ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΜΩΡΟΣ

**ΕΥΡΕΣΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΑ
ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΩΜΙΚΗΣ**

ΛΑΡΙΣΑ, 2020

**Εύρεση βιοδεικτών που σχετίζονται με την ενδομήτρια
υπολειπόμενη ανάπτυξη με χρήση μεταβολωμικής**

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Παναγιώτης Ζουμπουλάκης (επιβλέπων)

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Επισκέπτης Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Θεοδώρα Μπούτσικου

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής-Νεογνολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Δημήτριος Λεωνίδας

Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Παναγιώτης Ζουμπουλάκης (επιβλέπων)

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Επισκέπτης Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Θεοδώρα Μπούτσικου

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής-Νεογνολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Δημήτριος Λεωνίδας

Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Νικολέττα Ιακωβίδου

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής-Νεογνολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Μαρία Ζερβού

Κύρια Ερευνήτρια, Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.

Άννα Μαρία Ψαρρά

Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Ζωή Ηλιοδρομίτη

Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής-Νεογνολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Γεώργιος Μώρος

«Εύρεση βιοδεικτών που σχετίζονται με την ενδομήτρια
υπολειπόμενη ανάπτυξη με χρήση μεταβολωμικής»

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη (IUGR) αναφέρεται στην αδυναμία του εμβρύου να επιτύχει το γενετικά καθορισμένο ενδογενές δυναμικό αύξησης. Η IUGR παθολογία χαρακτηρίζεται από την περιορισμένη μεταφορά οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών από τη μητέρα στο έμβρυο και σχετίζεται με αυξημένη περιγεννητική νοσηρότητα και θνησιμότητα, καθώς και απώτερες επιπλοκές κατά την παιδική ηλικία και την ενήλικη ζωή.

Η παρούσα διατριβή εστίασε στην εφαρμογή της μεταβολωμικής για τον εντοπισμό δευτερογενών μεταβολιτών που χαρακτηρίζουν την IUGR παθολογία. Η μεταβολωμική πραγματοποιήθηκε με χρήση με φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) σε δείγματα ομφαλικού και μητρικού αίματος. Η μελέτη περιλάμβανε 84 κυήσεις εκ των οποίων οι 48 αφορούσαν IUGR περιπτώσεις και οι 36 κυήσεις νεογνών με φυσιολογική ανάπτυξη (AGA). Με εφαρμογή τεχνικών επιβλεπόμενης και μη επιβλεπόμενης πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης επιτεύχθηκε ο διαχωρισμός των ομφαλικών και των μητρικών δειγμάτων μεταξύ των IUGR και AGA υποσυνόλων.

Το μεταβολικό προφίλ των μητρικών προσομοιάζει αυτό των ομφαλικών δειγμάτων στις IUGR κυήσεις. Στο φάσμα NMR ταυτοποιήθηκαν 56 μεταβολίτες, εκ των οποίων 7 φάνηκε ότι συμμετέχουν παρόμοια στη διάκριση μεταξύ IUGR και AGA περιπτώσεων. Αυτή η συσχέτιση πιθανώς αναδεικνύει ότι μεταξύ των εμβρύων με IUGR παθολογία και των μητέρων τους επιδρούν κοινοί μηχανισμοί που διαφοροποιούν το μεταβολικό τους αποτύπωμα. Αυτό το συμπέρασμα, εφόσον επικυρωθεί με επιπρόσθετες μελέτες, είναι δυνατόν να οδηγήσει στην χρήση βιοδεικτών στο αίμα των εγκύων με σκοπό την ανάπτυξη νέων διαγνωστικών εργαλείων για την IUGR. Η ανάδειξη υποψήφιων βιοδεικτών σε πρώιμο στάδιο της κύησης θα μπορούσε να συμβάλλει στην ανάσχεση των αρνητικών επιπτώσεων της IUGR είτε μέσω κάποιας φαρμακευτικής ή διατροφικής παρέμβασης.

Συγκεκριμένα, η ενίσχυση της γλυκονεογένεσης και η καταστολή της γλυκερονεογένεσης στην ομάδα των IUGR νεογνών φαίνεται να αποδίδεται στη σχέση της IUGR παθολογίας με την αντίσταση στην ινσουλίνη.

Η αύξηση των BCAAs και κατ' επέκταση του 3-μέθυλο-2-οξοβαλερικού οξέος στις IUGR ομάδες, πιθανόν να σχετίζεται με την έλλειψη ή δυσλειτουργία του πολυ-ενζυμικού συμπλέγματος BCKD (Branched chain α-keto acid dehydrogenase).

Τέλος, η μείωση της θρυπτοφάνης στα IUGR νεογνά φαίνεται να σχετίζεται με την ανάπτυξη μηχανισμών προσαρμογής για την κάλυψη των αυξημένων αναγκών τους σε σεροτονίνη.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής επιβεβαιώνουν προηγούμενα διφορούμενα αποτελέσματα που σχετίζονται με την περίπλοκη παθολογία της ενδομήτριας υπολειπόμενης ανάπτυξης, και προσφέρουν νέα δεδομένα με έμφαση σε δυνητικούς βιοδείκτες για μελλοντική εφαρμογή στην έγκαιρη διάγνωση.

Λέξεις κλειδιά: Ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη, Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, Μεταβολωμική, Πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση, Βιοδείκτες, Μεταβολικά μονοπάτια

ABSTRACT

Intrauterine growth restriction (IUGR) refers to a condition in which a fetus is unable to achieve its genetically determined intrinsic growth potential. IUGR pathology is mainly attributed to limited maternal oxygen and nutrient supply to the fetus and is associated with increased perinatal morbidity and mortality, as well as long term complications during childhood and adult life.

In the present study, metabolomics was applied in order to identify secondary metabolites that characterize IUGR pathology. Nuclear magnetic resonance (NMR) metabolomics was implemented in umbilical cord blood and maternal blood samples. The study comprised 84 parturients giving birth to 48 IUGR and 36 appropriate for gestational age (AGA) infants. Supervised and unsupervised multivariate statistical analysis discriminated IUGR and AGA umbilical cord blood and maternal blood samples.

A clear association between maternal and umbilical cord blood altered metabolomic profile was evidenced in IUGR pregnancies. A total of 56 metabolites were identified in the NMR spectra, with 7 metabolites being equally connected to IUGR-AGA discrimination in both umbilical cord and maternal blood samples. This correlation probably suggests common mechanisms that differentiate the metabolic imprint between IUGR fetuses and their mothers. This conclusion, which needs further confirmation by additional studies, could lead to the use of biomarkers in the blood of pregnant women in order to develop new diagnostic tools for IUGR. The emergence of potential biomarkers at an early stage of pregnancy could help halt the negative effects of IUGR either through medication or nutritional intervention for the mother.

In particular, the enhancement of gluconeogenesis and the suppression of glyceroneogenesis in the neonatal IUGR group is probably attributed to the association of IUGR pathology with insulin resistance.

Moreover, the increase in BCAAs and consequently 3-methyl-2-oxovaleric acid in the IUGR groups may be related to the deficiency or dysfunction of the Branched Chain α -Keto acid Dehydrogenase (BCKD) complex.

Finally, the decrease in tryptophan in IUGR neonates seems to be related to the adaptation mechanisms in order to meet its increased serotonin needs.

The results of the present dissertation confirm previous ambiguous results related to the complex pathology of intrauterine growth restriction, and offer new data on potential biomarkers for future application in early diagnosis.

Keywords: Intrauterine Growth Restriction, Metabolomics, Nuclear Magnetic Resonance, Multivariate statistical analysis, Biomarkers, Metabolic pathways.

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΜΩΡΟΣ

2020

ΕΥΡΕΣΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΑ
ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΩΜΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: 12

Συνολικός αριθμός σελίδων: 175

Αριθμός σχημάτων: 74

Αριθμός πινάκων: 18

Αριθμός παραρτημάτων: 2

Αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών: 126

ΔΗΜΟΣΙΟΤΗΤΑ

«METABOLOMICS IN INTRAUTERINE GROWTH RESTRICTION»

George Moros^{A,B}, Charalampos Fotakis^B, Theodora Boutsikou^C, Nicoletta Iacovidou^C, Panagiotis Zoumpoulakis^{A,B*}, **Oral Presentation: 11th Aegean Analytical Chemistry Days (AACD2018)**, Chania, Crete, Greece, 25-29 Sept 2018

«Insights into intrauterine growth restriction based on maternal and umbilical cord blood metabolomics»

Georgios Moros^{1,2,+}, Theodora Boutsikou^{3,+}, Charalambos Fotakis², Zoe Iliodromiti³, Rozeta Sokou³, Theodora Katsila², Theodoros Xanthos⁴, Nicoletta Iacovidou^{3,*}, Panagiotis Zoumpoulakis^{2,*}, **Scientific Reports (under revisions, July 20)**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε από το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου της Θεσσαλίας, ωστόσο το πειραματικό μέρος πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Ανάλυσης του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Μέσα από την παρούσα διδακτορική διατριβή ήρθα σε επαφή με το χώρο της εμβρυομεταβολικής και κατανόησα τα σημαντικά οφέλη που έχει στη διάγνωση και ερμηνεία των ασθενειών.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Αν. Καθηγητή κ. Παναγιώτη Ζουμπουλάκη για το θέμα που μου ανέθεσε, τη συνεργασία, τη συνεχή επίβλεψη, την καθοδήγηση, την υποστήριξη και την πολύτιμη βοήθειά του προκειμένου να ολοκληρωθεί η παρούσα διατριβή.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Αν. Καθηγήτρια κα. Θεοδώρα Μπούτσικου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για τη συμβολή της στη συλλογή των βιολογικών δειγμάτων. Σημαντική ήταν η συνεισφορά της στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Δημήτριο Λεωνίδα για το ενδιαφέρον και τις συμβουλές του στην ολοκλήρωση της διατριβής.

Σημαντική ήταν η συμβολή της κα. Μαρίας Ζερβού, χάριν στην οποία έμαθα να χειρίζομαι και να λειτουργώ τον φασματογράφο NMR. Επίσης, σημαντική ήταν η βοήθεια της στην αντιμετώπιση των προβλημάτων στη λήψη των φασμάτων.

Ευχαριστώ την Αν. Καθηγήτρια κα. Νικολέττα Ιακωβίδου και την Επικ. Καθηγήτρια, κα. Ζωή Ηλιοδρομίτη για τη συμβολή τους στην ερμηνεία και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Ευχαριστώ την Επικ. Καθηγήτρια, κα. Άννα Μαρία Ψαρρά για τη συνεργασία.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Δρ. Χαράλαμπο Φωτάκη για την εκμάθηση των τεχνικών επεξεργασίας και αποτίμησης των φασμάτων και την εκμάθηση της πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης. Σημαντική ήταν η συνεισφορά του στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Ευχαριστώ θερμά τα μέλη του εργαστηρίου Μοριακής Ανάλυσης του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών και συναδέλφους μου: Ελένη Σιάπη, Ευτυχία Κρίση, Πάρη Χριστοδούλου, Θάλεια Τσιάκα, Δήμητρα Λαντζουράκη, Μπέττυ Λίγγρη και Κώστα Τσιάντα που με τον τρόπο τους συνέβαλαν στην επιτυχή ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής αλλά και για την ευχάριστη και φιλική ατμόσφαιρα που δημιούργησαν.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου για τη συνεχή υποστήριξη τους.

Η ερευνητική εργασία υποστηρίχτηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛΙΔΕΚ) και από τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας (ΓΓΕΤ), στο πλαίσιο της Δράσης «Υποτροφίες ΕΛΙΔΕΚ Υποψηφίων Διδακτόρων» (αρ. Σύμβασης 109).

ΕΛΙΔΕΚ.
Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας & Καινοτομίας

ΓΓΕΤ
ΓΕΝΙΚΗ ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ
ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	3
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΑ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ	4
1.1. Εισαγωγή - Καμπύλες Ανάπτυξης	4
1.2. Παθοφυσιολογία.....	5
1.3. Αίτια εμφάνισης IUGR	8
1.4. Διάγνωση IUGR.....	11
1.5. Παθολογίες που συνδέονται με την IUGR	14
1.6. Μεταβολωμικές προσεγγίσεις και βιοδείκτες στην ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. NMR-ΜΕΤΑΒΟΛΩΜΙΚΗ.....	24
2.1. Ολιστικές προσεγγίσεις.....	24
2.2. Αναλυτικές προσεγγίσεις στη μεταβολωμική.....	25
2.3. Τεχνικές Φασματοσκοπίας NMR. Φάσματα μίας διάστασης (1D-NMR).....	28
2.3.1. Καταστολή σήματος διαλύτη	29
2.3.2. Καταστολή σήματος πρωτεϊνών.....	30
2.4. Αποτίμηση μεταβολιτών με φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων (2D-NMR) ..	31
2.5. Προ-επεξεργασία φασματικών δεδομένων.....	34
2.6. Πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση	39
2.6.1. Ανάλυση κύριων συνιστωσών.....	41
2.6.2. Ορθογώνια παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων με διαχωριστική ανάλυση	41
2.6.3. Επικύρωση στατιστικών μοντέλων	42
2.6.4. Εντοπισμός σημαντικών μεταβολιτών	44
ΣΚΟΠΟΣ	47
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	49
3.1. Οργανολογία	49
3.2. Αντιδραστήρια.....	51
3.3. Λογισμικά	51
3.4. Μεθοδολογία έρευνας και κλινικά δείγματα	55
3.5. Επιλογή δειγμάτων – Κατάρτιση ερωτηματολογίου	56
3.6. Δειγματοληψία.....	63
3.7. Προκατεργασία δειγμάτων για ανάλυση στο NMR.....	64

3.8.	Λήψη φασμάτων NMR	65
3.9.	Χειρισμός φασμάτων	66
3.10.	Μεθοδολογία ταυτοποίησης μεταβολιτών	67
3.11.	Προκατεργασία δειγμάτων για ανάλυση στην HPLC.....	68
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ		70
4.1.	Ταυτοποίηση μεταβολιτών	70
4.2.	Πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση δεδομένων	78
4.3.	Προκαταρκτικός έλεγχος.....	78
4.4.	Επεξεργασία δεδομένων.....	86
4.5.	Ποσοτικός προσδιορισμός υποψήφιων βιοδεικτών	98
4.6.	Κύρια ευρήματα μελέτης	108
4.7.	Συσχέτιση αναδεικνυόμενων βιοδεικτών με την ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη	110
4.8.	Κλινικές και ερευνητικές επιπτώσεις.....	125
4.9.	Δυνατά σημεία της μελέτης	125
4.10.	Μελλοντικοί στόχοι.....	126
4.11.	Τελικά συμπεράσματα	127
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I.....		129
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II.....		137
Συντμήσεις.....		146
Συντμήσεις αμινοξέων		147
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		148

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΑ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

1.1. Εισαγωγή - Καμπύλες Ανάπτυξης

Η ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη (IUGR) αναφέρεται στην αδυναμία του εμβρύου να επιτύχει το γενετικά καθορισμένο ενδογενές δυναμικό αύξησης. Σύμφωνα με το Αμερικανικό Κολλέγιο Μαιευτήρων και Γυναικολόγων (American College of Obstetricians and Gynecologists – ACOG), το βάρος των νεογνών με ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη, όπως υπολογίζεται κατά την εξέταση στον υπέρηχο, βρίσκεται κάτω από τη δέκατη εκατοστιαία θέση αναφοράς (Ε/Θ, percentile) με βάση την εβδομάδα κύησης^{1,2}. Στο Σχήμα 1.1 δίνεται η εκατοστιαία θέση αναφοράς των νεογνών με βάση την ηλικία κύησης και το εκτιμώμενο βάρος τους.

Σχήμα 1.1. Διάγραμμα ρυθμού ανάπτυξης νεογνών όπου: SGA είναι τα μικρά για την ηλικία κύησης νεογνά, IUGR τα νεογνά με ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη, AGA τα φυσιολογικά για την ηλικία κύησης νεογνά και LGA τα μεγάλα για την ηλικία κύησης νεογνά.

Με βάση το παραπάνω διάγραμμα τα νεογνά διακρίνονται σε 3 κατηγορίες: 1) τα φυσιολογικά για την ηλικία κύησης (Appropriate for Gestational Age - AGA) που βρίσκονται μεταξύ της 10^{ης} και 90^{ης} εκατοστιαίας θέσης αναφοράς, 2) τα μεγάλα (μακροσωμικά) για την ηλικία κύησης (Large for Gestational Age - LGA) με βάρος μεγαλύτερο από την 90^η εκατοστιαία θέση αναφοράς και

3) τα νεογνά με βάρος μικρότερο από τη 10^η εκατοστιαία θέση αναφοράς. Στην τελευταία κατηγορία περιλαμβάνονται τα νεογνά που είναι μικρά για την ηλικία κύησης (Small for Gestational Age - SGA) και τα νεογνά που εμφανίζουν ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη (IUGR).

Η διάκριση των SGA και IUGR νεογνών είναι πολύ σημαντική καθώς τα SGA είναι νεογνά με βάρος <10^η Ε/Θ, η ομάδα όμως αυτή μπορεί να περιλαμβάνει νεογνά υγιή που βρίσκονται στα άκρα της κανονικής κατανομής για το βάρος τους, που όμως είναι «ιδιοσυστασιακά» μικρά. Ένα υποσύνολο των SGA νεογνών είναι τα IUGR νεογνά, στα οποία η χαμηλή εκατοστιαία θέση συνοδεύεται εξ'ορισμού με παθολογία στην μητρο- εμβρυο- πλακουντιακή μονάδα οδηγώντας σε αδυναμία του εμβρύου να επιτύχει το γενετικά καθορισμένο ενδογενές δυναμικό αύξησής του^{3,4}. Στη πλειοψηφία των IUGR περιπτώσεων, η μεταφορά του οξυγόνου ή/και των θρεπτικών συστατικών από τη μητέρα στο νεογνό είναι περιορισμένη⁵.

Η συχνότητα εμφάνισης της IUGR παθολογίας υπολογίζεται σε 4 % έως 8 % στις ανεπτυγμένες χώρες και σε 6 % έως 30 % στις αναπτυσσόμενες χώρες⁶. Η ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη σχετίζεται με αυξημένη εμβρυϊκή και νεογνική νοσηρότητα και θνησιμότητα³. Αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνά εμφανιζόμενη αιτία εμβρυϊκού θανάτου και συνήθως οδηγεί σε πρόωρο τοκετό, που αποτελεί το κύριο αίτιο εμβρυϊκού θανάτου⁷. Τα IUGR μωρά έχουν περίπου 5 %-10 % αυξημένο κίνδυνο ενδομήτριου θανάτου σε σχέση με τα φυσιολογικώς αναπτυσσόμενα (AGA), ενώ η IUGR παθολογία ευθύνεται για το 23 %- 65 % των προγεννητικών θανάτων^{8,9}.

1.2. Παθοφυσιολογία

Το έμβρυο από τη σύλληψή του περιέχει τη γενετική πληροφορία για την ανάπτυξή του, η οποία καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από το εμβρυϊκό περιβάλλον^{10,11}. Η ανάπτυξη του εμβρύου πραγματοποιείται σε τρία στάδια που χαρακτηρίζονται αρχικά κυρίως από κυτταρική υπερπλασία (μέχρι την 20^η εβδομάδα κύησης), ακολούθως από συνδυασμό κυτταρικής υπερπλασίας και υπερτροφίας (από την 20^η μέχρι την 28^η εβδομάδα της κύησης), και στη συνέχεια από κυτταρική υπερτροφία (από την 28^η εβδομάδα μέχρι το τέλος της

κύησης)¹². Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται ταχεία μίτωση, αύξηση του αριθμού των κυττάρων του εμβρύου και αύξηση του περιεχόμενου DNA, στο δεύτερο στάδιο μειώνεται ο ρυθμός της μίτωσης και τα κύτταρα αυξάνουν σε μέγεθος, ενώ στο τελευταίο στάδιο πραγματοποιείται ταχεία αύξηση του μεγέθους των κυττάρων και συσσώρευση λίπους, μυϊκής μάζας και συνδετικού ιστού. Το 95 % της πρόσληψης βάρους του εμβρύου λαμβάνει χώρα τις τελευταίες 20 εβδομάδες της κύησης. Παρόμοια είναι η πορεία ανάπτυξης του πλακούντα στα παραπάνω στάδια της κύησης^{12,13}. Στο Σχήμα 1.2 δίνονται τα στάδια της κυτταρικής υπερπλασίας και της κυτταρικής υπερτροφίας.

Σχήμα 1.2. Στάδια κυτταρικής αύξησης¹⁴.

Διαταραχές που αφορούν τον πλακούντα, το έμβρυο ή τη μητέρα επηρεάζουν την ομαλή ανάπτυξη του εμβρύου και είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη⁴. Ο κύριος παθογενετικός μηχανισμός αφορά την επηρεασμένη παροχή οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών μέσω του πλακούντα προς το έμβρυο, το οποίο στη συνέχεια εκτρέπει τους μεταβολικούς του μηχανισμούς υιοθετώντας ένα προφίλ «λιτού φαινότυπου» με σκοπό την ενδομήτρια επιβίωση στις επικρατούσες δυσμενείς συνθήκες. Αυτό αποτελεί τη βάση για την εκδήλωση αντίστασης στην ινσουλίνη και νοσημάτων φθοράς στην ενήλικη ζωή^{15,16}.

Η αύξηση του IUGR εμβρύου μπορεί να είναι συμμετρική ή μη συμμετρική (ασύμμετρη). Η συμμετρική αφορά το 20 % περίπου των IUGR κυήσεων και εκδηλώνεται στα αρχικά στάδια της κύησης (κυτταρική υπερπλασία). Περιλαμβάνει την ομοιόμορφη υπολειπόμενη αύξηση όλων των οργάνων του εμβρύου. Το βάρος, το μήκος και η περίμετρος της κεφαλής του εμβρύου είναι χαμηλότερα των φυσιολογικών τιμών με βάση την ηλικία κύησης (<10 % της

πρότυπης καμπύλης). Αντιθέτως, η ασύμμετρη αύξηση που χαρακτηρίζει τη πλειονότητα των IUGR κυήσεων (80 %) εκδηλώνεται στο στάδιο της κυτταρικής υπερτροφίας. Στην περίπτωση αυτή, η αύξηση της περιμέτρου κεφαλής και το μήκος σώματος είναι φυσιολογικά σε σχέση με το βάρος σώματος και την περίμετρο κοιλιάς που υπολείπονται. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην ανακατανομή της αιματικής ροής προς τα ευγενή όργανα (εγκέφαλος, καρδιά και επινεφρίδια) εις βάρος των υπολοίπων σπλάχνων που υπολείπονται σε αύξηση, φαινόμενο γνωστό ως “brain sparing”^{17–19}. Στο Σχήμα 1.3 φαίνονται οι περιπτώσεις συμμετρικής και ασύμμετρης υπολειπόμενης ανάπτυξης ενός εμβρύου σε σχέση μ’ ένα AGA έμβρυο.

Σχήμα 1.3. Τύποι IUGR ανάπτυξης εμβρύου ως προς ένα AGA έμβρυο²⁰.

Η πλειονότητα των συμμετρικών περιπτώσεων IUGR συνδυάζονται με γενετικά σύνδρομα ή βαριές συγγενείς λοιμώξεις και είναι ασύμβατες με τη ζωή²¹. Παρόλα αυτά, και ανεξάρτητα από το είδος της υπολειπόμενης ανάπτυξης είναι σήμερα βιβλιογραφικά τεκμηριωμένη η συσχέτισή της με αυξημένη περιγεννητική και απώτερη νοσηρότητα και θνησιμότητα^{7,19}. Το γεγονός αυτό καθιστά επιβεβλημένη την ανίχνευση βιοδεικτών στο αίμα της μητέρας που θα μπορούσαν δυνητικά να συμβάλλουν τόσο στην πρώιμη κλινική διάγνωση όσο και την αποτροπή των αρνητικών επιπτώσεων της IUGR στο έμβρυο.

1.3. Αίτια εμφάνισης IUGR

Τα αίτια που μπορεί να οδηγήσουν στην εκδήλωση IUGR κύησης σχετίζονται κυρίως με τον πλακούντα ή το έμβρυο ενώ μπορεί να είναι και μητρικής προέλευσης^{4,22}. Στα Σχήματα 1.4-1.6 συνοψίζονται οι πιο συχνοί παράγοντες κινδύνου για εκδήλωση IUGR^{3,4,22,23}.

Παράγοντες που σχετίζονται με τη μητέρα^{3,4,22,23}

Αρκετοί δημογραφικοί παράγοντες της μητέρας έχουν συσχετισθεί με την ανάπτυξη της IUGR παθολογίας (Σχήμα 1.4). Οι γυναίκες που βρίσκονται σε μεγάλη (>35 ετών) ή μικρή ηλικία (<16 ετών) έχουν αυξημένη πιθανότητα γέννησης ενός IUGR νεογνού. Άλλοι παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνουν τη φυλή της μητέρας, το χαμηλό κοινωνικοοικονομικό της προφίλ ακόμα και την χώρα διαμονής (πχ. αναπτυσσόμενη ή ανεπτυγμένη χώρα). Οι γυναίκες χαμηλού κοινωνικοοικονομικού προφίλ και εκείνες που διαβιούν σε αναπτυσσόμενες χώρες συνήθως στερούνται των απαραίτητων αγαθών διατροφής και σίτισης, της απαραίτητης φροντίδας ή είναι πιο επιρρεπείς στην κατάχρηση ουσιών, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η ομαλή ανάπτυξη του εμβρύου. Ακόμα, το βάρος της εγκύου πριν την κύηση και η χαμηλή πρόσληψη βάρους κατά τη διάρκεια της κύησης συνδέονται με την αύξηση εμφάνισης IUGR. Ένας άλλος παράγοντας κινδύνου περιλαμβάνει την προηγούμενη κύηση IUGR νεογνού.

Επιπλέον, η IUGR παθολογία συνδέεται με περιβαλλοντικούς παράγοντες. Οι γυναίκες που διαβιούν σε υψηλό υψόμετρο (συνθήκες υποξίας) είναι πιο επιρρεπείς στη γέννηση ενός IUGR νεογνού σε σχέση με τις γυναίκες που διαβιούν σε χαμηλότερο υψόμετρο. Επίσης, ο τρόπος ζωής της μητέρας (κάπνισμα, αλκοόλ) επηρεάζει την ανάπτυξη του εμβρύου και μπορεί να οδηγήσει στην IUGR παθολογία. Το κάπνισμα κατά τη διάρκεια της κύησης οδηγεί σε τριπλάσια περίπου αύξηση του ρυθμού γεννήσεων νεογνών με χαμηλό βάρος. Το 19% περίπου των γεννήσεων τελειόμηνων νεογνών χαμηλού βάρους αποδίδεται στο κάπνισμα της μητέρας κατά τη διάρκεια της

κύησης⁴. Η επίδραση του καπνίσματος ωστόσο είναι διαφορετική ανάλογα με τη δόση, τη διάρκεια της έκθεσης στον καπνό και το τρίμηνο της κύησης.

Ακόμα, κάποιες ασθένειες της μητέρας που συνδέονται με τη μείωση της ροής του αίματος στις αρτηρίες της μήτρας ή τη μείωση της μεταφοράς του οξυγόνου ή των θρεπτικών συστατικών από τη μητέρα στο έμβρυο, μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη IUGR κύησης. Τέτοιες ασθένειες περιλαμβάνουν το άσθμα, τη προεκλαμψία, τη χρόνια υπέρταση, τον προγεννητικό διαβήτη, τη συγγενή καρδιοπάθεια κ.α. Τέλος, υπάρχει σύνδεση της IUGR παθολογίας με ενδεχόμενη λοίμωξη της εγκύου.

- Ηλικία μητέρας (<16 ή >35)
- Χαμηλό βάρος μητέρας πριν τη κύηση (<45Kg, BMI<20)
- Ελλιπής διατροφή / Χαμηλή αύξηση βάρους
- Τρόπος ζωής (κάπνισμα, αλκοόλ, ναρκωτικά, στεροειδή)
- Μητρική λοίμωξη
- Ασθένεια (άσθμα, υπέρταση, συγγενής καρδιοπάθεια, κ.α.)
- Προηγούμενη κύηση IUGR
- Διαβίωση σε υψηλό υψόμετρο – Συνθήκες υποξίας

Σχήμα 1.4. Πιθανές αιτίες πρόκλησης της IUGR που οφείλονται στη μητέρα.

Παράγοντες που σχετίζονται με το έμβρυο^{3,4,22,23}

Οι πιθανές αιτίες της IUGR παθολογίας που σχετίζονται με το έμβρυο περιλαμβάνουν: γενετικές βλάβες, συγγενείς δυσπλασίες, μόλυνση του εμβρύου και πολλαπλή κύηση (Σχήμα 1.5).

Οι γενετικές βλάβες συνεισφέρουν το 5-20% των IUGR κυήσεων. Περιλαμβάνουν κυρίως χρωμοσωμικές ανωμαλίες όπως είναι η τρισωμία 21, 18, 13 και 16. Οι συγγενείς δυσπλασίες περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων τη συγγενή καρδιοπάθεια, τη διαφραγματοκήλη, ελλείμματα του κοιλιακού τοιχώματος (ομφαλοκήλη, γαστροσχισση), τη νεφρική αγενεσία ή δυσπλασία και τη μονή ομφαλική αρτηρία.

Οι συγγενείς λοιμώξεις συνεισφέρουν λιγότερο από το 5 % των IUGR κυήσεων και είναι κυρίως ιογενούς προέλευσης (ερυθρά, ανεμοβλογιά, έρπης ζωστήρας, HIV) ή παρασιτικές (τοξόπλασμα, σύφιλη, ελονοσία) και σε μικρότερο ποσοστό βακτηριακές (χλαμύδια, μυκόπλασμα, λιστέρια, φυματίωση).

Οι πολλαπλές κυήσεις αφορούν το 3 % περίπου των IUGR κυήσεων. Η πιθανότητα IUGR παθολογίας στις πολλαπλές κυήσεις είναι 5-10 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τις μονήρεις και σχετίζεται με τον αριθμό των κυοφορούμενων εμβρύων, τη χοριονικότητα και την ύπαρξη ανωμαλιών στον πλακούντα. Στις πολλαπλές κυήσεις, ο ρυθμός ανάπτυξης των εμβρύων μέχρι την 30^η-32^η εβδομάδα της κύησης είναι σχεδόν παρόμοιος με τον αντίστοιχο στις κυήσεις ενός εμβρύου, ενώ μετέπειτα μειώνεται σταδιακά.

- Γενετική βλάβη
- Συγγενής δυσπλασία
- Μόλυνση εμβρύου
- Πολλαπλή κύηση

Σχήμα 1.5. Πιθανές αιτίες πρόκλησης της IUGR που οφείλονται στο έμβρυο.

Παράγοντες που σχετίζονται με τον πλακούντα^{3,4,23}

Η ανεπάρκεια του πλακούντα επηρεάζει το 3 % των κυήσεων και αποτελεί την κυριότερη αιτία πρόκλησης IUGR, μέσω της ανεπαρκούς κυκλοφορίας και μεταφοράς των θρεπτικών συστατικών^{6,24}. Το βάρος του πλακούντα στις IUGR κυήσεις είναι κατά 24 % περίπου χαμηλότερο σε σχέση με αυτό στις AGA κυήσεις⁴.

Η μη φυσιολογική εμφύτευση του πλακούντα στη μήτρα (προδρομικός πλακούντας) συμβάλλει στην ελλιπή θρέψη και οξυγόνωση του εμβρύου. Επιπλέον παράγοντες κινδύνου για IUGR αποτελούν η αποκόλληση του πλακούντα, η προσκόλληση του πλακούντα στο μυομήτριο, η μη φυσιολογική αγγείωση του πλακούντα, ο μωσαϊκισμός του πλακούντα (CPM), η μονή ομφαλική αρτηρία ή κάποιος όγκος (π.χ. χοριοαγγείωμα) ή λοίμωξη του πλακούντα. Στο Σχήμα 1.6 δίνονται οι παράγοντες του πλακούντα που σχετίζονται με την IUGR.

- Δυσλειτουργία πλακούντα
- Χαμηλό βάρος
- Προδρομικός πλακούντας
- Αποκόλληση πλακούντα
- Προσκόλληση πλακούντα στο μυομήτριο
- Μη φυσιολογική αγγείωση του πλακούντα
- Μωσαϊκισμός πλακούντα
- Μονή ομφαλική αρτηρία
- Λοίμωξη του πλακούντα
- Όγκος πλακούντα

Σχήμα 1.6. Πιθανές αιτίες πρόκλησης της IUGR που οφείλονται στον πλακούντα.

1.4. Διάγνωση IUGR

Πρώτο βήμα για την αναγνώριση της IUGR παθολογίας αποτελεί η ακριβής καταγραφή της ηλικίας κύησης. Αυτή υπολογίζεται λαμβάνοντας υπόψιν την πρώτη μέρα της τελευταίας περιόδου της μητέρας και τα ευρήματα από τον υπέρηχο του πρώτου τριμήνου. Η διάγνωση γίνεται κατά την υπερηχογραφική εξέταση (εκτιμώμενο βάρος εμβρύου $<10^{\text{η}}$ εκατοστιαία θέση της πρότυπης καμπύλης ανάπτυξης), συνυπολογίζοντας συγκεκριμένους βιομετρικούς δείκτες όπως είναι η αμφιβρεγματική διάμετρος της κεφαλής (BPD), η περίμετρος της κεφαλής (HC) και της κοιλιάς (AC) και το μήκος του μηριαίου οστού (FL), με την αξιολόγηση των συνυπαρχόντων παραγόντων κινδύνου^{3,4}. Στο Σχήμα 1.7 δίνονται οι παράμετροι ελέγχου που υπολογίζονται κατά την υπερηχογραφική εξέταση και βοηθούν στην εκτίμηση του βάρους του εμβρύου.

Σχήμα 1.7. Βιομετρικοί παράγοντες που υπολογίζονται κατά την εξέταση στον υπέρηχο και βοηθούν στην εκτίμηση του βάρους του εμβρύου. (Α) Αμφιβρεγματική διάμετρος, (Β) Περίμετρος κεφαλής, (Γ) Περίμετρος κοιλιάς, (Δ) Μήκος μηριαίου οστού²⁵.

Η μέτρηση της αμφιβρεγματικής διαμέτρου μετά τη 14^η εβδομάδα της κύησης αποτελεί αξιόπιστη παράμετρο, ωστόσο επηρεάζεται από το σχήμα της εμβρυϊκής κεφαλής. Για το λόγο αυτό υπάρχουν αλγόριθμοι που υπολογίζουν την αμφιβρεγματική διάμετρο με βάση τις ανωτέρω ασυμμετρίες. Οι παράμετροι BPD, HC, FL παρουσιάζουν μικρή διακύμανση σε σχέση με την παράμετρο AC μεταξύ της 14^{ης} και 20^{ης} εβδομάδας της κύησης⁴. Να σημειωθεί ότι δεν υπάρχουν προκαθορισμένα όρια για τους παραπάνω βιομετρικούς δείκτες που να αποδεικνύουν την IUGR κατάσταση^{26,27}.

Επιπλέον υπερηχογραφικές παράμετροι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση της IUGR περιλαμβάνουν το λόγο της περιφέρειας της κεφαλής προς την περίμετρο της κοιλιάς του εμβρύου (HC/AC), το λόγο του μήκους του μηριαίου οστού προς την περίμετρο της κοιλιάς (FL/AC) και τον

δείκτη PI (ponderal index). Ο δείκτης PI υπολογίζεται με βάση το εκτιμώμενο βάρος και μήκος του εμβρύου. Οι λόγοι HC/AC και FL/AC και ο δείκτης PI μπορούν να προβλέψουν με ακρίβεια τις περιπτώσεις ασύμμετρης IUGR^{28,29}.

Στην κλινική πράξη, για την εκτίμηση εμβρυικού βάρους και την ανίχνευση της IUGR, προκρίνεται η χρήση προσαρμοσμένων διαγραμμάτων ελέγχου ανάπτυξης όπου συμπεριλαμβάνονται πληροφορίες που αφορούν τη μητέρα (δείκτης βάρους σώματος, τόκος, εθνικότητα) και το έμβρυο (ηλικία κύησης, φύλο)³⁰⁻³². Για την εκτίμηση της πορείας ανάπτυξης του μωρού πρέπει να ληφθούν διαδοχικές υπερηχογραφικές μετρήσεις σε διάστημα όχι μικρότερο από 2 εβδομάδες^{33,34}.

