



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

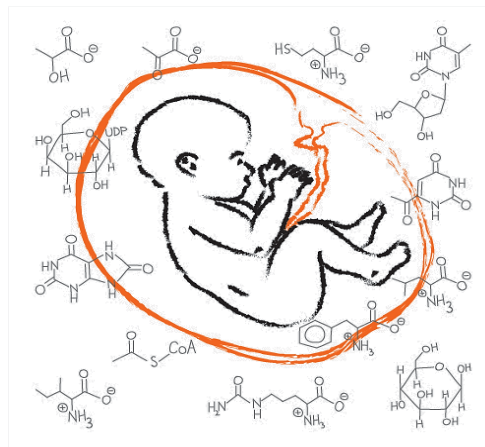
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Διατμηματικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών
“Ιατρική Χημεία”

Διαγνωστική προσέγγιση των ενδογενών μεταβολικών νοσημάτων με την χρήση της φασματοσκοπίας NMR

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία



Ευστρατία Δουλοπούλου

Χημικός

Επιβλέπουσα: Μπαϊρακτάρη Ελένη
Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας, Ιατρική Σχολή,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Μάιος 2023

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας κα. Μπαϊρακτάρη Ελένη (Επιβλέπουσα)

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιατρική Σχολή, Εργαστήριο Κλινικής Χημείας

Καθηγητής Παιδιατρικής κ. Αλέξανδρος Μάκης (Μέλος)

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιατρική Σχολή, Παιδιατρική Κλινική

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας κα. Αγγελική Μαγκλάρα (Μέλος)

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιατρική Σχολή, Εργαστήριο Κλινικής Χημείας

Στην αγαπημένη μου μητέρα, Δήμητρα

Πίνακας περιεχομένων

Πρόλογος.....	6
Περίληψη.....	7
Abstract.....	9
Εισαγωγή.....	11
Κεφάλαιο 1: Ενδογενή νοσήματα του μεταβολισμού	11
Γενετική Προσέγγιση των Ενδογενών Νοσημάτων του Μεταβολισμού.....	18
Κλινική εικόνα.....	19
Ανάγκη Διάγνωσης – Παρακολούθησης.....	20
Διαγνωστική Προσέγγιση.....	21
Κεφάλαιο 2: Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).....	25
Βασικές Αρχές.....	25
Χαρακτηριστικά Φάσματος NMR.....	29
Μεταβολομική με την χρήση του NMR.....	34
Κεφάλαιο 3: Ενδογενή νοσήματα του μεταβολισμού και NMR.....	37
Επιλεγμένα νοσήματα και διάγνωση τους με την χρήση του NMR.....	41
Σκοπός.....	69
Πειραματικό Μέρος.....	69
Πληθυσμός Μελέτης.....	69
Συλλογή Δειγμάτων.....	70
Υλικά και Αντιδραστήρια.....	70
Όργανα.....	70
Πειραματική Διαδικασία.....	70
Λήψη Φασμάτων ¹ H-NMR και Επεξεργασία Δεδομένων.....	71
Στοχευμένη Ανάλυση Μεταβολικού Προφίλ.....	71
Αποτελέσματα.....	72
Δημογραφικά Στοιχεία.....	72
Περιστατικό 1.....	72
Περιστατικό 2.....	76
Περιστατικά 3 & 4.....	80
Περιστατικό 5.....	85
Περιστατικό 6.....	91
Περιστατικό 7.....	95
Περιστατικό 8.....	96
Συζήτηση.....	97

Νόσος Hunter.....	99
Νόσος Morquio.....	102
Νόσος Pompe.....	104
Τυροσιναιμία τύπου II.....	107
Χωρίς Διάγνωση.....	107
Τριμεθυλαμιουρία (Fish Odor Syndrome).....	109
Σιτοστερολαιμία.....	112
Συμπεράσματα.....	116
Βιβλιογραφία.....	119

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο «**Διαγνωστική προσέγγιση των ενδογενών μεταβολικών νοσημάτων με την χρήση της φασματοσκοπίας NMR**» εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κλινικής Χημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στα πλαίσια του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Ιατρική Χημεία».

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια Κλινικής Χημείας κα. Ελένη Μπαϊρακτάρη για την συνεχή επίβλεψη, καθοδήγηση και την ουσιαστική συμμετοχή της στην ερευνητική διαδικασία. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον συνεπιβλέποντα Καθηγητή Παιδιατρικής κ. Αλέξανδρο Μάκη καθώς και την ειδικεύομενη Ιατρό στην Παιδιατρική Καλλιόπη Γιαννακάκη για την συλλογή των δειγμάτων, την συνεργασία και την καθοδήγηση τους κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την συνεπιβλέπουσα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας κα. Αγγελική Μαγκλάρα για την συμμετοχή της στην τριμελή εξεταστική επιτροπή. Συγχρόνως, θα ήθελα να ευχαριστήσω για την λήψη των φασμάτων NMR την μεταδιδάκτορα του εργαστηρίου Κλινική Χημείας κα. Χριστίνα Κωσταρά, ενώ και τους υποψήφιους διδάκτορες Κατερίνα Δήμου, Παναγιώτη Νταφόπουλο και Κυριακή Καρακίτσου για την συνεργασία και την καθοδήγηση που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας.

Τέλος, οφείλω να εκφράσω την απέραντη ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου, Δήμητρα και Αθανάσιο για τη συνεχή υποστήριξη και συμπαράστασή τους.

Περίληψη

Τα ενδογενή νοσήματα του μεταβολισμού αποτελούν μια ομάδα σπάνιων νοσημάτων που οφείλονται σε γενετικές μεταλλάξεις και οδηγούν σε ανεπάρκεια ή διαταραχή της φυσιολογικής λειτουργίας ενζύμων ή πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον μεταβολισμό. Η ατελής δράση των ενζύμων σε κάθε περίπτωση μπορεί να οδηγήσει σε δυσλειτουργία στον μεταβολισμό των πρωτεϊνών, των λιπιδίων ή των υδατανθράκων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση μορίων σε τοξικές για τον οργανισμό συγκεντρώσεις.

Η έγκαιρη διάγνωση των νοσημάτων αυτών είναι πολύ σημαντική προκειμένου να αποφευχθεί όσο το δυνατόν η ανάπτυξη σοβαρότερων συμπτωμάτων και να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα πρόωρου θανάτου στα νεογνά. Η μεταβολομική αποτελεί ιδανικό εργαλείο για την μελέτη των ενδογενών νοσημάτων του μεταβολισμού. Ειδικότερα, η φασματοσκοπία NMR των βιολογικών υγρών είναι κατάλληλη για newborn screening καθώς, παρέχει το μεταβολικό προφίλ του εκάστοτε βιολογικού υγρού εντοπίζοντας μη εκλεκτικά το σύνολο τόσο των γνωστών όσο και των άγνωστων (μη αναμενόμενων) μεταβολιτών, γρήγορα και με υψηλή επαναληψιμότητα.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε 1) Βιβλιογραφική ανασκόπηση σε ορισμένα από τα συχνότερα ενδογενή νοσήματα του μεταβολισμού που έχουν μελετηθεί με την χρήση της φασματοσκοπίας NMR και 2) Διερεύνηση με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ ενδογενών νοσημάτων του μεταβολισμού σε παιδιά που παρακολουθούνται στην Παιδιατρική Κλινική του ΠΓΝΙ. Η μελέτη περιλάμβανε νέες διαγνώσεις νοσημάτων καθώς και παρακολούθηση ασθενών που έχουν ήδη διαγνωστεί. Συλλέχθηκαν δείγματα ούρων τα οποία αναλύθηκαν με φασματοσκοπία NMR προκειμένου να ταυτοποιηθούν και να ποσοτικοποιηθούν οι μεταβολίτες που εμφανίζονται αυξημένοι, μειωμένοι ή απουσιάζουν στο εκάστοτε ενδογενές νόσημα του μεταβολισμού.

Τα περιστατικά που μελετήθηκαν αφορούν 1 ασθενή που πάσχει από την νόσο Hunter, 1 ασθενή που πάσχει από την νόσο Morquio, 2 ασθενείς που πάσχουν από την νόσο Pompe, 1 ασθενή με Τυροσιναιμία τύπου II, 1 ασθενή χωρίς διάγνωση ενώ συμπεριλαμβάνονται και δύο περιστατικά που μελετήθηκαν στο παρελθόν από το εργαστήριο μας που αφορούν 1 ασθενή με Τριμεθυλαμιουρία και 1 ασθενή με

Σιτοστερολαιμία αντίστοιχα. Όσον αφορά τα νοσήματα της Τυροσιναιμίας τύπου II, της Τριμεθυλαμινουρίας και της Σιτοστερολαιμίας, το $^1\text{H-NMR}$ αποτελεί ένα εξαιρετικό εργαλείο για την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών που εκκρίνονται σε μη φυσιολογικό βαθμό στα βιολογικά υγρά των ασθενών. Ειδικότερα, για την Τυροσιναιμία τύπου II, ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν οι μεταβολίτες 4-υδροξυφαινυλακετοξικό, 4-υδροξυφαινυλγαλακτικό, η Ν-ακετυλτυροσίνη καθώς και η τυροσίνη που αποτελούν χαρακτηριστικά ευρήματα για την συγκεκριμένη νόσο σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία. Στην περίπτωση της Τριμεθυλαμινουρίας αντίστοιχα ποσοτικοποιήθηκαν τα τριμεθυλαμινο-N-οξείδιο (TMAO) και η τριμεθυλαμίνη (TMA), ενώ υπολογίστηκε ο λόγος TMA /TMA +TMAO από τα οποία προέκυψε και η διάγνωση σε συμφωνία με την βιβλιογραφία. Ταυτόχρονα στην περίπτωση της Σιτοστερολαιμίας ποσοτικοποιήθηκαν σημαντικές ποσότητες φυτοστερολών, κυρίως β-σιτοστερόλης, που αποτελούν χαρακτηριστικές της νόσου. Έτσι, καθίσταται δυνατή η διάγνωση των νοσημάτων αυτών με την χρήση της φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$.

Τα νοσήματα Hunter, Morquio και Pompe ανήκουν στα νοσήματα λυσοσωμικής αποθήκευσης και ως εκ τούτου οι μεταβολίτες που εκκρίνονται στα ούρα των ασθενών έχουν σύνθετη χημική δομή και απαιτείται ειδική κατεργασία του δείγματος προκειμένου να ταυτοποιηθούν και να ποσοτικοποιηθούν. Κατ' επέκταση το $^1\text{H-NMR}$ που εφαρμόζεται στα ούρα χωρίς να έχει προηγηθεί επεξεργασία του δείγματος δεν δύναται να χρησιμοποιηθεί σαν εργαλείο για την διάγνωση των νοσημάτων αυτών. Στην περίπτωση του περιστατικού που δεν έχει διαγνωσθεί, με την χρήση του $^1\text{H-NMR}$ καταγράφηκε το μεταβολικό προφίλ των ούρων του ασθενή, από το οποίο προκύπτουν αυξημένοι μεταβολίτες που δεν εμφανίζονται φυσιολογικά, όπως το αιθυλομαλονικό οξύ. Ωστόσο προκειμένου να γίνει μια ασφαλής διάγνωση απαιτείται συνεκτίμηση των υπόλοιπων βιοχημικών αναλύσεων και της κλινικής εικόνας του ασθενή και ενδεχομένως η πραγματοποίηση περισσότερων και πιο εξειδικευμένων εξετάσεων, όπως είναι το προφίλ ακυλοκαρνιτίνης. Σε κάθε περίπτωση με την χρήση του $^1\text{H-NMR}$ προέκυψε το μεταβολικό προφίλ των ασθενών, όπου ταυτοποιήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε ένας σημαντικός αριθμός μεταβολιτών.

Abstract

Inborn Errors of Metabolism (IEMs) are a group of rare diseases, caused by genetic mutations that lead to a deficiency or a disruption of the normal function of enzymes or proteins involved in the human metabolism. Incomplete enzyme activity may lead to a disruption in the metabolism of proteins, lipids or carbohydrates. This results in the accumulation of small molecules, which cause the intoxication of patients.

Early diagnosis is crucial in order to deescalate the presentation of more severe symptoms and to minimize the possibility of premature death in newborns. Metabolomics can be a very useful tool for the study of inborn errors of metabolism. NMR spectroscopy in particular, is recommended for newborn screening, since it can provide a metabolic profile for each biological fluid by non-targeted detection of known and unknown (unexpected) metabolites in a quick and easily repeatable manner.

In the present thesis were carried out: 1) A literature review on some of the most common inborn errors of metabolism that have been studied with NMR spectroscopy and 2) An investigation, with ¹H-NMR spectroscopy, of IEMs in children attending the Pediatric Clinic of the University's General Hospital of Ioannina. The study included new diagnoses as well as follow-up of previously diagnosed patients. Urine samples were collected and analyzed by NMR spectroscopy in order to identify and quantify metabolites that appear increased, decreased or absent in each case.

The cases we studied include: 1 patient suffering from Hunter's disease, 1 patient suffering from Morquio's disease, 2 patients suffering from Pompe's disease, 1 patient with Tyrosinemia type II, 1 undiagnosed patient while also included are two cases previously studied in our lab, which involve 1 patient with Trimethylaminuria and 1 patient with Sitosterolemia respectively. Regarding the Tyrosinemia type II, Trimethylaminuria and Sitosterolemia, ¹H-NMR is an excellent tool for the identification and quantification of metabolites that are secreted in abnormal levels in the biological fluids of patients. For Tyrosinemia type II in particular, the metabolites 4-Hydroxyphenylacetate, 4-Hydroxyphenyllactate, N-Acetyltyrosine and Tyrosine were detected and quantified, which are typical findings for Tyrosinemia type II according to literature. In the case of Trimethylaminuria, trimethylamine-N-oxide (TMAO) and trimethylamine (TMA) were quantified and the ratio TMA /TMA +TMAO was calculated, from which the diagnosis was derived, in agreement with

literature. In the case of Sitosterolemia, significant amounts of phytosterols, mainly β -sitosterol, were quantified, which are characteristic for the disease. Thus, it becomes possible to diagnose these diseases using $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy.

Hunter, Morquio and Pompe diseases are lysosomal storage diseases and therefore the metabolites excreted in the urine of patients have a complex chemical structure and require processing of the sample to detect and quantify them. Consequently, $^1\text{H-NMR}$ applied to urine of these patients without prior treatment of the sample cannot be used for the diagnosis of these diseases. In the case of the undiagnosed case, $^1\text{H-NMR}$ provided the metabolic profile of the patient's urine, yielding elevated levels of metabolites, that do not occur normally in healthy subjects, such as ethylmalonic acid. However, in order to make a safe diagnosis, it is necessary to take into account further biochemical analyses and the clinical presentation of the patient and possibly perform more specific tests, such as acylcarnitine profiling. In each case, the metabolic profile of the patients' urine was obtained, using $^1\text{H-NMR}$, where a significant number of metabolites were detected and quantified.

Εισαγωγή

Κεφάλαιο 1: Ενδογενή νοσήματα του μεταβολισμού

Ως ενδογενή νοσήματα του μεταβολισμού (Inborn Errors of Metabolism, IEMs) ορίζονται οι κληρονομούμενες γενετικές ασθένειες που προκύπτουν από την ανεπάρκεια/διαταραχή της φυσιολογικής λειτουργίας ενός ενζύμου ή μιας λειτουργικής πρωτεΐνης που οδηγεί στη δυσλειτουργία μιας μεταβολικής οδού. Στις περισσότερες περιπτώσεις, είναι αποτέλεσμα των μεταλλάξεων στα αντίστοιχα γονίδια που κωδικοποιούν αυτά τα ένζυμα ή τις πρωτεΐνες. Η μειωμένη δραστηριότητα συγκεκριμένων ενζύμων σε μια πορεία του μεταβολισμού, έχει ως αποτέλεσμα είτε τη συσσώρευση υποστρωμάτων είτε την ανεπάρκεια προϊόντων του μονοπατιού ή και τα δύο.

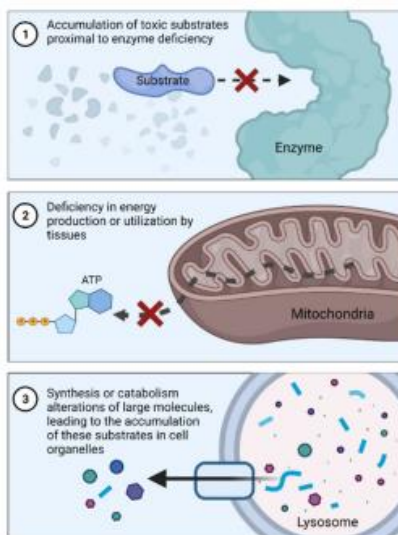
Ορισμένα από τα συσσωρευμένα υποστρώματα μπορεί να συμμετέχουν σε εναλλακτικές δευτερεύουσες οδούς με αποτέλεσμα να προκύψουν ασυνήθιστοι μεταβολίτες. Οι παθολογικές καταστάσεις συνήθως οφείλονται στην τοξική δράση των συσσωρευμένων μεταβολιτών και μπορούν να εμφανιστούν κλινικά με ποικίλους τρόπους. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η μη έγκαιρη διάγνωση των ενδογενών νοσημάτων μπορεί να οδηγήσει τους ασθενείς σε κώμα ή ακόμη και θάνατο. Τα αρχικά κλινικά συμπτώματα μπορεί να εμφανιστούν σε οποιαδήποτε φάση της ζωής του ατόμου, από την προγεννητική ανάπτυξη έως την ενηλικίωση. Η επιρροή από το περιβάλλον και κυρίως η διατροφή καθορίζουν τον φαινότυπο του ασθενούς.

Η εκδήλωση ενός ενδογενούς νοσήματος του μεταβολισμού είναι ποικιλόμορφη, ακόμα και για την ίδια ασθένεια. Ένας ενιαίος γονότυπος μπορεί να εκδηλωθεί με περισσότερους από έναν φαινότυπους, καθιστώντας έτσι δύσκολη την ταξινόμηση των νοσημάτων. Δεν υπάρχει καθολικό σύστημα ταξινόμησης[1], [2]. Όσον αφορά την παθοφυσιολογία τους μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις, διαγνωστικά χρήσιμες, κατηγορίες οι οποίες φαίνονται και στην εικόνα 1 από τους Solares et al. :

- I. Διαταραχές που προκαλούν βλάβες από τοξική συνάθροιση ουσιών
- II. Διαταραχές που σχετίζονται με τον ενεργειακό μεταβολισμό
- III. Διαταραχές που σχετίζονται με σύνθετα μόρια

Inborn Errors of Metabolism (IEM) Nosological Classification

- 1 Intoxication Disorders
- 2 Energy Metabolism Disorders
- 3 Storage Diseases



Εικόνα 1: Οι τρεις κατηγορίες IEMs με βάση την παθοφυσιολογία τους

I. Διαταραχές που προκαλούν βλάβες από τοξική συνάθροιση ουσιών

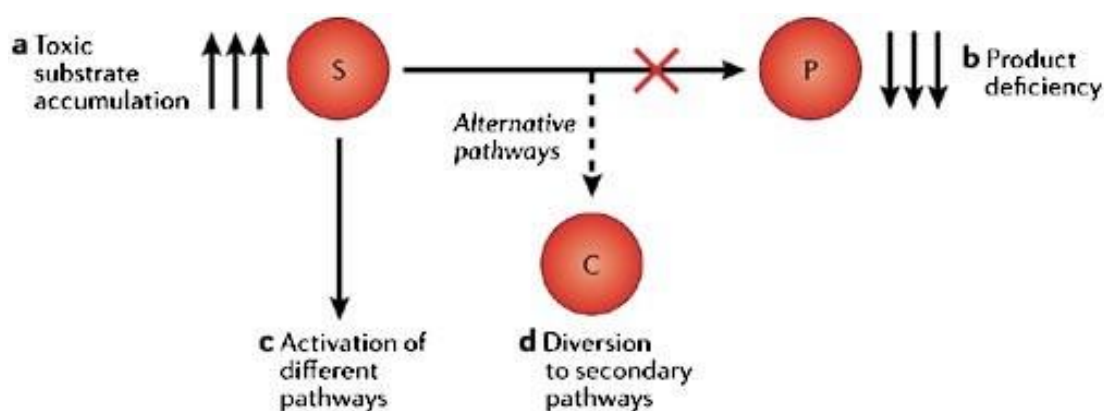
Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει τα ενδογενή νοσήματα του μεταβολισμού που οδηγούν σε συσσώρευση μικρών μορίων, τοξικών για τον οργανισμό, εξαιτίας της ενζυμικής δυσλειτουργίας. Αυτό μπορεί επίσης να έχει ως αποτέλεσμα την συμμετοχή των μορίων αυτών σε διαφορετικά βιοχημικά μονοπάτια, όπως φαίνεται και στην εικόνα 2, με αποτέλεσμα να προκύπτουν ασυνήθιστοι και τοξικοί μεταβολίτες. Σε αυτή την ομάδα ανήκουν οι διαταραχές του καταβολισμού των αμινοξέων, όπως η φαινυλκετονουρία, η νόσος ούρων σιροπιού σφενδάμου, η ομοκυστινουρία, τυροσιναιμία κ.α.. Επίσης οι περισσότερες οξέωσεις εξαιτίας της συσσώρευσης οργανικών οξέων, όπως το μεθυλομηλονικό ή το προπιονικό οξύ. Στην κατηγορία αυτή κατατάσσονται ακόμα οι συγγενείς ανωμαλίες του κύκλου της ουρίας, όπως η ατελής δράση της τρανσκαρβαμύλασης της ορνιθίνης, η δυσανεξία στα σάκχαρα όπως η γαλακτοζαιμία και η κληρονομική δυσανεξία στη φρουκτόζη, καθώς και η δηλητηρίαση από αυξημένη συγκέντρωση μετάλλων, όπως η νόσος Wilson, η νόσος Menkes, και η αιμοχρωμάτωση, ενώ στην ίδια κατηγορία ανήκουν και οι πορφυριναιμίες.

Πίνακας 1: Διαταραχές του μεταβολισμού που οδηγούν σε συσσώρευση μικρών μορίων που ασκούν τοξική δράση και χαρακτηριστικά παραδείγματα νοσημάτων

Διαταραχή μεταβολισμού

Νοσήματα

Αμινοξέα	φαινυλκετονουρία, νόσος ούρων σιροπιού σφενδάμου, ομοκυστινουρία, τυροσιναιμία κ.α.
Κύκλος Ουρίας	Ατελής δράση της τρανσκαρβαμυλάσης της ορνιθίνης
Οργανικά οξέα	Μεθυλομαλονικό, ισοβαλερικό, προπιονικό οξύ κ.α.
Σάκχαρα	Γαλακτοζαιμία, η κληρονομική δυσανεξία στη φρουκτόζη κ.α.
Μέταλλα	Νόσος Wilson, Νόσος Menkes, αιμοχρωμάτωση, πορφυριναιμίες



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Genetics

Εικόνα 2: Πιθανοί μηχανισμοί που οδηγούν σε τοξική συνάθροιση ουσιών

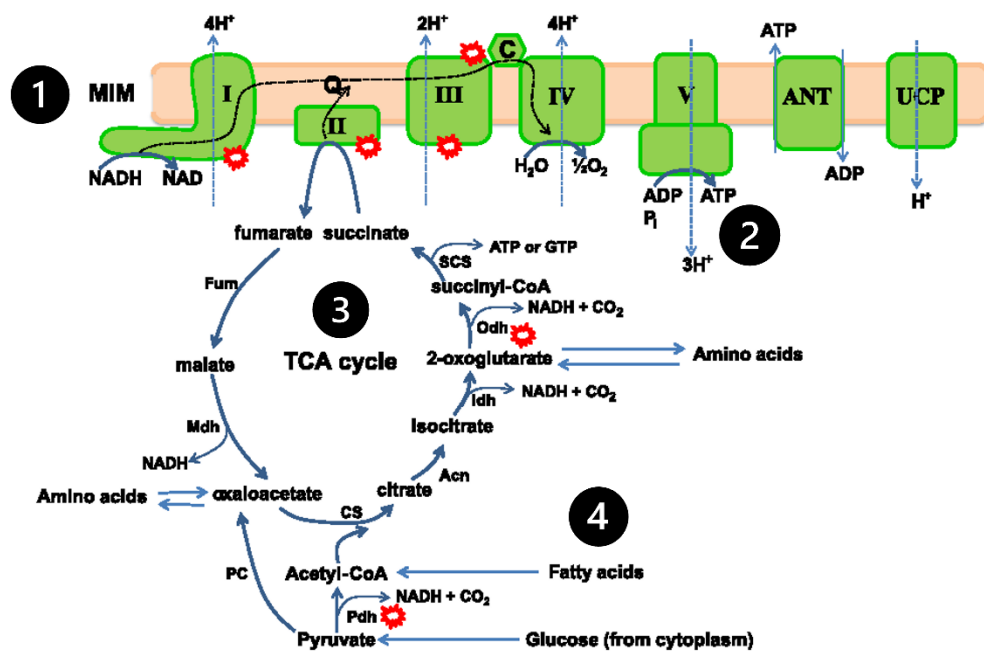
Όλες οι καταστάσεις αυτής της ομάδας παρουσιάζουν κλινικές ομοιότητες. Συγκεκριμένα δεν παρεμβαίνουν στην ανάπτυξη του εμβρύου. Ενώ, εμφανίζονται αρχικά χωρίς συμπτώματα και κλινική εικόνα που να υποδηλώνει την παρουσία τοξικών μορίων. Η εκδήλωση των συμπτωμάτων μπορεί να είναι οξεία, όπου τα συμπτώματα περιλαμβάνουν εμετό, κώμα, ηπατική ανεπάρκεια, θρομβοεμβολικές επιπλοκές, ή χρόνια, όπου εμφανίζεται αναπτυξιακή καθυστέρηση, μυοκαρδιοπάθεια κ.λπ. Οι συνθήκες που μπορούν να προκαλέσουν οξείες μεταβολικές εκδηλώσεις περιλαμβάνουν εκτεταμένο καταβολισμό, πυρετό, κάποια ταυτόχρονη ασθένεια και η πρόσληψη συγκεκριμένων τροφών, διαφορετικές για την εκάστοτε ασθένεια.

Η διάγνωση είναι απλή και πιο συχνά βασίζεται σε ανίχνευση και ποσοτικοποίηση στο πλάσμα και τα ούρα των ασθενών, αμινοξέων, οργανικών οξέων καθώς και ακυλοκαρντινών. Οι περισσότερες από αυτές τις διαταραχές είναι

θεραπεύσιμες και απαιτούν εξάλειψη της ουσίας που ασκεί τοξική δράση. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με ειδική διαίτα, εξωσωματικές διαδικασίες απομάκρυνσης ή φάρμακα με την ικανότητα να δεσμεύουν την ουσία και να ενισχύουν την αποβολή της, όπως είναι η καρνιτίνη, το βενζοϊκό νάτριο, η πενικιλαμίνη κ.λπ.[3].

II. Διαταραχές που σχετίζονται με τον ενεργειακό μεταβολισμό

Η κατηγορία αυτή αποτελείται από ενδογενή νοσήματα του μεταβολισμού που οφείλονται, τουλάχιστον εν μέρει, σε ανεπάρκεια στην παραγωγή ενέργειας ή την αξιοποίηση της στο ήπαρ, στο μυοκάρδιο, στους μύς, στον εγκέφαλο ή σε άλλους ιστούς. Αυτή η ομάδα μπορεί να χωριστεί σε μιτοχονδριακές και κυτταροπλασματικές ενεργειακές δυσλειτουργίες. Στην εικόνα 3 φαίνονται τα κυριότερα βιοχημικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται τα μιτοχόνδρια.



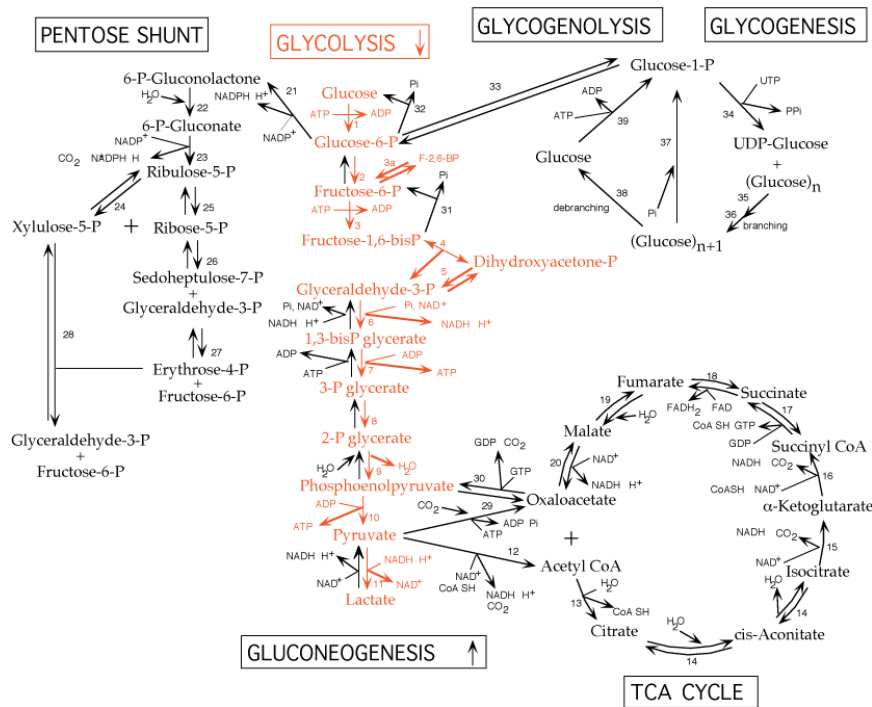
Εικόνα 3: Κυριότερα βιοχημικά μονοπάτια που εμπλέκονται τα μιτοχόνδρια. 1- Μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα 2- Οξειδωτική φωσφορυλίωση 3- Κύκλος κιτρικού οξέος 4- β-οξείδωση λιπαρών οξέων

Ειδικότερα τα μονοπάτια αυτά είναι η μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα, η οξειδωτική φωσφορυλίωση, ο κύκλος του κιτρικού οξέος και η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων. Η μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα πραγματοποιείται, στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου, από μια σειρά πρωτεϊνικών συμπλόκων. Ο ρόλος της είναι η μεταφορά ηλεκτρονίων, με μια σειρά διαδοχικών αντιδράσεων, στο τελικό μόριο αποδέκτη που είναι το οξυγόνο. Η διαδικασία αυτή οδηγεί σε παραγωγή ATP. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι μια διαδικασία παραγωγής ATP από ADP

και φωσφορικές ομάδες, με αξιοποίηση της ενέργειας που προκύπτει από την μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα. Ο κύκλος του κιτρικού οξέος ή κύκλος Krebs, ξεκινάει με την μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος, που προκύπτει κατά την διαδικασία της γλυκόλυσης, σε ακέτυλο συνένζυμο Α. Το ακέτυλο συνένζυμο Α εισέρχεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος από τον οποίο προκύπτουν ATP και CO₂. Η β-οξειδωση των λιπαρών οξέων είναι η διαδικασία αποικοδόμησης των λιπαρών οξέων σε ακέτυλο συνένζυμο Α, το οποίο επίσης εισέρχεται στον κύκλο κιτρικού οξέος για την παραγωγή ATP. Έτσι το μιτοχόνδριο παράγει με μια σειρά διαδοχικών βημάτων ATP, που αποτελεί την βασική πηγή ενέργειας του κυττάρου[4].

Διαταραχή της φυσιολογικής λειτουργίας κάποιου ενζύμου που εμπλέκεται στα παραπάνω βιοχημικά μονοπάτια μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση του αντίστοιχου ενδογενούς νοσήματος του μεταβολισμού. Οι μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες είναι ως επί το πλείστον ανίατες. Τα κοινά συμπτώματα των ασθενών της συγκεκριμένης κατηγορίας περιλαμβάνουν υπογλυκαιμία, υπεργαλακταϊμία, διόγκωση του ήπατος, υποτονία, μυοπάθεια, μυοκαρδιοπάθεια, μειωμένη ανάπτυξη, καρδιακή ανεπάρκεια, επιρροή του κυκλοφορικού συστήματος, αιφνίδιο θάνατο στη βρεφική ηλικία καθώς και επιρροή του εγκεφάλου [3], [5].

Όσον αφορά το κυτταρόπλασμα, παρέχει ATP και NADH στο μιτοχόνδριο για την παραγωγή ενέργειας. Αυτό πραγματοποιείται κατά την διαδικασία της γλυκόλυσης, η οποία φαίνεται και στην εικόνα 4. Κατά την γλυκόλυση τα μόρια της γλυκόζης αποικοδομούνται διαδοχικά και καταλήγουν σε πυροσταφυλικό οξύ. Το πυροσταφυλικό οξύ μεταβολίζεται φυσιολογικά σε ακέτυλο συνένζυμο Α ενώ σε αναερόβιες συνθήκες παράγεται γαλακτικό οξύ. Η αντίστροφη διαδικασία της γλυκόλυσης ονομάζεται γλυκονεογένεση ενώ το γλυκογόνο αποτελεί ένα πολυμερές της γλυκόζης που χρησιμοποιείται από τους οργανισμούς ως αποθήκη ενέργειας. Η αποικοδόμηση του σε γλυκόζη (γλυκογονόλυση) ή η σύνθεση του (γλυκογένεση) εξαρτάται από τα επίπεδα γλυκόζης του αίματος και ρυθμίζεται σε κάθε περίπτωση από την γλυκαγόνη ή την ινσουλίνη αντίστοιχα. Ο κύκλος των φωσφορικών πεντοζών λαμβάνει χώρα ταυτόχρονα με την γλυκόλυση και παράγει NADPH που αξιοποιείται από το κύτταρο ως αναγωγικός παράγοντας, καθώς και χρήσιμα για το κύτταρα σάκχαρα όπως η φωσφορική-5-ριβόζη, πρόδρομο για την σύνθεση νουκλεοτιδίων[6].



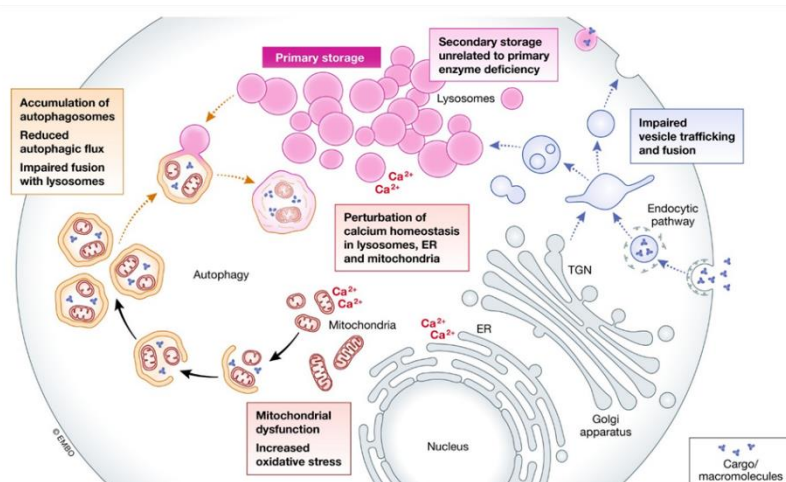
Εικόνα 4: Βιοχημικά μονοπάτια του κυτταροπλάσματος. Κύκλος φωσφορικών πεντοζών, γλυκόλυση, γλυκονεογένεση, γλυκογονόλυση, γλυκογονογένεση

Οι διαταραχές της φυσιολογικής λειτουργίας του κυτταροπλάσματος που επηρεάζουν τον ενεργειακό μεταβολισμό, εντοπίζονται στην διαδικασία της γλυκόλυσης, του μεταβολισμού του γλυκογόνου και της γλυκονεογένεσης (θεραπεύσιμες διαταραχές), διαταραχές του μεταβολισμού της κρεατίνης (εν μέρει θεραπεύσιμη) και του κύκλου των φωσφορικών πεντοζών (μη θεραπεύσιμη). Η διάγνωση διαταραχών αυτής της κατηγορίας είναι δύσκολη και βασίζεται σε εξειδικευμένες εξετάσεις, ενζυμικές αναλύσεις που απαιτούν βιοψία ή κυτταρική καλλιέργεια καθώς και σε μοριακές αναλύσεις [3].

III. Διαταραχές που σχετίζονται με σύνθετα μόρια

Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει δυσλειτουργίες στη σύνθεση, την αναδιαμόρφωση, την μεταφορά και την αποικοδόμηση των κυτταρικών οργανιδίων, δηλαδή των λυσοσωμάτων, των υπεροξειδοσωμάτων, του ενδοπλασματικού δικτύου, της συσκευής Golgi και των μιτοχονδρίων καθώς και σύνθετων μορίων. Στην εικόνα 4 φαίνονται τα παραπάνω οργανίδια, ενώ επισημαίνονται ορισμένες δυσλειτουργίες, όπως είναι το αυξημένο οξειδωτικό στρες σε περίπτωση διαταραχής των μιτοχονδρίων, η διαταραχή της φυσιολογικής λειτουργίας των λυσοσωμάτων, διαταραχή της

ομοιόστασης των ιόντων ασβεστίου στο εσωτερικό του κυττάρου καθώς και δυσλειτουργία του μονοπατιού της ενδοκύττωσης.



Εικόνα 5: Κυτταρικά οργανίδια και ορισμένες βασικές διαταραχές αυτής της κατηγορίας. Αυξημένο οξειδωτικό στρες σε περίπτωση διαταραχής των μιτοχονδρίων, διαταραχή της φυσιολογικής λειτουργίας των λυσοσωμάτων, διαταραχή της ομοιόστασης των ιόντων ασβεστίου στο εσωτερικό του κυττάρου καθώς και δυσλειτουργία του μονοπατιού της ενδοκύττωσης

Όλες οι διαταραχές της λυσοσωμικής αποθήκευσης (LSD), οι διαταραχές των υπεροξειδοσωμάτων (PBD), οι διαταραχές της ενδοκυτταρικής διακίνησης και επεξεργασίας και οι συγγενείς διαταραχές της γλυκοζυλίωσης (CDG) ανήκουν σε αυτή την ομάδα. Εκτός από αυτές τις γνωστές διαταραχές, πρόσφατα περιγράφηκε μια κατηγορία ενδογενών νοσημάτων του μεταβολισμού που περιλαμβάνει τη σύνθεση την αναδιαμόρφωση και τον καταβολισμό σύνθετων λιπιδίων και λιπαρών οξέων. Περιλαμβάνει μεταβολικές δυσλειτουργίες φωσφολιπιδίων, τριγλυκεριδίων, σφιγγολιπιδίων, ισοπρενοειδών όπως η χοληστερόλη και η ουβικινόνη καθώς και σύνθετων λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας (VLCFA), λιπαρών αλκοολών, λιπαρών οξέων διακλαδισμένης αλυσίδας, καθώς και εικασανοειδών που προέρχονται από αραχιδονικό οξύ όπως οι προσταγλανδίνες και τα λευκοτριένια. Τα συμπτώματα είναι συνήθως μόνιμα, εμφανίζονται προοδευτικά, είναι ανεξάρτητα των συνθηκών διαβίωσης του ασθενή (ακόμη και σε εμφάνιση οξείας κρίσης) και δεν σχετίζονται με την πρόσληψη τροφής.

Είναι αξιοσημείωτο ότι, τα νοσήματα αυτά παρουσίασαν ελπιδοφόρα αποτελέσματα σε δοκιμές χορήγησης της ελλείπουσας ένωσης, ωστόσο μέχρι στιγμής ένας μικρός αριθμός αυτών των διαταραχών φαίνεται να είναι θεραπεύσιμος. Παρ' όλα αυτά, η θεραπεία αντικατάστασης ενζύμων καθώς και η μείωση των διαθέσιμων

υποστρωμάτων εφαρμόζονται σε διάφορα νοσήματα λυσοσωμικής αποθήκευσης. Η ομαδοποίηση ασθενών μπορεί να παρέχει χρήσιμους αλγορίθμους για την διάγνωση αλλά και την μελέτη των ενδογενών νοσημάτων του μεταβολισμού[3].

Γενετική Προσέγγιση των Ενδογενών Νοσημάτων του Μεταβολισμού

Όλα τα IEMs σχετίζονται με δυσλειτουργία σε κάποιο μεταβολικό μονοπάτι συνεπώς, θα μπορούσε η κατηγοριοποίηση τους να γίνει με βάση το μονοπάτι στο οποίο εμπλέκονται. Ειδικότερα μελετήθηκαν, από τους S. Sahoo et al., 235 χαρακτηρισμένα IEMs τα οποία ταξινομήθηκαν σε 16 κύρια μεταβολικά μονοπάτια. Τα περισσότερα νοσήματα, 65 από αυτά συγκεκριμένα, σχετίζονται με τον μεταβολισμό των υδατανθράκων, 54 IEMs οφείλονται σε δυσλειτουργία στον μεταβολισμό των αμινοξέων και 51 αφορούν τον μεταβολισμό των λιπιδίων. Τα 235 IEMs αυτά, οφείλονται σε 250 δυσλειτουργικά γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν ένζυμα που καταλύουν συνολικά 1067 αντιδράσεις. Η γονιδιακή ανάλυση φαίνεται να μπορεί να διευκολύνει την αξιολόγηση της συμβολής των ενδογενών νοσημάτων του μεταβολισμού στον φαινότυπο των ασθενών σε παγκόσμια κλίμακα.

Τα IEMs φαίνεται να ακολουθούν συγκεκριμένα πρότυπα κληρονομικότητας. Ορισμένα νοσήματα δύναται να κληρονομούνται με παραπάνω από έναν τρόπους. Ειδικότερα, ανήκουν σε πέντε διαφορετικούς τύπους κληρονόμησης:

- i. Αυτοσωμική υπολειπόμενη
- ii. Αυτοσωμική επικρατούσα
- iii. Αυτοσωμική υπολειπόμενη ή αυτοσωμική επικρατούσα
- iv. X-φυλοσύνδετη ή αυτοσωμική επικρατούσα
- v. X-φυλοσύνδετη επικρατούσα ή υπολειπόμενη.

Η πλειοψηφία των νοσημάτων παρουσιάζονται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο κληρονόμησης. Το εκάστοτε νόσημα μπορεί να εκδηλωθεί με διαφορετικό φαινότυπο για κάθε ασθενή. Οι διαφορετικοί αυτοί φαινότυποι προκύπτουν λόγω τροποποιητικών γονιδίων, αλληλικών παραλλαγών, πολύπλοκων γενετικών και περιβαλλοντικών αλληλεπιδράσεων ή περιβαλλοντικών παραγόντων.

Πραγματοποιήθηκαν γονιδιακές μελέτες προκειμένου να προσδιοριστεί το σύνολο των αντιδράσεων που σχετίζονται με τα IEMs καθώς και η συσχέτιση των αντιδράσεων αυτών μεταξύ τους, στις διάφορες ασθένειες. Διαπίστωσαν πως έξι ασθένειες σχετίζονται με περισσότερες από πενήντα διαφορετικές αντιδράσεις,

επηρεάζοντας έτσι σε σημαντικό βαθμό το σύνολο του μεταβολισμού, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν σοβαρότερο φαινότυπο εδώ αναφερεσαι σε σχέση γονιδίων και αντιδράσεων και όχι πολυπαραγοντικών ασθενειών). Ταυτοποιήθηκαν επίσης 53 ζεύγη IEMs στα οποία επηρεάζεται μια κοινή μεταβολική αντίδραση. Συγχρόνως, έξι ζεύγη νοσημάτων έχουν κοινές όλες τις μεταβολικές τους αντιδράσεις και εμφανίζονται με παρόμοια κλινικά χαρακτηριστικά, καθιστώντας την διάκριση μεταξύ τους δυσκολότερη. Η μελέτη της συσχέτισης μεταξύ των IEMs όχι μόνο μας επιτρέπει να προσδιορίσουμε τις κοινές αντιδράσεις μεταξύ τους, αλλά βοηθά συγχρόνως στη συστηματική ταυτοποίηση των IEMs, που συνδέονται μέσω κοινών μεταβολιτών. Η ύπαρξη κοινών αντιδράσεων μεταξύ των νοσημάτων μπορεί επίσης να υποδεικνύει συννοσηρότητα[7].

Κλινική εικόνα

Συνήθως πραγματοποιείται προσυμπτωματικός έλεγχος νεογνών στον γενικό πληθυσμό και ειδικότερα σε οικογένειες με γενετική προδιάθεση, για να διαπιστωθεί η ύπαρξη κάποιου ενδογενούς νοσήματος. Ωστόσο, υπάρχουν τέσσερις ομάδες κλινικών συμπτωμάτων οι οποίες προϋδεάζουν τον ιατρό για την ύπαρξη κάποιας μεταβολικής διαταραχής. Ειδικότερα:

1. Πρώιμα συμπτώματα στην προγεννητική και νεογνική περίοδο.
2. Μεταγενέστερες οξείες και επαναλαμβανόμενες εκδηλώσεις συμπτωμάτων όπως κώμα, αταξία, έμετος, οξέωση αίματος, απουσία ανταχής κατά την άσκηση, καρδιακή, νεφρική, ηπατική ή άλλη σπλαχνική ανεπάρκεια.
3. Χρόνια και προοδευτικά νευρολογικά συμπτώματα όπως αναπτυξιακή καθυστέρηση, νοητική καθυστέρηση, επιληψία, νευρολογική επιδείνωση, ψυχιατρικά συμπτώματα.
4. Ειδικές και μόνιμες δυσλειτουργίες οργάνων ή/και συστημάτων.

Παρ' όλα αυτά η εκδήλωση ενός IEM μπορεί να γίνει και αργότερα κατά την παιδική ηλικία ή ακόμα και σε ενήλικες με την μορφή κάποιας οξείας ανεξήγητης, υποτροπιάζουσας ή επιμένουσας κρίσης σε οποιαδήποτε ηλικία. Πράγματι, σε περίπου 50% των ασθενών με IEM, η εμφάνιση της νόσου γίνεται μεταγενέστερα από την βρεφική ηλικία. Στις περιπτώσεις αυτές, η περίοδος χωρίς εμφάνιση συμπτωμάτων είναι συχνά μεγαλύτερη από 1 έτος και μπορεί να επεκταθεί μέχρι και προχωρημένη παιδική ηλικία, την εφηβεία ή ακόμη και την ενηλικίωση. Πολλές οξείες εκδηλώσεις

κληρονομικών διαταραχών, που έχουν καθυστερημένη εμφάνιση, προηγούνται των πρώιμων χαρακτηριστικών συμπτωμάτων και μπορεί να έχουν αγνοηθεί ή παρερμηνευτεί. Χρόνια διατροφικά και γαστρεντερικά ή μυϊκά συμπτώματα μπορούν να προηγούνται ή να συνοδεύουν τα νευρολογικά συμπτώματα.

Τα νευρολογικά συμπτώματα είναι πολύ συχνά στα ενδογενή νοσήματα του μεταβολισμού και περιλαμβάνουν προοδευτική ψυχοκινητική καθυστέρηση, επιληπτικές κρίσεις και μια σειρά νευρολογικών ανωμαλιών, τόσο στο κεντρικό όσο και στο περιφερικό σύστημα, νευροαισθητήριες ανωμαλίες και ψυχιατρικά συμπτώματα. Η τακτική παρακολούθηση των ασθενών καθίσταται δυσκολότερη όταν τα κλινικά ευρήματα δεν είναι ειδικά, όπως αναπτυξιακή καθυστέρηση, μικροκεφαλία, υποτονία ή σπασμοί [3].

