhou, Q., Miao, Z., Jia, W., He, F., & Cheng, R. (2023). Breastfeeding might partially contribute to gut microbiota construction and stabilization of propionate metabolism in cesarean-section infants. *European Journal of Nutrition*, *62*(2), 615–631. https://doi.org/10.1007/s00394-022-03020-9

Yang, Q., Zhang, A. H., Miao, J. H., Sun, H., Han, Y., Yan, G. L., Wu, F. F., & Wang, X. J. (2019). Metabolomics biotechnology, applications, and future trends: A systematic review. In *RSC Advances* (Vol. 9, Number 64, pp. 37245–37257). Royal Society of Chemistry. https://doi.org/10.1039/c9ra06697g