Επιπλέον προγεννητικές εξετάσεις που χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση της IUGR περιλαμβάνουν τη μέτρηση της ροής του αίματος στα αγγεία της μήτρας και του ομφάλιου λώρου με τη μέθοδο Doppler⁴. Το παθολογικό Doppler στις αρτηρίες της μήτρας συνδέεται με την IUGR³⁵. Στην περίπτωση της υπολειπόμενης ανάπτυξης του εμβρύου, μειώνεται η σπλαχνική αιματική ροή ενώ διατηρείται η ροή του αίματος στον εγκέφαλο, το μυοκάρδιο και τα επινεφρίδια³⁶. Παρόλο που η εξέταση Doppler στις αρτηρίες της μήτρας δεν προκρίνεται για την ανίχνευση της IUGR σε περιπτώσεις κυήσεων χαμηλού ρίσκου, ωστόσο χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της πορείας της εμβρυικής αύξησης σε IUGR στο πρώτο τρίμηνο της κύησης⁴.

Επιπρόσθετα, η χαμηλή τιμή της πρωτεΐνης A (PAPP-A) και της ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG) στο πλάσμα κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης και οι αυξημένοι δείκτες AFP, HCG και ινχιμπίνη A έχουν σχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο IUGR κύησης³⁷⁻³⁹.

Η μέτρηση SFH παρέχει μικρή ακρίβεια στον προσδιορισμό της IUGR. Φυσιολογική χαρακτηρίζεται η ανάπτυξη του εμβρύου όταν η τιμή SFH (απόσταση ηβικής σύμφυσης- πυθμένα μήτρας) είναι ± 2 ή ± 3 cm με βάση την εβδομάδα κύησης⁴⁰. Στο Σχήμα 1.8 δίνεται η μέτρηση SFH σε μια έγκυο με βάση την οποία γίνεται η εκτίμηση του βάρους του νεογνού.

Σχήμα 1.8. Υπολογισμός βάρους μωρού με βάση τη μέτρηση SFH. (Α) Μέτρηση SFH, (Β) Εκτίμηση βάρους νεογνού²⁵.

1.5. Παθολογίες που συνδέονται με την IUGR

Η IUGR σχετίζεται με μια σειρά άμεσων περιγεννητικών επιπλοκών, όπως: υποθερμία, υπογλυκαιμία, υπεργλυκαιμία, επίμονη πνευμονική υπέρταση, πνευμονική αιμορραγία, πολυκυτταραιμία, ασφυξία, πρόωρο τοκετό και θάνατο²³. Η IUGR συνδέεται ωστόσο με μακροχρόνιες συνέπειες όπως είναι το μεταβολικό σύνδρομο, η παχυσαρκία, η στεφανιαία νόσος, η υπέρταση, η δυσλιπιδαιμία, ο διαβήτης τύπου 2 και οι χρόνιες παθήσεις στα νεφρά και τους πνεύμονες⁴¹⁻⁴⁴. Στο Σχήμα 1.9 παρουσιάζονται οι μακροχρόνιες παθολογικές καταστάσεις που συνδέονται με την IUGR.

Σχήμα 1.9. Μακροχρόνιες παθολογίες που συνδέονται με την IUGR.

Οι χρόνιες παθήσεις αργότερα στην παιδική ηλικία, την εφηβεία και την ενήλικη ζωή οφείλονται σε “διαφορετικό προγραμματισμό” του εμβρύου λόγω της επίδρασης του βλαπτικού ερεθίσματος σε ένα κρίσιμο στάδιο της εμβρυικής αύξησης που εκτρέπει μόνιμα τη δομή, το μεταβολισμό και την εμβρυική φυσιολογία⁴⁵. Για παράδειγμα ο υποσιτισμός στο στάδιο της ταχείας αύξησης του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, επιδρά στο σχηματισμό των νευρώνων, με απώτερη επίπτωση στη νευροανάπτυξη του ατόμου^{46,47}.

Ο Barker⁴⁸ ήταν ο πρώτος που υπέθεσε ότι οι διαταραχές της ενδομήτριας αύξησης σχετίζονται με την απώτερη εκδήλωση νοσημάτων φθοράς στην ενήλικη ζωή. Πιο συγκεκριμένα, πρότεινε τη σύνδεση μεταξύ του χαμηλού βάρους των νεογνών και του αυξημένου κινδύνου ανάπτυξης καρδιαγγειακών παθήσεων. Οι Hales και Barker¹⁶ ανέπτυξαν την υπόθεση του «λιτού φαινοτύπου» (thrifty phenotype) σύμφωνα με την οποία η αντίσταση στην ινσουλίνη και ο διαβήτης τύπου 2 που εκδηλώνονται στην ενήλικη ζωή πιθανόν να συνδέονται με τις συνθήκες υποσιτισμού που επικρατούν κατά την ενδομήτρια ζωή, με συνέπεια την ανάπτυξη από το έμβρυο μηχανισμών προσαρμογής ώστε να διατηρήσει τα επίπεδα γλυκόζης για την επιβίωσή του.

Η αυξημένη ευαισθησία των IUGR νεογνών στην ινσουλίνη και η ταχεία αναπληρωματική αύξηση που εμφανίζουν μετά τη γέννηση (catch up growth) οδηγούν σταδιακά στην εμφάνιση αντίστασης στην ινσουλίνη⁴⁹. Με βάση τη βιβλιογραφία, τόσο η ινσουλίνη όσο και ο αυξητικός παράγοντας 1 (IGF-1) που εμφανίζει παρόμοια με την ινσουλίνη αναβολική δράση, εντοπίζονται σε χαμηλότερη συγκέντρωση στα IUGR νεογνά σε σχέση με τα AGA⁵⁰, επιβεβαιώνοντας την παραπάνω συσχέτιση.

Η IUGR, όπως ήδη αναφερθεί, σχετίζεται με τη μείωση της μεταφοράς του οξυγόνου ή/και των θρεπτικών συστατικών από τη μητέρα στο νεογνό⁵. Η έκθεση σε συνθήκες υποξίας και υποσιτισμού προάγει την ενεργοποίηση του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων σαν μηχανισμό προσαρμογής απέναντι στο αυξημένο στρες. Τα IUGR νεογνά εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης και μειωμένα επίπεδα αδρενοκορτικοτρόπου ορμόνης (ACTH) ως αποτέλεσμα της παραπάνω ενεργοποίησης⁵¹.

1.6. Μεταβολωμικές προσεγγίσεις και βιοδείκτες στην ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη

Τα τελευταία χρόνια, η μεταβολωμική χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο στην Νεογνολογία με σκοπό τη διερεύνηση των μοριακών-βιοχημικών διαταραχών που συνδέονται με παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς και την ανίχνευση δεικτών έγκαιρης διάγνωσης παθολογικών καταστάσεων που πιθανόν να συνδέονται με χρόνιες παθήσεις.

Στην κατεύθυνση αυτή, η μεταβολωμική αποτελεί πολύτιμο εργαλείο στην εξερεύνηση μεταβολικών διαταραχών στις περιπτώσεις ενδομήτριας υπολειπόμενης ανάπτυξης και στην πρόβλεψη της πιθανής σύνδεσης της IUGR με νοσήματα φθοράς. Οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα τόσο σε πειραματόζωα⁵² όσο και σε βιολογικά υγρά νεογνών (π.χ. ομφαλικό αίμα και ούρα) έχουν αναδείξει αλλαγές στο μεταβολικό αποτύπωμα νεογνών με IUGR, χωρίς ωστόσο κάποιος μεταβολίτης να είναι επαρκώς επικυρωμένος ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια στη κλινική πρακτική ως βιοδείκτης για την έγκαιρη διάγνωση της IUGR παθολογίας⁵³. Ωστόσο, υπάρχει σύνδεση της IUGR παθολογίας με το μη φυσιολογικό

μεταβολισμό των αμινοξέων, τη δυσανεξία στη γλυκόζη και την αντίσταση στην ινσουλίνη⁴⁵.

Η πρώτη μεταβολωμική μελέτη πάνω στην ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη αφορούσε στη διερεύνηση του μεταβολικού προφίλ των πρόωρων IUGR νεογνών σε σχέση με τα πρόωρα AGA νεογνά. Η έρευνα αφορούσε δείγματα ούρων από τη πρώτη και τέταρτη μέρα της γέννησής τους. Μεταξύ των μεταβολιτών που διέφεραν ανάμεσα στις 2 ομάδες, η μυο-ινοσιτόλη, η κρεατίνη, η κρεατινίνη και η σαρκosίνη βρέθηκαν σημαντικά αυξημένες στα IUGR νεογνά. Με βάση τους προτεινόμενους μεταβολίτες εντοπίστηκαν τρία μεταβολικά μονοπάτια που διαταράσσονται στην IUGR τα οποία περιλαμβάνουν το μεταβολισμό της αργινίνης και της προλίνης, τον κύκλο της ουρίας και το μεταβολισμό της γλυκίνης, σερίνης και θρεονίνης⁵⁴. Ωστόσο, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, αύξηση της μυο-ινοσιτόλης δεν παρατηρείται μόνο στα τελειόμηνα IUGR νεογνά αλλά και τα LGA νεογνά (που αποτελούν επίσης ομάδα νεογνών με ανώμαλη/αυξημένη εμβρυική αύξηση) σε σχέση με τα αντίστοιχα AGA^{55,56}. Η αύξηση της μυο-ινοσιτόλης συνδέθηκε με τη δυσανεξία στη γλυκόζη και την αντίσταση στην ινσουλίνη στην εφηβεία⁵⁷. Μεταβολίτες κλειδιά για τη διαφοροποίηση των IUGR νεογνών αποτελούν επίσης η θρεονίνη, το κιτρικό οξύ, η βεταΐνη, η γλυκίνη, η ουρία, το ηλεκτρικό οξύ, η γλυκερόλη, η γλυκόζη και το ουρικό οξύ⁵⁵⁻⁵⁷.

Σε μία άλλη μεταβολωμική μελέτη⁵⁸ που αφορούσε δείγματα ομφαλικού αίματος, εντοπίστηκαν 22 μεταβολίτες που διαφοροποιούν τις 2 ομάδες (IUGR και AGA νεογνά). Από τους προτεινόμενους μεταβολίτες, η φαινυλαλανίνη, η θρυπτοφάνη και το γλουταμινικό οξύ αποτελούν «κλειδιά» στο διαχωρισμό των 2 ομάδων. Οι διαφορές των αμινοξέων φαινυλαλανίνη και γλουταμινικό οξύ στις 2 ομάδες πιθανόν οφείλονται στο διαφορετικό μεταβολισμό του πλακούντα ή στον διαφορετικό τρόπο μεταφορά τους από τον πλακούντα. Από την άλλη μεριά, η θρυπτοφάνη αποτελεί πρόδρομη ένωση της σεροτονίνης και η διαφορά που έχει στις 2 ομάδες πιθανόν οφείλεται στον τρόπο λειτουργίας του μεταβολικού μονοπατιού της σύνθεσης της σεροτονίνης στον εγκέφαλο⁵⁸.

Παρόμοιες τάσεις εντοπίστηκαν σε μία ανάλογη μεταβολωμική μελέτη σε ομφαλικά δείγματα αίματος από δίδυμα νεογνά. Οι ομάδες IUGR και AGA

διέφεραν ως προς τις συγκεντρώσεις των αμινοξέων φαινυλαλανίνη, βαλίνη, ισολευκίνη, θρυπτοφάνη και προλίνη. Ωστόσο, η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε μικρό αριθμό δειγμάτων και τα αποτελέσματα ήταν στατιστικώς μη σημαντικά⁵⁹.

Οι Sanz-Cortés και συν. ξεχώρισαν τα IUGR και AGA νεογνά σε 2 ομάδες (πρόωρα και τελειόμηνα) και μελέτησαν ξεχωριστά το μεταβολικό προφίλ της κάθε ομάδας. Τα τελειόμηνα IUGR διαχωρίστηκαν περαιτέρω σε 2 υπο-ομάδες ανάλογα με την τιμή του δείκτη παλμικότητας στην εξέταση Doppler ($PI < 5^{\text{η}}$ εκατοστιαία θέση και $PI > 5^{\text{η}}$ εκατοστιαία θέση). Παρατήρησαν ένα κοινό μεταβολικό προφίλ στα πρόωρα και τελειόμηνα IUGR που χαρακτηρίζεται από την αύξηση των ακόρεστων λιπιδίων και των λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL) και τη μείωση της χολίνης στα IUGR σε σχέση με τα AGA νεογνά. Ωστόσο εντόπισαν επιμέρους διαφορές σε κάθε ομάδα και υποομάδα που μελετήθηκε και χαρακτήρισαν την IUGR σαν μία ετερογενή ασθένεια με διαφορετικό μεταβολικό μοτίβο ανάλογα με τα κλινικά χαρακτηριστικά που εκδηλώνονται⁶⁰.

Οι Abd El-Wahed και συν. χρησιμοποίησαν την πολύ ευαίσθητη τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υπερ-υψηλής απόδοσης συζευγμένης με τη φασματομετρία μαζών (UPLC-MS) για την ανίχνευση περισσότερων μεταβολιτών και τη μελέτη του μεταβολικού προφίλ των IUGR και AGA νεογνών. Τα IUGR νεογνά φέρουν υψηλότερες συγκεντρώσεις σε ακυλοκαρνιτίνες (κυρίως C18-OH και C16-OH), αμινοξέα διακλαδισμένης ανθρακικής αλυσίδας (λευκίνη, ισολευκίνη και βαλίνη) και αμινοξέα όπως η γλουταμίνη, η αλανίνη, το ασπαρτικό οξύ, η αργινίνη, το γλουταμινικό οξύ, η τυροσίνη, η ορνιθίνη και η κιτρουλίνη⁶¹.

Η γλουταμίνη αποτελεί πηγή ενέργειας των κυττάρων στα έμβρυα, ενώ έχει καθοριστικό ρόλο στην νευροανάπτυξη. Η αύξηση της γλουταμίνης θα μπορούσε να αποδοθεί στη συσχέτιση της IUGR με την αύξηση του ρυθμού καταβολισμού ώστε να αντισταθμιστεί η έλλειψη πηγών ενέργειας του εμβρύου. Οι ακυλοκαρνιτίνες αποτελούν επίσης σημαντική πηγή ενέργειας καθώς εμπλέκονται στο μονοπάτι της οξειδωσης των λιπαρών οξέων. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ακυλοκαρνιτίνες συνδέονται με τον διαβήτη τύπου 2 που δυνητικά αποτελεί μακροχρόνια επιπλοκή της IUGR⁶¹.

Το μεταβολικό προφίλ των IUGR νεογνών διαφέρει από εκείνο των AGA νεογνών 3-7 μέρες μετά τη γέννησή τους, ανάλογα με τη θέση που βρίσκονται τα IUGR νεογνά στην εκατοστιαία κλίμακα βάρους. Τα IUGR νεογνά με βάρος μικρότερο της 3^{ης} εκατοστιαίας θέσης διαφέρουν σε σχέση με τα AGA ως προς τους μεταβολίτες αλανίνη, μεθειονίνη, ορνιθίνη, σερίνη, τυροσίνη, ισοβαλέρυλο καρνιτίνη και εικοσενοϋλο καρνιτίνη, που εντοπίζονται σε χαμηλότερη συγκέντρωση. Ωστόσο, τα IUGR νεογνά με βάρος μεταξύ της 3^{ης} και της 5^{ης} εκατοστιαίας θέσης εμφάνισαν υψηλότερες συγκεντρώσεις από τα παραπάνω αμινοξέα (μικρότερες σε σχέση με τα AGA) πιθανόν λόγω ενός αντισταθμιστικού μηχανισμού⁶².

Με βάση μία μεταβολωμική μελέτη που αφορούσε δίδυμες IUGR και AGA κυήσεις, τα μεταβολικά μονοπάτια που επηρεάζονται σε μεγαλύτερο βαθμό από την IUGR περιλαμβάνουν το μεταβολισμό της μεθειονίνης-κυστεΐνης, το μεταβολισμό της φαινυλαλανίνης και το μεταβολισμό της τυροσίνης⁶³.

Οι Bahado-Singh και συν. χρησιμοποίησαν για πρώτη φορά 2 διαφορετικές τεχνικές ανάλυσης (¹H-NMR και LC-MS) για την αποτύπωση του μεταβολικού προφίλ των IUGR κυήσεων σε σχέση με τις AGA κυήσεις. Χρησιμοποίησαν τρεις διαφορετικούς αλγορίθμους για την επιλογή των πιο σημαντικών μεταβολιτών της IUGR. Με βάση τα αποτελέσματα, η κρεατινίνη, η ακετυλοκαρνιτίνη, η βουτυρυλοκαρνιτίνη, μία φωσφατιδυλοχολίνη (PC aa C24:0) και τρεις λυσοφωσφατιδυλοχολίνες (lysoPC a C16:1, lysoPC a C20:3, lysoPC a C28:1) αποτελούν χαρακτηριστικούς αλλά και στατιστικώς σημαντικούς μεταβολίτες της IUGR. Από την ανάλυση εμπλουτισμού, προέκυψαν συνολικά 7 μεταβολικά μονοπάτια που επηρεάζονται στατιστικώς σημαντικά από την IUGR τα οποία περιλαμβάνουν τη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων πολύ μακριάς αλυσίδας, την οξείδωση των λιπαρών οξέων διακλαδισμένης αλυσίδας, τη βιοσύνθεση των φωσφολιπιδίων, την αποικοδόμηση της λυσίνης, το μεταβολισμό της μεθειονίνης, το κύκλο της ουρίας και το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων. Τα περισσότερα από τα παραπάνω μεταβολικά μονοπάτια πραγματοποιούνται στο ήπαρ, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η λειτουργία του ήπατος διαταράσσεται λόγω της IUGR⁶⁴.

Στον Πίνακα 1 δίνονται οι μεταβολικές μελέτες που αφορούν την IUGR παθολογία και τα πιο σημαντικά ευρήματα.

Πίνακας 1: Μεταβολωμικές μελέτες που αφορούν την ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη.

Μελέτη	Αντικείμενο	Δείγματα	Τεχνική	Αποτελέσματα
Dessi ⁵⁴	26 πρόωρα IUGR vs 30 πρόωρα AGA	Ούρα • 1 ^η μέρα • 4 ^η μέρα	¹ H-NMR	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ μυο-ινοσιτόλη, σαρκοσίνη, κρεατίνη, κρεατινίνη (IUGR) • μεταβολισμός αργινίνης και προλίνης, • κύκλος ουρίας • μεταβολισμό της γλυκίνης, σερίνης και θρεονίνης
Favretto ⁵⁸	22 IUGR vs 22 AGA	Ομφαλικό αίμα	LC-MS	<ul style="list-style-type: none"> • 3 μεταβολίτες κλειδιά • ↑ Φαινυλαλανίνη, γλουταμινικό οξύ, θρυπτοφάνη (IUGR)
Cosmi ⁵⁹	4 δίδυμα IUGR vs 4 δίδυμα AGA	Ομφαλικό αίμα	LC-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Διαφοροποίηση φαινυλαλανίνης, βαλίνης, ισολευκίνης, θρυπτοφάνης, προλίνης (στατιστικά μη σημαντική)
Sanz-Cortés ⁶⁰	(α) 20 πρόωρα IUGR vs 23 πρόωρα AGA (β) 56 τελειόμηνα IUGR vs 55 τελειόμηνα AGA	Ομφαλικό αίμα	¹ H-NMR	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ VLDL, ακόρεστα λιπίδια (IUGR) • ↓ χολίνη (IUGR) <p>Διαφορετικό μεταβολικό μοτίβο (α) και (β)</p>
Barberini ⁵⁷	11 IUGR & 12 LGA vs	Ούρα	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ ινοσιτόλη (IUGR+LGA)

	10 AGA	(12 ώρες)		Διαφοροποίηση ουρία, γλυκερόλη, γλυκόζη, κιτρικό οξύ, ουρικό οξύ
Dessi ⁵⁵	12 IUGR & 12 LGA vs 17 AGA	Ούρα (8 ώρες)	¹ H-NMR	<ul style="list-style-type: none"> ↑ ινοσιτόλη (IUGR & LGA) <p>Διαφοροποίηση κρεατίνη, κρεατινίνη, βεταΐνη, κιτρικό οξύ, γλυκίνη, ουρία</p>
Marincola ⁵⁶	8 IUGR vs 8 AGA	Ούρα <ul style="list-style-type: none"> 8 ώρες 4^η μέρα 7^η μέρα 	¹ H-NMR	<ul style="list-style-type: none"> ↑ μυο-ινοσιτόλη, κιτρικό οξύ, γλυκίνη (IUGR) ↓ βεταΐνη, κρεατινίνη, ηλεκτρικό οξύ (IUGR)
Abd El-Wahed ⁶¹	40 IUGR vs 20 AGA	Ομφαλικό αίμα	LC-MS	<ul style="list-style-type: none"> ↑ ακυλοκαρνιτίνες (κυρίως C18-OH και C16-OH), αμινοξέα διακλαδισμένης ανθρακικής αλυσίδας, αλανίνη, γλουταμίνη, ασπαρτικό οξύ, αργινίνη, τυροσίνη, ασπαρτικό οξύ, ορνιθίνη, κιτρουλίνη (IUGR) ↓ ιστιδίνη, μεθειονίνη (IUGR)
Liu ⁶²	60 IUGR vs 60 AGA	Κηλίδες αίματος (3-7 μέρες)	LC-MS	<ul style="list-style-type: none"> ↓ αλανίνη, μεθειονίνη, ορνιθίνη, σερίνη τυροσίνη (IUGR<3^η εκατ. θέση)
Wang ⁶³	15 δίδυμα ζεύγη IUGR vs	Ομφαλικό αίμα	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> Μεταβολισμός μεθειονίνης-κεστεΐνης

	24 δίδυμα ζεύγη AGA			<ul style="list-style-type: none"> • Μεταβολισμός φαιτυλαανίνης • Μεταβολισμός τυροσίνης
Bahado-Singh ⁶⁴	40 IUGR vs 40 AGA	Ομφαλικό αίμα	LC-MS & ¹ H-NMR	<ul style="list-style-type: none"> • β-οξείδωση λιπαρών οξέων πολύ μακριάς αλυσίδας • οξείδωση των λιπαρών οξέων διακλαδισμένης αλυσίδας • βιοσύνθεση φωσφολιπιδίων • αποικοδόμηση λυσίνης • μεταβολισμός μεθειονίνης • κύκλος ουρίας • μεταβολισμός λιπαρών οξέων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. NMR-MΕΤΑΒΟΛΩΜΙΚΗ

2.1. Ολιστικές προσεγγίσεις

Μεταβολίτες χαρακτηρίζονται οι μικρού μοριακού βάρους ενώσεις (<1 kDA) που εντοπίζονται στα βιολογικά συστήματα (π.χ. αίμα, ούρα, ιστοί)⁶⁵. Η μεταβολωμική (metabolomics) αποτελεί μέρος της βιολογίας συστημάτων (Σχήμα 2.1) και αναφέρεται στη συστηματική μελέτη όλων των μεταβολιτών χαμηλού μοριακού βάρους σ' ένα βιολογικό σύστημα^{66,67}. Πρόκειται στην ουσία για ενδιάμεσα ή τελικά προϊόντα ή/και παραπροϊόντα του μεταβολισμού όπως αμινοξέα, αλκοόλες, λιπίδια ή βιταμίνες.

Σχήμα 2.1. Ολιστική προσέγγιση βιολογικών συστημάτων.

Τα βιολογικά συστήματα έχουν μοναδική και χαρακτηριστική βιοχημική σύσταση η οποία μεταβάλλεται με την επίδραση κάποιου εσωτερικού ή/και εξωτερικού ερεθίσματος δημιουργώντας το ονομαζόμενο 'μεταβολικό αποτύπωμα'⁶. Η μεταβολωμική φωτίζει τη μεταβολική εικόνα των ζωντανών οργανισμών όπως διαμορφώνεται υπό την επίδραση π.χ. μίας παθολογικής κατάστασης - ασθένειας⁶⁷, ενός φαρμάκου⁶⁸ ή μιας διατροφής⁶⁹, με σκοπό τη κατανόηση των βιολογικών ή/και βιοχημικών μηχανισμών των υπό μελέτη συστημάτων⁶.

Σκοπός της μεταβολωμικής είναι η ανίχνευση και επικύρωση των στατιστικώς σημαντικών μεταβολιτών (βιοδείκτες) εστιάζοντας στη πρόγνωση, διάγνωση ή/και θεραπευτική αξιολόγηση διαφόρων ασθενειών^{6,67}. Οι τεχνικές αναλυτικής χημείας που συνήθως χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και την υγρή ή αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με τη φασματομετρία μαζών (LC/GC-MS)⁷⁰. Κάθε μία από τις παραπάνω τεχνικές προσφέρει μοναδικά πλεονεκτήματα και πολλές φορές κρίνεται απαραίτητος ο συνδυασμός τους.

Η μεταβολωμική μελέτη μπορεί να είναι στοχευμένη (targeted) οπότε εξετάζει μία συγκεκριμένη ομάδα ενώσεων ή μη-στοχευμένη - ολιστική (untargeted) οπότε εξετάζει όσο το δυνατόν περισσότερες ενώσεις παρέχοντας τη συνολική εικόνα του μεταβολισμού⁷¹.

Τα δεδομένα που προκύπτουν ωστόσο είναι πολύπλοκα και ογκώδη εξαιτίας του πλήθους των μεταβολιτών που υπάρχουν στα βιολογικά υποστρώματα. Η ανάλυση και ερμηνεία τέτοιων δεδομένων βασίζεται στη πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση (multivariate statistical analysis), η οποία μπορεί να ανιχνεύσει μικρές διακυμάνσεις μέσα σε ένα πλήθος δεδομένων, παράγει μοντέλα διαφοροποίησης και προτείνει στατιστικώς σημαντικές ενώσεις ως βιοδείκτες⁷⁰.

2.2. Αναλυτικές προσεγγίσεις στη μεταβολωμική

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance-NMR) είναι μία σύγχρονη αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για το προσδιορισμό της δομής των μορίων⁷². Βρίσκει εφαρμογή σε διάφορους τομείς μεταξύ των οποίων είναι η χημεία, η βιολογία, η φαρμακευτική και η ιατρική. Τα τελευταία χρόνια, η τεχνική NMR μαζί με την υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με τη φασματομετρία μάζας (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS) και την αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με τη φασματομετρία μάζας (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS) βρίσκει ευρεία εφαρμογή στη βιολογία συστημάτων (systems biology)⁷³.

Κάθε μία από τις παραπάνω τεχνικές προσφέρει μοναδικά πλεονεκτήματα. Στη φασματοσκοπία NMR η προετοιμασία του δείγματος είναι ελάχιστη, χωρίς να

χρειάζεται διαχωρισμός ή κάποιου είδους παραγωγοποίησης του δείγματος. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για τον ποιοτικό όσο και για τον ποσοτικό προσδιορισμό ευρέος φάσματος ενώσεων σε σύντομο χρονικό διάστημα και αποτελεί μία μη καταστρεπτική αναλυτική τεχνική. Επιπλέον είναι δυνατή η ταυτοποίηση των ενώσεων χωρίς πρότυπα είτε με 2D NMR πειράματα, είτε μέσα από βάσεις δεδομένων (π.χ. πλατφόρμα Chemomx), γεγονός που περιορίζει το κόστος της ανάλυσης. Το κυριότερο χαρακτηριστικό της τεχνικής αυτής είναι η υψηλή επαναληψιμότητά της⁷⁴⁻⁷⁸. Σε σύγκριση όμως με τις φασματομετρικές μεθόδους ανάλυσης μαζών (LC-MS και GC-MS), έχει το μειονέκτημα της χαμηλής ευαισθησίας⁷⁴⁻⁷⁸, γεγονός που περιορίζει τον αριθμό των ενώσεων που μπορούν να μετρηθούν στο υπό-μελέτη σύστημα. Στον Πίνακα 2.1 συνοψίζονται τα βασικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των τεχνικών NMR και MS (LC-MS και GC-MS).

Πίνακας 2.1: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα τεχνικών NMR και MS στη μεταβολωμική ανάλυση^{74–78}.

	NMR	MS (LC-MS, GC-MS)
Πλεονεκτήματα	Υψηλή επαναληψιμότητα	Υψηλή ευαισθησία, ανάλογα με τον ανιχνευτή (nM-pM)
	Ελάχιστη προετοιμασία	Ανίχνευση ενώσεων με μικρότερη συγκέντρωση
	Μικρός χρόνος ανάλυσης	Μεγάλη εκλεκτικότητα (στοχευμένη ανάλυση)
	Δεν απαιτείται παραγωγοποίηση	Μικρός όγκος (1-10μL)
	Δεν απαιτείται διαχωρισμός	Ταυτοποίηση από βιβλιοθήκες στο GC-MS
	Μη καταστρεπτική τεχνική	
	Δεν απαιτούνται πρότυπα (μικρότερο κόστος)	
Μειονεκτήματα	Χαμηλή ευαισθησία (μM)	Μικρή επαναληψιμότητα
	Ανίχνευση ενώσεων με μεγαλύτερη συγκέντρωση	Καταστρεπτική τεχνική
	Μεγάλος όγκος (100μL)	Μεγάλος χρόνος ανάλυσης (μπορεί να ξεπεράσει τη 1 ώρα)
	Ακριβός εξοπλισμός	Απαιτητική προετοιμασία, διαχωρισμός ενώσεων (επιλογή στήλης, συνθηκών ανάλυσης)
		Παραγωγοποίηση στο GC-MS
		Ταυτοποίηση με πρότυπα στο LC-MS (αύξηση κόστους)
		Ακριβός εξοπλισμός

Με βάση μία πρόσφατη συγκριτική μεταβολωμική μελέτη στον ορό ανθρώπινου αίματος⁷⁹, ο αριθμός των μεταβολιτών που ταυτοποιήθηκαν με τη τεχνική του

NMR ήταν περίπου 50 και αφορούσε ενώσεις με συγκέντρωση μεγαλύτερη από $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, ενώ ο αριθμός των μεταβολιτών που ταυτοποιήθηκαν με τη τεχνική του MS ήταν μεγαλύτερος από 90 (ανάλογα με τη χρωματογραφική τεχνική, GC ή LC) και περιλάμβανε και ενώσεις με συγκέντρωση μικρότερη από $10 \mu\text{mol L}^{-1}$.

2.3. Τεχνικές Φασματοσκοπίας NMR. Φάσματα μίας διάστασης (1D-NMR)

Η φασματοσκοπία NMR μίας διάστασης (1D-NMR) αποτελεί τη πιο συνηθισμένη τεχνική λήψης ενός φάσματος πρωτονίου. Αποτελείται από μία επαναλαμβανόμενη ακολουθία τριών σταδίων που περιλαμβάνει: τη προετοιμασία του δείγματος (relaxation delay), την ακτινοβόλησή του μ' ένα παλμό διέγερσης (pulse excitation) και τον χρόνο καταγραφής των σημάτων (acquisition time) (Σχήμα 2.2)^{72,80}.

Σχήμα 2.2. Διαγραμματική απεικόνιση ενός 1D-NMR πειράματος.

Αρχικά οι πυρήνες είναι σε θερμική ισορροπία. Τα πυρηνικά spin είναι προσανατολισμένα παράλληλα ή αντιπαράλληλα σε σχέση με το εξωτερικό σταθερό μαγνητικό πεδίο και ο πληθυσμός της χαμηλότερης ενεργειακής στάθμης (spin παράλληλα ως προς το μαγνητικό πεδίο) είναι ελαφρώς πλεονάζων.

Στη συνέχεια, εφαρμόζεται ο παλμός διέγερσης των πυρήνων (pulse excitation), συνήθως υπό γωνία $\theta=90^\circ$, οπότε τα spin των πλεονάζοντων πυρήνων μεταπίπτουν στην κατάσταση υψηλότερης ενέργειας και εξισώνεται ο πληθυσμός των δύο ενεργειακών σταθμών. Με την παύση του παλμού, οι

πυρήνες αποδιεγείρονται, οπότε τα σπιν των πυρήνων επανέρχονται στην αρχική ενεργειακή τους κατάσταση.

Η ενέργεια που έχει απορροφηθεί, εκπέμπεται και ανιχνεύεται μέσω της τάσης που επάγεται σε συγκεκριμένα πηνία. Το αναλογικό σήμα που καταγράφεται είναι μία φθίνουσα ταλάντωση και ονομάζεται FID (Free Induction Decay), ενώ με τη βοήθεια του μετασχηματισμού Fourier το σήμα που λαμβάνεται μετατρέπεται από το πεδίο του χρόνου στο πεδίο των συχνοτήτων προκειμένου να καταγραφεί το φάσμα $^1\text{H-NMR}$.

Ο χρόνος που μεσολαβεί από την παύση του παλμού μέχρι την αποδιέγερση των πυρήνων και την καταγραφή των σημάτων αντιστοιχεί στο χρόνο καταγραφής (acquisition time). Η συνολική ακολουθία διαρκεί ελάχιστα δευτερόλεπτα, ωστόσο για την αύξηση της ευαισθησίας, λόγος σήματος προς θόρυβο (S/N), επαναλαμβάνεται αρκετές φορές (αύξηση των σαρώσεων, scans)^{72,80}.

2.3.1. Καταστολή σήματος διαλύτη

Η συγκέντρωση του νερού στα βιολογικά δείγματα είναι πολύ υψηλή σε σχέση με τους υπόλοιπους μεταβολίτες. Η μεταβολωμική ανάλυση των βιολογικών δειγμάτων με τη τεχνική του $^1\text{H-NMR}$ απαιτεί τη περιστολή του σήματος του νερού (water suppression). Εφαρμόζονται διάφορες τεχνικές για την καταστολή του σήματος του νερού. Συνήθως, εφαρμόζεται η ακολουθία presat όπου το σήμα του νερού ακτινοβολείται εκλεκτικά πριν την εφαρμογή του ισχυρού παλμού διέγερσης (Σχήμα 2.3). Η συνεχής ακτινοβολία του σήματος του νερού εμποδίζει την αποδιέγερση των σπιν των πρωτονίων του με αποτέλεσμα να μην ανιχνεύεται το σήμα του νερού και να ενισχύεται με αυτό τον τρόπο το σήμα των υπόλοιπων μεταβολιτών που βρίσκονται σε χαμηλότερη συγκέντρωση. Συνήθως, εφαρμόζεται σε συνδυασμό με την κύρια παλμική ακολουθία του πειράματος όπως η 1D-NOESYpresat, η οποία χρησιμοποιείται κυρίως στην ανάλυση των βιολογικών δειγμάτων^{80,81}.

Σχήμα 2.3. Διαγραμματική απεικόνιση της παλμοσειράς presat για την καταστολή του σήματος του νερού.

2.3.2. Καταστολή σήματος πρωτεϊνών

Τα βιολογικά δείγματα είναι πλούσια σε πρωτεΐνες⁸². Οι πρωτεΐνες δίνουν ευρείες και ισχυρές κορυφές στο $^1\text{H-NMR}$ που αλληλεπικαλύπτουν και επισκιάζουν τα σήματα των πρωτονίων πολλών μεταβολιτών⁸³. Η ακολουθία Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) εφαρμόζεται για την καταστολή του σήματος των μακρομορίων, όπως είναι οι πρωτεΐνες, επιτρέποντας την ανίχνευση των δευτερογενών μεταβολιτών καθιστώντας τα φάσματα που λαμβάνονται είναι πιο «καθαρά»^{84,85}. Η παλμική ακολουθία CPMG εφαρμόζεται μετά τη καταστολή του σήματος του νερού (presat) και την εφαρμογή του παλμού των 90° (x) όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.4. Ακολούθως, στο Σχήμα 2.5 φαίνεται η ανάλυση ενός δείγματος ορού αίματος με τις τεχνικές cpmgpresat και noesympresat. Με την τεχνική cpmgpresat το φάσμα είναι απαλλαγμένο από τις ευρείες κορυφές των πρωτεϊνών ενώ ο διαχωρισμός των κορυφών είναι πιο αποτελεσματικός.

Σχήμα 2.4. Διαγραμματική απεικόνιση της παλμοσειράς cpmgpresat για την ανάλυση βιολογικών δειγμάτων.

Σχήμα 2.5. Συγκριτική απεικόνιση φασμάτων δείγματος ορού αίματος (α) με την ακολουθία cpmgpresat και (β) με την ακολουθία noesypresat⁸⁶.

2.4. Αποτίμηση μεταβολιτών με φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων (2D-NMR)

Η μονοδιάστατη φασματοσκοπία NMR (1D-NMR) σε συνδυασμό με την πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση αποτελεί τη μέθοδο επιλογής για τη μεταβολωμική ανάλυση των βιολογικών δειγμάτων. Τα βιολογικά δείγματα είναι πλούσια σε οργανικές ενώσεις όπως πρωτεΐνες, λιπίδια, αμινοξέα, σάκχαρα ή οργανικά οξέα. Στη φασματοσκοπία ^1H -NMR, κάθε ένωση συντονίζεται σε διαφορετικές περιοχές του φάσματος ανάλογα με τα διαφορετικά είδη πυρήνων που διαθέτει και το χημικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα σήματα πολλών ενώσεων να αλληλεπικαλύπτονται και να καθίσταται δύσκολη έως αδύνατη η διάκριση και ταυτοποίησή τους. Με τη χρήση ενός πιο ισχυρού μαγνήτη ή κρυογενικού αισθητήρα (Cryoprobe), επιτυγχάνεται μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα και περιορίζεται ως ένα βαθμό η αλληλοεπικάλυψη των σημάτων.