Ανάγκη Διάγνωσης – Παρακολούθησης

Παρόλο που όλα τα ενδογενή νοσήματα του μεταβολισμού θεωρούνται μεμονωμένες ως σπάνιες διαταραχές, το συλλογικό τους αντίκτυπο είναι σημαντικό. Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη, υπολογίζεται πως 1 στα 800 νεογνά γεννιέται με κάποιο IEM. Η εμφάνιση κάθε νοσήματος εξαρτάται κυρίως από τη γεωγραφική και εθνική σύνθεση του πληθυσμού. Ο συνολικός αριθμός των διαγνωσμένων νοσημάτων αναμένεται να αυξηθεί λόγω της προόδου στη μοριακή βιολογία καθώς και την ανάπτυξη νέων διαγνωστικών μεθόδων και την επέκταση του νεογνικού ελέγχου.

Τα IEMs αποτελούν σοβαρό πρόβλημα δημόσιας υγείας, καθώς η καθυστερημένη διάγνωση μπορεί να οδηγήσει σε εντατική και μακράς διάρκειας θεραπεία. Έτσι, η έγκαιρη διάγνωση και η άμεση θεραπευτική παρέμβαση είναι ζωτικής σημασίας για την πρόληψη της ανάπτυξης σοβαρών συμπτωμάτων και την ελαχιστοποίηση της πιθανότητας πρόωρου θανάτου. Σύμφωνα με μελέτες, το 0.9 με 6% των πρόωρων θανάτων νεογνών οφείλεται σε κάποιο ενδογενές νόσημα του μεταβολισμού. Ειδικότερα, το φαινόμενο αυτό παρατηρείται συχνότερα σε νοσήματα που σχετίζονται με την μιτοχονδριακή οξείδωση των λιπαρών οξέων, τον κύκλο της ουρίας και οξεώσεις εξαιτίας της παρουσίας οργανικών οξέων.

Η απουσία του κατάλληλου εργαστηριακού ελέγχου καθώς και η εκδήλωση της ασθένειας μετά την ολοκλήρωση του καθιερωμένου ελέγχου αποτελούν κύριες αιτίες πρόωρου θανάτου στα νεογνά, εξαιτίας της παρουσίας κάποιου ενδογενούς νοσήματος του μεταβολισμού. Επιπλέον ο προκαθορισμένος έλεγχος νεογνών που

πραγματοποιείται σε κάθε χώρα διαφέρει, ενώ παρατηρείται και διαφοροποίηση του φαινοτύπου των ασθενών σε κάθε περίπτωση. Έτσι, προτείνεται διεύρυνση των εξετάσεων που πραγματοποιούνται καθώς και η εκτέλεση των εξετάσεων την κατάλληλη χρονική στιγμή[1], [8].

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που καθιστά την διάγνωση και την παρακολούθηση των ενδογενών νοσημάτων του μεταβολισμού απαραίτητες είναι η επιρροή που έχουν στον ενήλικο πληθυσμό. Υπάρχουν περιπτώσεις νοσημάτων τα οποία εκδηλώθηκαν σε μεταγενέστερο στάδιο στην ζωή των ασθενών ακόμα και μετά την ενηλικίωση. Ωστόσο, η συχνότητα του φαινομένου αυτού δεν μπορεί εύκολα να προσδιοριστεί καθώς συχνά δεν εξετάζεται η πιθανότητα ύπαρξης κάποιου IEM στους ενήλικες[3].

Ορισμένα ενδογενή νοσήματα του μεταβολισμού είναι άμεσοι παράγοντες πρόκλησης διανοητικής καθυστέρησης, ενώ άλλα μπορεί να επηρεάσουν την φυσιολογική εγκεφαλική λειτουργία μειώνοντας την ικανότητα του εγκεφαλικού ιστού να αντιμετωπίσει την ασφυξία κατά τη γέννηση, τα εγκεφαλικά τραύματα και τις λοιμώξεις. Η διανοητική καθυστέρηση είναι μια νευροαναπτυξιακή διαταραχή η οποία χαρακτηρίζεται από μειωμένη πνευματική λειτουργία και εμφανίζεται περίπου στο 1-2% του πληθυσμού. Οι ασθενείς έχουν αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα. Μεταξύ 30% και 50% των ασθενών έχουν διανοητική καθυστέρηση άγνωστης αιτιολογίας.

Δεδομένου ότι η διανοητική καθυστέρηση εξ ορισμού εμφανίζεται πριν από την ενηλικίωση, η διαγνωστική αξιολόγηση γίνεται συνήθως στην πρώιμη παιδική ηλικία. Επί του παρόντος, δεν υπάρχουν διεθνείς παραδοχές ή κατευθυντήριες γραμμές σχετικά με το ποιες μεταβολικές δοκιμές θα πρέπει να διενεργούνται σε ενήλικες με απροσδιόριστη διανοητική καθυστέρηση, καθώς οι διαθέσιμες κατευθυντήριες γραμμές επικεντρώνονται στην διαγνωστική διαδικασία στα παιδιά[9].

Διαγνωστική Προσέγγιση

Η πρώιμη διάγνωση μπορεί να αποβεί καίρια για την φροντίδα ή/και την θεραπεία του ασθενή. Κατά την κύηση, η πιθανότητα εμφάνισης των συνδρόμων Down, Edward και Patau μπορεί να εξετασθεί με την πραγματοποίηση υπερηχογραφήματος σε συνδυασμό με εξετάσεις αίματος, ενώ μπορεί να χρειαστεί και κάποια πιο επεμβατική τεχνική, όπως η αμνιοπαρακέντηση, που εγκυμονεί μεγαλύτερο

κίνδυνο αλλά μπορεί να δώσει πιο αξιόπιστα αποτελέσματα. Ένας νέος μη επεμβατικός τρόπος προγεννητικού ελέγχου είναι η πραγματοποίηση εξέτασης αίματος της μητέρας, προκειμένου να βρεθεί εξωκυττάριο ελεύθερο DNA του εμβρύου και να αναλυθεί. Η ανάλυση του γενετικού αυτού υλικού πραγματοποιείται με τεχνική αλληλούχησης του DNA.

Η ανίχνευση συγκεκριμένων μεταβολικών και ενδοκρινικών διαταραχών στον πληθυσμό νεογνών είναι μια σημαντική πτυχή υγειονομικής περίθαλψης που οργανώνεται στον δυτικό κόσμο κυρίως για τη φαινυλκετονουρία (PKU), τον συγγενή υποθυρεοειδισμό και την γαλακτοζαιμία, ενώ υπάρχουν τυποποιημένα τεστ για αιμοσφαιρινοπάθειες όπως η δρεπανοκυτταρική αναιμία. Ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος τύπος δειγμάτων για αυτές τις τεχνικές είναι αποξηραμένες σταγόνες αίματος του νεογέννητου σε χάρτινα φύλλα Guthrie, όπως φαίνεται και στην εικόνα 6. Ωστόσο, ο μεγαλύτερος αριθμός ενδογενών νοσημάτων του μεταβολισμού, πλην των προαναφερθέντων, δεν περιλαμβάνεται στον έλεγχο ρουτίνας και απαιτεί κάποια ειδικότερη εξέταση[10], [11].



Εικόνα 6: Αποξηραμένες σταγόνες αίματος του νεογέννητου σε χάρτινα φύλλα Guthrie

Υπάρχουν τεστ, στα πλαίσια της παρακολούθησης των νεογνών με την συγκεκριμένη τεχνική, τα οποία είναι σε θέση να εντοπίσουν προσυμπτωματικά αρκετά ενδογενή νοσήματα του μεταβολισμού. Βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην διάγνωση και την παρακολούθηση ασθενειών όπως η φαινυλοκετονουρία, ο συγγενής υποθυρεοειδισμός και η κυστική ίνωση. Τα τελευταία χρόνια τα προγράμματα αυτά

έχουν ενισχυθεί με την χρήση του MS/MS. Χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό, με υψηλής απόδοσης διαλογή, ενός ευρέος φάσματος μεταβολιτών, όπως αμινοξέα και ακυλοκαρνιτίνες. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμο στον προσδιορισμό κάποιου συγκεκριμένου μεταβολίτη, όπως η φαινυλαλανίνη στην περίπτωση της φαινυλοκετονουρίας. Ταυτόχρονα το μεγάλο πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι η ικανότητα της να παρέχει ένα ολοκληρωμένο μεταβολικό προφίλ, αντιπροσωπευτικό των μεταβολιτών την στιγμή της λήψης του δείγματος. Το πρόβλημα της τεχνικής αυτής είναι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν το μεταβολικό προφίλ του εκάστοτε ασθενή. Παρατηρείται διαφοροποίηση εξαιτίας της ηλικίας και των συνθηκών σίτισης του ασθενή καθώς και της θερμοκρασίας και του χρόνου αποθήκευσης του δείγματος. Για τον λόγο αυτό κρίνεται αναγκαίο να δημιουργηθεί σε κάθε περίπτωση ένας κατάλληλος αλγόριθμος προκειμένου να πραγματοποιηθεί σωστά η ερμηνεία των αποτελεσμάτων [12].

Το χρώμα καθώς και η οσμή των ούρων μπορούν να παρέχουν διαγνωστικές πληροφορίες για ένα πλήθος IEMs. Μη φυσιολογικές οσμές ούρων μπορούν να ανιχνευθούν σε χαρτί φίλτρου ξήρανσης ή ανοίγοντας ένα δοχείο ούρων το οποίο έχει παραμείνει κλειστό σε θερμοκρασία δωματίου για μερικά λεπτά.

Αν και η συγκέντρωση κετονοσωμάτων στον ορό μπορεί να φτάσει τα 0.5- 1 mmol/l στα πρώιμα στάδια της ζωής του νεογνού, η ακετονουρία, εάν παρατηρηθεί σε ένα νεογέννητο, είναι πάντα μη φυσιολογική και σημαντική ένδειξη μεταβολικού νοσήματος. Τα κετονοσώματα στην κυκλοφορία του αίματος είναι τα 3-ύδροξυβουτυρικό και ακετοξικό οξύ. Η κέτωση είναι μια φυσιολογική απόκριση στην νηστεία και αποτελεί καταβολική κατάσταση. Τα επίπεδα των κετονοσωμάτων στο αίμα εξαρτώνται κυρίως από την παραγωγή τους κατά την κετογένεση, καθώς και από την αξιοποίηση τους από τον οργανισμό κατά την κετόλυση. Μόνιμη ή διαλείπουσα κέτωση μπορεί να παρατηρηθεί σε ποικίλα IEMs.

Η μεταβολική οξέωση που προκύπτει από κάποιο ενδογενές νόσημα του μεταβολισμού μπορεί να οφείλεται σε συσσώρευση, με σταθερό ρυθμό, ανιόντων όπως το γαλακτικό οξύ, τα κετονοσώματα, κάποιο οργανικό οξύ ή ένας συνδυασμός αυτών και συνοδεύεται συνήθως από αυξημένο χάσμα ανιόντων.

Φυσιολογική τιμή pH αίματος δεν αποκλείει την υπεργαλακταιμία, καθώς η ουδετερότητα του pH διατηρείται συνήθως μέχρι τα επίπεδα του ορού να φτάσουν τα

6 mmol/l. Η αμμωνία και το γαλακτικό οξύ πρέπει να παρακολουθούνται εργαστηριακά. Αυξημένα επίπεδα αμμωνίας δύναται να προκαλέσουν αναπνευστική αλκάλωση, ενώ υπεραμμωναιμία με ταυτόχρονη κετοξέωση υποδηλώνει την παρουσία κάποιου οργανικού οξέος. Ωστόσο η υπεραμμωναιμία δύναται να εμφανιστεί και μεμονωμένα. Πρόκειται για μια επικίνδυνη για την ζωή του νεογνού κατάσταση. Υπεραμμωναιμία εμφανίζουν κυρίως οι ασθενείς που πάσχουν από νοσήματα που διαταράσσουν τον κύκλο της ουρίας καθώς και οι ασθενείς με οξέωσεις αίματος. Τα αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος απουσία λοίμωξης ή υποξίας των ιστών είναι ένα σημαντικό κλινικό εύρημα. Ελαφρώς υψηλότερες τιμές παρατηρούνται συχνά σε οργανικές οξέωσεις και σε υπεραμμωναιμίες[3], [13].

Οι μειωμένες συγκεντρώσεις γλυκόζης στο αίμα, που οφείλονται σε κάποιο ενδογενές νόσημα του μεταβολισμού, είναι το κύριο σύμπτωμα σε ασθένειες που επηρεάζουν τον μεταβολισμό των υδατανθράκων ή την οξείδωση των λιπαρών οξέων. Υπεργλυκαιμία μπορεί να είναι σύμπτωμα σε διάφορα IEMs όπως η ανεπάρκεια βήτα-κετοθειολάσης.

Ορισμένα σοβαρότερα συμπτώματα, όπως η μεταβολική οξέωση και ιδιαίτερα η κέτωση, μπορεί να είναι ελαφριά και παροδικά ενώ σε μεγάλο βαθμό σχετίζονται με την συμπτωματική θεραπεία. Συγχρόνως, εξίσου σοβαρά συμπτώματα, όπως η αναπνευστική οξέωση, διαταράσσουν την φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού συνολικά και μπορούν να αποτελέσουν ένδειξη για την παρουσία IEM, όπως στα νοσήματα που σχετίζονται με τον κύκλο της ουρίας[3], [14].

Κρίνεται λοιπόν αναγκαία η ύπαρξη πολλών διαφορετικών αναλυτικών τεχνικών στα διαγνωστικά εργαστήρια. Λόγω του χρόνου και των υλικοτεχνικών περιορισμών, δεν είναι εφικτή η εφαρμογή όλων των διαθέσιμων τεχνικών για τον έλεγχο των ενδογενών νοσημάτων του μεταβολισμού στον εκάστοτε ασθενή. Ως εκ τούτου, στην τρέχουσα κλινική πράξη, η συμπτωματολογία οδηγεί στην επιλογή συγκεκριμένων αναλύσεων για κάθε περίπτωση. Ωστόσο, η στρατηγική αυτή βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στην πληρότητα των κλινικών πληροφοριών που παρέχονται στο εργαστήριο, κατά συνέπεια υπάρχει κίνδυνος ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων στην περίπτωση που μια μεταβολική δοκιμή δεν έχει διενεργηθεί, λόγω ελλιπούς περιγραφής των συμπτωμάτων του ασθενούς. Συγχρόνως, με την διενέργεια ελέγχου που αφορά συγκεκριμένα μόνο νοσήματα, δεν ευνοείται η μελέτη για την ανακάλυψη μη

χαρακτηρισμένων μέχρι στιγμής νοσημάτων. Για τον λόγο αυτό, κρίνεται αναγκαία μια ολιστική προσέγγιση στην ανάλυση των μεταβολιτών για τον έλεγχο των IEMs. Προκειμένου να καλυφθεί αυτή η ανάγκη, αναδύονται τεχνολογίες όπως η προηγμένη φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (MS) η οποία επιτρέπει την μη στοχευμένη διερεύνηση του μεταβολικού προφίλ, δηλαδή μια ολιστική επισκόπηση μικρών μορίων με μάζα <1500 Da σε ένα βιολογικό σύστημα για μια δεδομένη χρονική στιγμή. Η προσέγγιση αυτή σε σχέση με άλλες ολιστικές τεχνικές (-omics), αναφέρεται ως «metabolomics». Η μη στοχευμένη μεταβολομική προσέγγιση εφαρμόζεται ευρέως σε ερευνητικούς τομείς που κυμαίνονται από μελέτη του περιβάλλοντος και τοξικολογία καθώς και ανθρώπινες ασθένειες, από τις οποίες ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές παθήσεις και ο διαβήτης είναι οι πιο ευρέως μελετημένες. Όσον αφορά τα ενδογενή νοσήματα του μεταβολισμού, η μη στοχευμένη μεταβολομική προσέγγιση εφαρμόζεται σταδιακά. Τα τελευταία χρόνια έχει υιοθετηθεί ερευνητικά η εφαρμογή πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίων υψηλής ανάλυσης (NMR) για τη διάγνωση ενδογενών νοσημάτων του μεταβολισμού, γεγονός που οδήγησε στον εντοπισμό αρκετών νέων IEMs[11].

Κεφάλαιο 2: Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού αναπτύχθηκε για πρώτη φορά το 1946 από ερευνητικές ομάδες στο Stanford και στο M.I.T., στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής. Αξιοποιήθηκε στην επιστήμη της Φυσικής και της Χημείας και σήμερα αποτελεί την επικρατέστερη φασματοσκοπία διαθέσιμη στους χημικούς για τον προσδιορισμό της λεπτομερούς χημικής δομής των ουσιών που συνθέτουν. Ένα επίσης ευρέως χρησιμοποιούμενο εργαλείο που αξιοποιεί την τεχνολογία NMR είναι η απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού (MRI). Εφαρμόζεται κατά κόρον στην Ιατρική Ακτινολογία προκειμένου να απεικονιστούν τμήματα μαλακών ιστών στο ανθρώπινο σώμα. Τα τελευταία 40 χρόνια περίπου, το NMR έχει αξιοποιηθεί επίσης στην ανάλυση βιολογικών δειγμάτων[1], [15].

Βασικές Αρχές

Τα κβαντομηχανικά υποατομικά σωματίδια, δηλαδή τα πρωτόνια, τα νετρόνια και τα ηλεκτρόνια, περιστρέφονται γύρω από έναν άξονα (spin). Σε ορισμένα άτομα, όπως π.χ. τα ^{12}C , ^{16}O , ^{32}S , τα spin αλληλοεξουδετερώνονται με αποτέλεσμα ο πυρήνας να μην έχει συνολικό spin. Ωστόσο σε άτομα όπως τα ^{13}C , ^1H , ^{31}P , ^{15}N , ^{19}F , ο πυρήνας διαθέτει συνολικό spin. Η κβαντομηχανική ορίζει πως το πυρηνικό spin

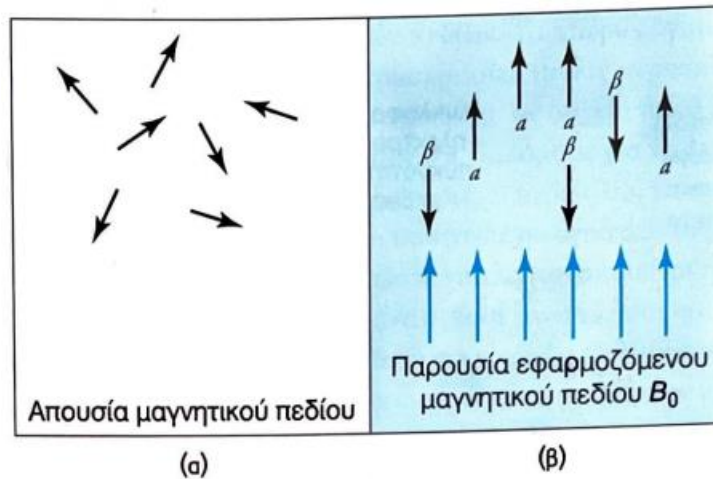
χαρακτηρίζεται από τον κβαντικό αριθμό πυρηνικού spin (I). Η ύπαρξη του spin ενός πυρήνα αποτελεί βασική προϋπόθεση προκειμένου να αξιοποιηθεί αυτός ο πυρήνας με την χρήση του NMR. Για τον υπολογισμό του spin ισχύει:

α) Αν ο πυρήνας έχει άρτιο ατομικό (Z) και μαζικό αριθμό (A) τότε έχουν $I=0$. Οι πυρήνες αυτοί δεν εκδηλώνουν μαγνητικές ιδιότητες και επομένως δεν δίνουν σήματα NMR.

β) Αν το άθροισμα των νετρονίων και των πρωτονίων είναι περιττός αριθμός, τότε ο πυρήνας έχει ημιακέραιο spin, δηλαδή $1/2, 3/2, \dots$. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο πυρήνας του ^1H με κβαντικό αριθμό πυρηνικού spin $I=1/2$. Οι πυρήνες αυτοί εμφανίζουν μαγνητικές ιδιότητες και παρουσιάζουν συμμετρική σφαιρική κατανομή του φορτίου τους με αποτέλεσμα να είναι χρήσιμοι στην φασματοσκοπία NMR.

γ) Αν ο αριθμός των νετρονίων και των πρωτονίων είναι και οι δύο περιττοί, τότε το spin είναι ακέραιος αριθμός.

Οι πυρήνες των στοιχείων περιέχουν φορτία και κατά συνέπεια κατά την περιστροφή τους συμπεριφέρονται ως μαγνητικά δίπολα και δημιουργούν μαγνητικά πεδία κάθετα στο επίπεδο περιστροφής τους. Η ένταση των πεδίων εξαρτάται από την μαγνητική ροπή, μ , η οποία αποτυπώνει το μέγεθος του δημιουργούμενου διπόλου και αποτελεί χαρακτηριστική ιδιότητα των πυρήνων. Απουσία ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου τα ανύσματα των πυρηνικών μαγνητικών ροπών προσανατολίζονται τυχαία στο χώρο. Υπό την επίδραση ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, ισχύος B_0 , η αλληλεπίδραση της πυρηνικής μαγνητικής ροπής και του μαγνητικού πεδίου είναι κβαντισμένη και η μαγνητική ροπή προσανατολίζεται ομόρροπα ή αντίρροπα προς το πεδίο. Ο ομόρροπος προσανατολισμός ονομάζεται *α κατάσταση spin* ενώ όταν το πρωτόνιο προσανατολίζεται αντίρροπα προς το μαγνητικό πεδίο καταλαμβάνει *κατάσταση β spin*, όπως φαίνεται και στην εικόνα [15], [16].



Εικόνα 7: Προσανατολισμός των διανυσμάτων των πυρηνικών μαγνητικών διπολικών ροπών μ των πρωτονίων (α) απουσία και (β) παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου εντάσεως B₀

Οι πυρήνες μπορούν να προσανατολιστούν με $2I+1$ τρόπους. Έτσι για παράδειγμα ο πυρήνας του ^1H με $I=1/2$, δίνει δύο ενεργειακά επίπεδα τα οποία χαρακτηρίζονται από τον μαγνητικό κβαντικό αριθμό του σπιν, m_I , το οποίο ορίζεται στο διάστημα από $-I$ μέχρι I . Στην περίπτωση του ^1H το m_I μπορεί να πάρει δύο τιμές $-1/2$ και $+1/2$. Η κατάσταση α αντιστοιχεί στο $m_I = +1/2$ και η κατάσταση β στο $m_I = -1/2$. Οι δύο καταστάσεις spin δεν είναι ενεργειακά ισοδύναμες και υπάρχει μια μετρήσιμη διαφορά ενέργειας (ΔE) μεταξύ τους, συγκεκριμένα η κατάσταση α είναι πιο χαμηλή ενεργειακά και κατά συνέπεια η πιο ευνοϊκή. Γενικά ο ομόρροπος προσανατολισμός αποτελεί την βασική κατάσταση του πυρήνα ενώ ο αντίρροπος προσανατολισμός την διεγερμένη, με αυξημένη ενέργεια. Σε ισχυρό μαγνητικό πεδίο, η διαφορά ενέργειας μεταξύ δύο καταστάσεων spin, είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη διαφορά σε ασθενές πεδίο. Η διαφορά ενέργειας είναι ανάλογη της ισχύς του μαγνητικού πεδίου και δίνεται από την σχέση (1):

$$\Delta E = \frac{\gamma h B_0}{2\pi} \quad (1)$$

όπου $\Delta E = H$ διαφορά ενέργειας μεταξύ των α και β καταστάσεων spin

$h = H$ σταθερά Planck

$B_0 = H$ ισχύς του μαγνητικού πεδίου

$\gamma = O$ γυρομαγνητικός λόγος

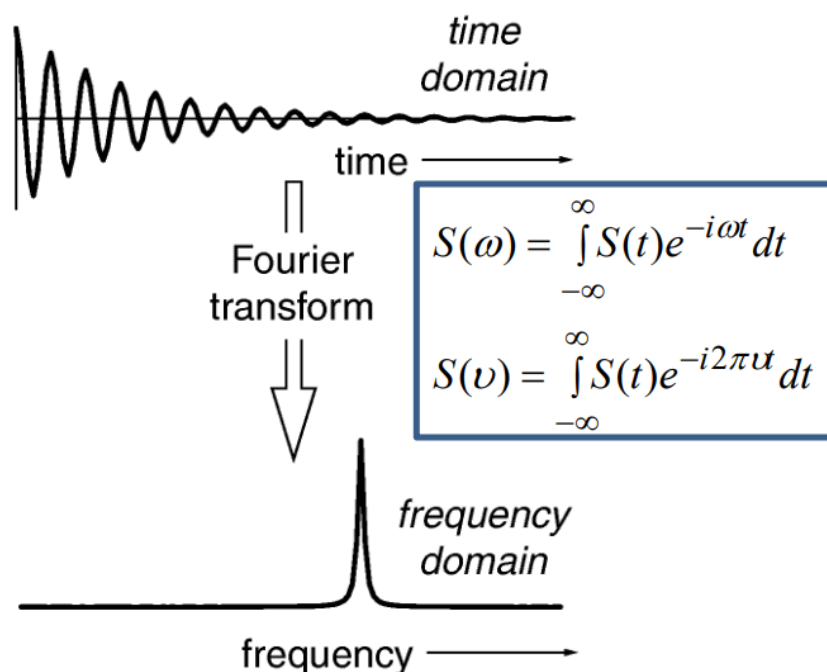
Ο γυρομαγνητικός λόγος (γ) είναι μια σταθερά χαρακτηριστική του κάθε πυρήνα και συσχετίζει την πυρηνική γωνιακή ορμή και την μαγνητική ροπή του. Για ένα πρωτόνιο ισχύει : $\gamma = 2.674 \times 10^4 \text{ gauss}^{-1}\text{sec}^{-1}$ [15], [17].

Όταν ένας πυρήνας που βρίσκεται στην α κατάσταση spin απορροφά ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, όταν αυτή ισούται με την ΔE μεταξύ των δύο καταστάσεων spin. Η απορρόφηση προκαλεί την μετάβαση του πυρήνα στην β κατάσταση spin και ο πυρήνας βρίσκεται σε συντονισμό. Η αποδιέγερση του πυρήνα δηλαδή η επιστροφή του στη χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση, ισορροπία, ονομάζεται χαλάρωση (relaxation). Χαρακτηρίζεται από δύο χρόνους:

α) από το χρόνο επαναφοράς spin-πλέγματος, T_1 (spin-lattice relaxation), ο οποίος αποτελεί το μέσο χρόνο που χρειάζεται ένας μεμονωμένος πυρήνας προκειμένου να επιστρέψει στην κατάσταση θερμικής ισορροπίας, μία διεργασία που συνοδεύεται με απώλεια ενέργειας του διεγερμένου πυρηνικού spin προς το περιβάλλον του μοριακού πλέγματος, και

β) από το χρόνο επαναφοράς spin-spin, T_2 (spin-spin relaxation), ο οποίος αποτελεί το χρόνο που απαιτείται για να σταματήσει η παραγωγή του σήματος, μία διεργασία που συνοδεύεται από απώλεια ενέργειας του διεγερμένου πυρηνικού spin προς τους γειτονικούς πυρήνες [15].

Κατά την αποδιέγερση του πυρήνα, εκπέμπεται ραδιοσυχνότητα συγκεκριμένης ενέργειας, η οποία αποτελεί και το σήμα του NMR. Συλλέγεται ως Ελεύθερη Φθίνουσα Επαγωγή (FID) στο πεδίο του χρόνου. Προκειμένου να εξαχθούν οι κατάλληλες πληροφορίες από το σήμα που λαμβάνει ο υπολογιστής απαιτείται μετατροπή του από το πεδίο του χρόνου στο οποίο λαμβάνεται, στο πεδίο της συχνότητας. Η επαγωγή μεταφέρεται στο πεδίο συχνοτήτων με μετασχηματισμό Fourier. Ειδικότερα, ο μετασχηματισμός Fourier είναι η μετατροπή του σήματος από το πεδίο του χρόνου στο πεδίο των συχνοτήτων, μέσω μαθηματικών εξισώσεων[18].



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση της μετατροπής Fourier

Χαρακτηριστικά Φάσματος NMR

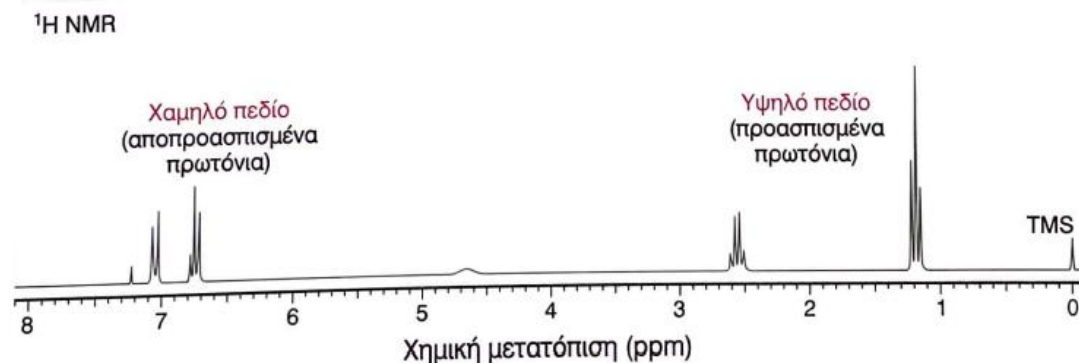
Ένα φάσμα, για παράδειγμα του ^1H NMR, αποτελείται από πλήθος κορυφών απορρόφησης, των οποίων οι θέσεις απεικονίζουν το διαφορετικό χημικό περιβάλλον των πρωτονίων και μπορούν να παρέχουν πληροφορίες για την χημική δομή των διάφορων μορίων. Ειδικότερα τα χαρακτηριστικά ενός φάσματος NMR είναι:

- Οι χημικές μετατοπίσεις
- Ο αριθμός των σημάτων
- Το εμβαδό των κορυφών
- Η σχάση spin – spin

Χημικές Μετατοπίσεις: Ως χημικές μετατοπίσεις ορίζονται οι θέσεις απορρόφησης σε ένα φάσμα, οι οποίες οφείλονται στην ηλεκτρονιακή προστασία και αποπροστασία. Πρόκειται για την διαφορά, σε μέρη ανά εκατομμύριο (ppm) μεταξύ της συχνότητας συντονισμού του παρατηρούμενου πρωτονίου και μίας ένωσης αναφοράς όπως το τριμεθυλοσιλυλοπροπανοϊκό οξύ (TSP). Η χρήση μίας ένωσης αναφοράς είναι απαραίτητη διότι στην πράξη είναι δύσκολο να μετρήσουμε το απόλυτο πεδίο στο οποίο απορροφά ένα πρωτόνιο με ακρίβεια τέτοια ώστε να μπορούμε να μελετήσουμε τα μεμονωμένα πρωτόνια[17].

Δεν απορροφούν όλοι οι πυρήνες στην ίδια περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, εξαιτίας της παρουσίας ηλεκτρονίων που τους περιβάλλουν. Παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, το ηλεκτρονιακό νέφος επάγει ένα τοπικό μαγνητικό πεδίο που αντιτίθεται στο εξωτερικό πεδίο. Το πρωτόνιο έτσι υπόκειται σε δύο μαγνητικά πεδία, το ισχυρό εξωτερικό και το ασθενές επαγόμενο μαγνητικό πεδίο. Έτσι, το ολικό μαγνητικό πεδίο στο πρωτόνιο είναι μικρότερο του εξωτερικού πεδίου. Στην περίπτωση αυτή, το πρωτόνιο προασπίζεται (προστατεύεται) από τα ηλεκτρόνια και προκειμένου να επιτευχθεί ο συντονισμός σε ορισμένη συχνότητα, το εφαρμοζόμενο πεδίο πρέπει να αυξηθεί. Δεν χαρακτηρίζονται όλα τα πρωτόνια από ταυτόσημο ηλεκτρονιακό περιβάλλον. Ορισμένα περιβάλλονται από μεγαλύτερη ηλεκτρονιακή πυκνότητα και προασπίζονται περισσότερο ενώ άλλα περιβάλλονται από μικρότερη ηλεκτρονιακή πυκνότητα και προασπίζονται λιγότερο ή αποπροασπίζονται (αποπροστατεύονται). Συνεπώς, τα πρωτόνια σε διαφορετικά ηλεκτρονιακά περιβάλλοντα θα παρουσιάζουν διαφορετική ΔΕ μεταξύ των α και β καταστάσεων spin και επομένως θα απορροφούν σε διαφορετικές ραδιοσυχνότητες. Καθίσταται λοιπόν εφικτό να διερευνηθεί το ηλεκτρονιακό περιβάλλον κάθε ατόμου υδρογόνου στο μόριο[16].

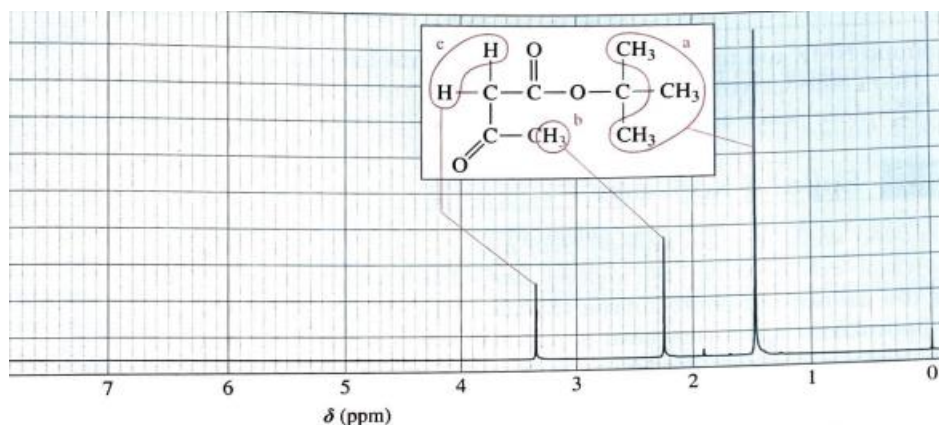
Οι χημικές μετατοπίσεις μετρώνται σε μέρη ανά εκατομμύριο (ppm), ένα αδιάστατο κλάσμα του συνολικά εφαρμοζόμενου πεδίου. Η μετατόπιση σε ppm ορισμένου πρωτονίου, είναι η ίδια ανεξάρτητα του εφαρμοζόμενου πεδίου και της συχνότητας του φασματομέτρου. Η πιο συνηθισμένη κλίμακα χημικών μετατοπίσεων είναι η δ (δέλτα). Πρόκειται για τον λόγο της παρατηρούμενης μετατόπισης σε σχέση με την ένωση αναφοράς σε Hz προς την λειτουργική συχνότητα του οργάνου σε Hz. Σε αυτήν το σήμα της ένωσης αναφοράς ορίζεται στα 0.00 ppm. Τα περισσότερα πρωτόνια απορροφούν σε χαμηλότερα πεδία από την ένωση αναφοράς και έτσι η κλίμακα δ αυξάνει προς το χαμηλότερο πεδίο, δηλαδή προς τα αριστερά του φάσματος, όπως φαίνεται και στην εικόνα 9. Για τις περισσότερες οργανικές ενώσεις, τα παραγόμενα σήματα κυμαίνονται μεταξύ 0 και 12 ppm[16], [17].



Εικόνα 9: Ένα αντιπροσωπευτικό φάσμα ¹H NMR στο οποίο επισημαίνονται οι περιοχές που αντιστοιχούν στο χαμηλό και στο υψηλό πεδίο

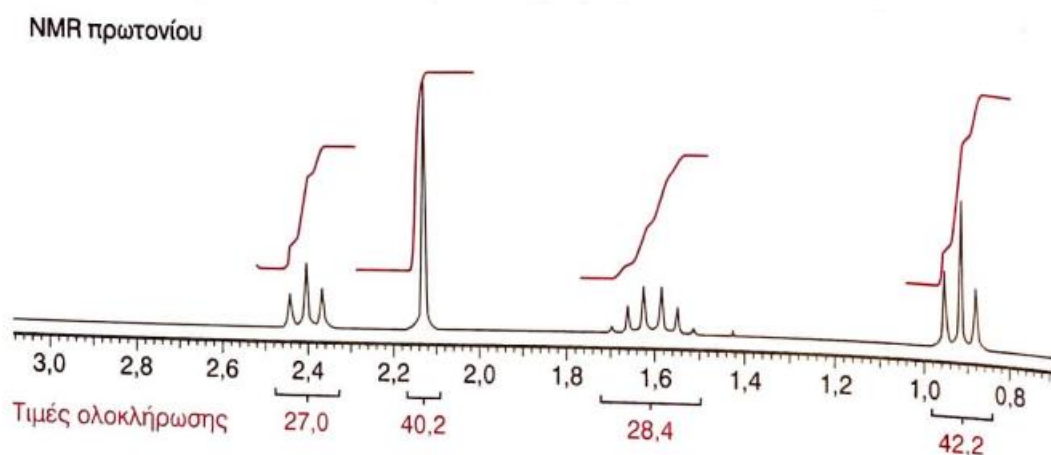
Η μέτρηση στα σύγχρονα φασματομέτρα γίνεται με διατήρηση της ισχύος σταθερή ενώ το δείγμα ακτινοβολείται με βραχύ παλμό που καλύπτει ολόκληρο το εύρος των σχετικών ραδιοσυχνοτήτων. Έτσι τα σήματα στο αριστερό τμήμα του φάσματος, όπως αναφέρονται εμπειρικά χαμηλού πεδίου, είναι σήματα υψηλής συχνότητας και προκύπτουν από αποπροασπισμένα πρωτόνια που απορροφούν σε υψηλότερες ραδιοσυχνότητες. Αντίθετα, σήματα στο δεξιό τμήμα του φάσματος, υψηλού πεδίου αντίστοιχα, είναι σήματα χαμηλής συχνότητας καθώς προκύπτουν από προασπισμένα πρωτόνια τα οποία απορροφούν σε χαμηλότερες ραδιοσυχνότητες[16].

Αριθμός των σημάτων: Ο αριθμός των σημάτων σε ένα φάσμα ¹H NMR υποδεικνύει τον αριθμό των διαφορετικών ειδών πρωτονίων, δηλαδή πρωτόνια σε διαφορετικά ηλεκτρονιακά περιβάλλοντα. Τα πρωτόνια που βρίσκονται σε παρόμοιο χημικό περιβάλλον και υφίστανται ίδια προστασία, εμφανίζουν και την ίδια χημική μετατόπιση, και ονομάζονται χημικώς ισοδύναμα. Τα πρωτόνια με διαφορετικό περιβάλλον απορροφούν σε διαφορετικές εντάσεις πεδίου και αποτελούν χημικώς μη ισοδύναμα πρωτόνια. Τα χημικώς ισοδύναμα πρωτόνια παράγουν ένα σήμα στο φάσμα. Στην εικόνα 10 δίνεται το ¹H NMR φάσμα του ακετοξικού tert-βουτυλεστέρα, το οποίο διαθέτει χημικώς ισοδύναμα πρωτόνια, ενώ ταυτόχρονα περιέχει τριών διαφορετικών ειδών πρωτόνια[17].



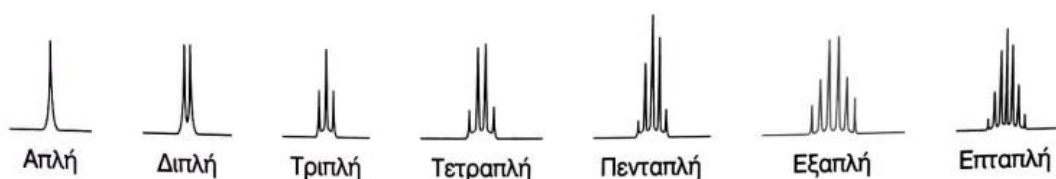
Εικόνα 10: Το ^1H NMR φάσμα του ακετοξικού *tert*-βουτυλεστέρα όπου φαίνεται η αντιστοίχιση των πρωτονίων με τις κορυφές του φάσματος

Εμβαδόν των κορυφών: Το εμβαδόν που περικλείει κάθε κορυφή είναι ανάλογο προς τον αριθμό των πρωτονίων που προκαλούν το σήμα. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των πρωτονίων που διεγείρονται τόσο μεγαλύτερο είναι το ποσό της ενέργειας που απορροφάται και αντίστοιχα η περιοχή κάτω από την κορυφή απορρόφησης. Το εμβαδόν που υπολογίζεται για κάθε κορυφή έχει σημασία σε σύγκριση με τα υπόλοιπα, καθώς δηλώνει την αναλογία των πρωτονίων κάθε σήματος και όχι τον πραγματικό αριθμό τους. Η μέτρηση του εμβαδόν συχνά αναπαρίσταται με κλιμακωτές καμπύλες, όπως φαίνεται και στην εικόνα, ενώ το ύψος κάθε καμπύλης αντιστοιχεί στο εμβαδόν κάθε σήματος[16].



Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση της μέτρησης του εμβαδού των κορυφών με κλιμακωτές καμπύλες

Spin – spin σχάση: Ένα πρωτόνιο, όπως αναφέρθηκε, υφίσταται την επίδραση τόσο του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, όσο και του επαγόμενου μαγνητικού πεδίου. Η ύπαρξη γειτονικών πρωτονίων επηρεάζει τους πυρήνες αυτούς. Τα σήματα που προκύπτουν σε αυτή την περίπτωση δεν είναι απλά, εμφανίζουν σχάση. Κάθε σήμα που σχάζεται χαρακτηρίζεται από την πολλαπλότητα, η οποία είναι ο αριθμός των κορυφών κάθε σήματος. Η πολλαπλότητα μπορεί να είναι απλή στην περίπτωση μιας κορυφής, διπλή για δύο κορυφές, τριπλή για τρεις κ.ο.κ., όπως φαίνεται και στην εικόνα[16], [17].

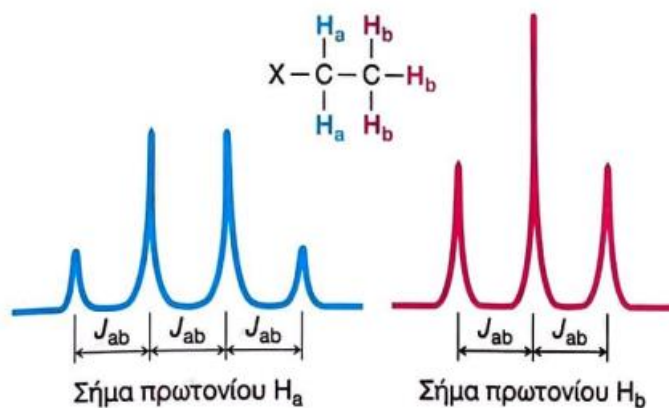


Εικόνα 12: Διαφορετικές πιθανές πολλαπλότητες των κορυφών σε ένα φάσμα HNMR

Η σχάση αυτή ονομάζεται σχάση spin – spin ή σύζευξη. Τα πρωτόνια αυτά αναφέρονται ως μαγνητικά συζευγμένα. Τα επιμέρους πρωτόνια μπορούν να προσανατολιστούν ομόρροπα ή αντίρροπα προς το μαγνητικό πεδίο. Κάθε πρωτόνιο συμπεριφέρεται όπως ένας μικρός μαγνήτης και επηρεάζει την χημική μετατόπιση των γειτονικών του. Ανάλογα τον αριθμό των γειτονικών πρωτονίων, προκύπτει διαφορετικό ηλεκτρονιακό περιβάλλον για το κάθε πρωτόνιο. Συνεπώς κάθε περιβάλλον εμφανίζεται ως διαφορετική κορυφή σχάζοντας το σήμα. Η πολλαπλότητα του σήματος έτσι προκύπτει, με βάση το τρίγωνο του Pascal, από τον κανόνα $N + 1$, όπου N είναι ο αριθμός των γειτονικών πρωτονίων. Γενικά, τα ισοδύναμα πρωτόνια δεν σχάζονται μεταξύ τους[17].

Η απόσταση μεταξύ των διαδοχικών κορυφών ενός σήματος που έχει υποστεί σχάση ονομάζεται σταθερά σύζευξης ή τιμή J και μετριέται σε Hz. Τα γειτονικά πρωτόνια έχουν ίδια τιμή J , επειδή δύο μαγνητικά συζευγμένα πρωτόνια έχουν ίδια επίδραση το ένα στο άλλο. Η σταθερά σύζευξης είναι ανεξάρτητη της ισχύος του πεδίου του φασματομέτρου. Αυτό οφείλεται στο ότι η μαγνητική επίδραση ενός πρωτονίου σε ένα άλλο, εξαρτάται από τους δεσμούς που τα συνδέουν και όχι από το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Η σταθερά αυτή είναι χρήσιμη για την ταυτοποίηση γειτονικών πρωτονίων σε πολύπλοκα φάσματα καθώς και για την διάκριση μεταξύ

διαστερεομερών. Στην εικόνα φαίνεται ενδεικτικά πως θα αντιστοιχιζόταν από ένα φάσμα σε ένα μόριο η σταθερά σύζευξης J [16].



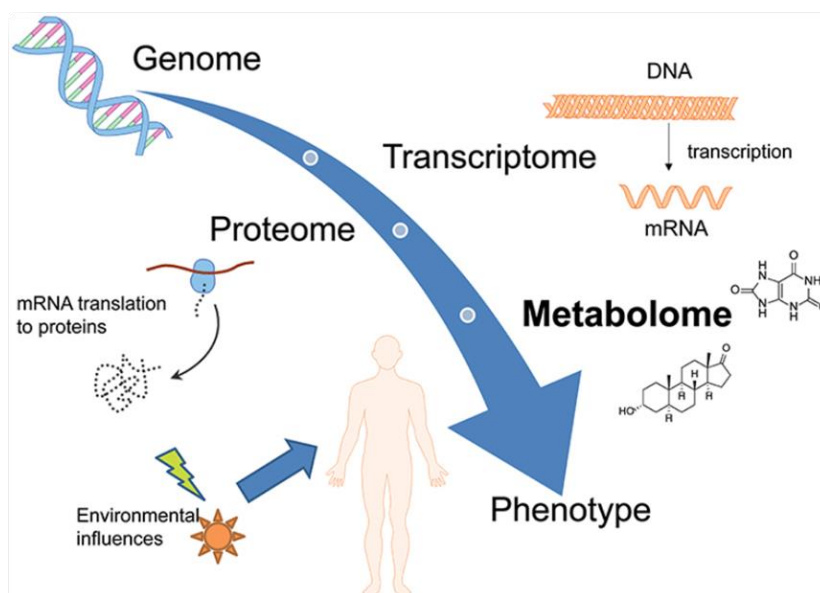
Εικόνα 13: Αναπαράσταση της εύρεσης της σταθεράς σύζευξης για ένα θεωρητικό μόριο

Στην περίπτωση που στο περιβάλλον του πρωτονίου υπάρχουν διαφορετικά είδη πρωτονίων, εμφανίζεται σύνθετη σχάση με διαφορετικές σταθερές σύζευξης για κάθε διαφορετικό πρωτόνιο. Η μορφή του σήματος εξαρτάται από τις επιμέρους J . Σε μεγάλες διαφορές μεταξύ των σταθερών οι πολλαπλές κορυφές που εμφανίζονται είναι ευδιάκριτες ενώ πολύ συχνά παρατηρείται αλληλεπικάλυψη των κορυφών και εμφάνιση ενός πιο σύνθετου σήματος που ονομάζεται πολλαπλή (multiplet). Σε περίπτωση ευκίνητων πρωτονίων που ανταλλάσσονται ταχύτερα από τον χρόνο ανίχνευσης του φασματόμετρου προκαλείται ένα φαινόμενο που αλληλοαναιρεί πιθανές επιδράσεις σχάσης και δεν εμφανίζεται πολλαπλότητα στο σήμα. Μία κορυφή μπορεί επίσης να εμφανίζεται απλή παρά την παρουσία γειτονικών πρωτονίων, στην περίπτωση που η σταθερά J είναι πολύ μικρή[16], [17]

Μεταβολομική με την χρήση του NMR

Η μεταβολομική είναι η ποσοτική ανάλυση ενός μεγάλου αριθμού μεταβολιτών, χαμηλού μοριακού βάρους που είναι ενδιάμεσα ή τελικά προϊόντα όλων των μεταβολικών οδών σε έναν ζωντανό οργανισμό[19]. Οι μεταβολίτες είναι τα ενδιάμεσα ή τελικά προϊόντα του μεταβολισμού και η συγκέντρωσή τους είναι αντιπροσωπευτική της φυσιολογικής λειτουργίας του οργανισμού καθώς και της επιρροής των εξωτερικών παραγόντων σε αυτόν. Η μέτρησή τους στους οργανισμούς μπορεί να παρέχει πληροφορίες για την κατανόηση, την διάγνωση και την παρακολούθηση διαφόρων ασθενειών. Συγχρόνως τα επίπεδα των μεταβολιτών

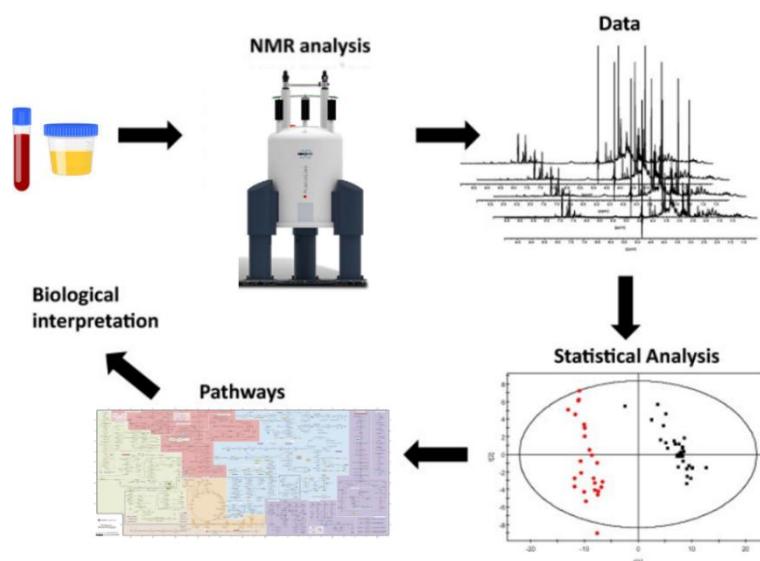
επιτρέπουν την αξιολόγηση των παραγόντων που επηρεάζουν τον μεταβολισμό των ατόμων, όπως η ηλικία, το φύλλο, η λήψη φαρμάκων, η ύπαρξη τοξινών καθώς και περιβαλλοντικοί παράγοντες, με στόχο την ανάπτυξη της εξατομικευμένης ιατρικής. Ως μεταβόλομα[20], εικόνα 14, ορίζεται το σύνολο των μεταβολιτών που εντοπίζονται σε έναν οργανισμό, ένα βιολογικό υγρό ή έναν ιστό. Όσον αφορά τον άνθρωπο, στο μεταβόλομα συμπεριλαμβάνονται τόσο οι ενδογενείς μεταβολίτες όσο και οι εξωγενείς χημικές ουσίες ή τα ξеноβιοτικά. Η μεταβολομική αναπτύχθηκε σε πρώιμο στάδιο στις αρχές της δεκαετίας του 50, ενώ τα τελευταία 20 χρόνια το πεδίο της μεταβολομικής έχει εξελιχθεί ραγδαία με την πρόοδο στην οργανολογία του NMR και του MS, με τον πλουτισμό των βάσεων δεδομένων με πληροφορίες καθώς και με την βελτίωση των λογισμικών για την επεξεργασία των δεδομένων [20].



Εικόνα 14: Στάδια έπειτα από τα οποία προκύπτει ο τελικός φαινότυπος στον άνθρωπο

Όπως απεικονίζεται και στην εικόνα 15, μια τυπική πορεία εργασίας μεταβολομικής αποτελείται από πειραματικά και αναλυτικά βήματα. Οι μέθοδοι προετοιμασίας του δείγματος εξαρτώνται κυρίως από τον τύπο του δείγματος (π.χ. αίμα, ούρα ή ENY) και την αναλυτική μέθοδο που χρησιμοποιείται, όπως το NMR ή η φασματομετρία μάζας (MS). Η καταγραφή και η τήρηση των πειραματικών συνθηκών, όπως ο χρόνος συλλογής, τα υλικά και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται καθώς και η θερμοκρασία αποθήκευσης, είναι υψίστης σημασίας για την απόκτηση ακριβών και επαναλήψιμων αποτελεσμάτων. Στη συνέχεια, χρησιμοποιείται μια αναλυτική τεχνική για την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό των ενώσεων που υπάρχουν στα δείγματα. Τα δεδομένα που λαμβάνονται απαιτούν ειδική επεξεργασία προτού

αναλυθούν, προκειμένου να γίνει σε αυτά η ταυτοποίηση των μεταβολιτών. Ειδικότερα στο NMR, απαιτείται η μείωση του θορύβου, η διόρθωση του baseline καθώς και



Εικόνα 15: Πορεία εργασίας της χρήσης του NMR στην μεταβολομική

φασματική ευθυγράμμιση. Ανεξάρτητα από την αναλυτική προσέγγιση που επιλέγεται για την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό των μεταβολιτών, πραγματοποιούνται στατιστικές αναλύσεις για τον προσδιορισμό πιθανών διαφορών μεταξύ «υγιών» και ασθενών ομάδων ή μεταξύ ομάδων σε διαφορετικά στάδια της νόσου. Το επόμενο βήμα της πορείας εργασίας της μεταβολομικής, είναι η ερμηνεία των δεδομένων, η ταυτοποίηση μεταβολιτών που μπορεί να λειτουργήσουν ως βιοδείκτες και η αντιστοίχιση τους στα διάφορα μεταβολικά μονοπάτια. Μέσω των παραπάνω μπορούν τα αποτελέσματα της μεταβολομικής μελέτης να αξιοποιηθούν προκειμένου να προκύψει σωστά η βιολογική τους ερμηνεία[21].

Η χρήση του NMR πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά στα μέσα της δεκαετίας του 1940. Ωστόσο, μόνο μετά την εισαγωγή υπεραγωγίμων μαγνητών και τη χρήση του μετασχηματισμού Fourier στα μέσα της δεκαετίας του 1960, το NMR βρήκε εφαρμογή σε πολλούς κλάδους των βασικών και εφαρμοσμένων επιστημών[1]. Η εφαρμογή του NMR στην μεταβολομική συγκεκριμένα, έχει επεκταθεί εξαιτίας της ανάγκης για περαιτέρω κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στις ανθρώπινες ασθένειες. Ειδικότερα, η ανακάλυψη νέων βιοδεικτών και η κατανόηση του μηχανισμού της παθογένεσης των ασθενειών αποτελούν το επίκεντρο των ερευνών, με στόχο την έγκαιρη ανίχνευση ασθενειών και την ταυτόχρονη βελτίωση των θεραπευτικών προσεγγίσεων. Έχουν μελετηθεί ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, του διαβήτη, των καρδιαγγειακών παθήσεων, των λοιμώξεων και της

παχυσαρκίας. Επίσης, η δυνατότητα που παρέχει η μεταβολομική για παρακολούθηση των μεταβολών στα επίπεδα των μεταβολιτών εξαιτίας της φαρμακευτικής αγωγής, προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για τις διάφορες θεραπευτικές προσεγγίσεις [20].

Το NMR διαθέτει πλεονεκτήματα που το καθιστούν κατάλληλο για την χρήση του στην μεταβολομική, για την ανάλυση μεταβολιτών σε βιολογικά δείγματα. Αρχικά δεν απαιτεί μεγάλη επεξεργασία του δείγματος πριν την λήψη του, είναι μη καταστροφικό για αυτό και μη επεμβατικό για τους ασθενείς. Δύναται να ανιχνεύσει δεκάδες μεταβολίτες, καθώς και να ταυτοποιήσει αγνώστους μεταξύ αυτών, σε μία μέτρηση. Είναι μία ανάλυση η οποία μπορεί να προσφέρει ποσοτικά αποτελέσματα και ταυτόχρονα είναι επαναλήψιμη. Συγχρόνως λαμβάνονται πληροφορίες για την πραγματική εικόνα του μεταβολισμού την στιγμή της λήψης του δείγματος παρέχοντας ένα μεταβολικό προφίλ το οποίο δεν επηρεάζεται από το όργανο ή τον χειριστή που πραγματοποιεί την μέτρηση. Μπορεί να πραγματοποιηθεί μέτρηση με την αξιοποίηση πυρήνων ^1H , ^2H , ^{13}C , ^{31}P και ^{15}N σε διαφορετικές αναλύσεις στο ίδιο δείγμα. Παρ' όλα αυτά έχει ορισμένα μειονεκτήματα σαν αναλυτική τεχνική. Πρωτίστως, έχει σχετικά μικρή ευαισθησία σε σύγκριση με την φασματομετρία MS ενώ ταυτόχρονα έχει υψηλό κόστος οργάνων[1].

Κεφάλαιο 3: Ενδογενή νοσήματα του μεταβολισμού και NMR

Η μεταβολομική με την χρήση του NMR συνεπώς αποτελεί ιδανικό εργαλείο για την μελέτη των ενδογενών νοσημάτων του μεταβολισμού. Παρ' όλα αυτά η χρήση του δεν εφαρμόζεται στην καθημερινή κλινική πράξη. Η ολιστική φύση της μεθόδου επιτρέπει τον εντοπισμό μεταβολιτών που δεν εντοπίζονται στις εξετάσεις ρουτίνας με τις υπόλοιπες τεχνικές. Το NMR που χρησιμοποιείται συνήθως για την ανάλυση των βιολογικών υγρών βασίζεται στον πυρήνα των πρωτονίων ($^1\text{HNMR}$), εξαιτίας της μεγαλύτερης ευαισθησίας του.

Όσον αφορά τα βιολογικά υγρά, τα ούρα αποτελούν το συνηθέστερο δείγμα για την παρακολούθηση των ενδογενών νοσημάτων του μεταβολισμού, καθώς συλλέγεται εύκολα και μη επεμβατικά, σε μεγάλες ποσότητες, μπορεί να συλλεχθεί δείγμα πολλαπλές φορές μέσα στην ίδια ημέρα και η προετοιμασία που προηγείται της μέτρησης στο NMR είναι ελάχιστη. Περισσότεροι από 2000 μικρού μοριακού βάρους μεταβολίτες εμφανίζονται στα ούρα και μπορούν δυνητικά να ταυτοποιηθούν σε μία μέτρηση με $^1\text{HNMR}$. Ωστόσο στην πράξη ανά δείγμα, δύναται να ταυτοποιηθεί και να

ποσοτικοποιηθεί ορισμένος αριθμός μεταβολιτών (περίπου 200), εξαιτίας της αλληλεπικάλυψης των σημάτων ή/και της εν γέννη μειωμένης ευαισθησίας του NMR. Χαρακτηριστικό των ούρων αποτελεί η υψηλή μεταβλητότητα των επιπέδων των μεταβολιτών σε αυτά, κάτι που δυσχεραίνει τον ορισμό των φυσιολογικών ορίων τους σε υγιή άτομα. Προκειμένου να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα, ένας μεγάλος αριθμός δειγμάτων πρέπει να αναλυθεί προκειμένου να τεθεί μια βάση δεδομένων φυσιολογικών καταστάσεων, με βάση την οποία μπορεί να γίνει ταχεία διαλογή των μη φυσιολογικών φασματικών δεδομένων. Το ολικό αίμα, το πλάσμα και ο ορός χρησιμοποιούνται επίσης για την διάγνωση των IEMs με NMR, ωστόσο με μικρότερη συχνότητα σε σχέση με τα ούρα εξαιτίας της πιο επεμβατικής φύσης της δειγματοληψίας. Η λήψη του εγκεφαλονωτιαίου υγρού είναι ιδιαίτερα επεμβατική σε σύγκριση με τα ούρα και το αίμα και για τον λόγο αυτό είναι λιγότερο συχνή στην παρακολούθηση των IEMs. Ωστόσο, η σύσταση του εξαρτάται από τους ρυθμούς παραγωγής και μεταβολισμού των μεταβολιτών στον εγκέφαλο και για τον λόγο αυτό αποτελεί χρήσιμο στοιχείο για την παρακολούθηση νοσημάτων που σχετίζονται με το κεντρικό νευρικό σύστημα[1].

Η επιλογή των συνθηκών λήψης του φάσματος NMR που θα πραγματοποιηθεί για την παρακολούθηση των IEMs σε κάθε περίπτωση, εξαρτάται από τον σκοπό της εκάστοτε μελέτης, το είδος των δειγμάτων και την διαθεσιμότητα σε υλικοτεχνικές δομές. Συνήθως πραγματοποιείται με τα γρήγορα και πλήρως αυτοματοποιημένα πειράματα 1-D ^1H NMR. Ένα μειονέκτημα του 1-D ^1H NMR στα βιολογικά υγρά, είναι ότι στα φάσματα οι κορυφές αλληλεπικαλύπτονται και ενδέχεται να δημιουργηθεί πρόβλημα κατά την ανίχνευση ή την ποσοτικοποίηση αρκετών μεταβολιτών. Αυτό το πρόβλημα μπορεί να ξεπεραστεί με την χρήση όμο- ή ετεροπυρηνικών τεχνικών 2D-NMR, οι οποίες παρέχουν πολύ καλύτερη ανάλυση και επιτρέπουν την ταυτοποίηση περισσότερων ενώσεων. Από την άλλη, οι τεχνικές 2D – NMR απαιτούν μεγαλύτερους πειραματικούς χρόνους και για αυτό δεν πραγματοποιούνται με την ίδια συχνότητα.

Η χρήση υψηλότερων συχνοτήτων, όπως 750–1000 MHz, παρέχει καλύτερη φασματική ανάλυση και ευαισθησία, ωστόσο το κόστος της ανάλυσης είναι μεγαλύτερο. Συγκριτικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων για τα ίδια δείγματα παρήγαγαν παρόμοια μεταβολικά προφίλ, κάτι που αποδεικνύει την επαναληψιμότητα της μεθόδου. Μια σύγκριση μεταξύ του κόστους, της ταχύτητας και της ευαισθησίας μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων NMR

καταδεικνύει ότι η χρήση NMR στα 500 ή 600 MHz αποτελεί κατάλληλο εργαλείο για την παρακολούθηση των IEMs[1].

Η επεξεργασία των δεδομένων σε βιολογικά δείγματα, πραγματοποιείται με συγκεκριμένη ακολουθία βημάτων προκειμένου να ληφθούν στο σύνολο τους οι πληροφορίες από το φάσμα. Υπάρχουν δύο κύριες προσεγγίσεις για την ανάλυση των δεδομένων του NMR με διαγνωστική αξία. Η πρώτη προσέγγιση είναι η μη στοχευμένη, κατά την οποία τα φασματοσκοπικά δεδομένα ενός δείγματος αποτελούν ένα μεταβολικό «αποτύπωμα» και εντοπίζονται διαφορές ή ομοιότητες μεταξύ πολλών δειγμάτων μέσω στατιστικής επεξεργασίας. Η δεύτερη μέθοδος για την ανάλυση δεδομένων NMR είναι η δημιουργία μεταβολικού προφίλ με στοχευμένο τρόπο, στην οποία εντοπίζονται και ποσοτικοποιούνται οι μεταβολίτες. Η προσέγγιση αυτή χρησιμοποιεί κλασικές ποσοτικές τεχνικές NMR και αξιοποιεί το γεγονός ότι κάθε μεταβολίτης έχει ένα χαρακτηριστικό «αποτύπωμα» στο φάσμα, υπό την προϋπόθεση ότι το pH και η θερμοκρασία έχουν ρυθμιστεί κατά την απόκτηση των δεδομένων.

Συνήθως στις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται το NMR για διάγνωση ενδογενών νοσημάτων του μεταβολισμού σε ούρα, πραγματοποιείται ποσοτικοποίηση και σύγκριση μεταξύ υγείων και ασθενών ατόμων. Τα επίπεδα των μεταβολιτών εκφράζονται αναφορικά με την ποσότητα κρεατινίνης στο δείγμα (mmol της ένωσης/mol κρεατινίνης). Αυτή η προσέγγιση βασίζεται στη συσχέτιση που υπάρχει μεταξύ του ποσοστού απέκκρισης της κρεατινίνης με το συνολικό σωματικό βάρος και στο ότι σε υγιή άτομα, υπάρχει μικρή μεταβολική διακύμανση στα επίπεδα απέκκρισης της[1].

Ένα συχνό πρόβλημα που εμφανίζεται στην κλινική πράξη σε σχέση με τα ενδογενή νοσήματα του μεταβολισμού είναι ο μεγάλος αριθμός μεταβολιτών που σχετίζονται με αυτά. Για τον λόγο αυτό ένα χρήσιμο εργαλείο αποτελούν οι ανοιχτής πρόσβασης βάσεις δεδομένων για μεταβολίτες. Όσον αφορά το ανθρώπινο μεταβόλομα η βάση δεδομένων είναι το HMDB (Human Metabolome Data Base). Πρόκειται για την μεγαλύτερη online βάση δεδομένων και περιέχει πληροφορίες για την πλειοψηφία των γνωστών μεταβολιτών. Παρέχει πληροφορίες για: την δομή, τον βιολογικό ρόλο, τα βιοχημικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται, την συσχέτιση τους με διάφορες ασθένειες, φυσιολογικές και μη συγκεντρώσεις τους στα διαφορετικά

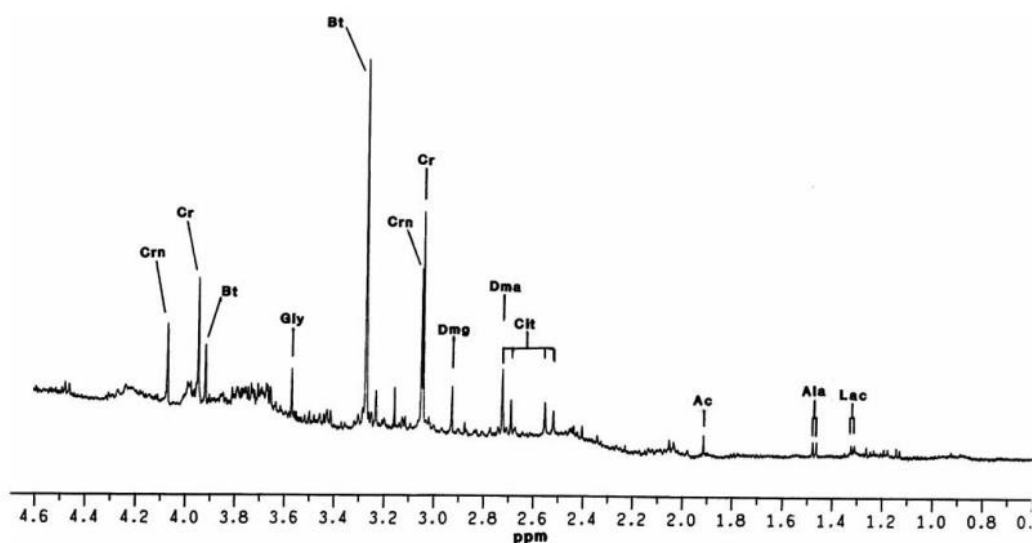
βιολογικά υγρά συνοδευόμενα σε κάθε περίπτωση με τα σχετικά φασματοσκοπικά τους δεδομένα σε NMR, MS/MS και GC-MS.

Παρόλο που το HMDB δεν δημιουργήθηκε αποκλειστικά για την χρήση του στην μελέτη των διαφόρων IEMs αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο στην κλινική πράξη αλλά και την έρευνα που σχετίζεται με τα νοσήματα αυτά. Ειδικότερα, προσφέρει λεπτομερή στοιχεία για 247 βιοδείκτες που σχετίζονται με 147 επαρκώς χαρακτηρισμένα νοσήματα [22].

Καίριας σημασίας καθίσταται η καθιέρωση φυσιολογικών τιμών των μεταβολιτών για την κάθε ηλικιακή ομάδα, προκειμένου να επιτευχθεί διάγνωση ασθενειών, να εκτιμηθεί η εμφάνιση νέων νοσημάτων, να γίνει παρακολούθηση του μεταβολισμού των ατόμων αλλά και να αξιολογηθεί η γενικότερη κατάσταση της υγείας τους. Το πλήθος αλλά και η διαφοροποίηση των μεταβολιτών που εμφανίζονται σε υγιή νεογνά, φαίνεται να είναι μικρότερο αλλά και απλούστερο σε σύγκριση με αυτό των ενηλίκων. Αυτό πιθανώς να οφείλεται σε διαφορές στον μεταβολισμό των νεογνών καθώς και σε διαφορές που προκύπτουν εξαιτίας της διατροφής, της έκθεσης στους διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες καθώς και στην διαφορετική σύνθεση της μικροχλωρίδας του εντέρου. Η σύγκριση μεταξύ των ούρων νεογνών και ενηλίκων καταδεικνύει σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις πληθώρας μεταβολιτών. Συγκεκριμένα, παρατηρούνται στα ούρα των νεογνών πολύ υψηλότερα επίπεδα απαραίτητων αμινοξέων, δηλαδή της ιστιδίνης, ισολευκίνης, λευκίνης, λυσίνης, μεθειονίνης, φαινυλαλανίνης, θρεονίνης, τρυπτοφάνης και βαλίνης καθώς και αμινοξέων που σχετίζονται με το κολλαγόνο, δηλαδή της προλίνης, γλυκίνης και υδρόξυπρολίνης, όπως και ακυλοκαρνιτινών. Το γεγονός αυτό, αντανακλά την ανάγκη για μεγάλη συγκέντρωση των ενώσεων αυτών, προκειμένου να διατηρηθεί η ταχεία κυτταρική ανάπτυξη και διαίρεση στα νεογνά. Σαφής διαφοροποίηση των μεταβολιτών παρατηρείται μεταξύ των δύο φύλων στα νεογνά. Η παρατηρούμενη διαφορά στην σύσταση των ούρων μεταξύ των φύλων ενισχύει την ανάγκη ύπαρξης διαφορετικών τιμών αναφοράς, κάτι που μπορεί να αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμο στην διάγνωση των IEMs[23].

Όσον αφορά την χρήση της φασματοσκοπίας NMR, δύναται να εντοπίσει μεταβολίτες οι οποίοι δεν ανιχνεύονται με τις συμβατικές τεχνικές και κατ' επέκταση να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του συνολικού μεταβολικού προφίλ ενός

υγιούς νεογνού. Ειδικότερα, έχουν παρατηρηθεί, έπειτα από ανάλυση με $^1\text{H-NMR}$ των ούρων υγείων νεογνών, υψηλά επίπεδα βεταΐνης. Μέγιστη έκκριση εμφανίζεται στην ηλικία των 2-4 μηνών, ενώ μειώνεται σε $<0.1 \text{ mol/mol}$ κρεατινίνης μέχρι τον πρώτο χρόνο ζωής τους. Η βεταΐνη φυσιολογικά εκκρίνεται από την οξείδωση της χολίνης στο ήπαρ και τους νεφρούς και αποτελεί εναλλακτικός δότης μεθυλίου στην μεθυλίωση της ομοκυστεΐνης. Συγχρόνως, σε σημαντικό βαθμό στα ούρα των νεογνών εκκρίνεται η κρεατίνη, η οποία δεν αξιολογείται στην κλινική πράξη αλλά ανιχνεύεται με την χρήση του $^1\text{H-NMR}$. Η έκκριση της κρεατινίνης ποικίλει μεταξύ των νεογνών και επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την διατροφή, ειδικότερα από την πρόσληψη του κρέατος. Παρακάτω παρατίθεται το φάσμα ούρων ενός υγιούς 3 μηνών κοριτσιού όπου έχουν ταυτοποιηθεί οι κορυφές για: οξικό, αλανίνη, βεταΐνη, κιτρικό, κρεατίνη, κρεατινίνη, διμεθυλαμίνη, διμεθυλογλυκίνη, γλυκίνη, γαλακτικό[24].



Εικόνα 16: Φάσμα ούρων ενός υγιούς 3 μηνών κοριτσιού όπου έχουν ταυτοποιηθεί οι κορυφές για: οξικό, αλανίνη, βεταΐνη, κιτρικό, κρεατίνη, κρεατινίνη, διμεθυλαμίνη, διμεθυλογλυκίνη, γλυκίνη, γαλακτικό

Επιλεγμένα νοσήματα και διάγνωση τους με την χρήση του NMR

Μέχρι σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί πληθώρα ερευνών που αφορούν την διάγνωση ενδογενών νοσημάτων του μεταβολισμού με την χρήση της φασματοσκοπίας NMR κυρίως σε αίμα και ούρα ασθενών. Τα τελευταία χρόνια, έχει εξετασθεί, από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες η ικανότητα της φασματοσκοπίας NMR στην παρακολούθηση των νοσημάτων αυτών σε μεγαλύτερη κλίμακα. Ειδικότερα, το 2014 οι Aygen et al. ανέλυσαν με $^1\text{H-NMR}$ τα ούρα 989 νεογνών στην Τουρκία, για τον

προσδιορισμό των μεταβολιτών που εντοπίζονται φυσιολογικά στα ούρα των νεογνών προκειμένου να ταυτοποιούνται σε κάθε περίπτωση οι μη φυσιολογικοί μεταβολίτες[25]. Επίσης οι Embade et al. το 2019 στην Ισπανία πραγματοποίησαν μια αντίστοιχη μελέτη χρησιμοποιώντας 470 δείγματα νεογνών. Δημιούργησαν στατιστικά μοντέλα για 150 μεταβολίτες. Τα αποτελέσματα τους συνάδουν για 18 από τους 20 μεταβολίτες που βρέθηκαν στην μελέτη των Aygen et al.. Ταυτόχρονα, ταυτοποιήθηκαν 84 μεταβολίτες που δεν εντοπίζονται σε υγιή νεογνά. Υποστηρίζουν, πως είναι δυνατό να ταυτοποιηθούν με την μέθοδο αυτή 75 διαφορετικά ενδογενή νοσήματα του μεταβολισμού, ενώ η συμφωνία των αποτελεσμάτων τους με την Τουρκική μελέτη τους οδηγεί στο συμπέρασμα πως το μοντέλο που προτείνουν δύναται να χρησιμοποιηθεί και σε άλλες περιοχές ανά τον κόσμο για μια πιο καθολική προσέγγιση στην διάγνωση των ενδογενών μεταβολικών νοσημάτων με την χρήση της φασματοσκοπίας NMR[26].

Μία από τις βασικές κατηγορίες ενδογενών νοσημάτων του μεταβολισμού είναι αυτά που προκαλούν συσσώρευση μεταβολιτών που ασκούν τοξική δράση στους ασθενείς. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας αποτελούν οι διαταραχές στον μεταβολισμό των αμινοξέων. Νοσήματα αυτής της κατηγορίας είναι η νόσος ούρων σιροπιού σφενδάμου, η φαινυλοκετονουρία, η τυροσιναιμία, οι διαταραχές του κύκλου της ουρίας κ.α.[27].

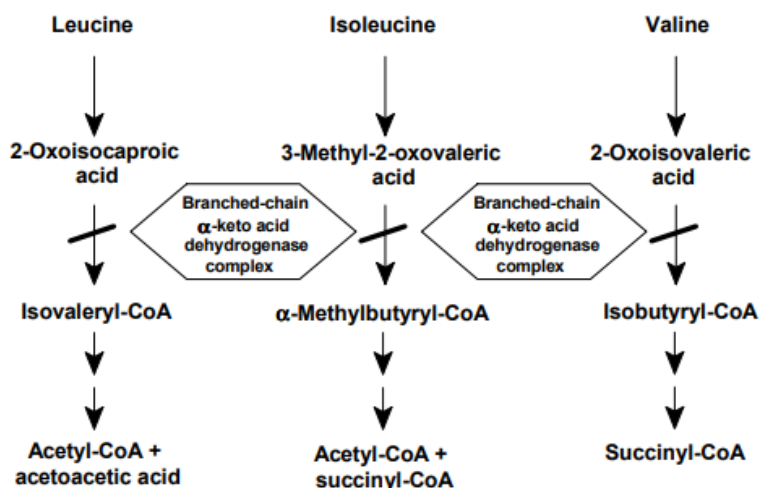
Νόσος οσμής ούρων σαν σιρόπι σφενδάμου (MSUD)

Η νόσος οσμής ούρων σαν σιρόπι σφενδάμου (Maple Syrup Urine Disease, MSUD) είναι ένα ενδογενές νόσημα του μεταβολισμού και οφείλεται στην έλλειψη του συμπλόκου ενζύμων αφυδρογονάση των α-κετοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (branched-chain-ketoacid dehydrogenase, BCKD). Καταλύει το δεύτερο βήμα στον μεταβολισμό των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (BCAA), δηλαδή της βαλίνης, της ισολευκίνης και της λευκίνης. Το σύμπλοκο της BCKAD αποτελείται από 4 υπομονάδες, E1a, E1b, E2, E3. Διαταραχή της φυσιολογικής λειτουργίας οποιασδήποτε από τις υπομονάδες του ενζύμου μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση αμινοξέων και κετοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας. Η αποκαρβοξυλάση, υπομονάδα E1, κωδικοποιείται από τα γονίδια BCKDHA για την E1a υπομονάδα της και αντίστοιχα από το BCKDHB για την υπομονάδα E1b. Η τρανσακετυλάση της διακλαδισμένης αλυσίδας του διυδρολιποαμιδίου, υπομονάδα E2, κωδικοποιείται από

το γονίδιο DBT, ενώ η δεϋδρογονάση του διϋδρολιποαμιδίου, υπομονάδα E3, κωδικοποιείται από το γονίδιο DLD.

Κλινικά, παρατηρείται χαρακτηριστική οσμή σιροπιού σφενδάμου στο πλάσμα και στα ούρα των ασθενών. Τα πρώτα συμπτώματα γίνονται εμφανή από τις πρώτες μέρες ζωής του νεογνού, με εμφάνιση κετονουρίας και κέτωσης αίματος καθώς και υποσιτισμού, εγκεφαλοπάθειας με λήθαργο, άπνοια και χαρακτηριστικών κινήσεων εξαιτίας της μυϊκής υπερτονίας. Εργαστηριακά, παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα των BCAAs και της L-άλλο-ισολευκίνης στο πλάσμα ενώ ταυτόχρονα με την κέτωση παρατηρείται και υπονατριαιμία. Η L-άλλο-ισολευκίνη προκύπτει από την τρανσαμίνωση της ισολευκίνης *in vivo*. Μπορεί να ταυτοποιηθεί σε πολύ μικρές ποσότητες και σε υγιή άτομα. Αποτελεί παθολογικό εύρημα σε όλες τις μορφές του MSUD. Συγχρόνως αυξημένα εμφανίζονται και τα κετοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας, α-κετοϊσοκαπροϊκό, α-κετο-β-μεθυλοβαλερικό και α-κετοϊσοβαλερικό οξύ. Η χρήση της μαγνητικής τομογραφίας δείχνει την ύπαρξη εγκεφαλικού οιδήματος. Τα επίπεδα της άλλο-ισολευκίνης εμφανίζονται αυξημένα και πριν την εμφάνιση συμπτωμάτων ή οξείας μεταβολικής κρίσης και κατ' επέκταση θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στα προγράμματα παρακολούθησης των νεογνών[3], [28].

Το βιοχημικό μονοπάτι που διαταράσσεται φαίνεται στην εικόνα[29]:



Εικόνα 17: Το βιοχημικό μονοπάτι που διαταράσσεται στην περίπτωση της νόσου ούρων σιροπιού σφενδάμου

Όσον αφορά την χρήση της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, σε ούρα ασθενών που πάσχουν από MSUD ενδεικτικά με βάση την βιβλιογραφία, εμφανίζονται αυξημένα τα αμινοξέα και τα κετοξέα διακλαδισμένης

αλυσίδας[30], [31], ενώ έχουν ταυτοποιηθεί και ασυνήθιστοι μεταβολίτες όπως το 3-υδροξυβουτυρικό οξύ, 3-μεθυλο-2-οξοβαλερικό οξύ, 2-υδροξυισοβαλερικό οξύ, η

<i>Μελέτη</i>	Βιολογικό Υγρό	Μεταβολίτες
<i>Pontoni et al. (1996)</i>	Ούρα	BCAAs & BCKAs
<i>Holmes et al. (1997)</i>	Ούρα	BCAAs & BCKAs
<i>Pulido et al. (2021)</i>	Ούρα	3-ύδροξυβουτυρικό, 3-μέθυλο-2-οξοβαλερικό, 2-υδροξυισοβαλερικό οξύ, αλλοϊσολευκίνη, ισολευκίνη, 2-οξοϊσοκαπροϊκό οξύ

άλλο-ισολευκίνη, ισολευκίνη και το 2-οξοϊσοκαπροϊκό οξύ[32]. Συγκεντρωτικά παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2: Αποτελέσματα ερευνών με την χρήση της φασματοσκοπίας NMR για την νόσο ούρων σιροπιού σφενδάμου

Ενδεικτικά παρατίθεται ένα φάσμα NMR ούρων ασθενή που πάσχει από την συγκεκριμένη νόσο, εστιασμένο στην περιοχή του φάσματος που εντοπίζονται οι μεταβολίτες που μας ενδιαφέρουν, στην οποία γίνεται ευδιάκριτη η παρουσία δύο εκ των τριών κετοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας καθώς και του 2-οξο-ισοκαπροϊκού και 2-υδροξυίσοβαλερικού οξέος[29].

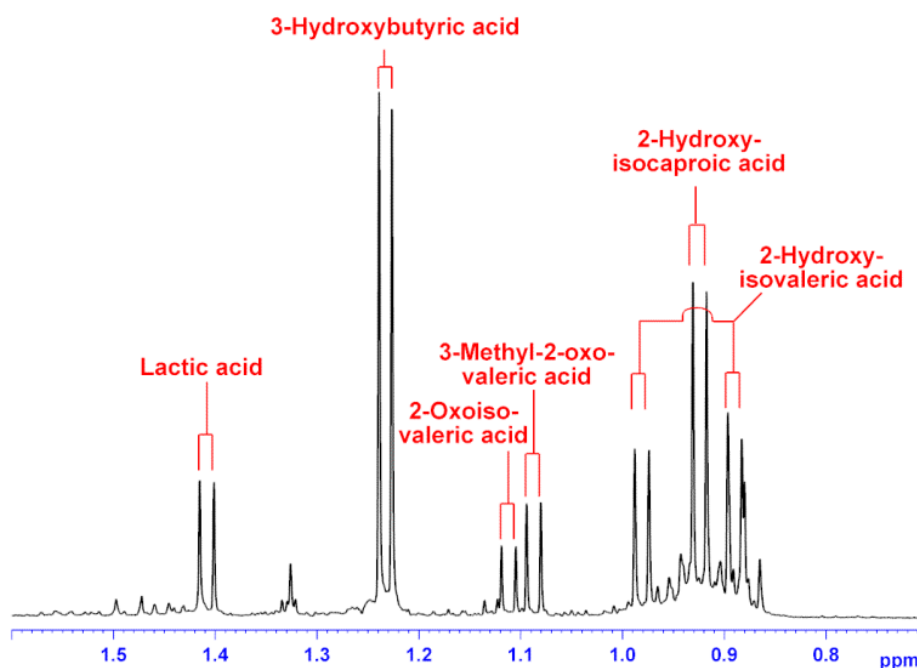
Maple syrup urine disease

[Gene Locus](#)

[EC Number](#)

[OMIM](#)

[Table of Contents](#)



Εικόνα 18: Επιλεγμένο φάσμα NMR ούρων ασθενή με την νόσο ούρων σιροπιού σφενδάμου

Φαινυλοκετονουρία (PKU)

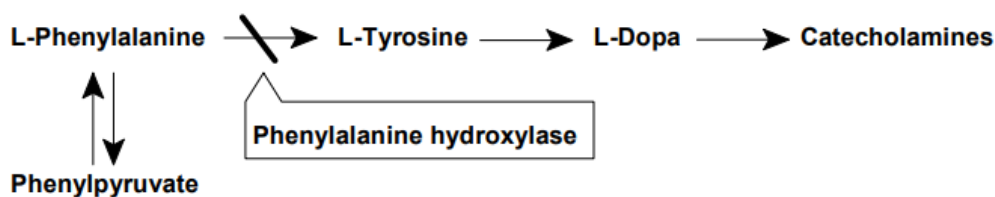
Η φαινυλοκετονουρία είναι ένα ενδογενές νόσημα του μεταβολισμού, που οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο PAH που κωδικοποιεί το ένζυμο υδροξυλάση της φαινυλαλανίνης. Το γονίδιο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12 στην θέση 12q24.11. Η υδροξυλάση της φαινυλαλανίνης μετατρέπει την φαινυλαλανίνη σε τυροσίνη. Προκειμένου να ολοκληρωθεί η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη η παρουσία του συμπαραγόντα τετραυδροβιοπτερίνη (BH₄) καθώς και μοριακού οξυγόνου και σιδήρου. Ατελής δράση του ενζύμου οδηγεί σε αυξημένες συγκεντρώσεις φαινυλαλανίνης στο αίμα και σε τοξικές συγκεντρώσεις της στον εγκέφαλο. Η φαινυλοκετονουρία, απουσία θεραπείας, συνδέεται με προοδευτική διανοητική δυσλειτουργία, συνοδευόμενη από πρόσθετα συμπτώματα, τα οποία μπορεί να περιλαμβάνουν εκζεματικό εξάνθημα, αυτισμό, επιληπτικές κρίσεις και κινητικά προβλήματα.

Η είσοδος της φαινυλαλανίνης στον εγκέφαλο πραγματοποιείται από έναν μεγάλο μεγέθους και με ουδέτερο φορτίο, μεταφορέα L-αμινοξέων 1 (LAT1). Συγχρόνως, εισέρχονται στον εγκέφαλο από τον ίδιο μεταφορέα δύο άλλα μεγάλα

ουδέτερα αμινοξέα η τυροσίνη, που αποτελεί πρόδρομο μόριο της ντοπαμίνης και της νορεπινεφρίνης, και η τρυπτοφάνη, που αποτελεί πρόδρομο μόριο της σεροτονίνης. Οι υψηλές συγκεντρώσεις φαινυλαλανίνης στο αίμα μπορούν να αναστείλουν τον LAT1 και κατ' επέκταση να εμποδίσουν την είσοδο άλλων μεγάλων ουδέτερων αμινοξέων στον εγκέφαλο, αυξάνοντας τις πιθανότητες πρόκληση βλάβης στους νευροδιαβιβαστές και μείωσης της διαθεσιμότητας τους για πρωτεϊνοσύνθεση.

Όσον αφορά την διαγνωστική προσέγγιση, η αρχική αξιολόγηση πραγματοποιείται με ανάλυση των αμινοξέων του αίματος. Εάν το νεογνό πάσχει από υπερφαινυλαλανιναιμία, στην ανάλυση αμινοξέων αίματος θα εμφανιστούν αυξημένες συγκεντρώσεις φαινυλαλανίνης (>120μmol/L), φυσιολογικές ή μειωμένες συγκεντρώσεις τυροσίνης και φυσιολογικές συγκεντρώσεις των υπόλοιπων αμινοξέων[33].

Το βιοχημικό μονοπάτι που διαταράσσεται φαίνεται στην εικόνα[29]:



Εικόνα 19: Το βιοχημικό μονοπάτι που διαταράσσεται στην φαινυλοκετονουρία

Όσον αφορά την χρήση της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, στα βιολογικά υγρά ασθενών που πάσχουν από φαινυλοκετονουρία με βάση την βιβλιογραφία, το βασικό γνώρισμα είναι τα αυξημένα επίπεδα φαινυλαλανίνης τόσο στο πλάσμα όσο και στα ούρα[32], [34]–[36]. Ταυτόχρονα έχουν παρατηρηθεί αυξημένοι, σε σχέση πάντα με υγιή άτομα, οι μεταβολίτες: αλανίνη, κιτρικό και γλουταμικό οξύ[34], [36], μειωμένοι οι μεταβολίτες: τυροσίνη, γλουταμίνη και κρεατινίνη[36]. Συγχρόνως παρατηρήθηκαν ασυνήθιστοι μεταβολίτες στα ούρα των ασθενών όπως το ηλεκτρικό οξύ[35], η N-ακετυλο-φαινυλαλανίνη και το 3-φαινυλογαλακτικό οξύ[32] ενώ και τρεις μη ταυτοποιημένοι μεταβολίτες[34]. Αξιοσημείωτη είναι ωστόσο η μελέτη του λιπιδαιμικού προφίλ αυτών των ασθενών που πραγματοποιήθηκε από τους *Cannet et al.* (2020). Ειδικότερα, παρατηρήθηκε σε ασθενείς που πάσχουν από φαινυλοκετονουρία, να εμφανίζονται μειωμένα τα επίπεδα

της LDL, ενώ δεν παρατηρούνται διαφοροποιήσεις στα επίπεδα της HDL[36]. Συγκεντρωτικά παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3: Αποτελέσματα ερευνών με την χρήση της φασματοσκοπίας NMR για την Φαινυλοκετονουρία

Μελέτη	Βιολογικό Υγρό	Μεταβολίτες
<i>Pan et al. (2007)</i>	Ούρα	↑ Φαινυλαλανίνη, Αλανίνη, Κιτρικό οξύ και ανίχνευση 3 μη ταυτοποιημένων μεταβολιτών
<i>Blasco et al. (2016)</i>	Πλάσμα	↑ Φαινυλαλανίνη, ↓ Τυροσίνη και Γλουταμίνη
	Ούρα	Ανίχνευση Ηλεκτρικού οξέος
<i>Cannet et al. (2020)</i>	Πλάσμα	↑ Φαινυλαλανίνη και Κιτρικό και Γλουταμικό οξύ ενώ ↓ LDL, Τυροσίνη, Γλουταμίνη, Κρεατινίνη
<i>σPulido et al. (2021)</i>	Ούρα	N-ακετυλο-φαινυλαλανίνη, 3-φαινυλογαλακτικό οξύ

Ενδεικτικά παρατίθεται ένα φάσμα NMR ούρων ασθενή που πάσχει από την συγκεκριμένη νόσο, εστιασμένο στην περιοχή του φάσματος που εντοπίζονται οι μεταβολίτες που μας ενδιαφέρουν, στην οποία γίνεται ευδιάκριτη η αυξημένη συγκέντρωση της φαινυλαλανίνης [29].

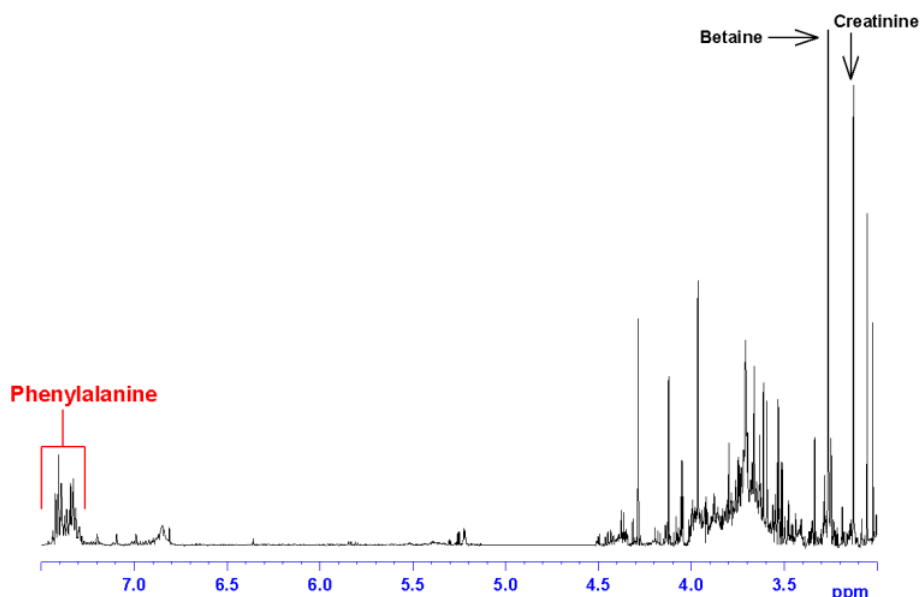
Phenylketonuria

[Gene Locus](#)

[EC Number](#)

[OMIM](#)

[Table of Contents](#)



Εικόνα 20: Επιλεγμένο φάσμα NMR ούρων ασθενή με Φαινυλοκετονουρία

Τυροσιναιμίες

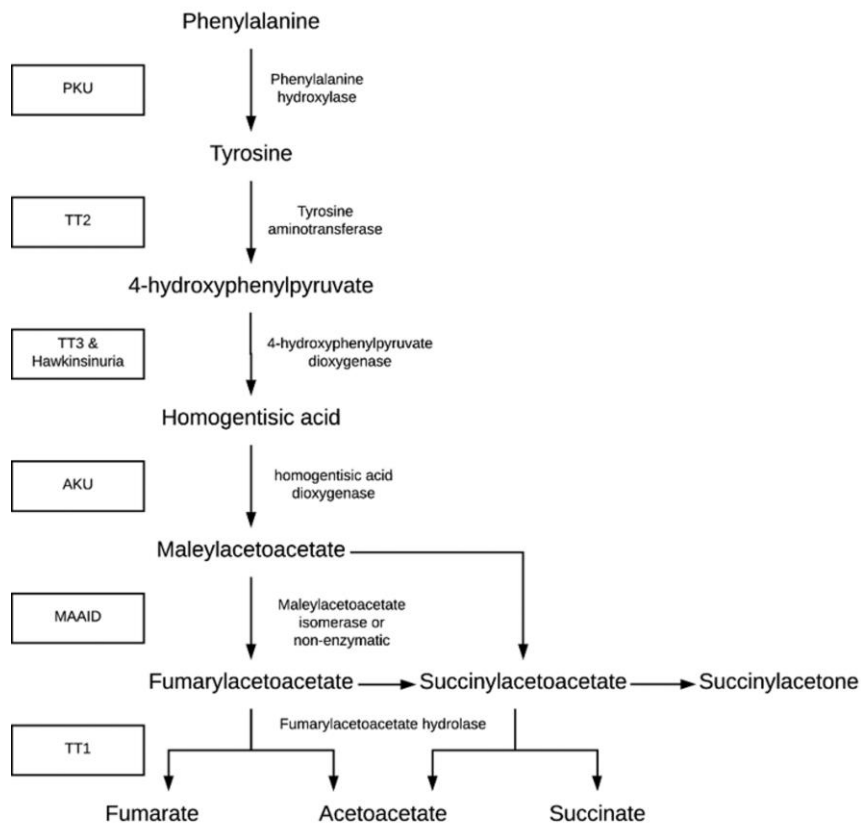
Η τυροσίνη είναι ένα μη απαραίτητο αμινοξύ το οποίο προέρχεται από δύο πηγές, είτε εξωγενώς από την διατροφή είτε ενδογενώς από την υδροξυλίωση της φαινυλαλανίνης. Αποτελεί πρόδρομο μόριο για την σύνθεση κατεχολαμινών, θυροειδών ορμονών και της μελανίνης. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, μέσω φωσφορυλίωσης ή σουλφώσης, των καταλοίπων τυροσίνης παίζουν καίριο ρόλο στην μεταφορά σημάτων και στην αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών. Το πρώτο στάδιο στον καταβολισμό της τυροσίνης είναι η μετατροπή της σε 4-υδροξυφαινυλπυροσταφυλικό οξύ από την αμινοτρανσφεράση τυροσίνης. Η τρανσαμίνωση της τυροσίνης μπορεί να πραγματοποιηθεί επίσης από την μιτοχονδριακή αμινοτρανσφεράση ασπαρτικού, σε μικρότερο βαθμό σε φυσιολογικές καταστάσεις. Η τυροσίνη φυσιολογικά καταβολίζεται και καταλήγει σε φουμαρικό και ακετοξικό οξύ, όπου το τελευταίο αυτό στάδιο καταλύει το ένζυμο υδρολάση του ακετοξικού φουμαρυλίου. Τα ενδιάμεσα του καταβολισμού αυτού, το μαλεϊλοακετοξικό και ακετοξικό του φουμαρυλίου, ανάγονται σε ηλεκτροακετοξικό, το οποίο αποκαρβοξυλιώνεται και προκύπτει η ηλεκτρολοακετόνη[3].