Με τη φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων (2D-NMR) καθίσταται δυνατή η αναγνώριση των σημάτων που αλληλεπικαλύπτονται επιτρέποντας κατ' επέκταση την ταυτοποίηση περισσότερων ενώσεων^{80,81}.

Υπάρχουν 2 είδη δισδιάστατης φασματοσκοπίας NMR: η ομοπυρηνική (homonuclear), όπου η μεταφορά της μαγνήτισης γίνεται μέσω ίδιων πυρήνων (κυρίως πυρήνες υδρογόνου, ^1H - ^1H) και η ετεροπυρηνική (heteronuclear), όπου η μεταφορά της μαγνήτισης γίνεται μέσω διαφορετικών πυρήνων (κυρίως μέσω πυρήνων υδρογόνου και άνθρακα, ^1H - ^{13}C)⁸⁷. Στον Πίνακα 2.2 δίνονται τα πιο χαρακτηριστικά πειράματα δισδιάστατης φασματοσκοπίας NMR και το είδος της συσχέτισης που καταγράφουν μεταξύ των σπιν των πυρήνων. Κάθε μία από τις τεχνικές που αναφέρονται αναλύεται στις επόμενες παραγράφους.

Πίνακας 2.2: Πρακτικές τεχνικές λήψης φάσματος 2D-NMR, σε συνάρτηση με το είδος της πληροφορίας που λαμβάνεται⁸⁰.

Τεχνική	Γενική αρχή	Συσχέτιση
^1H-^1H COSY (C ORRELATION S PECTROSCOPY)	Συσχετίζει συζευγμένα ομοπυρηνικά σπιν που απέχουν μεταξύ τους 2 ή 3 δεσμούς ($^2J_{\text{H-H}}$, $^3J_{\text{H-H}}$)
^1H-^1H TOCSY (T OTAL C ORRELATION S PECTROSCOPY)	Συσχετίζει όλα τα ομοπυρηνικά σπιν που ανήκουν στο ίδιο σύστημα σπιν
^1H-^{13}C HSQC (H ETERO核uclear S INGLE Q UANTUM C OHERENCE)	Συσχετίζει συζευγμένα ετεροπυρηνικά σπιν κατά μήκος ενός δεσμού ($^1J_{\text{C-H}}$)
^1H-^{13}C HMBC (H ETERO核uclear M ULTIPLE B OND C OHERENCE)	Συσχετίζει συζευγμένα ετεροπυρηνικά σπιν που απέχουν μεταξύ τους 2 ή 3 δεσμούς ($^2J_{\text{C-H}}$, $^3J_{\text{C-H}}$)

➤ **Πείραμα COSY**

Το πείραμα COSY (COrrrelation SpectroscopY) αποτελεί το πρώτο και πιο ευρέως διαδεδομένο πείραμα λήψης φάσματος δύο διαστάσεων. Συσχετίζει ομοπυρηνικά σπιν (κυρίως ^1H) που απέχουν μεταξύ τους 2 ή 3 δεσμούς με σκοπό τη ταυτοποίηση και το προσδιορισμό της δομής των μορίων⁸⁷.

➤ **Πείραμα TOCSY**

Το πείραμα TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY) σε αντίθεση με το πείραμα COSY, συσχετίζει όλους τους πυρήνες πρωτονίου που ανήκουν σε ένα δεδομένο σύστημα σπιν. Η μαγνήτιση μεταφέρεται σε όλους τους πυρήνες του συστήματος σπιν μέσω του μηχανισμού της διαδοχικής βαθμιδωτής σύζευξης. Η ακολουθία TOCSY χρησιμοποιείται συμπληρωματικά της ακολουθίας COSY στα πειράματα μεταβολωμικής ανάλυσης βιολογικών δειγμάτων αφού ένα και μόνο σήμα, όταν δεν αλληλεπικαλύπτεται, μπορεί να αποκαλύψει τη δομή ολόκληρης της ένωσης μέσα σε ένα συγκεκριμένο σύστημα σπιν.

➤ **Πείραμα HSQC**

Το πείραμα HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) συσχετίζει συζευγμένα ετεροπυρηνικά σπιν (συνήθως ^1H και ^{13}C ή ^1H και ^{15}N) κατά μήκος ενός δεσμού. Είναι συμπληρωματικό των ομοπυρηνικών 2D NMR πειραμάτων και χρησιμοποιείται κυρίως για την ταυτοποίηση των ενώσεων που περιέχουν πρωτόνια που δεν σχάζονται από γειτονικά πρωτόνια (π.χ. γλυκίνη). Επίσης, ενισχύει την ταυτοποίηση των ενώσεων παρέχοντας πληροφορίες για το συντονισμό των ομάδων του άνθρακα.

➤ **Πείραμα HMBC**

Το πείραμα HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) συσχετίζει ετεροπυρηνικά σπιν (κυρίως ^1H και ^{13}C) που απέχουν μεταξύ τους μέχρι 3 δεσμούς. Το πείραμα ^1H - ^{13}C HMBC χρησιμοποιείται συμπληρωματικά του πειράματος ^1H - ^{13}C HSQC στα πειράματα μεταβολωμικής ανάλυσης βιολογικών δειγμάτων λόγω του πλήθους των πληροφοριών που παρέχει. Επιπλέον, με το

πείραμα ^1H - ^{13}C HMBC καθίσταται εφικτή η ανίχνευση τεταρτοταγών πυρήνων άνθρακα^{80,87}.

2.5. Προ-επεξεργασία φασματικών δεδομένων

Τα δεδομένα που περιέχονται στα φάσματα είναι ογκώδη, πολύπλοκα και ο χειρισμός τους ιδιαίτερα απαιτητικός. Η υιοθέτηση αυστηρών κανόνων χειρισμού, κατεργασίας και ανάλυσης των δειγμάτων διασφαλίζει εν' μέρει τη «ποιότητα» των δεδομένων. Ωστόσο, η προ-επεξεργασία των δεδομένων είναι απαραίτητη πριν την εφαρμογή της στατιστικής ανάλυσης ώστε σε κάθε φάσμα να μπορεί να αποδοθεί παρόμοια ταυτότητα για την ίδια μεταβλητή. Ορισμένα βήματα διασφαλίζουν ότι μικρές αλλαγές στα φάσματα που μπορεί πχ. να οφείλονται στο διαφορετικό pH ή στη διαφορετική ιοντική ισχύ των δειγμάτων δεν οδηγούν σε λάθος συμπεράσματα.

Το λογισμικό Mnova ή MestreNova (<https://mestrelab.com/>) διαθέτει τους απαραίτητους μαθηματικούς αλγόριθμους ώστε τα φάσματα να διαμορφωθούν κατάλληλα προς αποτίμηση. Οι αλγόριθμοι που εφαρμόζονται περιλαμβάνουν:

- το φιλτράρισμα για τη βελτίωση της απεικόνισης του φάσματος (apodization)
- τον καθορισμό σημείου αναφοράς του άξονα των χημικών μετατοπίσεων (referencing)
- τη διόρθωση της φάσης σήματος (phase correction)
- τη διόρθωση της γραμμής βάσης (baseline correction)
- την κανονικοποίηση του φάσματος (normalization)
- την ευθυγράμμιση των κορυφών συντονισμού των ληφθέντων φασμάτων με βάση ένα φάσμα (alignment).
- την τμηματοποίηση του φάσματος (binning)

➤ Φιλτράρισμα

Το φιλτράρισμα χρησιμοποιείται προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία (λόγος σήματος προς θόρυβο) και η διακριτική ικανότητα (resolution) του φάσματος. Πραγματοποιείται με την παρεμβολή μηδενικών σημείων στο ληφθέν σήμα (FID), διαδικασία που καλείται (zero filling). Περαιτέρω βελτίωση του φάσματος σε σχέση με την αύξηση σήματος-προς θόρυβο και την εξομάλυνση των φασματικών γραμμών πραγματοποιείται με τη διαδικασία apodization όπου η FID πολλαπλασιάζεται με μία εκθετική συνάρτηση, ο εκθέτης της οποίας περιλαμβάνει τον παράγοντα διεύρυνσης γραμμής (line broadening). Ο παράγοντας διεύρυνσης γραμμής πρέπει να είναι μικρότερος ή το πολύ ίσος ως προς το resolution του ληφθέντος φάσματος (ημίσειο εύρος φασματικής γραμμής) ώστε η προκαλούμενη διεύρυνση να μην έχει αρνητική επίδραση στη διακριτική ικανότητα. Συνήθως χρησιμοποιείται ένα παράθυρο διεύρυνσης 0,3-1,0 Hz (Σχήμα 2.6)⁷².

Σχήμα 2.6. Εφαρμογή apodization με διαφορετικές τιμές του παράγοντα διεύρυνσης γραμμής.

➤ Καθορισμός σημείου αναφοράς

Η βαθμονόμηση του άξονα των χημικών μετατοπίσεων (referencing) γίνεται με βάση τη συχνότητα συντονισμού κάποιας πρότυπης ουσίας αναφοράς. Συνήθως χρησιμοποιείται το εσωτερικό πρότυπο TSP [3-(trimethylsilyl)-2,2',3,3'-tetradeuteriopropionic acid] ή το DSS [4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid] ενώ σαν συχνότητα αναφοράς ορίζεται το μηδέν. Με βάση το σημείο αναφοράς γίνεται η ταυτοποίηση των μεταβολιτών, η ευθυγράμμιση των

κορυφών συντονισμού και κατ' επέκταση η πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση⁸⁸.

➤ Διόρθωση της φάσης σήματος

Η διόρθωση της φάσης σήματος των κορυφών (phase correction) είναι απαραίτητη για τη συμμετρία των κορυφών και την απαλοιφή παραμορφώσεων λόγω διαφοράς φάσης (phase distortions). Η μη-ομοιόμορφη απεικόνιση των φασμάτων μπορεί να οδηγήσει σε σφάλματα κατά τη διαδικασία της ευθυγράμμισης των κορυφών (alignment) ή του διαχωρισμού των φασματικών περιοχών σε τμήματα (binning) με αποτέλεσμα να αποδοθεί διαφορετική «ταυτότητα» για τον ίδιο μεταβολίτη μεταξύ των φασμάτων. Ακόμη, η μη-ομοιόμορφη απεικόνιση των φασμάτων οδηγεί σε λάθη κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό των μεταβολιτών από το λογισμικό Chenomx.

Η διαδικασία διόρθωσης της φάσης σήματος των κορυφών μπορεί να γίνει είτε αυτόματα είτε χειροκίνητα. Σε κάποιες μεταβολωμικές μελέτες προτιμάται η χειροκίνητη διόρθωση του σήματος καθώς στην αντίθετη περίπτωση παραμορφώνονται τα σήματα χαμηλής έντασης^{72,88}. Στο Σχήμα 2.7 παρουσιάζεται η διαδικασία διόρθωσης της φάσης του σήματος.

Σχήμα 2.7. Διόρθωση φάσης σήματος.

➤ Διόρθωση γραμμής βάσης

Επόμενο βήμα μετά τη διόρθωση της φάσης του σήματος αποτελεί η διόρθωση της γραμμής βάσης (baseline correction). Διάφοροι παράγοντες που προέρχονται κυρίως από τα ηλεκτρονικά μέρη του φασματογράφου οδηγούν σε παραμόρφωση της γραμμής βάσης του φάσματος. Η μη-διόρθωση μπορεί να οδηγήσει σε σφάλματα κατά την ευθυγράμμιση των κορυφών ή σε λάθη κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό. Η διόρθωση της γραμμής βάσης γίνεται αυτόματα με την εφαρμογή συγκεκριμένων φίλτρων⁸⁸. Στο Σχήμα 2.8 δίνεται η μορφή ενός φάσματος μετά την εφαρμογή φίλτρου διόρθωσης της γραμμής βάσης.

Σχήμα 2.8. Εφαρμογή φίλτρου διόρθωσης της γραμμής βάσης.

➤ Κανονικοποίηση φάσματος

Η κανονικοποίηση των φασμάτων (normalization) είναι απαραίτητη πριν τη στατιστική ανάλυση προκειμένου να αντισταθμιστούν πιθανά σφάλματα που προέρχονται από τη προκατεργασία των δειγμάτων (πχ. διαφορετική αραιώση των δειγμάτων) με συνέπεια την επίδραση στην ποσοτικοποίηση. Η κανονικοποίηση επιτρέπει την αντικειμενική σύγκριση των διαφορετικών φασμάτων για την εξαγωγή αξιόπιστων ποσοτικών πληροφοριών^{88,89}.

➤ Ευθυγράμμιση κορυφών συντονισμού

Αποτελεί ίσως το πιο σημαντικό στάδιο της προ-επεξεργασίας πριν τη στατιστική ανάλυση. Μετά την εφαρμογή των παραπάνω σταδίων, όλα τα φάσματα ευθυγραμμίζονται ως προς ένα κοινό φάσμα αναφοράς για τη σύγκριση των φασματικών τους γραμμών και την κατασκευή μίας κοινής

μήτρας δεδομένων. Ωστόσο, μικρές διακυμάνσεις στο pH, τη θερμοκρασία ή τη συγκέντρωση των αλάτων μεταξύ των δειγμάτων μπορεί να οδηγήσουν σε μετατόπιση των χημικών μετατοπίσεων από φάσμα σε φάσμα.

Η ευθυγράμμιση των κορυφών συντονισμού στο κοινό φάσμα αναφοράς (alignment) διασφαλίζει ότι οι ίδιες κορυφές συντονίζονται στην ίδια περιοχή του φάσματος επιτρέποντας την εξαγωγή ορθών πληροφοριών⁸⁸. Υπάρχουν διάφοροι αλγόριθμοι ευθυγράμμισης των κορυφών. Στο Σχήμα 2.9 φαίνεται η διαδικασία της ευθυγράμμισης, όπου όλα τα φάσματα ευθυγραμμίζονται ως προς ένα κοινό φάσμα αναφοράς. Πιο συγκεκριμένα, τα φάσματα διαιρούνται σε ίδιο αριθμό τμημάτων χωρίς καθορισμένο μήκος και σε καθένα από αυτά γίνεται γραμμική μετατόπιση ως προς το αντίστοιχο τμήμα του φάσματος αναφοράς ώστε να ευθυγραμμιστούν οι κοινές φασματικές κορυφές. Οι φασματικές περιοχές που δεν περιέχουν κορυφές ή δεν παρατηρείται μετατόπιση της συχνότητας συντονισμού των φασματικών κορυφών μεταξύ των φασμάτων, δεν επιλέγονται για ευθυγράμμιση.

Σχήμα 2.9. (Α) Φάσματα χωρίς ευθυγράμμιση, (Β) επιλογή τμημάτων για ευθυγράμμιση, (Γ) Φάσματα μετά από ευθυγράμμιση.

➤ Τμηματοποίηση φάσματος

Η τμηματοποίηση του φάσματος σε μικρά τμήματα (binning), αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα στάδια επεξεργασίας ενός φάσματος πριν την εφαρμογή της πολυπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης. Τα δεδομένα που προέρχονται από την μεταβολωμική μελέτη των βιολογικών δειγμάτων με τη τεχνική του ^1H -NMR είναι ογκώδη και πολύπλοκα. Προκειμένου να αξιοποιηθούν και να ακολουθήσει η πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση, είναι απαραίτητο να

μετασχηματιστούν με τέτοιο τρόπο ώστε να περιέχονται σ' ένα πίνακα ο οποίος να περιέχει τόσες σειρές όσες είναι και οι διαφορετικές παρατηρήσεις (φάσματα-δείγματα) και τόσες στήλες όσος είναι και ο αριθμός των διαφορετικών μεταβλητών (χημικές μετατοπίσεις).

Η τεχνική της τμηματοποίησης του φάσματος (binning) μειώνει τον αριθμό των μεταβλητών (χημικές μετατοπίσεις) και περιορίζει την ολίσθηση των χημικών μετατοπίσεων λόγω του διαφορετικού pH ή της επίδρασης της ιονικής ισχύος όπως είδαμε παραπάνω⁸⁹. Συνήθως, το φασματικό εύρος του τμήματος είναι πολύ μικρό (πχ 0,001-0,01ppm). Στο Σχήμα 2.10 φαίνεται η δημιουργία τμημάτων (bins) σ' ένα φάσμα και η μετατροπή τους σε μήτρα δεδομένων (πρώτη γραμμή πίνακα). Η παραπάνω προσέγγιση εφαρμόζεται σε όλα τα φάσματα προκειμένου να κατασκευαστεί η τελική μήτρα δεδομένων (πίνακας) στην οποία θα πραγματοποιηθεί η πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση.

Σχήμα 2.10. Τμήματα ενός φάσματος (bins) και αντιστοιχία με μήτρα δεδομένων.

2.6. Πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα που προκύπτουν από την εφαρμογή ολιστικών τεχνικών ανάλυσης είναι πολλαπλά και ογκώδη με αποτέλεσμα ο χειρισμός τους να είναι δύσκολος και η εξαγωγή/αξιοποίηση των χημικών πληροφοριών ιδιαίτερα απαιτητική. Στόχος των μεταβολωμικών μελετών είναι η προβολή των χημικών πληροφοριών σε μία μορφή φιλική προς των ερευνητή, που να καθιστά δυνατή εξαγωγή χρήσιμων πληροφοριών χωρίς παράπλευρη απώλεια χρήσιμων πληροφοριών.

Χημειομετρία (chemometrics) είναι ο κλάδος που ασχολείται με την εξαγωγή/αξιοποίηση των χημικών πληροφοριών που προκύπτουν από τα πειράματα των χημικών αναλύσεων. Τμήμα της χημειομετρίας αποτελεί η πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση (multivariate statistical analysis) που εντοπίζει τις διακυμάνσεις των χημικών πληροφοριών στα δείγματα και βρίσκει τη βέλτιστη συσχέτιση μεταξύ των πιο σημαντικών μεταβολών μεταξύ των δειγμάτων.

Η πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση βασίζεται σε 2 τύπους στατιστικών τεχνικών: στις μη επιβλεπόμενες (unsupervised), όπου ο χρήστης δεν παρέχει καμία πληροφορία που να αφορά την ταυτότητα των δειγμάτων και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό τους, και στις επιβλεπόμενες (supervised) όπου οι πληροφορίες αυτές εισάγονται εκ των προτέρων με σκοπό το διαχωρισμό τους. Ουσιαστικά, οι μη επιβλεπόμενες τεχνικές αποτελούν το πρωταρχικό εργαλείο της στατιστικής ανάλυσης για τον εντοπισμό τάσεων, ομάδων ή ακραίων τιμών ενώ οι επιβλεπόμενες τεχνικές συσχετίζουν τις χημικές πληροφορίες με πρόσθετα δεδομένα με σκοπό το διαχωρισμό των δειγμάτων.

Οι παρατηρήσεις (φάσματα) και οι μεταβλητές (bins) απεικονίζονται σε διαφορετικά διαγράμματα. Το διάγραμμα που προκύπτει από την προβολή των παρατηρήσεων στο νέο σύστημα συντεταγμένων ονομάζεται διάγραμμα scores (score plot) και δείχνει αν υπάρχει κάποια ομαδοποίηση μεταξύ των παρατηρήσεων. Το διάγραμμα loading (loading plot) δείχνει ποιες μεταβλητές είναι σημαντικές ως προς τις τάσεις που ανιχνεύθηκαν με βάση το score plot. Κάθε μεταβλητή αντιστοιχεί σ' ένα τμήμα ενός μεταβολίτη, επομένως με βάση το διάγραμμα loading εντοπίζονται οι σημαντικοί μεταβολίτες.

Πριν την εφαρμογή της πολυπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης τα δεδομένα υπόκειται σε κατάλληλη μετατροπή κλίμακος (scaling) προκειμένου κάθε μεταβλητή ή κάθε μεταβολίτης ανεξάρτητα από τη φυσική αφθονία του στο εξεταζόμενο δείγμα και συνεπώς την ένταση των φασματικών κορυφών του, να έχει το ίδιο «στατιστικό βάρος» στη δημιουργία των μοντέλων. Η μετατροπή pareto αποτελεί την πιο συνηθισμένη τεχνική μετατροπής δεδομένων

μεταβολωμικής ανάλυσης. Ουσιαστικά μειώνει την επίδραση των έντονων κορυφών ενώ δίνει έμφαση στις μικρές κορυφές^{88,90}.

2.6.1. Ανάλυση κύριων συνιστωσών

Η ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA) αποτελεί μία μη επιβλεπόμενη μέθοδο ανάλυσης με σκοπό τη συμπίεση της βασικής πληροφορίας που περιέχεται στο σύνολο των μεταβλητών σε μικρότερο αριθμό μεταβλητών, οι οποίες αποκαλούνται βασικές συνιστώσες (Principal Components, PCs). Η κύρια συνιστώσα περιέχει τη μεγαλύτερη δυνατή διακύμανση (variance), ενώ οι υπόλοιπες συνιστώσες ακολουθούν με φθίνουσα σειρά, με αποτέλεσμα οι περισσότερες πληροφορίες να εντοπίζονται στις αρχικές συνιστώσες. Κάθε συνιστώσα σχηματίζει ορθή γωνία με τις προηγούμενες, επομένως οι νέες συνιστώσες είναι μεταξύ τους κάθετες και άρα μη συσχετιζόμενες μεταξύ τους. Γραφικά, το αποτέλεσμα της PCA ανάλυσης είναι η προβολή σημείων από ένα πολυδιάστατο χώρο δεδομένων σ' ένα χώρο μικρότερων διαστάσεων^{56,91}.

2.6.2. Ορθογώνια παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων με διαχωριστική ανάλυση

Η μέθοδος ορθογώνιας παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων με διαχωριστική ανάλυση (Orthogonal Partial Least Square Regression – Discriminant Analysis, OPLS-DA) αποτελεί μία επιβλεπόμενη μέθοδο ανάλυσης με σκοπό τον διαχωρισμό των παρατηρήσεων (φασμάτων) με βάση τις πληροφορίες που παρέχονται. Αυτό που κάνει είναι να εντοπίζει τη σύνδεση μεταξύ της ανεξάρτητης μήτρας δεδομένων X (descriptor matrix) με την εξαρτημένη μήτρα αποκρίσεων Y (response matrix) με τη βοήθεια φίλτρου ορθογώνιας διόρθωσης σήματος (orthogonal signal correction, OSC). Για να το επιτύχει αυτό, μειώνει τη μεταβλητότητα που δεν σχετίζεται ή δεν έχει καμία επίδραση στο διαχωρισμό των ομάδων.

2.6.3. Επικύρωση στατιστικών μοντέλων

Τα μοντέλα που εξάγονται από την πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση πρέπει να είναι έγκυρα και αξιόπιστα. Πρώτο βήμα για τη διασφάλιση της αξιοπιστίας των μοντέλων αποτελεί ο έλεγχος των παραμέτρων R^2 (συντελεστής προσαρμογής του εξαγόμενου μοντέλου στην πραγματική διακύμανση των μεταβλητών – goodness of fit) και Q^2 (προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου - goodness of prediction). Στα πειράματα μεταβολωμικής αξιόπιστα θεωρούνται τα μοντέλα που παρουσιάζουν τιμές R^2 και Q^2 μεγαλύτερες από 0,5 ενώ η διαφορά $R^2 - Q^2$ είναι μικρότερη από 0,2^{55,92}.

Στην περίπτωση ενός OPLS-DA μοντέλου, πέραν από τον έλεγχο των παραπάνω παραμέτρων, είναι απαραίτητη η περαιτέρω επικύρωση των αποτελεσμάτων. Τα «εργαλεία» που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν:

- τον έλεγχο αναδιάταξης των αποκρίσεων (response permutation testing)
- τον έλεγχο διασταυρωμένης επικύρωσης της ανάλυσης (cross-validated analysis of variance, CV-ANOVA)
- την καμπύλη ROC (receiver operating characteristic curve)⁹¹.

Έλεγχος αναδιάταξης των αποκρίσεων

Διασφαλίζει ότι ο διαχωρισμός των ομάδων σ' ένα OPLS-DA μοντέλο είναι ικανοποιητικός και ότι τα αποτελέσματα που παρατηρούνται δεν οφείλονται στη τύχη. Σε αυτό τον έλεγχο, οι μεταβλητές της μήτρας X παραμένουν σταθερές ενώ οι μεταβλητές της μήτρας Y αναδιατάσσονται τυχαία αρκετές φορές (έως 999 φορές). Κάθε φορά παράγεται ένα νέο OPLS-DA μοντέλο για τη μήτρα X και την αναδιατεταγμένη μήτρα Y ενώ οι συντελεστές R^2 και Q^2 υπολογίζονται πάλι. Για να είναι ένα OPLS-DA μοντέλο αξιόπιστο πρέπει οι τιμές R^2 και Q^2 (στα αριστερά του διαγράμματος), που προέρχονται από την αναδιάταξη των μεταβλητών της μήτρας Y , να είναι χαμηλότερες από τις αρχικές (στα δεξιά του διαγράμματος) καθώς επίσης η τομή της γραμμής παλινδρόμησης της Q^2 στον άξονα y να είναι κάτω από το μηδέν^{93,94}. Στο Σχήμα 2.11 φαίνεται ένα έγκυρο διάγραμμα ελέγχου αναδιάταξης των αποκρίσεων ενός OPLS-DA μοντέλου.

Σχήμα 2.11. Διάγραμμα αναδιάταξης των μεταθέσεων.

Έλεγχος διασταυρωμένης επικύρωσης της ανάλυσης

Είναι ένα διαγνωστικό εργαλείο που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της αξιοπιστίας ενός OPLS-DA μοντέλου. Βασίζεται στη συνάρτηση ελέγχου F (F-test) για τον έλεγχο της πιθανότητας ο διαχωρισμός να είναι τυχαίος. Συνήθως, ένα μοντέλο θεωρείται στατιστικά σημαντικό όταν η τιμή p-value είναι μικρότερη από 0,05 για στάθμη εμπιστοσύνης (βεβαιότητα) 95%.

Καμπύλη ROC

Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της συνολικής διακριτικής ικανότητας του μοντέλου. Απεικονίζει το ποσοστό των αληθώς θετικών-true positive rate-TPR (ευαισθησία) σε σχέση με το ποσοστό των ψευδώς θετικών- false positive rate-FPR (1-ειδικότητα) τιμών για όλες τις πιθανές οριακές τιμές διαχωρισμού⁹⁵. Όσο πιο μεγάλη είναι η ευαισθησία τόσο καλύτερος είναι ο διαχωρισμός των ομάδων. Αυτό που ουσιαστικά λαμβάνεται υπόψιν σε μία καμπύλη ROC είναι το εμβαδόν της καμπύλης (area under curve-AUC), η τιμή του οποίου μπορεί να κυμαίνεται από 0,50 (κακός διαχωρισμός-διαγώνιος γραμμή) μέχρι 1,0 (τέλειος διαχωρισμός-Γ γραμμή)⁹⁵. Στο Σχήμα 2.12 δίνονται οι καμπύλες ROC για ένα τέλειο (AUC=1,0, κόκκινη γραμμή), για ένα καλό (AUC=0,950, μαύρη γραμμή) και για ένα κακό (AUC=0,50, μπλε γραμμή) διαχωρισμό.

Σχήμα 2.12. Καμπύλες ROC.

2.6.4. Εντοπισμός σημαντικών μεταβολιών

Η διασφάλιση της αξιοπιστίας των μοντέλων επιτρέπει την αναζήτηση των σημαντικών μεταβλητών που συνεισφέρουν κατά κύριο λόγο στο διαχωρισμό των ομάδων στο διάγραμμα score. Κάθε μεταβλητή αντιστοιχεί σε μία ορισμένη περιοχή του φάσματος η οποία είναι χαρακτηριστική για κάθε μεταβολίτη. Επομένως μπορεί να γίνει ταύτιση των πιο σημαντικών μεταβολιτών οι οποίοι χαρακτηρίζονται δυνητικοί-υποψήφιοι βιοδείκτες (potential biomarkers). Τα «εργαλεία» που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν:

- το διάγραμμα σημαντικότητας, VIP plot (Variable Influence on Projection ή Variable Importance in Projection) και
- το διάγραμμα S-γραμμής, S-line plot⁹¹.

Διάγραμμα Σημαντικότητας, VIP plot

Χρησιμοποιείται συνήθως για να περιγράψει ένα OPLS-DA μοντέλο. Δείχνει με φθίνουσα σειρά τις πιο σημαντικές μεταβλητές (bins) για το διαχωρισμό των ομάδων στο διάγραμμα score⁹¹. Συνήθως, λαμβάνονται υπόψιν μεταβλητές με τιμή $VIP > 1,0$. Στην ουσία $VIP > 1,0$ δείχνει ότι η μεταβλητή συνεισφέρει περισσότερο από το μέσο όρο στο διαχωρισμό. Η υιοθέτηση τιμών $VIP > 1,0$ έχει ως αποτέλεσμα τη συμπερίληψη μέχρι και του 50% των μεταβλητών⁹⁶. Στο Σχήμα 2.13 δίνεται ένα τυπικό διάγραμμα VIP, όπου γίνεται χρωματική διάκριση των μεταβλητών ανάλογα με τη τιμή VIP.

Σχήμα 2.13. Διάγραμμα VIP. Με μπλε χρώμα απεικονίζονται οι πιο σημαντικές μεταβλητές ($VIP > 1$) και με πράσινο οι λιγότερο σημαντικοί μεταβλητές ($VIP < 1$).

Το διάγραμμα VIP εξαρτάται από τις μεταβλητές που επιλέγονται. Για την εύρεση των πιο σημαντικών μεταβλητών λαμβάνεται υπόψιν και η τιμή της παραμέτρου $p(\text{corr})$. $P(\text{corr})$ είναι το διάγραμμα των μεταβλητών (loadings) λαμβάνοντας υπόψιν τον συντελεστή συσχέτισης για τη μετατροπή κλίμακος. Οι τιμές της παραμέτρου $p(\text{corr})$ παραμένουν σταθερές ανεξάρτητα από τις μεταβλητές που επιλέγονται ενώ το εύρος των τιμών του κυμαίνεται από -1,0 έως 1,0. Δεν υπάρχει όριο για τη βέλτιστη τιμή του $p(\text{corr})$ με βάση το οποίο μία μεταβλητή θεωρείται σημαντική. Συνήθως, πιο σημαντικές θεωρούνται οι μεταβλητές που συνδυάζουν $VIP > 1,0$ και $|p(\text{corr})| > 0,5$ ⁹⁶. Στο Σχήμα 2.14 δίνεται το διάγραμμα VIP- $p(\text{corr})$ όπου απεικονίζονται οι πιο σημαντικές μεταβλητές.

Σχήμα 2.14. Διάγραμμα σημαντικότητας μεταβλητών VIP- $p(\text{corr})$. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι πιο σημαντικές μεταβλητές για το διαχωρισμό των ομάδων στο ομάδων στο διάγραμμα score [$VIP > 1,45$ και $|p(\text{corr})| > 0,5$].

Διάγραμμα S-γραμμής, S-line plot

Πρόκειται για ένα διάγραμμα μεταβλητών (loading plot), όπου το «βάρος» (loading weight) κάθε μεταβλητής στη διαφοροποίηση απεικονίζεται σε χρωματική κλίμακα σύμφωνα με την απόλυτη τιμή του συντελεστή συσχέτισης ($|r|$) (color-coded coefficient loading plot)^{93,94}. Το νέο διάγραμμα (ψευτο-φάσμα) απεικονίζει κορυφές σε 2 κατευθύνσεις ανάλογα με τη συνεισφορά τους στο διαχωρισμό των 2 ομάδων. Οι κορυφές που έχουν θετικό προσανατολισμό (>0) αντιστοιχούν σε μεταβολίτες που εντοπίζονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στην ομάδα στη θετική κατεύθυνση της πρώτης κύριας συνιστώσας πρόβλεψης (1^ο και 4^ο τεταρτημόριο). Αντίθετα, κορυφές με αρνητικό προσανατολισμό (<0) αντιστοιχούν σε μεταβολίτες που βρίσκονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στην ομάδα στην αρνητική κατεύθυνση της πρώτης κύριας συνιστώσας πρόβλεψης (2^ο και 3^ο τεταρτημόριο). Όσο πιο κόκκινο είναι το χρώμα των κορυφών στη κλίμακα, τόσο μεγαλύτερη είναι η συμμετοχή των μεταβολιτών στο διαχωρισμό των ομάδων⁹⁴. Στο Σχήμα 2.15 δίνεται ένα τυπικό διάγραμμα S-line με επισήμανση των σημαντικών μεταβολιτών.

Σχήμα 2.15. Διάγραμμα S-line.

ΣΚΟΠΟΣ

Αντικείμενο της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτελεί ο εντοπισμός των βιοδεικτών που σχετίζονται με την ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη (IUGR) με τη χρήση της μεταβολωμικής. Η μεταβολωμική αποτελεί μέρος της μεταγονιδιατικής ανάλυσης και αναφέρεται στη μελέτη του συνόλου των δευτερογενών μεταβολιτών ενός βιολογικού συστήματος. Στόχος είναι η καταγραφή του μεταβολικού αποτυπώματος των IUGR κυήσεων ώστε να ανιχνευτούν οι μεταβολίτες εκείνοι που σχετίζονται με τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της IUGR. Τα αποτελέσματα αναμένεται να βοηθήσουν στην κατανόηση των μεταβολικών μονοπατιών που μπορούν να αποτελέσουν στόχο για μελλοντική θεραπεία.

Για τον εντοπισμό των πιθανών βιοδεικτών πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη και ανάλυση από (α) αίμα μητέρων και (β) αίμα ομφάλιου λώρου κατά τον τοκετό, τόσο από περιπτώσεις IUGR κυήσεων όσο και από κυήσεις με κανονική ανάπτυξη του εμβρύου (AGA). Η ολιστική ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της φασματοσκοπίας NMR. Στη συνέχεια, με την εφαρμογή της πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης επιτεύχθηκε ο διαχωρισμός των ομάδων IUGR και AGA στα ομφαλικά και μητρικά δείγματα. Από τα μοντέλα διαχωρισμού προέκυψαν οι μεταβολίτες που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των ομάδων IUGR και AGA, οι οποίοι προκρίθηκαν για την ανάδειξη των μεταβολικών μονοπατιών που σχετίζονται με την IUGR. Τελικό στάδιο της μελέτης αποτέλεσε η επικύρωση των επικρατέστερων μεταβολιτών μέσω της ανεξάρτητης τεχνικής της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Οργανολογία

Τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας συνοψίζονται στον Πίνακα 3.1. Ακολουθώς, στα Σχήματα 3.1 και 3.2 φαίνονται τα όργανα NMR και HPLC που χρησιμοποιήθηκαν για τις αναλύσεις.

Πίνακας 3.1: Όργανα και συσκευές πειραματικής διαδικασίας.

Όργανο/Συσκευή	Χαρακτηριστικά
Φασματογράφος NMR εφοδιασμένος με αισθητήρα $1\text{H}\{^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\}$ 5mm PFG Automatable Triple Resonance	Varian 600 MHz
Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή στο ορατό - υπεριώδες (HPLC-UV-Vis)	LKB, Bromma, Sweden
Αναλυτικός ζυγός	METTLER AT261
Φυγόκεντρος	HERMLE Centrifuge Z326K
Συσκευή εξάτμισης/λαιοφιλίσωσης	Centri Vap Centrifugal Concentrator with Cold Trap, LABCONCO
Συσκευή ανάδευσης	FALC INSTRUMENTS

Σχήμα 3.1. Φασματογράφος NMR Varian 600MHz που βρίσκεται εγκατεστημένος στο Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

Σχήμα 3.2. Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή ορατού - υπεριώδους που βρίσκεται στο χώρο του αγροκτήματος της Γεωπονικής Σχολής του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

3.2. Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2: Αντιδραστήρια και διαλύτες πειραματικής διαδικασίας.