Διαταραχή σε κάποιο από τα ένζυμα που εμπλέκονται στον μεταβολισμό της τυροσίνης οδηγεί σε υπερτυροσιναιμία. Η υπερτυροσιναιμία σε νεογνά συχνά οφείλεται σε ελλιπή δράση του ενζύμου δεϋδρογονάση του 4-υδροξυφενυλοπυροσταφυλικού. Ωστόσο, η επιμένουσα τυροσιναιμία υποδηλώνει την παρουσία κάποιου ενδογενούς νοσήματος στον μεταβολισμό της τυροσίνης. Έχουν καταγραφεί έξι βασικά ενδογενή νοσήματα του μεταβολισμού της τυροσίνης, η τυροσιναιμία τύπου I, τυροσιναιμία τύπου II, τυροσιναιμία τύπου III, η Hawksinuria, η Αλκαπτονουρία καθώς και η έλλειψη της ισομεράσης του μαλεΐλοακετοξικού. Τα νοσήματα αυτά, τα γονίδια στα οποία έχει καταγραφεί η μετάλλαξη καθώς και οι πρωτεΐνες που εκφράζονται σε κάθε περίπτωση παρατίθενται στον πίνακα παρακάτω[37].

Πίνακας 4: Τα νοσήματα που σχετίζονται με τον μεταβολισμό της τυροσίνης, τα γονίδια στα οποία έχει καταγραφεί η μετάλλαξη καθώς και οι πρωτεΐνες που εκφράζονται σε κάθε περίπτωση

Νόσος	Γονίδιο	Χρωμόσωμα	Ένζυμο που επηρεάζεται
<i>Τυροσιναιμία Τύπου I</i>	FAH	15q25.1	Υδρολάση του ακετοξικού φουμαρυλίου
<i>Τυροσιναιμία Τύπου II</i>	TAT	16q22.2	Αμινοτρανσφεράση τυροσίνης
<i>Τυροσιναιμία Τύπου III</i>	HPD	12q24.31	Διοξυγενάση του 4-υδροξυφαινυλπυροσταφυλικού
<i>Hawksinuria</i>	HPD	12q24.31	Υδροξυλάση του 4-υδροξυφαινυλπυροσταφυλικού
<i>Αλκαπτονουρία</i>	HGD	3q13.33	1,2-διοξυγενάση του ομογεντισικού
<i>Έλλειψη της ισομεράσης του μαλεΐλοακετοξικού</i>	GSTZ1	14q24.3	Ισομεράση του μαλεΐλοακετοξικού

Ενώ στην εικόνα φαίνεται ο μεταβολισμός της τυροσίνης και τα ένζυμα που εμπλέκονται στο βιοχημικό αυτό μονοπάτι, ενώ επισημαίνονται σε κάθε περίπτωση τα ενδογενή νοσήματα του μεταβολισμού της τυροσίνης.



Εικόνα 21: Ο μεταβολισμός της τυροσίνης και τα ένζυμα που εμπλέκονται στο βιοχημικό αυτό μονοπάτι.

Η Τυροσιναιμία τύπου I κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο και οφείλεται σε μετάλλαξη στο γονίδιο FAH που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 15 στο σημείο 15q25.1, η οποία οδηγεί σε διαταραχή του ενζύμου υδρολάση του ακετοξικού φουμαρυλίου. Κλινικά, οι ασθενείς εμφανίζουν συχνότερα σοβαρά ηπατικά και νεφρικά προβλήματα με ταυτόχρονη διαταραχή της νευρικής τους λειτουργίας, ενώ σπανιότερα έχουν παρατηρηθεί ακόμα και μυοκαρδιοπάθειες και υπερινσουλιναιμίες εξαιτίας της υπερτροφίας των παγκρεατικών κυττάρων. Υπολογίζεται ότι σε παγκόσμια κλίμακα 1 στα 100000 νεογνά πάσχουν από τυροσιναιμία τύπου I, ενώ είναι συχνότερη σε Καναδά και Νορβηγία[28].

Το γονίδιο FAH εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ και στους νεφρούς. Οι μεταβολίτες που προκύπτουν από το συγκεκριμένο βιοχημικό μονοπάτι, ειδικότερα τα

μαλεϊλοακετοξικό, ακετοξικό φουμαρυλίου καθώς και τα παράγωγα τους, ηλεκτρυλο ακετόνη και ηλεκτρυλο ακετοξικό συσσωρεύονται και είναι αυτά που ασκούν την παθογόνο δράση. Τα μαλεϊλοακετοξικό και ακετοξικό φουμαρυλίου επηρεάζουν μόνο τα κύτταρα των οργάνων στα οποία παράγονται και κατά συνέπεια δεν εντοπίζονται στα βιολογικά υγρά των ασθενών. Αντίθετα η ηλεκτρυλοακετόνη και το ηλεκτρυλοακετοξικό μπορούν εύκολα να ανιχνευθούν στο πλάσμα και στα ούρα των ασθενών.

Η έγκαιρη διάγνωση καθώς και η θεραπεία της τυροσιναιμίας παίζει καίριο ρόλο στην πορεία της ασθένειας. Όσον αφορά την διάγνωση, στο παρελθόν αξιολογούνταν τα επίπεδα της τυροσίνης που οδηγούσε ωστόσο σε ψευδή θετικά και ψευδή αρνητικά αποτελέσματα εξαιτίας της αστάθειας στην διακύμανση της συγκέντρωσης του μεταβολίτη. Για τον λόγο αυτό, έχει υιοθετηθεί ευρέως η χρήση της ηλεκτρυλο ακετόνης ως ειδικός δείκτης για την τυροσιναιμία τύπου I. Η ηλεκτρυλο ακετόνη αποτελεί ισχυρό αναστολέα του ενζύμου αφυδρογονάση του 5-αμινολεβουλινικού οξέος. Κατά συνέπεια οι ασθενείς με τυροσιναιμία τύπου I έχουν υψηλά επίπεδα 5-αμινολεβουλινικού οξέος, το οποίο αποτελεί νευροτοξικό παράγοντα και πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνο για τις οξείες νευρολογικές κρίσεις των ασθενών. Συγχρόνως η ηλεκτρυλο ακετόνη διαταράσσει την νεφρική σωληναριακή λειτουργία, την σύνθεση της αίμης καθώς και την φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού. Τα υψηλά επίπεδα της ηλεκτρυλο ακετόνης στον έλεγχο στο αίμα, στο πλάσμα ή τα ούρα των ασθενών αποτελούν παθογνωμονικά για την συγκεκριμένη νόσο. Επιπρόσθετα παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα τυροσίνης, φαινυλαανίνης και μεθειονίνης στο πλάσμα ενώ στα ούρα των ασθενών μπορεί να απεκκρίνεται σε μεγάλο βαθμό 5-αμινολεβουλινικό οξύ. Σε πολλές περιπτώσεις η διάγνωση επιβεβαιώνεται και με γενετικό έλεγχο[3], [28], [37].

Η *Τυροσιναιμία τύπου II* κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο και οφείλεται σε μετάλλαξη του γονιδίου TAT που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 16 στο σημείο 16q22.1-q22.3, η οποία οδηγεί σε διαταραχή του ηπατικού ενζύμου αμινοτρανσφεράση τυροσίνης. Η δυσλειτουργία του ενζύμου έχει ως αποτέλεσμα την σημαντική αύξηση των επιπέδων της τυροσίνης στον ορό και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό των ασθενών. Συγχρόνως παρατηρείται αυξημένη παραγωγή φαινολικών οξέων, του 4-υδροξυφαινόλυπυροσταφυλλικού, του 4-υδροξυφαινόλυγαλακτικού και του 4-υδροξυφαινόλυακετοξικού, η οποία ενδεχομένως να οφείλεται στην απαμίνωση της

τυροσίνης στους νεφρούς ή στον καταβολισμό της τυροσίνης από την μιτοχονδριακή αμινοτρασφεράση. Κλινικά, η νόσος χαρακτηρίζεται από οφθαλμικές και δερματικές αλλοιώσεις, νευρικές επιπλοκές ή οποιονδήποτε συνδυασμό αυτών. Η διαταραχή εμφανίζεται συνήθως από την βρεφική ηλικία αλλά μπορεί να εκδηλωθεί σε οποιαδήποτε φάση της ζωής του ατόμου. Τα οφθαλμικά συμπτώματα είναι το συχνότερο και επιμένον πρόβλημα και δύναται να εμφανιστούν από τους πρώτους μήνες ζωής των ασθενών με εμφάνιση φωτοευαισθησίας, δακρύρροια και οξύ πόνο. Η ενδεχόμενη βλάβη στον κερατοειδή έχει συσχετιστεί με κρυστάλλωση της τυροσίνης στα επιθηλιακά κύτταρα του κερατοειδούς, η οποία οδηγεί σε διαταραχή της κυτταρικής λειτουργίας και επάγει φλεγμονώδη αντίδραση.

Όσον αφορά την διάγνωση της τυροσιναιμίας τύπου II, έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα τυροσίνης πλάσματος που συνήθως ξεπερνούν τα 21.7 mg/dl (1200 μmol/L). Συγχρόνως παρατηρείται αυξημένη απέκκριση των φαινολικών οξέων στα ούρα, 4-υδροξυφαινόλυπυροσταφυλλικού, 4-υδροξυφαινόλυγαλακτικού και 4-υδροξυφαινόλυακετοξικού καθώς και της N-ακετυλοτυροσίνης και της 4-τυραμίνης. Η διάγνωση μπορεί να επιβεβαιωθεί και με γενετικό έλεγχο [3], [28], [37].

Η *Τυροσιναιμία τύπου III* κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο και οφείλεται σε μετάλλαξη του γονιδίου HPD που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12 στο σημείο 12q24.31, η οποία οδηγεί σε διαταραχή του ενζύμου διοξυγενάση του 4-υδροξυφαινόλυπυροσταφυλλικού, που εκφράζεται στο ήπαρ και στους νεφρούς. Σαν αποτέλεσμα παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα τυροσίνης στο πλάσμα καθώς και αυξημένη έκκριση στα ούρα των φαινολικών οξέων, 4-υδροξυφαινόλυπυροσταφυλλικό, 4-υδροξυφαινόλυγαλακτικό και του 4-υδροξυφαινόλυακετοξικού. Κλινικά εμφανίζεται με νευρολογικά συμπτώματα, όπως νοητική στέρηση, αταξία, τρέμουλο, μικροκεφαλία και επιληπτικές κρίσεις.

Όσον αφορά την διάγνωση της νόσου πραγματοποιείται αξιολόγηση των αυξημένων επιπέδων τυροσίνης πλάσματος, η οποία είναι της τάξης των 5.5 – 23.5 mg/dl (300–1300 μmol/L) και συνοδεύονται από αυξημένη έκκριση των φαινολικών οξέων στα ούρα. Η διάγνωση μπορεί να επιβεβαιωθεί με ενζυμική δοκιμασία σε ιστό βιοψίας που έχει ληφθεί από το ήπαρ ή τους νεφρούς καθώς και από γενετικό έλεγχο.

Αποτελεί καίριας σημασίας η διάκριση μεταξύ των τριών τύπων τυροσιναιμίας. Προκειμένου να αποκλείσουμε την τυροσιναιμία τύπου I, πρέπει να παρατηρείται

φυσιολογική ηπατική λειτουργία καθώς και φυσιολογικά επίπεδα ηλεκτρυλο ακετόνης. Η διάκριση μεταξύ της τυροσιναιμίας τύπου II και τύπου III είναι δυσκολότερη, καθώς η τυροσίνη τείνει να είναι σε υψηλότερα επίπεδα στην τύπου II, ενώ τα αυξημένα οργανικά και φαινολικά οξέα καταδεικνύουν τυροσιναιμία τύπου III [3], [28], [37].

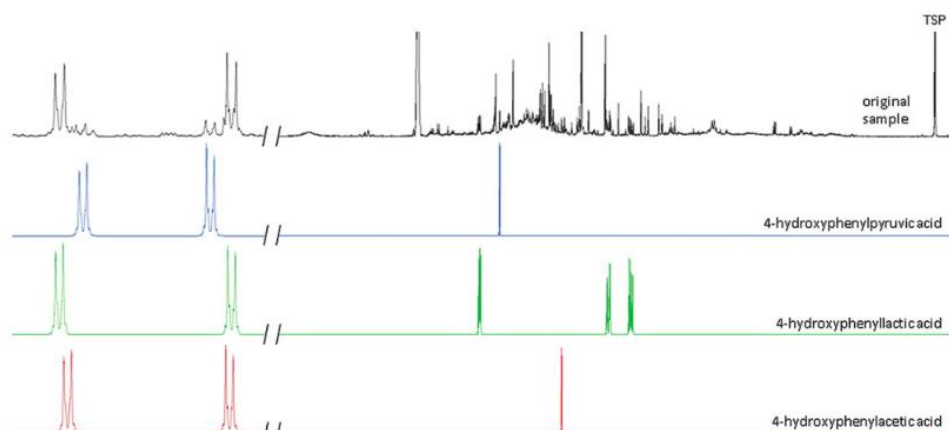
Έχουν πραγματοποιηθεί έρευνες για την διάγνωση των τυροσιναιμιών με την χρήση της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, στα βιολογικά υγρά ασθενών. Με βάση την βιβλιογραφία, το βασικό γνώρισμα είναι τα αυξημένα επίπεδα τυροσίνης τόσο στο πλάσμα όσο και στα ούρα, ενώ και στην μελέτη των *Aygen et al* που δεν παρατηρήθηκε αυξημένη τυροσίνη στα ούρα, είχαν ήδη προσδιοριστεί υψηλά επίπεδα στο αίμα των ασθενών. Συγχρόνως για την τυροσιναιμία τύπου I έχουν ταυτοποιηθεί στα ούρα των ασθενών τα 4-υδροξυφαινυλγαλακτικό και 4-υδροξυφαινυλακετοξικό ενώ έχουν παρατηρηθεί αυξημένοι, σε σχέση πάντα με υγιή άτομα, οι μεταβολίτες: βεταΐνη, μεθειονίνη, N-ακετυλοτυροσίνη, κιτρικό, γαλακτικό, γλουταμικό οξύ, αλανίνη, α- και β-γλυκόζη. Ενώ η ηλεκτρυλο ακετόνη που αποτελεί παθογνωμικός δείκτης της νόσου δεν μπορεί εύκολα να ταυτοποιηθεί με την χρήση του NMR. Για την τυροσιναιμία τύπου II έχουν ταυτοποιηθεί και τα τρία 4-υδροξυφαινολικά οξέα, χαρακτηριστικά της νόσου ενώ ταυτόχρονα έχουν βρεθεί αυξημένοι οι μεταβολίτες: N-ακετυλοτυροσίνη, φορμικό, γαλακτικό οξύ, αλανίνη και λοιπά αμινοξέα καθώς και μονομεθυλεστέρας του γλουταρικού οξέος. Ενώ στην μελέτη των *Aygen et al* δεν μπόρεσε να γίνει διάκριση μεταξύ τυροσιναιμίας II και III εξαιτίας της απουσίας δείγματος πλάσματος. Ωστόσο η τυροσιναιμία τύπου I αποκλείστηκε γιατί θα αναμενόταν στα ούρα των ασθενών 5-όξοπρολίνη και 4-υδροξυκυκλοεξαγαλακτικό, που απουσίαζαν στην συγκεκριμένη περίπτωση. Συνοπτικά τα παραπάνω παρατίθενται στον πίνακα παρακάτω [25], [38]–[42]:

Πίνακας 5: Αποτελέσματα ερευνών με την χρήση της φασματοσκοπίας NMR για τα νοσήματα που αφορούν τον μεταβολισμό της τυροσίνης

Μελέτη	Νόσημα	Βιολογικό Υγρό		Τεχνική	Μεταβολίτες
		Ούρα	Πλάσμα		
<i>Pontoni et al. (1981)</i>	Tyr II	Ούρα		NMR	Τυροσίνη
		Πλάσμα			Τυροσίνη

<i>Engelke et al. (2004)</i>	Tyr I	Ούρα	NMR	Τυροσίνη, βεταΐνη, μεθειονίνη 4-υδροξυφαινυλγαλακτικό οξύ, N-ακετυλοτυροσίνη
	Tyr II			N-ακέτυλοτυροσίνη
<i>Pan et al. (2007)</i>	Tyr II	Ούρα	NMR	Τυροσίνη, φορμικό, γαλακτικό, 4-υδροξυφαινυλγαλακτικό, αλανίνη και μονομεθυλεστερας του γλουταρικού οξέος
<i>Shanaia et al. (2007)</i>	Tyr II	Ούρα	NMR	Τυροσίνη και άλλα αμινοξέα 4-υδροξυφαινυλγαλακτικό, 4-υδροξυφαινυλακετοξικό, 4- υδροξυφαινυλπυροσταφυλλικό
<i>Bal et al. (2008)</i>	Tyr I	Ούρα	¹³ C NMR	Τυροσίνη, κιτρικό 4-υδροξυφαινυλγαλακτικό, 4-υδροξυφαινυλακετοξικό, γαλακτικό, γλουταμικό οξύ, αλανίνη, α- και β-γλυκόζη
<i>Aygen et al. (2014)</i>	Tyr II ή III	Ούρα	NMR	4-υδροξυφαινυλγαλακτικό, 4-υδροξυφαινυλακετοξικό, 4- υδροξυφαινυλπυροσταφυλλικό

Ενδεικτικά παρατίθενται φάσματα ούρων ασθενών με τυροσιναιμία τύπου II ή III και τύπου I, εστιασμένα στην περιοχή του φάσματος που εντοπίζονται οι μεταβολίτες που μας ενδιαφέρουν:

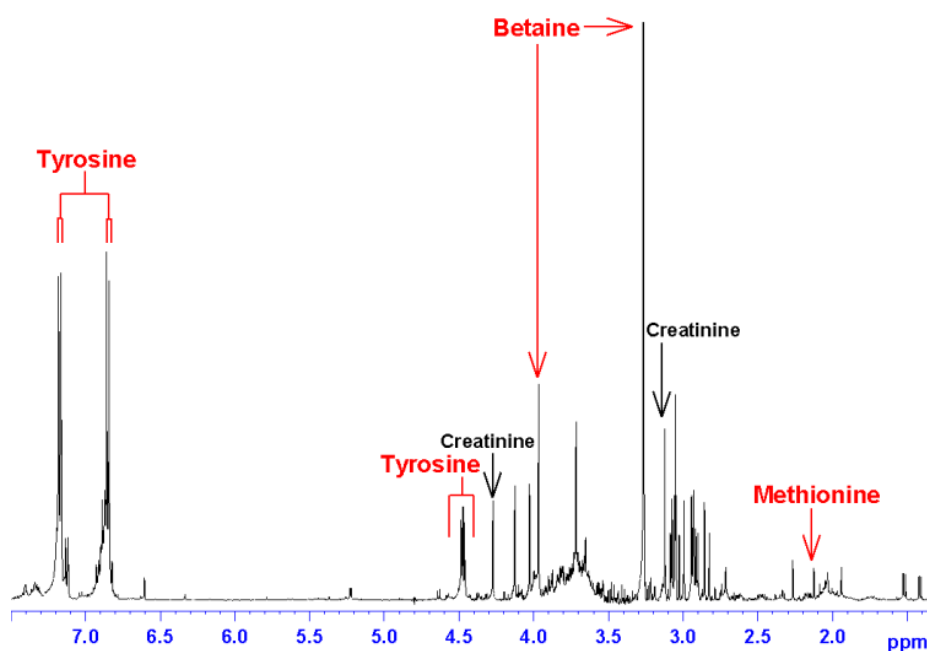


Εικόνα 22: Φάσμα HNMR ούρων ασθενή με τυροσιναιμία τύπου II ή III

Γαλακτοζαιμία

Η γαλακτοζαιμία είναι ένα ενδογενές νόσημα του μεταβολισμού των υδατανθρακών που οφείλεται σε ατελή δράση ενός από τα τρία ένζυμα που σχετίζονται με τον μεταβολισμό της γαλακτόζης. Τα ένζυμα αυτά είναι η γαλακτοκινάση (GALK), η ουριδυλοτρανσφεράση της φωσφορικής-1- γαλακτόζης (GALT) και η επιμεράση της UDP-γαλακτόζης (GALE), ενώ η ελλιπής δράση οποιουδήποτε από αυτά μπορεί να οδηγήσει σε υπεργαλακτοζαιμία. Συχνότερα εμφανίζεται δυσλειτουργία της GALT η οποία οδηγεί σε κλασική γαλακτοζαιμία. Κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο και εμφανίζεται με συχνότητα 1/ 40.000 – 60.000 στην Ευρώπη και τις ΗΠΑ.

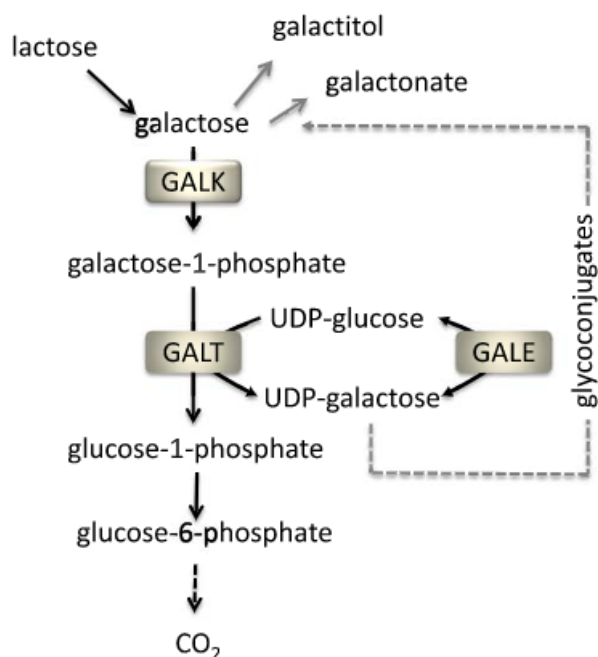
Tyrosinemia type I



Εικόνα 23: Φάσμα HNMR ούρων ασθενή με τυροσιναιμία τύπου I

Η γαλακτόζη είναι μια αλδοεξόζη που υπάρχει σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς ως μεταβολίτης, ενώ ταυτόχρονα έχει και δομικό ρόλο, καθώς αποτελεί συστατικό πολλών μακρομορίων. Μετά την πέψη της, η γαλακτόζη απορροφάται στο λεπτό έντερο από τα εντεροκύτταρα και εισέρχεται στο ήπαρ μέσω της πυλαίας φλέβας. Ο μεταβολισμός της πραγματοποιείται από τρία ένζυμα μέσα από το μονοπάτι του Leloir που φαίνεται και στην εικόνα 24. Απουσία ενός εκ των βασικών ενζύμων του μονοπατιού, η γαλακτόζη μεταβολίζεται μέσα από εναλλακτικά μονοπάτια και κατ'

επέκταση παρατηρείται συσσώρευση άλλων μεταβολιτών, της γαλακτιτόλης και του γαλακτονικού οξέος.



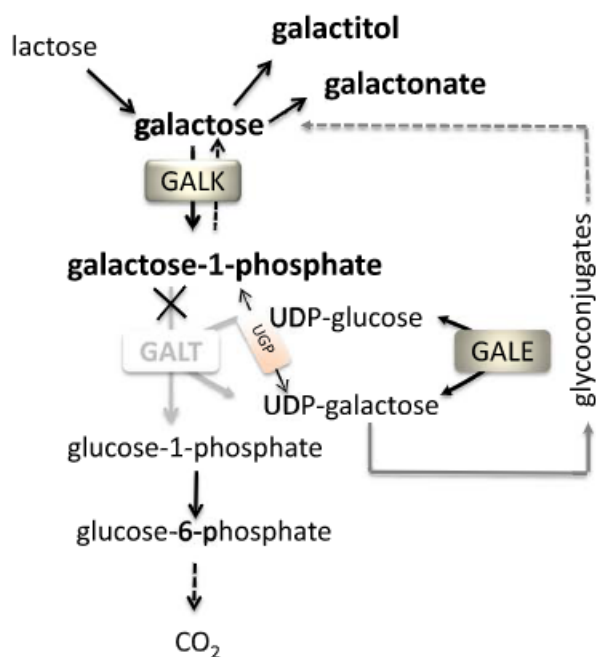
Εικόνα 24: Μεταβολισμός γαλακτόζης (μονοπάτι του Leloir)

Η ανεπάρκεια του GALT οδηγεί σε «Κλασική γαλακτοζαιμία». Οι ασθενείς με κλασική γαλακτοζαιμία παρουσιάζουν σοβαρή ανεπάρκεια GALT. Εμφανίζεται τυπικά στη νεογνική περίοδο, με κακή σίτιση και μειωμένη ανάπτυξη, ίκτερο, διόγκωση και δυσλειτουργία του ήπατος, λήθαργο, υποτονία, νεφρική σωληναριακή νόσο και σηψαιμία. Ο διαιτητικός περιορισμός της γαλακτόζης δύναται να βελτιώσει αυτές τις νεογνικές επιπλοκές.

Η διάγνωση της γαλακτοζαιμίας πραγματοποιείται με βάση την κλινική εικόνα του νεογνού σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα του προσυμπτωματικού ελέγχου ή/και των εργαστηριακών ευρημάτων. Ως δείκτης χρησιμοποιούνται τα επίπεδα της 1-φωσφορικής-γαλακτόζης καθώς και η ενζυμική δραστηριότητα του GALT στα ερυθρά αιμοσφαίρια ενώ συγχρόνως μπορεί να πραγματοποιηθεί μοριακός έλεγχος στο γονίδιο που κωδικοποιεί το GALT. Συγκεκριμένα όσον αφορά τον προσυμπτωματικό έλεγχο των νεογνών, στις περισσότερες χώρες πραγματοποιείται μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας καθώς και των επιπέδων γαλακτόζης και Gal-1-P. Υψηλά επίπεδα γαλακτόζης σε συνδυασμό με μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα υποδηλώνουν την ύπαρξη κλασικής γαλακτοζαιμίας. Σε περίπτωση που εντοπιστούν υψηλά επίπεδα

γαλακτόζης χωρίς μειωμένη ενζυμική δράση πρέπει να διερευνηθεί η περίπτωση ανεπάρκειας των ενζύμων GALK και GALE καθώς και άλλες νόσοι που μπορεί να οδηγήσουν σε δευτερεύουσα υπεργαλακτοζαιμία, όπως συγγενείς ηπατικές αρτηριοφλεβώδεις δυσπλασίες.

Ο τρόπος με τον οποίο το βιοχημικό μονοπάτι διαταράσσεται φαίνεται στην εικόνα[43]:



Εικόνα 25: Το βιοχημικό μονοπάτι που διαταράσσεται στην γαλακτοζαιμία

Όσον αφορά την χρήση της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, σε ούρα ασθενών που πάσχουν από γαλακτοζαιμία εξαιτίας της ελλιπούς δραστηριότητας του GALT, εμφανίζονται κυρίως αυξημένα τα επίπεδα της γαλακτόζης[29], [44], [45] αλλά και της γαλακτιτόλης[44]–[46]. Ταυτόχρονα έχουν παρατηρηθεί, σε ούρα ασθενών, από τους Wehrli et al., αυξημένα επίπεδα γαλακτονικού οξέος[46]. Συγκεντρωτικά παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 6: Αποτελέσματα ερευνών με την χρήση της φασματοσκοπίας NMR για την Γαλακτοζαιμία

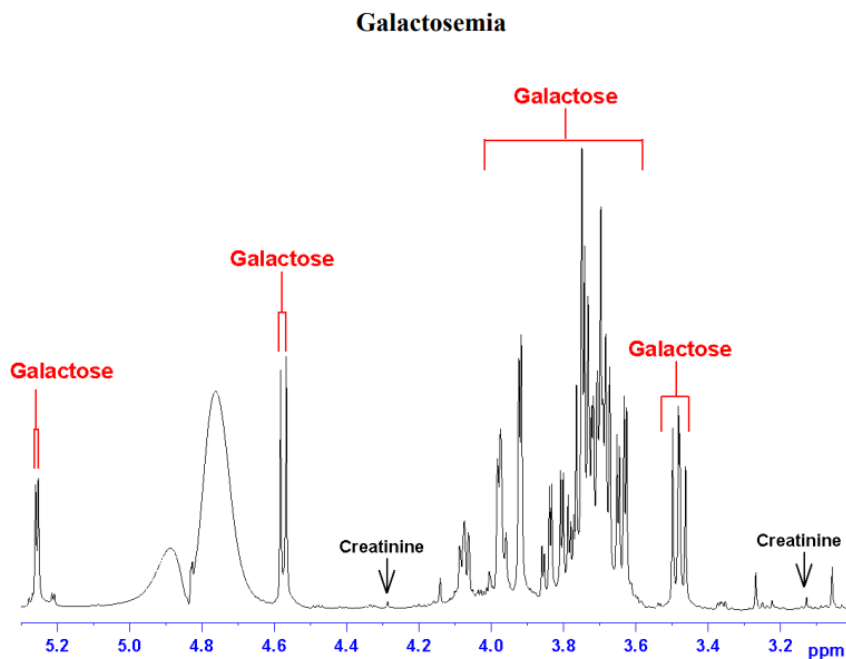
Μελέτη	Βιολογικό Υγρό	Μεταβολίτες
Wehrli et al. (1997)	Ούρα	Γαλακτονικό οξύ & Γαλακτιτόλη
Engelke et al. (2007)	Ούρα	Γαλακτόζη

Gramma et al. (2019)

Scurtul et al. (2021)

Ούρα	Γαλακτόζη & Γαλακτιτόλη
Ούρα	Γαλακτόζη & Γαλακτιτόλη

Παρακάτω παρατίθεται ενδεικτικά ένα φάσμα ούρων ασθενή που πάσχει από γαλακτοζαιμία εξαιτίας της ανεπαρκούς δράσης του ενζύμου GALT, εστιασμένο στην περιοχή του φάσματος που εντοπίζονται οι μεταβολίτες που μας ενδιαφέρουν, όπου έχουν αποδοθεί οι κορυφές που αντιστοιχούν στην γαλακτόζη[29].



Εικόνα 26: Επιλεγμένο φάσμα NMR ούρων ασθενή με γαλακτοζαιμία

Οξέωσεις που οφείλονται στην συσσώρευση οργανικών οξέων

Η ανεπάρκεια ενός ενζύμου ή μιας πρωτεΐνης μεταφορέα που απαιτείται σε κάποια από τις μεταβολικές οδούς που εμπλέκονται στον καταβολισμό των αμινοξέων, των υδατανθράκων ή των λιπιδίων μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση οργανικών οξέων, καθώς τα οργανικά οξέα αποτελούν ενδιάμεσα των οδών αυτών. Τα πλεονάζοντα προϊόντα που προκύπτουν απεκκρίνονται στα ούρα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση οξέωσης στα ούρα και στο αίμα των ασθενών. Η εκάστοτε διαταραχή μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση συγκεκριμένων οργανικών οξέων και κατά συνέπεια τα οργανικά οξέα αυτά να μπορούν να αξιοποιηθούν ως βιοδείκτες για τις νόσους αυτές.

Οι διαταραχές αυτές ως επί το πλείστον κληρονομούνται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο. Σημαντικές ασθένειες αυτής της κατηγορίας είναι η προπιονική οξέωση (PA), η μεθυλομαλονική οξέωση (MMA), η ισοβαλερική οξέωση (IVA) καθώς και η γλουταρική οξέωση τύπου I (GA1). Κλινικά στα νεογνά, παρατηρείται εγκεφαλοπάθεια, ενώ ο λήθαργος και τα προβλήματα σίτισης σε συνδυασμό με αφυδάτωση αποτελούν πρώιμα συμπτώματα. Το προκύπτον εγκεφαλικό οίδημα μπορεί να οδηγήσει σε κώμα και ακόμη και θάνατο. Πανκυτταροπενία και μυελοδυσπλασία παρατηρούνται στις PA και MMA. Δύναται συγχρόνως να προκύψει πολυοργανική ανεπάρκεια. Επίσης μια ασυνήθιστη δυσάρεστη οσμή των ποδιών μπορεί να έχει διαγνωστική αξία για την ισοβαλερική οξέωση[3].

Όσον αφορά τις προπιονική, μεθυλομαλονική και ισοβαλερική οξέωση, είναι αποτέλεσμα ελλιπούς δράσης των ενζύμων που καταλύουν τον καταβολισμό των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας. Η ειδοποιός διαφορά μεταξύ των διαφόρων οξέωσεων και των διαταραχών στον μεταβολισμό των αμινοξέων, είναι η συσσώρευση στα μιτοχόνδρια μεταβολιτών του συνενζύμου-A (CoA). Ειδικότερα, η ισοβαλερική οξέωση προκαλείται από ατελής δράση της δεϋδρογονάσης του ισοβαλερικού-CoA, ένα ένζυμο που εμπλέκεται στην καταβολική οδό της λευκίνης. Η προπιονική οξέωση οφείλεται στην συσσώρευση του προπιονυλο-CoA, εξαιτίας της ανεπάρκειας του ενζύμου, καρβοξυλάση του προπιονυλο-CoA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή ενζύμων που εμπλέκονται σε σημαντικές μεταβολικές οδούς όπως στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος και του κύκλου της ουρίας. Η μεθυλομαλονική οξέωση είναι αποτέλεσμα της ανεπάρκειας του ενζύμου μούτωση του μεθυλομαλονυλο-CoA. Δευτερογενής ανεπάρκεια αυτού του ενζύμου μπορεί επίσης να προκληθεί από τον ανεπαρκή μεταβολισμό του συμπαραγόντα της, κοβαλαμίνη, καθώς και από μη γενετικά εξαρτώμενους παράγοντες όπως η ανεπάρκεια της βιταμίνης B12. Τέλος, η γλουταρική οξέωση τύπου I προκαλείται από διαταραχή στην λειτουργία ενός ενζύμου που εμπλέκεται στον καταβολισμό της λυσίνης και της τρυπτοφάνης, η δεϋδρογονάση του γλουταρυλο-CoA.

Βιοχημικά, στους ασθενείς παρατηρείται, μεταβολική οξέωση υψηλού χάσματος ανιόντων, συσσώρευση γαλακτικού, κετονών και ενδιάμεσα προϊόντα του κύκλου του Krebs, καθώς και υπογλυκαιμία και υπεραμμωναιμία. Απαιτούνται εξειδικευμένες εξετάσεις προκειμένου να επιβεβαιωθεί η διάγνωση. Ειδικότερα, η μέτρηση των ακυλοκαρνιτινών στο πλάσμα καταδεικνύει, χαμηλή ολική καρνιτίνη και

για τις τέσσερις οργανικές οξέωσεις. Η ανάλυση των οργανικών οξέων του πλάσματος δείχνει αύξηση του 3-υδροξυπροπιονικού, του μέθυλοκιτρικού, της τιγλυγλυκίνης και της προπιονυγλυκίνης σε ασθενείς με προπιονική οξέωση. Ταυτόχρονα παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα μεθυλομαλονικού οξέος σε ασθενείς που πάσχουν από μεθυλομαλονική οξέωση. Στην ισοβαλερική οξέωση εντοπίζονται αυξημένα επίπεδα του 3-υδροξυϊσοβαλερικού οξύ και ισοβαλερυλογλυκίνη. Τέλος υψηλά επίπεδα 3-υδροξυγλουταρικό και γλουταρικό οξύ στην γλουταρική οξέωση τύπου I. Η ανάλυση των αμινοξέων, καταδεικνύει αυξημένη γλυκίνη σε ασθενείς με προπιονική, μεθυλομαλονική ή ισοβαλερική οξέωση. Ωστόσο, οι διαταραχές του μεταβολισμού δεν εμφανίζονται με τα ίδια συμπτώματα πάντα και κατ' επέκταση απαιτείται ενζυματική ή/και μοριακή ανάλυση προκειμένου να επιβεβαιωθεί η διάγνωση[3], [47].

Οι Engelke et al., μελέτησαν τις παραπάνω οξέωσεις με την χρήση της φασματοσκοπίας NMR σε ούρα ασθενών [29]. Τα αποτελέσματα τους παρατίθενται συγκεντρωτικά στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 7: Μεταβολίτες που εμφανίζονται αυξημένοι στα ούρα ασθενών με διαφορετικές οργανικές οξέωσεις σύμφωνα με τους Engelke et al.

Νόσημα	Βιολογικό Υγρό	Μεταβολίτες
<i>Προπιονική οξέωση</i>	Ούρα	3 – υδρόξυπροπιονικό, 3-υδρόξυβουτυρικό οξύ, ακετοξικό οξύ & ακετόνη & τιγλυγλυκίνη
<i>Μεθυλομαλονική οξέωση</i>	Ούρα	Μεθυλομαλονικό, 3 – υδρόξυπροπιονικό οξύ
<i>Ισοβαλερική οξέωση</i>	Ούρα	Ισοβαλερυλογλυκίνη, 3-υδρόξυϊσοβαλερικό οξύ
<i>Γλουταρική οξέωση τύπου I</i>	Ούρα	Γλουταρικό, 3-υδρόξυγλουταρικό οξύ

Έχουν πραγματοποιηθεί και άλλες μελέτες με την χρήση της φασματοσκοπίας NMR σε ούρα ασθενών που πάσχουν από τις παραπάνω οξέωσεις. Τα ευρήματα τους ταυτίζονται με αυτά των Engelke et al., ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν παρατηρηθεί και επιπλέον μεταβολίτες. Ειδικότερα, για την MMA το κύριο εύρημα

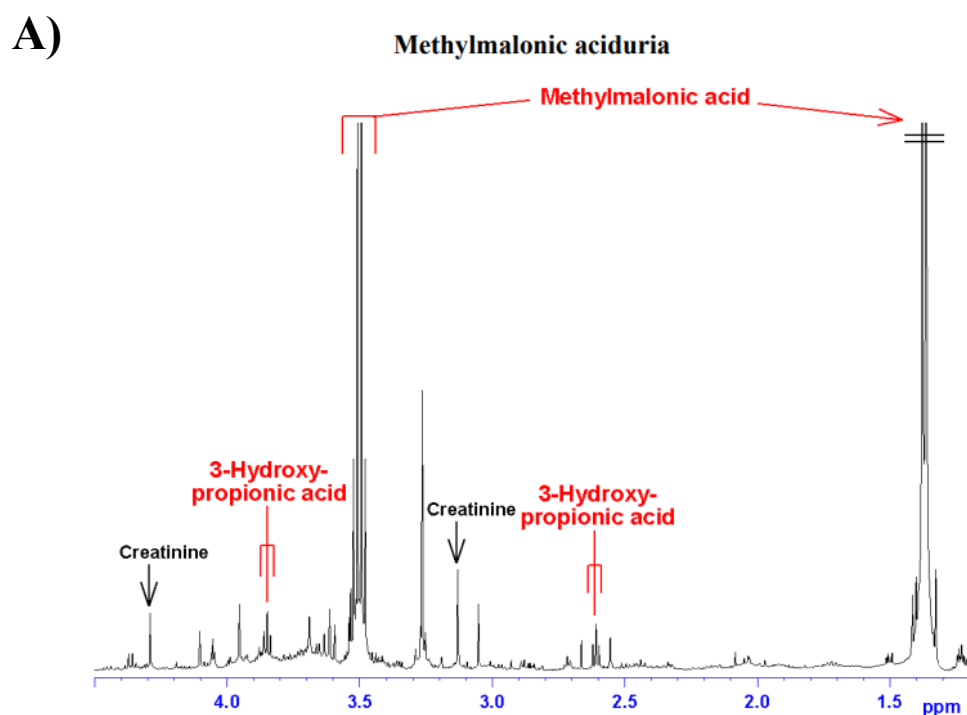
αποτελούν τα αυξημένα επίπεδα του μεθυλομαλονικού οξέος στα ούρα των ασθενών[1], [48]–[50], ενώ έχουν ταυτοποιηθεί και ασυνήθιστοι μεταβολίτες όπως η προπιόνυλοκαρνιτίνη, η καρνιτίνη, το οροτικό οξύ, η οροτιδίνη, το ουροκανικό οξύ το ΤΜΑΟ, και η ακυλοκαρνιτίνη [1], [50] καθώς και η γλυκίνη[49]. Όσον αφορά την IVA έχει παρατηρηθεί αυξημένη η συγκέντρωση του ισοβαλερικού οξέος[48] καθώς και των Ισοβαλερυλογλυκίνη, 3-υδροξυισοβαλερικό οξύ, και σε περιπτώσεις οξείας κρίσης η ισοβαλερυλοαλανίνη[32]. Στην περίπτωση της PA έχουν εντοπιστεί ασυνήθιστοι μεταβολίτες σε ούρα ασθενών, συγκεκριμένα οι 3-υδροξυ-N-βαλερικό, μέθυλοκιτρικό, προπιόνυλογλυκίνη, 3-υδροξυ-N-βουτυρικό, γαλακτικό, 3-υδροξυπροπιονικό, τιγυλγλυκίνη και ιππουρικό[49] ενώ παρατηρούνται και αυξημένα επίπεδα προπιονικού οξέος[32]. Τέλος όσον αφορά την GA1, έχουν παρατηρηθεί αυξημένα τα επίπεδα του γλουταρικού οξέος[32].

Πίνακας 8: Αποτελέσματα ερευνών με την χρήση της φασματοσκοπίας NMR για τις διαφορετικές οργανικές οξέωσεις

Μελέτη	Νόσημα	Βιολογικό Υγρό	Μεταβολίτες
<i>Yamaguchi et al.</i> (1985)	MMA	Ούρα	Μεθυλομαλονικό οξύ
	IVA	Ούρα	Ισοβαλερικό οξύ
<i>Kodama et al.</i> (1991)	PA	Ούρα	3- υδροξυ-N-βαλερικό, μέθυλοκιτρικό, προπιόνυλογλυκίνη, 3-υδροξυ- N-βουτυρικό, γαλακτικό, 3- υδροξυπροπιονικό, τιγυλγλυκίνη και ιππουρικό
	MMA	Ούρα	Μεθυλομαλονικό οξύ & Γλυκίνη
<i>Kostidis et al.</i> (2015)	MMA	Ούρα	Μεθυλομαλονικό & Ουροκανικό οξύ & ΤΜΑΟ, καρνιτίνη, ακυλοκαρνιτίνη
	MMA	Ούρα	Μεθυλομαλονικό οξύ, Προπιόνυλοκαρνιτίνη,

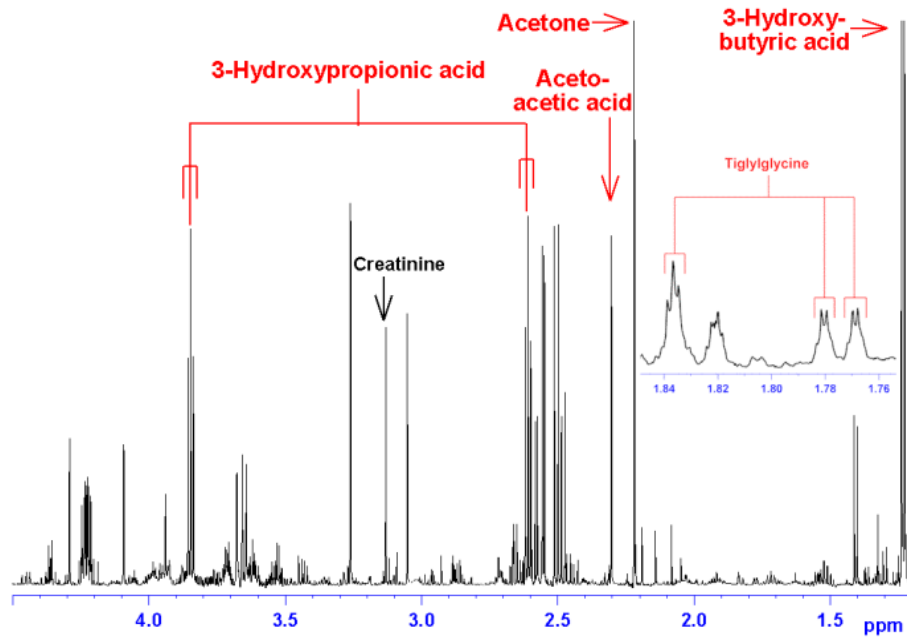
<i>Nicolescu et al.</i> (2020)			Καρνιτίνη, Οροτικό Οξύ, Οροτιδίνη
<i>Pulido et al.</i> (2021)	PA	Ούρα	Προπιονικό & 3- υδρόξυπροπιονικό & 3- υδρόξυβουτυρικό οξύ, προπιονυλογλυκίνη
	IVA		Ισοβαλερυλογλυκίνη, 3- υδρόξυισοβαλερικό οξύ, ισοβαλερυλοαλανίνη
	GA1		Γλουταρικό οξύ

Ενδεικτικά παρατίθενται φάσματα ούρων ασθενών με την αντίστοιχη οξέωση, εστιασμένα στην περιοχή του φάσματος που εντοπίζονται οι μεταβολίτες που μας ενδιαφέρουν:



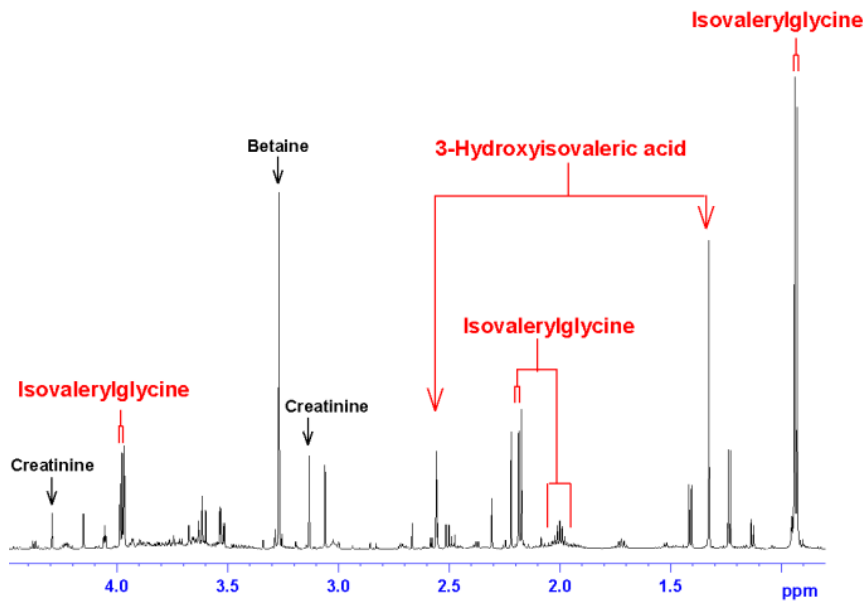
B)

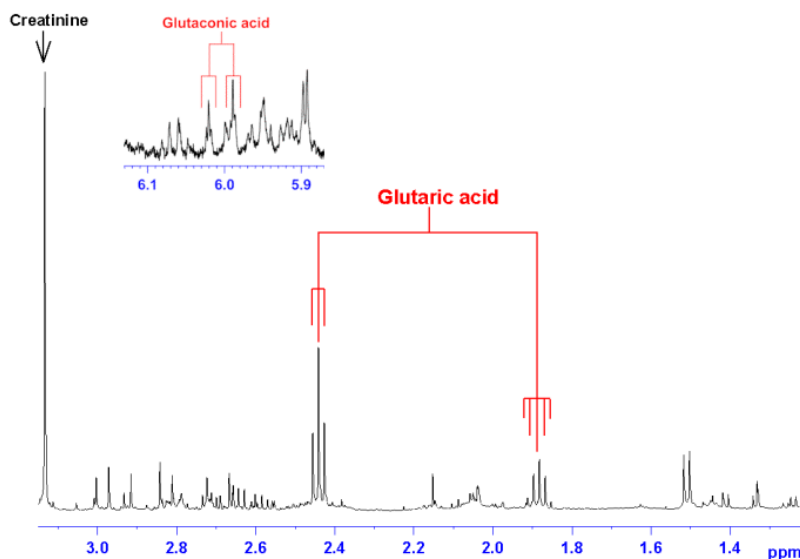
Propionic aciduria



C)

Isovaleric aciduria



D)**Glutaric aciduria type I**

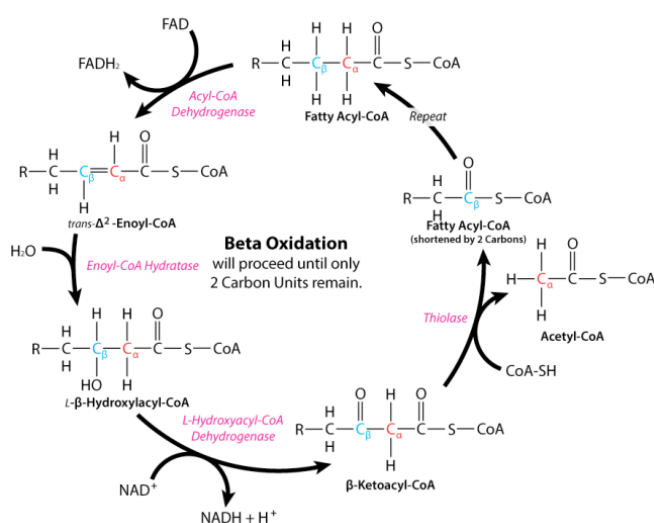
Εικόνα 27: Επιλεγμένα φάσματα NMR ούρων ασθενών με: A) Μεθυλομαλονική οξέωση B) Προπιονική οξέωση C) Ισοβαλερική οξέωση D) Γλουταρική οξέωση τύπου I

Διαταραχές της οξειδωσης των λιπαρών οξέων (FAODs)

Τα λιπαρά οξέα είναι σημαντική πηγή ενέργειας για τον οργανισμό και αποτελούν την βασική αποθήκη ενέργειας του. Προτιμώνται από τον καρδιακό μυ, έναντι της γλυκόζης, και είναι η κύρια πηγή ενέργειας του σκελετικού μυ κατά την διάρκεια της άσκησης. Κατά την διάρκεια πολύωρης νηστείας, οι περισσότεροι μυσ χρησιμοποιούν τα λιπαρά οξέα για την παραγωγή ενέργειας, έτσι ώστε η γλυκόζη να παραμείνει για να αξιοποιηθεί από τον εγκέφαλο. Η οξείδωση των λιπαρών οξέων, στο ήπαρ, εκτός από την παροχή ενέργειας παρέχει και ακέτυλο συνένζυμο-A (acetyl-CoA) για την σύνθεση των κετονοσωμάτων. Με την χρήση των κετονοσωμάτων, δύναται να αξιοποιηθεί ως πηγή ενέργειας τα λιπαρά οξέα και ο εγκέφαλος[3].

Η οξείδωση των λιπαρών οξέων, (εικόνα 27), πραγματοποιείται στην μήτρα του μιτοχονδρίου. Τα μικρού και μεσαίου μήκους αλυσίδας λιπαρά οξέα εισέρχονται στην μιτοχονδριακή μήτρα ελεύθερα, ενώ τα μεγάλα μήκους αλυσίδας απαιτούν την σύνδεση τους με καρνιτίνη προκειμένου να εισέλθουν. Η καρνιτίνη εισέρχεται στο κύτταρο μέσω ενός μεταφορέα της πλασματικής μεμβράνης και στην συνέχεια συνδέεται με ένα λιπαρό οξύ, μέσω της δράσης της παλμιτοϋλοτρανσφεράσης τύπου I

της καρνιτίνης (CPT1), στην εξωτερική μεμβράνη της μήτρας του μιτοχονδρίου. Το μόριο του λιπαρού οξέος με την καρνιτίνη (δηλ. η ακυλοκαρνιτίνη), μεταφέρεται στο εσωτερικό της μήτρας του μιτοχονδρίου, μέσω της μετατοπάσης καρνιτίνης-ακυλοκαρνιτίνης (CACT), προκειμένου να διαχωριστεί το λιπαρό οξύ από την καρνιτίνη από το ένζυμο παλμιτοϋλοτρανσφεράση τύπου 2 της καρνιτίνης (CPT2). Μόλις το ελεύθερο λιπαρό οξύ είναι διαθέσιμο στη μιτοχονδριακή μήτρα, υποβάλλεται σε τέσσερα διαδοχικά βήματα οξειδωσης που ολοκληρώνονται με την απόσπαση δύο ατόμων άνθρακα με τη μορφή ακέτυλου-CoA. Τα οξειδωτικά ένζυμα που συμμετέχουν εξαρτώνται από το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας των λιπαρών οξέων και έτσι υπάρχουν εξειδικευμένα ένζυμα για την οξειδωση λιπαρών οξέων βραχείας (Short Chain Acyl-CoA dehydrogenase, SCAD), μεσαίας (Medium Chain Acyl-CoA dehydrogenase, MCAD) και μακράς αλυσίδας (Long Chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, LCHAD). Τα SCAD και MCAD καθώς και η δεϋδρογονάση που οξειδώνει τα λιπαρά οξέα πολύ μακριάς αλυσίδας (Very Long Chain Acyl-CoA dehydrogenase, VLCAD) συμμετέχουν στο πρώτο βήμα της οξειδωσης, ενώ το LCHAD συμμετέχει στο τρίτο οξειδωτικό βήμα[3].



Εικόνα 28: Οξείδωση λιπαρών οξέων

Μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν οποιοδήποτε από τα ένζυμα που εμπλέκονται στο βιοχημικό μονοπάτι, οδηγεί σε ελλιπή ή καθόλου δράση του, και κατά συνέπεια στην ανάλογη ασθένεια. Όλα τα νοσήματα που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία κληρονομούνται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο, ωστόσο σε μερικές περιπτώσεις εμφανίζουν συμπτώματα και οι ετεροζυγώτες. Συγκεκριμένα τα γονίδια που κωδικοποιούν το εκάστοτε ένζυμο φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 9: Τα γονίδια στα οποία έχει καταγραφεί η μετάλλαξη, τα ένζυμα που εκφράζονται καθώς και τα νοσήματα που προκύπτουν σε κάθε περίπτωση στις διαταραχές οξείδωσης των λιπαρών οξέων

Γονίδιο	Ένζυμο που κωδικοποιεί	Νόσημα
<i>ACADVL</i>	VLCAD	Έλλειψη VLCAD
<i>ACADM</i>	MCAD	Έλλειψη MCAD
<i>HADHA</i>	LCHAD	Έλλειψη LCHAD
<i>SLC22A5</i>	Μεταφορέας πλασματικής μεμβράνης	Έλλειψη μεταφορέα
<i>CPT1A</i>	CPT1	Έλλειψη CPT1
<i>SLC2520</i>	CACT	Έλλειψη CACT
<i>CPT2</i>	CPT2	Έλλειψη CPT2

Κλινικά, οι διαταραχές οξείδωσης των λιπαρών οξέων (FAODs), προκαλούν τρεις καταστάσεις:

1. Οξεία υποκετονική υπογλυκαιμία και εγκεφαλοπάθεια, συνοδευόμενη από ηπατομεγαλία και ηπατική δυσλειτουργία, και σπάνια ίκτερο. Τα συμπτώματα επιδεινώνονται με την νηστεία ή κάποια λοίμωξη με έμετο.
2. Μυοκαρδιοπάθεια, συνήθως υπερτροφική, με εμφάνιση αρρυθμιών.
3. Μυοπάθεια, με εμφάνιση αδυναμίας είτε με οξεία ραβδομύολυση, η οποία μπορεί να επιδεινωθεί με άσκηση ή λοίμωξη

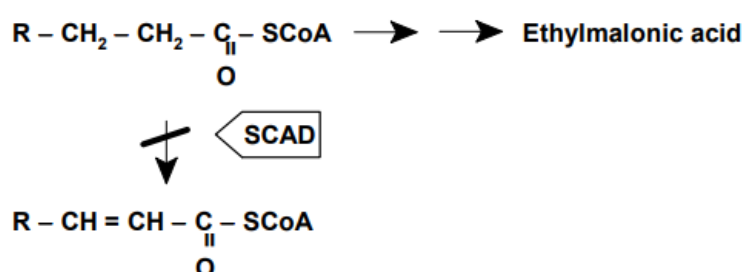
Ορισμένοι ασθενείς ωστόσο, δεν αναπτύσσουν ποτέ συμπτώματα, είτε επειδή έχουν ήπια μορφή κάποιας νόσου είτε επειδή δεν εκτίθενται στο απαραίτητο περιβαλλοντικό στρες[3], [14], [28].

Η υπογλυκαιμία που εμφανίζεται οφείλεται στην αδυναμία λήψης της απαιτούμενης ενέργειας από την οξείδωση των λιπαρών οξέων. Η ελλιπής οξείδωση των λιπαρών οξέων οδηγεί σε αύξηση τους στην κυκλοφορία και σε ταυτόχρονη μείωση της παραγωγής κετονοσωμάτων. Αυτό οφείλεται στην μείωση των επιπέδων ακέτυλο-CoA, που αποτελεί υπόστρωμα για τη σύνθεση των κετονοσωμάτων και ταυτόχρονα, η έλλειψη του κατά την διάρκεια καταβολικών καταστάσεων, οδηγεί σε αναστολή της γλυκονεογένεσης. Εργαστηριακά, όταν εμφανίζεται υπογλυκαιμία με ταυτόχρονη αύξηση στα λιπαρά οξέα και μείωση των επιπέδων των κετονοσωμάτων,

αποτελούν συνήθως επαρκείς ενδείξεις για την διάγνωση των νοσημάτων αυτών. Μια αρκετά χρήσιμη τεχνική, με μεγάλη ευαισθησία, για την διάγνωση των διαταραχών αυτών, είναι η πραγματοποίηση προφίλ ακυλοκαρνιτίνης πλάσματος καθώς και η μέτρηση των ακυλογλυκινών στα ούρα. Η συσσώρευση, σε τοξικά επίπεδα, ακυλοκαρνιτινών μακράς αλυσίδας προκαλείται από την δυσλειτουργία της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας και οδηγεί σε τοξική για τον ασθενή συνάθροιση τους. Για την επιβεβαίωση της διάγνωσης σε ορισμένες περιπτώσεις απαιτούνται ενζυμικές και γενετικές μελέτες[14].

Με την χρήση της φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$ σε πλάσμα αίματος δύναται να πραγματοποιηθεί ταυτοποίηση λιπιδίων. Ωστόσο, οι διαγνωστικοί δείκτες που αφορούν τα ενδογενή νοσήματα του μεταβολισμού των λιπιδίων είναι δύσκολο να ταυτοποιηθούν εξαιτίας των χαμηλών συγκεντρώσεών τους στα βιολογικά δείγματα, της αλληλεπικάλυψης με άλλους μεταβολίτες και των παρεμβολών στο φάσμα εξαιτίας της παρουσίας πρωτεϊνών στο δείγμα. Παρ' όλα αυτά, η φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ έχει εφαρμοστεί για την διάγνωση ενδογενών νοσημάτων του μεταβολισμού των λιπιδίων[51].

Ενδεικτικά, η φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ έχει χρησιμοποιηθεί για την μελέτη της νόσου έλλειψης του ενζύμου δεϋδρογονάση βραχείας αλυσίδας ακέτυλο-CoA. Με την ατελή δράση του ενζύμου ο καταβολισμός προχωράει από μια περιφερειακή οδό, συγκεκριμένα εμπλέκεται το ένζυμο καρβοξυλάση του προπιόνυλο-CoA, και προκύπτει αιθυλομαλονικό οξύ. Παρ' όλα αυτά τα αυξημένα επίπεδα αιθυλομαλονικού οξέος σε αυτούς τους ασθενείς δεν είναι παθογνωμικά και η κλινική εικόνα παίζει καίριο ρόλο στην διάγνωση. Το συγκεκριμένο βιοχημικό μονοπάτι φαίνεται στην εικόνα[29]:



Εικόνα 29: Το βιοχημικό μονοπάτι που καταλύει το ένζυμο δεϋδρογονάση βραχείας αλυσίδας ακέτυλο-CoA

Όσον αφορά την χρήση της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, είναι ευδιάκριτα στα ούρα ασθενών τα υψηλά επίπεδα του αιθυλομαλονικού οξέος[29], [52], συγχρόνως έχουν ταυτοποιηθεί και κετονοσώματα όπως η ακετόνη και το ακετοξικό οξύ, ενώ τέλος στον ορό των ασθενών εμφανίζονται αυξημένα τα επίπεδα των ακυλοκαρνιτινών και συγκεκριμένα της βουτύρυλοκαρνιτίνης[52]. Συγκεντρωτικά παρατίθενται στον πίνακα παρακάτω:

Πίνακας 10: Αποτελέσματα ερευνών με την χρήση της φασματοσκοπίας NMR για την νόσο έλλειψης του ενζύμου δεϋδρογονάση βραχείας αλυσίδας ακέτυλο-CoA

Μελέτη	Βιολογικό Υγρό	Μεταβολίτες
<i>Battisti et al. (2007)</i>	Ούρα	Αιθυλομαλονικό οξύ, Ακετόνη, Ακετοξικό οξύ
	Ορός	Βουτύρυλοκαρνιτίνη
<i>Engelke et al. (2007)</i>	Ούρα	Αιθυλομαλονικό οξύ

Παρακάτω παρατίθεται ενδεικτικά ένα φάσμα ούρων ασθενή που πάσχει από την νόσο έλλειψης του ενζύμου δεϋδρογονάση βραχείας αλυσίδας ακέτυλο-CoA, εστιασμένο στην περιοχή του φάσματος που εντοπίζονται οι μεταβολίτες που μας ενδιαφέρουν, στο οποίο έχουν αποδοθεί οι κορυφές που αντιστοιχούν στο αιθυλομαλονικό οξύ[29].

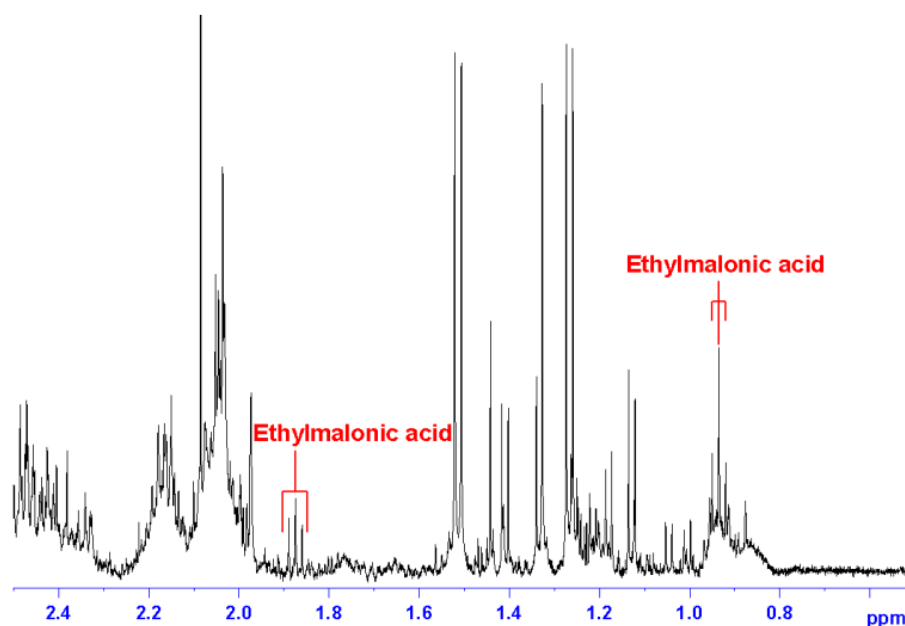
Short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency

[Gene Locus](#)

[EC Number](#)

[OMIM](#)

[Table of Contents](#)



Εικόνα 30: Φάσμα HNMR ούρων ασθενή που πάσχει από την νόσο έλλειψης του ενζύμου δεϋδρογονάση βραχείας αλυσίδας ακετύλο-CoA

Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση με φασματοσκοπία NMR ενδογενών νοσημάτων του μεταβολισμού σε παιδιά που παρακολουθούνται στην Παιδιατρική Κλινική του ΠΓΝΙ. Η μελέτη περιλάμβανε νέες διαγνώσεις νοσημάτων καθώς και παρακολούθηση ασθενών που έχουν ήδη διαγνωστεί. Συλλέχθηκαν δείγματα ούρων τα οποία αναλύθηκαν με φασματοσκοπία NMR προκειμένου να ταυτοποιηθούν και να ποσοτικοποιηθούν οι μεταβολίτες που εμφανίζονται αυξημένοι, μειωμένοι ή απουσιάζουν στο εκάστοτε ενδογενές νόσημα του μεταβολισμού. Ο βασικός σκοπός ήταν να μελετηθεί η ικανότητα της φασματοσκοπίας NMR στη διάγνωση ενδογενών νοσημάτων του μεταβολισμού στα παιδιά σε σχέση με τις καθιερωμένες τεχνικές.

Πειραματικό Μέρος

Πληθυσμός Μελέτης

Στην παρούσα πειραματική μελέτη συλλέχθηκαν δείγματα ούρων και ορού ασθενών που ανήκαν σε δύο ομάδες:

- i. 4 ασθενείς με ενδογενή μεταβολικά νοσήματα, ήδη διαγνωσμένα από την Παιδιατρική Κλινική του ΠΓΝΙ.
- ii. 2 ασθενείς όπου υπήρχε η υποψία ύπαρξης κάποιου μεταβολικού νοσήματος και βρισκόνταν υπό διερεύνηση από την Παιδιατρική και την Νεογνολογική Κλινική του ΠΓΝΙ.
- iii. 2 ασθενείς όπου το εργαστήριο μας στο παρελθόν έπαιξε καίριο ρόλο στην διάγνωση τους.

Συλλογή Δειγμάτων

Από κάθε ασθενή συλλέχθηκαν δείγματα ούρων. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 2000 στροφές και αποθηκευτήκαν στους -80°C μέχρι την ανάλυση τους με NMR.

Υλικά και Αντιδραστήρια

- Γυάλινα σωληνάρια NMR διαμέτρου 5 mm (Wilmad 535 PP, Sigma-Aldrich)
- Κωνικά σωληνάρια Eppendorf 1,5 mL
- Πιπέτες : 50 μL , 200-1000 μL . (Finnipipette Thermo Labsystems)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (0.2M Na_2HPO_4 /0.2 M NaH_2PO_4 , pH 7.4. Na_2HPO_4 , MB = 141.96g / mol, Riedel-de Haen, NaH_2PO_4 MB = 156.01g / mol, Merck)
- Διάλυμα D_2O / TSP [Δευτεριωμένο Ύδωρ (D_2O M = 20.03g / mol , Sigma-Aldrich, βαθμού δευτερίωσης 99.9%) περιεκτικότητας 0.075% σε δευτεριωμένο άλας sodium, 3-trimethylsilyl- (2,2,3,3- $^2\text{H}_4$)-1 -propionate (TSP, MB=172.28 g/mol Sigma Aldrich)]

Όργανα

- Φασματογράφος Bruker Avance DRX 500MHz
- Φυγόκεντρος Centrifuge 5415 D, Eppendorf

Πειραματική Διαδικασία

Τα δείγματα ούρων που αποθηκευτήκαν στους -80°C , αποψύχθηκαν και παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου 25°C μέχρι να επιτευχθεί θερμική ισορροπία. Στη συνέχεια ακολούθησε ήπια ανάδευση 400 μL ούρων (Vortex, VELP Scientifica), και ανάμειξη με 200 μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (0.2 M Na_2HPO_4 / 0.2 M NaH_2PO_4 , pH 7.4. Na_2HPO_4 , M=141.96 g/mol, Riedel-de Haën, NaH_2PO_4 , M=156.01 g/mol, Merck). Το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών χρησιμοποιήθηκε έτσι

ώστε να επιτευχθεί όσο το δυνατόν ελαχιστοποίηση των μεταβολών του pH και καλύτερη σταθεροποίησή του στην περιοχή 7.4 ± 0.5 . Το διάλυμα των 600μl αφέθηκε για 10 λεπτά για την πλήρη ανάμειξη των ούρων με το ρυθμιστικό διάλυμα και στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση (Centrifuge 5415 D, Eppendorf) σε 8.000 στροφές ανά λεπτό για 5 λεπτά με στόχο την απομάκρυνση πιθανών ιζημάτων. Το διαυγές υπερκείμενο 500μl αναμίχθηκε με 50 μl διαλύματος δευτεριωμένου νερού (D_2O , $M=20.03$ g/mol, Sigma-Aldrich, βαθμού δευτερίωσης 99.9%) που περιείχε 0.075% δευτεριωμένο άλας sodium 3-trimethylsilyl-(2,2,3,3- 2H_4)-1-propionate (TSP, $M=172.28$ g/mol, Sigma-Aldrich) με τελική συγκέντρωση 0.456mM TSP. Το μείγμα μεταφέρθηκε σε γυάλινα σωληνάρια διαμέτρου 5mm για τις μετρήσεις NMR. Το D_2O χρησιμοποιήθηκε για το lock της συχνότητας πεδίου (field frequency lock-solvent) του φασματογράφου και προστέθηκε αμέσως πριν την εκτέλεση των πειραμάτων 1H -NMR για την ελαχιστοποίηση της ανταλλαγής μεταξύ των εύκολα αποσπώμενων πρωτονίων ορισμένων μεταβολιτών με το δευτέριο, όπως συμβαίνει π.χ. με τα πρωτόνια της κορυφής της μεθυλενικής ομάδας της κρεατινίνης (δ 1H 4.06ppm). Το TSP χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο (δ 1H 0.0) για τη βαθμονόμηση των χημικών μετατοπίσεων. Η διαδικασία αυτή ακολουθήθηκε για κάθε δείγμα ούρων.

Λήψη Φασμάτων 1H -NMR και Επεξεργασία Δεδομένων

Τα φάσματα 1H -NMR ούρων καταγράφηκαν στους 298K σε φασματογράφο Avance III 500 MHz (Bruker BioSpin GmbH). Για την καταστολή του σήματος του νερού χρησιμοποιήθηκε η 1D ακολουθία παλμών NOESYPRESAT (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy Presaturation) με χρόνο ανάμειξης 0,1s. Για κάθε φάσμα, συνολικά συλλέχθηκαν 128 σαρώσεις (scans) σε 64K δεδομένα (data points) με εύρος φάσματος 10,000 Hz και χρόνο λήψης 3.28s. Τα FID (free-induction decays) των φασμάτων ούρων που λήφθηκαν υπέστησαν επεξεργασία κατά την οποία πολλαπλασιάστηκαν με συνάρτηση εκθετικής line broadening (lb) ίση με 0.3 Hz, πριν να ακολουθήσει ο μετασχηματισμός Fourier. Τα φάσματα διορθώθηκαν ως προς τη φάση (phase) και τη γραμμή βάσης (baseline) (Topspin 4.0.8, Bruker Biospin, Rheinstetten, Γερμανία).

Στοχευμένη Ανάλυση Μεταβολικού Προφίλ

Η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Chenomx NMR Suite 9.0 Profiler (Chenomx Edmonton, Καναδάς), τις διαθέσιμες βάσεις δεδομένων όπως το Human Metabolome Database και το Biological

Magnetic Resonance Data Bank. Η πρότυπη βιβλιοθήκη 500 MHz του λογισμικού Chenomx NMR Suite 9.0 χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών, η κρεατινίνη ούρων χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο και οι τιμές εκφράστηκαν ως μmoles του μεταβολίτη προς mmol κρεατινίνης (μM/mM).

Αποτελέσματα

Δημογραφικά Στοιχεία

Σε κάθε περίπτωση πραγματοποιήθηκαν βιοχημικές και αιματολογικές εξετάσεις στα εργαστήρια του ΠΓΝΙ. Προκειμένου να γίνει η διάγνωση ή η διερεύνηση για κάποιο νόσημα πραγματοποιήθηκαν για κάθε περιστατικό επιπρόσθετα εξειδικευμένες εξετάσεις στα εργαστήρια του ΠΓΝΙ.

Το περιστατικό 1 είναι ένα παιδί ηλικίας 3,5 ετών που πάσχει από την νόσο Hunter. Στην περίπτωση του περιστατικού 2, παιδί ηλικίας 5,5 ετών, πρόκειται για ασθενή με Βλεννοπολυσακχαρίδωση τύπου IV. Τα περιστατικά 3 και 4 αφορούν δύο αδέρφια 11 και 13 ετών αντίστοιχα τα οποία πάσχουν από την Νόσο Pompe. Το περιστατικό 5, αφορά βρέφος, 11 ημερών την ημέρα λήψης του δείγματος, και πρόκειται για ασθενή που βρίσκονταν υπό διερεύνηση από το ΠΓΝΙ. Το περιστατικό 6 αφορά έναν ασθενή 5,5 μηνών την χρονική στιγμή λήψης του δείγματος, όπου παρουσιάστηκε στο ΠΓΝΙ με επεισόδια σπασμών και βρίσκονταν επίσης υπό διερεύνηση. Ενώ τέλος, το περιστατικό 7 αφορά μια γυναίκα 17 ετών την ημερομηνία λήψης του δείγματος που πάσχει από τριμεθυλαμινουρία ενώ το περιστατικό 8 αφορά ασθενή ηλικίας 48 χρονών την χρονική στιγμή λήψης του δείγματος, που πάσχει από σιτοστερολαιμία.

Περιστατικό 1

Το περιστατικό 1 αφορά ένα παιδί ηλικίας 3,5 ετών που πάσχει από νόσο Hunter ή βλεννοπολυσακχαρίδωση τύπου II. Η διάγνωση βασίστηκε στην κλινική εικόνα του ασθενή σε συνδυασμό με τους αυξημένους βλεννοπολυσακχαρίτες που βρέθηκαν στα ούρα και την χαμηλή ενζυμική δραστηριότητα της σουλφατάσης. Οι εξετάσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν από το Ινστιτούτο Υγείας του παιδιού στην Αθήνα.

Στο φάσμα NMR των ούρων ποσοτικοποιήθηκαν 63 μεταβολίτες και παρέχεται το μεταβολικό προφίλ του ασθενή το οποίο παρουσιάζεται στον πίνακα 11. Με βάση τις φυσιολογικές τιμές που αναφέρονται στην βιβλιογραφία οι μεταβολίτες που

παρουσιάζουν διαφοροποίηση εμφανίζονται συνοπτικά στον πίνακα 12. Με εξαίρεση την γλυκίνη οι υπόλοιποι μεταβολίτες φαίνεται να εμφανίζουν σχετική αύξηση σε σχέση με τα φυσιολογικά όρια.

Πίνακας 11: Μεταβολικό προφίλ με το σύνολο των μεταβολιτών για το περιστατικό 1

Μεταβολίτης	Συγκέντρωση ούρων (umol/mmol creatinine)	Φυσιολογικά όρια (umol/mmol creatinine)
<i>1-Methylnicotinamide</i>	5.73	7.75 ± 7.16
<i>2-Aminobutyrate</i>	6.91	<6.33
<i>2-Hydroxy-3-methylvalerate</i>	9.78	6.53 ± 5.52
<i>2-Hydroxybutyrate</i>	9.71	3.29 ± 3.53
<i>2-Hydroxyisobutyrate</i>	9.32	7.9 (3.7-19.5)
<i>2-Hydroxyisovalerate</i>	1.87	2.0 (0.0-4.5)
<i>2-Hydroxyvalerate</i>	2.85	Not Quantified
<i>3-Aminoisobutyrate</i>	19.94	<110.86
<i>3-Hydroxybutyrate</i>	10.10	<99
<i>3-Hydroxyisobutyrate</i>	7.28	13.0 (2.0-24.0)
<i>3-Hydroxyisovalerate</i>	7.23	11.43 ± 7.8
<i>3-Indoxylsulfate</i>	64.09	129.0 (45.0-191.0)
<i>3-Methyl-2-oxovalerate</i>	4.55	Not Quantified
<i>4-Hydroxybenzoate</i>	2.38	2.5 (0.7-13.7)
<i>Acetate</i>	9.17	16.06 ± 11.38
<i>Acetoacetate</i>	9.49	18.64 ± 20.32
<i>Acetone</i>	2.29	3.91 ± 3.93
<i>Alanine</i>	30.46	65.01 ± 27.64
<i>Betaine</i>	10.08	16.88 ± 25.16
<i>Butyrate</i>	7.18	4.00 ± 2.18
<i>Carnitine</i>	3.96	18.16 ± 16.44
<i>Choline</i>	3.74	6.3 (0.72-28.5)
<i>cis-Aconitate</i>	51.33	73.8 (64.0-130.3)
<i>Citrate</i>	369.28	493.68 ± 202.52
<i>Creatine</i>	212.35	62.01 – 932.29

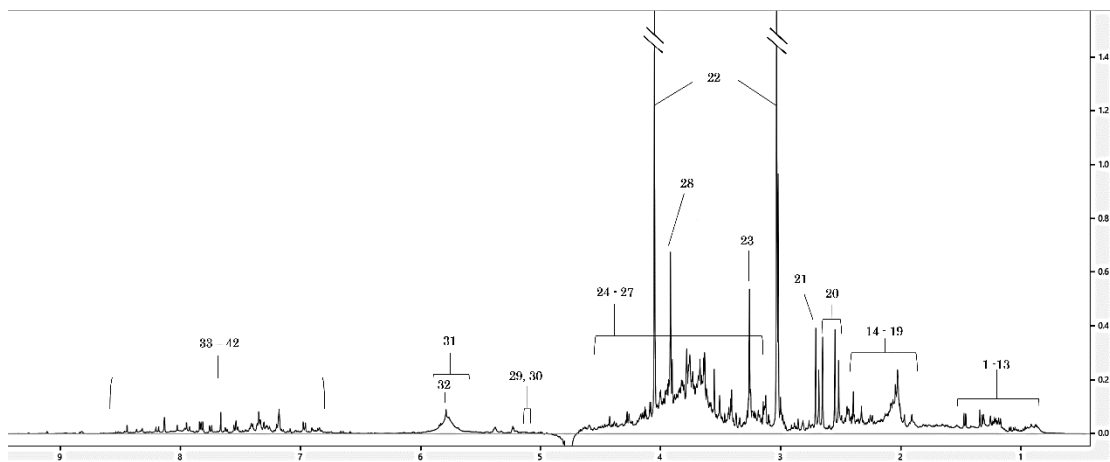
<i>Creatine phosphate</i>	62.98	53.68 ± 28.39
<i>Dimethylamine</i>	57.23	56.97 ± 42.80
<i>Formate</i>	30.16	46.20 ± 30.21
<i>Fumarate</i>	0.52	1.34 ± 1.32
<i>Galactose</i>	8.21	10.03 ± 12.94
<i>Gluconate</i>	90.64	63.46 ± 28.04
<i>Glucose</i>	41.89	31.60 ± 15.98
<i>Glucuronate</i>	30.41	1.38 - 5.00
<i>Glutamine</i>	89.33	94.95 ± 48.61
<i>Glycine</i>	69.03	312.54 ± 214.07
<i>Hippurate</i>	46.68	205.48 ± 143.91
<i>Histidine</i>	5.75	62.59 ± 67.65
<i>Hypoxanthine</i>	18.04	17.1 ± 1.0
<i>Isoleucine</i>	3.34	3.93 ± 3.14
<i>Lactate</i>	13.50	25.19 ± 11.83
<i>Leucine</i>	4.42	7.55 ± 4.95
<i>Mannose</i>	6.54	2.36 ± 0.31
<i>Methanol</i>	13.89	11.57 ± 17.32
<i>Methylamine</i>	6.27	5.91 ± 3.78
<i>myo-Inositol</i>	80.75	40.56 ± 25.48
<i>N,N-Dimethylglycine</i>	3.02	5.07 ± 3.31
<i>N-Acetylaspartate</i>	17.77	6.1-15.4
<i>N-Isovaleroylglycine</i>	2.63	2.32 ± 1.91
<i>N-Methylhydantoin</i>	2.24	8.9 ± 7.78
<i>N-Phenylacetyl glycine</i>	95.33	74.84 ± 30.79
<i>O-Acetylcarnitine</i>	3.74	4.47 ± 3.52
<i>Phenylalanine</i>	9.91	14.39 ± 18.64
<i>Pyruvate</i>	7.96	8.349 ± 4.704
<i>Sarcosine</i>	1.94	5.95 ± 10.64
<i>Succinate</i>	30.90	14.58 ± 9.67
<i>Taurine</i>	77.88	90.24 ± 61.21
<i>Threonine</i>	37.17	25.71 ± 16.04

<i>Trigonelline</i>	14.04	8.99 ± 4.22
<i>Trimethylamine</i>	2.51	3.37 ± 2.00
<i>Trimethylamine N-oxide</i>	44.84	69.88 ± 55.00
<i>Tyrosine</i>	10.18	27.35 ± 13.98
<i>Urea</i>	2228.42	55008.54 ± 103035.18
<i>Valine</i>	5.24	6.9 ± 3.86

Πίνακας 12: Μεταβολίτες που παρουσιάζουν διαφοροποίηση με βάση τις φυσιολογικές τιμές της βιβλιογραφίας για το περιστατικό 1

Μεταβολίτης	Συγκέντρωση στα ούρα ($\mu\text{mol}/\text{mmol creatinine}$)	Φυσιολογικά όρια ($\mu\text{mol}/\text{mmol creatinine}$)
<i>Glycine</i>	69.03	312.54 ± 214.07
<i>Glucuronate</i>	116.80	63.46 ± 28.04
<i>Glucuronate</i>	30.41	1.38-5.00
<i>Mannose</i>	6.54	2.36 ± 0.31
<i>myo-Inositol</i>	80.75	40.56 ± 25.48
<i>N-Acetylaspartate</i>	17.77	6.1-15.4
<i>Succinate</i>	30.90	14.58 ± 9.67

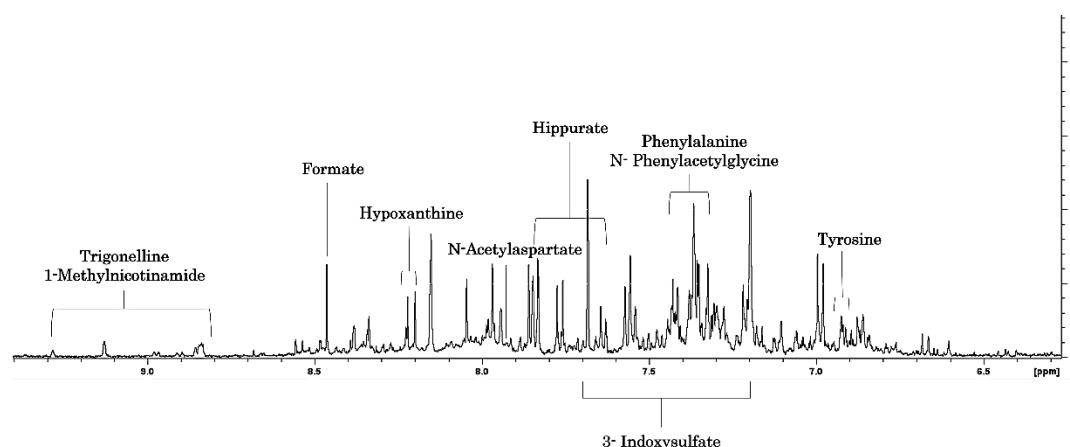
Στην εικόνα φαίνεται το φάσμα ούρων του περιστατικού 1 όπου επισημαίνονται με αρίθμηση ορισμένοι από τους σημαντικότερους μεταβολίτες.



Εικόνα 31: Φάσμα ούρων του περιστατικού 1 όπου επισημαίνονται με αρίθμηση ορισμένοι από τους σημαντικότερους μεταβολίτες. 1 – 2-Hydroxyisovalerate 2 - Ethylmalonate 3

Isoleucine 4 - Valine 5 - Leucine 6- 3-Hydroxyisovalerate 7 - 3-Hydroxyisobutyrate 8 - 3-Methyl-2-oxovalerate 9 - 3-Hydroxybutyrate 10 - Lactate 11 - Threonine 12 - 2-Hydroxyisobutyrate 13 - Alanine 14 - Acetate 15 - Glutamine 16 - Acetone 17 - Acetoacetate 18- Pyruvate 19 - Succinate 20 - Citrate 21 - Dimethylamine 22 - Creatinine 23 - Trimethylamine N- oxide 24- Glucose 25- Gluconate 26 - Glucuronate 27 - myo-inositol 28 - Creatine 29 - Mannose 30 - Galactose 31 - Urea 32 - cis - aconitate 33 - Tyrosine 34 - N-Acetylaspartate 35 - Histidine 36- 3-Indoxysulfate 37 - Phenylalanine 38 - N-Phenylacetyl glycine 39 - Hippurate 40- Hypoxanthine 41 - Formate 42- 1-Methylnicotinamide

Στην εικόνα φαίνεται σε μεγέθυνση η περιοχή των 6.3 με 9.4 ppm



Εικόνα 32: Μεγέθυνση φάσματος στην περιοχή 6.3 με 9.4 ppm

Περιστατικό 2

Το περιστατικό 2 είναι ένα παιδί ηλικίας 5,5 ετών που πάσχει από Βλεννοπολυσακχαρίδωση τύπου IV ή νόσος Morquio. Η διάγνωση προέκυψε έπειτα από πραγματοποίηση γενετικού ελέγχου. Στο φάσμα NMR των ούρων ποσοτικοποιήθηκαν 63 μεταβολίτες και παρέχεται το μεταβολικό προφίλ του ασθενή το οποίο παρουσιάζεται στον πίνακα 13. Με βάση τις φυσιολογικές τιμές που αναφέρονται στην βιβλιογραφία οι μεταβολίτες που παρουσιάζουν διαφοροποίηση εμφανίζονται συνοπτικά στον πίνακα 14. Παρατηρείται για τους μεταβολίτες μικρή σχετικά αύξηση σε σχέση με τα φυσιολογικά όρια.

Πίνακας 13: Μεταβολικό προφίλ με το σύνολο των μεταβολιτών για το περιστατικό 2

Μεταβολίτης	Συγκέντρωση ούρων ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine)	Φυσιολογικά όρια ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine)
<i>1-Methylnicotinamide</i>	4.04	7.75 \pm 7.16
<i>2-Aminobutyrate</i>	8.17	<6.33
<i>2-Hydroxy-3-methylvalerate</i>	13.17	6.53 \pm 5.52
<i>2-Hydroxybutyrate</i>	7.44	3.29 \pm 3.53
<i>2-Hydroxyisobutyrate</i>	3.56	7.9 (3.7-19.5)
<i>2-Hydroxyisovalerate</i>	2.26	2.0 (0.0-4.5)
<i>2-Hydroxyvalerate</i>	10.37	Not Quantified
<i>3-Aminoisobutyrate</i>	9.57	<110.86
<i>3-Hydroxybutyrate</i>	23.50	<99
<i>3-Hydroxyisobutyrate</i>	10.49	13.0 (2.0-24.0)
<i>3-Hydroxyisovalerate</i>	10.43	11.43 \pm 7.8
<i>3-Indoxylsulfate</i>	44.81	129.0 (45.0-191.0)
<i>3-Methyl-2-oxovalerate</i>	2.32	Not Quantified
<i>4-Hydroxybenzoate</i>	3.24	2.5 (0.7-13.7)
<i>Acetate</i>	9.38	16.06 \pm 11.38
<i>Acetoacetate</i>	10.02	18.64 \pm 20.32
<i>Acetone</i>	3.75	3.91 \pm 3.93
<i>Alanine</i>	49.13	65.01 \pm 27.64
<i>Betaine</i>	13.87	16.88 \pm 25.16
<i>Butyrate</i>	4.55	4.00 \pm 2.18
<i>Carnitine</i>	15.11	18.16 \pm 16.44
<i>Choline</i>	5.88	6.3 (0.72-28.5)
<i>cis-Aconitate</i>	54.79	73.8 (64.0-130.3)
<i>Citrate</i>	562.74	493.68 \pm 202.52
<i>Creatine</i>	129.43	62.01 - 932.29
<i>Creatine phosphate</i>	94.89	53.68 \pm 28.39
<i>Dimethylamine</i>	58.32	56.97 \pm 42.80

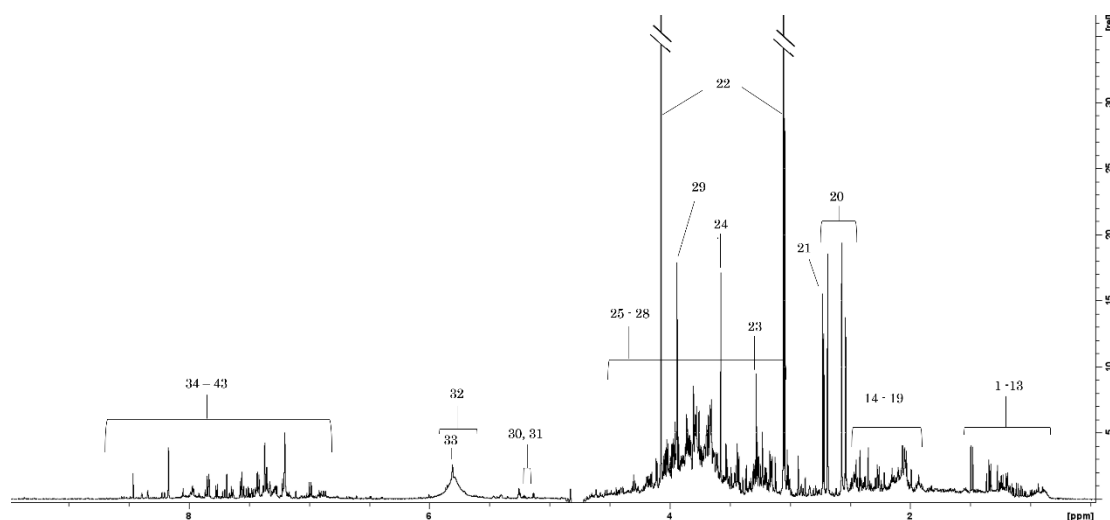
<i>Formate</i>	38.00	46.20 ± 30.21
<i>Fumarate</i>	1.37	1.34 ± 1.32
<i>Galactose</i>	9.22	10.03 ± 12.94
<i>Gluconate</i>	43.63	63.46 ± 28.04
<i>Glucose</i>	53.46	31.60 ± 15.98
<i>Glucuronate</i>	30.46	1.38 - 5.00
<i>Glutamine</i>	74.73	94.95 ± 48.61
<i>Glycine</i>	173.60	312.54 ± 214.07
<i>Hippurate</i>	63.66	205.48 ± 143.91
<i>Histidine</i>	6.68	62.59 ± 67.65
<i>Hypoxanthine</i>	13.52	17.1 ± 1.0
<i>Isoleucine</i>	6.77	3.93 ± 3.14
<i>Lactate</i>	7.98	25.19 ± 11.83
<i>Leucine</i>	4.07	7.55 ± 4.95
<i>Mannose</i>	5.57	2.36 ± 0.31
<i>Methanol</i>	19.30	11.57 ± 17.32
<i>Methylamine</i>	7.19	5.91 ± 3.78
<i>myo-Inositol</i>	52.92	40.56 ± 25.48
<i>N,N-Dimethylglycine</i>	12.50	5.07 ± 3.31
<i>N-Acetylglutamate</i>	11.70	6.1-15.4
<i>N-Isovaleroylglycine</i>	1.84	2.32 ± 1.91
<i>N-Methylhydantoin</i>	5.09	8.9 ± 7.78
<i>N-Phenylacetylglucine</i>	88.28	74.84 ± 30.79
<i>O-Acetylcarnitine</i>	6.26	4.47 ± 3.52
<i>Phenylalanine</i>	11.96	14.39 ± 18.64
<i>Pyruvate</i>	7.25	8.349 ± 4.704
<i>Sarcosine</i>	1.37	5.95 ± 10.64
<i>Succinate</i>	16.54	14.58 ± 9.67
<i>Taurine</i>	86.66	90.24 ± 61.21
<i>Threonine</i>	26.14	25.71 ± 16.04
<i>Trigonelline</i>	8.43	8.99 ± 4.22
<i>Trimethylamine</i>	2.35	3.37 ± 2.00

<i>Trimethylamine N-oxide</i>	20.64	69.88 ± 55.00
<i>Tyrosine</i>	16.54	27.35 ± 13.98
<i>Urea</i>	2296.83	55008.54 ± 103035.18
<i>Valine</i>	4.36	6.9 ± 3.86

Πίνακας 14: Μεταβολίτες που παρουσιάζουν διαφοροποίηση με βάση τις φυσιολογικές τιμές της βιβλιογραφίας για το περιστατικό 2

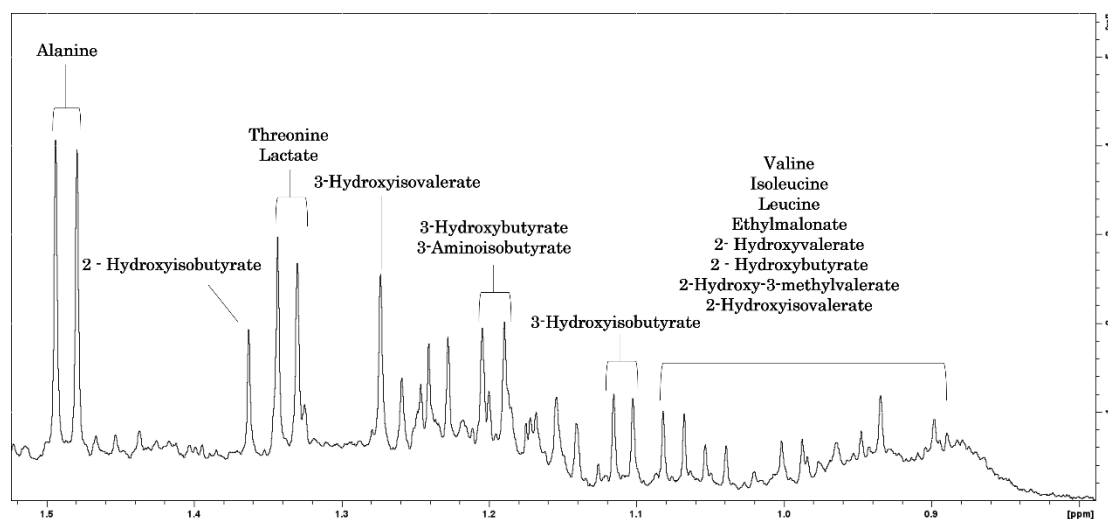
Μεταβολίτης	Συγκέντρωση στα ούρα ($\mu\text{mol}/\text{mmol creatinine}$)	Φυσιολογικά όρια ($\mu\text{mol}/\text{mmol creatinine}$)
<i>2-Aminobutyrate</i>	8.17	<6.33
<i>Creatine phosphate</i>	94.89	53.68 ± 28.39
<i>Mannose</i>	5.57	2.36 ± 0.31
<i>N-Acetylglutamate</i>	11.70	6.52 ± 4.43

Στην εικόνα φαίνεται το φάσμα του περιστατικού 2 όπου επισημαίνονται με αρίθμηση ορισμένοι από τους σημαντικότερους μεταβολίτες.