Διαλύτης/Αντιδραστήριο	Χαρακτηριστικά
Μεθανόλη (CH_3OH)	LC-MS grade, Fluka Analytical
Δευτεριωμένο νερό (D_2O)	99.98%, Deutero
Όξινο φωσφορικό νάτριο ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	$\geq 99.0\%$, Sigma-Aldrich
Δισόξινο φωσφορικό νάτριο (NaH_2PO_4)	$\geq 99.0\%$, Sigma-Aldrich
3-(τριμέθυλοσιλυλο) προπιονικό άλας νατρίου (TSP)	99%, Santa Cruz Biotechnology
Ακετονιτρίλιο (CH_3CN)	99.8%, Sigma-Aldrich
Όξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO_3)	$\geq 99.7\%$, Sigma-Aldrich
Dabsyl chloride [$(\text{CH}_3)_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{N}=\text{NC}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{Cl}$]	> 98% Santa Cruz Biotechnology
Ακετόνη (CH_3COCH_3)	$\geq 99.9\%$, Sigma-Aldrich
Διμέθυλοφορμαμίδιο [$\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$]	99.8% Sigma-Aldrich
Τριαιθυλαμίνη [$(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$]	$\geq 99.5\%$, Sigma-Aldrich
3-Υδροξυβουτυρικό οξύ ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_3$)	98% Alfa Aesar
3-Μέθυλο-2-οξοβαλερικό οξύ ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_3$)	> 95.0%, TGI
Ισολευκίνη ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$)	99.9%, Sigma-Aldrich

3.3. Λογισμικά

Τα βιολογικά δείγματα είναι πλούσια σε δευτερογενείς μεταβολίτες χαμηλού μοριακού βάρους. Τα φάσματα που προκύπτουν από την ανάλυση τέτοιων

δειγμάτων περιλαμβάνουν πλήθος φασματικών κορυφών με πολλές αλληλεπικαλύψεις. Η επεξεργασία πολλαπλών φασμάτων και η αξιοποίηση των πληροφοριών που παρέχουν, απαιτεί τη χρήση εξειδικευμένων λογισμικών ώστε (α) να μπορούν να αναγνωριστούν οι μεταβολίτες στα φάσματα και (β) τα φάσματα να είναι απευθείας συγκρίσιμα και να αποφευχθεί η απώλεια χρήσιμων πληροφοριών. Στο Σχήμα 3.3 δίνονται τα λογισμικά που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής και στη συνέχεια αναλύονται οι λειτουργίες τους.

Σχήμα 3.3. Λογισμικά που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της διδακτορικής.

Το λογισμικό Chenomx (Chenomx Suite 7.6, Chenomx, Edmonton, Alberta, Canada) δίνει μία πρώτη εικόνα των εν δυνάμει μεταβολιτών που περιέχονται στα φάσματα και των συσχετίσεων των κορυφών τους. Παρέχει μία λίστα με τους πιθανούς μεταβολίτες, για δεδομένη περιοχή του φάσματος, συνεπικουρώντας την ταυτοποίησή τους από τα δεδομένα των 2D πειραμάτων. Επιπλέον, παρέχει τη δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού των μεταβολιτών, με βάση τη συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου. Στο Σχήμα 3.4 φαίνεται η

ταυτοποίηση της βαλίνης μέσα από το λογισμικό Chenomx καθώς και η συγκέντρωσή της στο δείγμα.

Σχήμα 3.4. Ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός βαλίνης μέσα από το λογισμικό Chenomx.

➤ **Metaboneer**

Το λογισμικό Metaboneer⁹⁷ έχει τη δυνατότητα της αυτόματης ταυτοποίησης των μεταβολιτών στα φάσματα του ορού. Παρέχει μία λίστα με τους πιο πιθανούς μεταβολίτες με την ένδειξη P (Positive) ή N (Negative), ανάλογα με το αν εντοπίζονται στα φάσματα με βάση τη χαρακτηριστική φασματική τους κορυφή.

➤ **Mnova**

Πρωταρχικό βήμα για την εξαγωγή των πληροφοριών από τα φάσματα αποτελεί η βελτίωση της απεικόνισης τους, ώστε να μπορεί να αποδοθεί παρόμοια ταυτότητα για την ίδια μεταβλητή. Το λογισμικό Mnova ή MestreNova (v. 10.1) διαθέτει τους απαραίτητους αλγόριθμους ώστε να φάσματα να διαμορφωθούν κατάλληλα και να αντισταθμιστούν σφάλματα που πιθανόν να

οφείλονται στο διαφορετικό χειρισμό των δειγμάτων ή στις διαφορετικές συνθήκες λειτουργίας του οργάνου.

➤ **MATLAB**

Το πιο κρίσιμο κομμάτι της προ-επεξεργασίας των φασμάτων είναι εκείνο της ευθυγράμμισης των κορυφών συντονισμού τους. Με βάση το λογισμικό MATLAB (v. 7.4.0) και την εφαρμογή μίας βελτιστοποιημένης έκδοσης του αλγορίθμου “Correlation Optimized Warping”, είναι δυνατή η περαιτέρω ευθυγράμμιση των κορυφών συντονισμού στα φάσματα, όπως προκύπτουν μετά τη χρήση του λογισμικού Mnova. Ο συγκεκριμένος αλγόριθμος, ευθυγραμμίζει όλα τα φάσματα ως προς ένα κοινό φάσμα αναφοράς (κάθε φορά επιλέγεται διαφορετικό φάσμα αναφοράς από το σύνολο των φασμάτων). Ο χρήστης ορίζει την παράμετρο μετατόπισης (slack) με βάση το σύνολο των φασματικών δεδομένων και τον αριθμό των φασμάτων. Η επιτυχία κάθε κύκλου ευθυγράμμισης, ελέγχεται με βάση έναν αριθμό που δίνει το ποσοστό σύγκλισης των φασμάτων.

➤ **SIMCA**

Τα δεδομένα που προκύπτουν εισάγονται στο λογισμικό SIMCA (v. 14.0, Umetrics, Umea, Sweden). προκειμένου να ακολουθήσει η πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση. Τα βήματα και οι πληροφορίες που εξάγονται μέσω της πολυπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης έχουν αναλυθεί στην εισαγωγή.

➤ **MetaboAnalyst**

Αφορά τον εντοπισμό των μεταβολιτών εκείνων που συνεισφέρουν περισσότερο (στατιστικώς σημαντικοί) στο διαχωρισμό των ομάδων μελέτης και αποτελούν τους υποψήφιους βιοδείκτες της IUGR παθολογίας. Το λογισμικό MetaboAnalyst (v. 4.0) αξιοποιεί τις φασματικές πληροφορίες των δειγμάτων με σκοπό τη διάκρισή τους και τον εντοπισμό των στατιστικώς σημαντικών μεταβολιτών της διάκρισης. Μέσα από τον έλεγχο του εμβαδού κάτω από τη καμπύλη ROC για κάθε μεταβολίτη εντοπίζονται οι υποψήφιοι

βιοδείκτες και στη συνέχεια χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό των μεταβολικών μονοπατιών που μεταβάλλονται περισσότερο από την IUGR παθολογία.

3.4. Μεθοδολογία έρευνας και κλινικά δείγματα

Η παρούσα διπλωματική εργασία επικεντρώνεται στον εντοπισμό των βιοδεικτών της ενδομήτριας υπολειπόμενης ανάπτυξης με τη χρήση της μεταβολωμικής μελέτης. Η μεταβολωμική προσέγγιση επικεντρώνεται στη συγκριτική μελέτη των μεταβολιτών ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων που προέρχονται από 2 ομάδες (case-control), με τη χρήση μίας αναλυτικής τεχνικής. Για τον σκοπό της έρευνας, αποφασίστηκε η λήψη δειγμάτων (α) μητρικού και (β) ομφαλικού αίματος τόσο από περιπτώσεις κυήσεων με έκβαση τοκετού νεογνό με IUGR όσο και από κυήσεις με γέννηση AGA νεογνού. Η επιλογή του ομφαλικού αίματος έγινε καθώς αντικατοπτρίζει το αίμα του νεογνού.

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε από τη Νεογνολογική Κλινική του Αρεταίειου Νοσοκομείου της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Το συμβούλιο και η επιτροπή βιοηθικής του Νοσοκομείου ενέκριναν την πραγματοποίηση της παρούσας έρευνας σύμφωνα με την υπ' αριθμόν ΕΕ-2/26/06-06-2017 έγκριση. Πριν τη δειγματοληψία, ζητήθηκε από όλες τις συμμετέχουσες μητέρες η υπογεγραμμένη συγκατάθεσή τους. Επίσης, όλα τα δείγματα λήφθηκαν και επεξεργάστηκαν σύμφωνα τις αρχές της διακήρυξης του Ελσίνκι.

Η μεταβολωμική μελέτη, όπως αναφέρθηκε ήδη, μπορεί να είναι είτε στοχευμένη (targeted), είτε μη-στοχευμένη/ολιστική (untargeted). Στην παρούσα διπλωματική διατριβή, αποφασίστηκε σε πρώτη φάση η μη-στοχευμένη ανάλυση των δειγμάτων με την τεχνική της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πυρήνα υδρογόνου ($^1\text{H-NMR}$), για τον εντοπισμό των μεταβολιτών στους οποίους βασίζεται η διάκριση μεταξύ των 2 ομάδων (IUGR-AGA τόσο σε μητέρες όσο και νεογνά). Κατόπιν, μετά τον εντοπισμό των εν δυνάμει μεταβολιτών που σχετίζονται με τη συγκεκριμένη παθολογική κατάσταση, ακολούθησε η στοχευμένη, ποσοτική ανάλυση των

επικρατέστερων αμινοξέων με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Τα στάδια του συνολικού πειραματικού σχεδιασμού συνοψίζονται στο Σχήμα 3.5.

Σχήμα 3.5. Στάδια πειραματικής πορείας.

3.5. Επιλογή δειγμάτων – Κατάρτιση ερωτηματολογίου

Η επιλογή των επίτοκων που θα συμμετέχουν στην έρευνα είναι καθοριστικής σημασίας για τη διασφάλιση της εγκυρότητας των αποτελεσμάτων. Η πρώτη μέριμνα που λήφθηκε αφορούσε στην υιοθέτηση αυστηρών κριτηρίων συμπερίληψης-αποκλεισμού για τον σαφή καθορισμό των κυήσεων που χαρακτηρίζονται ως IUGR σε σχέση με περιπτώσεις κυήσεων που αφορούν άλλες παθολογίες κύησης όπως είναι π.χ. η προεκλαμψία. Ο διαχωρισμός τέτοιων περιπτώσεων έγινε από το ιατρικό προσωπικό της Νεογνολογικής Κλινικής του Αρεταίειου Νοσοκομείου της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Μία πρώτη ένδειξη για το χαρακτηρισμό μίας κύησης ως IUGR δίνεται μέσα από την υπερηχογραφική εξέταση, όπου γίνεται εκτίμηση του βάρους του νεογνού και κατά πόσο αυτό είναι αναμενόμενο ή μη σε σχέση με την εβδομάδα κύησης της μητέρας. Σε περίπτωση που το βάρος του νεογνού βρίσκεται χαμηλότερα από την 10^η εκατοστιαία θέση στην κλίμακα αναφοράς (Σχήμα 1.1), τότε η κύηση χαρακτηρίζεται ως ενδεχόμενη IUGR. Μία πιο σαφής εικόνα δίνεται μέσα από την εξέταση Doppler, όταν η ροή του αίματος στις αρτηρίες της μήτρας και του ομφαλού παρουσιάζει αυξημένη αντίσταση, όπως υποδηλώνεται από την αύξηση του δείκτη παλμών (PI, pulsation index). Τέλος, γίνεται σύνδεση με το ατομικό ιστορικό της εγκύου και καταγράφονται οι παράγοντες κινδύνου που μπορεί να οδηγήσουν σε μία IUGR κύηση.

Ανθρωπομετρικά-κλινικά χαρακτηριστικά

Πριν τη διεξαγωγή της έρευνας, πραγματοποιήθηκε η κατάρτιση ενός ερωτηματολογίου το οποίο περιλαμβάνει εκτενείς πληροφορίες σχετικά με το ατομικό αναμνηστικό της επίτοκου και την κύηση. Τέτοιες πληροφορίες αφορούν τυχόν προβλήματα κατά την διάρκεια της κύησης και αν ακολουθήθηκε κάποια φαρμακευτική αγωγή, ενδεχόμενες επιπλοκές, πληροφορίες για τις καπνικές της συνήθειες, το δείκτη βάρους σώματος της εγκύου (BMI) πριν τον τοκετό, την ηλικία και την εθνικότητα της μητέρας. Επίσης, παρέχει πληροφορίες που σχετίζονται με τον τρόπο κύησης, το φύλο και το βάρος του νεογνού, την ηλικία κύησης και την εκατοστιαία θέση (Ε/Θ, percentile) του νεογνού. Οι πληροφορίες αυτές είναι απαραίτητες για να τεκμηρίωση τυχόν έκτροπων τιμών στα αποτελέσματα που θα βοηθήσουν στην εξαγωγή αξιόπιστων συμπερασμάτων. Στον Πίνακα 3.3 καταγράφονται τα χαρακτηριστικά των εγκύων και των νεογνών για τις περιπτώσεις IUGR και AGA.

Δειγματοχώρος

Συνολικά στην έρευνα συμμετείχαν 84 έγκυες εκ των οποίων οι 48 αφορούσαν IUGR κυήσεις ($\leq 10^{\text{η}}$ εκατοστιαία θέση) και οι 36 AGA κυήσεις (μεταξύ 10^{ης} και 90^{ης} εκατοστιαίας θέσης). Όλες οι περιπτώσεις αφορούσαν μη-πρόωρες

κυήσεις (>259 ημέρες) ενώ οι AGA κυήσεις δεν έφεραν κάποια παθολογία ή επιπλοκή στο ατομικό αναμνηστικό τους. Στην περίπτωση των IUGR κυήσεων, καταγράφονται 6 περιπτώσεις με σακχαρώδη διαβήτη κύησης (ΣΔΚ) και μία περίπτωση με θρομβοφιλία στο ατομικό αναμνηστικό της μητέρας. Η μέση ηλικία κύησης για τα IUGR νεογνά ήταν $273 (\pm 7)$ μέρες και το μέσο βάρος τους ήταν $2610 (\pm 10\text{g})$. Αντίστοιχα, η μέση ηλικία κύησης για τα AGA νεογνά ήταν $278 (\pm 7)$ μέρες και το μέσο βάρος τους ήταν $3405 (\pm 273 \text{ g})$.

Πίνακας 3.3: Ανθρωπομετρικά και κλινικά χαρακτηριστικά εγκύων και νεογνών.

Δείγμα	Ομάδα	Ε/Θ	Βάρος γέννησης (g)	Φύλο	Ηλικία κύησης (ημέρες)	Κάπνισμα	Ατομικό ιστορικό μητέρας	Είδος τοκετού	Ηλικία μητέρας	Εθνικότητα	BMI εγκύου πριν τον τοκετό
1	IUGR	5	2550	Θήλυ	273	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	32	Ελληνική	19.3
2	IUGR	7	2930	Θήλυ	276	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	34	Ρουμανική	24.1
3	IUGR	3	2850	Άρρεν	278	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	25	Ελληνική	21.8
4	IUGR	1	1920	Θήλυ	265	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	30	Ελληνική	33
5	IUGR	4	2450	Θήλυ	271	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	26	Κυπριακή	19
6	IUGR	4	2560	Θήλυ	269	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	36	Ελληνική	23
7	IUGR	8	2880	Θήλυ	272	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	31	Ελληνική	33.4
8	IUGR	2	2230	Θήλυ	260	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	41	Ελληνική	25
9	IUGR	2	2510	Άρρεν	275	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	31	Ελληνική	25
10	IUGR	10	2760	Άρρεν	265	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	30	Ελληνική	25.7
11	IUGR	6	2690	Θήλυ	277	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	34	Ελληνική	21
12	IUGR	5	2800	Θήλυ	277	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	26	Ελληνική	26
13	IUGR	3	2540	Θήλυ	274	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	27	Ελληνική	19
14	IUGR	6	2450	Θήλυ	267	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	25	Γεωργιανή	23
15	IUGR	2	2860	Άρρεν	281	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	33	Ελληνική	28
16	IUGR	4	2770	Θήλυ	283	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	36	Ελληνική	34
17	IUGR	5	2250	Θήλυ	260	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	30	Ελληνική	33
18	IUGR	6	2850	Θήλυ	281	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	36	Ελληνική	32

19	IUGR	10	2880	Άρρεν	274	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	35	Ρουμανική	21
20	IUGR	8	2730	Θήλυ	279	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	28	Αλβανική	22
21	IUGR	4	2600	Άρρεν	273	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	34	Φιλιππινέζικη	21
22	IUGR	10	2560	Θήλυ	263	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	28	Ελληνική	31
23	IUGR	10	2920	Άρρεν	274	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	38	Ελληνική	26
24	IUGR	9	2780	Άρρεν	270	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	32	Αλβανική	24
25	IUGR	10	2590	Θήλυ	275	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	24	Αλβανική	20
26	IUGR	9	2590	Θήλυ	270	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	35	Ελληνική	20
27	IUGR	3	2760	Θήλυ	279	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	29	Ελληνική	26
28	IUGR	10	2160	Θήλυ	262	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	27	Αλβανική	23
29	IUGR	8	2840	Θήλυ	277	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	26	Αλβανική	26
30	IUGR	6	2880	Άρρεν	275	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	46	Αλβανική	25
31	IUGR	9	2780	Άρρεν	280	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	31	Ελληνική	24
32	IUGR	8	2610	Θήλυ	273	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	32	Ελληνική	21
33	IUGR	6	2220	Άρρεν	262	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	26	Αλβανική	22
34	IUGR	1	1890	Άρρεν	260	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	41	Φιλιππινέζικη	25
35	IUGR	2	2200	Θήλυ	260	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	40	Ελληνική	22
36	IUGR	1	2430	Άρρεν	275	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	28	Ελληνική	21
37	IUGR	3	2140	Θήλυ	260	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	25	Αλβανική	20
38	IUGR	5	2650	Άρρεν	276	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	35	Ελληνική	20
39	IUGR	10	2650	Θήλυ	268	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	45	Ελληνική	20
40	IUGR	5	2760	Άρρεν	276	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	38	Ελληνική	20
41	IUGR	7	2550	Θήλυ	261	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	30	Κυπριακή	22

42	IUGR	9	2920	Θήλυ	277	ΟΧΙ	ΣΔΚ	Φυσιολογικός	32	Ελληνική	19.6
43	IUGR	7	2820	Άρρεν	266	ΟΧΙ	ΣΔΚ	Καισαρική	37	Ελληνική	23
44	IUGR	3	2590	Θήλυ	275	ΝΑΙ	ΣΔΚ	Καισαρική	32	Ελληνική	28
45	IUGR	2	2210	Θήλυ	263	ΝΑΙ	ΣΔΚ	Καισαρική	34	Ελληνική	20
46	IUGR	7	2530	Θήλυ	264	ΟΧΙ	ΣΔΚ	Καισαρική	36	Ρωσική	27
47	IUGR	3	2800	Άρρεν	282	ΟΧΙ	ΣΔΚ	Καισαρική	32	Ρουμανική	27
48	IUGR	4	2510	Θήλυ	272	ΟΧΙ	Θρομβοφιλία	Καισαρική	24	Αλβανική	21
1	AGA	54	3410	Άρρεν	275	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	35	Ελληνική	22
2	AGA	40	3390	Άρρεν	280	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	40	Ελληνική	20
3	AGA	42	3460	Άρρεν	285	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	35	Ελληνική	23
4	AGA	40	3140	Θήλυ	274	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	24	Ελληνική	21
5	AGA	42	3390	Άρρεν	272	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	31	Ελληνική	31
6	AGA	44	3490	Άρρεν	281	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	30	Ελληνική	21
7	AGA	56	3180	Άρρεν	274	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	28	Ελληνική	18
8	AGA	47	3520	Άρρεν	276	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	34	Γεωργιανή	22
9	AGA	65	3380	Θήλυ	274	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	34	Ελληνική	25
10	AGA	43	3160	Θήλυ	280	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	37	Ελληνική	19
11	AGA	40	3270	Άρρεν	273	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	27	Αλβανική	21
12	AGA	65	3000	Θήλυ	269	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	23	Ελληνική	21
13	AGA	42	2930	Θήλυ	285	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	21	Αλβανική	17
14	AGA	52	3700	Άρρεν	282	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	25	Ελληνική	34
15	AGA	65	3250	Θήλυ	269	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	30	Ελληνική	24

16	AGA	52	3430	Θήλυ	277	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	32	Ρουμανική	23
17	AGA	65	3740	Θήλυ	280	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	33	Ελληνική	33
18	AGA	53	3610	Θήλυ	276	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	29	Ελληνική	19
19	AGA	56	3410	Θήλυ	286	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	25	Αλβανική	19
20	AGA	44	2440	Θήλυ	261	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	31	Αλβανική	24
21	AGA	65	4000	Άρρεν	290	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	33	Ελληνική	28
22	AGA	40	3250	Θήλυ	282	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	32	Ρουμανική	21
23	AGA	42	3370	Άρρεν	275	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	48	Ελληνική	29
24	AGA	41	3430	Θήλυ	283	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	40	Ελληνική	23
25	AGA	42	3250	Θήλυ	275	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	38	Ελληνική	22
26	AGA	60	3450	Θήλυ	278	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	40	Ελληνική	22
27	AGA	54	3400	Θήλυ	283	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	29	Αλβανική	22
28	AGA	63	3490	Θήλυ	280	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	37	Ελληνική	27
29	AGA	66	3590	Άρρεν	274	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	29	Αλβανική	26
30	AGA	62	3460	Θήλυ	274	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	33	Αλβανική	24
31	AGA	60	3800	Άρρεν	284	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	33	Αλβανική	23
32	AGA	51	3790	Άρρεν	283	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	27	Ρωσική	36
33	AGA	57	3100	Άρρεν	278	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	28	Ελληνική	35
34	AGA	35	3230	Θήλυ	278	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Φυσιολογικός	42	Ελληνική	23
35	AGA	48	3520	Άρρεν	273	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	39	Ελληνική	32
36	AGA	45	3350	Θήλυ	282	ΟΧΙ	ΟΧΙ	Καισαρική	39	Κροατική	20

3.6. Δειγματοληψία

Η δειγματοληψία έγινε από το εξειδικευμένο ιατρονοσηλευτικό προσωπικό της Νεογνολογικής Κλινικής στο Αρεταίειο Νοσοκομείο. Μικτό αρτηριοφλεβικό αίμα συλλέχθηκε αμέσως μετά τον τοκετό από τον διπλά σφιγμένο ομφάλιο λώρο, το οποίο αντικατοπτρίζει το αίμα του νεογνού (Σχήμα 3.6). Όσον αφορά το μητρικό αίμα, η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε είτε στο πρώτο στάδιο του τοκετού για τις περιπτώσεις εκείνες που ο τοκετός ήταν φυσιολογικός, είτε πριν λάβουν αναισθησία στη περίπτωση του τοκετού με καισαρική τομή. Η δειγματοληψία από τις εγκύους πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες νηστείας. Ο χρόνος μεταξύ του τελευταίου γεύματος και της δειγματοληψίας ήταν τουλάχιστον 8 ώρες.

Στη συνέχεια, τα δείγματα έμειναν για μία ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος επιτρέποντας την πήξη του αίματος και κατόπιν φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά (1500 g) για το διαχωρισμό του ορού από το πλάσμα. Ο ορός συλλέχθηκε και τοποθετήθηκε στην κατάψυξη (-80°C) μέχρι την διεξαγωγή της έρευνας. Ο συνολικός χρόνος από τη λήψη μέχρι την κατάψυξη του ορού δεν ξεπερνούσε τις 2 ώρες.

Σχήμα 3.6. Σχηματική αναπαράσταση πλακούντα.

3.7. Προκατεργασία δειγμάτων για ανάλυση στο NMR

Ο ορός του αίματος, όπως και τα περισσότερα βιολογικά δείγματα είναι πλούσιος σε πρωτεΐνες⁸². Οι πρωτεΐνες, αν δεν απομακρυνθούν από τα δείγματα, δίνουν ευρείες κορυφές στο φάσμα ¹H-NMR που αλληλεπικαλύπτουν τις κορυφές πολλών μεταβολιτών, δυσκολεύοντας την ταυτοποίησή τους⁸³. Η παλμική ακολουθία Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG), όπως αναφέρθηκε παραπάνω (Παράγραφος 2.3.2) αίρει αυτό τον περιορισμό με την καταστολή του σήματος των πρωτεϊνών. Ωστόσο, πολλοί μεταβολίτες που έχουν υψηλή συγγένεια πρόσδεσης με τις πρωτεΐνες αυτές καταστέλλονται παράλληλα με την παραπάνω ακολουθία και είναι αδύνατη η ανίχνευσή τους⁹⁸.

Για την άρση της παρεμπόδισης των πρωτεϊνών αποφασίστηκε η κατακρήμνισή τους με έναν οργανικό διαλύτη πριν την ανάλυση των δειγμάτων στο NMR. Για την προκατεργασία των δειγμάτων ακολουθήθηκε η μέθοδος των Nagana Gowda et al⁹⁸. Πιο συγκεκριμένα, 250 μ L ορού εκχυλίστηκαν με 500 μ L μεθανόλης (1:2 v/v), ακολούθησε ανάδευση για 1 λεπτό και τοποθέτηση των δειγμάτων στην κατάψυξη (-20 °C) για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (11 000 rpm / 4 °C) για 20 λεπτά οδηγώντας τις πρωτεΐνες σε κατακρήμνιση. Η υπερκείμενη φάση απομακρύνθηκε σε νέο errendorf και εξατμίστηκε μέχρι ξηρού. Τα δείγματα επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 400 μ L δευτεριωμένου νερού (D₂O) και 150 μ L ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH=7.0). Έπειτα, 500 μ L δείγματος μεταφέρθηκαν στο σωληνίσκο του NMR, έγινε η προσθήκη του εσωτερικού TSP (0,25 mM, τελική συγκέντρωση) και ακολούθησε η ανάλυση στο NMR. Τα στάδια της προκατεργασίας απεικονίζονται συνοπτικά στο Σχήμα 3.7.

Σχήμα 3.7. Προετοιμασία δειγμάτων για ανάλυση στο NMR.

3.8. Λήψη φασμάτων NMR

Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε φασματογράφο NMR Varian 600 MHz με ανιχνευτή τριπλού συντονισμού (υδρογόνου-άνθρακα-αζώτου, ^1H , ^{13}C , ^{15}N) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25°C). Για τη λήψη των φασμάτων 1D ^1H -NMR χρησιμοποιήθηκε η παλμική ακολουθία PRESAT με επιλεκτική ακτινοβολία του σήματος του D_2O στην περιοχή (4,68-5,00 ppm), με παράλληλη ενσωμάτωση της ακολουθίας CPMG για την περιστολή των φασματικών κορυφών των μακρομορίων (πρωτεϊνών, λιπιδίων). Η επιλογή της CPMG παλμικής ακολουθίας έγινε με βάση προκαταρκτικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στον ορό του αίματος με τις ακολουθίες NOESYPRESAT και CPMGPRESAT, καθώς παρείχε πιο «καθαρά» φάσματα (υψηλότερος λόγος σήματος κορυφής προς θόρυβο, S/N).

Η λήψη των φασμάτων πραγματοποιήθηκε στις 128 σαρώσεις (scans) σε 64.000 σημεία δεδομένων (data points) και σε εύρος φάσματος -1 έως 11 ppm. Η καθυστέρηση του χρόνου αποδιέγερσης (relaxation delay) ορίστηκε στα 5 δευτερόλεπτα ενώ το εύρος του ενισχυτή στη λήψη του αναλογικού σήματος (receiver gain) διαμορφώθηκε αυτόματα στα 60.

3.9. Χειρισμός φασμάτων

Μετά τη λήψη των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$, ακολούθησε το στάδιο της προ-επεξεργασίας, προκειμένου τα φάσματα να διαμορφωθούν κατάλληλα για την αξιοποίησή τους και να ακολουθήσει η στατιστική ανάλυση. Στον Πίνακα 3.4 δίνονται τα βήματα της προ-επεξεργασίας μαζί με την παράμετρο που προκρίθηκε. Τα διαδοχικά στάδια της προ-επεξεργασίας (όπως αναλύονται στην εισαγωγή) περιλαμβάνουν:

1. Βαθμονόμηση
2. Βελτίωση της απεικόνισής των φασμάτων
3. Διόρθωση της φάσης σήματος
4. Διόρθωση της γραμμής βάσης
5. Τμηματοποίηση του φάσματος
6. Κανονικοποίηση
7. Ευθυγράμμιση όλων των κορυφών συντονισμού σ' ένα κοινό φάσμα αναφοράς.

Πίνακας 3.4: Στάδια προ-επεξεργασίας φασμάτων και παράμετροι επιλογής.

Προ-επεξεργασία	Παράμετρος
Φιλτράρισμα	εκθετικό (0,3) και ημιτονοειδές (1,9)
Βαθμονόμηση	TSP
Διόρθωση φάσης σήματος	Αυτόματη
Διόρθωση γραμμής βάσης	Αυτόματη
Κανονικοποίηση	Συνολικό εμβαδόν
Ευθυγράμμιση	Χειροκίνητη
Τμηματοποίηση	0,001

Στη συνέχεια, τα τμήματα χωρίς πληροφορία αποκόπηκαν από το κοινό φάσμα αναφοράς. Τα τμήματα αυτά αφορούσαν τις περιοχές από 0,00 ppm – 0,60 ppm, 4,68 ppm – 5,00 ppm (περιοχή του D_2O), 9,00 ppm – 11,00 ppm. Επίσης, αποκόπηκε και η περιοχή της μεθανόλης (3,36 ppm) που αποτελεί το διαλύτη της εκχύλισης, και ίχνη του οποίο εμφανίστηκαν στα φάσματα.

Κατόπιν, το κοινό φάσμα αναφοράς μετατράπηκε σε ASCII μορφή και εισήχθη στο λογισμικό MATLAB (<https://www.mathworks.com/>) για περαιτέρω ευθυγράμμιση. Τέλος, η μήτρα δεδομένων εισήχθη στο λογισμικό SIMCA (<https://umetrics.com/>) για να ακολουθήσει η πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση.

3.10. Μεθοδολογία ταυτοποίησης μεταβολιτών

Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών στον ορό είναι ένα από τα πιο δύσκολα κομμάτια της μεταβολωμικής ανάλυσης λόγω της πληθώρας των διαφορετικών μεταβολιτών και της αλληλοεπικάλυψης ορισμένων κορυφών. Πρωταρχικό εργαλείο για την ταυτοποίηση των μεταβολιτών στα φάσματα αποτελεί η κατασκευή ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος (pool), με τυχαία ανάμειξη δειγμάτων από όλες τις ομάδες μελέτης. Η ταυτοποίηση βασίζεται κυρίως στη αποκρυστάλλωση των πληροφοριών που παρέχονται μέσα από τα 2D πειράματα (COSY, TOCSY, HSQC και HMBC). Οι συνθήκες λήψης των φασμάτων περιγράφονται στον Πίνακα 3.5.

Πίνακας 3.5: Παράμετροι 2D NMR πειραμάτων.

Πείραμα	Εύρος φάσματος (Hz)	Χρόνος καταγραφής (sec)	Αριθμός σαρώσεων (scans)	Αριθμός FIDs κατά τη διεύθυνση t1	Μιγαδικά σημεία	Χρόνος αποδιέγερσης (sec)
gCOSY	9615.4	0.150	128	256	1442	1.00
zTOCSY	7183.9	0.150	128	256	1078	1.00
gHSQCad	7183.9	0.285	320	160	2048	1.80
gHMBCad	7183.9	0.285	320	160	2048	1.80

Επιπρόσθετα εργαλεία που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση περιλαμβάνουν: το λογισμικό Chenomx (<https://www.chenomx.com/>), τις βάσεις δεδομένων HMDB (<https://hmdb.ca/>) και BMRB (<http://www.bmrw.wisc.edu/>) καθώς και τη μελέτη της βιβλιογραφίας.

3.11. Προκατεργασία δειγμάτων για ανάλυση στην HPLC

Η ανάλυση των δειγμάτων με την τεχνική της HPLC αποτελεί το τελευταίο κομμάτι της πειραματικής διαδικασίας με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό των αμινοξέων που αποτελούν υποψήφιους βιοδείκτες της IUGR. Η τεχνική της HPLC βασίζεται στο διαχωρισμό των συστατικών του δείγματος στην υγρή χρωματογραφία και κατόπιν στην ανίχνευση τους με τη βοήθεια ενός ανιχνευτή.

Στην παρούσα διπλωματική διατριβή εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο του Krause⁹⁹. Τα στάδια της προετοιμασίας περιλαμβάνουν: κατακρήμνιση των πρωτεϊνών, λυοφιλοποίηση, επαναδιάλυση σε ρυθμιστικό διάλυμα, παραγωγοποίηση, ανάλυση στην HPLC και ανίχνευση των αμινοξέων με ανιχνευτή υπεριώδους (UV) στα 436nm. Πιο συγκεκριμένα, 200 μ L ορού αίματος αναμείχθηκαν με ίση ποσότητα (v/v) από ακετονιτρίλιο, ακολούθησε ανάδευση και παραμονή των δειγμάτων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 15,000g/10 λεπτά ώστε να γίνει η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Από την υπερκείμενη φάση παραλήφθηκαν 200 μ L προς λυοφιλοποίηση και επαναδιάλυση σε ίση ποσότητα από ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών (pH=8,6).

Για το στάδιο της παραγωγοποίησης έγινε παραλαβή 60 μ L από το παραπάνω διάλυμα, αραίωση με 240 μ L ρυθμιστικού διαλύματος, ανάδευση, προσθήκη 300 μ L από το αντιδραστήριο παραγωγοποίησης (0,08 g dabsyl chloride σε 20 mL ακετόνης), ανάδευση και μεταφορά σε υδατόλουτρο στους 70°C για 15 λεπτά ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Η διακοπή της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με ψύξη του δείγματος σε παγόλουτρο για 5 λεπτά. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάμειξη του δείγματος με 600 μ L διαλύματος αραίωσης αποτελούμενο από τη κινητή φάση A, ακετονιτρίλιο και αιθανόλη (1:2:1). Ακολούθησε ανάδευση, φυγοκέντρηση στα 5000g για 5 λεπτά και παραλαβή της οργανικής στιβάδας για την χρωματογραφική ανάλυση. Η παραπάνω πειραματική πορεία ακολουθήθηκε και στα δείγματα των πρότυπων ενώσεων των αμινοξέων, με σκοπό την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς για κάθε αμινοξύ και τον ποσοτικό προσδιορισμό τους στα δείγματα του ορού. Τα στάδια της πειραματικής πορείας περιγράφονται συνοπτικά στο Σχήμα 3.8.

Η χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων και των πρότυπων ενώσεων έγινε σε σύστημα βαθμωτής έκλουσης αντίστροφης φάσης. Η κινητή φάση Α αποτελείται από μείγμα NaH_2PO_4 / $\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$ / $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$ ενώ η κινητή φάση Β από μείγμα από ακετονιτρίλιο και νερό. Οι συνθήκες της χρωματογραφικής ανάλυσης των δειγμάτων περιγράφονται στο πρωτόκολλο του Krause⁹⁹.

Σχήμα 3.8. Προετοιμασία δειγμάτων για ανάλυση στην HPLC.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Ταυτοποίηση μεταβολιτών

Για την ταυτοποίηση των μεταβολιτών κατασκευάστηκε ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα με ανάμειξη 5 τυχαίων δειγμάτων ορού από κάθε ομάδα (AGA μητρικό αίμα, AGA ομφαλικό αίμα, IUGR μητρικό αίμα και IUGR ομφαλικό αίμα), και ελήφθησαν τα 2D πειράματα gCOSY, zTOCSY, gHSQCad και gHMBCad (Παράρτημα Ι). Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών επικουρήθηκε από το λογισμικό Chenomx (<https://www.chenomx.com/>), τις βάσεις δεδομένων HMDB (<https://hmdb.ca/>) και BMRB (<http://www.bmrb.wisc.edu/>) αλλά και από βιβλιογραφικά δεδομένα. Τέλος, επειδή οι ενώσεις 3-μέθυλο-2-οξοβαλερικό οξύ, ισολευκίνη και 3-ύδροξυβουτυρικό εντοπίζονται σε χαμηλή συγκέντρωση στα δείγματα, ωστόσο αποτελούν δυνητικά σημαντικούς-χαρακτηριστικούς μεταβολίτες της IUGR, ταυτοποιήθηκαν περαιτέρω με πειράματα εμβολιασμού (spiking) του δείγματος αναφοράς (Παράρτημα Ι).

Στο Σχήμα 4.1 δίνεται ενδεικτικά η αποτίμηση των αρωματικών πρωτονίων της τυροσίνης στο φάσμα COSY, ενώ στο Σχήμα 4.2 καταγράφονται τα σήματα της κρεατίνης στο φάσμα HSQC στον ορό του αίματος.

Σχήμα 4.1. Φάσμα ^1H - ^1H COSY δείγματος ορού αίματος με καταγραφή της σύζευξης των αρωματικών πρωτονίων της τυροσίνης.

Σχήμα 4.2. Φάσμα ^1H - ^{13}C HSQC δείγματος ορού αίματος με καταγραφή των σημάτων της κρεατίνης.

Συνολικά, ταυτοποιήθηκαν 56 μεταβολίτες, χωρίς να συμπεριλαμβάνονται τα ίχνη των λιπιδίων που δεν απομακρύνθηκαν από την πειραματική διαδικασία (εντοπίζονται σε πολύ χαμηλή ένταση) και τα σάκχαρα της περιοχής 3,00-4,00 ppm που δεν είναι δυνατή η διάκρισή τους (έχουν παρόμοια δομή και συντονίζονται στις ίδιες περιοχές του φάσματος). Στο Σχήμα 4.3 δίνεται το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του δείγματος αναφοράς με την ακολουθία `cpmgpresat` με μεγέθυνση των περιοχών 0,60-1,25 ppm και 6,70-7,80 ppm. Ακολούθως, στον Πίνακα 4.1 δίνεται η λίστα των μεταβολιτών που ταυτοποιήθηκαν, οι χημικές μετατοπίσεις και η πολλαπλότητα των χαρακτηριστικών τους κορυφών.