Εικόνα 33: Φάσμα ούρων του περιστατικού 2 όπου επισημαίνονται με αρίθμηση ορισμένοι από τους σημαντικότερους μεταβολίτες. 1 – 2-Hydroxyisovalerate 2 - Ethylmalonate 3 – Isoleucine 4 - Valine 5 - Leucine 6– 3-Hydroxyisovalerate 7 - 3-Hydroxyisobutyrate 8 – 3-Methyl-2-oxovalerate 9 – 3-Hydroxybutyrate 10 – Lactate 11 – Threonine 12 – 2-Hydroxyisobutyrate 13 - Alanine 14 – Acetate 15 – Glutamine 16 – Acetone 17 - Acetoacetate 18– Pyruvate 19 – Succinate 20 – Citrate 21 – Dimethylamine 22 – Creatinine 23 – Trimethylamine N- oxide 24- Glycine 25– Glucose 26- Gluconate 27 – Glucuronate 28 – myo- inositol 29 – Creatine 30 – Mannose 31– Galactose 32 – Urea 33 – cis – aconitate 34 – Tyrosine 35 - N- Acetylglutamate 36 – Histidine 37– 3-Indoxysulfate 38 – Phenylalanine 39 – NPhenylacetylglutamine 40 – Hippurate 41– Hypoxanthine 42 – Formate 43– 1-Methylnicotinamide

Στην εικόνα φαίνεται σε μεγέθυνση η περιοχή των 0.8 με 1.5 ppm



Εικόνα 34: Μεγέθυνση φάσματος στην περιοχή 0.8 με 1.5 ppm

Περιστατικά 3 & 4

Τα δείγματα 3 και 4 προέρχονται από δύο αδέρφια 11 και 13 ετών αντίστοιχα τα οποία πάσχουν από την Νόσο Pompe. Η διάγνωση βασίστηκε στην χαμηλή ενζυμική δραστηριότητα που εντοπίστηκε για την όξινη α-γλυκοσιδάση σε έλεγχο που έγινε σε ινοβλάστες και κηλίδες αίματος στο Ινστιτούτο Υγείας του Παιδιού.

Στα φάσματα NMR των ούρων ποσοτικοποιήθηκαν για το δείγμα 3 58 και για το δείγμα 4 62 μεταβολίτες. Το μεταβολικό προφίλ για τον εκάστοτε ασθενή παρουσιάζεται στον πίνακα 15. Με βάση τις φυσιολογικές τιμές που αναφέρονται στην βιβλιογραφία οι μεταβολίτες που παρουσιάζουν διαφοροποίηση εμφανίζονται συνοπτικά στους πίνακες 16 και 17.

Πίνακας 15: Μεταβολικό προφίλ με το σύνολο των μεταβολιτών για τα περιστατικά 3 και 4

Μεταβολίτης	Συγκέντρωση ούρων (umol/mmol creatinine)		Φυσιολογικά όρια (umol/mmol creatinine)
	Δείγμα 3	Δείγμα 4	
<i>1-Methylnicotinamide</i>	0.05	5.94	7.75 ± 7.16
<i>2-Aminobutyrate</i>	--	3.80	<6.33
<i>2-Hydroxy-3-methylvalerate</i>	--	6.14	6.53 ± 5.52
<i>2-Hydroxybutyrate</i>	--	4.10	3.29 ± 3.53
<i>2-Hydroxyisobutyrate</i>	5.92	6.70	7.9 (3.7-19.5)

<i>2-Hydroxyisovalerate</i>	2.36	2.90	2.0 (0.0-4.5)
<i>2-Hydroxyvalerate</i>	--	4.59	Not Quantified
<i>3-Aminoisobutyrate</i>	--	16.38	34.29 ± 32.20
<i>3-Chlorotyrosine</i>	4.58	7.14	6.96 ± 3.58
<i>3-Hydroxybutyrate</i>	6.91	8.70	<99
<i>3-Hydroxyisobutyrate</i>	8.71	12.01	13.0 (2.0-24.0)
<i>3-Hydroxyisovalerate</i>	4.94	7.44	11.43 ± 7.8
<i>3-Indoxylsulfate</i>	18.14	39.26	129.0 (45.0-191.0)
<i>3-Methyl-2-oxovalerate</i>	4.21	8.67	Not Quantified
<i>4-Hydroxybenzoate</i>	2.02	3.45	2.5 (0.7-13.7)
<i>Acetate</i>	7.35	11.80	16.06 ± 11.38
<i>Acetoacetate</i>	17.25	11.76	18.64 ± 20.32
<i>Acetone</i>	3.21	4.73	3.91 ± 3.93
<i>Alanine</i>	25.72	37.39	65.01 ± 27.64
<i>Betaine</i>	11.09	16.60	16.89 ± 25.16
<i>Butyrate</i>	3.31	3.59	4.002 ± 2.176
<i>Carnitine</i>	5.21	13.99	18.16 ± 16.44
<i>Choline</i>	4.79	4.13	6.3 (0.72-28.5)
<i>cis-Aconitate</i>	23.79	33.70	33.69 ± 14.03
<i>Citrate</i>	155.41	548.71	493.68 ± 202.52
<i>Creatine</i>	41.82	5.01	62.01 - 932.29
<i>Creatine phosphate</i>	5.66	5.71	53.68 ± 28.39
<i>Dimethylamine</i>	42.45	35.85	56.97 ± 42.79
<i>Ethylmalonate</i>	7.90	4.41	6.95 ± 4.98
<i>Formate</i>	18.19	31.33	46.20 ± 30.21
<i>Fumarate</i>	0.58	1.72	1.34 ± 1.32
<i>Galactose</i>	17.50	--	10.03 ± 12.94
<i>Gluconate</i>	59.58	77.34	63.47 ± 28.04
<i>Glucose</i>	52.80	57.98	31.60 ± 15.98
<i>Glutamine</i>	54.19	--	94.95 ± 48.61
<i>Glycine</i>	96.00	184.15	312.54 ± 214.07
<i>Hippurate</i>	64.20	149.94	205.48 ± 143.91

<i>Histidine</i>	20.51	84.31	62.59 ± 67.65
<i>Hypoxanthine</i>	3.20	9.16	17.1 ± 1.0
<i>Isoleucine</i>	2.52	2.60	3.93 ± 3.14
<i>Lactate</i>	22.76	7.19	25.20 ± 11.83
<i>Leucine</i>	3.46	3.29	7.55 ± 4.95
<i>Mannitol</i>	102.15	2161.65	62.69 ± 69.96
<i>Methanol</i>	8.56	27.48	11.57 ± 17.32
<i>Methylamine</i>	4.92	4.85	5.91 ± 3.78
<i>myo-Inositol</i>	--	38.18	40.56 ± 25.48
<i>N,N-Dimethylglycine</i>	6.94	8.35	5.07 ± 3.31
<i>N-Isovaleroylglycine</i>	2.40	1.97	2.32 ± 1.91
<i>N-Methylhydantoin</i>	2.47	2.04	8.95 ± 7.78
<i>N-Phenylacetyl glycine</i>	39.16	6.70	74.84 ± 30.79
<i>O-Acetylcarnitine</i>	2.61	5.99	4.47 ± 3.52
<i>Phenylalanine</i>	14.96	43.81	14.39 ± 18.64
<i>Propionate</i>	4.38	2.41	3.00 ± 3.69
<i>Pyruvate</i>	6.23	7.35	8.35 ± 4.70
<i>Sarcosine</i>	1.24	3.04	5.95 ± 10.64
<i>Succinate</i>	4.81	9.81	14.58 ± 9.66
<i>Taurine</i>	24.42	34.72	90.24 ± 61.21
<i>Threonine</i>	10.14	49.72	25.71 ± 16.04
<i>Trigonelline</i>	2.41	7.68	8.99 ± 4.22
<i>Trimethylamine</i>	1.95	3.50	3.366 ± 1.99
<i>Trimethylamine N-oxide</i>	50.67	28.20	69.88 ± 55.00
<i>Tyrosine</i>	17.26	9.74	27.35 ± 13.98
<i>Urea</i>	1087.47	4565.64	55008.54 ± 103035.18
<i>Valine</i>	4.27	4.89	6.90 ± 3.858

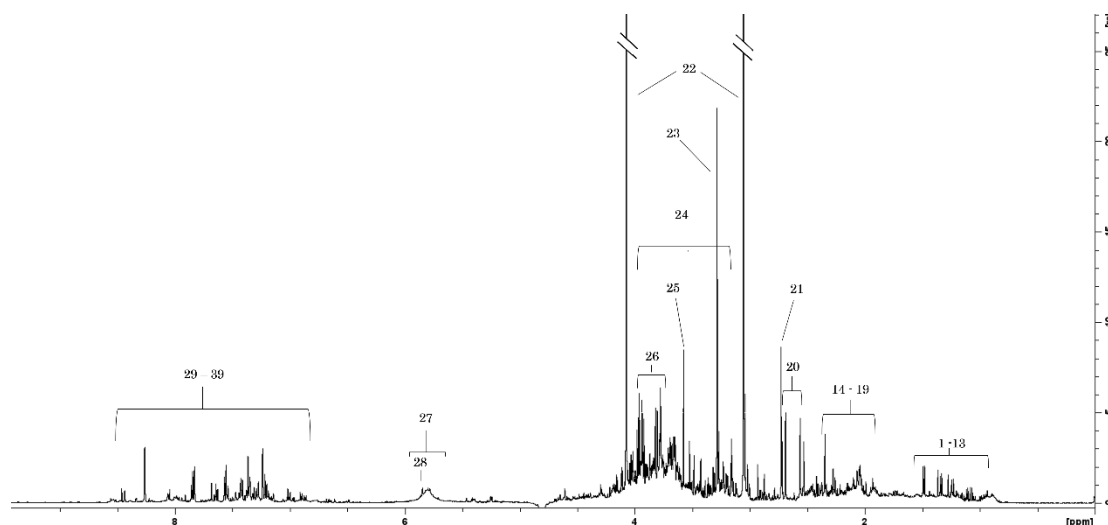
Πίνακας 16: Μεταβολίτες που παρουσιάζουν διαφοροποίηση με βάση τις φυσιολογικές τιμές της βιβλιογραφίας για το περιστατικό 3

<i>Μεταβολίτης</i>	Συγκέντρωση στα ούρα ($\mu\text{mol}/\text{mmol creatinine}$)	Φυσιολογικές συγκεντρώσεις ($\mu\text{mol}/\text{mmol creatinine}$)
<i>3-Indoxylsulfate</i>	18.14	129.0 (45.0-191.0)
<i>Creatine</i>	41.82	62.01 - 932.29
<i>Alanine</i>	25.72	65.01 ± 27.64
<i>Glucose</i>	52.80	31.60 ± 15.98
<i>Glycine</i>	96.00	312.54 ± 214.07
<i>Mannitol</i>	102.15	62.69 ± 69.96
<i>Succinate</i>	4.81	14.58 ± 9.67
<i>Taurine</i>	24.42	90.24 ± 61.21
<i>Trigonelline</i>	2.41	3.39-62.67

Πίνακας 17: Μεταβολίτες που παρουσιάζουν διαφοροποίηση με βάση τις φυσιολογικές τιμές της βιβλιογραφίας για το περιστατικό 4

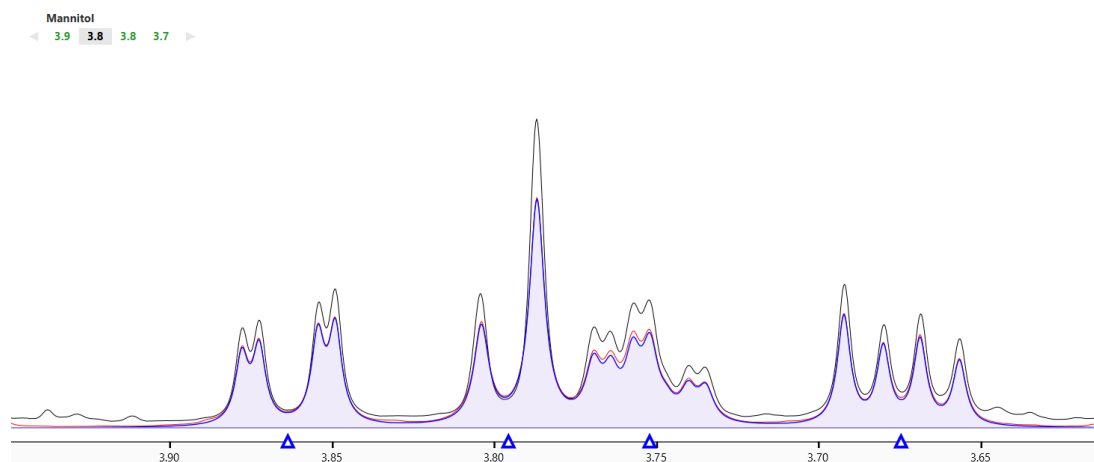
<i>Μεταβολίτης</i>	Συγκέντρωση δείγματος ($\mu\text{mol}/\text{mmol creatinine}$)	Φυσιολογικές συγκεντρώσεις ($\mu\text{mol}/\text{mmol creatinine}$)
<i>3-Indoxylsulfate</i>	39.26	45.0 - 191.0
<i>Creatine</i>	5.01	62.01 - 932.29
<i>Glucose</i>	57.98	31.60 ± 15.98
<i>Mannitol</i>	2161.65	62.69 ± 69.96
<i>Phenylalanine</i>	43.81	14.39 ± 18.64
<i>Taurine</i>	34.72	90.24 ± 61.21

Στην εικόνα φαίνεται το φάσμα ούρων του περιστατικού 3 όπου επισημαίνονται με αρίθμηση ορισμένοι από τους σημαντικότερους μεταβολίτες.



Εικόνα 35: Φάσμα ούρων του περιστατικού 3 όπου επισημαίνονται με αρίθμηση ορισμένοι από τους σημαντικότερους μεταβολίτες. **1** – 2-Hydroxyisovalerate **2** – Ethylmalonate **3** – Isoleucine **4** – Valine **5** – Leucine **6**– 3-Hydroxyisovalerate **7** - 3-Hydroxyisobutyrate **8** – 3-Methyl-2-oxovalerate **9** – 3-Hydroxybutyrate **10** – Lactate **11** – Threonine **12** – 2-Hydroxyisobutyrate **13** – Alanine **14** - Acetate **15** – Glutamine **16** – Acetone **17** - Acetoacetate **18**– Pyruvate **19** – Succinate **20** – Citrate **21** – Dimethylamine **22** – Creatinine **23** – Trimethylamine N- oxide **24**– Glucose **25** – Glycine **26** – Mannitol **27** – Urea **28** – cis-aconitate **29** – Tyrosine **30** – N-Acetyltyrosine **31** – Histidine **32**– 3-Indoxysulfate **33** – Phenylalanine **34** – N-Phenylacetyltyrosine **35** – Hippurate **36**– Hypoxanthine **37** – Formate **38**– 1-Methylnicotinamide **39** – Unspecified

Στην εικόνα φαίνεται μέσα από την πλατφόρμα Chenomx NMR Suite 9.0 Profiler φαίνεται η ποσοτικοποίηση του σακχάρου Μαννιτόλη στην περιοχή 3.7 με 3.9 ppm στο περιστατικό 4.



Εικόνα 36: Από την πλατφόρμα Chenomx NMR Suite 9.0 Profiler φαίνεται η ποσοτικοποίηση του σακχάρου Μαννιτόλη στην περιοχή 3.7 με 3.9 ppm, όπου με μπλε φαίνεται το ποσοτικοποιημένο τμήμα του φάσματος.

Περιστατικό 5

Το δείγμα 5 ανήκει σε ένα βρέφος, 11 ημερών την ημέρα λήψης του δείγματος, το οποίο βρίσκονταν υπό διερεύνηση με την υποψία Τυροσιναιμίας Τύπου II ή Συστηματώδη Ερυθριματώδη Λύκου. Πραγματοποιήθηκαν βιοχημικές αναλύσεις από το Ινστιτούτο Υγείας του Παιδιού καθώς και ανάλυση των ούρων του ασθενή με την χρήση της φασματοσκοπίας NMR από το εργαστήριο μας. Τα ευρήματα του Ινστιτούτου Υγείας του παιδιού περιλαμβάνουν άμεση υπερχολερυθρυναιμία και παρατεταμένο χρόνο πήξης αίματος, ενώ σε εξέταση που πραγματοποιήθηκε σε δείγμα με κάρτα Guthrie παρατηρείται: αυξημένη γαλακτόζη. Συγχρόνως στα αμινογράμματα ορού εμφανίζονται: μεγάλη αύξηση μεθειονίνης, θρεονίνης, τυροσίνης, σχετική αύξηση υδροξυπρολίνης, προλίνης, σερίνης, γλυκίνης, αλανίνης, κιτροουλίνης, φαινυλαλανίνης, λυσίνης και ιστιδίνης.

Στο φάσμα NMR των ούρων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Chenomx NMR Suite 9.0 Profiler για την ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών. Το πλήρες μεταβολικό προφίλ του ασθενή φαίνεται στον πίνακα 18. Οι μεταβολίτες που παρουσιάζουν σημαντική αύξηση στα δικά μας ευρήματα, με βάση τα φυσιολογικά όρια της βιβλιογραφίας, παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 19.

Πίνακας 18: Μεταβολικό προφίλ με το σύνολο των μεταβολιτών για το περιστατικό 5

<i>Μεταβολίτης</i>	Συγκέντρωση δείγματος (umol/mmol creatinine)	Φυσιολογικά όρια (umol/mmol creatinine)
<i>1-Methylnicotinamide</i>	134.84	7.75 ± 7.16
<i>2-Aminobutyrate</i>	31.59	<6.33
<i>2-Hydroxy-3-methylvalerate</i>	53.13	6.53 ± 5.52
<i>2-Hydroxyisobutyrate</i>	8.82	0.1 (0.1-8.2)
<i>2-Hydroxyisovalerate</i>	16.63	2.0 (0.0-4.5)
<i>2-Hydroxyvalerate</i>	79.58	Not Quantified

<i>3-Aminoisobutyrate</i>	131.71	2.04-354.79
<i>3-Hydroxybutyrate</i>	61.28	<54.30
<i>3-Hydroxyisobutyrate</i>	145.89	25.4 (10.2 -33.5)
<i>3-Hydroxyisovalerate</i>	37.28	26.9 (9.1-66.4)
<i>3-Indoxylsulfate</i>	26.57	129.0 (45.0-191.0)
<i>3-Methyl-2-oxovalerate</i>	15.85	Not Quantified
<i>4-Hydroxybenzoate</i>	28.80	1.5 (0.1-2.8)
<i>4-Hydroxyphenylacetate</i>	662.69	15.5-59.1
<i>4-Hydroxyphenyllactate</i>	2197.57	4.8 (2.7-5.3)
<i>Acetate</i>	125.01	16.06 ± 11.38
<i>Acetoacetate</i>	29.80	18.64 ± 20.321
<i>Acetone</i>	25.00	4.2 (0.98-15.3)
<i>Alanine</i>	3508.43	39.57 - 187.91
<i>Asparagine</i>	1625.18	2.83-113.12
<i>Betaine</i>	2544.93	16.89 ± 25.16
<i>Butyrate</i>	9.15	3.2 (0.0-6.4)
<i>Carnitine</i>	25.56	18.16 ± 16.44
<i>Choline</i>	158.50	6.3 (0.72-28.5)
<i>cis-Aconitate</i>	156.49	73.8 (64.0-130.3)
<i>Citrate</i>	1009.04	708.9 (25.2-3168.4)
<i>Creatine</i>	148.23	25 - 776
<i>Creatine phosphate</i>	173.79	53.68 ± 28.39
<i>Dimethylamine</i>	141.31	56.97 ± 42.79
<i>Ethylmalonate</i>	27.35	0.5-20.2
<i>Formate</i>	407.08	46.20 ± 30.21
<i>Fructose</i>	33819.73	70.38 ± 107.54
<i>Fumarate</i>	50.01	10.7 (0.1-28.2)
<i>Galactose</i>	39.51	262.58 ± 881.72
<i>Glucose</i>	319.57	7.0 (0.0-15.0)
<i>Glutamine</i>	841.39	75.18 - 321.66
<i>Glycine</i>	3397.70	64-165
<i>Hippurate</i>	53.69	12.5-56.2

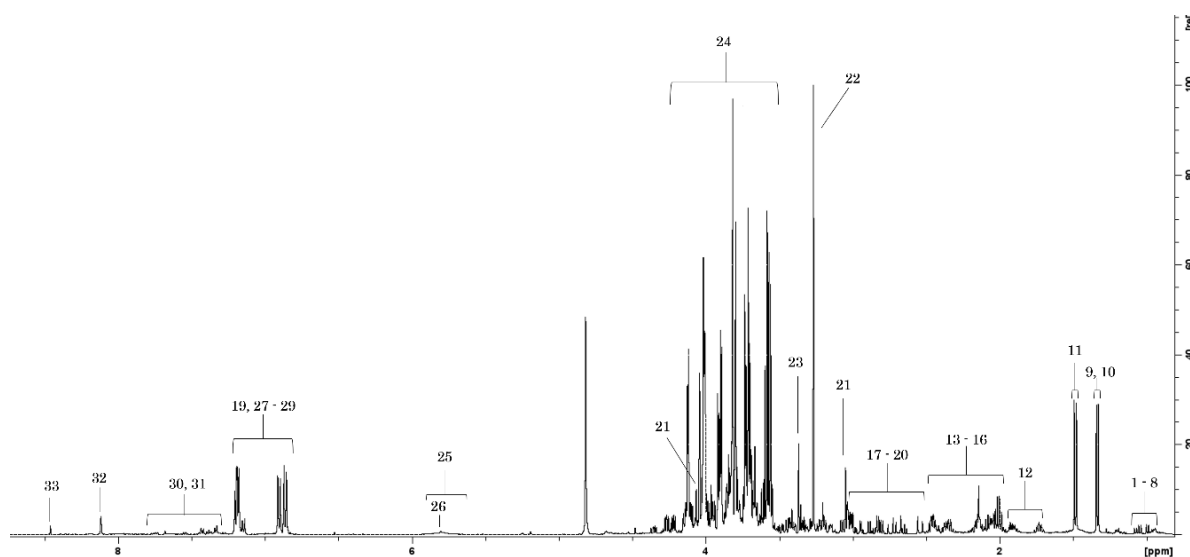
<i>Histidine</i>	1209.29	62.59 ± 67.65
<i>Hypoxanthine</i>	37.62	<5.2
<i>Isoleucine</i>	37.50	<9.73
<i>Lactate</i>	260.19	12.55-125.51
<i>Leucine</i>	83.60	<22.62
<i>Lysine</i>	968.97	2.15-224.84
<i>Mannitol</i>	1081.82	62.69 ± 69.96
<i>Mannose</i>	110.28	11.65 ± 15.42
<i>Methanol</i>	1103.58	11.57 ± 17.32
<i>Methionine</i>	485.21	<4.64
<i>Methylamine</i>	14.51	5.91 ± 3.78
<i>myo-Inositol</i>	700.64	40.56 ± 25.48
<i>N,N-Dimethylglycine</i>	26.68	5.07 ± 3.31
<i>N-Acetyltyrosine</i>	105.70	1.60 (0-6.40)
<i>N-Isovaleroylglycine</i>	20.20	0.37 ± 1.19
<i>N-Phenylacetyl glycine</i>	76.46	74.84 ± 30.79
<i>O-Acetylcarnitine</i>	38.17	4.47 ± 3.52
<i>Phenylalanine</i>	418.69	1.58-31.67
<i>Proline</i>	3521.93	3.17- 229.48
<i>Pyruvate</i>	180.38	28.6 (12.9-43.0)
<i>Sarcosine</i>	25.11	<8.48
<i>Succinate</i>	30.81	12.60 ± 12.13
<i>Taurine</i>	262.86	9.72 - 158.62
<i>Threonine</i>	3666.37	25.71 ± 16.04
<i>trans-4-Hydroxy-L-proline</i>	1341.00	<286.82
<i>Trimethylamine</i>	19.09	3.37 ± 1.20
<i>Trimethylamine N-oxide</i>	272.13	69.88 ± 55.00
<i>Tryptophan</i>	177.81	1.58-35.63
<i>Tyrosine</i>	3132.27	14.59 ± 10.74
<i>Urea</i>	4647.06	55008.54 ± 103035.18
<i>Valine</i>	256.17	1.24-23.86

Πίνακας 19: Μεταβολίτες που παρουσιάζουν διαφοροποίηση με βάση τις φυσιολογικές τιμές της βιβλιογραφίας για το περιστατικό 5

<i>Μεταβολίτης</i>	Συγκέντρωση στα ούρα ($\mu\text{mol}/\text{mmol creatinine}$)	Φυσιολογικά όρια ($\mu\text{mol}/\text{mmol creatinine}$)
<i>4-Hydroxyphenylacetate</i>	662.69	15.5 – 59.1
<i>4-Hydroxyphenyllactate</i>	2197.57	2.7 – 5.3
<i>Alanine</i>	3508.43	39.57 – 187.91
<i>Asparagine</i>	1625.18	2.83-113.12
<i>Betaine</i>	2544.93	16.88 \pm 25.16
<i>Choline</i>	158.50	0.72-28.5
<i>Formate</i>	407.08	46.20 \pm 30.21
<i>Fructose</i>	33819.73	70.38 \pm 107.54
<i>Fumarate</i>	50.01	0.1-28.2
<i>Glutamine</i>	841.39	75.18 - 321.66
<i>Glycine</i>	3397.70	64-165
<i>Histidine</i>	1209.29	12.6 \pm 3.5
<i>Hypoxanthine</i>	37.62	<5.2
<i>Isoleucine</i>	37.50	<9.73
<i>Lactate</i>	260.19	12.56-125.51
<i>Leucine</i>	83.60	<22.62
<i>Lysine</i>	968.97	2.15-224.84
<i>Mannitol</i>	1081.82	62.69 \pm 69.96
<i>Mannose</i>	110.28	11.65 \pm 15.42
<i>Methanol</i>	1103.58	11.57 \pm 17.32
<i>Methionine</i>	485.21	<4.64
<i>myo-Inositol</i>	700.64	40.56 \pm 25.48
<i>N-Acetyltyrosine</i>	105.70	0 – 6.40
<i>Phenylalanine</i>	418.69	1.58-31.67
<i>Proline</i>	3521.93	3.17- 229.48
<i>Pyruvate</i>	180.38	12.9-43.0
<i>Threonine</i>	3666.37	25.71 \pm 16.04

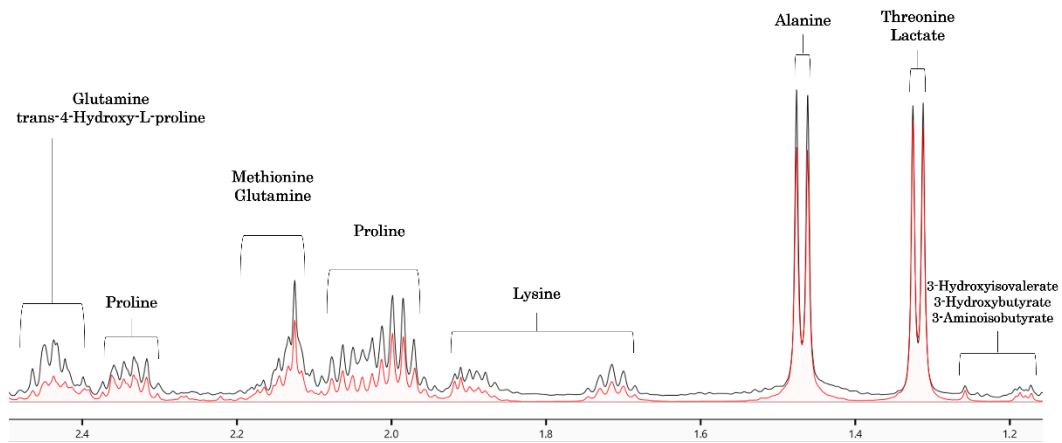
<i>trans-4-Hydroxy-L-proline</i>	1341.00	<286.82
<i>Tryptophan</i>	177.81	1.58-35.63
<i>Tyrosine</i>	3132.27	14.59 ± 10.74
<i>Valine</i>	256.17	1.24-23.86

Στην εικόνα φαίνεται το φάσμα ούρων του περιστατικού 5 όπου επισημαίνονται με αρίθμηση ορισμένοι από τους σημαντικότερους μεταβολίτες.



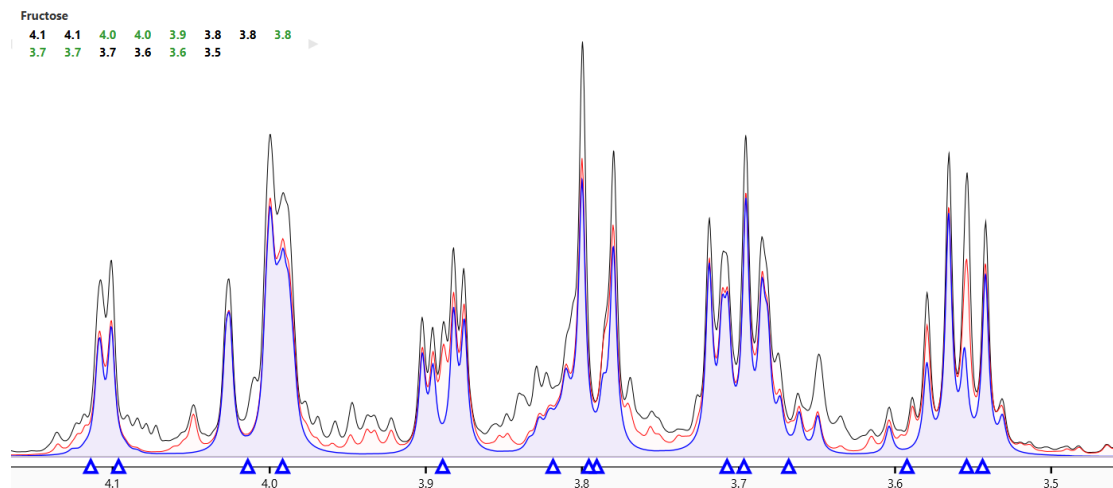
Εικόνα 37: Φάσμα ούρων του περιστατικού 5 όπου επισημαίνονται με αρίθμηση ορισμένοι από τους σημαντικότερους μεταβολίτες. **1** – Leucine **2** – Valine **3** – Isoleucine **4** - 3-Hydroxyisobutyrate **5** - 3-Hydroxybutyrate **6**– 3-Aminoisobutyrate **7** - 3-Hydroxyisovalerate **8** – 2-Hydroxyvalerate **9** – Threonine **10** – Lactate **11** – Alanine **12** – Lysine **13** – Proline **14** – Methionine **15** – Glutamine **16** – *trans-4-Hydroxy-L-proline* **17** - Citrate **18**– Dimethylamine **19** - 4-Hydroxyphenyllactate **20** – Asparagine **21** – Creatinine **22** – Betaine **23** – Methanol **24** – Fructose **25** – Urea **26** – *cis*-Aconitate **27** – 4-Hydroxyphenylacetate **28** – Tyrosine **29** – *N*-Acetyltyrosine **30** – Phenylalanine **31** – Tryptophan **32** – Histidine **33** – Formate

Στην εικόνα φαίνεται σε μεγέθυνση η περιοχή 1.1 με 2.5 στο πρόγραμμα Chenomx NMR Suite 9.0 Profiler.



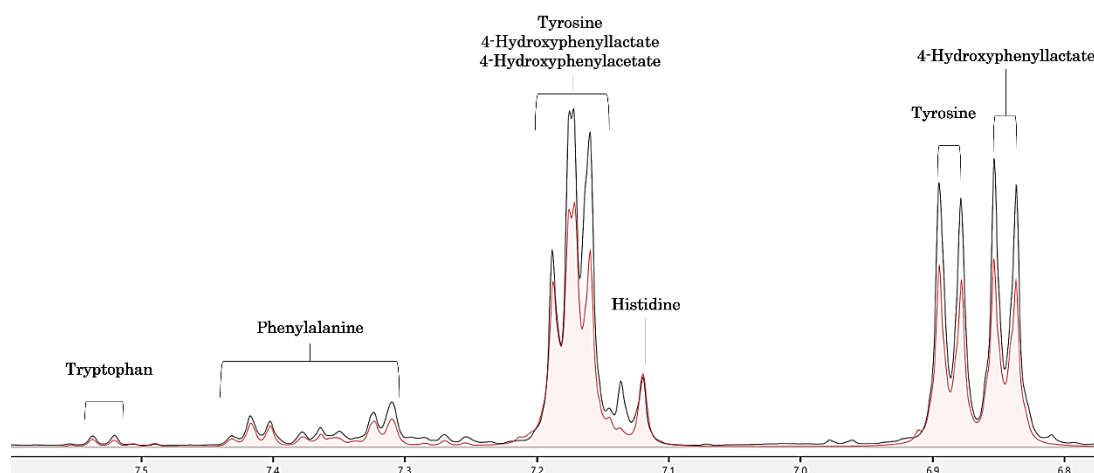
Εικόνα 38: Σε μεγέθυνση η περιοχή 1.1 με 2.5 ppm στο πρόγραμμα Chenomx NMR Suite 9.0 Profiler.

Αντίστοιχα φαίνεται η περιοχή 3.5 με 4.1 ppm όπου έχει ταυτοποιηθεί και ποσοτικοποιηθεί το σάκχαρο φρουκτόζη.



Εικόνα 39: Σε μεγέθυνση η περιοχή 3.5 με 4.1 ppm όπου έχει ταυτοποιηθεί και ποσοτικοποιηθεί το σάκχαρο φρουκτόζη

Τέλος στην εικόνα φαίνεται η αρωματική περιοχή στα 6.8 με 7.5 ppm:



Εικόνα 40: Σε μεγέθυνση η περιοχή 6.8 με 7.5 ppm

Περιστατικό 6

Το περιστατικό αφορά έναν ασθενή 5,5 μηνών την χρονική στιγμή λήψης του δείγματος, όπου παρουσιάστηκε στο ΠΓΝΙ με επεισόδια σπασμών και βρίσκονταν υπό διερεύνηση ενώ κατά την λήψη του δείγματος βρισκόταν υπό αγωγή για επιληπτικές κρίσεις. Ο ασθενής έπειτα από βιοχημικές εξετάσεις εμφάνισε αυξημένη αμμωνία, χαμηλά επίπεδα βιταμίνης B12 με φυσιολογικά αέρια αρτηριακού αίματος και γαλακτικού οξέος. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκαν ευρήματα στα αμινογράμματα ορού τα οποία περιλαμβάνουν αύξηση ταυρίνης, σχετική αύξηση θρεονίνης-σερίνης και αύξηση γαλακτικού οξέος.

Από την ανάλυση των ούρων του ασθενούς με την χρήση της φασματοσκοπίας NMR και ποσοτικοποίηση με την χρήση της πλατφόρμας Chenomix 9.0 παρατίθενται το συνολικό μεταβολικό προφίλ στον πίνακα 20. Ενώ στον πίνακα 21 φαίνονται οι μεταβολίτες που παρουσιάζουν διαφοροποίηση από τα φυσιολογικά όρια, με βάση την βιβλιογραφία.

Πίνακας 20: Μεταβολικό προφίλ με το σύνολο των μεταβολιτών για το περιστατικό 6

Μεταβολίτης	Συγκέντρωση στα ούρα ($\mu\text{mol}/\text{mmol creatinine}$)	Φυσιολογικά όρια ($\mu\text{mol}/\text{mmol creatinine}$)
<i>1-Methylnicotinamide</i>	89.10	7.75 ± 7.16
<i>2-Aminobutyrate</i>	15.02	<6.33
<i>2-Hydroxybutyrate</i>	159.37	5.0 (0.0-10.0)
<i>2-Hydroxyisobutyrate</i>	14.77	7.9 (3.7-19.5)

<i>2-Hydroxyisovalerate</i>	7.64	2.0 (0.0-4.5)
<i>3-Aminoisobutyrate</i>	102.60	2.04-354.79
<i>3-Hydroxybutyrate</i>	20.11	<54.30
<i>3-Hydroxyisobutyrate</i>	26.48	25.4 (10.2 -33.5)
<i>3-Hydroxyisovalerate</i>	26.73	26.9 (9.1-66.4)
<i>3-Methyl-2-oxovalerate</i>	13.24	Not Quantified
<i>Acetate</i>	60.85	16.06 ± 11.38
<i>Acetoacetate</i>	11.71	18.64 ± 20.32
<i>Acetone</i>	41.75	4.2 (0.98-15.3)
<i>Alanine</i>	112.02	39.57 - 187.91
<i>Betaine</i>	9.42	16.89 ± 25.16
<i>Carnitine</i>	27.24	18.16 ± 16.44
<i>Choline</i>	12.98	6.3 (0.72-28.5)
<i>Citrate</i>	506.62	708.9 (25.2-3168.4)
<i>Creatine</i>	92.92	25 - 776
<i>Creatine phosphate</i>	117.36	53.68 ± 28.39
<i>Dimethylamine</i>	142.57	56.97 ± 42.793
<i>Ethylmalonate</i>	137.98	0.5-20.2
<i>Formate</i>	185.85	46.20 ± 30.21
<i>Galactose</i>	445.52	262.58 ± 881.72
<i>Glucose</i>	-	7.0 (0.0-15.0)
<i>Glycine</i>	495.67	64-165
<i>Hippurate</i>	39.46	12.5-56.2
<i>Histidine</i>	324.85	62.59 ± 67.65
<i>Homocysteine</i>	76.63	2.00 ± 1.65
<i>Isoleucine</i>	14.00	<9.73
<i>Lactate</i>	17.82	12.55-125.51
<i>Leucine</i>	12.22	<22.62
<i>Methanol</i>	71.79	11.57 ± 17.32
<i>Methylamine</i>	4.33	5.91 ± 3.78
<i>myo-Inositol</i>	131.87	40.56 ± 25.48
<i>N,N-Dimethylglycine</i>	84.27	5.01 ± 3.31

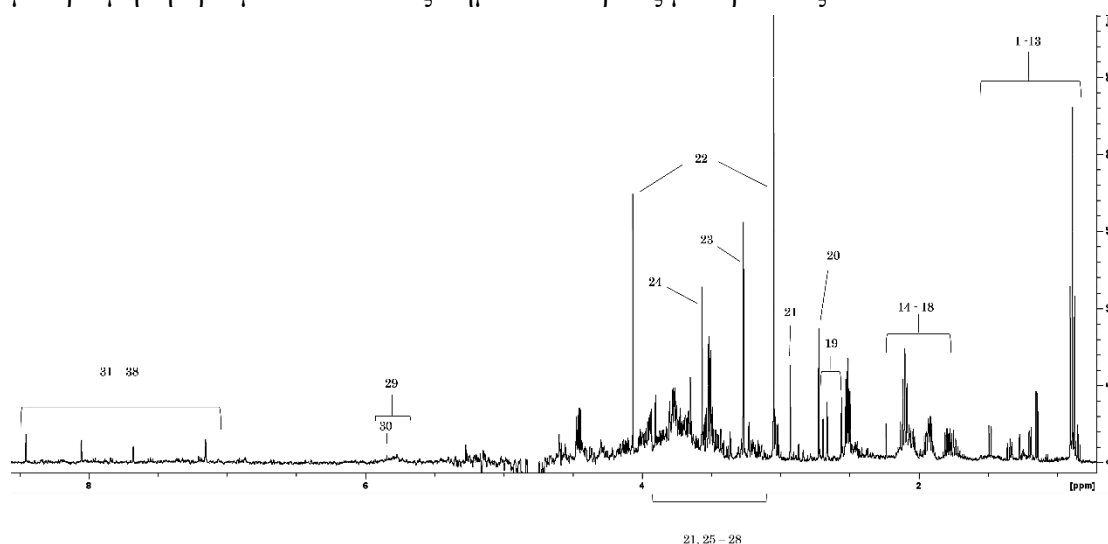
<i>N-Acetylaspartate</i>	29.28	18.0 (0.1-43.9)
<i>N-Isovaleroylglycine</i>	6.11	0.37 ± 1.19
<i>N-Methylhydantoin</i>	28.51	8.95 ± 7.78
<i>N-Phenylacetylglycine</i>	33.60	74.84 ± 30.79
<i>O-Acetylcarnitine</i>	9.16	4.47 ± 3.52
<i>Phenylalanine</i>	6.11	1.58-31.67
<i>Propionate</i>	12.73	11.4-18.3
<i>Pyruvate</i>	22.15	28.6 (12.9-43.0)
<i>Sarcosine</i>	3.56	<8.48
<i>Succinate</i>	18.58	12.60 ± 12.13
<i>Taurine</i>	103.62	9.72 - 158.62
<i>Threonine</i>	88.09	25.71 ± 16.04
<i>Trimethylamine</i>	6.62	3.37 ± 1.99
<i>Trimethylamine N-oxide</i>	168.53	69.88 ± 55.003
<i>Tyrosine</i>	31.06	14.59 ± 10.74
<i>Urea</i>	2139.77	55008.54 ± 103035.18
<i>Valine</i>	10.18	1.24-23.86

Πίνακας 21: Μεταβολίτες που παρουσιάζουν διαφοροποίηση με βάση τις φυσιολογικές τιμές της βιβλιογραφίας για το περιστατικό 6

<i>Μεταβολίτης</i>	Συγκέντρωση στα ούρα (umol/mmol creatinine)	Φυσιολογικά όρια (umol/mmol creatinine)
<i>2-Hydroxybutyrate</i>	159.37	0.0 – 10.0
<i>2-Hydroxyisovalerate</i>	7.64	0.0-4.5
<i>Acetate</i>	60.85	16.06 ± 11.38
<i>Acetone</i>	41.75	0.98 – 15.3
<i>Creatine</i>	92.92	62.01 - 932.29
<i>Carnitine</i>	27.24	18.16 ± 16.44
<i>Ethylmalonate</i>	137.98	0.5-20.2
<i>Glycine</i>	495.67	64 – 165
<i>Histidine</i>	324.85	62.59 ± 67.65

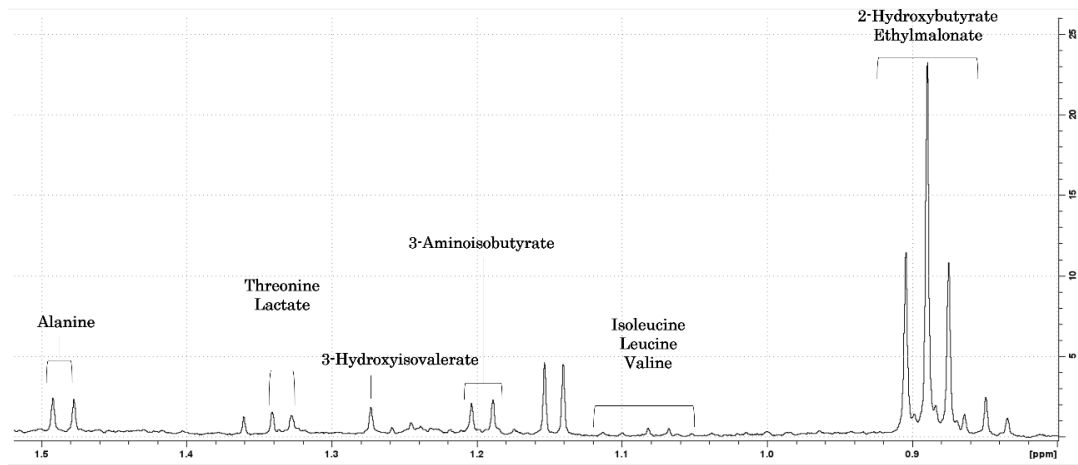
Homocysteine	76.63	2.00 ± 1.65
Isoleucine	14.00	<9.73
Methanol	71.79	11.57 ± 17.32
myo-Inositol	131.87	40.60 ± 25.48
N,N-Dimethylglycine	84.27	5.07 ± 3.31
Threonine	88.09	25.71 ± 16.04
TMAO	168.53	69.88 ± 55.00

Στην εικόνα φαίνεται το φάσμα ούρων του περιστατικού 6 όπου επισημαίνονται με αρίθμηση ορισμένοι από τους σημαντικότερους μεταβολίτες.



Εικόνα 41: Φάσμα ούρων του περιστατικού 6 όπου επισημαίνονται με αρίθμηση ορισμένοι από τους σημαντικότερους μεταβολίτες. **1** – 2-Hydroxyisovalerate **2** - Ethylmalonate **3** – Isoleucine **4** – Valine **5** – Leucine **6**– 3-Hydroxyisovalerate **7** - 3-Hydroxyisobutyrate **8** – 3-Methyl-2-oxovalerate **9** – 3-Hydroxybutyrate **10** – Lactate **11** – Threonine **12** – 2-Hydroxyisobutyrate **13** – Alanine **14** - Acetate **15** – Acetone **16** - Acetoacetate **17**– Pyruvate **18** – Succinate **19** – Citrate **20** – Dimethylamine **21** - N,N-Dimethylglycine **22** – Creatinine **23** – Trimethylamine N- oxide **24** – Glycine **25** – Galactose **26** – myo-inositol **27**- Taurine **28**- Creatine **29**- Urea **30** – cis-aconitate **31** – Tyrosine **32** – Histidine **33** – Phenylalanine **34**– N-Phenylacetyl glycine **35** – Hippurate **36** – Formate **37**– 1-Methylnicotinamide

Στην εικόνα φαίνεται σε μεγέθυνση η περιοχή των 0.8 με 1.5 ppm

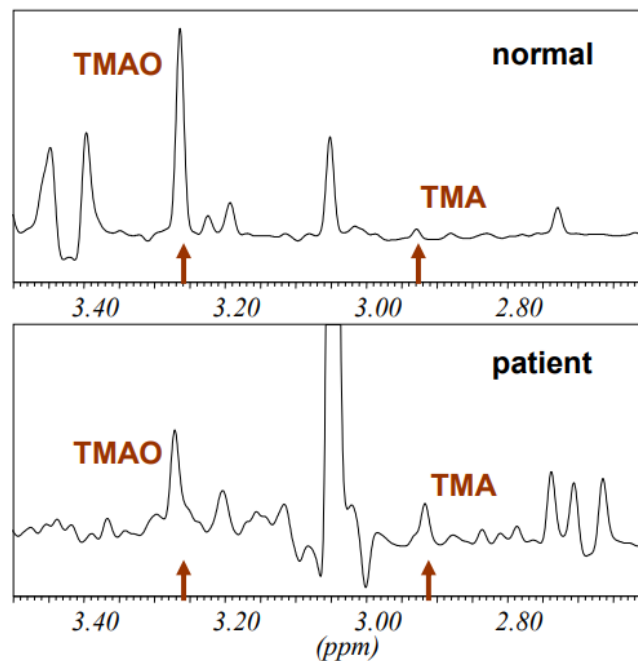


Εικόνα 42: Σε μεγέθυνση η περιοχή των 0.8 με 1.5 ppm

Περιστατικό 7

Το περιστατικό 7, γυναίκα ηλικίας 17 ετών την χρονική στιγμή της λήψης του δείγματος, πάσχει από τριμεθυλαμινουρία. Η διάγνωση πραγματοποιήθηκε έπειτα από ανάλυση των ούρων του ασθενή με την χρήση της φασματοσκοπίας NMR. Η διάγνωση βασίστηκε στον λόγο TMA /TMA +TMAO. Στα υγιή άτομα ο λόγος αυτός κυμαίνεται από 92 έως 98%. Στην ασθενή με τριμεθυλαμινουρία ο λόγος ήταν 70%.

Παρακάτω παρατίθεται το φάσμα των ούρων του ασθενή σε αντιπαραβολή με ενός υγιούς ατόμου, ενώ είναι επικεντρωμένο στην περιοχή των 2,60 – 3,50 ppm, όπου εντοπίζονται τα TMA και TMAO.