Σχήμα 4.3. Φάσμα ^1H -NMR ορού αίματος με την ακολουθία *crmgpresat*. Η ταυτοποίηση των κύριων μεταβολιτών παρουσιάζεται σε κάθε μία φασματική κορυφή.

Πίνακας 4.1: Μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν στον ορό του αίματος με τη φασματοσκοπία NMR.

α/α	Μεταβολίτης	Χαρακτηριστική ομάδα	Χημική μετατόπιση πρωτονίου (ppm)
1	1-Μέθυλο-ιστιδίνη	CH ₂ (2), CH ₂ (5)	7.06 (s), 7.79 (s)
2	3-Μέθυλο-2-οξοβαλερικό οξύ	δ-CH ₃ , CH ₃ , γ-CH ₂ , γ-CH ₂ , β-CH	0.90 (t), 1.09 (d), 1.46 (m), 1.68 (m), 2.95 (m)
3	3-Ύδροξυβουτυρικό οξύ	γ-CH ₃ , α-CH ₂ , α-CH ₂ , β-CH	1.20 (d), 2.30 (m), 2.41 (m), 4.14 (m)
4	cis-Ακονιτικό οξύ	CH	5.68 (s)
5	α-Γλυκόζη	CH	5.24 (d)
6	Αιθανολαμίνη	NCH ₂ , OCH ₂	3.15 (t), 3.83 (t)
7	Αιθανόλη	CH ₃ , CH ₂	1.17 (t), 3.65 (q)
8	Ακετόνη	CH ₃	2.24 (s)
9	Ακέτυλογλυκίνη	CH ₃	2.04 (s)
10	Αλανίνη	β-CH ₃ , α-CH	1.48 (d), 3.78 (q)
11	α-Μαννόζη	CH	5.19 (d)
12	Αργινίνη	γ-CH ₂ , γ-CH ₂ , β-CH ₂ , δ-CH ₂ , α-CH	1.67 (m), 1.75 (m), 1.91 (m), 3.24 (t), 3.76 (t)
13	Ασπαραγίνη	β-CH ₂ , β-CH ₂ , α-CH	2.85 (m), 2.95 (m), 4.00 (dd)
14	Ασπαρτικό οξύ	CH ₂ , CH ₂ , CH	2.68 (dd), 2.82 (dd), 3.90 (dd)
15	β-Αλανίνη	α-CH ₂ , β-CH ₂	2.56 (t), 3.19 (t)
16	Βαλίνη	γ-CH ₃ , γ-CH ₃ , β-CH, α-CH	0.99 (d), 1.05 (d), 2.27 (m), 3.61 (d)
17	β-Γλυκόζη	CH	4.65 (d)
18	Βεταίνη	CH ₃	3.27 (s)
19	Γαλακτικό οξύ	β-CH ₃ , α-CH	1.33 (d), 4.11 (q)

20	Γλουταμινικό οξύ	β -CH ₂ , β -CH ₂ , γ -CH ₂ , α -CH	2.06 (m), 2.11 (m), 2.36 (m), 3.77 (dd)
21	Γλουταμίνη	β -CH ₂ , γ -CH ₂ , α -CH	2.14 (m), 2.46 (m), 3.78 (t)
22	Γλυκερόλη	CH ₂ , CH ₂ , CH	3.55 (dd), 3.66(dd), 3.78 (m)
23	Γλυκεροφωφοχολίνη	CH ₃ , NCH ₂ , OCH ₂	3.22 (s), 3.68 (t), 4.32 (t)
24	Γλυκίνη	CH ₂	3.56 (s)
25	Διμέθυλογλυκίνη	CH ₃	2.93 (s)
26	Θρεονίνη	γ -CH ₃ , α -CH, β -CH	1.33 (d), 3.59 (d), 4.25 (m)
27	Ινοσίνη	CH ₂ , -O-CH-CH ₂ OH, -CH(OH)-CH-, -N-CH-, N-CH-N, -N-CH-N (ιμιδαζ.)	3.85 (d), 4.28 (m), 4.44 (dd), 6.10 (d), 8.24 (s), 8.34 (s)
28	Ιππουρικό οξύ	C _{3,5} H, C _{2,6} H	7.54 (m), 7.83 (dd)
29	Ισολευκίνη	δ -CH ₃ , CH ₃ , γ -CH ₂ , γ -CH ₂ , β -CH,	0.95 (t), 1.01 (d), 1.25 (m), 1.47 (m), 1.98 (m), 3.69 (d)
30	Ιστιδίνη	β -CH ₂ , β -CH ₂ , α -CH, NCHC, NCHNH	3.12 (dd), 3.23(dd), 3.99 (dd), 7.07 (s), 7.82 (s)
31	Καρνιτίνη	CH ₃	3.23 (s)
32	Κιτρικό οξύ	CH ₂ , CH ₂	2.55 (d), 2.67 (d)
33	Κρεατίνη	CH ₃ , CH ₂	3.04 (s), 3.93 (s)
34	Κρεατινίνη	CH ₃ , CH ₂	3.05 (s), 4.07 (s)
35	Κυστεΐνη	CH ₂ , CH	3.05 (d), 3.95 (t)
36	Κυστίνη	β -CH ₂ , β -CH ₂ , α -CH	3.18 (dd), 3.38 (dd), 4.09 (dd)
37	Λευκίνη	δ -CH ₃ , δ -CH ₃ , γ -CH & β -CH ₂ , α -CH	0.96 (d), 0.97 (d), 1.69-1.74 (m), 3.74 (m)
38	Λιπίδια / Ακόρεστες αλυσίδες λιπιδίων	CH ₃ , -(CH ₂) _n / CH, CH ₂	0.82 (m), 1.16 (m) / 2.77 (m), 5.30 (m)

39	Λυσίνη	γ -CH ₂ , γ -CH ₂ , δ -CH ₂ , β -CH ₂ , ϵ -CH ₂ , α -CH	1.45 (m), 1.52(m), 1.73 (m), 1.91 (m), 3.03 (t), 3.76 (t)
40	Μεθανόλη	CH ₃	3.36 (s)
41	Μεθειονίνη	β -CH ₂ , γ -CH ₂	2.16 (m), 2.63 (t)
42	Μηλικό οξύ	CH ₂ , CH ₂ , CH	2.38 (dd), 2.67 (dd), 4.30 (dd)
43	Μυο-ινοσιτόλη	C ₂ H, C _{4,6} H, C _{1,3} H	3.28 (t), 3.52 (dd), 3.61 (t)
44	Ορνιθίνη	γ -CH ₂ , β -CH ₂ , δ -CH ₂ , α -CH	1.75 (m), 1.94 (m), 3.06 (t), 3.77 (t)
45	Ουριδίνη	CH (δακτ.), CH (δακτ.)	5.90 (d), 7.88 (d)
46	Προλίνη	γ -CH ₂ , β -CH ₂ , β -CH ₂ , δ -CH ₂ , δ -CH ₂ , α -CH	1.99(m), 2.05 (m), 2.35 (m), 3.34 (m), 3.41 (m), 4.14 (dd)
47	Προπυλενογλυκόλη	CH ₃ , CH ₂ , CH ₂ ,	1.15 (d), 3.39 (dd), 3.54 (dd)
48	Πυρογλουταμινικό οξύ	β -CH ₂ , γ -CH ₂ , β -CH ₂ , α -CH	2.03 (m), 2.41 (m), 2.51(m), 4.17 (dd)
49	Σάκχαρα*	CH, CH, CH ₂	3.27-3.32 (m), 3.42(m), 3.44 - 3.52 (m), 3.55 (m), 3.58-3.65 (m), 3.72 (m), 3.74 (m), 3.83(m), 3.80-4.0 (m)
50	Ξερίνη	α -CH, β -CH ₂	3.85 (dd), 3.95 (m)
51	Σουκρόζη	CH	5.40 (d)
52	Ταυρίνη	SCH ₂ , CH ₂	3.26 (t), 3.42 (t)
53	Θρυπτοφάνη	β -CH ₂ , β -CH ₂ , α -CH, CH (δακτ.) (8), CH (δακτ.) (9), CH (δακτ.) (6), CH (δακτ.) (7)	3.32 (dd), 3.49 (dd), 4.06 (dd), 7.21 (t), 7.30 (t), 7.55 (d), 7.74 (d)
54	Τυροσίνη	CH ₂ , CH ₂ , α -CH, ϵ -CH (δακτ.), δ -CH (δακτ.)	3.07 (dd), 3.20 (dd), 3.94 (dd), 6.90 (m), 7.20 (m)
55	Φαινυλαλανίνη	β -CH ₂ , β -CH ₂ , α -CH, δ -CH (δακτ.), σt-CH (δακτ.), ϵ -CH (δακτ.)	3.14 (dd), 3.28 (dd), 4.00 (dd), 7.33 (m), 7.38 (t), 7.43 (m)

56	Φορμικό οξύ	CH	8.46 (s)
57	Χολίνη	CH ₃ , NCH ₂ , OCH ₂	3.21 (s), 3.53 (m), 4.07 (m)
58	Χοληστερόλη	C18-CH ₃	0.73 (m)

* γλυκόζη, μαλτόζη, φρουκτόζη, λακτόζη, ξυλόζη, σουκρόζη

4.2. Πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση δεδομένων

Η πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση εφαρμόζεται μετά το στάδιο της προ-επεξεργασίας των φασμάτων με σκοπό την προβολή των φασματικών δεδομένων σε μία πιο φιλική προς το χρήστη μορφή, που να καθίσταται εφικτή η εξαγωγή χρήσιμων πληροφοριών.

Εφαρμόζεται για το διαχωρισμό των ομάδων IUGR και AGA μεταξύ των ομφαλικών και μητρικών δειγμάτων και τον εντοπισμό των μεταβολιών που συνεισφέρουν σε μεγαλύτερο ποσοστό στη παρατηρούμενη διάκριση και αποτελούν ενδεχομένως τους υποψήφιους βιοδείκτες της IUGR παθολογίας. Στη συνέχεια, μέσα από το λογισμικό MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>), κατασκευάζεται για κάθε μεταβολίτη η καμπύλη ROC και οι μεταβολίτες με υψηλή τιμή AUC αξιοποιούνται για την εύρεση των μεταβολικών μονοπατιών που επηρεάζονται από την IUGR παθολογία.

Με βάση προκαταρκτικές δοκιμές απεικόνισης που έγιναν στη μήτρα δεδομένων, αποφασίστηκε να ακολουθηθεί η τεχνική μετατροπής κλίμακος pareto.

4.3. Προκαταρκτικός έλεγχος

Η PCA ανάλυση αποτελεί το πρωταρχικό εργαλείο της πολυπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης των δεδομένων με σκοπό τον εντοπισμό ομάδων, τάσεων ή και ακραίων τιμών μεταξύ των δειγμάτων, με βάση τις χημικές πληροφορίες που περιέχονται στα φάσματά τους. Σε κάθε μία από τις 4 ομάδες μελέτης (AGA μητρικό αίμα, AGA ομφαλικό αίμα, IUGR μητρικό αίμα και IUGR ομφαλικό αίμα) εφαρμόστηκε η PCA ανάλυση για την εκτίμηση της ομοιομορφίας των δειγμάτων και τον εντοπισμό πιθανών έκτροπων τιμών. Κατόπιν, σε κάθε ένα από τα παραγόμενα PCA μοντέλα ελέγχθηκαν:

- η παθολογία της εγκύου
- το κάπνισμα κατά τη διάρκεια της κύησης
- ο χρόνος κύησης
- η ηλικία της μητέρας
- το BMI της μητέρας πριν την κύηση
- το είδος του τοκετού
- το φύλο του νεογνού
- η εκατοστιαία θέση του νεογνού

Στα Σχήματα 4.4 και 4.5 δίνονται τα μοντέλα PCA για κάθε μία από τις 2 ομάδες AGA (μητρικό και ομφαλικό αίμα). Όπως παρουσιάζεται ακολούθως, η κατανομή των δειγμάτων στο χώρο του ελλειψοειδούς είναι κανονική, ενώ δεν εντοπίζονται έκτροπες τιμές.

Σχήμα 4.4. Μοντέλο PCA για τα δείγματα AGA ορού μητρικού αίματος.

Σχήμα 4.5. Μοντέλο PCA για τα δείγματα AGA ορού ομφαλικού αίματος.

Επίδραση της παθολογίας της εγκύου

Στα Σχήματα 4.6 και 4.7 παρουσιάζονται τα μοντέλα ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) για τις ομάδες IUGR (μητρικό και ομφαλικό αίμα) με εξέταση της παθολογίας της εγκύου (πράσινο χρώμα). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.7, το δείγμα με θρομβοφιλία εντοπίζεται εκτός του ελλειψοειδούς στην περίπτωση των δειγμάτων του ομφαλικού αίματος, γεγονός που εξηγείται από το διαφορετικό μεταβολικό προφίλ του συγκεκριμένου δείγματος σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα.

Αντίθετα, τα δείγματα με ΣΔΚ (σακχαρώδη διαβήτη κύησης) παρουσιάζουν κανονική κατανομή, ωστόσο, τα φάσματά τους εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα (Σχήμα 4.8).

Σχήμα 4.6. Μοντέλο PCA για τα δείγματα IUGR μητρικού αίματος. Τα δείγματα με ΣΔΚ αναπαρίστανται με πράσινο τετράγωνο και το δείγμα με θρομβοφιλία με πράσινο ρόμβο.

Σχήμα 4.7. Μοντέλο PCA για τα δείγματα IUGR ομφαλικού αίματος. Τα δείγματα με ΣΔΚ αναπαρίστανται με πράσινο τετράγωνο και το δείγμα με θρομβοφιλία με πράσινο ρόμβο.

Σχήμα 4.8. Κορυφές γλυκόζης στα δείγματα IUGR ομφαλικού αίματος. Οι μαύρες γραμμές απεικονίζουν τις κορυφές της γλυκόζης στα δείγματα με ΣΔΚ.

Με βάση το διαφορετικό προφίλ των IUGR δειγμάτων με παθολογία (θρομβοφιλία και ΣΔΚ) σε σχέση με τα υπόλοιπα IUGR δείγματα, αποφασίστηκε ο αποκλεισμός τους από την περαιτέρω πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση, περιορίζοντας το συνολικό αριθμό των υπό-μελέτη δειγμάτων στα 77 (41 IUGR και 36 AGA).

Επίδραση του είδους του τοκετού

Ο έλεγχος της επίδρασης του τοκετού (φυσιολογικός τοκετός ή καισαρική τομή) στα PCA μοντέλα των δειγμάτων του ομφαλικού αίματος (IUGR και AGA), έδειξε μία τάση διαχωρισμού των δειγμάτων που προήλθαν από γυναίκες που γέννησαν φυσιολογικά σε σχέση με τα δείγματα που προήλθαν από γυναίκες που γέννησαν με καισαρική τομή.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.9 (Α), στην περίπτωση των IUGR δειγμάτων ομφαλικού αίματος, υπάρχει μία τάση διαχωρισμού αυτών που προέρχονται από γυναίκες που γέννησαν φυσιολογικά (κόκκινοι κύκλοι), σε σχέση με τα δείγματα που προέρχονται από γυναίκες που γέννησαν με καισαρική τομή (κίτρινοι κύκλοι), κατά μήκος της πρώτης κύριας συνιστώσας (PC₁) της PCA. Αντίστοιχα, στο Σχήμα 4.9 (Β), φαίνεται μία τάση διαχωρισμού των AGA δειγμάτων ομφαλικού αίματος κατά μήκος της δεύτερης κύριας συνιστώσας (PC₂) της PCA ανάλογα με τον τρόπο του τοκετού.

Σχήμα 4.9. Επίδραση του είδους του τοκετού στα δείγματα ομφαλικού αίματος, (A) για την ομάδα IUGR και (B) για την ομάδα AGA. Με κόκκινο χρώμα αναπαρίστανται τα δείγματα που προέρχονται από γυναίκες που γέννησαν φυσιολογικά και με κίτρινο τα δείγματα που προέρχονται από γυναίκες που γέννησαν με καισαρική τομή.

Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε η OPLS-DA ανάλυση στα δείγματα του ομφαλικού αίματος (IUGR και AGA) ανάλογα με το είδος του τοκετού και μέσα από το διάγραμμα S-line, έγινε η επιλογή των μεταβλητών που συμμετέχουν σε μεγαλύτερο βαθμό στο διαχωρισμό. Όπως φαίνεται στα Σχήματα 4.10 και 4.11, ο διαχωρισμός των δειγμάτων ομφαλικού αίματος και στις 2 ομάδες είναι ικανοποιητικός, ενώ από τα διαγράμματα S-line προκύπτει ότι ο διαχωρισμός

οφείλεται κυρίως στο γαλακτικό οξύ (1,33 (d), 4,11 (q)). Το γαλακτικό οξύ εντοπίζεται και στις δύο περιπτώσεις σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στην αρνητική κατεύθυνση (<0) της πρώτης κύριας συνιστώσας, που σημαίνει ότι βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στα ομφαλικά δείγματα που προέρχονται από τις μητέρες που είχαν φυσιολογικό τοκετό.

Σχήμα 4.10. (A) OPLS-DA διάκριση ομφαλικών δειγμάτων IUGR ανάλογα με το είδος του τοκετού. Με κόκκινο χρώμα αναπαρίστανται τα δείγματα που προέρχονται από τις γυναίκες που γέννησαν φυσιολογικά ενώ με κίτρινο τα δείγματα που προέρχονται από τις γυναίκες που γέννησαν με καισαρική τομή. (B) Διάγραμμα μεταβλητών S-line.

Σχήμα 4.11. (Α) OPLS-DA διάκριση ομφαλικών δειγμάτων AGA ανάλογα με το είδος του τοκετού. Με κόκκινο χρώμα αναπαρίστανται τα δείγματα που προέρχονται από τις γυναίκες που γέννησαν φυσιολογικά ενώ με κίτρινο τα δείγματα που προέρχονται από τις γυναίκες που γέννησαν με καισαρική τομή. (Β) Διάγραμμα μεταβλητών S-line.

Με βάση το διαχωρισμό των δειγμάτων ομφαλικού αίματος ανάλογα με το είδος του τοκετού, λόγω της υψηλότερης συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος στα δείγματα που προέρχονται από τις μητέρες που γέννησαν φυσιολογικά, αποφασίστηκε η απομάκρυνση του γαλακτικού οξέος (1,33 (d), 4,11 (q)) από την περαιτέρω επεξεργασία των δεδομένων.

Επίδραση των υπολοίπων παραμέτρων

Όλα τα ανθρωπομετρικά και κλινικά χαρακτηριστικά που καταγράφονται στον Πίνακα 3.3, πέραν της παθολογίας της εγκύου και του είδους του τοκετού, ελέγχθηκαν στα PCA μοντέλα των ομάδων (AGA μητρικό αίμα, AGA ομφαλικό αίμα, IUGR μητρικό αίμα και IUGR ομφαλικό αίμα) μετά την απομάκρυνση του γαλακτικού οξέος. Από την απεικόνιση των PCA μοντέλων που προέκυψαν, δεν εντοπίστηκε κάποια αξιόλογη συσχέτιση. Στο Σχήμα 4.12 φαίνεται ενδεικτικά η απεικόνιση της εκατοστιαίας θέσης του νεογνού (Ε/Θ, percentile) στο PCA μοντέλο των δειγμάτων IUGR ομφαλικού αίματος.

Σχήμα 4.12. PCA μοντέλο δειγμάτων IUGR ομφαλικού αίματος με απεικόνιση της εκατοστιαίας θέσης του νεογνού.

4.4. Επεξεργασία δεδομένων

Ο δειγματοχώρος, μετά την απομάκρυνση των IUGR δειγμάτων με ΣΔΚ και θρομβοφιλία, περιλαμβάνει 77 ζεύγη δειγμάτων ομφαλικού και μητρικού αίματος. Τα 41 ζεύγη αφορούν IUGR περιπτώσεις και τα 36 περιπτώσεις AGA. Τα δείγματα χωρίστηκαν σε 2 ομάδες ανάλογα με τη φύση τους (ομφαλικά και μητρικά δείγματα) και σε κάθε ομάδα εφαρμόστηκε πολυπαραμετρική στατιστική επεξεργασία.

➤ **Ομφαλικά δείγματα**

Το μοντέλο της PCA ανάλυσης των δειγμάτων του ομφαλικού αίματος (41 IUGR και 36 AGA), μετά την απομάκρυνση των περιοχών του γαλακτικού οξέος και της μεθανόλης (κατάλοιπα του διαλύτη εκχύλισης) φαίνεται στο Σχήμα 4.13.

Σχήμα 4.13. PCA μοντέλο δειγμάτων ομφαλικού αίματος. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται τα IUGR δείγματα και με μπλε τα AGA.

Όπως φαίνεται παραπάνω, τα AGA δείγματα (μπλε κύκλοι) διαφοροποιούνται από τα IUGR δείγματα (κόκκινοι κύκλοι). Τα AGA δείγματα εντοπίζονται κυρίως στο πρώτο τεταρτημόριο του ελλειψοειδούς σε αντίθεση με τα IUGR δείγματα που κατανέμονται κυρίως στο δεύτερο και τρίτο τεταρτημόριο.

Ακολούθησε η OPLS-DA ανάλυση για την περίπτωση διαχωρισμού των ομφαλικών δειγμάτων σε IUGR και AGA. Για την επικύρωση του μοντέλου χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος αναδιάταξης των αποκρίσεων (response permutation testing), ο έλεγχος διασταυρωμένης επικύρωσης της ανάλυσης (CV-ANOVA) και ο έλεγχος του εμβαδού κάτω από τις καμπύλες ROC.

Στο Σχήμα 4.14 δίνεται το OPLS-DA μοντέλο των ομφαλικών δειγμάτων, μαζί με το διάγραμμα ελέγχου αναδιάταξης των αποκρίσεων και τις καμπύλες ROC, ενώ στον Πίνακα 4.2 δίνεται ο πίνακας ελέγχου διασταυρωμένης επικύρωσης της ανάλυσης.

Σχήμα 4.14. (Α) OPLS-DA μοντέλο δειγμάτων ομφαλικού αίματος. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται τα IUGR δείγματα και με μπλε τα AGA. (Β) Διάγραμμα ελέγχου αναδιάταξης των αποκρίσεων. (Γ) Καμπύλες ROC.

Πίνακας 4.2: CV-ANOVA για το OPLS-DA μοντέλο των ομφαλικών δειγμάτων.

	SS	DF	MS	F	p-value	SD
Total corr.	76	76	1			1
Regression	42,4896	4	10,6224	22,8232	$3,33 \times 10^{-12}$	3,2592
Residual	33,5103	72	0,465422			0,682218

Όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα, το μοντέλο OPLS-DA θεωρείται αξιόπιστο καθώς οι τιμές των παραμέτρων $R^2Y(cum)$ και $Q^2(cum)$ είναι μεγαλύτερες από 0,50, ενώ η διαφορά $R^2Y(cum) - Q^2(cum)$ είναι μικρότερη από 0,20. Η προσαρμογή του μοντέλου, $R^2Y(cum)$ είναι ικανοποιητική ενώ η ικανότητα πρόβλεψης του, $Q^2(cum)$ θεωρείται καλή. Επίσης, το μοντέλο επικυρώνεται καθώς το διάγραμμα ελέγχου αναδιάταξης των αποκρίσεων είναι έγκυρο στις 999 επαναλήψεις, οι τιμές εμβαδού κάτω από τις καμπύλες ROC των 2 ομάδων είναι μεγαλύτερες από 0,90 και η τιμή p-value του ελέγχου διασταυρωμένης επικύρωσης της ανάλυσης είναι μικρότερη από 0,05.

Κατόπιν, εφόσον το OPLS-DA μοντέλο είναι έγκυρο και αξιόπιστο, ακολούθησε η εξαγωγή του διαγράμματος μεταβλητών S-line (Σχήμα 4.15), για την

ανίχνευση των μεταβολιτών που συνεισφέρουν περισσότερο στη παρατηρούμενη διάκριση.

Σχήμα 4.15. Διάγραμμα S-line με μεγέθυνση των περιοχών με τους μεταβολίτες που συνεισφέρουν περισσότερο στη διάκριση, όπου: 1: Ισολευκίνη, 2: Λευκίνη, 3: Βαλίνη, 4: 3-Μέθυλο-2-οξοβαλερικό οξύ, 5: Αλανίνη, 6: Γλυκερόλη, 7: Θρυπτοφάνη, 8: Φαινυλαλανίνη.

Με βάση την OPLS-DA διάκριση των ομφαλικών δειγμάτων από την πρώτη κύρια συνιστώσα πρόβλεψης και το διάγραμμα S-line, προκύπτει ότι οι φασματικές κορυφές με αρνητικό προσανατολισμό αντιστοιχούν σε μεταβολίτες που εντοπίζονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στην IUGR ομάδα, ενώ οι κορυφές με θετικό προσανατολισμό αντιστοιχούν σε μεταβολίτες που εντοπίζονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στην AGA ομάδα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, όσο πιο κόκκινο είναι το χρώμα της κορυφής, τόσο μεγαλύτερη είναι η συνεισφορά του αντίστοιχου μεταβολίτη στη διάκριση.

Επομένως, οι μεταβολίτες που βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στα IUGR δείγματα είναι η λευκίνη, η ισολευκίνη, η βαλίνη και η αλανίνη και το 3-μέθυλο-2-οξοβαλερικό οξύ. Αντιθέτως, τα AGA δείγματα περιέχουν υψηλότερη συγκέντρωση σε γλυκερόλη, φαινυλαλανίνη και θρυπτοφάνη.

Στη συνέχεια, μέσα από το λογισμικό MetaboAnalyst, παρήχθησαν οι καμπύλες ROC και τα θηκογράμματα (box plots) για τους παραπάνω μεταβολίτες στις 2 ομάδες (Σχήμα 4.16). Όλοι οι προτεινόμενοι μεταβολίτες θεωρούνται

στατιστικώς σημαντικοί στη διάκριση των ομάδων IUGR και AGA, με υψηλές τιμές AUC και τιμές p-value <0,05. Στον Πίνακα 4.3 δίνονται οι τιμές των AUC και p-value για τους συγκεκριμένους μεταβολίτες και υποψήφιους βιοδείκτες.

Σχήμα 4.16. Καμπύλες ROC και θηκογράμματα για τους σημαντικούς μεταβολίτες της διάκρισης των ομφαλικών δειγμάτων.

Πίνακας 4.3: Τιμές AUC και p-value για τους υποψήφιους βιοδείκτες της διάκρισης των ομφαλικών δειγμάτων.

Μεταβολίτης	AUC	p-value
Αλανίνη	0,871	$6,47 \times 10^{-9}$
Λευκίνη	0,816	$1,31 \times 10^{-6}$
Ισολευκίνη	0,795	$6,39 \times 10^{-6}$
Βαλίνη	0,785	$4,77 \times 10^{-6}$
3-Μέθυλο-2-οξοβαλερικό οξύ	0,642	$3,66 \times 10^{-3}$
Φαινυλαλανίνη	0,779	$3,05 \times 10^{-5}$
Γλυκερόλη	0,835	$1,59 \times 10^{-7}$
Θρυπτοφάνη	0,751	$7,52 \times 10^{-5}$

Μεταξύ των υποψήφιων μεταβολιτών-βιοδεικτών στα ομφαλικά δείγματα, η αλανίνη θεωρείται ως ο πιο σημαντικός μεταβολίτης της IUGR (AUC=0,871), ενώ το 3-μέθυλο-2-οξοβαλερικό οξύ ο λιγότερο σημαντικός μεταβολίτης (AUC=0,642).

Οι παραπάνω μεταβολίτες χρησιμοποιήθηκαν μέσα από το λογισμικό MetaboAnalyst για τον εντοπισμό των μεταβολικών μονοπατιών που μεταβάλλονται από την IUGR παθολογία. Στο Σχήμα 4.17 δίνεται το διάγραμμα Barchart με τα μεταβολικά μονοπάτια που επηρεάζονται από την IUGR παθολογία. Τα μονοπάτια με την υψηλότερη συμμετοχή από τους προτεινόμενους βιοδείκτες (hit) ως προς το σύνολο των μεταβολιτών που συμμετέχουν στο συγκεκριμένο μονοπάτι (total), με τιμή p-value<0,05 επιλέχθηκαν ως τα πιο σημαντικά μονοπάτια που επηρεάζονται από την IUGR παθολογία. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.4, μόνο το μεταβολικό μονοπάτι της αποικοδόμησης των αμινοξέων βαλίνη, λευκίνη και ισολευκίνη επηρεάζεται από την IUGR παθολογία.

Σχήμα 4.17. Διάγραμμα Barchart οφθαλμικών δειγμάτων.

Πίνακας 4.4: Ανάλυση εμπλουτισμού δειγμάτων οφθαλμικού αίματος.

Μεταβολικό μονοπάτι	Συνολικός αριθμός μεταβολιτών	Βιοδείκτες που συμμετέχουν	p-value
Αποικοδόμηση βαλίνης, λευκίνης και ισολευκίνης	60	4	$6,26 \times 10^{-4}$
Μεταβολισμός θρυπτοφάνης	60	2	0,0753
Κύκλος γλυκόζης-αλανίνης	13	1	0,0975
Μεταβολισμός αλανίνης	17	1	0,126
Μεταβολισμός γλουταθειόνης	21	1	0,153
Μεταβολισμός γλυκερολιπιδίων	25	1	0,18
Μεταβολισμός φαινυλαλανίνης και τυροσίνης	28	1	0,20
Κύκλος ουρίας	29	1	0,206
Μεταβολισμός γαλακτόζης	38	1	0,262
Μεταβολισμός γλυκίνης και σερίνης	59	1	0,379

➤ **Μητρικά δείγματα**

Η πορεία ανάλυσης των φασματικών δεδομένων από τα μητρικά δείγματα (41 IUGR και 36 AGA) ήταν ανάλογη με εκείνη των ομφαλικών δειγμάτων. Στο Σχήμα 4.18 δίνεται η PCA ανάλυση όλου του δειγματοχώρου.

Σχήμα 4.18. PCA μοντέλο δειγμάτων μητρικού αίματος. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται τα IUGR δείγματα και με μπλε τα AGA.

Όπως φαίνεται παραπάνω, τα AGA δείγματα (μπλε κύκλοι) τείνουν να διαχωριστούν από τα IUGR δείγματα (κόκκινοι κύκλοι) κατά μήκος της δεύτερης κύριας συνιστώσας της PCA. Πιο συγκεκριμένα, τα AGA δείγματα συγκεντρώνονται στο 1^ο και 2^ο τεταρτημόριο σε αντίθεση με τα IUGR δείγματα που εντοπίζονται κυρίως στο 3^ο και 4^ο τεταρτημόριο.

Ακολουθως, στο Σχήμα 4.19 δίνεται το μοντέλο της OPLS-DA ανάλυσης των μητρικών δειγμάτων μαζί με το διάγραμμα ελέγχου αναδιάταξης των αποκρίσεων και τις καμπύλες ROC, ενώ στον Πίνακα 4.5 δίνεται ο πίνακας ελέγχου της διασταυρωμένης επικύρωσης της ανάλυσης.

Σχήμα 4.19. (Α) OPLS-DA μοντέλο δειγμάτων μητρικού αίματος. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται τα IUGR δείγματα και με μπλε τα AGA. (Β) Διάγραμμα ελέγχου αναδιάταξης των αποκρίσεων. (Γ) Καμπύλες ROC.

Πίνακας 4.5: CV-ANOVA για το OPLS-DA μοντέλο των μητρικών δειγμάτων.

	SS	DF	MS	F	p-value	SD
Total corr.	76	76	1			1
Regression	43,0229	4	10,7557	23,4834	$1,89 \times 10^{-12}$	3,27959
Residual	32,9771	72	0,458015			0,676768

Το παραπάνω OPLS-DA μοντέλο είναι αξιόπιστο καθώς οι τιμές R^2Y (cum) και Q^2 (cum) είναι μεγαλύτερες του 0,50, ενώ η διαφορά R^2Y (cum) - Q^2 (cum) είναι μικρότερη του 0,20. Επίσης, το μοντέλο επικυρώνεται από το διάγραμμα ελέγχου αναδιάταξης των αποκρίσεων (999 επαναλήψεις), τις τιμές του εμβαδού κάτω από τις καμπύλες ROC των 2 ομάδων ($AUC > 0,90$) και την τιμή p-value του ελέγχου διασταυρωμένης επικύρωσης της ανάλυσης ($p\text{-value} < 0,05$). Στο Σχήμα 4.20 δίνεται το διάγραμμα μεταβλητών S-line για το παραπάνω μοντέλο διάκρισης.

Σχήμα 4.20. Διάγραμμα S-line για την ανίχνευση των σημαντικών μεταβολιτών της διάκρισης των μητρικών δειγμάτων, όπου: 1: Ισολευκίνη, 2: Λευκίνη, 3: Βαλίνη, 4: 3-Μέθυλο-2-οξοβαλερικό οξύ, 5: 3-Υδροξυβουτυρικό οξύ, 6: Αλανίνη, 7: Γλυκερόλη, 8: Φαινυλαλανίνη.

Τα μητρικά δείγματα διαχωρίζονται στο OPLS-DA μοντέλο από την πρώτη κύρια συνιστώσα. Τα IUGR δείγματα βρίσκονται στην αριστερή πλευρά της πρώτης κύριας συνιστώσας και χαρακτηρίζονται από τις φασματικές κορυφές με αρνητικό προσανατολισμό στο διάγραμμα S-line που αντιστοιχούν σε μεταβολίτες σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στη συγκεκριμένη ομάδα. Αντίθετα, τα AGA δείγματα βρίσκονται στην δεξιά πλευρά της πρώτης κύριας συνιστώσας και σχετίζονται περισσότερο με τους μεταβολίτες των οποίων οι φασματικές κορυφές έχουν θετικό προσανατολισμό στο S-line.

Επομένως, τα IUGR μητρικά δείγματα περιέχουν υψηλότερη συγκέντρωση στους μεταβολίτες λευκίνη, ισολευκίνη, βαλίνη, αλανίνη, 3-υδροξυβουτυρικό οξύ και 3-μέθυλο-2-οξοβαλερικό οξύ. Αντιθέτως, τα AGA δείγματα περιέχουν υψηλότερη συγκέντρωση σε γλυκερόλη και φαινυλαλανίνη. Στο Σχήμα 4.21 δίνονται οι καμπύλες ROC και τα θηκογράμματα για τους προτεινόμενους μεταβολίτες-υποψήφιους βιοδείκτες, ενώ στον Πίνακα 4.6 δίνονται οι τιμές AUC και p-value.

Σχήμα 4.21. Καμπύλες ROC και θηκογράμματα για τους σημαντικούς μεταβολίτες της διάκρισης των μητρικών δειγμάτων.

Πίνακας 4.6: Τιμές AUC και p-value για τους υποψήφιους βιοδείκτες της διάκρισης των μητρικών δειγμάτων.

Μεταβολίτης	AUC	p-value
Αλανίνη	0,792	$3,76 \times 10^{-6}$
Λευκίνη	0,773	$5,81 \times 10^{-5}$
Ισολευκίνη	0,812	$8,76 \times 10^{-7}$
Βαλίνη	0,786	$7,18 \times 10^{-6}$
3-Μέθυλο-2-οξοβαλερικό οξύ	0,777	$7,35 \times 10^{-4}$
Φαινυλαλανίνη	0,750	$9,73 \times 10^{-5}$
Γλυκερόλη	0,751	$1,84 \times 10^{-4}$
3-Υδροξυβουτυρικό οξύ	0,774	$2,58 \times 10^{-5}$

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα, όλοι οι προτεινόμενοι μεταβολίτες λαμβάνουν τιμές $AUC \geq 0,75$ και θεωρούνται στατιστικώς σημαντικοί για τη διάκριση των μητρικών δειγμάτων, ενώ η ισολευκίνη είναι ο πιο σημαντικός

μεταβολίτης (AUC=0,812) της διάκρισης. Στο Σχήμα 4.22 δίνεται το διάγραμμα Barchart με τα μεταβολικά μονοπάτια που επηρεάζονται από την IUGR παθολογία στα μητρικά δείγματα.

Σχήμα 4.22. Διάγραμμα Barchart μητρικών δειγμάτων.

Στον Πίνακα 4.7 δίνεται η ανάλυση εμπλουτισμού για τα παραπάνω μεταβολικά μονοπάτια. Το μοναδικό μεταβολικό μονοπάτι που επηρεάζεται στατιστικώς σημαντικά ($p\text{-value} < 0,05$) από την IUGR παθολογία μεταξύ των μητρικών δειγμάτων είναι εκείνο της αποικοδόμησης των αμινοξέων βαλίνη, λευκίνη και ισολευκίνη.