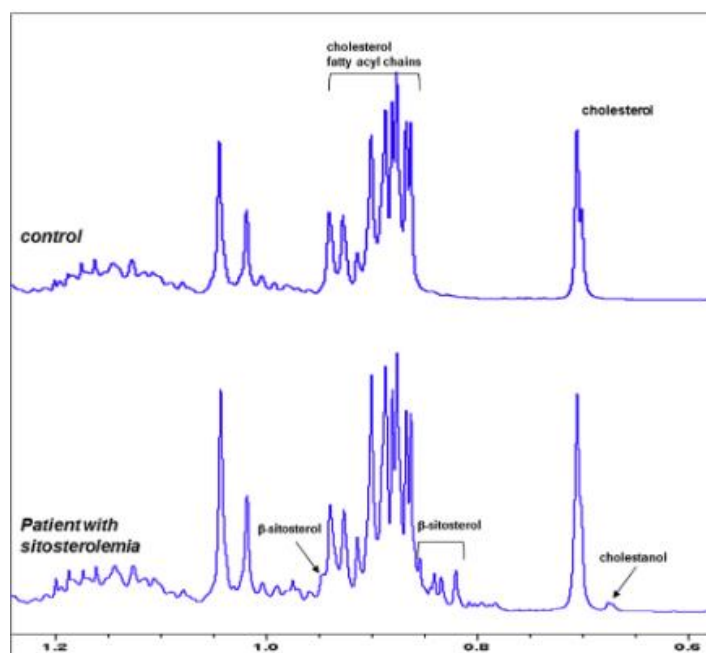


Εικόνα 43: Φάσμα των ούρων του ασθενή σε αντιπαραβολή με ενός υγιούς ατόμου, ενώ είναι επικεντρωμένο στην περιοχή των 2,60 – 3,50 ppm, όπου εντοπίζονται τα TMA και TMAO

Περιστατικό 8

Το περιστατικό αφορά μια γυναίκα ηλικίας 48 ετών την χρονική στιγμή της λήψης του δείγματος, η οποία πάσχει από σιτοστερολαιμία. Η διάγνωση πραγματοποιήθηκε, έπειτα από αξιολόγηση των βιοχημικών αποτελεσμάτων, των ευρημάτων του εργαστηρίου καθώς και της κλινικής εικόνας της ασθενούς. Όσον αφορά τα βιοχημικά αποτελέσματα, δεν παρατηρήθηκαν σοβαρές διαταραχές πλην της υπερχοληστερολαιμίας, ενώ από την γενική αίματος προκύπτουν αναιμία, θρομβοπενία και δικτυοερυθροκυττάρωση. Η εξέταση περιφερειακού αίματος έδειξε στοματοκυττάρωση και μακροθρομβοπενία. Τα παραπάνω σε συνδυασμό με το ιστορικό πρόωρης καρδιαγγειακής νόσου οδήγησαν στην κλινική υποψία σιτοστερολαιμίας.

Εξετάστηκε στη συνέχεια, με την χρήση της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, το πλάσμα της ασθενούς, έπειτα από εκχύλιση των λιπιδίων. Τα ευρήματα μας φαίνεται να καταδεικνύουν την παρουσία σημαντικών ποσοτήτων φυτοστερολών, κυρίως β-σιτοστερόλης, οι οποίες εντοπίζονται στο φάσμα κοντά στην περιοχή της χοληστερόλης. Παράλληλα ποσοτικοποιήθηκαν τα επίπεδα β-σιτοστερόλης στο πλάσμα με αέρια χρωματογραφία/ φασματοσκοπία μάζας όπου βρέθηκε τιμή της τάξης των 25,4 mg/dL, με φυσιολογικά όρια να μην ξεπερνούν τα 1 mg/dL. Παρακάτω παρατίθεται το φάσμα του πλάσματος της ασθενούς επικεντρωμένο στην περιοχή ενδιαφέροντος, στα 0,55 – 1,25 ppm, σε αντιπαραβολή με ένα αντίστοιχο φάσμα υγιούς ατόμου.



Εικόνα 44: Το φάσμα του πλάσματος της ασθενούς επικεντρωμένο στην περιοχή ενδιαφέροντος, στα 0,55 – 1,25 ppm, σε αντιπαραβολή με ένα αντίστοιχο φάσμα υγιούς ατόμου

Συζήτηση

Τα IEMs αποτελούν σοβαρό πρόβλημα δημόσιας υγείας, καθώς η καθυστερημένη διάγνωση μπορεί να οδηγήσει σε μη αναστρέψιμα χρόνια προβλήματα. Έτσι, η έγκαιρη διάγνωση και η άμεση θεραπευτική παρέμβαση είναι ζωτικής σημασίας για την πρόληψη της ανάπτυξης σοβαρών συμπτωμάτων και την ελαχιστοποίηση της πιθανότητας πρόωρου θανάτου[8]. Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που καθιστά την διάγνωση και την παρακολούθηση των ενδογενών νοσημάτων του μεταβολισμού απαραίτητες είναι η επιρροή που έχουν στον ενήλικο πληθυσμό. Υπάρχουν περιπτώσεις νοσημάτων τα οποία εκδηλώθηκαν σε μεταγενέστερο στάδιο στην ζωή των ασθενών ακόμα και μετά την ενηλικίωση[3].

Ένα αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό των νοσημάτων αυτών είναι η συσσώρευση, σε συγκεντρώσεις της τάξης του mM, μη φυσιολογικών μεταβολιτών στα βιολογικά υγρά, ο προσδιορισμός όμως των οποίων δεν αποτελεί μέρος της καθημερινής πρακτικής στα κλινικά εργαστήρια και η διάγνωση συχνά βασίζεται στην ανάλυση με αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματοσκοπία μάζης (GC-MS), υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματοσκοπία μάζης (LC-MS/MS) και ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία. Όλες αυτές οι τεχνικές απαιτούν εκτενή προετοιμασία του δείγματος. Ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος

τύπος δειγμάτων για αυτές τις τεχνικές είναι κηλίδες αίματος του νεογέννητου (newborn bloodspot screening)[10],[12].

Η μεταβολομική αποτελεί ιδανικό εργαλείο για την μελέτη των ενδογενών νοσημάτων του μεταβολισμού. Ειδικότερα, η φασματοσκοπία NMR των βιολογικών υγρών στην μεταβολομική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, αποδίδει ένα χαρακτηριστικό αποτύπωμα στο οποίο όλοι οι μεταβολίτες εμφανίζονται με ένα εύκολα αναγνωρίσιμο σήμα που χαρακτηρίζει την δομή τους η ένταση του οποίου είναι ανάλογη της συγκέντρωσής τους. Η ικανότητα του NMR να παρέχει το μεταβολικό προφίλ ενός βιολογικού υγρού εντοπίζοντας μη εκλεκτικά το σύνολο τόσο των γνωστών όσο και των άγνωστων μεταβολιτών, γρήγορα και με υψηλή επαναληψιμότητα το καθιστά κατάλληλο για newborn screening. Η επικρατέστερη μορφή NMR που χρησιμοποιείται για την ανάλυση των βιολογικών υγρών βασίζεται στον πυρήνα των πρωτονίων (^1H NMR), εξαιτίας της μεγαλύτερης ευαισθησίας του[11].

Όσον αφορά τα βιολογικά υγρά, τα ούρα αποτελούν το συνηθέστερο δείγμα για την παρακολούθηση των ενδογενών νοσημάτων του μεταβολισμού, καθώς 1) Ένα αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό των νοσημάτων αυτών είναι η συσσώρευση, σε συγκεντρώσεις της τάξης του mM, μη φυσιολογικών μεταβολιτών στα βιολογικά υγρά (κυρίως στα ούρα) και 2) το δείγμα ούρων συλλέγεται εύκολα και μη επεμβατικά, μπορεί να συλλεχθεί δείγμα πολλαπλές φορές μέσα στην ίδια ημέρα και η προετοιμασία που προηγείται της μέτρησης στο NMR είναι ελάχιστη, παρέχοντας την δυνατότητα εντοπισμού πληθώρας διαφορετικών μεταβολιτών[1]. Για τον λόγο αυτό αποτέλεσαν και το βασικό είδος δείγματος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.

Καίριας σημασίας για την παρούσα μελέτη αποτέλεσε ο προσδιορισμός των μεταβολιτών που εντοπίζονται στα ούρα όλων των ατόμων, υγείων και μη. Προκειμένου να γίνει αυτό, αξιοποιήθηκαν λίστες μεταβολιτών που είχαν χρησιμοποιηθεί στο εργαστήριο μας στο παρελθόν σε συνδυασμό με άλλες έρευνες από την διεθνή βιβλιογραφία [24]–[26], [53]–[55].

Προκειμένου να προσδιοριστούν τα φυσιολογικά όρια των μεταβολιτών στην παρούσα μελέτη για την ηλικία του εκάστοτε περιστατικού, αξιοποιήθηκε η μεγαλύτερη ηλεκτρονική βάση δεδομένων που αφορά το ανθρώπινο μεταβόλομα, το HMDB (<http://www.hmdb.ca/>). Παρέχει πληροφορίες για την πλειοψηφία των μεταβολιτών που αφορούν: την δομή, τον βιολογικό ρόλο, τα βιολογικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται, την συσχέτιση τους με διάφορες ασθένειες, φυσιολογικές και μη συγκεντρώσεις τους στα

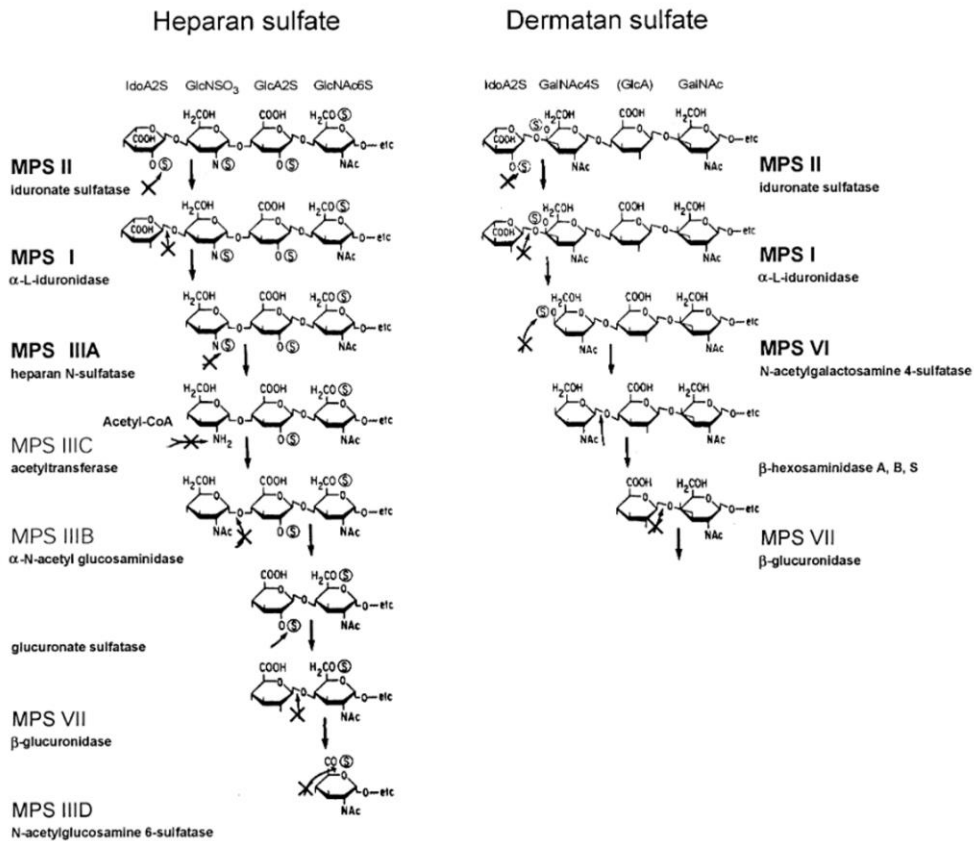
διαφορετικά βιολογικά υγρά συνοδευόμενα σε κάθε περίπτωση με τα σχετικά φασματοσκοπικά τους δεδομένα σε NMR, MS/MS και GC-MS[22].

Νόσος Hunter

Το περιστατικό 1 αφορά παιδί ηλικίας 3,5 ετών που πάσχει από την νόσο Hunter. Η νόσος Hunter ανήκει στην κατηγορία των βλεννοπολυσακχαριδώσεων και ειδικότερα πρόκειται για την Βλεννοπολυσακχαρίδωση τύπου II. Οι βλεννοπολυσακχαρίτες ή γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs) είναι πολυσακχαρίτες, οι οποίοι αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες μονάδες δισακχαρίτη[56]. Οι βλεννοπολυσακχαριδώσεις είναι κληρονομούμενα μεταβολικά νοσήματα που οδηγούν σε απουσία ή σημαντική έλλειψη μιας από τις λυσοσωμικές υδρολάσες που είναι υπεύθυνες για την αποικοδόμηση των βλεννοπολυσακχαριτών. Ανήκουν στις διαταραχές της λυσοσωμικής αποθήκευσης. Η νόσος Hunter ειδικότερα, οφείλεται σε ελλιπή δράση της σουλφατάσης του ιδουρονικού η οποία φυσιολογικά αφαιρεί μια ομάδα θείου από τα μόρια των βλεννοπολυσακχαριτών θειική ηπαράνη και δερματάνη. Απουσία του ενζύμου, οι βλεννοπολυσακχαρίτες συσσωρεύονται στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων οργάνων και ιστών, συμπεριλαμβανομένου και του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η συσσώρευση αυτή οδηγεί σε αλλαγή της μορφολογίας των κυττάρων με αποτέλεσμα να παρατηρείται δυσλειτουργία στα όργανα. Κληρονομείται με φυλοσύνδετο υπολειπόμενο τρόπο εξαρτώμενη από το X-χρωμόσωμα και ως εκ τούτου έχει παρατηρηθεί σχεδόν αποκλειστικά σε αρσενικά. Το γονίδιο στο οποίο εντοπίζεται η μετάλλαξη εντοπίζεται στο X χρωμόσωμα στην θέση Xq28.

Η έγκαιρη διάγνωση της νόσου κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική για την έκβαση των ασθενών. Πραγματοποιείται έπειτα από συνεκτίμηση της κλινικής εικόνας του ασθενή σε συνδυασμό με βιοχημικό και ενδεχομένως μοριακό έλεγχο. Ο βιοχημικός έλεγχος περιλαμβάνει την μέτρηση των βλεννοπολυσακχαριτών στα ούρα των ασθενών και την ενζυμική δοκιμασία της σουλφατάσης. Ειδικότερα, στην πλειοψηφία των ασθενειών αυτών, παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα βλεννοπολυσακχαριτών στα ούρα και κατά συνέπεια απαιτείται ταυτοποίηση συγκεκριμένων βλεννοπολυσακχαριτών κατά περίπτωση προκειμένου να πραγματοποιηθεί διάγνωση. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό, και εφόσον έχουν παρατηρηθεί κυρίως αυξημένες οι θειικές ηπαράνη και δερματάνη, πραγματοποιούνται ενζυμικές δοκιμασίες της σουλφατάσης σε λευκοκύτταρα και ινοβλάστες του αίματος των ασθενών. Ο μοριακός έλεγχος δεν κρίνεται απαραίτητος για την διάγνωση της νόσου αλλά μπορεί να παρέχει σημαντικές πληροφορίες για το είδος της μετάλλαξης του γονιδίου[57].

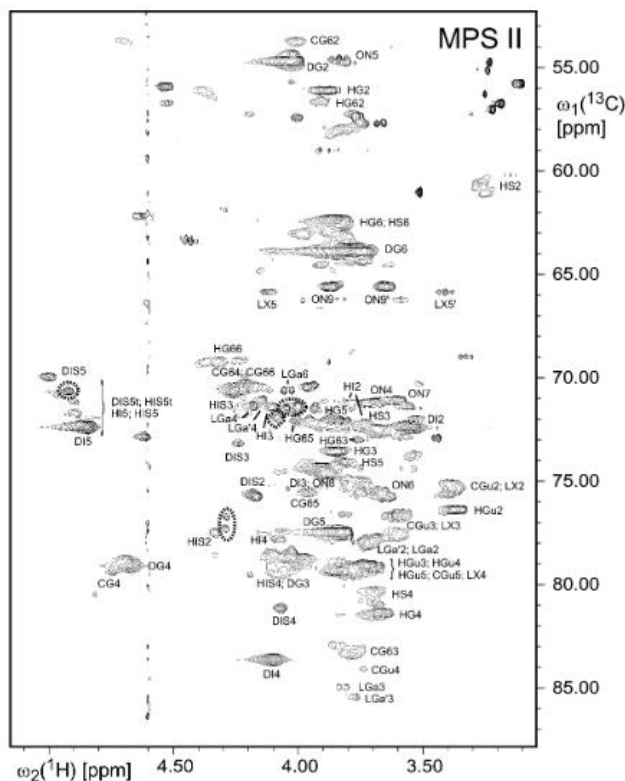
Στην εικόνα φαίνεται το μονοπάτι αποικοδόμησης των βλεννοπολυσακχαριτών θειική ηπαράνη και δερματάνη ενώ σε κάθε στάδιο της αποικοδόμησης τους φαίνεται και το διαφορετικό ένζυμο που συμμετέχει. Απουσία του εκάστοτε ενζύμου οδηγεί στα διαφορετικά είδη βλεννοπολυσακχαριδώσεων (MPS).



Εικόνα 45: Μονοπάτι αποικοδόμησης των βλεννοπολυσακχαριτών θειική ηπαράνη και δερματάνη ενώ σε κάθε στάδιο της αποικοδόμησης τους φαίνεται και το διαφορετικό ένζυμο που συμμετέχει

Αναφορικά με την χρήση του NMR στην μελέτη των νοσημάτων αυτών στην βιβλιογραφία, έχουν διερευνηθεί από τους *Hochuli et al.* το 2003, ωστόσο έγινε χρήση διδιάστατης ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (^1H , ^{13}C -COSY-NMR). Ειδικότερα, μελέτησαν τα ούρα ασθενών με διαφορετικά είδη βλεννοπολυσακχαριδώσεων προκειμένου να παρέχουν ένα μέσο άμεσης διάγνωσης και παρακολούθησης της εκάστοτε νόσου και να είναι δυνατή η αξιολόγηση της σοβαρότητας του κάθε περιστατικού. Συγκεκριμένα για την νόσο Hunter, στα ούρα των ασθενών είχαν ήδη εντοπισθεί και ποσοτικοποιηθεί υψηλά επίπεδα βλεννοπολυσακχαριτών. Προκειμένου να προσδιοριστεί το κλάσμα των βλεννοπολυσακχαριτών αυτών απομονώθηκαν από τα

δείγματα ούρων, με την χρήση ιονοανταλλακτικής χρωματογραφίας, και στην συνέχεια έγινε λήψη του φάσματος. Σε σύγκριση με υγιή άτομα, οι ασθενείς που πάσχουν από την νόσο Hunter, εμφάνισαν υψηλά επίπεδαθεικών δερματάνη και ηπαράνη. Το δισδιάστατο φάσμα φαίνεται και στην εικόνα[58].



Εικόνα 46: Δισδιάστατο ετεροπυρηνικό φάσμα H-C NMR ούρων ασθενή που πάσχει από την νόσο Hunter

Δεδομένου ότι δεν υπήρξε κάποια ειδική κατεργασία του δείγματος που να προηγήθηκε την λήψη των φασμάτων για την παρούσα εργασία, καθίσταται αδύνατος ο εντοπισμός και η ποσοτικοποίηση των συγκεκριμένων μορίων με την χρήση ¹H-NMR. Αυτό οφείλεται στην παρουσία πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων στα ούρα σε συνδυασμό με την μικρή ένταση των σημάτων που δίνουν οι παραπάνω μεταβολίτες με αποτέλεσμα να αλληλεπικαλύπτονται από τα υπόλοιπα σήματα. Όσον αφορά τους μεταβολίτες που παρουσιάζουν διαφοροποίηση από τα φυσιολογικά όρια, με βάση την βιβλιογραφία, δεν έχει αναφερθεί κάποια συσχέτιση με την νόσο Hunter και προτείνεται περεταίρω διερεύνηση των νοσημάτων αυτών και με περισσότερα ενδεχομένως δείγματα, προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

Στην περιοχή των 6.3 με 9.4 ppm της εικόνας υπάρχουν κορυφές που δεν έχουν αντιστοιχηθεί σε κάποιον γνωστό μεταβολίτη και ενδεχομένως οφείλονται στην παρουσία φαρμάκων στα ούρα. Ο ασθενής βρισκόταν υπο αγωγή την χρονική στιγμή λήψης του δείγματος.

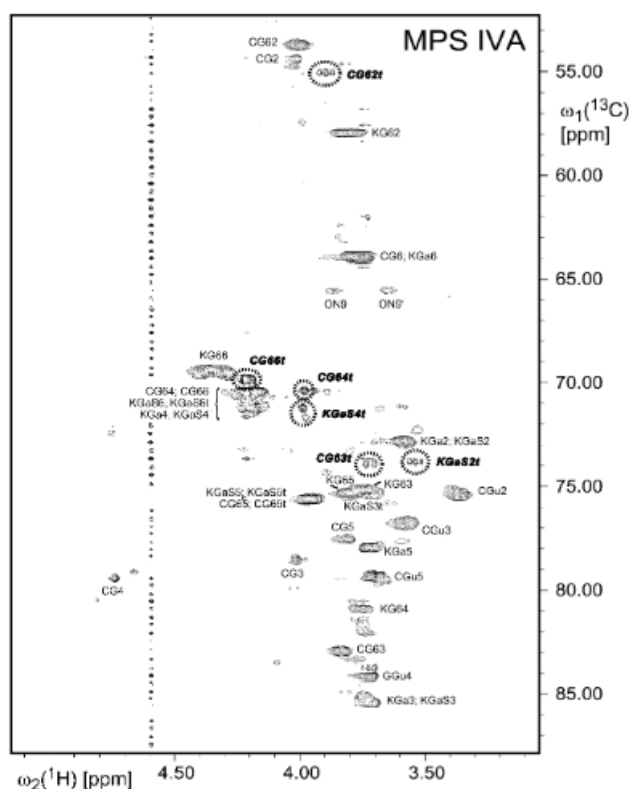
Νόσος Morquio

Όπως αναφέρθηκε το περιστατικό 2 αφορά παιδί ηλικίας 5,5 ετών που πάσχει από Βλεννοπολυσακχαρίδωση τύπου IV ή νόσος Morquio. Οφείλεται σε μετάλλαξη στο γονίδιο GALNS ή στο GLB1 τα οποία βρίσκονται στα χρωμοσώματα 16q24.3 και 3p21.31 αντίστοιχα και κωδικοποιούν την σύνθεση των ενζύμων σουλφατάση-6 και β-γαλακτοσιδάση αντίστοιχα. Έχουν ταυτοποιηθεί δύο τύποι της ασθένειας. Στην περίπτωση έλλειψης του ενζύμου σουλφατάση-6 της N-ακετυλογαλακτοζαμίνης προκύπτει η νόσος Morquio τύπου A (MPS IVA) ενώ στην περίπτωση έλλειψης του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση προκύπτει η νόσος Morquio τύπου B (MPS IVB). Η νόσος και στις δύο περιπτώσεις κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο. Τα ένζυμα αυτά φυσιολογικά εμπλέκονται στην διάσπαση των βλεννοπολυσακχαριτών και ειδικότερα στο μονοπάτι αποικοδόμησης των θεικών κερατάνη και χονδροϊτίνη-6. Απουσία τους, οι βλεννοπολυσακχαρίτες συσσωρεύονται στα οστά, τις αρθρώσεις και τους οφθαλμούς. Κατά συνέπεια η συσσώρευση αυτή εμποδίζει την φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων αυτών και οδηγεί στην εκδήλωση των συμπτωμάτων της νόσου. Τα συμπτώματα αυτά περιλαμβάνουν: άτομα με χαμηλό ανάστημα, σκελετικές δυσμορφίες και προβλήματα όρασης και ακοής ενώ προοδευτικά μπορεί να προκαλέσουν βλάβη σε όργανα και ιστούς οδηγώντας στην ανάπτυξη καρδιακών και πνευμονικών προβλημάτων, καθώς και νευρολογικής φύσης συμπτώματα. Η εμφάνιση των συμπτωμάτων διαφέρει μεταξύ των ατόμων και μπορεί να επιδεινωθούν σε βάθος χρόνου, ενώ η εμφάνιση τους γίνεται συνήθως στην πρώιμη παιδική ηλικία.

Όταν υπάρχει υποψία με βάση την κλινική εικόνα του ασθενούς για την ύπαρξη νόσου Morquio τύπου A ή B, ο συνιστώμενος τρόπος διάγνωσης είναι η μέτρηση της ενζυματικής δραστηριότητας της σουλφατάσης-6 της N-ακετυλογαλακτοζαμίνης ή της β-γαλακτοσιδάσης αντίστοιχα σε δείγματα ινοβλαστών ή λευκοκυττάρων. Συνίσταται ωστόσο, να διεξάγεται πρόσθετη βιοχημική ή/και γενετική ανάλυση για να αποκλειστούν πιθανά ψευδώς θετικά αποτελέσματα από ασθένειες που μπορεί να παρουσιάζουν επίσης χαμηλή δραστηριότητα του ενζύμου σουλφατάση-6 της N-ακετυλογαλακτοζαμίνης, όπως η πολλαπλή ανεπάρκεια σουλφατάσης (MSD) ή η βλεννολιπιδίωση II ή III (ML II/III). Άλλες διαγνωστικές μέθοδοι περιλαμβάνουν την ταυτοποίηση της θεικής κερατάνης ούρων με

χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, ηλεκτροφόρηση ή διαδοχική φασματομετρία μάζας (TMS) καθώς και μέτρηση της θειικής κερατάνης σε πλάσμα ή κηλίδες αίματος. Ωστόσο δεν αποτελεί έναν ειδικό δείκτη για την νόσο καθώς μπορεί να παρατηρηθεί αυξημένη και σε άλλες νόσους λυσοσωμικής αποθήκευσης. Σε κάθε περίπτωση ο γενετικός έλεγχος μπορεί να επιβεβαιώσει τις βιοχημικές αναλύσεις [59].

Οι *Hochuli et al.* το 2003 μελέτησαν, όπως προαναφέρθηκε, τις βλεννοπολυσακχαριδώσεις με την χρήση της διδιάστατης φασματοσκοπίας NMR. Συγκεκριμένα για την νόσο Morquio κατά αντιστοιχία, στα ούρα της ασθενούς είχαν ήδη εντοπισθεί και ποσοτικοποιηθεί υψηλά επίπεδα βλεννοπολυσακχαριτών. Προκειμένου να διαπιστωθεί το κλάσμα των βλεννοπολυσακχαριτών αυτών απομονώθηκαν από τα δείγματα ούρων με την χρήση ιονοανταλλακτικής χρωματογραφίας και στην συνέχεια έγινε λήψη του φάσματος. Σε σύγκριση με υγιή άτομα, οι ασθενείς που πάσχουν από την νόσο Morquio εμφάνισαν υψηλά επίπεδα θειικών κερατάνη και χονδροϊτίνη-6. Η χονδροϊτίνη εμφανίζεται και στα ούρα υγιών ατόμων καθώς και των ασθενών με τις υπόλοιπες βλεννοπολυσακχαριδώσεις, παρ' όλα αυτά στην συγκεκριμένη νόσο τα επίπεδα της είναι αυξημένα. Το διδιάστατο φάσμα φαίνεται και στην εικόνα[58].



Εικόνα 47: Δισδιάστατο ετεροπυρηνικό φάσμα H-C NMR ούρων ασθενή που πάσχει από την νόσο Morquio

Δεδομένου ότι δεν υπήρξε κάποια ειδική κατεργασία του δείγματος που να προηγήθηκε την λήψη των φασμάτων για την παρούσα εργασία, καθίσταται αδύνατος ο εντοπισμός και η ποσοτικοποίηση των συγκεκριμένων μορίων με την χρήση ¹H-NMR. Αυτό οφείλεται στην παρουσία πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων στα ούρα σε συνδυασμό με την μικρή ένταση των σημάτων που δίνουν οι παραπάνω μεταβολίτες με αποτέλεσμα να αλληλεπικαλύπτονται από τα υπόλοιπα σήματα. Όσον αφορά τους μεταβολίτες που παρουσιάζουν διαφοροποίηση από τα φυσιολογικά όρια, με βάση την βιβλιογραφία, δεν έχει αναφερθεί κάποια συσχέτιση με την νόσο Morquio και προτείνεται περεταίρω διερεύνηση των νοσημάτων αυτών και με περισσότερα ενδεχομένως δείγματα, προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

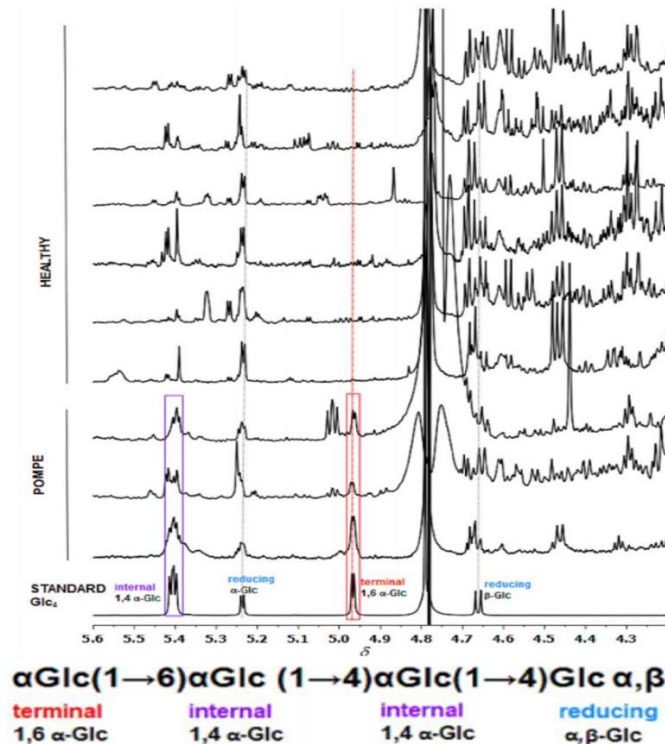
Νόσος Pompe

Τα περιστατικά 3 και 4 αφορούν δύο αδέρφια 11 και 13 ετών αντίστοιχα τα οποία πάσχουν από την Νόσο Pompe ή γλυκογονίαση τύπου II ή ανεπάρκεια όξινης μαλτάσης. Ανήκει επίσης στις διαταραχές της λυσοσωμικής αποθήκευσης. Οφείλεται σε μετάλλαξη στο γονίδιο GAA που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17 στο σημείο 17q25.2- q25.3 και κωδικοποιεί το ένζυμο α-γλυκοσιδάση (ή όξινη μαλτάση). Το ένζυμο φυσιολογικά εμπλέκεται στην επαγωγή της αποθήκευσης του γλυκογόνου. Μερική ή πλήρη ανεπάρκεια του ενζύμου οδηγεί σε συσσώρευση του γλυκογόνου στα κύτταρα μυών και οργάνων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα εμφάνιση νευρομυϊκών συμπτωμάτων.

Η έγκαιρη διάγνωση της νόσου κρίνεται απαραίτητη καθώς απουσία θεραπείας μπορεί να προκαλέσει και πρόωρο θάνατο τον πρώτο χρόνο ζωής του ασθενούς. Η διάγνωση πραγματοποιείται έπειτα από συνεκτίμηση βιοχημικών εξετάσεων. Ειδικότερα η προτεινόμενη πρακτική στην Ευρώπη περιλαμβάνει κυρίως εκτίμηση της ενζυμικής δραστηριότητας σε συνδυασμό με γενετικό έλεγχο. Η ενζυμική δραστηριότητα της α-γλυκοσιδάσης μπορεί να ελεγχθεί σε κηλίδες αίματος καθώς και σε ινοβλάστες και η διάγνωση να επιβεβαιωθεί με γενετικό έλεγχο. Συγχρόνως, έχουν παρατηρηθεί σε ορισμένους ασθενείς μεταβολές και σε άλλα ένζυμα όπως είναι η κρεατινική κινάση, οι αμινοτρασφεράσες ασπαρτικού και αλανίνης καθώς και η δεϋδρογονάση του γαλακτικού. Προκειμένου να αξιολογηθεί η πορεία της νόσου μπορεί να πραγματοποιηθεί μυϊκή βιοψία για να ελεγχθεί το ποσοστό συσσώρευσης του γλυκογόνου. Ταυτόχρονα, έχει ανακαλυφθεί στα ούρα των ασθενών που πάσχουν από κάποια διαταραχή της αποθήκευσης του γλυκογόνου, ένας πιθανός βιοδείκτης, ο

τετρασακχαρίτης 6-αD-γλυκοπυρανοζυλο-μαλτοτριόζη (Glc4). Πρόκειται για μια δεξτρίνη η οποία προκύπτει από την αμυλολυτική πέψη του γλυκογόνου και άλλων διακλαδισμένων πολυμερών γλυκόζης. Ωστόσο δεν μπορεί να αξιοποιηθεί για την διάκριση μεταξύ των διαφορετικών διαταραχών της αποθήκευσης του γλυκογόνου. Ενώ εντοπίζεται αυξημένος και σε ορισμένες λευχαιμίες και σαρκώματα, στην εγκυμοσύνη, σε συνθήκες μυϊκής διάσπασης, συμπεριλαμβανομένης της μυϊκής δυστροφίας Duchenne και σε ασθενείς που είχαν υποστεί μυϊκό τραύμα καθώς και σε ασθενείς με οξεία παγκρεατίτιδα. Έχει αναπτυχθεί μια μέθοδος ανίχνευσης του προερχόμενου από γλυκογόνο τετρασακχαρίτη με την χρήση της LC-MS-MS. Παρά την ευαισθησία της τεχνικής, εξαιτίας της έλλειψης ειδικότητας του βιοδείκτη για την νόσο Pompe, δεν μπορεί να αποτελέσει ανεξάρτητο διαγνωστικό εργαλείο και απαιτεί την συνεκτίμηση των υπόλοιπων εξετάσεων [60]–[62].

Αναφορικά με την χρήση του NMR για την ανίχνευση του συγκεκριμένου τετρασακχαρίτη, έχει πραγματοποιηθεί μια μελέτη από τους Papanoná et al. οι οποίοι ταυτοποίησαν σε ούρα ασθενών με την νόσο Pompe, τον τετρασακχαρίτη με την χρήση τεχνικών φασματομετρίας μάζας αλλά και ¹HNMR. Πριν την λήψη του φάσματος, πραγματοποιήθηκε λυοφιλοποίηση των δειγμάτων και επαναδιάλυση τους σε δευτεριωμένο νερό. Τα τέσσερα διαφορετικά τμήματα του τετρασακχαρίτη ταυτοποιήθηκαν στην περιοχή περίπου 4,6 – 5,4 ppm. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν με την χρήση δυσδιάστατης ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας NMR. Σε συνδυασμό με τα ευρήματα αυτά, εντοπίστηκαν και ολιγοσακχαρίτες υψηλότερου μοριακού βάρους, κάτι που συνάδει με την νόσο Pompe. Στην εικόνα φαίνεται το φάσμα ¹HNMR όπου με διαφορετικά χρώματα επισημαίνονται και τα διαφορετικά τμήματα του τετρασακχαρίτη[63].



Εικόνα 48: Φάσμα $^1\text{H NMR}$ ούρων του ασθενή όπου με διαφορετικά χρώματα επισημαίνονται και τα διαφορετικά τμήματα του τετρασακχαρίτη

Επίσης οι Beha et al. μελέτησαν με την χρήση της φασματοσκοπίας $^{13}\text{C NMR}$ την εναπόθεση του γλυκογόνου στους μύες προκειμένου να αξιολογηθεί η πρόοδος της νόσου[64].

Δεδομένου ότι δεν υπήρξε κάποια ειδική κατεργασία του δείγματος που να προηγήθηκε την λήψη των φασμάτων για την παρούσα εργασία καθίσταται αδύνατος ο εντοπισμός και η ποσοτικοποίηση του συγκεκριμένου τετρασακχαρίτη. Αυτό οφείλεται στην παρουσία πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων στα ούρα σε συνδυασμό με την μικρή ένταση των σημάτων του μεταβολίτη τα οποία εντοπίζονται κοντά στην περιοχή καταστολής του νερού, προκαλώντας την αλληλεπικάλυψη των σημάτων του. Αξιοσημείωτη φαίνεται η αύξηση του σακχάρου Μαννιτόλη, η οποία οφείλεται ενδεχομένως στην θεραπεία ενζυμικής αντικατάστασης που έχει χορηγηθεί στους ασθενείς κατά την λήψη του δείγματος. Ειδικότερα η μαννιτόλη αποτελεί έκδοχο του φαρμάκου που χορηγήθηκε. Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων 3-Ινδόξυθεικού, της κρεατίνης και της ταυρίνης με ταυτόχρονη αύξηση της γλυκόζης και για τα δύο περιστατικά. Στην διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχει κάποια συσχέτιση αυτών των μεταβολιτών με την νόσο Pompe και απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων προκειμένου να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα.

Τυροσιναιμία τύπου II

Το δείγμα 5 αφορά ένα βρέφος, 11 ημερών την ημέρα λήψης του δείγματος, το οποίο βρίσκονταν υπό διερεύνηση με την υποψία Τυροσιναιμίας Τύπου II ή Συστηματώδη Ερυθρηματώδη Λύκου. Πραγματοποιήθηκαν βιοχημικές αναλύσεις από το Ινστιτούτο Υγείας του Παιδιού καθώς και ανάλυση των ούρων του ασθενή με την χρήση της φασματοσκοπίας NMR από το εργαστήριο μας. Με βάση τα ευρήματα μας η διαφορική διάγνωση που θα προτείναμε ήταν τυροσιναιμία τύπου II.

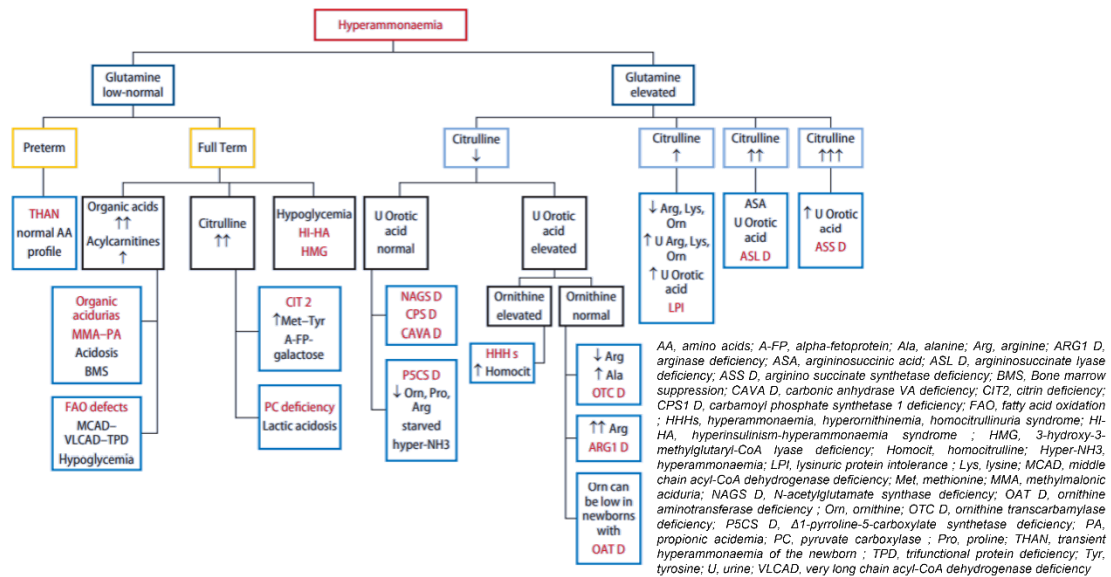
Όσον αφορά τους δείκτες της τυροσιναιμίας που έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία, ταυτοποιήσαμε και ποσοτικοποιήσαμε τα 4-υδροξυφαινυλγαλακτικό και 4-υδροξυφαινυλακετοξικό καθώς και την N-ακέτυλοτυροσίνη και τυροσίνη. Ενώ εμφανίζονται και στο δείγμα αυξημένοι οι υπόλοιποι μεταβολίτες που αναφέρονται στην βιβλιογραφία που έχουν ταυτοποιηθεί και ποσοτικοποιηθεί με την χρήση του NMR, όπως το φορμικό και το γαλακτικό οξύ, η αλανίνη και πληθώρα αμινοξέων [25], [39], [41], [42]. Σε σύγκριση με τα ευρήματα του Ινστιτούτου Υγείας του Παιδιού, παρατηρείται επίσης ως επί το πλείστον ταύτιση. Συγκεκριμένα αυξημένοι βρέθηκαν και από τα δύο εργαστήρια οι μεταβολίτες: μεθειονίνη, θρεονίνη, τυροσίνη, υδροξυπρολίνη, προλίνη, γλυκίνη, αλανίνη, φαινυλαλανίνη, λυσίνη και ιστιδίνη. Ενώ από το ΠΓΝΙ βρέθηκαν επίσης αυξημένη η γαλακτόζη, η οποία στο φάσμα ούρων δεν εμφανίζεται αυξημένη, η κιτρουλίνη και η σερίνη οι οποίες δεν μπορούν με ασφάλεια να ταυτοποιηθούν στο φάσμα με την συγκεκριμένη μέθοδο. Επίσης σημαντική αύξηση φαίνεται να έχουν στο φάσμα των ούρων οι μεταβολίτες: ασπαραγίνη, βεταΐνη, χολίνη, φρουκτόζη, γλουταμίνη, υποξανθίνη, ισολευκίνη, λευκίνη, μαννιτόλη, μαννόζη, μεθανόλη, μυοϊνοσιτόλη, πυροσταφυλικό, τρυπτοφάνη και βαλίνη.

Χωρίς Διάγνωση

Το περιστατικό αφορά έναν ασθενή 5,5 μηνών την χρονική στιγμή λήψης του δείγματος, όπου παρουσιάστηκε στο ΠΓΝΙ με επεισόδια σπασμών και βρίσκονταν υπό διερεύνηση. Κατά την λήψη του δείγματος βρισκόταν υπό αγωγή κατά των επιληπτικών κρίσεων αγωγή. Ο ασθενής έπειτα από βιοχημικές εξετάσεις είχε αυξημένη αμμωνία, χαμηλά επίπεδα βιταμίνης B12 με φυσιολογικά αέρια αρτηριακού αίματος και γαλακτικού οξέος. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκαν ευρήματα στα αμινογράμματα ορού τα οποία περιλαμβάνουν αύξηση ταυρίνης, αύξηση θρεονίνης-σερίνης και αύξηση γαλακτικού οξέος. Τόσο το εργαστήριο μας όσο και το ιατρικό

προσωπικό της παιδιατρικής κλινικής του ΠΓΝΙ, απ' όσο γνωρίζουμε, δεν έχουν καταλήξει σε κάποια διάγνωση για τον συγκεκριμένο ασθενή.

Σύμφωνα με τους *Saudubray et al.*, υπάρχει ένας αλγόριθμος που μπορεί να εφαρμοστεί σε παιδιατρικούς ασθενείς που εμφανίζονται με υπεραμμωναιμία προκειμένου να περιοριστούν οι πιθανές αιτίες από τον κλινικό ιατρό. Ο αλγόριθμος φαίνεται και στην εικόνα.



Εικόνα 49: Διαγνωστικός αλγόριθμος που μπορεί να εφαρμοστεί στους παιδιατρικούς ασθενείς που εμφανίζουν υπεραμμωναιμία

Με γνώμονα τον αλγόριθμο αυτόν αλλά και την διεθνή βιβλιογραφία, προσπαθήσαμε να ταυτοποιήσουμε στο φάσμα των ούρων μεταβολίτες που θα μπορούσαν να μας προσανατολίσουν προς κάποια νόσο. Με την χρήση του προγράμματος Chenomx NMR Suite 9.0 Profiler, διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση στο αιθυλομαλονικό οξύ, το 2-ύδροξυβουτυρικό οξύ και την γλυκίνη. Υποθέτουμε πως τα παραπάνω θα μπορούσαν να σχετίζονται με διαταραχή στον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, απαιτούνται ωστόσο παραπάνω εξετάσεις όπως το προφίλ ακυλοκαρνιτών, προκειμένου να επιβεβαιωθεί αυτή η υποψία. Συγχρόνως παρατηρείται μικρή μεταβολή στον μεταβολισμό των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας, χωρίς να υπάρχει η περίπτωση νόσου ούρων με οσμή σιροπιού σφενδάμου καθώς δεν εμφανίζουν σημαντική αύξηση οι χαρακτηριστικοί για την νόσο μεταβολίτες. Επιπρόσθετα παρατηρείται ενδεχόμενη διαταραχή στον μεταβολισμό της γλυκίνης, καθώς παρατηρείται αύξηση τόσο στην ίδια την γλυκίνη αλλά και στην N,N-

διμεθυλογλυκίνη και την θρεονίνη, από τις οποίες μπορεί να προκύψει η γλυκίνη από διαφορετικά βιοχημικά μονοπάτια.

Στην εικόνα 50 φαίνονται συνοπτικά κάποιες από τις πιθανές διαταραχές της οξείδωσης των λιπαρών οξέων που διερευνηθήκαν στην βιβλιογραφία για την παρούσα εργασία καθώς και τα χαρακτηριστικά τους βιοχημικά ευρήματα. Ωστόσο, δεν μπορεί με ασφάλεια να προταθεί κάποιο από τα παρακάτω χωρίς περαιτέρω εξετάσεις και χωρίς να συνεκτιμηθεί και η κλινική εικόνα του ασθενή.

SCADD

Short Chain acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency

- Αυξημένα: Ethylmalonate, methylsuccinate, butyrylglycine, κετονοσώματα
- C4 ακυλοκαρνιτίνη
- Γενικά ασυμπτωματική
- Developmental delay
- Κετωτική Υπογλυκαιμία

MCADD

Medium Chain acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency

- Αυξημένα: Ethylmalonate, Malonic, Methylmalonate, Succinic
- Αυξημένη NH₃ (με φυσιολογική ή μειωμένη γλουταμίνη)
- Αυξημένα 2-Hydroxybutyrate, 3-Hydroxybutyrate, παράγωγα γλυκίνης και λιπαρών οξέων
- Suberic > Adipic
- C8, C10 ακυλοκαρνιτίνες
- Εξάρτηση από νηστεία η εκδήλωση, όχι πάντα κέτωση
- Εγκεφαλοπάθεια, Υποκετονική υπογλυκαιμία, Δυσλειτουργία ήπατος

MADD (Glutaric Aciduria Type II)

Multiple acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency

- Αυξημένα: Ethylmalonate, Sarcosine, Isobutyric Acid, 2-methylbutyric Acid, 3-hydroxyisovaleric Acid, 2-hydroxyglutaric Acid, Adipic Acid, Suberic Acid, Sebacic Acid, Isovaleryl Glycine, Isobutyryl Glycine, 2-methylbutyryl Glycine
- Hyperprolinaemia
- C6, C8, C10, C12 ακυλοκαρνιτίνες

TFPD

Trifunctional Protein Deficiency

- Υπογλυκαιμία με μεταβολική οξέωση
- Αυξημένη NH₃ με φυσιολογική γλουταμίνη
- Ακυλοκαρνιτίνες αίματος

Ethylmalonic Encephalopathy

- Αυξημένα: Ethylmalonate, Carnitine, Isovalerylglycine, Thiosulfate
- Mutation Analysis *ETHE1*
- C4, C5 ακυλοκαρνιτίνες
- C4, C5 ακυλογλυκίνες

Εικόνα 50: Πιθανές διαταραχές της οξείδωσης των λιπαρών οξέων που διερευνηθήκαν για το συγκεκριμένο περιστατικό με βάση την διεθνή βιβλιογραφία καθώς και τα βιοχημικά τους ευρήματα.