Πίνακας 4.7: Ανάλυση εμπλουτισμού δειγμάτων μητρικού αίματος.

Μεταβολικό μονοπάτι	Συνολικός αριθμός μεταβολιτών	Βιοδείκτες που συμμετέχουν	p-value
Αποικοδόμηση βαλίνης, λευκίνης και ισολευκίνης	60	4	$6,26 \times 10^{-4}$
Κύκλος γλυκόζης-αλανίνης	13	1	0,975
Μεταβολισμός αλανίνης	17	1	0,126
Μεταβολισμός γλουταθειόνης	21	1	0,153
Μεταβολισμός γλυκερολιπιδίων	25	1	0,18
Μεταβολισμός φαινυλαλανίνης και τυροσίνης	28	1	0,20
Κύκλος ουρίας	29	1	0,206
Βιοσύνθεση λιπαρών οξέων	35	1	0,244
Μεταβολισμός γαλακτόζης	38	1	0,262
Μεταβολισμός γλυκίνης και σερίνης	59	1	0,379
Μεταβολισμός θρυπτοφάνης	60	1	0,384

4.5. Ποσοτικός προσδιορισμός υποψήφιων βιοδεικτών

Όπως παρουσιάστηκε προηγουμένως, μέσα από την πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση των δεδομένων επιτεύχθηκε ο διαχωρισμός των ομάδων IUGR και AGA στα ομφαλικά και μητρικά δείγματα. Ο διαχωρισμός είναι έγκυρος καθώς $R^2X > 0,50$ (ικανότητα προσαρμογής), $Q^2 > 0,50$ (ικανότητα πρόβλεψης) και $R^2X - Q^2 > 0,20$. Επίσης, τα μοντέλα διαχωρισμού είναι ισχυρά καθώς επαληθεύονται μέσα από τον έλεγχο αναδιάταξης των αποκρίσεων (999 επαναλήψεις), τις καμπύλες ROC ($AUC > 0,75$) και τον έλεγχο CV-ANOVA ($p\text{-value} < 0,05$).

Μέσα από το διάγραμμα μεταβλητών S-γραμμής (S-line plot) εντοπίστηκαν οι μεταβολίτες που συνεισφέρουν σε μεγαλύτερο βαθμό στο διαχωρισμό των 2 ομάδων και δύναται να αποτελέσουν υποψήφιους βιοδείκτες, ενώ τα αποτελέσματα επαληθεύτηκαν από τις καμπύλες ROC κάθε μεταβολίτη.

Στη συνέχεια επιχειρήθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός των συγκεκριμένων μεταβολιτών σε κάθε δειγματοχώρο μέσω των φασμάτων NMR και το λογισμικό Chenomx, ενώ ακολούθησε επικύρωση των αποτελεσμάτων των επικρατέστερων αμινοξέων με χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

Υπολογισμός συγκεντρώσεων από τα φάσματα NMR.

Το λογισμικό Chenomx, πέραν της δυνατότητας υποστήριξης της ταυτοποίησης των μεταβολιτών στα φάσματα, παρέχει τη δυνατότητα του ποσοτικού προσδιορισμού με βάση την φασματική κορυφή του εσωτερικού προτύπου που έχει προστεθεί σε προκαθορισμένη συγκέντρωση. Παρόλ' αυτά η ποσοτικοποίηση θα πρέπει να θεωρείται προσεγγιστική στις περισσότερες περιπτώσεις, δεδομένης της αλληλοεπικάλυψης των φασματικών κορυφών στο φάσμα πρωτονίου. Κατά συνέπεια τα αποτελέσματα αξιολογούνται συγκριτικά μεταξύ των δειγμάτων ή/και ομάδων δειγμάτων παρουσιάζοντας περισσότερο τις τάσεις αυξομείωσης των συγκεντρώσεων και λιγότερο τις απόλυτες τιμές τους. Στον Πίνακα 4.8 δίνεται ο μέσος όρος της τιμής της συγκέντρωσης των υποψήφιων βιοδεικτών στα ομφαλικά και μητρικά δείγματα σε κάθε ομάδα μελέτης μαζί με τις στατιστικώς σημαντικές διαφορές τους ($p < 0,05$). Ακολούθως, στα Σχήματα 4.23-4.26 δίνεται η κατανομή της συγκέντρωσης των μεταβολιτών σε κάθε μία από τις 4 ομάδες μελέτης αντίστοιχα.

Πίνακας 4.8: Μέσος όρος συγκέντρωσης (mM) υποψήφιων βιοδεικτών για κάθε ομάδα δειγμάτων με το Chenomx.

Υποψήφιοι βιοδείκτες	Ομφαλικό αίμα		Μητρικό αίμα	
	IUGR (N=5/41)	AGA (N=5/36)	IUGR (N=5/41)	AGA (N=5/36)
Λευκίνη	0,148 (±0,016) ^a	0,067 (±0,005) ^b	0,095 (±0,014) ^c	0,073 (±0,015) ^d
Ισολευκίνη	0,096 (±0,018) ^a	0,039 (±0,007) ^b	0,057 (±0,013) ^c	0,039 (±0,014) ^c
Βαλίνη	0,231 (±0,024) ^a	0,125 (±0,027) ^b	0,153 (±0,014) ^c	0,120 (±0,023) ^d
Αλανίνη	0,396 (±0,153) ^a	0,189 (±0,023) ^b	0,251 (±0,042) ^c	0,241 (±0,062) ^c
Φαινυλαλανίνη	0,037 (±0,004) ^a	0,038 (±0,009) ^a	0,029 (±0,004) ^b	0,051 (±0,012) ^c
Γλυκερόλη	0,070 (±0,035) ^a	0,078 (±0,022) ^a	0,067 (±0,022) ^b	0,138 (±0,051) ^c
3-Μέθυλο-2-όξοβαλερικό οξύ	0,104 (±0,022) ^a	0,031 (±0,008) ^b	0,070 (±0,028) ^b	0,049 (±0,014) ^b
Θρυπτοφάνη	0,036 (±0,001) ^a	0,043 (±0,015) ^a	-	-
3-Υδροξυβουτυρικό οξύ	-	-	0,069 (±0,039) ^b	0,032 (±0,018) ^b

**Διαφορετικά γράμματα (a, b, c, d) στην ίδια γραμμή υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές (p-value<0,05).*

Όπως προκύπτει από τον Πίνακα 4.8, όλοι οι μεταβολίτες εκτός της γλυκερόλης και της φαινυλαλανίνης έχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) στην ομάδα των ομφαλικών δειγμάτων ενώ στην περίπτωση των μητρικών δειγμάτων στατιστικώς σημαντικές διαφορές έχουν η λευκίνη η βαλίνη, η φαινυλαλανίνη και η γλυκερόλη. Μόνο η λευκίνη και η βαλίνη φαίνεται να διαφοροποιούνται στατιστικώς σημαντικά τόσο στα ομφαλικά όσο και τα μητρικά δείγματα. Τέλος, η θρυπτοφάνη δεν ήταν δυνατό να ποσοτικοποιηθεί με τη βοήθεια του Chenomx.

Σχήμα 4.23. Εύρος τιμών συγκέντρωσης υποψήφιων βιοδεικτών στην ομάδα IUGR ομφαλικού αίματος.

Σχήμα 4.24. Εύρος τιμών συγκέντρωσης υποψήφιων βιοδεικτών στην ομάδα AGA ομφαλικού αίματος.

Σχήμα 4.25. Εύρος τιμών συγκέντρωσης υποψήφιων βιοδεικτών στην ομάδα IUGR μητρικού αίματος.

Σχήμα 4.26. Εύρος τιμών συγκεντρώσεων υποψήφιων βιοδεικτών στην ομάδα AGA μητρικού αίματος.

Στα Σχήματα 4.27 και 4.28, παρουσιάζονται οι διαφοροποιήσεις στις συγκεντρώσεις των προτεινόμενων μεταβολιτών στις ομάδες IUGR και AGA στα ομφαλικά και μητρικά δείγματα.

Σχήμα 4.27. Θηκογράμματα συγκέντρωσης υποψήφιων βιοδεικτών στα IUGR και AGA στα ομφαλικά δείγματα με χρήση της φασματοσκοπίας NMR.

Σχήμα 4.28. Θηκογράμματα συγκέντρωσης υποψήφιων βιοδεικτών στα IUGR και AGA στα μητρικά δείγματα με χρήση της φασματοσκοπίας NMR.

Υπολογισμός συγκεντρώσεων ελεύθερων αμινοξέων με χρήση της Υγρής Χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η τεχνική της HPLC χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ελεύθερων αμινοξέων λευκίνη, ισολευκίνη, βαλίνη, αλανίνη, φαινυλαλανίνη και θρυπτοφάνη που όπως προκύπτει από τα προηγούμενα αποτελέσματα αποτελούν σημαντικούς μεταβολίτες που χαρακτηρίζουν τα IUGR δείγματα. Επιπρόσθετα, επιλέχθηκε για την ποσοτικοποίηση της θρυπτοφάνης, ενός σημαντικού αρωματικού αμινοξέος που δεν ήταν δυνατό να εκτιμηθεί η συγκέντρωσή του με χρήση του Chenomx στα φάσματα NMR. Η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε 5 τυχαία δείγματα από κάθε ομάδα (IUGR και AGA ομφαλικά και μητρικά δείγματα) με σκοπό την επιβεβαίωση των ταυτοποιημένων αυτών αμινοξέων καθώς και των διαφορών που εντοπίζονται στις συγκεντρώσεις τους στα δείγματα. Η ακολουθία της χρωματογραφικής ανάλυσης περιλαμβάνει: ένα τυφλό δείγμα (blank), μείγμα των πρότυπων αμινοξέων και στη συνέχεια τα υπό-εξέταση δείγματα. Η επαναληψιμότητα του οργάνου ελέγχεται με τα δείγματα ελέγχου ποιότητας (quality control samples, QCs), τα οποία αναλύονται κάθε φορά μετά από 10 δείγματα. Στο Σχήμα 4.29 δίνεται ένα τυπικό χρωματογράφημα στον ορό του αίματος με την HPLC. Στον Πίνακα 4.9 δίνεται ο μέσος όρος της συγκέντρωσης των παραπάνω αμινοξέων σε κάθε ομάδα μελέτης. Ακολούθως, στα Σχήματα 4.30 και 4.31 δίνονται τα θηκογράμματα με τη συγκέντρωση των προτεινόμενων αμινοξέων στα IUGR και AGA στα ομφαλικά και μητρικά δείγματα αντίστοιχα.

Σχήμα 4.29. Χρωματογράφημα ορού αίματος με χρήση HPLC.

Πίνακας 4.9: Μέσος όρος συγκεντρώσεων (mM) υποψήφιων βιοδεικτών για κάθε ομάδα δειγμάτων με εφαρμογή HPLC.

Αμινοξύ	Ομφαλικό αίμα (mM)		Μητρικό αίμα (mM)	
	IUGR (N=5)	AGA (N=5)	IUGR (N=5)	AGA (N=5)
Λευκίνη	0,108 (±0,017) ^a	0,075 (±0,007) ^b	0,071 (±0,026) ^c	0,073 (±0,007) ^c
Ισολευκίνη	0,043 (±0,011) ^a	0,027 (±0,010) ^b	0,042 (±0,005) ^c	0,025 (±0,017) ^c
Βαλίνη	0,207 (±0,041) ^a	0,174 (±0,042) ^a	0,138 (±0,020) ^b	0,120 (±0,021) ^b
Αλανίνη	0,332 (±0,137) ^a	0,206 (±0,047) ^a	0,201 (±0,034) ^b	0,176 (±0,018) ^b
Φαινυλαλανίνη	0,042 (±0,017) ^a	0,049 (±0,014) ^a	0,048 (±0,021) ^b	0,055 (±0,032) ^b
Θρυπτοφάνη	0,100 (±0,030) ^a	0,146 (±0,029) ^b	0,120 (±0,048) ^c	0,055 (±0,039) ^d

*Διαφορετικά γράμματα (a, b, c,) στην ίδια γραμμή υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p\text{-value} < 0,05$).

Σχήμα 4.30. Θηκογράμματα συγκέντρωσης σημαντικών αμινοξέων στα IUGR και AGA στα ομφαλικά δείγματα με την HPLC.

Σχήμα 4.31. Θηκογράμματα συγκέντρωσης σημαντικών αμινοξέων στα IUGR και AGA στα μητρικά δείγματα με την HPLC.

Με βάση τα ανωτέρω αποτελέσματα της ανάλυσης με χρήση HPLC, τα μελετώμενα αμινοξέα (αναλύτες) προσδιορίστηκαν σε όλα τα δείγματα και των

δύο ομάδων (μητέρων και ομφαλικά). Ωστόσο, στα δείγματα που εξετάστηκαν, στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των IUGR και AGA εντοπίστηκαν μόνο στην περίπτωση της λευκίνης και της ισολευκίνης στα ομφαλικά δείγματα, ενώ η θρυπτοφάνη διαφοροποιείται στατιστικώς σημαντικά τόσο στα ομφαλικά όσο και τα μητρικά δείγματα. Η φαινυλαλανίνη, όπως και στην περίπτωση του ποσοτικού προσδιορισμού με NMR δεν φάνηκε να έχει στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομφαλικών δειγμάτων.

Θα πρέπει ωστόσο να ληφθεί υπ' όψη ότι η απουσία στατιστικώς σημαντικών διαφορών ενδεχόμενα οφείλεται στον περιορισμένο αριθμό των δειγμάτων που αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Για το λόγο αυτό, στην επόμενη ενότητα γίνεται συζήτηση για όλους τους προτεινόμενους μεταβολίτες από την ολιστική προσέγγιση με χρήση φασματοσκοπίας NMR δίνοντας ασφαλώς έμφαση στα βιοχημικά μονοπάτια που εμπλέκονται τα αμινοξέα λευκίνη, ισολευκίνη και θρυπτοφάνη.

4.6. Κύρια ευρήματα μελέτης

Τα αποτελέσματα της έρευνας αναδεικνύουν ότι το προφίλ των μεταβολιτών που επηρεάζονται από την IUGR παθολογία είναι παρεμφερές τόσο στα νεογνά (ομφαλικό αίμα) όσο και στις μητέρες. Από τους 56 μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν στον ορό του αίματος, 7 μεταβολίτες είχαν παρόμοιο προφίλ στις επιμέρους ομάδες IUGR-AGA, τόσο μεταξύ των ομφαλικών όσο και μεταξύ των μητρικών δειγμάτων ορού αίματος. Επιπλέον, ο διαχωρισμός των ομφαλικών δειγμάτων φάνηκε να ενισχύεται από την θρυπτοφάνη ενώ ο διαχωρισμός των μητρικών δειγμάτων από το 3-ύδροξυβουτυρικό οξύ.

Στον Πίνακα 4.10 παρουσιάζονται οι σχετιζόμενοι με την IUGR μεταβολίτες και οι τάσεις αυξομείωσης των συγκεντρώσεών τους στα ομφαλικά και μητρικά δείγματα. Οι τάσεις διαφοροποίησης των αμινοξέων λευκίνη, ισολευκίνη, βαλίνη, αλανίνη, φαινυλαλανίνη και θρυπτοφάνη (μόνο στα ομφαλικά δείγματα) στις ομάδες IUGR και AGA προκύπτουν με βάση τις 2 τεχνικές ανάλυσης. Η διαφοροποίηση της θρυπτοφάνης προκύπτει από τα αποτελέσματα της HPLC ενώ η διαφοροποίηση των μεταβολιτών 3-μέθυλο-2-όξοβαλερικό οξύ,

γλυκερόλη και 3-υδροξυβουτυρικό οξύ προκύπτει με βάση τα αποτελέσματα του NMR.

Πίνακας 4.10: Υποδεικνυόμενοι από τη μεταβολωμική μελέτη μεταβολίτες που διαφοροποιούνται μεταξύ AGA και IUGR στα ομφαλικά και μητρικά δείγματα.

Υποψήφιοι βιοδείκτες	Ομφαλικό αίμα		Μητρικό αίμα	
	IUGR	AGA	IUGR	AGA
Λευκίνη	▲	▼	▲	▼
Ισολευκίνη	▲	▼	▲	▼
Βαλίνη	▲	▼	▲	▼
Αλανίνη	▲	▼	▲	▼
Φαινυλαλανίνη	▼	▲	▼	▲
Γλυκερόλη	▼	▲	▼	▲
3-Μέθυλο-2-όξοβαλερικό οξύ	▲	▼	▲	▼
Θρυπτοφάνη	▼	▲	▲	▼
3-Υδροξυβουτυρικό οξύ	-	-	▲	▼

Όπως φαίνεται παραπάνω, τα αμινοξέα διακλαδισμένης ανθρακικής αλυσίδας (BCAAs, λευκίνη, ισολευκίνη και βαλίνη), το μη-απαραίτητο αμινοξύ αλανίνη και το 3-μέθυλο-2-οξοβαλερικό οξύ βρίσκονται σε υψηλότερη συγκέντρωση στα IUGR δείγματα (ομφαλικά και μητρικά) σε αντίθεση με το απαραίτητο αμινοξύ φαινυλαλανίνη και την γλυκερόλη που συμμετέχουν σε υψηλότερη συγκέντρωση στα AGA δείγματα (ομφαλικά και μητρικά). Αντιθέτως, το 3-υδροξυβουτυρικό διαφοροποιείται μόνο μεταξύ των μητρικών δειγμάτων ενώ το απαραίτητο αμινοξύ θρυπτοφάνη εντοπίζεται σε υψηλότερη συγκέντρωση στα ομφαλικά AGA και στα μητρικά IUGR δείγματα.

Με βάση τα παραπάνω, μπορεί να γίνει η υπόθεση ότι στις IUGR κυήσεις φαίνεται δυνατό να επιδρούν κοινοί μηχανισμοί τόσο στη μητέρα όσο και στο νεογνό. Ένα ακόμη σημαντικό αποτέλεσμα αφορά στη σύνδεση της IUGR παθολογίας με το μεταβολικό μονοπάτι της αποικοδόμησης των αμινοξέων

διακλαδισμένης ανθρακικής αλυσίδας (BCAAs) (Σχήμα 4.32). Τέλος, το 3-μέθυλο-2-οξοβαλερικό οξύ φαίνεται να σχετίζεται με την IUGR παθολογία, ως ενδιάμεσο προϊόν του μεταβολικού μονοπατιού αποικοδόμησης των BCAAs ωστόσο η υπόθεση αυτή χρήζει επιπρόσθετης μελέτης.

Σχήμα 4.32. Αποικοδόμηση BCAAs¹⁰⁰.

4.7. Συσχέτιση αναδεικνυόμενων βιοδεικτών με την ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη

Ακολούθως αναδεικνύεται ο ρόλος των υποψήφιων βιοδεικτών της IUGR στον οργανισμό και εξετάζεται η συμμετοχή τους σε μεταβολικά μονοπάτια που θα μπορούσαν να ερμηνεύσουν την IUGR.

➤ **Αμινοξέα διακλαδισμένης ανθρακικής αλυσίδας, BCAAs**

Τα αμινοξέα διακλαδισμένης ανθρακικής αλυσίδας, BCAAs (λευκίνη, ισολευκίνη και βαλίνη) εντοπίζονται σε υψηλότερη συγκέντρωση στα IUGR δείγματα (ομφαλικά και μητρικά) σε σχέση με τα αντίστοιχα AGA δείγματα. Πρόκειται για απαραίτητα αμινοξέα, που σημαίνει ότι δεν μπορούν να συντεθούν στον οργανισμό και πρέπει να προσληφθούν μέσω της τροφής. Είναι εξαιρετικής σημασίας καθώς εμπλέκονται σε σημαντικές μεταβολικές διεργασίες του οργανισμού που περιλαμβάνουν το στρες, την παραγωγή ενέργειας και το μεταβολισμός στους μύες. Παρά την παρόμοια δομή τους, τα BCAAs συμμετέχουν σε διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια. Η βαλίνη μετατρέπεται σε υδατάνθρακες, η λευκίνη σε λιπίδια και η ισολευκίνη τόσο σε υδατάνθρακες όσο και σε λιπίδια. Αυτό εξηγεί και τις διαφορετικές ανάγκες του οργανισμού για κάθε ένα από τα 3 BCAAs.

Η έλλειψη τους συνδέεται με διαφορετικά συμπτώματα. Η πιο συνηθισμένη νόσος που συνδέεται με την αύξηση των BCAAs είναι η MSUD (Maple Syrup Urine Disease ή νόσος με οσμή ούρων σαν σιρόπι σφενδάμου), η οποία εμφανίζεται στη νεογνική ηλικία και συνδέεται με προβλήματα σίτισης¹⁰¹. Σημαντικές ποσότητες των παραπάνω αμινοξέων παράγονται από την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών σε συνθήκες νηστείας. Τα BCAAs αποικοδομούνται στους ιστούς, πέραν του ήπατος, αποδίδοντας τα συνένζυμα NADH και FADH₂ που εμπλέκονται στην παραγωγή ενέργειας¹⁰².

Η παρατηρούμενη αύξηση της συγκέντρωσης των BCAAs στα δείγματα των IUGR νεογνών θα μπορούσε να αιτιολογηθεί εν μέρει από τη σύνδεση της IUGR παθολογίας με τη μειωμένη μεταφορά των θρεπτικών συστατικών από τη μητέρα στο νεογνό διαμέσου του πλακούντα⁵. Η ανεπάρκεια των θρεπτικών συστατικών έχει εξάλλου προταθεί από τη μεταβολωμική μελέτη των Favretto και συν.⁵⁸ για να περιγράψουν την αύξηση της συγκέντρωσης των απαραίτητων αμινοξέων βαλίνη και ισολευκίνη στα δείγματα ομφαλικού αίματος των IUGR νεογνών σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα από AGA νεογνά.

Η έκφραση των πρωτεϊνών είναι διαφορετική στην περίπτωση των IUGR νεογνών¹⁰³, το οποίο θα μπορούσε να οδηγήσει σε μείωση του ρυθμού χρησιμοποίησης των BCAAs αυξάνοντας κατ' επέκταση την συγκέντρωσή

τους. Αυτή η αύξηση θα μπορούσε ενδεχομένως να αιτιολογηθεί και από την παρατήρηση ότι τα IUGR νεογνά εμφανίζουν κοινές μεταβολικές διαταραχές με εκείνες που προκύπτουν από τη διαταραχή του κύκλου της ουρίας⁶¹.

Η αύξηση της συγκέντρωσης των BCAAs συνδέεται επίσης με την αντίσταση στην ινσουλίνη και την ανάπτυξη διαβήτη τύπου 2 στο μέλλον^{104–106}. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα IUGR νεογνά ενεργοποιούν μία σειρά από προσαρμοστικούς μηχανισμούς με σκοπό την αποθήκευση γλυκόζης για την επιβίωση των ζωτικών οργάνων, με επακόλουθο την απορρύθμιση της έκκρισης ινσουλίνης¹⁰⁷. Επομένως, η παρατηρούμενη αύξηση των BCAAs στην ομάδα των IUGR νεογνών θα μπορούσε να συνδεθεί με την αντίσταση στην ινσουλίνη και τη μελλοντική εμφάνιση διαβήτη τύπου 2.

Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι τα επίπεδα ινσουλίνης και ο αυξητικός παράγοντας 1 (IGF-1) στα IUGR έμβρυα είναι σε φυσιολογικά επίπεδα στην αρχή της κύησης και στην πορεία μειώνονται. Η ινσουλίνη και ο IGF-1 είναι κατεξοχήν αναβολικές ορμόνες κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής⁵⁰. Τα έμβρυα που εμφανίζουν υπολειπόμενη αύξηση έχουν μειωμένα ενεργειακά αποθέματα και δεν μπορούν να χτίσουν τους ιστούς τους με συνέπεια τη διαταραχή της έκκρισης ινσουλίνης και την αντίσταση στην ινσουλίνη.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η δυσανεξία στη γλυκόζη ή η χαμηλή επάρκεια σε ινσουλίνη από μέρους των IUGR νεογνών, θα μπορούσε να οδηγήσει σε αλλαγές στη συγκέντρωση των ενδιάμεσων αμινοξέων του κύκλου του Krebs⁶. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.33, η ινσουλίνη καταλύει τη μετατροπή των υδατανθράκων και των πρωτεϊνών σε λίπη συσσωρεύοντας ακέτυλο-CoA. Στην περίπτωση του διαβήτη, το ακέτυλο-CoA που προέρχεται από τον καταβολισμό των υδατανθράκων και των πρωτεϊνών μετατρέπεται σε κετονοσώματα (ketone bodies) όπως είναι το 3-υδροξυβουτυρικό οξύ¹⁰², περιορίζοντας την ποσότητα από το ακέτυλο-CoA που εισέρχεται στον κύκλο του Krebs. Στο Σχήμα 4.34 φαίνεται η προέλευση των αμινοξέων από ενδιάμεσα προϊόντα της γλυκολυτικής οδού και του κύκλου του Krebs.

Σχήμα 4.33. Ρόλος της ινσουλίνης¹⁰².

Σχήμα 4.34. Διαγραμματική απεικόνιση της προέλευσης των αμινοξέων βαλίνης και λευκίνης από το μονοπάτι της γλυκόλυσης και της ισολευκίνης από τον κύκλο του Krebs¹⁰².

Τα έμβρυα αναπτύσσονται φυσιολογικά μέχρι την εμφάνιση του αιτίου που οδηγεί στην εκδήλωση της IUGR. Με την εκδήλωση της IUGR, τα έμβρυα αρχίζουν σιγά-σιγά να καταβολίζουν τις ήδη δομημένες πρωτεΐνες τους, χωρίς να παράγουν νέες πρωτεΐνες, μειώνοντας το μέγεθος των οργάνων που δεν είναι ζωτικά. Στο πλαίσιο αυτό, η αύξηση των BCAAs στα IUGR έμβρυα θα μπορούσε ενδεχομένως να οφείλεται στον υπερκαταβολισμό των πρωτεϊνών.

➤ **Αλανίνη**

Η αλανίνη αποτελεί μη απαραίτητο αμινοξύ και εντοπίζεται σε υψηλότερη συγκέντρωση στα IUGR δείγματα (ομφαλικά και μητρικά) σε σχέση με τα αντίστοιχα AGA δείγματα. Συντίθεται είτε από το πυροσταφυλικό οξύ είτε από τη διάσπαση του DNA και των διπεπτιδίων καρνοσίνη και ανσερίνη. Συγκεντρώνεται κυρίως στους μύες και αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα αμινοξέα που απελευθερώνεται από τους μύες, λειτουργώντας σαν κύρια πηγή ενέργειας. Η αλανίνη συμμετέχει και ρυθμίζει το μεταβολισμό της γλυκόζης¹⁰⁸.

Ο κύκλος της γλυκόζης-αλανίνης (glucose-alanine cycle) περιγράφει τη μετατροπή της γλυκόζης σε αλανίνη και ξανά σε γλυκόζη σε μία κυκλική διαδικασία από τους μυς στο ήπαρ. Πιο συγκεκριμένα, η αλανίνη που σχηματίζεται στους μύες από το πυροσταφυλικό οξύ μέσω της γλυκόλυσης διαχέεται στη κυκλοφορία του αίματος και από εκεί στο ήπαρ, όπου μετατρέπεται πάλι σε πυροσταφυλικό οξύ και έπειτα σε γλυκόζη μέσω της γλυκονεογένεσης. Η γλυκόζη επανέρχεται στους μύες και ο κύκλος επαναλαμβάνεται¹⁰². Στο Σχήμα 4.35 δίνεται ο κύκλος της γλυκόζης-αλανίνης.

Σχήμα 4.35. Κύκλος γλυκόζης-αλανίνης¹⁰².

Η αλανίνη αποτελεί ρυθμιστή του μεταβολισμού της γλυκόζης που είναι σημαντικός μεταβολίτης της IUGR παθολογίας. Η δυσανεξία στη γλυκόζη που εμφανίζουν τα IUGR νεογνά πιθανόν να δικαιολογεί την παρατηρούμενη αύξηση της αλανίνης λόγω του κύκλου της γλυκόζης-αλανίνης. Επίσης, η αύξηση της αλανίνης πιθανόν να οφείλεται στον υπερκαταβολισμό των πρωτεϊνών. Αύξηση στα επίπεδα της αλανίνης για τα IUGR νεογνά που βρίσκονται μεταξύ 3^{ης} και 10^{ης} εκατοστιαίας θέσης σε σχέση με τα AGA νεογνά αναφέρεται στη βιβλιογραφία ενισχύοντας τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης⁶².

Επίσης, οι μηχανισμοί προσαρμογής του πλακούντα (που σχετίζονται με τον μεταβολισμό και τη μεταφορά) διαφοροποιούνται στις IUGR κυήσεις σε σχέση με τις AGA κυήσεις, εξαιτίας της μείωσης της διαθεσιμότητας των θρεπτικών συστατικών, δικαιολογώντας την αύξηση της αλανίνης και των BCAAs στις μητέρες των IUGR νεογνών^{109,110}.

➤ **Γλυκερόλη**

Στην παρούσα μελέτη, η γλυκερόλη εντοπίζεται σε υψηλότερη συγκέντρωση στα AGA δείγματα σε σχέση με τα IUGR δείγματα, σκιαγραφώντας την έλλειψη ή την κατανάλωση που παρατηρείται στις IUGR ομάδες. Η γλυκερόλη αποτελεί το δομικό σκελετό των τριγλυκεριδίων (όπως είναι τα λίπη) και των φωσφολιπιδίων. Τα τριγλυκερίδια αποθηκεύονται στον λιπώδη ιστό και

υδρολύονται σε περιόδους νηστείας παράγοντας γλυκερόλη και ελεύθερα λιπαρά οξέα¹¹¹. Το μεταβολικό μονοπάτι της γλυκονεογένεσης (gluconeogenesis) περιγράφει τη σύνθεση της γλυκόζης με πρόδρομες ενώσεις το πυροσταφυλικό οξύ, τη γλυκερόλη, το γαλακτικό οξύ και τα αμινοξέα με γλυκογενετική δράση¹⁰². Στο ήπαρ π.χ., η γλυκερόλη μπορεί να μετατραπεί σε γλυκόζη, καλύπτοντας τις ενεργειακές ανάγκες του μεταβολισμού των κυττάρων¹¹². Από την άλλη μεριά, η γλυκόλυση (glycolysis) που αποτελεί το αντισταθμιστικό μεταβολικό μονοπάτι διάσπασης της γλυκόζης, απορρυθμίζεται σε συνθήκες αντίστασης ή χαμηλής επάρκειας σε ινσουλίνη¹¹³. Όπως αναφέρθηκε ήδη, τα IUGR νεογνά εμφανίζουν έλλειψη ινσουλίνης¹⁰⁷ υποδεικνύοντας υπολειτουργία στο μεταβολικό μονοπάτι της γλυκόλυσης.

Επομένως, η παρατηρούμενη μείωση της γλυκερόλης στην IUGR ομάδα των νεογνών θα μπορούσε να αιτιολογηθεί από τη συνεχή μετατροπή της γλυκερόλης σε γλυκόζη μέσω του μεταβολικού μονοπατιού της γλυκονεογένεσης, η οποία με τη σειρά της δεν μεταβολίζεται επαρκώς στο αντισταθμιστικό μεταβολικό μονοπάτι της γλυκόλυσης. Πράγματι, οι IUGR ομάδες εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα γλυκόζης σε σχέση με τις AGA ομάδες (παρόλο που η γλυκόζη δε φαίνεται να αποτελεί δυνητικό βιοδείκτη της IUGR), ενισχύοντας την παραπάνω επισήμανση. Στο σχήμα 4.36 φαίνεται συνοπτικά το μονοπάτι της γλυκονεογένεσης.

Σχήμα 4.36. Γλυκονεογένεση¹⁰².

Ένα άλλο μεταβολικό μονοπάτι που συνθέτει φωσφορική γλυκερόλη (γλυκερόλη-3P) από πρόδρομες ενώσεις πέραν της γλυκόζης είναι εκείνο της γλυκερονεογένεσης (glyceroneogenesis)¹¹⁴. Σαν πρόδρομες ενώσεις χρησιμοποιούνται το πυροσταφυλικό οξύ, το γαλακτικό οξύ και η αλανίνη¹¹⁵. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται πως η καταστολή της γλυκερονεογένεσης συνδέεται με το διαβήτη τύπου 2¹¹⁵. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η IUGR παθολογία συνδέεται με μακροχρόνιες επιπτώσεις όπως ο διαβήτης τύπου 2^{54,116}. Συνεπώς, η μείωση της γλυκερόλης στην ομάδα των IUGR νεογνών θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα της απορρύθμισης του μονοπατιού της γλυκερονεογένεσης. Επίσης, η αύξηση της αλανίνης στην ομάδα των IUGR νεογνών θα μπορούσε να επιβεβαιώσει την παραπάνω υπόθεση. Στο Σχήμα 4.37 δίνεται το μεταβολικό μονοπάτι της γλυκερονεογένεσης.

Σχήμα 4.37. Μεταβολικό μονοπάτι γλυκερονεογένεσης¹¹⁵.

➤ **3-Μέθυλο-2-οξοβαλερικό οξύ**

Το οργανικό οξύ 3-μέθυλο-2-οξοβαλερικό οξύ εντοπίζεται σε υψηλότερη συγκέντρωση στα IUGR δείγματα, ωστόσο η τιμή AUC είναι μικρότερη στη

περίπτωση της διάκρισης των ομφαλικών δειγμάτων. Πρόκειται για ένα κέτο οξύ διακλαδισμένης ανθρακικής αλυσίδας (BCKA) που σχηματίζεται από την ατελή αποικοδόμηση των αμινοξέων διακλαδισμένης ανθρακικής αλυσίδας (BCAAs)^{106,117} (Σχήμα 4.32). Υψηλά επίπεδα του 3-μέθυλο-2-οξοβαλερικού οξέος έχουν συνδεθεί με τη νόσο MSUD, που δημιουργείται από την έλλειψη του ενζυμικού συμπλέγματος BCKD, που καταλύει τη διάσπαση των κέτο οξέων που δημιουργούνται από τη διάσπαση των BCAAs, οδηγώντας στη συσσώρευση των BCAAs¹¹⁷.

Με βάση την ανάλυση εμπλουτισμού βρέθηκε ότι το μεταβολικό μονοπάτι που επηρεάζεται σε μεγαλύτερο βαθμό από την IUGR παθολογία και στις 2 ομάδες δειγμάτων (ομφαλικά, μητρικά) είναι εκείνο της διάσπασης των BCAAs. Επομένως, η αύξηση του 3-μέθυλο-2-οξοβαλερικού οξέος και κατ' επέκταση η αύξηση των BCAAs στις IUGR ομάδες, πιθανόν να οφείλεται στη δυσλειτουργία ή έλλειψη του πολυ-ενζυμικού συμπλέγματος BCKD (Branched chain α -keto acid dehydrogenase). Το 3-μέθυλο-2-οξοβαλερικό οξύ συνδέεται επίσης με το διαβήτη τύπου 2 και τη διαταραγμένη γλυκόζη νηστείας (IFG, impaired fasting glucose)¹⁰⁶ που όπως έχει αναφερθεί παραπάνω έχουν συσχετιστεί με την IUGR παθολογία.

➤ **3-Ύδροξυβουτυρικό οξύ**

Το 3-ύδροξυβουτυρικό οξύ εντοπίζεται σε υψηλότερη συγκέντρωση στην ομάδα των μητέρων των IUGR νεογνών αν και δεν επαληθεύτηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στον μικρό δειγματοχώρο που μελετήθηκε με HPLC. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με μία πρόσφατη προοπτική μεταβολωμική μελέτη στον μητρικό ορό του αίματος, στην οποία το 3-ύδροξυβουτυρικό οξύ προτάθηκε ως ανεξάρτητος δείκτης της IUGR παθολογίας, ωστόσο τα αποτελέσματα πάλι στερούνταν προβλεπτικής ισχύος ($AUC < 0,70$)⁷.

Το 3-ύδροξυβουτυρικό οξύ αποτελεί προϊόν της μερικής αποικοδόμησης των BCAAs (κυρίως της βαλίνη). Μαζί με την ακετόνη και το ακετοξικό οξύ αποτελούν κετονοσώματα (ketone bodies) που σχηματίζονται από τη συμπίκνωση 2 μορίων ακέτυλο-συνενζύμου A (Σχήμα 4.38). Χρησιμοποιείται

σαν πηγή ενέργειας από τον εγκέφαλο όταν τα επίπεδα γλυκόζης είναι πολύ χαμηλά¹⁰².

Σχήμα 4.38. Σύνθεση κετονοσωμάτων από το ακέτυλο-CoA¹⁰².

Όταν επικρατούν συνθήκες νηστείας ή μη ρυθμισμένου διαβήτη η γλυκονεογένεση ενισχύεται, εξαλείφοντας τα ενδιάμεσα του κύκλου του Krebs (οξαλοξικό οξύ), ενώ η παραγωγή των κετονοσωμάτων ενισχύεται (Σχήμα 4.39)¹⁰². Η παρατηρούμενη αύξηση του 3-υδροξυβουτυρικού οξέος στην ομάδα των μητέρων των IUGR νεογνών θα μπορούσε να είναι απόρροια των συνθηκών νηστείας ή/και αντίστασης στην ινσουλίνη που επικρατούν στις IUGR κυήσεις. Επιπλέον, η αύξηση των συγκεντρώσεων κετογενετικών αμινοξέων

λευκίνη, ισολευκίνη ενδέχεται να ενισχύσει τη σύνθεση του 3-υδροξυβουτυρικού οξέος.

Σχήμα 4.39. Σύνθεση κετονοσωμάτων και εξαγωγή τους από το ήπαρ¹⁰².

➤ **Φαινυλαλανίνη**

Η φαινυλαλανίνη εντοπίζεται σε υψηλότερη συγκέντρωση στα AGA μητρικά και ομφαλικά δείγματα. Παρόλο που οι διαφοροποιήσεις αυτές δεν φάνηκε να είναι στατιστικώς σημαντικές από τα αποτελέσματα της HPLC, μπορούν να αξιολογηθούν ως τάσεις. Η φαινυλαλανίνη αποτελεί απαραίτητο αμινοξύ και προέρχεται κυρίως από τη διάσπαση των πρωτεϊνών της τροφής. Μέσα στον οργανισμό, η φαινυλαλανίνη μπορεί να ακολουθήσει τα εξής 3 μεταβολικά μονοπάτια: (1) να ενσωματωθεί στις κυτταρικές πρωτεΐνες, (2) να μετατραπεί σε φαινυλοπυροσταφυλικό οξύ μέσω της οξειδάσης της φαινυλαλανίνης ή της αμινοτρανσφεράσης της τυροσίνης, ή (3) να μετατραπεί σε τυροσίνη μέσω της υδροξυλάσης της φαινυλαλανίνης (Σχήμα 4.40)⁵⁸.

Σχήμα 4.40. Μεταβολικά μονοπάτια φαινυλαλανίνης⁵⁸.

Με βάση τη βιβλιογραφία, ο συντελεστής εμπλουτισμού (enrichment ratio) της φαινυλαλανίνης (μαζί με την γλυκίνη και προλίνη) από τη μητέρα στο νεογνό είναι χαμηλότερος στις IUGR σε σχέση με τις AGA κυήσεις, υποδεικνύοντας ότι η μεταφορά της φαινυλαλανίνης διαμέσου του πλακούντα πιθανώς να διαταράσσεται από την IUGR παθολογία¹¹⁸. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η μείωση της μεταφοράς των απαραίτητων αμινοξέων από τη μητέρα στο έμβρυο στις κυήσεις με υπολειπόμενη ανάπτυξη οφείλεται στις συνθήκες εμβρυϊκής υποξαιμίας που επικρατούν¹¹⁰.

Η διαφοροποίηση του μεταβολισμού του πλακούντα ή της μεταφοράς διαμέσου του πλακούντα, σε συνδυασμό με την αύξηση του μεταβολισμού της φαινυλαλανίνης στις IUGR κυήσεις θα μπορούσε να δικαιολογήσει τη παρατηρούμενη μείωση της φαινυλαλανίνης στις IUGR ομάδες^{58,60}.

➤ **Θρυπτοφάνη**

Το απαραίτητο αμινοξύ θρυπτοφάνη διαφοροποιείται στατιστικώς σημαντικά όπως προέκυψε τόσο από τη μεταβολωμική (AUC>0,75 στα ομφαλικά δείγματα) όσο και από τα αποτελέσματα της HPLC (ομφαλικά και μητρικά δείγματα). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων με HPLC έδειξαν υψηλότερες συγκεντρώσεις στα ομφαλικά AGA και στα μητρικά IUGR δείγματα. Παρόμοια αποτελέσματα έδειξε προηγούμενη μελέτη σε ομφαλικά δείγματα, όπου τα αμινοξέα θρυπτοφάνη, φαινυλαλανίνη και γλουταμινικό οξύ διαφέρουν

σημαντικά μεταξύ των IUGR και AGA έχοντας μεγαλύτερη συγκέντρωση στα IUGR δείγματα⁵⁸.

Η θρυπτοφάνη είναι κρίσιμο αμινοξύ για την ανάπτυξη του εμβρύου ενώ η έλλειψη της σχετίζεται με την αποβολή του. Η θρυπτοφάνη είναι πρόδρομη ένωση της σεροτονίνης, που αποτελεί νευροδιαβιβαστή του εγκεφάλου και ορμόνη των νευρώνων των οργάνων του σώματος¹¹⁹ (Σχήμα 4.41). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η σεροτονίνη και οι υποδοχείς της βρίσκονται στον πλακούντα, υποδεικνύοντας τον κρίσιμο ρόλο που διαδραματίζουν στην ανάπτυξη του¹²⁰. Έχειδειχθεί ότι ανωμαλίες στη βιοσύνθεση της σεροτονίνης στον πλακούντα μπορεί να οδηγήσουν σε ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη¹²¹.

Από πειράματα που έχουν γίνει σε αρουραίους, η βιοσύνθεση της σεροτονίνης στον εγκέφαλο των εμβρύων κατά την διάρκεια της κύησης, αυξάνεται όταν επικρατούν συνθήκες νηστείας¹²². Έτσι, στην περίπτωση των IUGR κυήσεων, η μείωση της θρυπτοφάνης στην ομάδα των νεογνών πιθανώς να οφείλεται στην αύξηση της βιοσύνθεσης της σεροτονίνης ως μηχανισμός προσαρμογής στις συνθήκες νηστείας που επικρατούν¹²³.

Επίσης, η αυξημένη παραγωγή σεροτονίνης κατά την κύηση και κατά συνέπεια η κατανάλωση θρυπτοφάνης, είναι αναγκαία για την έκκριση ινσουλίνης από τη μητέρα. Η παρατηρούμενη αύξηση της θρυπτοφάνης στις μητέρες των IUGR νεογνών θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα της μειωμένης παραγωγής σεροτονίνης¹²¹.

Σχήμα 4.41. Μετατροπή θρυπτοφάνης σε σεροτονίνη¹⁰².

Η θρυπτοφάνη συμμετέχει επίσης στο μεταβολικό μονοπάτι της σύνθεσης της κυνουρενίνης (Σχήμα 4.42). Συγκεκριμένα, η αποικοδόμηση της θρυπτοφάνης στα θηλαστικά συμβαίνει κατά ποσοστό μεγαλύτερο του 95% μέσω του μονοπατιού της κυνουρενίνης. Η θρυπτοφάνη αποτελεί ένα υπόστρωμα για τη μεταβολική οδό της κυνουρενίνης και στον πλακούντα. Στις κυήσεις, η αποικοδόμησή της θρυπτοφάνης σε κυνουρενίνη είναι απαραίτητη για τη νευροπροστασία του εμβρύου. Η έκφραση και η δραστηριότητα της μεταβολικής αυτής οδού είναι παρούσα από τα πρώιμα στάδια της κύησης και απορρυθμίζεται από την υποξία και τις κυήσεις με ενδομήτρια υπολειπόμενη

ανάπτυξη¹²⁴. Συγκεκριμένα, τα ένζυμα που περιλαμβάνονται στο μονοπάτι αυτό (2,3-διοξυγενάση της θρυπτοφάνης και 2,3-διοξυγενάση 1 και 2 της ινδολεαμίνης)¹²⁵ εξαρτώνται από τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου, με αποτέλεσμα το μονοπάτι της σύνθεσης της κυνουρενίνης να απορρυθμίζεται σε συνθήκες υποξίας, όπως στη περίπτωση των IUGR κυήσεων¹²⁴.

Σχήμα 4.42. Μετατροπή θρυπτοφάνης σε κυνουρενίνη¹⁰².

Παράλληλα, μια πρόσφατη έρευνα¹²⁴ που εστίασε στην κυνουρενίνη και τους μεταβολίτες της κατά τη διάρκεια της κύησης έδειξε ότι όλοι οι κύριοι μεταβολίτες της κυνουρενίνης υπήρχαν στο αίμα του ομφάλιου λώρου και γενικά ήταν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από ότι στο μητρικό αίμα, κάτι που επαληθεύεται και από τα ευρήματα της παρούσας μελέτη. Επιπρόσθετα, τα γονίδια που σχετίζονται με τα ένζυμα παραγωγής της κυνουρενίνης από την θρυπτοφάνη, βρέθηκαν στην ίδια μελέτη σημαντικά χαμηλότερα στον πλακούντα κυήσεων με ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη σε σύγκριση με τους μάρτυρες.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η μεταφορά της θρυπτοφάνης από τη μητέρα στο έμβryo μέσω του πλακούντα και της ομφαλικής φλέβας δεν επηρεάζεται από την IUGR παθολογία, παρόλ' αυτά η διαθεσιμότητα της θρυπτοφάνης ρυθμίζεται από την κυκλοφορία της δεσμευμένης με την αλβουμίνη

θρυπτοφάνης καθώς και την αναλογία ελεύθερης προς δεσμευμένης στην αλβουμίνη¹²⁶. Η αύξηση της θρυπτοφάνης στην ομάδα των IUGR μητέρων ενδεχομένως σχετίζεται με την κάλυψη των αυξημένων αναγκών σε θρυπτοφάνη από τη μητέρα και με την αύξηση της ελεύθερης θρυπτοφάνης λόγω της μείωσης των επιπέδων της αλβουμίνης.

4.8. Κλινικές και ερευνητικές επιπτώσεις

Ένα σημαντικό εύρημα της μελέτης είναι το αναδεικνυόμενο παρεμφερές μεταβολικό προφίλ μεταξύ των ομφαλικών και των μητρικών δειγμάτων στις IUGR κυήσεις. Αυτή η συσχέτιση πιθανώς αναδεικνύει ότι μεταξύ των εμβρύων με IUGR παθολογία και των μητέρων τους επιδρούν κοινοί μηχανισμοί που διαφοροποιούν το μεταβολικό τους αποτύπωμα. Αυτό το συμπέρασμα, εφόσον επικυρωθεί με επιπρόσθετες μελέτες, είναι δυνατόν να οδηγήσει στη χρήση βιοδεικτών στο αίμα των εγκύων με σκοπό την ανίχνευση πιθανής IUGR.

Επίσης, η αύξηση των BCAAs και κατ' επέκταση του 3-μέθυλο-2-όξοβαλερικού οξέος καθώς και η ενίσχυση της γλυκονεογένεσης και η καταστολή της γλυκερονεογένεσης στην ομάδα των IUGR νεογνών φαίνεται να αποδίδεται στη σχέση της IUGR παθολογίας με την αντίσταση στην ινσουλίνη.

Τέλος, η μείωση της θρυπτοφάνης στα IUGR νεογνά φαίνεται να σχετίζεται με την ανάπτυξη μηχανισμών προσαρμογής για την κάλυψη των αυξημένων αναγκών τους σε σεροτονίνη.

4.9. Δυνατά σημεία της μελέτης

Η συμπερίληψη 84 εγκύων εκ των οποίων οι 48 αφορούσαν IUGR κυήσεις και οι 36 AGA κυήσεις αποτελεί, σε σχέση με τη βιβλιογραφία, έναν από τους μεγαλύτερους δειγματοχώρους που έχουν μελετηθεί έως τώρα. Επίσης, η σύγκριση του μεταβολικού αποτυπώματος των μητρικών και των ομφαλικών δειγμάτων αποτελεί μια πρωτοτυπία αποδεικνύοντας τη συσχέτιση του μεταβολικού προφίλ των νεογνών με IUGR παθολογία με το μεταβολικό προφίλ των μητέρων τους.

Συγκεκριμένα, 7 από τους 9 προτεινόμενους βιοδείκτες συμμετέχουν παρόμοια στη διάκριση των ομάδων IUGR και AGA μεταξύ των ομφαλικών και μητρικών δειγμάτων.

Η διάκριση των ομάδων IUGR και AGA μεταξύ των ομφαλικών και μητρικών δειγμάτων αντίστοιχα επιτεύχθηκε βάσει συμπληρωματικών στατιστικών μοντέλων. Στις περισσότερες περιπτώσεις, ο ρόλος των προτεινόμενων βιοδεικτών επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα της βιβλιογραφίας.

Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών και ο ποσοτικός προσδιορισμός των προκρινόμενων αμινοξέων τόσο από τα φάσματα NMR όσο και με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αναδεικνύει τον ρόλο της λευκίνης, της ισολευκίνης και της αλανίνης στη διάκριση μεταξύ των IUGR και AGA ομφαλικών δειγμάτων.

4.10. Μελλοντικοί στόχοι

Επόμενο στάδιο της έρευνας αποτελεί μία στοχευμένη προοπτική μελέτη σε αίμα εγκύων κατά το δεύτερο τρίμηνο της κύησης συσχετίζοντας τα αποτελέσματα με την έκβαση του τοκετού (IUGR και AGA). Η στοχευμένη αυτή μελέτη θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί με χαμηλότερου κόστους εξοπλισμό όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης στοχεύοντας στους 7 προτεινόμενους από την παρούσα διατριβή μεταβολίτες και ιδιαίτερα στα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας. Η προτεινόμενη έρευνα αναμένεται να επαληθεύσει μερικώς ή στο σύνολό τους τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, προτείνοντας κάποιους από τους υποδεικνυόμενους μεταβολίτες (μόνους ή συνδυαστικά) ως υποψήφιους βιοδείκτες με σκοπό την έγκαιρη διάγνωση της IUGR. Η ανάδειξη υποψήφιων βιοδεικτών της IUGR σε πρώιμο στάδιο της κύησης θα μπορούσε να συμβάλλει στην ανάσχεση των αρνητικών επιπτώσεων της IUGR είτε μέσω κάποιας φαρμακευτικής ή διατροφικής παρέμβασης στη μητέρα.

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, η αύξηση των BCAAs και κατ' επέκταση του 3-μέθυλο-2-οξοβαλερικού οξέος στις IUGR ομάδες, πιθανόν να σχετίζεται με την έλλειψη ή δυσλειτουργία του πολυ-ενζυμικού συμπλέγματος branched chain α -keto acid dehydrogenase (BCKD) στην οποία

οφείλεται και η νόσος με οσμή ούρων σαν σιρόπι σφενδάμου (Maple Syrup Urine Disease, MSUD). Η δράση του συμπλόκου BCKD και επακόλουθα η οξείδωση των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας επηρεάζονται από παράγοντες όπως η ινσουλίνη και τα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας. Προτείνεται λοιπόν, η μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν το πολυ-ενζυμικό σύμπλεγμα BCKD, ως ένας δεύτερος μελλοντικός ερευνητικός στόχος, επιβεβαιώνοντας την παραπάνω συσχέτιση.

4.11. Τελικά συμπεράσματα

Στη παρούσα μεταβολωμική μελέτη με εφαρμογή φασματοσκοπίας NMR, επιχειρήθηκε η χαρτογράφηση του μεταβολικού αποτυπώματος σε περιπτώσεις νεογνών με ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη. Η μεταβολωμική αποτέλεσε πολύτιμο εργαλείο τόσο για τη μελέτη των βιολογικών μηχανισμών που εμπλέκονται στην παθολογία όσο και στην αναζήτηση δυνητικών βιοδεικτών. Συνολικά, αποτυπώθηκε η μεταβολική εικόνα σε ορό αίματος από ομφάλιο λώρο (που αντικατοπτρίζει το νεογνό) και ορό αίματος από τη μητέρα κατά τον τοκετό.

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν για πρώτη φορά μία παρόμοια εικόνα μεταξύ του μεταβολικού προφίλ των νεογνών με IUGR παθολογία και των μητέρων τους. Φαίνεται πως αρκετοί μεταβολίτες συμμετείχαν κατά παρόμοιο τρόπο στη διάκριση των ομάδων IUGR και AGA μεταξύ των ομφαλικών και μητρικών δειγμάτων, ένα σημαντικό εύρημα για περαιτέρω μελέτες που αφορούν την παθοφυσιολογία της κύησης.

Τα αμινοξέα διακλαδισμένης ανθρακικής αλυσίδας (BCAAs, λευκίνη, ισολευκίνη και βαλίνη), το μη-απαραίτητο αμινοξύ αλανίνη και το 3-μέθυλο-2-οξοβαλερικό οξύ βρίσκονται σε υψηλότερη συγκέντρωση στα IUGR δείγματα (ομφαλικά και μητρικά) σε αντίθεση με το απαραίτητο αμινοξύ φαινυλαλανίνη και την γλυκερόλη που συμμετέχουν σε υψηλότερη συγκέντρωση στα AGA δείγματα (ομφαλικά και μητρικά). Αντιθέτως, το 3-ύδροξυβουτυρικό διαφοροποιείται μόνο μεταξύ των μητρικών δειγμάτων ενώ το απαραίτητο αμινοξύ θρυπτοφάνη εντοπίζεται σε υψηλότερη συγκέντρωση στα ομφαλικά AGA και στα μητρικά IUGR δείγματα.

Τα αποτελέσματα της διατριβής επιβεβαίωσαν τη σύνδεση της IUGR παθολογίας με την αύξηση των αμινοξέων διακλαδισμένης ανθρακικής αλυσίδας με πιθανή συσχέτιση με την αντίσταση στην ινσουλίνη. Επίσης, η ελάττωση της γλυκερόλης στα IUGR ομφαλικά δείγματα συνδέθηκε με την ενίσχυση του κύκλου της γλυκονεογένεσης και την καταστολή του κύκλου της γλυκερονεογένεσης.

Επίσης, αναδεικνύεται η έλλειψη ή μείωση των ενεργειακών αποθεμάτων από το έμβρυο στις IUGR κυήσεις με συνέπεια την ανάπτυξη μηχανισμών προσαρμογής ώστε να αντισταθμίσει τα απαραίτητα ποσά ενέργειας για την επιβίωσή του.

Συγκεντρωτικά, η παρούσα διατριβή συνεισφέρει ουσιαστικά στην περίπλοκη παθολογία της ενδομήτριας υπολειπόμενης ανάπτυξης, επιβεβαιώνοντας προηγούμενα αποτελέσματα και προσφέροντας νέα δεδομένα με την ανάδειξη πιθανών βιοδεικτών για μελλοντική χρήση ως διαγνωστικό εργαλείο.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Στα παρακάτω σχήματα δίνονται 2D φάσματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των μεταβολιών στο αντιπροσωπευτικό δείγμα του ορού.

Σχήμα A.1. Φάσμα gCOSY.

Σχήμα Α.2. Φάσμα gCOSY με ταυτοποίηση των μεταβολιτών της περιοχής 0.6-3.0 ppm.

Σχήμα Α.3. Φάσμα gCOSY με ταυτοποίηση των μεταβολιτών της περιοχής 3.0-5.25 ppm.

Σχήμα Α.4. Φάσμα gCOSY με ταυτοποίηση των μεταβολιτών της αρωματικής περιοχής.

Σχήμα Α.5. Φάσμα z-TOCSY.

Σχήμα A.8. Φάσμα zTOCSY με ταυτοποίηση των μεταβολιτών της αρωματικής περιοχής.

Σχήμα A.9. Φάσμα gHSQC.

Σχήμα A.10. Φάσμα gHSQCad με ταυτοποίηση των μεταβολιτών της περιοχής 0.65-1.80 ppm.

Σχήμα A.11. Φάσμα gHSQCad με ταυτοποίηση των μεταβολιτών της περιοχής 1.85-2.70 ppm.

Σχήμα A.12. Φάσμα gHSQCad με ταυτοποίηση των μεταβολιτών της περιοχής 2.80-4.30 ppm.

Σχήμα A.13. Φάσμα gHSQCad με ταυτοποίηση των μεταβολιτών της αρωματικής περιοχής.

Σχήμα A.14. Φάσμα gHMBCad.

Σχήμα A.15. Ταυτοποίηση των μεταβολιτών 3-μέθυλο-2-οξοβαλερικό οξύ, ισολευκίνη και 3-ύδροξυβουτυρικό οξύ με τον εμβολιασμό του αντιπροσωπευτικού δείγματος.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΠΟΣΟΤΙΚΩΝ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ

Descriptives										
Category	Aminoacid	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
						Lower Bound	Upper Bound			
UC HPLC	Ala	1 IUGR	5	,3322	,13747	,06148	,1616	,5029	,22	,55
		2 AGA	5	,2056	,04625	,02068	,1482	,2631	,15	,27
		Total	10	,2689	,11748	,03715	,1849	,3530	,15	,55
	Val	1 IUGR	5	,2073	,04173	,01866	,1554	,2591	,15	,24
		2 AGA	5	,1736	,04243	,01898	,1209	,2263	,12	,22
		Total	10	,1904	,04346	,01374	,1593	,2215	,12	,24
	ile	1 IUGR	5	,0434	,01122	,00502	,0294	,0573	,03	,06
		2 AGA	5	,0272	,01041	,00466	,0143	,0402	,01	,04
		Total	10	,0353	,01328	,00420	,0258	,0448	,01	,06
	leu	1 IUGR	5	,1079	,01657	,00741	,0873	,1285	,09	,13
		2 AGA	5	,0748	,00698	,00312	,0661	,0834	,06	,08
		Total	10	,0913	,02117	,00669	,0762	,1065	,06	,13
	trp	1 IUGR	5	,1003	,03020	,01351	,0628	,1378	,05	,13
		2 AGA	5	,1465	,02864	,01281	,1110	,1821	,12	,19
		Total	10	,1234	,03693	,01168	,0970	,1498	,05	,19
	phe	1 IUGR	5	,0422	,01466	,00656	,0240	,0604	,02	,06

	2 AGA	5	,0492	,01389	,00621	,0319	,0664	,03	,07
	Total	10	,0457	,01395	,00441	,0357	,0557	,02	,07
UC NMR	ala1 1 IUGR	5	,3962	,15262	,06826	,2067	,5857	,29	,66
	2 AGA	5	,1894	,02280	,01020	,1611	,2177	,15	,21
	Total	10	,2928	,14986	,04739	,1856	,4000	,15	,66
	val1 1 IUGR	5	,2307	,02363	,01057	,2013	,2600	,20	,27
	2 AGA	5	,1247	,02680	,01199	,0915	,1580	,10	,17
	Total	10	,1777	,06069	,01919	,1343	,2211	,10	,27
	ile1 1 IUGR	5	,0961	,01760	,00787	,0743	,1179	,07	,12
	2 AGA	5	,0394	,00662	,00296	,0312	,0476	,03	,05
	Total	10	,0678	,03241	,01025	,0446	,0909	,03	,12
	leu1 1 IUGR	5	,1482	,01587	,00710	,1285	,1679	,12	,16
	2 AGA	5	,0669	,00502	,00225	,0607	,0732	,06	,07
	Total	10	,1076	,04427	,01400	,0759	,1393	,06	,16
	trp1 1 IUGR	5	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
	2 AGA	5	,0427	,01472	,00658	,0244	,0610	,03	,07
	Total	10	,0214	,02456	,00777	,0038	,0389	,00	,07
	phe 1 IUGR	5	,0372	,00368	,00165	,0326	,0418	,03	,04
	1 2 AGA	5	,0379	,00889	,00397	,0269	,0490	,03	,05
	Total	10	,0376	,00642	,00203	,0330	,0422	,03	,05
Maternal HPLC	ala2 1 IUGR	5	,2006	,03372	,01508	,1588	,2425	,16	,23
	2 AGA	5	,1765	,01857	,00831	,1535	,1996	,15	,20
	Total	10	,1886	,02864	,00906	,1681	,2091	,15	,23
	val2 1 IUGR	5	,1385	,02012	,00900	,1136	,1635	,12	,17

	2 AGA	5	,1198	,02099	,00939	,0938	,1459	,09	,14
	Total	10	,1292	,02175	,00688	,1136	,1447	,09	,17
	ile2 1 IUGR	5	,0416	,00488	,00218	,0356	,0477	,04	,05
	2 AGA	5	,0251	,01661	,00743	,0045	,0457	,01	,05
	Total	10	,0334	,01446	,00457	,0230	,0437	,01	,05
	leu2 1 IUGR	5	,0711	,02629	,01176	,0384	,1037	,04	,09
	2 AGA	5	,0731	,00698	,00312	,0644	,0817	,07	,08
	Total	10	,0721	,01816	,00574	,0591	,0851	,04	,09
	trp2 1 IUGR	5	,1197	,04796	,02145	,0601	,1792	,07	,20
	2 AGA	5	,0549	,03893	,01741	,0065	,1032	,02	,12
	Total	10	,0873	,05350	,01692	,0490	,1255	,02	,20
	phe 1 IUGR	5	,0480	,02085	,00933	,0221	,0739	,03	,07
	2 2 AGA	5	,0550	,03163	,01415	,0157	,0943	,02	,09
	Total	10	,0515	,02553	,00807	,0332	,0697	,02	,09
Maternal NMR	ala3 1 IUGR	5	,2506	,04240	,01896	,1979	,3032	,18	,29
	2 AGA	5	,2411	,06213	,02778	,1639	,3182	,18	,34
	Total	10	,2458	,05039	,01594	,2098	,2819	,18	,34
	val3 1 IUGR	5	,1530	,01390	,00622	,1358	,1703	,13	,16
	2 AGA	5	,1190	,02373	,01061	,0895	,1484	,09	,15
	Total	10	,1360	,02566	,00811	,1176	,1543	,09	,16
	ile3 1 IUGR	5	,0571	,01297	,00580	,0410	,0732	,04	,07
	2 AGA	5	,0389	,01449	,00648	,0209	,0569	,02	,06
	Total	10	,0480	,01612	,00510	,0365	,0595	,02	,07
	leu3 1 IUGR	5	,0949	,01376	,00615	,0778	,1119	,08	,11

	2 AGA		5	,0729	,01462	,00654	,0548	,0911	,05	,09
	Total		10	,0839	,01769	,00559	,0712	,0965	,05	,11
	trp3	1 IUGR	5	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
	2 AGA		5	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
	Total		10	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
	phe	1 IUGR	5	,0291	,00383	,00171	,0243	,0339	,02	,03
	3	2 AGA	5	,0508	,01250	,00559	,0353	,0663	,04	,07
	Total		10	,0400	,01438	,00455	,0297	,0502	,02	,07

ANOVA							
			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
UC HPLC	ala	Between Groups	,040	1	,040	3,809	,087
		Within Groups	,084	8	,011		
		Total	,124	9			
	val	Between Groups	,003	1	,003	1,601	,241
		Within Groups	,014	8	,002		
		Total	,017	9			
	ile	Between Groups	,001	1	,001	5,549	,046
		Within Groups	,001	8	,000		
		Total	,002	9			
	leu	Between Groups	,003	1	,003	16,938	,003
		Within Groups	,001	8	,000		
		Total	,004	9			
	trp	Between Groups	,005	1	,005	6,174	,038
		Within Groups	,007	8	,001		
		Total	,012	9			
	phe	Between Groups	,000	1	,000	,593	,464
		Within Groups	,002	8	,000		
		Total	,002	9			
UC NMR	ala1	Between Groups	,107	1	,107	8,976	,017
		Within Groups	,095	8	,012		
		Total	,202	9			
	val1	Between Groups	,028	1	,028	43,937	,000
		Within Groups	,005	8	,001		0,000164
		Total	,033	9			
	ile1	Between Groups	,008	1	,008	45,469	,000
		Within Groups	,001	8	,000		0,000146
		Total	,009	9			
	leu1	Between Groups	,017	1	,017	119,290	,000
		Within Groups	,001	8	,000		0,000004
		Total	,018	9			
	trp1	Between Groups	,005	1	,005	42,133	,000
		Within Groups	,001	8	,000		0,000190
		Total	,005	9			
	phe1	Between Groups	,000	1	,000	,030	,868
		Within Groups	,000	8	,000		
		Total	,000	9			
Mat	ala2	Between Groups	,001	1	,001	1,964	,199

Maternal NMR		Within Groups	,006	8	,001		
		Total	,007	9			
	val2	Between Groups	,001	1	,001	2,072	,188
		Within Groups	,003	8	,000		
		Total	,004	9			
	ile2	Between Groups	,001	1	,001	4,557	,065
		Within Groups	,001	8	,000		
		Total	,002	9			
	leu2	Between Groups	,000	1	,000	,027	,872
		Within Groups	,003	8	,000		
		Total	,003	9			
	trp2	Between Groups	,010	1	,010	5,503	,047
		Within Groups	,015	8	,002		
		Total	,026	9			
	phe2	Between Groups	,000	1	,000	,171	,690
		Within Groups	,006	8	,001		
		Total	,006	9			
	ala3	Between Groups	,000	1	,000	,080	,784
		Within Groups	,023	8	,003		
		Total	,023	9			
Maternal NMR	val3	Between Groups	,003	1	,003	7,670	,024
		Within Groups	,003	8	,000		
		Total	,006	9			
	ile3	Between Groups	,001	1	,001	4,367	,070
		Within Groups	,002	8	,000		
		Total	,002	9			
	leu3	Between Groups	,001	1	,001	5,970	,040
		Within Groups	,002	8	,000		
		Total	,003	9			
	trp3	Between Groups	,000	1	,000	.	.
		Within Groups	,000	8	,000		
		Total	,000	9			
	phe3	Between Groups	,001	1	,001	13,785	,006
		Within Groups	,001	8	,000		
		Total	,002	9			

Correlations

		ala	ala1	ala2	ala3
ala	Pearson Correlation	1	,909**	-,198	-,225
	Sig. (2-tailed)		,000	,583	,533
	N	10	10	10	10
ala1	Pearson Correlation	,909**	1	-,014	,108
	Sig. (2-tailed)	,000		,970	,767
	N	10	10	10	10
ala2	Pearson Correlation	-,198	-,014	1	,214
	Sig. (2-tailed)	,583	,970		,554
	N	10	10	10	10
ala3	Pearson Correlation	-,225	,108	,214	1
	Sig. (2-tailed)	,533	,767	,554	
	N	10	10	10	10

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Correlations

		val	val1	val2	val3
val	Pearson Correlation	1	,558	,193	,069
	Sig. (2-tailed)		,094	,594	,850
	N	10	10	10	10
val1	Pearson Correlation	,558	1	,484	,507
	Sig. (2-tailed)	,094		,156	,135
	N	10	10	10	10
val2	Pearson Correlation	,193	,484	1	,641*
	Sig. (2-tailed)	,594	,156		,046
	N	10	10	10	10
val3	Pearson Correlation	,069	,507	,641*	1
	Sig. (2-tailed)	,850	,135	,046	
	N	10	10	10	10

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Correlations

		ile	ile1	ile2	ile3
ile	Pearson Correlation	1	,757*	,675*	,049
	Sig. (2-tailed)		,011	,032	,892
	N	10	10	10	10
ile1	Pearson Correlation	,757*	1	,674*	,435
	Sig. (2-tailed)	,011		,032	,209
	N	10	10	10	10
ile2	Pearson Correlation	,675*	,674*	1	,046
	Sig. (2-tailed)	,032	,032		,899
	N	10	10	10	10
ile3	Pearson Correlation	,049	,435	,046	1
	Sig. (2-tailed)	,892	,209	,899	
	N	10	10	10	10

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Correlations

		leu	leu1	leu2	leu3
leu	Pearson Correlation	1	,811**	-,123	,476
	Sig. (2-tailed)		,004	,735	,165
	N	10	10	10	10
leu1	Pearson Correlation	,811**	1	,130	,619
	Sig. (2-tailed)	,004		,721	,056
	N	10	10	10	10
leu2	Pearson Correlation	-,123	,130	1	-,291
	Sig. (2-tailed)	,735	,721		,415
	N	10	10	10	10
leu3	Pearson Correlation	,476	,619	-,291	1
	Sig. (2-tailed)	,165	,056	,415	
	N	10	10	10	10

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Correlations

		trp	trp1	trp2	trp3
trp	Pearson Correlation	1	,455	-,521	. ^a
	Sig. (2-tailed)		,186	,123	.
	N	10	10	10	10
trp1	Pearson Correlation	,455	1	-,419	. ^a
	Sig. (2-tailed)	,186		,228	.
	N	10	10	10	10
trp2	Pearson Correlation	-,521	-,419	1	. ^a
	Sig. (2-tailed)	,123	,228		.
	N	10	10	10	10
trp3	Pearson Correlation	. ^a	. ^a	. ^a	. ^a
	Sig. (2-tailed)	.	.	.	.
	N	10	10	10	10

a. Cannot be computed because at least one of the variables is constant.

Correlations

		phe	phe1	phe2	phe3
phe	Pearson Correlation	1	-,297	,402	-,020
	Sig. (2-tailed)		,405	,250	,957
	N	10	10	10	10
phe1	Pearson Correlation	-,297	1	-,100	,337
	Sig. (2-tailed)	,405		,784	,341
	N	10	10	10	10
phe2	Pearson Correlation	,402	-,100	1	,284
	Sig. (2-tailed)	,250	,784		,427
	N	10	10	10	10
phe3	Pearson Correlation	-,020	,337	,284	1
	Sig. (2-tailed)	,957	,341	,427	
	N	10	10	10	10

Συντμήσεις

AGA:	Φυσιολογικά για την ηλικία κύησης
AUC:	Εμβαδόν καμπύλης ROC
BCAAs:	Αμινοξέα διακλαδισμένης ανθρακικής αλυσίδας
COSY:	Τεχνική λήψης φάσματος 2D, με συσχετισμό ομοπυρηνικών σπιν
CPMG:	Ακολουθία καταστολής σήματος πρωτεϊνών
CV-ANOVA:	Έλεγχος διασταυρωμένης επικύρωσης της ανάλυσης
HMBC:	Τεχνική λήψης φάσματος 2D, με συσχετισμό ετεροπυρηνικών σπιν
HPLC:	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
HSQC:	Τεχνική λήψης φάσματος 2D, με συσχετισμό ετεροπυρηνικών σπιν
IUGR:	Ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη
LGA:	Μεγάλα για την ηλικία κύησης
MS:	Φασματομετρία μαζών
NMR:	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
NOESY:	Ακολουθία λήψης φάσματος πρωτονίου
OPLS-DA:	Ορθογώνια παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων με διαχωριστική ανάλυση
PCA:	Ανάλυση κύριων συνιστωσών
PRESAT:	Τεχνική καταστολής σήματος νερού
p-value:	Στατιστικός όρος σημαντικότητας
ROC curve:	Καμπύλη δέκτη λειτουργικών χαρακτηριστικών
SGA:	Μικρά για την ηλικία κύησης
S-line plot:	Διάγραμμα S-γραμμής
TOCSY:	Τεχνική λήψης φάσματος 2D, με συσχετισμό ομοπυρηνικών σπιν
VIP plot:	Διάγραμμα σημαντικότητας
E/Θ:	Εκατοστιαία θέση
ΣΔΚ:	Σακχαρώδης διαβήτης κύησης

Συντμήσεις αμινοξέων

Ala:	Αλανίνη
Val:	Βαλίνη
Leu:	Λευκίνη
Ile:	Ισολευκίνη
Phe:	Φαινυλαλανίνη
Trp:	Θρυπτοφάνη

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Chauhan, S. P.; Gupta, L. M.; Hendrix, N. W.; Berghella, V.; American College of Obstetricians and Gynecologists. Intrauterine Growth Restriction: Comparison of American College of Obstetricians and Gynecologists Practice Bulletin with Other National Guidelines. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2009**, *200* (4), 409.e1-6. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2008.11.025>.
- (2) Committee on Practice Bulletins--Gynecology, American College of Obstetricians and Gynecologists, Washington, DC 20090-6920, USA. Intrauterine Growth Restriction. Clinical Management Guidelines for Obstetrician-Gynecologists. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Int J Gynaecol Obstet* **2001**, *72* (1), 85–96.
- (3) Mandruzzato, G.; Antsaklis, A.; Botet, F.; Chervenak, F. A.; Figueras, F.; Grunebaum, A.; Puerto, B.; Skupski, D.; Stanojevic, M.; WAPM. Intrauterine Restriction (IUGR). *J Perinat Med* **2008**, *36* (4), 277–281. <https://doi.org/10.1515/JPM.2008.050>.
- (4) Suhag, A.; Berghella, V. Intrauterine Growth Restriction (IUGR): Etiology and Diagnosis. *Curr Obstet Gynecol Rep* **2013**, *2* (2), 102–111. <https://doi.org/10.1007/s13669-013-0041-z>.
- (5) Xu, Y.; Williams, S. J.; O'Brien, D.; Davidge, S. T. Hypoxia or Nutrient Restriction during Pregnancy in Rats Leads to Progressive Cardiac Remodeling and Impairs Postischemic Recovery in Adult Male Offspring. *FASEB J.* **2006**, *20* (8), 1251–1253. <https://doi.org/10.1096/fj.05-4917fje>.
- (6) Dessì, A.; Marincola, F. C.; Fanos, V. Metabolomics and the Great Obstetrical Syndromes--GDM, PET, and IUGR. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **2015**, *29* (2), 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2014.04.023>.
- (7) Powell, K. L.; Carrozzi, A.; Stephens, A. S.; Tasevski, V.; Morris, J. M.; Ashton, A. W.; Dona, A. C. Utility of Metabolic Profiling of Serum in the Diagnosis of Pregnancy Complications. *Placenta* **2018**, *66*, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2018.04.005>.