Στην εικόνα 41 η κορυφή στα 0.9 ppm έχουν ταυτοποιηθεί τα αιθυλομαλονικό και 2-υδροξυβουτυρικό οξύ. Ωστόσο, στην ίδια κορυφή αντιστοιχεί και κάποιος μη προσδιορισμένος μεταβολίτης, σε υψηλή συγκέντρωση, ο οποίος πιθανά να οφείλεται στην παρουσία φαρμάκων στα ούρα του ασθενή.

Τριμεθυλαμιουρία (Fish Odor Syndrome)

Το περιστατικό 7 στο οποίο η διάγνωση πραγματοποιήθηκε με ανάλυση των ούρων με φασματοσκοπία NMR πάσχει από τριμεθυλαμιουρία.

Η τριμεθυλαμιουρία, επίσης γνωστή και fish odor syndrome, είναι ένα ενδογενές νόσημα του μεταβολισμού που προκαλεί μια ισχυρή, οσμή στο σώμα που

θυμίζει ψάρι, στην οποία οφείλεται και η εναλλακτική ονομασία της. Το σύνδρομο οφείλεται σε ανεπάρκεια του FMO3, απαραίτητο για την οξείδωση της τριμεθυλαμίνης (TMA). Οι ασθενείς που πάσχουν από τριμεθυλαμινουρία, δεν είναι σε θέση να οξειδώσουν την τριμεθυλαμίνη, και κατά συνέπεια απεκκρίνεται στην αναπνοή, τα ούρα, τον ιδρώτα, και άλλα σωματικά υγρά, με αποτέλεσμα να γίνεται εμφανής η χαρακτηριστική οσμή.

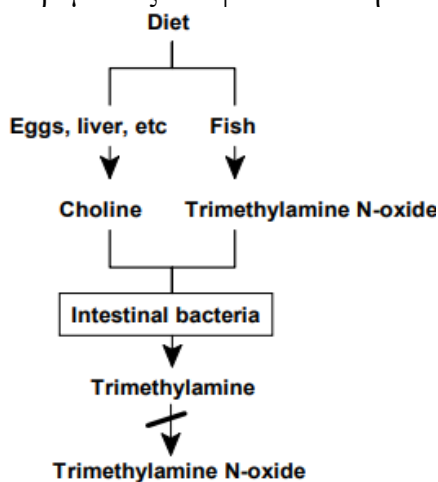
Η χολίνη μετατρέπεται σε TMA από την εντερική χλωρίδα, κατά συνέπεια μια διατροφή πλούσια σε χολίνη μπορεί να επιδεινώσει την κλινική εικόνα. Η κατανάλωση ψαριών μπορεί επίσης να επιδεινώσει την κατάσταση καθώς, τα ψάρια περιέχουν τριμεθυλαμινο-N-οξείδιο (TMAO), το οποίο, μαζί με τη χολίνη και την καρνιτίνη, είναι πρόδρομες ενώσεις της τριμεθυλαμίνης.

Έχουν καταγραφεί διαφορετικοί τύποι τριμεθυλαμινουρίας. Η νόσος δύναται να κληρονομηθεί ως μετάλλαξη που εντοπίζεται στην συστοιχία γονιδίων που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1 στην περιοχή 1q23-q25, η οποία μεταβιβάζεται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο. Εκτός από την κληρονομική μορφή, η διαταραχή μπορεί να εμφανιστεί και επίκτητη έπειτα από εξωγενή βλάβη στο ήπαρ, όπως για παράδειγμα ηπατίτιδα. Η διάκριση μεταξύ κληρονομικής και επίκτητης τριμεθυλαμινουρίας απαιτεί γονιδιακό έλεγχο. Η διαταραχή μπορεί επίσης να εμφανιστεί παροδικά κατά την παιδική ηλικία και έπειτα από την ωρίμανση του συστήματος FMO3, να επιλυθεί ή μπορεί να αναπτυχθεί παροδικά σε συνδυασμό με την εμμηνόρροια. Η διαταραχή μπορεί επίσης να αναπτυχθεί ως αποτέλεσμα της πρόσληψης υπερβολικών ποσοτήτων πρόδρομων ουσιών τριμεθυλαμίνης.

Η διάγνωση πραγματοποιείται αρχικά εξαιτίας της χαρακτηριστικής οσμής και στην συνέχεια επιβεβαιώνεται από μια δοκιμασία, κατά την οποία χορηγείται, από του στόματος, στον ασθενή ορισμένης συγκέντρωσης TMA και στην συνέχεια η ποσότητα της μετριέται στα ούρα. Υπολογίζεται ο λόγος TMA προς το άθροισμα της TMA και του TMAO, ο οποίος στα φυσιολογικά άτομα ισούται με 92-98%, ενώ στους ασθενείς είναι σημαντικά μειωμένος. Οι ασθενείς συχνά υποφέρουν από κοινωνικό αποκλεισμό και αναπτύσσουν ψυχοκοινωνικά προβλήματα. Η ένταση της οσμής κυμαίνεται από ήπια έως ισχυρή. Η ανεπάρκεια του συστήματος FMO3 μπορεί επίσης να οδηγήσει σε ανισορροπίες νευροδιαβιβαστών που προκαλούν ψυχολογικά συμπτώματα. Η θεραπεία περιλαμβάνει διατροφικό περιορισμό των ενώσεων που μεταβολίζονται σε

TMA. Ωστόσο, ο διατροφικός περιορισμός δεν είναι πάντα αποτελεσματικός. Μια άλλη θεραπεία περιλαμβάνει αντιβιοτικά, όπως η μετρονιδαζόλη, για τη μείωση της ικανότητας παραγωγής TMA από την εντερική χλωρίδα. Αποτελεσματική θα μπορούσε να είναι και η γονιδιακή θεραπεία[65].

Το βιοχημικό μονοπάτι που παρεμποδίζεται φαίνεται στην εικόνα[29]:



Εικόνα 51: Το βιοχημικό μονοπάτι που παρεμποδίζεται στην τριμεθυλαμινουρία

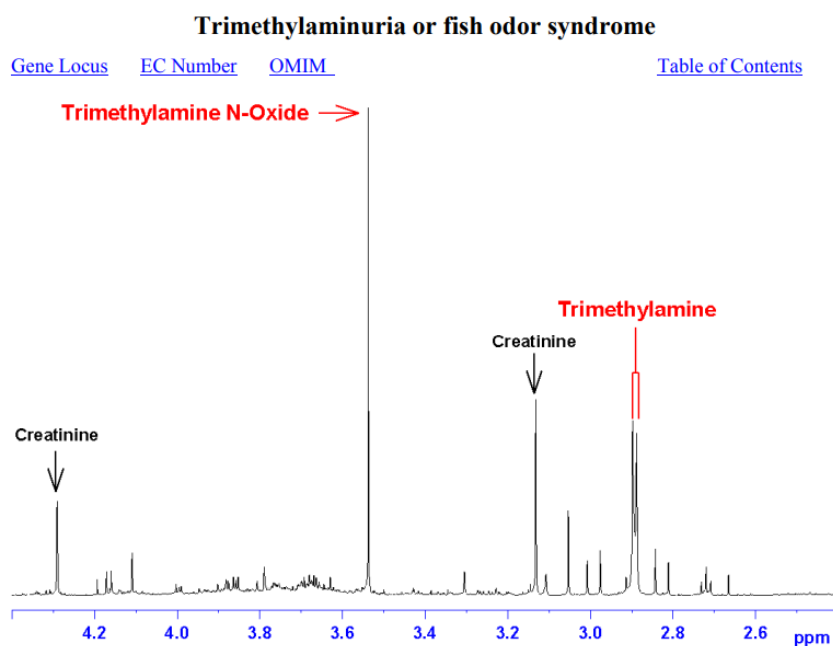
Όσον αφορά την χρήση της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, σε ούρα ασθενών που πάσχουν από τριμεθυλαμινουρία, το συχνότερο εύρημα είναι η μείωση των επιπέδων του τριμεθυλαμινο-N-οξειδίου (TMAO) με ταυτόχρονη αύξηση των επιπέδων της τριμεθυλαμίνης (TMA)[66]–[70]. Σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της κρεατίνης[66] ή του κιτρικού οξέος[67], ενώ στην μελέτη των Bouchemal et al. οι ασθενείς παρουσίασαν μειωμένα επίπεδα διμεθυλαμίνης και κιτρικού οξέος[69]. Συνοπτικά παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 22: Αποτελέσματα ερευνών με την χρήση της φασματοσκοπίας NMR για την Τριμεθυλαμινουρία

Μελέτη	Βιολογικό Υγρό	Μεταβολίτες
Abeling et al. (1995)	Ούρα	↑ TMA & ↓ TMAO → ↑ TMA/TMAO ↑ Κρεατίνη
Maschke et al. (1997)	Ούρα	↑ TMA & ↓ TMAO → ↑ TMA/TMAO ↑ Κιτρικό οξύ

<i>Podadera et al. (2005)</i>	Ούρα	↑ TMA & ↓ TMAO → ↑ TMA/TMAO
<i>Bouchemal et al. (2019)</i>	Ούρα	↑ TMA & ↓ TMAO → ↑ TMA/TMAO ↓ Διμεθυλαμίνη & Κιτρικό οξύ
<i>Veyrat et al. (2021)</i>	Ούρα	↑ TMA & ↓ TMAO → ↑ TMA/TMAO

Παρακάτω παρατίθεται ενδεικτικά ένα φάσμα ούρων ασθενή που πάσχει από τριμεθυλοάμινοουρία, εστιασμένο στην περιοχή του φάσματος που εντοπίζονται οι μεταβολίτες που μας ενδιαφέρουν, όπου έχουν αποδοθεί οι κορυφές που αντιστοιχούν στην τριμεθυλαμίνη και στο τριμεθυλαμινο-N- οξείδιο[29].



Εικόνα 52: Φάσμα ούρων ασθενή που πάσχει από τριμεθυλοάμινοουρία, εστιασμένο στην περιοχή του φάσματος που εντοπίζονται οι μεταβολίτες τριμεθυλαμίνη και τριμεθυλαμινο-N- οξείδιο

Τα δικά μας ευρήματα συμφωνούν με την βιβλιογραφία, καθώς παρατηρούμε επίσης αυξημένη έκκριση στα ούρα της τριμεθυλαμίνης και μειωμένη έκκριση του τριμεθυλαμινο-N-οξείδιο. Κατά συνέπεια, εμφανίζεται αυξημένος ο λόγος TMA/TMAO.

Σιτοστερολαιμία

Η σιτοστερολαιμία ή αλλιώς φυτοστερολαιμία, είναι μια σπάνια κληρονομούμενη ασθένεια που οδηγεί σε διαταραχή του μεταβολισμού των λιπιδίων. Χαρακτηρίζεται από υψηλή απορρόφηση και χαμηλή χολική απέκκριση των φυτικών

στερολών και της χοληστερόλης. Ως εκ τούτου, οι ασθενείς έχουν αυξημένα επίπεδα στο πλάσμα φυτικών στερολών, όπως η σιτοστερόλη, η σιτοστανόλη, η καμπεστερόλη και η στιγμαστερόλη, καθώς και χοληστερόλη χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL). Κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο. Η μετάλλαξη εντοπίζεται είτε στο γονίδιο ABCG5 είτε στο ABCG8 στο χρωμόσωμα 2p21. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν ένα ζευγάρι ABC (adenosine triphosphate-binding cassette) μεταφορέων που σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές το G5G8, το οποίο στη συνέχεια κινείται στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων και των εντερικών κυττάρων και προάγει την έκκριση χοληστερόλης και ξενοστερολών στη χολή και τον εντερικό αυλό [71]–[73].

Η κλινική εικόνα των ασθενών εξαρτάται από την σοβαρότητα της νόσου καθώς και την ηλικία εμφάνισης των πρώτων συμπτωμάτων. Τα συμπτώματα μπορεί να εμφανιστούν σε οποιαδήποτε ηλικία από την παιδική ηλικία μέχρι την ενηλικίωση. Ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά της ασθένειας περιλαμβάνουν:

- **Ξανθώματα:** καλοήθεις όγκοι που αποτελούνται από λιπώδεις εναποθέσεις που μπορούν να αναπτυχθούν στα βλέφαρα, τους τένοντες, τα χέρια, τα πόδια και τους γλουτούς.
- **Πρώρη αθηροσκλήρωση:** η συσσώρευση λιπαρών πλακών στα αιμοφόρα αγγεία, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένο κίνδυνο καρδιακής προσβολής και εγκεφαλικού επεισοδίου[72].

Όσον αφορά την διάγνωση της νόσου τα εργαστηριακά ευρήματα που παρατηρούνται είναι:

- **Αυξημένα επίπεδα φυτικών στερολών:** Η σιτοστερόλη και η καμπεστερόλη είναι συνήθως αυξημένες στο αίμα και τους ιστούς των ατόμων με σιτοστερολαιμία.
- **Αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης:** Η ολική χοληστερόλη, χοληστερόλη χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL) και τα τριγλυκερίδια μπορεί να είναι αυξημένα στο αίμα ατόμων με σιτοστερολαιμία.
- **Εμφάνιση αιματολογικών διαταραχών.**

- Με την πραγματοποίηση γενετικού ελέγχου μπορεί να επιβεβαιωθεί η διάγνωση της σιτοστερολαιμίας εντοπίζοντας μεταλλάξεις στα γονίδια ABCG5 ή ABCG8.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ορισμένα άτομα με σιτοστερολαιμία μπορεί να έχουν φυσιολογικά επίπεδα χοληστερόλης ενώ άλλα μπορεί να μην εμφανίσουν συμπτώματα, αλλά εξακολουθούν να έχουν αυξημένες φυτικές στερόλες. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η διάκριση μεταξύ των φυτικών στερολών και των μορίων χοληστερόλης απαιτούνται πιο εξειδικευμένες τεχνικές όπως είναι η αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματοσκοπία μάζης (GC-MS), υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματοσκοπία μάζης (LC-MS/MS), ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία καθώς και φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Με την χρήση των τεχνικών αυτών δύναται να ποσοτικοποιηθούν οι φυτικές στερόλες πλάσματος [71]–[74].

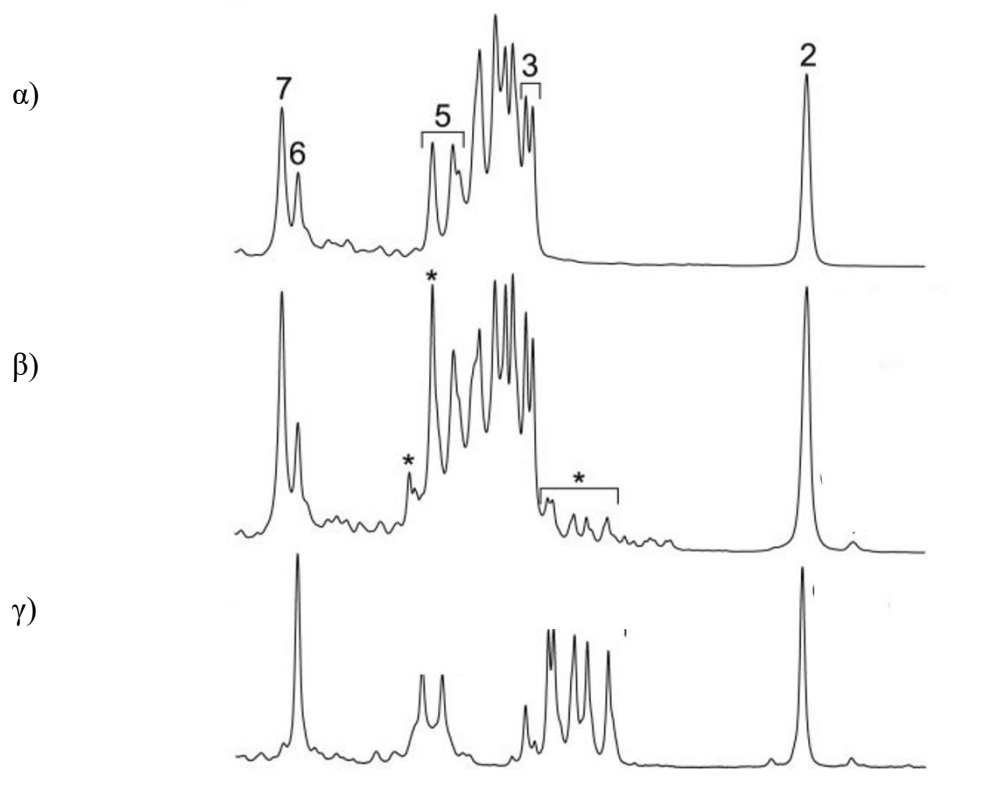
Όπως έχει αναφερθεί, η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου μπορεί να αξιοποιηθεί στην μελέτη των λιπιδίων του πλάσματος [51]. Όσον αφορά τα ευρήματα των μελετών με την χρήση του $^1\text{H-NMR}$, οι Rees et al. ανέλυσαν τα λιπίδια της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων. Στα φάσματα φάνηκαν αρκετές μη φυσιολογικές κορυφές κοντά στις κορυφές της χοληστερόλης, ενώ τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης ήταν φυσιολογικά. Μελέτησαν επίσης τις στερόλες του πλάσματος με την χρήση του GC-MS, από το οποίο προέκυψε πληθώρα μη φυσιολογικών κορυφών οι οποίες αποδίδονται στις φυτικές στερόλες, β-σιτοστερόλη, στιγμαστερόλη, ισοφουκοστερόλη, στιγμαστανόλη και καμπεστερόλη[75]. Οι Oostendorp et al. μπόρεσαν να ταυτοποιήσουν την ύπαρξη της β-σιτοστερόλης καθώς και των καμπεστερόλη και στιγμαστερόλη σε σύγκριση με δείγματα φυσιολογικών ατόμων, ενώ όσον αφορά την β-σιτοστερόλη επιβεβαίωσαν τα ευρήματα με την χρήση της ίδιας της ένωσης ως ένωση αναφοράς καθώς και με την χρήση της δισδιάστατης φασματοσκοπίας NMR πρωτονίου. Παρ' όλα αυτά κρίνουν αδύνατη την ποσοτικοποίηση των παραπάνω ενώσεων με την μεθοδολογία που περιγράφουν[51]. Οι Niu et al. πραγματοποίησαν μια μελέτη, σε νεογνά και παιδιά που πάσχουν από την νόσο, η οποία περιλάμβανε κλινικές παρατηρήσεις, γενετική και βιοχημική ανάλυση καθώς και θεραπευτική προσέγγιση των ατόμων αυτών. Στα πλαίσια της βιοχημικής ανάλυσης, ταυτοποιήθηκαν στο πλάσμα του ασθενή 1, όπως αναφέρουν, υψηλά επίπεδα φυτικών στερολών με την χρήση του NMR. Ωστόσο δεν μπόρεσαν να

ποσοτικοποιήσουν επακριβώς τις ενώσεις αυτές[72]. Τα παραπάνω παρατίθενται συγκεντρωτικά στον πίνακα:

Πίνακας 23: Αποτελέσματα ερευνών με την χρήση της φασματοσκοπίας NMR για την Σιτοστερολαιμία

Μελέτη	Βιολογικό Υγρό	Τεχνική	Μεταβολίτες
<i>Rees et al. (2005)</i>	Λιπίδια μεμβράνης ερυθροκυττάρων	NMR	Μη φυσιολογικοί μεταβολίτες στην περιοχή της χοληστερόλης
	Πλάσμα	GC-MS	Φυτικές στερόλες
<i>Oostendorp et al. (2006)</i>	Απομονωμένα λιπίδια	NMR	β-σιτοστερόλη, καμπεστερόλη και στιγμαστερόλη
<i>Niu et al. (2010)</i>	Ορός	NMR	Φυτικές στερόλες

Παρακάτω παρατίθεται μια εικόνα από την μελέτη των Oostendorp et al. όπου φαίνονται αντίστοιχα τα δείγματα υγείους, με σιτοστερολεμία και η καθαρή β-σιτοστερόλη επικεντρωμένα σε συγκεκριμένη περιοχή του φάσματος ¹H-NMR. Οι κορυφές που είναι επισημασμένες με αστερίσκο αντιστοιχούν στην β-σιτοστερόλη. Ενώ οι αριθμημένες κορυφές που φαίνονται αποτελούν κορυφές της χοληστερόλης που αφορούν είτε την ολική, την ελεύθερη ή την εστεροποιημένη μορφή της[51].



Εικόνα 53: Μεγέθυνση σε συγκεκριμένη περιοχή φάσματος $^1\text{H-NMR}$ από την βιβλιογραφία για δείγματα α) υγείους, β) με σιτοστερολεμία και γ) η καθαρή β -σιτοστερόλη. Οι κορυφές που είναι επισημασμένες με αστερίσκο αντιστοιχούν στην β -σιτοστερόλη. Ενώ οι αριθμημένες κορυφές που φαίνονται αποτελούν κορυφές της χοληστερόλης που αφορούν είτε την ολική, την ελεύθερη ή την εστεροποιημένη μορφή της

Τα ευρήματα μας συμφωνούν με την βιβλιογραφία, καθώς φαίνεται να καταδεικνύουν την παρουσία σημαντικών ποσοτήτων φυτοστερολών, οι οποίες εντοπίζονται στο φάσμα κοντά στην περιοχή της χοληστερόλης.

Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε μια βιβλιογραφική ανασκόπηση σε ορισμένα από τα συχνότερα ενδογενή νοσήματα του μεταβολισμού που έχουν μελετηθεί με την χρήση της φασματοσκοπίας NMR, ενώ παράλληλα πραγματοποιήθηκε διερεύνηση με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ ενδογενών νοσημάτων του μεταβολισμού σε παιδιά που παρακολουθούνται στην Παιδιατρική Κλινική του ΠΓΝΙ. Η μελέτη περιλάμβανε νέες διαγνώσεις νοσημάτων καθώς και παρακολούθηση ασθενών που έχουν ήδη διαγνωστεί. Συλλέχθηκαν δείγματα ούρων τα οποία αναλύθηκαν με φασματοσκοπία NMR προκειμένου να ταυτοποιηθούν και να

ποσοτικοποιηθούν οι μεταβολίτες που εμφανίζονται αυξημένοι, μειωμένοι ή απουσιάζουν στο εκάστοτε ενδογενές νόσημα του μεταβολισμού.

Τα περιστατικά που μελετήθηκαν αφορούν 1 ασθενή που πάσχει από την νόσο Hunter, 1 ασθενή που πάσχει από την νόσο Morquio, 2 ασθενείς που πάσχουν από την νόσο Pompe, 1 ασθενή με Τυροσιναιμία τύπου II, 1 ασθενή χωρίς διάγνωση ενώ συμπεριλαμβάνονται και δύο περιστατικά που μελετήθηκαν στο παρελθόν από το εργαστήριο μας που αφορούν 1 ασθενή με Τριμεθυλαμιουρία και 1 ασθενή με Σιτοστερολαιμία αντίστοιχα. Όσον αφορά τα νοσήματα της Τυροσιναιμίας τύπου II, της Τριμεθυλαμιουρίας και της Σιτοστερολαιμίας, το $^1\text{H-NMR}$ αποτελεί ένα εξαιρετικό εργαλείο για την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών που εκκρίνονται σε μη φυσιολογικό βαθμό στα βιολογικά υγρά των ασθενών. Ειδικότερα, για την Τυροσιναιμία τύπου II, ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν οι μεταβολίτες 4-υδροξυφαινυλακετοξικό, 4-υδροξυφαινυλγαλακτικό, η Ν-ακετυλτυροσίνη καθώς και η τυροσίνη που αποτελούν χαρακτηριστικά ευρήματα για την συγκεκριμένη νόσο σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία. Στην περίπτωση της Τριμεθυλαμιουρίας αντίστοιχα ποσοτικοποιήθηκαν τα τριμεθυλαμινο-N-οξείδιο (TMAO) και η τριμεθυλαμίνη (TMA), ενώ υπολογίστηκε ο λόγος TMA /TMA +TMAO από τα οποία προέκυψε και η διάγνωση σε συμφωνία με την βιβλιογραφία. Ταυτόχρονα στην περίπτωση της Σιτοστερολαιμίας ποσοτικοποιήθηκαν σημαντικές ποσότητες φυτοστερολών, κυρίως β-σιτοστερόλης, που αποτελούν χαρακτηριστικές της νόσου. Έτσι, καθίσταται δυνατή η διάγνωση των νοσημάτων αυτών με την χρήση της φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$.

Τα νοσήματα Hunter, Morquio και Pompe ανήκουν στα νοσήματα λυσοσωμικής αποθήκευσης και ως εκ τούτου οι μεταβολίτες που εκκρίνονται στα ούρα των ασθενών έχουν πιο σύνθετη χημική δομή και απαιτείται ειδική κατεργασία του δείγματος προκειμένου να ταυτοποιηθούν και να ποσοτικοποιηθούν. Κατ' επέκταση το $^1\text{H-NMR}$ που εφαρμόζεται στα ούρα χωρίς να έχει προηγηθεί επεξεργασία του δείγματος δεν δύναται να χρησιμοποιηθεί σαν εργαλείο για την διάγνωση των νοσημάτων αυτών. Ωστόσο σε κάθε περίπτωση προέκυψε το μεταβολικό προφίλ των ούρων των ασθενών όπου εμφανίζονται αυξημένοι ή μειωμένοι μεταβολίτες οι οποίοι δεν έχουν συσχετισθεί με τα παραπάνω νοσήματα στην βιβλιογραφία. Συνεπώς απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση των παραπάνω νοσημάτων, με την ανάλυση μεγαλύτερου όγκου δειγμάτων, προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

Στην περίπτωση του περιστατικού που δεν έχει διαγνωσθεί, με την χρήση του $^1\text{H-NMR}$ αποκτήθηκε το μεταβολικό προφίλ των ούρων του ασθενή, από το οποίο προκύπτουν αυξημένοι μεταβολίτες που δεν εμφανίζονται σε φυσιολογικά, όπως είναι το αιθυλομαλονικό οξύ. Ωστόσο προκειμένου να γίνει μια ασφαλής διάγνωση απαιτείται συνεκτίμηση των υπόλοιπων βιοχημικών αναλύσεων και της κλινικής εικόνας του ασθενή και ενδεχομένως η πραγματοποίηση περισσότερων και πιο εξειδικευμένων εξετάσεων, όπως είναι το προφίλ ακυλοκαρνιτίνης. Σε κάθε περίπτωση με την χρήση του $^1\text{H-NMR}$ προέκυψε το μεταβολικό προφίλ των ασθενών, όπου ταυτοποιήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε ένας σημαντικός αριθμός μεταβολιτών.

Συνολικά όσον αφορά την χρήση της φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$ στην διάγνωση των ενδογενών νοσημάτων του μεταβολισμού, συμπεραίνουμε πως μπορεί να αποτελέσει ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο στην κλινική πράξη και να παρέχει πληροφορίες που δεν μπορούν να αποκτηθούν με την ίδια ευκολία με την χρήση διαφορετικών μεθόδων. Δύναται να αξιοποιηθεί για την διάγνωση ορισμένων ενδογενών νοσημάτων του μεταβολισμού, κυρίως αυτών που έχουν ως αποτέλεσμα την συσσώρευση μορίων σε τοξικές για τους ασθενείς συγκεντρώσεις. Ωστόσο σε ορισμένα νοσήματα απαιτείται προκατεργασία του δείγματος για να είναι σε θέση να εντοπίσει πιο σύνθετους δομικά μεταβολίτες, όπως είναι συγκεκριμένοι πολυσακχαρίτες στα νοσήματα της λυσοσωμικής αποθήκευσης. Η δυνατότητα του ωστόσο, να ανιχνεύσει δεκάδες μεταβολίτες, καθώς και να ταυτοποιήσει αγνώστους μεταξύ αυτών, σε μία μέτρηση ενώ ταυτόχρονα αποτελεί μία ανάλυση η οποία μπορεί να προσφέρει ποσοτικά αποτελέσματα και ταυτόχρονα είναι επαναλήψιμη την καθιστά ένα χρήσιμο εργαλείο στην μελέτη των νοσημάτων αυτών.

Βιβλιογραφία

- [1] S. Kostidis and E. Mikros, “NMR studies of inborn errors of metabolism,” *eMagRes*, vol. 4, no. 1, pp. 57–68, 2015, doi: 10.1002/9780470034590.emrstm1400.
- [2] I. Solares *et al.*, “Diagnosis and management of inborn errors of metabolism in adult patients in the emergency department,” *Diagnostics*, vol. 11, no. 11. MDPI, Nov. 01, 2021. doi: 10.3390/diagnostics11112148.
- [3] J.-M. R. Saudubray Matthias Baumgartner John Walter Eds, “Inborn Metabolic Diseases Diagnosis and Treatment 6th Edition.”
- [4] R. J. Mailloux, X. Jin, and W. G. Willmore, “Redox regulation of mitochondrial function with emphasis on cysteine oxidation reactions,” *Redox Biology*, vol. 2, no. 1. Elsevier B.V., pp. 123–139, 2014. doi: 10.1016/j.redox.2013.12.011.
- [5] K. K. Dhillon and S. Gupta, “Biochemistry, Ketogenesis,” *StatPearls*, Feb. 2022, Accessed: Mar. 11, 2022. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493179/>
- [6] R. P. Donnelly and D. K. Finlay, “Glucose, glycolysis and lymphocyte responses,” *Mol Immunol*, vol. 68, no. 2, pp. 513–519, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.molimm.2015.07.034.
- [7] S. Sahoo, L. Franzson, J. J. Jonsson, and I. Thiele, “A compendium of inborn errors of metabolism mapped onto the human metabolic network,” *Mol Biosyst*, vol. 8, no. 10, pp. 2545–2558, 2012, doi: 10.1039/c2mb25075f.
- [8] W. J. van Rijt *et al.*, “Inborn Errors of Metabolism That Cause Sudden Infant Death: A Systematic Review with Implications for Population Neonatal Screening Programmes,” *Neonatology*, vol. 109, no. 4. S. Karger AG, pp. 297–302, Jun. 01, 2016. doi: 10.1159/000443874.
- [9] S. Hope, C. H. Johannessen, N. O. Aanonsen, and P. Strømme, “The investigation of inborn errors of metabolism as an underlying cause of idiopathic intellectual disability in adults in Norway,” *Eur J Neurol*, vol. 23, pp. 36–44, Jan. 2016, doi: 10.1111/ene.12884.
- [10] C. M. Vass, S. Georgsson, F. Ulph, and K. Payne, “Preferences for aspects of antenatal and newborn screening: A systematic review,” *BMC Pregnancy Childbirth*, vol. 19, no. 1, Apr. 2019, doi: 10.1186/S12884-019-2278-7.
- [11] K. L. M. Coene *et al.*, “Next-generation metabolic screening: targeted and untargeted metabolomics for the diagnosis of inborn errors of metabolism in individual patients,” *J Inherit Metab Dis*, vol. 41, no. 3, pp. 337–353, May 2018, doi: 10.1007/s10545-017-0131-6.
- [12] Kaustuv Bhattacharya, Tiffany Wotton, and Veronica Wiley, “The evolution of blood-spot newborn screening”, doi: 10.3978/j.issn.2224-4336.2014.03.08.
- [13] O. L. Brady and G. v. Elsmie, “The use of 2:4-dinitrophenylhydrazine as a reagent for aldehydes and ketones,” *Analyst*, vol. 51, no. 599, pp. 77–78, 1926, doi: 10.1039/AN9265100077.

- [14] F. Ezgu, “Inborn Errors of Metabolism,” in *Advances in Clinical Chemistry*, Academic Press Inc., 2016, pp. 195–250. doi: 10.1016/bs.acc.2015.12.001.
- [15] J. C. Edwards, “Principles of NMR.”
- [16] D. Klein, *Οργανική Χημεία - Τόμος II*, 2nd ed. Εκδόσεις Utopia, 2015.
- [17] L. G. Wade, *Οργανική Χημεία*, 7th ed. Εκδόσεις Τζιόλα, 2010.
- [18] J. H. F. Bothwell and J. L. Griffin, “An introduction to biological nuclear magnetic resonance spectroscopy,” *Biological Reviews*, vol. 86, no. 2. pp. 493–510, May 2011. doi: 10.1111/j.1469-185X.2010.00157.x.
- [19] G. A. N. Gowda, S. Zhang, H. Gu, V. Asiago, N. Shanaiah, and D. Raftery, “Metabolomics-based methods for early disease diagnostics,” *Expert Review of Molecular Diagnostics*, vol. 8, no. 5. pp. 617–633, Sep. 2008. doi: 10.1586/14737159.8.5.617.
- [20] G. A. N. Gowda and D. Raftery, “NMR-Based Metabolomics Methods and Protocols Methods in Molecular Biology 2037.” [Online]. Available: <http://www.springer.com/series/7651>
- [21] C. E. Kostara, “Expanding the Molecular Disturbances of Lipoproteins in Cardiometabolic Diseases: Lessons from Lipidomics,” *Diagnostics*, vol. 13, no. 4. MDPI, Feb. 01, 2023. doi: 10.3390/diagnostics13040721.
- [22] R. Mandal, D. Chamot, and D. S. Wishart, “The role of the Human Metabolome Database in inborn errors of metabolism,” *Journal of Inherited Metabolic Disease*, vol. 41, no. 3. Springer Netherlands, pp. 329–336, May 01, 2018. doi: 10.1007/s10545-018-0137-8.
- [23] Y. López-Hernández *et al.*, “The urinary metabolome of healthy newborns,” *Metabolites*, vol. 10, no. 4, Apr. 2020, doi: 10.3390/metabo10040165.
- [24] R. A. Iles, “Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Genetic Disorders,” 2008.
- [25] S. Aygen *et al.*, “NMR-Based screening for inborn errors of metabolism: Initial results from a study on Turkish neonates,” in *JIMD Reports*, Springer, 2014, pp. 101–111. doi: 10.1007/8904_2014_326.
- [26] N. Embade *et al.*, “NMR-based newborn urine screening for optimized detection of inherited errors of metabolism,” *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-49685-x.
- [27] F. Ezgu, “Inborn Errors of Metabolism,” in *Advances in Clinical Chemistry*, Academic Press Inc., 2016, pp. 195–250. doi: 10.1016/bs.acc.2015.12.001.
- [28] K. Vaidyanathan and S. Gopalakrishnan, “A Review Novel biomarkers for inborn errors of metabolism in the metabolomics era,” 2018.
- [29] U. F. H. Engelke *et al.*, “Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörungen in der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin Handbook of 1 H-NMR spectroscopy in inborn errors of metabolism: body fluid NMR spectroscopy and in vivo MR spectroscopy A P S E D I T I O N,” 2007. [Online]. Available: www.ags.nl

- [30] G. Pontoni, F. Rotondo, M. Carteni-Farina, and V. Zappia, "Diagnosis and follow-up of inborn errors of amino acid metabolism: Use of proton magnetic resonance of biological fluids," *Amino Acids*, vol. 10, no. 4, pp. 305–315, 1996, doi: 10.1007/BF00805859.
- [31] E. Holmes, P. J. D. Foxall, M. Spraul, R. D. Farrant, J. K. Nicholson, and J. C. Lindon, "750 MHz ¹H NMR spectroscopy characterisation of the complex metabolic pattern of urine from patients with inborn errors of metabolism: 2-hydroxyglutaric aciduria and maple syrup urine disease," *J Pharm Biomed Anal*, vol. 15, no. 11, pp. 1647–1659, Jul. 1997, doi: 10.1016/S0731-7085(97)00066-6.
- [32] N. Pulido *et al.*, "¹H-nuclear magnetic resonance analysis of urine as diagnostic tool for organic acidemias and aminoacidopathies," *Metabolites*, vol. 11, no. 12, p. 891, Dec. 2021, doi: 10.3390/METABO11120891/S1.
- [33] N. Blau, F. J. van Spronsen, and H. L. Levy, "Phenylketonuria," 2010. [Online]. Available: www.thelancet.com
- [34] Z. Pan *et al.*, "Principal component analysis of urine metabolites detected by NMR and DESI-MS in patients with inborn errors of metabolism," *Anal Bioanal Chem*, vol. 387, no. 2, pp. 539–549, Jan. 2007, doi: 10.1007/S00216-006-0546-7/TABLES/4.
- [35] H. Blasco *et al.*, "A multiplatform metabolomics approach to characterize plasma levels of phenylalanine and tyrosine in phenylketonuria," *JIMD Rep*, vol. 32, pp. 69–79, 2017, doi: 10.1007/8904_2016_568/FIGURES/4.
- [36] C. Cannet *et al.*, "Lower plasma cholesterol, LDL-cholesterol and LDL-lipoprotein subclasses in adult phenylketonuria (PKU) patients compared to healthy controls: Results of NMR metabolomics investigation," *Orphanet J Rare Dis*, vol. 15, no. 1, pp. 1–7, Feb. 2020, doi: 10.1186/S13023-020-1329-5/FIGURES/2.
- [37] N. Blau, C. Dionisi, V. Carlos, R. Ferreira, C. Vianey-Saban, and C. D. M. van Karnebeek, "Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases Second Edition."
- [38] D. Bal, A. Kraska-Dziadecka, W. Gradowska, and A. Gryff-Keller, "Investigation of a wide spectrum of inherited metabolic disorders by ¹³C NMR spectroscopy", Accessed: Dec. 20, 2022. [Online]. Available: www.actabp.pl
- [39] Z. Pan *et al.*, "Principal component analysis of urine metabolites detected by NMR and DESI-MS in patients with inborn errors of metabolism," *Anal Bioanal Chem*, vol. 387, no. 2, pp. 539–549, Jan. 2007, doi: 10.1007/S00216-006-0546-7/TABLES/4.
- [40] N. Shanaiah, M. A. Desilva, G. A. N. Gowda, M. A. Raftery, B. E. Hainline, and D. Raftery, "Class selection of amino acid metabolites in body fluids using chemical derivatization and their enhanced ¹³C NMR," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, no. 28, pp. 11540–11544, Jul. 2007, doi: 10.1073/PNAS.0704449104.
- [41] U. F. H. Engelke *et al.*, "N-acetylated metabolites in urine: proton nuclear magnetic resonance spectroscopic study on patients with inborn errors of

- metabolism,” *Clin Chem*, vol. 50, no. 1, pp. 58–66, Jan. 2004, doi: 10.1373/CLINCHEM.2003.020214.
- [42] G. Pontoni, F. Rotondo, M. Carteni-Farina, and V. Zappia, “Diagnosis and follow-up of inborn errors of amino acid metabolism: Use of proton magnetic resonance of biological fluids,” *Amino Acids 1996 10:4*, vol. 10, no. 4, pp. 305–315, 1996, doi: 10.1007/BF00805859.
- [43] D. Demirbas, A. I. Coelho, M. E. Rubio-Gozalbo, and G. T. Berry, “Hereditary galactosemia,” *Metabolism*, vol. 83, pp. 188–196, Jun. 2018, doi: 10.1016/J.METABOL.2018.01.025.
- [44] A. Grama *et al.*, “Novel Mutation in GALT Gene in Galactosemia Patient with Group B Streptococcus Meningitis and Acute Liver Failure,” *Medicina (Kaunas)*, vol. 55, no. 4, Apr. 2019, doi: 10.3390/MEDICINA55040091.
- [45] M. Scurtul *et al.*, “BULETIN DE PERINATOLOGIE 1(90) • 2021 INSTITUTUL MAMEI SI COPILULUI SOCIETATEA DE PEDIATRIE DIN REPUBLICA MOLDOVA 76 CLASSICAL GALACTOSEMIA-A CASE REPORT”.
- [46] S. L. Wehrli, G. T. Berry, M. Palmieri, A. Mazur, L. Elsas, and S. Segal, “Urinary Galactonate in Patients with Galactosemia: Quantitation by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy,” *Pediatric Research 1997 42:6*, vol. 42, no. 6, pp. 855–861, 1997, doi: 10.1203/00006450-199712000-00022.
- [47] C. R. Ferreira and C. D. M. van Karnebeek, “Inborn errors of metabolism,” in *Handbook of Clinical Neurology*, Elsevier B.V., 2019, pp. 449–481. doi: 10.1016/B978-0-444-64029-1.00022-9.
- [48] S. Yamaguchi, N. Koda, Y. Eto, and K. Aoki, “Quick screening and diagnosis of organic acidemia by NMR urinalysis,” *J Pediatr*, vol. 106, no. 4, pp. 620–622, 1985, doi: 10.1016/S0022-3476(85)80088-3.
- [49] S. Kodama *et al.*, “¹H-NMR Studies of Urine in Propionic Acidemia and Methylmalonic Acidemia,” *Pediatrics International*, vol. 33, no. 2, pp. 139–145, Apr. 1991, doi: 10.1111/J.1442-200X.1991.TB01534.X.
- [50] A. Nicolescu *et al.*, “Monitoring Methylmalonic Aciduria by NMR Urinomics,” *Molecules*, vol. 25, no. 22, Nov. 2020, doi: 10.3390/MOLECULES25225312.
- [51] M. Oostendorp, U. F. H. Engelke, M. A. A. P. Willemsen, and R. A. Wevers, “Diagnosing Inborn Errors of Lipid Metabolism with Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy,” *Clin Chem*, vol. 52, no. 7, pp. 1395–1405, Jul. 2006, doi: 10.1373/CLINCHEM.2006.069112.
- [52] C. Battisti *et al.*, “A new case of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: clinical, biochemical, genetic and (1)H-NMR spectroscopic studies,” *Neurol Sci*, vol. 28, no. 6, pp. 328–330, Sep. 2007, doi: 10.1007/S10072-007-0847-4.
- [53] N. Pulido *et al.*, “¹H-nuclear magnetic resonance analysis of urine as diagnostic tool for organic acidemias and aminoacidopathies,” *Metabolites*, vol. 11, no. 12, p. 891, Dec. 2021, doi: 10.3390/METABO11120891/S1.

- [54] H. Gu *et al.*, “¹H NMR metabolomics study of age profiling in children,” *NMR Biomed*, vol. 22, no. 8, p. 826, 2009, doi: 10.1002/NBM.1395.
- [55] L. Maitre *et al.*, “Assessment of metabolic phenotypic variability in children’s urine using ¹H NMR spectroscopy,” *Sci Rep*, vol. 7, Apr. 2017, doi: 10.1038/SREP46082.
- [56] Z. Lukacs, “Mucopolysaccharides,” *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics*, pp. 287–324, 2008, doi: 10.1007/978-3-540-76698-8_17/COVER.
- [57] R. Giugliani *et al.*, “Guidelines for diagnosis and treatment of Hunter Syndrome for clinicians in Latin America,” *Genet Mol Biol*, vol. 37, no. 2, p. 315, 2014, doi: 10.1590/S1415-47572014000300003.
- [58] M. Hochuli, K. Wüthrich, and B. Steinmann, “Two-dimensional NMR spectroscopy of urinary glycosaminoglycans from patients with different mucopolysaccharidoses,” *NMR in Biomedicine*, vol. 16, no. 4, pp. 224–236, Jun. 2003. doi: 10.1002/nbm.833.
- [59] R. M. Leadley *et al.*, “A systematic review of the prevalence of Morquio A syndrome: challenges for study reporting in rare diseases,” *Orphanet J Rare Dis*, vol. 9, p. 173, Nov. 2014, doi: 10.1186/S13023-014-0173-X.
- [60] J. F. Cabello and D. Marsden, “Pompe disease: clinical perspectives,” 2017, doi: 10.2147/ODRR.S69109.
- [61] S. Taverna *et al.*, “Pompe disease: pathogenesis, molecular genetics and diagnosis,” *Aging*, vol. 12, no. 15, pp. 15856–15874, Aug. 2020, doi: 10.18632/AGING.103794.
- [62] S. P. Young *et al.*, “Assessing disease severity in Pompe disease: The roles of a urinary glucose tetrasaccharide biomarker and imaging techniques,” *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, vol. 160C, no. 1, pp. 50–58, Feb. 2012, doi: 10.1002/AJMG.C.31320.
- [63] Z. Pakanová *et al.*, “Molecular diagnosis of Pompe disease using MALDI TOF/TOF and ¹H NMR,” *Chemical Papers*, vol. 70, no. 3, pp. 265–271, Mar. 2016, doi: 10.1515/CHEMPAP-2015-0218/METRICS.
- [64] G. Beha *et al.*, “FP.19 Quantification of glycogen distribution in late-onset Pompe patients using 7 Tesla C13 NMR spectroscopy,” *Neuromuscular Disorders*, vol. 32, p. S73, Oct. 2022, doi: 10.1016/J.NMD.2022.07.132.
- [65] “Trimethylaminuria related to the choline concentration of infant formula 2003”.
- [66] N. G. G. M. Abeling, A. H. van Gennip, H. D. Bakker, A. Heerschap, U. Engelke, and R. A. Wevers, “Diagnosis of a new case of trimethylaminuria using direct proton NMR spectroscopy of urine,” *J Inherit Metab Dis*, vol. 18, no. 2, pp. 182–184, Mar. 1995, doi: 10.1007/BF00711761.
- [67] S. Maschke *et al.*, “¹H-NMR analysis of trimethylamine in urine for the diagnosis of fish-odour syndrome,” *Clin Chim Acta*, vol. 263, no. 2, pp. 139–146, Jul. 1997, doi: 10.1016/S0009-8981(97)00060-0.

- [68] P. Podadera, J. A. G. Arêas, and U. M. Lanfer-Marquez, "Diagnosis of suspected trimethylaminuria by NMR spectroscopy," *Clin Chim Acta*, vol. 351, no. 1–2, pp. 149–154, 2005, doi: 10.1016/J.CCCN.2004.09.006.
- [69] N. Bouchemal *et al.*, "Diagnosis and phenotypic assessment of trimethylaminuria, and its treatment with riboflavin: ¹H NMR spectroscopy and genetic testing," *Orphanet J Rare Dis*, vol. 14, no. 1, Sep. 2019, doi: 10.1186/S13023-019-1174-6.
- [70] C. Veyrat-Durebex *et al.*, "Quality consideration for the validation of urine TMA and TMAO measurement by nuclear magnetic resonance spectroscopy in Fish Odor Syndrome," *Anal Biochem*, vol. 630, p. 114330, Oct. 2021, doi: 10.1016/J.AB.2021.114330.
- [71] K. Williams, A. Segard, and G. A. Graf, "Sitosterolemia: Twenty Years of Discovery of the Function of ABCG5ABCG8," *International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 2641*, vol. 22, no. 5, p. 2641, Mar. 2021, doi: 10.3390/IJMS22052641.
- [72] D. M. Niu *et al.*, "Clinical observations, molecular genetic analysis, and treatment of sitosterolemia in infants and children," *J Inherit Metab Dis*, vol. 33, no. 4, pp. 437–443, Aug. 2010, doi: 10.1007/S10545-010-9126-2/TABLES/1.
- [73] A. Liebeskind, A. L. Peterson, and D. P. Wilson, "Sitosterolemia in the Pediatric Population," *Endotext*, Jan. 2020, Accessed: Jan. 17, 2023. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK395586/>
- [74] I. Andrade, L. Santos, and F. Ramos, "Advances in analytical methods to study cholesterol metabolism: the determination of serum noncholesterol sterols," *Biomed Chromatogr*, vol. 27, no. 10, pp. 1234–1242, Oct. 2013, doi: 10.1002/BMC.2840.
- [75] D. C. Rees *et al.*, "Stomatocytic haemolysis and macrothrombocytopenia (Mediterranean stomatocytosis/macrothrombocytopenia) is the haematological presentation of phytosterolaemia," *Br J Haematol*, vol. 130, no. 2, pp. 297–309, Jul. 2005, doi: 10.1111/J.1365-2141.2005.05599.X.