- (8) Chen, H.-Y.; Chauhan, S. P.; Ward, T. C. S.; Mori, N.; Gass, E. T.; Cisler, R. A. Aberrant Fetal Growth and Early, Late, and Postneonatal Mortality: An Analysis of Milwaukee Births, 1996-2007. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2011**, *204* (3), 261.e1-261.e10. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.11.040>.
- (9) Gardosi, J.; Clausson, B.; Francis, A. The Value of Customised Centiles in Assessing Perinatal Mortality Risk Associated with Parity and Maternal Size. *BJOG* **2009**, *116* (10), 1356–1363. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2009.02245.x>.
- (10) Gardosi, J.; Chang, A.; Kalyan, B.; Sahota, D.; Symonds, E. M. Customised Antenatal Growth Charts. *Lancet* **1992**, *339* (8788), 283–287. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)91342-6](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)91342-6).
- (11) Zhang, S.; Nagana Gowda, G. A.; Ye, T.; Raftery, D. Advances in NMR-Based Biofluid Analysis and Metabolite Profiling. *Analyst* **2010**, *135* (7), 1490–1498. <https://doi.org/10.1039/c0000091d>.
- (12) Baschat, A. A. Fetal Growth Disorders. In *High risk pregnancy management options*; Saunders Elsevier: Pennsylvania, 2006; pp 240–271.
- (13) Baschat, A. A.; Galan, H. L.; Gabbe, S. G. Intrauterine Growth Restriction. In *Obstetrics normal and problem pregnancies*; Elsevier: Philadelphia, 2012; pp 706–741.
- (14) Muscle Hypertrophy <http://physiologicalresponsestotraining.weebly.com/muscle-hypertrophy.html> (accessed May 13, 2020).
- (15) Briana, D. D.; Malamitsi-Puchner, A. Intrauterine Growth Restriction and Adult Disease: The Role of Adipocytokines. *Eur. J. Endocrinol.* **2009**, *160* (3), 337–347. <https://doi.org/10.1530/EJE-08-0621>.
- (16) Hales, C. N.; Barker, D. J. Type 2 (Non-Insulin-Dependent) Diabetes Mellitus: The Thrifty Phenotype Hypothesis. *Diabetologia* **1992**, *35* (7), 595–601. <https://doi.org/10.1007/BF00400248>.
- (17) Rosenberg, A. The IUGR Newborn. *Semin. Perinatol.* **2008**, *32* (3), 219–224. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2007.11.003>.

- (18) Villar, J.; Belizan, J. M. The Timing Factor in the Pathophysiology of the Intrauterine Growth Retardation Syndrome. *Obstet Gynecol Surv* **1982**, 37 (8), 499–506. <https://doi.org/10.1097/00006254-198208000-00001>.
- (19) Bocca-Tjeertes, I.; Bos, A.; Kerstjens, J.; de Winter, A.; Reijneveld, S. Symmetrical and Asymmetrical Growth Restriction in Preterm-Born Children. *Pediatrics* **2014**, 133 (3), e650-656. <https://doi.org/10.1542/peds.2013-1739>.
- (20) Walker, C. L.; Merriam, A. A.; Ohuma, E. O.; Dighe, M. K.; Gale, M.; Rajagopal, L.; Papageorgiou, A. T.; Gyamfi-Bannerman, C.; Waldorf, K. M. A. Femur-Sparing Pattern of Abnormal Fetal Growth in Pregnant Women from New York City after Maternal Zika Virus Infection. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* **2018**, 219 (2), 187.e1-187.e20. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2018.04.047>.
- (21) Dashe, J. S.; McIntire, D. D.; Lucas, M. J.; Leveno, K. J. Effects of Symmetric and Asymmetric Fetal Growth on Pregnancy Outcomes. *Obstet Gynecol* **2000**, 96 (3), 321–327. [https://doi.org/10.1016/s0029-7844\(00\)00943-1](https://doi.org/10.1016/s0029-7844(00)00943-1).
- (22) Hendrix, N.; Berghella, V. Non-Placental Causes of Intrauterine Growth Restriction. *Semin. Perinatol.* **2008**, 32 (3), 161–165. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2008.02.004>.
- (23) Sharma, D.; Shastri, S.; Sharma, P. Intrauterine Growth Restriction: Antenatal and Postnatal Aspects. *Clin Med Insights Pediatr* **2016**, 10, 67–83. <https://doi.org/10.4137/CMPed.S40070>.
- (24) Bamfo, J. E. A. K.; Odibo, A. O. Diagnosis and Management of Fetal Growth Restriction. *J Pregnancy* **2011**, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/640715>.
- (25) Cherian, A. G. Diagnosis of Intrauterine Growth Restriction. *Curr. Med. Issues* **2017**, 15, 267–270. https://doi.org/10.4103/cmi.cmi_77_17.
- (26) Brodzki, J.; Marsál, K. Management of Pregnancies with Suspected Intrauterine Growth Retardation in Sweden. Results of a Questionnaire. *Acta Obstet Gynecol Scand* **2000**, 79 (9), 723–728.
- (27) Small-for-Gestational-Age Fetus, Investigation and Management (Green-top Guideline No. 31) <https://www.rcog.org.uk/en/guidelines-research-services/guidelines/gtg31/> (accessed May 13, 2020).

- (28) Crane, J. P.; Kopta, M. M. Prediction of Intrauterine Growth Retardation via Ultrasonically Measured Head/Abdominal Circumference Ratios. *Obstet Gynecol* **1979**, *54* (5), 597–601.
- (29) Hadlock, F. P.; Deter, R. L.; Harrist, R. B.; Roecker, E.; Park, S. K. A Date-Independent Predictor of Intrauterine Growth Retardation: Femur Length/Abdominal Circumference Ratio. *AJR Am J Roentgenol* **1983**, *141* (5), 979–984. <https://doi.org/10.2214/ajr.141.5.979>.
- (30) Gardosi, J.; Francis, A.; Turner, S.; Williams, M. Customized Growth Charts: Rationale, Validation and Clinical Benefits. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2018**, *218* (2S), S609–S618. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.12.011>.
- (31) Agarwal, P.; Rajadurai, V. S.; Yap, F.; Yeo, G.; Chong, Y.-S.; Kwek, K.; Saw, S. M.; Gluckman, P. D.; Lee, Y. S.; GUSTO Study Group; Tan, K. H. Comparison of Customized and Cohort-Based Birthweight Standards in Identification of Growth-Restricted Infants in GUSTO Cohort Study. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* **2016**, *29* (15), 2519–2522. <https://doi.org/10.3109/14767058.2015.1092956>.
- (32) Figueras, F.; Figueras, J.; Meler, E.; Eixarch, E.; Coll, O.; Gratacos, E.; Gardosi, J.; Carbonell, X. Customised Birthweight Standards Accurately Predict Perinatal Morbidity. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* **2007**, *92* (4), F277-280. <https://doi.org/10.1136/adc.2006.108621>.
- (33) Mongelli, M.; Ek, S.; Tambyrajia, R. Screening for Fetal Growth Restriction: A Mathematical Model of the Effect of Time Interval and Ultrasound Error. *Obstet Gynecol* **1998**, *92* (6), 908–912. [https://doi.org/10.1016/s0029-7844\(98\)00349-4](https://doi.org/10.1016/s0029-7844(98)00349-4).
- (34) Owen, P.; Maharaj, S.; Khan, K. S.; Howie, P. W. Interval between Fetal Measurements in Predicting Growth Restriction. *Obstet Gynecol* **2001**, *97* (4), 499–504. [https://doi.org/10.1016/s0029-7844\(00\)01155-8](https://doi.org/10.1016/s0029-7844(00)01155-8).
- (35) Martin, A. M.; Bindra, R.; Curcio, P.; Cicero, S.; Nicolaides, K. H. Screening for Pre-Eclampsia and Fetal Growth Restriction by Uterine Artery Doppler at 11-14 Weeks of Gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* **2001**, *18* (6), 583–586. <https://doi.org/10.1046/j.0960-7692.2001.00594.x>.

- (36) Maršál, K. Physiological Adaptation of the Growth-Restricted Fetus. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **2018**, *49*, 37–52. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.02.006>.
- (37) Dugoff, L.; Hobbins, J. C.; Malone, F. D.; Porter, T. F.; Luthy, D.; Comstock, C. H.; Hankins, G.; Berkowitz, R. L.; Merkatz, I.; Craigo, S. D.; Timor-Tritsch, I. E.; Carr, S. R.; Wolfe, H. M.; Vidaver, J.; D'Alton, M. E. First-Trimester Maternal Serum PAPP-A and Free-Beta Subunit Human Chorionic Gonadotropin Concentrations and Nuchal Translucency Are Associated with Obstetric Complications: A Population-Based Screening Study (the FASTER Trial). *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2004**, *191* (4), 1446–1451. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2004.06.052>.
- (38) Dugoff, L.; Society for Maternal-Fetal Medicine. First- and Second-Trimester Maternal Serum Markers for Aneuploidy and Adverse Obstetric Outcomes. *Obstet Gynecol* **2010**, *115* (5), 1052–1061. <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e3181da93da>.
- (39) Dugoff, L.; Hobbins, J. C.; Malone, F. D.; Vidaver, J.; Sullivan, L.; Canick, J. A.; Lambert-Messerlian, G. M.; Porter, T. F.; Luthy, D. A.; Comstock, C. H.; Saade, G.; Eddleman, K.; Merkatz, I. R.; Craigo, S. D.; Timor-Tritsch, I. E.; Carr, S. R.; Wolfe, H. M.; D'Alton, M. E.; FASTER Trial Research Consortium. Quad Screen as a Predictor of Adverse Pregnancy Outcome. *Obstet Gynecol* **2005**, *106* (2), 260–267. <https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000172419.37410.eb>.
- (40) Gardosi, J.; Francis, A. Controlled Trial of Fundal Height Measurement Plotted on Customised Antenatal Growth Charts. *Br J Obstet Gynaecol* **1999**, *106* (4), 309–317. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1999.tb08267.x>.
- (41) Barker, D. J.; Winter, P. D.; Osmond, C.; Margetts, B.; Simmonds, S. J. Weight in Infancy and Death from Ischaemic Heart Disease. *Lancet* **1989**, *2* (8663), 577–580. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(89\)90710-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(89)90710-1).
- (42) Hales, C. N.; Barker, D. J.; Clark, P. M.; Cox, L. J.; Fall, C.; Osmond, C.; Winter, P. D. Fetal and Infant Growth and Impaired Glucose Tolerance at Age 64. *BMJ* **1991**, *303* (6809), 1019–1022. <https://doi.org/10.1136/bmj.303.6809.1019>.

- (43) Law, C. M.; Shiell, A. W. Is Blood Pressure Inversely Related to Birth Weight? The Strength of Evidence from a Systematic Review of the Literature. *J. Hypertens.* **1996**, *14* (8), 935–941.
- (44) Longo, S.; Bollani, L.; Decembrino, L.; Di Comite, A.; Angelini, M.; Stronati, M. Short-Term and Long-Term Sequelae in Intrauterine Growth Retardation (IUGR). *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* **2013**, *26* (3), 222–225. <https://doi.org/10.3109/14767058.2012.715006>.
- (45) Priante, E.; Verlato, G.; Giordano, G.; Stocchero, M.; Visentin, S.; Mardegan, V.; Baraldi, E. Intrauterine Growth Restriction: New Insight from the Metabolomic Approach. *Metabolites* **2019**, *9* (11). <https://doi.org/10.3390/metabo9110267>.
- (46) Levitsky, D. A.; Strupp, B. J. Malnutrition and the Brain: Changing Concepts, Changing Concerns. *J. Nutr.* **1995**, *125* (8 Suppl), 2212S–2220S. https://doi.org/10.1093/jn/125.suppl_8.2212S.
- (47) Grantham-McGregor, S. A Review of Studies of the Effect of Severe Malnutrition on Mental Development. *J. Nutr.* **1995**, *125* (8 Suppl), 2233S–2238S. https://doi.org/10.1093/jn/125.suppl_8.2233S.
- (48) Barker, D. J. Fetal Origins of Coronary Heart Disease. *BMJ* **1995**, *311* (6998), 171–174. <https://doi.org/10.1136/bmj.311.6998.171>.
- (49) Muhlhausler, B. S.; Duffield, J. A.; Ozanne, S. E.; Pilgrim, C.; Turner, N.; Morrison, J. L.; McMillen, I. C. The Transition from Fetal Growth Restriction to Accelerated Postnatal Growth: A Potential Role for Insulin Signalling in Skeletal Muscle. *J. Physiol. (Lond.)* **2009**, *587* (Pt 17), 4199–4211. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.173161>.
- (50) Lee, M. H.; Jeon, Y. J.; Lee, S. M.; Park, M. H.; Jung, S.-C.; Kim, Y. J. Placental Gene Expression Is Related to Glucose Metabolism and Fetal Cord Blood Levels of Insulin and Insulin-like Growth Factors in Intrauterine Growth Restriction. *Early Hum. Dev.* **2010**, *86* (1), 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.01.001>.
- (51) Economides, D. L.; Nicolaides, K. H.; Linton, E. A.; Perry, L. A.; Chard, T. Plasma Cortisol and Adrenocorticotropin in Appropriate and Small for Gestational Age Fetuses. *Fetal Ther* **1988**, *3* (3), 158–164. <https://doi.org/10.1159/000263348>.

- (52) Nissen, P. M.; Nebel, C.; Oksbjerg, N.; Bertram, H. C. Metabolomics Reveals Relationship between Plasma Inositols and Birth Weight: Possible Markers for Fetal Programming of Type 2 Diabetes. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/378268>.
- (53) Conde-Agudelo, A.; Papageorgiou, A. T.; Kennedy, S. H.; Villar, J. Novel Biomarkers for Predicting Intrauterine Growth Restriction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* **2013**, 120 (6), 681–694. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.12172>.
- (54) Dessì, A.; Atzori, L.; Noto, A.; Visser, G. H. A.; Gazzolo, D.; Zanardo, V.; Barberini, L.; Puddu, M.; Ottonello, G.; Atzei, A.; De Magistris, A.; Lussu, M.; Murgia, F.; Fanos, V. Metabolomics in Newborns with Intrauterine Growth Retardation (IUGR): Urine Reveals Markers of Metabolic Syndrome. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* **2011**, 24 Suppl 2, 35–39. <https://doi.org/10.3109/14767058.2011.605868>.
- (55) Dessì, A.; Marincola, F. C.; Pattumelli, M. G.; Ciccarelli, S.; Corbu, S.; Ossicini, C.; Fanos, V.; Agostino, R. Investigation of the ¹H-NMR Based Urine Metabolomic Profiles of IUGR, LGA and AGA Newborns on the First Day of Life. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* **2014**, 27 Suppl 2, 13–19. <https://doi.org/10.3109/14767058.2014.955674>.
- (56) Marincola, F. C.; Dessì, A.; Pattumelli, M. G.; Corbu, S.; Ossicini, C.; Ciccarelli, S.; Agostino, R.; Mussap, M.; Fanos, V. (1)H NMR-Based Urine Metabolic Profile of IUGR, LGA, and AGA Newborns in the First Week of Life. *Clin. Chim. Acta* **2015**, 451 (Pt A), 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.08.008>.
- (57) Barberini, L.; Noto, A.; Fattuoni, C.; Grapov, D.; Casanova, A.; Fenu, G.; Gaviano, M.; Carboni, R.; Ottonello, G.; Crisafulli, M.; Fanos, V.; Dessì, A. Urinary Metabolomics (GC-MS) Reveals That Low and High Birth Weight Infants Share Elevated Inositol Concentrations at Birth. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* **2014**, 27 Suppl 2, 20–26. <https://doi.org/10.3109/14767058.2014.954786>.
- (58) Favretto, D.; Cosmi, E.; Ragazzi, E.; Visentin, S.; Tucci, M.; Fais, P.; Cecchetto, G.; Zanardo, V.; Viel, G.; Ferrara, S. D. Cord Blood Metabolomic Profiling in Intrauterine Growth Restriction. *Anal Bioanal*

- Chem* **2012**, 402 (3), 1109–1121. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5540-z>.
- (59) Cosmi, E.; Visentin, S.; Favretto, D.; Tucci, M.; Ragazzi, E.; Viel, G.; Ferrara, S. D. Selective Intrauterine Growth Restriction in Monochorionic Twin Pregnancies: Markers of Endothelial Damage and Metabolomic Profile. *Twin Res Hum Genet* **2013**, 16 (4), 816–826. <https://doi.org/10.1017/thg.2013.33>.
- (60) Sanz-Cortés, M.; Carbajo, R. J.; Crispi, F.; Figueras, F.; Pineda-Lucena, A.; Gratacós, E. Metabolomic Profile of Umbilical Cord Blood Plasma from Early and Late Intrauterine Growth Restricted (IUGR) Neonates with and without Signs of Brain Vasodilation. *PLoS ONE* **2013**, 8(12), e80121. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080121>.
- (61) Abd El-Wahed, M. A.; El-Farghali, O. G.; ElAbd, H. S. A.; El-Desouky, E. D.; Hassan, S. M. Metabolic Derangements in IUGR Neonates Detected at Birth Using UPLC-MS. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* **2017**, 18 (3), 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.ejmhg.2016.12.002>.
- (62) Liu, J.; Chen, X.-X.; Li, X.-W.; Fu, W.; Zhang, W.-Q. Metabolomic Research on Newborn Infants With Intrauterine Growth Restriction. *Medicine (Baltimore)* **2016**, 95 (17), e3564. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000003564>.
- (63) Wang, L.; Han, T.-L.; Luo, X.; Li, S.; Young, T.; Chen, C.; Wen, L.; Xu, P.; Zheng, Y.; Saffery, R.; Baker, P. N.; Tong, C.; Qi, H. Metabolic Biomarkers of Monochorionic Twins Complicated With Selective Intrauterine Growth Restriction in Cord Plasma and Placental Tissue. *Sci Rep* **2018**, 8 (1), 15914. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33788-y>.
- (64) Bahado-Singh, R. O.; Yilmaz, A.; Bisgin, H.; Turkoglu, O.; Kumar, P.; Sherman, E.; Mrazik, A.; Odibo, A.; Graham, S. F. Artificial Intelligence and the Analysis of Multi-Platform Metabolomics Data for the Detection of Intrauterine Growth Restriction. *PLoS ONE* **2019**, 14 (4), e0214121. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214121>.
- (65) Holmes, E.; Wilson, I. D.; Nicholson, J. K. Metabolic Phenotyping in Health and Disease. *Cell* **2008**, 134 (5), 714–717. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.026>.

- (66) Nicholson, J. K.; Lindon, J. C. Systems Biology: Metabonomics. *Nature* **2008**, 455 (7216), 1054–1056. <https://doi.org/10.1038/4551054a>.
- (67) Spratlin, J. L.; Serkova, N. J.; Eckhardt, S. G. Clinical Applications of Metabolomics in Oncology: A Review. *Clin. Cancer Res.* **2009**, 15 (2), 431–440. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1059>.
- (68) Nicholson, J. K.; Connelly, J.; Lindon, J. C.; Holmes, E. Metabonomics: A Platform for Studying Drug Toxicity and Gene Function. *Nat Rev Drug Discov* **2002**, 1 (2), 153–161. <https://doi.org/10.1038/nrd728>.
- (69) Zeisel, S. H.; Waterland, R. A.; Ordovás, J. M.; Muoio, D. M.; Jia, W.; Fodor, A. Highlights of the 2012 Research Workshop: Using Nutrigenomics and Metabolomics in Clinical Nutrition Research. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **2013**, 37 (2), 190–200. <https://doi.org/10.1177/0148607112462401>.
- (70) Madsen, R.; Lundstedt, T.; Trygg, J. Chemometrics in Metabolomics--a Review in Human Disease Diagnosis. *Anal. Chim. Acta* **2010**, 659 (1–2), 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.11.042>.
- (71) Bartel, J.; Krumsiek, J.; Theis, F. J. Statistical Methods for the Analysis of High-Throughput Metabolomics Data. *Comput Struct Biotechnol J* **2013**, 4, e201301009. <https://doi.org/10.5936/csbj.201301009>.
- (72) Bharti, S. K.; Roy, R. Quantitative ¹H NMR Spectroscopy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2012**, 35, 5–26. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.02.007>.
- (73) Smolinska, A.; Blanchet, L.; Buydens, L. M. C.; Wijmenga, S. S. NMR and Pattern Recognition Methods in Metabolomics: From Data Acquisition to Biomarker Discovery: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2012**, 750, 82–97. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.049>.
- (74) Emwas, A.-H. M. The Strengths and Weaknesses of NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry with Particular Focus on Metabolomics Research. *Methods Mol. Biol.* **2015**, 1277, 161–193. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2377-9_13.
- (75) Keun, H. C.; Athersuch, T. J. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)-Based Metabolomics. *Methods Mol. Biol.* **2011**, 708, 321–334. https://doi.org/10.1007/978-1-61737-985-7_19.

- (76) Atan, N. A. D.; Koushki, M.; Ahmadi, N. A.; Rezaei-Tavirani, M. Metabolomics-Based Studies in the Field of Leishmania/Leishmaniasis. *Alexandria Journal of Medicine* **2018**, *54* (4), 383–390. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2018.06.002>.
- (77) Aboud, O. A.; Weiss, R. H. New Opportunities from the Cancer Metabolome. *Clin. Chem.* **2013**, *59* (1), 138–146. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.184598>.
- (78) Nightingale Health - NMR or MS – which technology to pick when analysing biofluids? <https://nightingalehealth.com/research/blog/nmr-or-ms--which-technology-to-pick-when-analysing> (accessed May 20, 2020).
- (79) Psychogios, N.; Hau, D. D.; Peng, J.; Guo, A. C.; Mandal, R.; Bouatra, S.; Sinelnikov, I.; Krishnamurthy, R.; Eisner, R.; Gautam, B.; Young, N.; Xia, J.; Knox, C.; Dong, E.; Huang, P.; Hollander, Z.; Pedersen, T. L.; Smith, S. R.; Bamforth, F.; Greiner, R.; McManus, B.; Newman, J. W.; Goodfriend, T.; Wishart, D. S. The Human Serum Metabolome. *PLOS ONE* **2011**, *6* (2), e16957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016957>.
- (80) Claridge, T. D. W. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*; Vol. 2.
- (81) Emwas, A.-H. M.; Merzaban, J. S.; Serrai, H. Chapter 3 - Theory and Applications of NMR-Based Metabolomics in Human Disease Diagnosis. In *Applications of NMR Spectroscopy*; ur-Rahman, A., Choudhary, M. I., Eds.; Bentham Science Publishers, 2015; pp 93–130. <https://doi.org/10.1016/B978-1-60805-963-8.50003-2>.
- (82) Adkins, J. N.; Varnum, S. M.; Auberry, K. J.; Moore, R. J.; Angell, N. H.; Smith, R. D.; Springer, D. L.; Pounds, J. G. Toward a Human Blood Serum Proteome: Analysis by Multidimensional Separation Coupled with Mass Spectrometry. *Mol. Cell Proteomics* **2002**, *1* (12), 947–955.
- (83) Zhang, B.; Xie, M.; Bruschweiler-Li, L.; Bruschweiler, R. Nanoparticle-Assisted Removal of Protein in Human Serum for Metabolomics Studies. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (1), 1003–1007. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03889>.
- (84) Beckonert, O.; Keun, H. C.; Ebbels, T. M. D.; Bundy, J.; Holmes, E.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K. Metabolic Profiling, Metabolomic and Metabonomic Procedures for NMR Spectroscopy of Urine, Plasma,

- Serum and Tissue Extracts. *Nat Protoc* **2007**, 2 (11), 2692–2703.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.376>.
- (85) Wang, Y.; Bollard, M. E.; Keun, H.; Antti, H.; Beckonert, O.; Ebbels, T. M.; Lindon, J. C.; Holmes, E.; Tang, H.; Nicholson, J. K. Spectral Editing and Pattern Recognition Methods Applied to High-Resolution Magic-Angle Spinning ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Liver Tissues. *Anal. Biochem.* **2003**, 323 (1), 26–32.
- (86) Garcia, E.; Andrews, C.; Hua, J.; Kim, H. L.; Sukumaran, D. K.; Szyperski, T.; Odunsi, K. Diagnosis of Early Stage Ovarian Cancer by ¹H NMR Metabonomics of Serum Explored by Use of a Microflow NMR Probe. *J. Proteome Res.* **2011**, 10 (4), 1765–1771.
<https://doi.org/10.1021/pr101050d>.
- (87) Two Dimensional NMR Spectroscopy
<http://www.cryst.bbk.ac.uk/PPS2/projects/schirra/html/2dnmr.htm>
 (accessed Jan 17, 2020).
- (88) Emwas, A.-H.; Saccenti, E.; Gao, X.; McKay, R. T.; Dos Santos, V. A. P. M.; Roy, R.; Wishart, D. S. Recommended Strategies for Spectral Processing and Post-Processing of 1D ¹H-NMR Data of Biofluids with a Particular Focus on Urine. *Metabolomics* **2018**, 14 (3), 31.
<https://doi.org/10.1007/s11306-018-1321-4>.
- (89) Emwas, A.-H. M.; Salek, R. M.; Griffin, J. L.; Merzaban, J. NMR-Based Metabolomics in Human Disease Diagnosis: Applications, Limitations, and Recommendations. *Metabolomics* **2013**, 9 (5), 1048–1072.
<https://doi.org/10.1007/s11306-013-0524-y>.
- (90) Eriksson, L. Why pre-processing your data creates better data analytics models <https://blog.umetrics.com/why-preprocessing-data-creates-better-data-analytics-models> (accessed Nov 18, 2019).
- (91) Eriksson, L.; Johansson, E.; Kettaneh-Wold, N.; Trygg, J.; Wikström, C.; Wold, S. Multi- and Megavariate Data Analysis: Principles and Applications, Umetrics AB, Umeå, 2006.
- (92) Fotakis, C.; Zoga, M.; Baskakis, C.; Tsiaka, T.; Boutsikou, T.; Briana, D. D.; Dendrinou, K.; Malamitsi-Puchner, A.; Zoumpoulakis, P. Investigating the Metabolic Fingerprint of Term Infants with Normal and Increased Fetal

- Growth. *RSC Adv.* **2016**, *6* (83), 79325–79334. <https://doi.org/10.1039/C6RA12403H>.
- (93) Cloarec, O.; Dumas, M. E.; Trygg, J.; Craig, A.; Barton, R. H.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K.; Holmes, E. Evaluation of the Orthogonal Projection on Latent Structure Model Limitations Caused by Chemical Shift Variability and Improved Visualization of Biomarker Changes in ¹H NMR Spectroscopic Metabonomic Studies. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (2), 517–526. <https://doi.org/10.1021/ac048803i>.
- (94) Guleria, A.; Pratap, A.; Dubey, D.; Rawat, A.; Chaurasia, S.; Sukesh, E.; Phatak, S.; Ajmani, S.; Kumar, U.; Khetrapal, C. L.; Bacon, P.; Misra, R.; Kumar, D. NMR Based Serum Metabolomics Reveals a Distinctive Signature in Patients with Lupus Nephritis. *Sci Rep* **2016**, *6*, 35309. <https://doi.org/10.1038/srep35309>.
- (95) Vitale, R.; Marini, F.; Ruckebusch, C. SIMCA Modeling for Overlapping Classes: Fixed or Optimized Decision Threshold? *Anal. Chem.* **2018**, *90* (18), 10738–10747. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01270>.
- (96) Wheelock, Å. M.; Wheelock, C. E. Trials and Tribulations of 'omics Data Analysis: Assessing Quality of SIMCA-Based Multivariate Models Using Examples from Pulmonary Medicine. *Mol Biosyst* **2013**, *9* (11), 2589–2596. <https://doi.org/10.1039/c3mb70194h>.
- (97) Filintisi, A.; Fotakis, C.; Asvestas, P.; Matsopoulos, G. K.; Zoumpoulakis, P.; Cavouras, D. Automated Metabolite Identification from Biological Fluid ¹H NMR Spectra. *Metabolomics* **2017**, *13* (12), 146. <https://doi.org/10.1007/s11306-017-1286-8>.
- (98) Nagana Gowda, G. A.; Raftery, D. Quantitating Metabolites in Protein Precipitated Serum Using NMR Spectroscopy. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (11), 5433–5440. <https://doi.org/10.1021/ac5005103>.
- (99) Krause, I.; Bockhardt, A.; Neckermann, H.; Henle, T.; Klostermeyer, H. Simultaneous Determination of Amino Acids and Biogenic Amines by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography of the Dabsyl Derivatives. *Journal of Chromatography A* **1995**, *715* (1), 67–79. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00578-B](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00578-B).

- (100) Chuang, D. T.; Chuang, J. L.; Wynn, R. M. Lessons from Genetic Disorders of Branched-Chain Amino Acid Metabolism. *J. Nutr.* **2006**, *136* (1 Suppl), 243S-9S. <https://doi.org/10.1093/jn/136.1.243S>.
- (101) Human Metabolome Database: Showing metabocard for L-Valine (HMDB0000883) <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000883> (accessed Jun 24, 2020).
- (102) Nelson, D. L.; Lehninger, A. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th ed.; New York : W.H. Freeman, 2005.
- (103) Aravidou, E.; Eleftheriades, M.; Malamitsi-Puchner, A.; Anagnostopoulos, A. K.; Aravantinos, L.; Dontas, I.; Aravidis, C.; Creatsas, G.; Tsangaris, G.; Chrousos, G. P. Protein Expression in the Brain of Rat Offspring in Relation to Prenatal Caloric Restriction. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* **2016**, *29* (16), 2707–2714. <https://doi.org/10.3109/14767058.2015.1102222>.
- (104) Newgard, C. B.; An, J.; Bain, J. R.; Muehlbauer, M. J.; Stevens, R. D.; Lien, L. F.; Haqq, A. M.; Shah, S. H.; Arlotto, M.; Slentz, C. A.; Rochon, J.; Gallup, D.; Ilkayeva, O.; Wenner, B. R.; Yancy, W. S.; Eisenson, H.; Musante, G.; Surwit, R. S.; Millington, D. S.; Butler, M. D.; Svetkey, L. P. A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature That Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance. *Cell Metab.* **2009**, *9* (4), 311–326. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.02.002>.
- (105) Wang, T. J.; Larson, M. G.; Vasan, R. S.; Cheng, S.; Rhee, E. P.; McCabe, E.; Lewis, G. D.; Fox, C. S.; Jacques, P. F.; Fernandez, C.; O'Donnell, C. J.; Carr, S. A.; Mootha, V. K.; Florez, J. C.; Souza, A.; Melander, O.; Clish, C. B.; Gerszten, R. E. Metabolite Profiles and the Risk of Developing Diabetes. *Nat. Med.* **2011**, *17* (4), 448–453. <https://doi.org/10.1038/nm.2307>.
- (106) Menni, C.; Fauman, E.; Erte, I.; Perry, J. R. B.; Kastenmüller, G.; Shin, S.-Y.; Petersen, A.-K.; Hyde, C.; Psatha, M.; Ward, K. J.; Yuan, W.; Milburn, M.; Palmer, C. N. A.; Frayling, T. M.; Trimmer, J.; Bell, J. T.; Gieger, C.; Mohny, R. P.; Brosnan, M. J.; Suhre, K.; Soranzo, N.; Spector, T. D. Biomarkers for Type 2 Diabetes and Impaired Fasting

- Glucose Using a Nontargeted Metabolomics Approach. *Diabetes* **2013**, 62 (12), 4270–4276. <https://doi.org/10.2337/db13-0570>.
- (107) Dessì, A.; Fanos, V. Myoinositol: A New Marker of Intrauterine Growth Restriction? *J Obstet Gynaecol* **2013**, 33 (8), 776–780. <https://doi.org/10.3109/01443615.2013.831046>.
- (108) Human Metabolome Database: Showing metabocard for D-Alanine (HMDB0001310) <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0001310> (accessed Feb 21, 2020).
- (109) Cetin, I.; Ronzoni, S.; Marconi, A. M.; Perugino, G.; Corbetta, C.; Battaglia, F. C.; Pardi, G. Maternal Concentrations and Fetal-Maternal Concentration Differences of Plasma Amino Acids in Normal and Intrauterine Growth-Restricted Pregnancies. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1996**, 174 (5), 1575–1583. [https://doi.org/10.1016/s0002-9378\(96\)70609-9](https://doi.org/10.1016/s0002-9378(96)70609-9).
- (110) Economides, D. L.; Nicolaides, K. H.; Gahl, W. A.; Bernardini, I.; Evans, M. I. Plasma Amino Acids in Appropriate- and Small-for-Gestational-Age Fetuses. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1989**, 161 (5), 1219–1227. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(89\)90670-4](https://doi.org/10.1016/0002-9378(89)90670-4).
- (111) Reshef, L.; Olswang, Y.; Cassuto, H.; Blum, B.; Croniger, C. M.; Kalhan, S. C.; Tilghman, S. M.; Hanson, R. W. Glyceroneogenesis and the Triglyceride/Fatty Acid Cycle. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278 (33), 30413–30416. <https://doi.org/10.1074/jbc.R300017200>.
- (112) Human Metabolome Database: Showing metabocard for Glycerol (HMDB0000131) <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0000131> (accessed Feb 21, 2020).
- (113) Guo, X.; Li, H.; Xu, H.; Woo, S.; Dong, H.; Lu, F.; Lange, A. J.; Wu, C. Glycolysis in the Control of Blood Glucose Homeostasis. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **2012**, 2 (4), 358–367. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2012.06.002>.
- (114) Nye, C. K.; Hanson, R. W.; Kalhan, S. C. Glyceroneogenesis Is the Dominant Pathway for Triglyceride Glycerol Synthesis in Vivo in the Rat. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283 (41), 27565–27574. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804393200>.

- (115) Jeoung, N. H.; Harris, R. A. Role of Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4 in Regulation of Blood Glucose Levels. *Korean Diabetes J* **2010**, *34* (5), 274–283. <https://doi.org/10.4093/kdj.2010.34.5.274>.
- (116) Pallotto, E. K.; Kilbride, H. W. Perinatal Outcome and Later Implications of Intrauterine Growth Restriction. *Clin Obstet Gynecol* **2006**, *49* (2), 257–269.
- (117) Human Metabolome Database: Showing metabocard for 3-Methyl-2-oxovaleric acid (HMDB0000491) <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0000491> (accessed Feb 5, 2020).
- (118) Paolini, C. L.; Marconi, A. M.; Ronzoni, S.; Di Noio, M.; Fennessey, P. V.; Pardi, G.; Battaglia, F. C. Placental Transport of Leucine, Phenylalanine, Glycine, and Proline in Intrauterine Growth-Restricted Pregnancies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2001**, *86* (11), 5427–5432. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.11.8036>.
- (119) Human Metabolome Database: Showing metabocard for L-Tryptophan (HMDB0000929) <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000929> (accessed Jun 25, 2020).
- (120) Huang, W. Q.; Zhang, C. L.; Di, X. Y.; Zhang, R. Q. Studies on the Localization of 5-Hydroxytryptamine and Its Receptors in Human Placenta. *Placenta* **1998**, *19* (8), 655–661. [https://doi.org/10.1016/s0143-4004\(98\)90027-3](https://doi.org/10.1016/s0143-4004(98)90027-3).
- (121) Ranzil, S.; Walker, D. W.; Borg, A. J.; Wallace, E. M.; Ebeling, P. R.; Murthi, P. The Relationship between the Placental Serotonin Pathway and Fetal Growth Restriction. *Biochimie* **2019**, *161*, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.12.016>.
- (122) Hernández, J.; Manjarrez, G. G.; Chagoya, G. Newborn Humans and Rats Malnourished in Utero: Free Plasma L-Tryptophan, Neutral Amino Acids and Brain Serotonin Synthesis. *Brain Res.* **1989**, *488* (1–2), 1–13. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)90687-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90687-2).
- (123) Manjarrez, G.; Cisneros, I.; Herrera, R.; Vazquez, F.; Robles, A.; Hernandez, J. Prenatal Impairment of Brain Serotonergic Transmission in Infants. *J. Pediatr.* **2005**, *147* (5), 592–596. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2005.06.025>.

- (124) Murthi, P.; Wallace, E. M.; Walker, D. W. Altered Placental Tryptophan Metabolic Pathway in Human Fetal Growth Restriction. *Placenta* **2017**, *52*, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.02.013>.
- (125) Sedlmayr, P.; Blaschitz, A.; Stocker, R. The Role of Placental Tryptophan Catabolism. *Front Immunol* **2014**, *5*, 230. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00230>.
- (126) Badawy, A. A.-B. Tryptophan Metabolism, Disposition and Utilization in Pregnancy. *Biosci. Rep.* **2015**, *35* (5). <https://doi.org/10.1042/BSR20150197>.